

**Entwicklung einer neuen zellbasierten
Qualitätskontrolle der extrakorporalen Photopherese
durch CD71-Oberflächenfärbung und
Apoptosequantifizierung**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schwab, Laura Aileen
aus Kirchheimbolanden

Gießen 2020

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
unter der Leitung von Prof. Dr. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. Thilo Jakob

Tag der Disputation: 19.02.2021

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	EINFÜHRUNG	1
1.2	8-METHOXYPORALEN	1
1.3	GESCHICHTE DER ECP	2
1.4	EINSATZGEBIETE DER ECP	3
1.4.1	CTCL	3
1.4.2	GvHD	4
1.4.3	ABSTOßUNGSREAKTIONEN NACH ORGANTRANSPLANTATION	4
1.4.3.1	Lungentransplantation	4
1.4.3.2	Herztransplantation	5
1.4.4	SONSTIGE	5
1.5	KLINISCHE DURCHFÜHRUNG DER ECP	6
1.6	NEBENWIRKUNGEN DER ECP UND KONTRAINDIKATIONEN	7
1.7	WIRKMECHANISMEN DER ECP	8
1.7.1	DIE IMPFTHEORIE	8
1.7.2	TOLERANZINDUKTION	9
1.7.3	MODULATION DER ZYTKINPRODUKTION NACH ECP	9
1.7.4	VERSCHIEBUNG DER TH2 ZU TH1- ANTWORT NACH ECP	10
1.8	QUALITÄTSKONTROLLE DER ECP	10
1.8.1	MESSUNG DER ³ H-THYMIDIN-AUFNAHME IN DIE DNA NACH ECP	11
1.8.2	QUANTIFIZIERUNG DER PROLIFERATIONSSINHIBITION DURCH DEN FLUORESCENZFARBSTOFF CFSE	11
1.8.3	KOMBINATIONSPROTOKOLL AUS PROLIFERATIONS- UND APOPTOSEMESSUNG	12
1.8.4	APOPTOSEMESSUNG ALS ALLEINIGE QUALITÄTSKONTROLLE DER ECP	12
1.9	ZIELSETZUNG	12
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	14
2.1	MATERIALIEN	14
2.1.1	GERÄTE UND ZUBEHÖR	14
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	15
2.1.3	STIMULATIONSENTKÖRPER	16
2.1.4	MITOGENE UND DAS ZYTKIN INTERLEUKIN-2	16

2.1.5	MONOKLONALE ANTIKÖRPER UND REAGENZIEN ZUR DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN ANALYSE	17
2.1.6	CHEMIKALIEN	18
2.1.7	BEADS	20
2.2	METHODEN	20
2.2.1	EXPERIMENTELLE PHOTOPHERESE	20
2.2.1.1	Gewinnung von peripheren humanen mononukleären Zellen	20
2.2.1.2	Versuchsaufbau der experimentellen Photopherese	21
2.2.2	EXTRAKORPORALE PHOTOPHERESE	22
2.2.2.1	Durchführung der extrakorporalen Photopherese	22
2.2.2.2	Klinische Proben	22
2.2.3	CFSE-MARKIERUNG	23
2.2.4	STIMULATION DER ZELLEN	23
2.2.5	VALIDIERUNG DES CD71-ASSAYS	24
2.2.5.1	Gesunde Blutspender	24
2.2.5.2	Patientenproben	25
2.2.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	25
2.2.6.1	Hintergrund	25
2.2.6.2	Kompensation	26
2.2.6.3	Färbeprotokoll	26
2.2.6.4	CFSE-Bestimmung	26
2.2.6.5	Apoptosebestimmung	27
2.2.6.6	Bestimmung der absoluten Zellzahl	28
2.2.6.7	Gatingstrategie zur Identifizierung proliferierender T-Zellen	28
2.2.6.8	Gatingstrategie zur Identifizierung apoptotischer Zellen	30
2.2.7	STATISTIK	31
3	<u>ERGEBNISSE</u>	32
3.1	VORVERSUCHE MIT PBMCs GESUNDER BLUTSPENDER	32
3.1.1	VERGLEICH DER Ki-67 EXPRESSION NACH EINSATZ UNTERSCHIEDLICHER T-ZELLSTIMULANZIEN	32
3.1.2	VERGLEICH DER Ki-67- UND CD71- EXPRESSION NACH UNTERSCHIEDLICHER T-ZELL STIMULATION UND EINSATZ DER EXTRAKORPORALEN PHOTOPHERESE	33
3.1.3	OPTIMIERUNG DER T-ZELLSTIMULATION	34
3.1.4	UNTERSUCHUNG DES PHOTOPHERESEEFFEKTS NACH VERLÄNGERUNG DES ZEITABSTANDES ZWISCHEN UVA/ 8-MOP-BEHANDLUNG UND ZELLSTIMULATION	36

3.1.5	UNTERSUCHUNG DER KINETIK DER CD71-, CD69- UND CD25- EXPRESSION NACH EXPERIMENTELLER PHOTOPHERESE.....	37
3.1.5.1	CD71	37
3.1.5.2	CD69	38
3.1.5.3	CD25	38
3.1.6	SERUMABHÄNGIGE EXPRESSION DES OBERFLÄCHENMARKERS CD69 NACH BESTRAHLUNG DER ZELLEN.....	40
3.1.7	WEITERE KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN DER CD71-EXPRESSION IN BESTRAHLTEN ZELLEN ZUR ERMITTLUNG DER OPTIMALEN STIMULATIONSDAUER.....	41
3.2	VALIDIERUNG DES CD71- UND APOPTOSE- ASSAYS AN PBMCs GESUNDER BLUTSPENDER.....	43
3.2.1	VALIDIERUNG DES CD71- ASSAYS UND VERGLEICH MIT DEM GOLDSTANDARD DER CFSE-FLUORESZENZMARKIERUNG	43
3.2.2	ÜBERPRÜFUNG DER APOPTOSE NACH EINSATZ DER EXPERIMENTELLEN PHOTOPHERESE	47
3.2.3	VERGLEICH DES CD71- UND APOPTOSEASSAYS.....	48
3.3	VORVERSUCHE MIT PBMCs AUS PATIENTENPROBEN.....	49
3.3.1	VERLÄNGERUNG DES ZEITABSTANDES ZWISCHEN ECP UND STIMULATION DER ZELLEN.	49
3.3.2	ÜBERPRÜFUNG DER STIMULATION IN PATIENTENPROBEN.....	50
3.4	VALIDIERUNG DES APOPTOSEASSAYS UND DES CD71-ASSAYS AN PBMCs AUS PATIENTENPROBEN.....	51
3.4.1	UNTERSUCHUNG DER APOPTOSE NACH ECP	51
3.4.2	UNTERSUCHUNG DER CD71-EXPRESSION IN PATIENTENPROBEN NACH ECP UND VERGLEICH MIT DEM GOLDSTANDARD DER CFSE-FLUORESZENZMARKIERUNG	54
<u>4</u>	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>57</u>
4.1	LIMITIERUNGEN DES ³ H-THYMIDIN-, CFSE- UND APOPTOSEASSAYS	57
4.2	EIGNUNG VON Ki-67, CD71 UND WEITEREN T-ZELLAKTIVIERUNGSMARKERN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER UVA-/8-MOP-BEHANDLUNG	58
4.2.1	CD69.....	60
4.3	VALIDIERUNG DES CD71-ASSAYS UND VERGLEICH MIT DEM GOLDSTANDARD DER CFSE- FLUORESZENZMARKIERUNG UND DER APOPTOSEMESSUNG	61
4.3.1	DARSTELLUNG DES DELTA-WERTES DER CD71-EXPRESSION.....	61
4.3.2	VERGLEICH DES CD71- UND CFSE- ASSAYS	62
4.3.3	APOPTOSEMESSUNG	63

4.3.4	VORZÜGE DES CD71-ASSAYS.....	64
4.3.5	CD71 TEST-LIMITIERUNG	65
4.4	VALIDIERUNG DES APOPTOSEASSAYS AN PBMCs AUS PATIENTENPROBEN.....	66
4.5	VALIDIERUNG DES CD71-ASSAYS AN PBMCs AUS PATIENTENPROBEN.....	67
5	<u>AUSBLICK.....</u>	69
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	70
7	<u>SUMMARY.....</u>	71
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	72
9	<u>ANHANG.....</u>	83
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	83
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	84
9.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	86
10	<u>PUBLIKATIONEN.....</u>	87
11	<u>DANKSAGUNG</u>	88

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Extrakorporale Photopherese (ECP) ist ein immunmodulatorisches Verfahren, das seit über 30 Jahren erfolgreich zur Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL, *engl. cutaneous T-cell lymphoma*) eingesetzt wird (Edelson et al., 1987; Scarisbrick et al., 2008; Zic, 2003). Im Laufe der Jahre wurde das Indikationsspektrum stark erweitert, sodass die ECP mittlerweile bei weiteren T-zellvermittelten Erkrankungen zum Einsatz kommt. Dazu gehören vor allem die *Graft-versus-Host Disease* (GvHD, Transplantat-gegen-Wirt Reaktion) und Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation (Benden et al., 2008; Dignan et al., 2012; Kirklin et al., 2006; Scarisbrick et al., 2008; D. Wolff et al., 2011). Aktuell wird die Wirkung der ECP in der Therapie der atopischen Dermatitis, der Sklerodermie, des Morbus Crohn, des Diabetes Typ 1 und weiteren entzündlich- oder autoimmunbedingten Krankheiten untersucht (Knobler et al., 2014). Die ECP ist eine Kombinationstherapie aus Leukapherese und anschließender UVA-Exposition der Zellen und wird aktuell in über 200 Zentren weltweit durchgeführt (Knobler et al., 2009). Dem Patienten wird bei der Behandlung zunächst Blut entnommen, dies zentrifugiert, und der dabei entstandene Leukozytenfilm mit dem Photosensibilisator 8-Methoxypsoralen versetzt. Es folgt die Bestrahlung der Zellen mit UVA-Licht und die Rückführung der behandelten Zellen in den Blutkreislauf des Patienten (Schooneman, 2003).

1.2 8-Methoxypsoralen

Psoralene sind eine Untergruppe der sogenannten Furocumarine, die als sekundäre Pflanzenstoffe in der Natur vorkommen. Furocumarine sind trizyklische aromatische Verbindungen und entstehen aus der Fusion eines Cumarinmoleküls und eines Furanringes. Diese besondere Struktur verleiht ihnen die Eigenschaft langwellige UVA-Strahlung zu absorbieren und Bindungen mit der Zell-DNA einzugehen (Gasparro et al., 1989). Sie sensibilisieren die Zelle also für UVA-Licht. 8-Methoxypsoralen (8-MOP) ist ein Extrakt der Pflanze *Ammi majus*, welche von den Ägyptern schon vor hunderten Jahren zur topischen Anwendung bei Vitiligo genutzt wurde (Fitzpatrick & Pathak, 1959). 1947 wurde 8-MOP als die aktive Komponente der Pflanze identifiziert (Fahmy & Abu-Shady, 1947). 8-MOP ist ein kleines lipophiles Molekül, dass schnell in das Zellinnere und den Zellkern eindringt. Ohne Aktivierung durch UVA-Licht bleibt 8-MOP wirkungslos.

Unter Bestrahlung im optimalen Wellenlängenbereich von 320-400nm wird es hochreaktiv und bildet kovalente Bindungen mit der Pyrimidinbase Thymin der DNA aus. Dieses Einlagern in den DNA-Strang wird Interkalation genannt. Werden zwei Thyminbasen der DNA durch ein Molekül 8-MOP verbunden kommt es zur Ausbildung sogenannter „Cross-Links“, also Quervernetzungen der DNA. Auch andere Proteine und Lipide können durch das reaktive 8-MOP verändert oder gebunden werden, was letztendlich zu Zellmembranschäden, Apoptose, Veränderung der Immunogenität und zur Aktivierung Antigenpräsentierender Zellen führen kann (Heshmati, 2003).

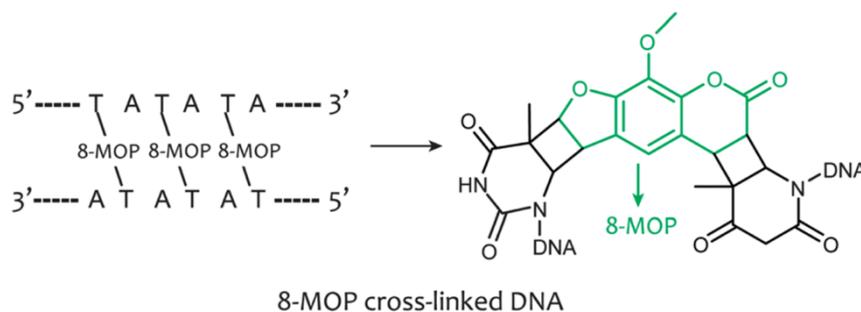


Abb. 1: Schematische Darstellung der Bildung von "Cross-Links" im DNA-Doppelstrang durch 8-MOP zwischen Thymin-Basenpaaren (Xie et al., 2013)

1.3 Geschichte der ECP

Der Vorläufer der ECP war die sogenannte Photochemotherapie oder auch PUVA (Psoralen plus UVA-Licht), die etwa in den 70er Jahren entstand. Untersucht wurden in dieser Zeit vor allem Psoriasis-Patienten nach oraler Applikation von Psoralen und topischer Bestrahlung mit langwelligem UVA-Licht (Parrish et al., 1974; K. Wolff et al., 1975). Etwa zeitgleich konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Sézary-Syndrom, eine Variante des CTCL erfolgreich mit der Leukapherese, also der Separierung und Entnahme von Leukozyten aus dem Vollblut, behandelt werden können (Edelson et al. 1974; Pineda and Winkelmann 1981). Die PUVA wurde einige Jahre später ebenfalls zur palliativen Behandlung des CTCL eingesetzt (Gilchrest, 1979). Diese beiden Therapien (PUVA und Leukapherese) ebneten den Weg hin zur ECP, indem sie erstmals Mitte der achtziger Jahre kombiniert bei CTCL angewendet wurden. Es zeigte sich ein Erfolg der ECP auch bei Patienten mit zum Teil chemotherapeutischer Resistenz der Erkrankung. Vermutet wurde eine Immunreaktion auf die reinfundierten, bestrahlten Zellen mit der Folge einer Aktivitätsabnahme maligner T-Zellen (Edelson et al. 1987).

Diese Ergebnisse veranlasste die *US Food and Drug Administration* 1988 dazu, die ECP als Therapie bei CTCL zuzulassen (Edelson 1989; Zic et al. 1999). Aufgrund ihrer Effektivität und dem geringen Nebenwirkungsspektrum wurde die ECP in den darauffolgenden Jahren weiterentwickelt und ihre Wirkung in der Therapie anderer Erkrankungen untersucht.

1.4 Einsatzgebiete der ECP

1.4.1 CTCL

Der Ausdruck CTCL umfasst eine heterogene Gruppe von malignen kutanen lymphatischen Neoplasien. Dabei kommt es durch eine Störung der T-Zellfunktion zu einer Akkumulation eines malignen T-Zell-Klons in der Haut. Die zwei häufigsten Varianten des CTCL sind die Mycosis fungoides (MF) und das Sézary-Syndrom (SS) (Knobler et al., 2014). Im schwierig zu diagnostizierenden Frühstadium der MF bilden sich ekzemartige Herde der Haut, die Jahre bis Jahrzehnte persistieren können. Schreitet die Krankheit fort, dehnen sich die Herde zu halbkugelartigen, teilweise ulzerierenden Tumoren aus. Das SS ist eine aggressive und leukämische Variante des CTCL, bei der neben dem generalisierten Hautbefall (Erythrodermie) atypische T-Zellen, sogenannte Sézary-Zellen, im Blut zirkulieren und Organe befallen können (Jawed et al., 2014). Entscheidend für die klinische Indikationsstellung der ECP sind die Leitlinien der Amerikanischen Gesellschaft für Apherese (ASFA, *engl. American Society For Apheresis*,). Patienten, die einen Sézary-Zellanteil von über 5% aufweisen, an einer refraktären Erkrankung leiden oder sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befinden, profitieren neben einer systemischen Therapie von der ECP (Schwartz et al., 2016). Laut den S1-Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft ist die ECP in Deutschland zur palliativen Therapie von Hautmanifestationen des CTCL zugelassen, falls andere Behandlungsformen nicht ansprechen. Liegt eine Erythrodermie vor, wird die ECP, je nach Stadium der Erythrodermie, als Erstlinientherapie empfohlen (Schiller et al., 2011).

Die ECP sollte beim CTCL an zwei aufeinanderfolgenden Tagen alle zwei bis vier Wochen für mindestens sechs Monate durchgeführt werden. Bei maximalem Ansprechen kann das Behandlungsintervall auf vier bis acht Wochen erweitert werden. Bei Nicht-Ansprechen kommen Kombinationstherapien (z.B. ECP in Kombination mit einer Chemotherapie) in Frage (Knobler, 2014; Schiller et al., 2011).

1.4.2 GvHD

Bei vielen malignen hämatologischen Erkrankungen kann eine allogene Stammzelltransplantation zum Einsatz kommen (D'Souza et al., 2017). Die GvHD ist eine schwere Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation bei der Spender-T-Zellen Gewebe des Empfängers als fremd erkennen und schädigen. Die Folgen können sehr unterschiedlich sein und betreffen vor allem die Haut und Schleimhäute, die Augen, den Gastrointestinaltrakt, die Leber und die Lunge (Hymes, Alousi, & Cowen 2012). Die GvHD wird in eine akute und chronische Verlaufsform eingeteilt. In 50% der Fälle geht die akute in die chronische GvHD über. Beide Formen werden in der Erstlinien-Therapie mit Immunsuppressiva therapiert. Zum Einsatz kommen vorrangig Kortikosteroide und Calcineurininhibitoren (Jamil & Mineishi, 2015). In den Leitlinien der ASFA wird die ECP bei der GvHD als weitere Therapieoption aufgeführt (Schwartz et al., 2016). Bei der steroidabhängigen oder steroidrefraktären akuten GvHD kann die ECP adjunktiv eingesetzt werden. Die Gesamtansprechraten der ECP für die steroidrefraktäre akute GvHD liegen Studien zufolge zwischen 52 und 100%; davon betreffen 66-100% die Haut, 40-83% den Gastrointestinaltrakt und 27-71% die Leber (Schwartz et al., 2016). Bei der steroidabhängigen oder steroidrefraktären chronischen GvHD wird die ECP als Zweitlinien-Therapie empfohlen. Die Behandlung sollte wöchentlich, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt werden, wobei sich die Gesamtdauer der Therapie nach dem Therapieansprechen richtet (Schiller et al., 2011).

1.4.3 Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation

1.4.3.1 Lungentransplantation

Die Abstoßung eines allogenen Transplantats ist ebenfalls eine T-Zellvermittelte Reaktion, die durch Einsatz immunsuppressiver Medikamente unterdrückt werden soll. In der Erhaltungstherapie nach Lungentransplantation wird oft eine dreifach Kombination aus Kortikosteroiden, einem Calcineurininhibitor und einem Zellzyklusinhibitor wie Azathioprin oder Mycophenolat-Mofetil eingesetzt (Snell et al., 2013). Trotz des ausgeprägten immunsuppressiven Regimes kommt es häufig zu chronischen Abstoßungsreaktionen in Form des Bronchiolitis Obliterans Syndroms. Diese Pathologie betrifft die distalen intrapulmonalen Verzweigungen. Zusätzliche therapeutische Optionen sind dann ein Klassenwechsel oder eine Dosiserhöhung der Immunsuppressiva. (Knobler et al., 2014). Wenn diese konventionellen Therapieschemata keine adäquate Antwort erzeugen, kann die ECP unterstützend, wie

mehrere Studien bestätigen, eingesetzt werden (Andreu et al., 1995; Benden et al., 2008; Jaksch et al., 2012; O'Hagan et al., 1999; Slovis et al., 1995; Villanueva et al., 2000). Laut ASFA-Leitlinien wird die ECP beim Bronchiolitis Obliterans Syndrom sechs Monate angewendet. Davon sollten fünf Zyklen im ersten Monat, zwei Zyklen in den folgenden zwei Monaten und jeweils ein Zyklus pro Monat in den letzten drei Monaten stattfinden (Schwartz et al., 2016).

1.4.3.2 Herztransplantation

Die ECP kann nach einer Herztransplantation als supportive Therapie ergänzend zum immunsuppressiven Regime eingesetzt werden (Barr et al., 1998; Kirklin et al., 2006). Da die existierenden Studien erhebliche Protokollunterschiede aufweisen, kann aktuell keine eindeutige Therapieempfehlung ausgesprochen werden (Knobler, 2014). Die ASFA-Leitlinien empfehlen eine ECP Prozedur an zwei aufeinanderfolgenden Tagen entweder wöchentlich oder im Abstand von zwei bis acht Wochen bis zur Stabilisierung der Erkrankung (Schwartz et al., 2016).

1.4.4 Sonstige

Es gibt Hinweise, dass die ECP einen positiven Einfluss bei der Prävention bzw. Therapie von Abstoßungsreaktionen bei Lebertransplantaten (Lehrer et al., 2000; Urbani et al., 2004, 2008) und Nierentransplantaten hat (Genberg et al., 2005; Jardine et al., 2009; Kusztal et al., 2011; Wolfe et al., 1996). Eine allgemeine Therapieempfehlung besteht jedoch nicht. Weitere Indikationen, mit zum Teil eingeschränkter Evidenz, können je nach Begleitumständen andere Autoimmunerkrankungen sein, wie z.B. die Systemische Sklerodermie (Knobler et al., 2006), Bullöse Autoimmundermatosen (Sanli et al., 2010; Wollina & Looks, 1999), die Atopische Dermatitis (Radenhausen et al., 2004), Lichen ruber planus (Kunte et al., 2005) oder Morbus Crohn (Reinisch et al., 2013, 2001). Für die meisten Indikationen fehlen prospektive, randomisierte Multizenterstudien, um allgemeingültige Aussagen zur Therapieempfehlung treffen zu können. Für die Atopische Dermatitis, die systemische Sklerodermie und den Pemphigus vulgaris, der zu den bullösen Autoimmundermatosen gehört, empfiehlt die ASFA eine Anwendung der ECP an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von zwei bis sechs Wochen (Schwartz et al., 2016).

1.5 Klinische Durchführung der ECP

Die ECP kann in drei Teilschritte gegliedert werden: Als erstes erfolgt die Separation des Vollblutes und die Gewinnung der mononukleären Zellen in Form eines Buffy Coats. Im zweiten Schritt folgt die Zugabe von 8-MOP und die anschließende Photoaktivierung der Zellen durch Bestrahlung mit UVA-Licht. Im letzten Schritt werden dem Patienten die behandelten Zellen rückinfundiert (Schooneman, 2003). Für die Durchführung der ECP wird in Deutschland neben dem geschulten Personal auch eine besondere räumliche und apparative Ausstattung benötigt. Dazu gehören speziell für die ECP zugelassene Geräte. Sogenannte integrierte (geschlossene oder „in-line“) Systeme, die die ersten beiden Schritte (Zellseparation und die anschließende UVA-Bestrahlung) automatisch nacheinander durchführen, werden bisweilen nur von dem „UVAR XTS“ - und dem „CELLEX“ -Photopherese-System der Firma Therakos realisiert. (Marshall, 2006; Perotti & Sniecinski, 2015). Offene Systeme („off-line“ Systeme) separieren die Zellen, die UVA-Bestrahlung muss jedoch manuell eingestellt werden. Ein ECP-Zyklus dauert je nach verwendetem System 1 bis 3 Stunden (Just & Knobler, 2015). Dem Patienten wird zunächst ein peripherer venöser Zugang gelegt, bevorzugt mit einer Dialylenadel an der Cubitalvene, um eine ausreichend hohe Flussrate des Blutes im Zellseparator zu erreichen. Nachdem der Patient mit dem Gerät verbunden ist, fließt sein Blut zunächst in eine integrierte Zentrifuge, wo es in die Bestandteile Erythrozyten, Leukozyten und Plasma getrennt wird. Die Erythrozyten und das Plasma werden dem Patienten zurückinfundiert, während der Leukozytenfilm (auch Buffy Coat genannt) weiter in einen separaten Plastikbeutel fließt. Um eine ausreichende Menge an mononukleären Zellen zu erhalten, muss dieser Zyklus 3 bis 6 Mal wiederholt werden (Ward, 2011). Der Buffy Coat besteht hauptsächlich aus Leukozyten, Thrombozyten, etwas Blutplasma und einigen Erythrozyten. Der Erythrozytenanteil im Buffy Coat darf einen bestimmten Wert nicht überschreiten, da die roten Blutzellen die Bestrahlung stören könnten. Schon ein Hämatokrit von durchschnittlich 5% kann einen abschirmenden Effekt auslösen (Gasparro et al., 1989; Lee & Garro, 1989; Ward, 2011). Nach vollendetem Sammelprozess wird der Buffy Coat mit Kochsalzlösung verdünnt, um ein konstantes Bestrahlungsvolumen zu erhalten. Anschließend erfolgt die Zugabe von 8-MOP in der Konzentration 200ng/ml (Schooneman, 2003). Die extrakorporale Applikation hat im Vergleich zur oralen 8-MOP-Einnahme zwei wesentliche Vorteile: Sie ist besser verträglich, da typische Nebenwirkungen der oralen 8-MOP-Einnahme wie Übelkeit, Schwindel, Erbrechen, Juckreiz und Diarrhö weniger häufig auftreten (Knobler et al., 1993). Außerdem kann es bei der oraler Gabe zu starken Konzentrationsschwankungen des 8-MOP kommen (Geskin, 2007; Shephard et al., 1999). Die gesammelten Zellen

fließen weiter in die Photoaktivierungskammer, wo sie mit UVA-Licht bestrahlt werden. Die Bestrahlungsstärke liegt bei 2 Joule/cm², der Wellenlängenbereich des UVA-Lichts liegt zwischen 320 und 400nm (Schooneman, 2003) . Danach werden die bestrahlten Zellen dem Patienten zurückinfundiert. Pro Behandlung werden etwa 10-15% der im Blut zirkulierenden Leukozyten der ECP ausgesetzt (Just & Knobler, 2015).

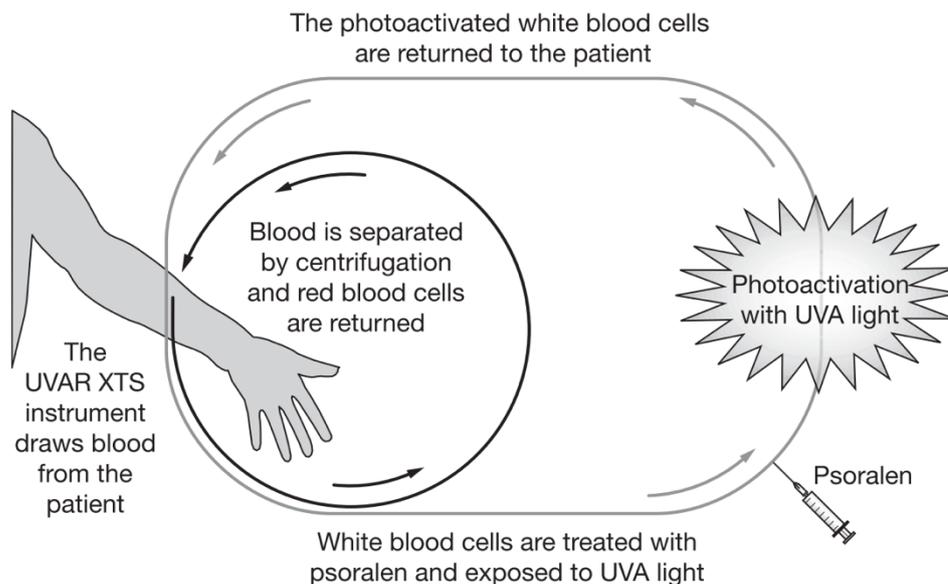


Abb. 2: Illustration des ECP- Ablaufs. (Marshall, 2006)

1.6 Nebenwirkungen der ECP und Kontraindikationen

Die ECP hat ein sehr geringes Nebenwirkungsspektrum. In unter 1% der behandelten Patienten kommt es während oder nach der ECP zu ECP-assoziierten Nebenwirkungen, wobei Übelkeit die häufigste Reaktion darstellt. Zu den leichten Nebenwirkungen gehören außerdem Kopfschmerzen, Fieber (typischerweise 4-12h nach der ECP-Behandlung) und Schüttelfrost. Zu den schweren Nebenwirkungen gehören die Ausbildung einer Hypotension, einer vasovagalen Synkope, lokale Hautinfektionen nach Anlage des venösen Zugangs, Gerinnungsstörungen nach Heparinabgabe, eine Anämie oder Sepsis (Scarlsbrick, 2009). Zu den Kontraindikationen der ECP-Therapie gehören eine bestehende Schwangerschaft, eine 8-MOP- Unverträglichkeit, eine ausgeprägte Anämie oder eine Gerinnungsstörung, wobei in vielen Fällen immer eine Nutzen-Risiko Abwägung erforderlich ist (Just & Knobler, 2015).

1.7 Wirkmechanismen der ECP

Obwohl die ECP seit über 30 Jahren angewendet wird, sind die genauen Wirkmechanismen nicht vollständig bekannt. Im Folgenden werden die bis heute aufgestellten Hypothesen und Untersuchungen vorgestellt.

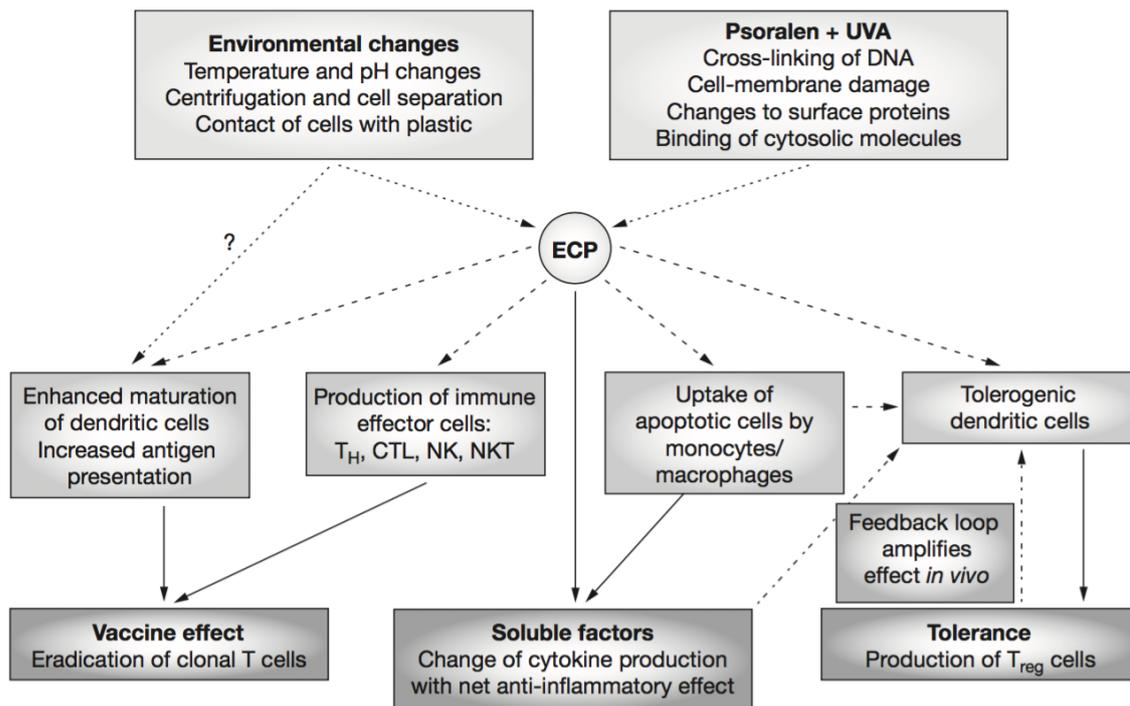


Abb. 3: Wirkmechanismen der ECP, Überblick (Marshall, 2006)

1.7.1 Die Impftheorie

Grundlage der Impftheorie ist die Initiierung einer Immunreaktion auf reinfundierte apoptotische Lymphozyten (Hannani, 2015). Sie spielt vor allem in der Erklärung des ECP-Erfolges bei CTCL eine Rolle. Die Apoptose der Lymphozyten wird durch die 8-MOP/UVA-Behandlung ausgelöst und beginnt etwa 24-72 Stunden nach Reinfusion (Yoo et al., 1996). Monozyten scheinen hingegen resistenter gegen die Behandlung zu sein, da sie keine erhöhte Apoptoserate nach ECP aufweisen (Tambur et al., 2000). Interessanterweise zeigen diese Zellen nach Kontakt mit den Kunststoffmaterialien des Photopheresesystems zu unreifen dendritischen Zellen (DZ) was die Analysen

spezifischer DZ-Oberflächenmarker, wie zum Beispiel CD83, bestätigen (Berger et al., 2010, 2001). Diese unreifen DZ sind in der Lage apoptotische Lymphozyten zu phagozytieren unter denen sich auch maligne CTCL-Lymphozyten befinden. Daraufhin differenzieren sich die DZ zu potenten DZ und exprimieren Antigene der Tumorzellen. Ausgereifte DZ sind hoch effizient in der Induktion einer Anti-Tumor Antwort (Timmerman & Levy, 1999). Diese besteht im Falle des CTCL in der Aktivierung und Proliferation von Effektorzellen gegen CTCL-T-Zellen wie zum Beispiel zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen. Dieser Vorgang wird auch Transimmunisierung genannt (Girardi et al., 2006).

1.7.2 Toleranzinduktion

Im Falle der GvHD scheint die sogenannte Toleranzinduktion eine wichtige Rolle zu spielen. Der Begriff Toleranzinduktion bezieht sich auf die Herabregulation der schädigenden Immunreaktion bei GvHD und geht wohl vor allem von den regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) aus. (Beres & Drobyski, 2013; Rezvani et al., 2006). T_{regs} können eine Immunantwort aktiv hemmen und regulieren so die Selbsttoleranz des Immunsystems. Sie sind CD4 positiv (CD4+) und exprimieren zusätzlich auf ihrer Oberfläche CD25. Der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3) ist ein weiterer T_{reg} -spezifischer Marker (Fontenot & Rudensky, 2005). In einem murinen Modell zur Kontakthypersensitivität konnte gezeigt werden, dass die Infusion von UVA/8-MOP behandelten Leukozyten zur Induktion von T_{reg} Zellen beiträgt (Maeda et al., 2005). Auch bei Patienten mit GvHD stieg der Anteil regulatorischer T-Zellen nach Einsatz der ECP signifikant an (Biagi et al., 2007; Di Biaso et al., 2009; Schmitt et al., 2009). Weiterhin zeigten ECP-induzierte T_{regs} eine Zell-Zell-kontaktabhängige Inhibition der Effektor T-Zellen bei GvHD (Biagi et al., 2007).

1.7.3 Modulation der Zytokinproduktion nach ECP

Durch Einsatz der ECP konnten sowohl Veränderungen des proinflammatorischen also auch antiinflammatorischen Zytokinmusters festgestellt werden. Wie Untersuchungen von CTCL Patienten zeigten, wurden die proinflammatorischen Marker TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) und Interleukin 6 (IL-6) von Monozyten nach ECP vermehrt gebildet. Es wird vermutet, dass das erhöhte entzündliche Milieu die Anti-Tumor Antwort des Immunsystems verbessert (Vowels et al., 1992). Das proinflammatorische Zytokin

IL-1b war bei Patienten nach der ECP-Behandlung ebenfalls erhöht (Yakut et al., 2015). Auch antiinflammatorische Signale können durch die ECP induziert werden. Dies ist vor allem bei Patienten mit GvHD relevant, die von diesem Effekt profitieren. Es konnte in diesem Zusammenhang eine erhöhte Produktion des anti-entzündlichen IL-10 festgestellt werden (Craciun et al., 2002; Di Renzo et al., 2005). Außerdem wurden bei GvHD-Patienten nach ECP reduzierte intrazelluläre Mengen von $\text{TNF}\alpha$, Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2 gemessen (Bladon & Taylor, 2005).

1.7.4 Verschiebung der TH2 zu TH1- Antwort nach ECP

Bei CTCL-Patienten zeigt der maligne T-Zellklon ein vermehrtes T-Helfer Typ 2 (TH2) Zytokinmuster, was sich durch eine Erhöhung von IL-4 und IL-5 äußert. Dies geht mit einer Dysbalance der TH1/TH2-Immunantwort zugunsten der TH2-Antwort einher (Guenova et al., 2013). Diese überschießende TH2 Reaktion hemmt jedoch die Antwort zytotoxischer T-Zellen, wodurch maligne Tumorzellen vermindert angegriffen werden und sich weiter ausbreiten können. Aktiviert werden zytotoxische T-Zellen hingegen von den TH1-Zellen. Diese werden von IL-12 stimuliert und produzieren INF- γ und IL-2 (Tokura, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine einjährige ECP-Therapie bei CTCL-Patienten zur Normalisierung von IL-4 sowie einem Anstieg von IL-12 und INF- γ führt (Di Renzo et al., 1997). Auch bei Patienten mit chronischer GvHD zeigte sich eine vermehrte monozytäre IL-12 Produktion. Diese Ergebnisse lassen eine Wiederherstellung der TH1/TH2- Balance durch die ECP vermuten. (Di Renzo et al., 2005).

1.8 Qualitätskontrolle der ECP

Die ECP ist ein zellbasiertes Verfahren, das die Behandlung weißer Blutzellen außerhalb des Körpers erfordert. Trotz jahrelanger klinischer Anwendung der ECP, konnte keine standardisierte, flächendeckende Qualitätskontrolle auf zellulärer Ebene etabliert werden (Pierelli et al., 2018). Die Bildung von Crosslinks der Zell-DNA mit nachfolgender Proliferationshemmung und Apoptose sind universell akzeptierte Folgen der ECP, weshalb die Effekte der UVA/8-MOP- Behandlung auf PBMCs bislang hinsichtlich des antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Effektes untersucht wurden (Schmid et al., 2015). Die Arbeitsgruppe um Pierelli führte 2018 eine Umfrage an Zentren durch, die die

ECP bei akuter GvHD routinemäßig einsetzen. Zur Qualitätskontrolle antworteten 50% der Zentren, dass die lymphozytäre Apoptose zwischen 72h und 96h nach ECP durchflusszytometrisch überprüft werden solle, außerdem müsse die Sterilität des ECP-Blutproduktes vor Reinfusion überprüft werden. Die übrigen 50% der Zentren führten teilweise Sterilitätskontrollen durch, eine zellbasierte Kontrolle sei jedoch nicht vorhanden (Pierelli et al., 2018). Diese Ergebnisse zeigen wie unterschiedlich die Kontrollen durchgeführt werden und wie wichtig eine universell akzeptierte Qualitätskontrolle ist, um einheitliche Qualitätsstandards der Zentren zu gewährleisten. Die bis heute getesteten Verfahren basieren auf der Messung der Proliferationsinhibition oder der Apoptosezunahme nach ECP.

1.8.1 Messung der ³H-Thymidin-Aufnahme in die DNA nach ECP

Die Arbeitsgruppe um Jacob testete 2003 ein Verfahren bei dem die Mitogen-induzierte lymphozytäre Proliferation vor und nach der ECP von Patientenproben durch Messung der ³H-Thymidin-Aufnahme in die DNA verglichen wurde. T-Zellen wurden dabei mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert, wodurch die Zellteilung angeregt wurde. ³H-Thymidin ist ein radioaktiv markiertes Nukleosid, das bei der Zellteilung in neue DNA-Stränge eingebaut wird. Die Zellproliferation kann dann anhand der Radioaktivitätszunahme in der Ionisationskammer gemessen werden (Jacob et al., 2003).

1.8.2 Quantifizierung der Proliferationsinhibition durch den Fluoreszenzfarbstoff CFSE

Um Radioaktivität zu vermeiden und Kosten einzusparen, wurde von der Arbeitsgruppe um Evrard im Jahr 2010 ein weiteres Protokoll untersucht: Als T-Zell Stimulanz wurde ebenfalls PHA eingesetzt und die induzierte T-Zellproliferation in Patientenproben mit und ohne ECP nach 3-tägiger Kultur gemessen. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde der Fluoreszenzmarker CFSE (5,6-Carboxy Fluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) eingesetzt. CFSE ist ein grüner Fluoreszenzfarbstoff, der in die Zellen aufgenommen wird und sich bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Die Farbtintensität nimmt dabei bei jeder Zellteilung ab. Die Auswertung erfolgt am Durchflusszytometer (Evrard et al., 2010).

1.8.3 Kombinationsprotokoll aus Proliferations- und Apoptosemessung

2014 wurde durch die österreichische Arbeitsgruppe von Prof. E Rohde und D. Schmid ein kombinierter Qualitätskontrolltest untersucht, der die Proliferationsinhibition und die Apoptosezunahme der T-Zellen nach ECP beinhaltet. Verwendet wurden mit Kochsalzlösung verdünnte Buffy Coats gesunder Blutspender, die im Sinne einer offline-Prozedur behandelt wurden. Vor und nach der Behandlung wurden Proben entnommen, die mit PHA stimuliert und kultiviert wurden. Die Proliferation wurde nach 3 Tagen durch das CFSE-Assay am Durchflusszytometer überprüft. Die Apoptose wurde mittels Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung, also Annexin-V- und Propidiumiodid- Färbung an nicht stimulierten Zellen gemessen (Schmid et al., 2015).

1.8.4 Apoptosemessung als alleinige Qualitätskontrolle der ECP

Die Arbeitsgruppe um F. Taverna veröffentlichte 2015 ihre Arbeiten zu einem Apoptose-Qualitätskontrolltest. Untersucht wurde die Apoptosezunahme nach ECP von GvHD-Patienten mittels Annexin-V- und Propidiumiodid- Färbung und Messung am Durchflusszytometer. Die Ergebnisse wurden mit dem CFSE- Proliferationsassay nach 5-tägiger Kultur verglichen. Zur Zellstimulation wurde einerseits PHA verwendet, andererseits wurde auch eine Stimulation mit CD3/28 und IL-2 durchgeführt. Beide Proliferationsassays und das Apoptoseassay konnten einen Effekt der ECP Behandlung anzeigen (Taverna et al., 2015).

1.9 Zielsetzung

Die Extrakorporale Photopherese ist seit über 30 Jahren klinisch etabliert und gilt als erfolgreiches und nebenwirkungsarmes Verfahren in der Therapie des CTCL, der GvHD und bei Transplantatabstoßungen. Trotz jahrelanger Anwendung gibt es bis heute kein einfaches, standardisiertes und zuverlässiges Protokoll zur zellbasierten Qualitätskontrolle.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein schnelles und unkompliziertes Verfahren zu entwickeln, das auf zellulärer Ebene ein Ansprechen der Behandlung mit UVA-Bestrahlung und 8-MOP zeigt. Dabei wurde die Erarbeitung eines „Single-Day“-Testverfahrens angestrebt. Verschiedene T-Zell Proliferationsmarker wie CD71, CD69, CD25 und Ki-67 wurden dazu systematisch im Hinblick auf Kinetik und Zuverlässigkeit durchflusszytometrisch überprüft und unterschiedliche T-Zellstimuli und

Zellkulturbedingungen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit dem Goldstandard, also der T-Zellproliferationsmessung nach CFSE-Färbung und einer Apoptosemessung verglichen. Die Apoptosequantifizierung erfolgte durch eine Vital- Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Annexin-V und Sytox. Untersucht wurden unbehandelte und stimulierte T-Zellen gesunder Blutspender sowie Patientenproben nach ECP-Behandlung.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Zubehör

Geräte	Modell und Zubehör	Hersteller
Automatischer Hämatologie Analysator	KX-21N Sysmex	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, D
Brutschrank	HERAcell 240 CO2 Inkubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II, FACSDiva Software V6.1.2	BD Biosciences, Heidelberg, D
Mini Zentrifuge	Kinetic Energy 26 Joules Galaxy Mini Centrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pipetten	10-1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe für Stabpipetten	-	STARLAB GmbH Hamburg, D
Sterilbank	SAFE 2020	Thermo Electron GmbH, Langenselbold, D
UVA-Bestrahlungskammer	BIO-LINK BLX-365	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH Eberhardzell, D
UVA-Dosimeter	RM-21	Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, D
Vortex	RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, D
Wasserbad	WNB 10	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, D
Zentrifugen	Rotina 380, Typ 1701 Rotina 380R, Typ 1706	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

Tab. 1: Geräte und Zubehör

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
FACS Tubes	5ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Glaspipetten	Cellstar-Linie 5- 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Kanülen	BD Mikrolance 3 20G x 1 ½“ (0,9mmx40mm)	BD, Heidelberg, D
Pasteurpipetten	3,5ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	10µl, 200µl, 1000µl	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße	SafeSeal 0,5ml Mikrotube 1,5ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Reaktionsröhrchen, konischer Boden	Cellstar Cellreactor 15ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Spritzen	5ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Zellkulturplatten	TC-Platte 12-Well, Standard, F-Boden; Ref: 83.3921	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
	TC-Platte 96-Well, Standard, F-Boden; Ref: 83.3924	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
	TC-Platte 96 Well, Cell+, F-Boden, Ref: 83.3924.300	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
	Cellstar 96-Well Cell Culture Plate, F-Boden; Ref: 655180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

	Microplatte, 96-Well, PS, F-Boden (KAMINFORM), μ CLEAR, schwarz, hochbindend	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellsieb	Fisherbrand Sterile Cell Strainer 70 μ m Nylon Mesh	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Stimulationsantikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Konzentration	Kat. Nr.	Hersteller
LEAF Purified Anti-Human CD3	UCHT1	Mouse IgG1, κ	1,0 mg/ml	300414	BioLegend San Diego, USA
Ultra-LEAF Purified Anti-Human CD28 Antibody	CD28.2	Mouse IgG1, κ	1,0 mg/ml	302934	BioLegend San Diego, USA

Tab. 3: Stimulationsantikörper

2.1.4 Mitogene und das Zytokin Interleukin-2

Mitogene sind Proteine, die die Zellteilung anregen. Sie sind im Gegensatz zu Antigenen, die passgenau an einen Rezeptor binden, unspezifisch. Zu den Mitogenen gehören Lektine wie Concanavalin A und Phytohämagglutinin.

Lektine	Kat. Nr.	Hersteller
Concanavalin A von <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	C5275	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, D
Phytohämagglutinin/ Lektin von <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	L4144-5MG	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, D

Tab. 4: Lektine

Zytokine haben sehr vielfältige Funktionen und dienen häufig der Kommunikation zwischen den Zellen. Eine Untergruppe der Zytokine sind die Interleukine. IL-2 wird von aktivierten T-Zellen gebildet und hat einen positiven Effekt auf die T-Zellproliferation. Aldesleukin ist die synthetisch hergestellte Variante von IL-2.

Zytokine	Handelsname	Hersteller
Aldesleukin/ Interleukin-2 aus <i>E.coli</i>	Proleukin S	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, D

Tab. 5: Zytokine (Interleukin-2)

2.1.5 Monoklonale Antikörper und Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse

Antikörper	Klon	Isotyp	Stock- konzentration	Kat. Nr.	Hersteller
APC Anti-Human CD8a Antibody	RPA-T8	Mouse IgG1	50µg/ml	301014/ 301049	BioLegend San Diego, USA
APC/Cy7 Anti-Human CD71 Antibody	CY1G4	Mouse IgG2a, κ	100µg/ml	334110	BioLegend San Diego, USA
Brilliant Violet 421 anti-human CD25 Antibody	M-A251	Mouse IgG1, κ	50µg/ml	356114	BioLegend San Diego, USA
Human CD4 APC-conjugated Antibody	11830	Mouse IgG _{2A}	50µg/ml	FAB3791A	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Pacific Blue Annexin V	-	-	80µg/ml	640918	BioLegend San Diego, USA
Pacific Blue anti-human CD3 Antibody	UCHT1	Mouse IgG1, κ	100µg/ml	300417	BioLegend San Diego, USA

PE Annexin V	-	-	4µg/ml	640947	BioLegend San Diego, USA
PE Anti-Human CD69	FN50	Mouse IgG1, κ	50µg/ml	310906	BioLegend San Diego, USA
PE Anti-Human Ki-67 Antibody	Ki-67	Mouse IgG1, κ	50µg/ml	350504	BioLegend San Diego, USA
PerCP/Cy5.5 Anti-Human CD4 Antibody	RPA- T4	Mouse IgG1, κ	100µg/ml	300530	BioLegend San Diego, USA
Sytox Blue dead cell stain	-	-	1mM	S34857	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SYTOX Green Dead Cell Stain	-	-	30µM	S34860	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vibrant CFDA SE Cell Tracer Kit	-	-	10mM	V-12883	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	-	-	-	00-5523- 00	eBioscience, Inc. San Diego, CA, USA

Tab. 6: Monoklonale Antikörper und Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse

2.1.6 Chemikalien

Chemikalie	Kat. Nr.	Hersteller
8-Methoxypsoralen 0,2mg/10ml	-	Apotheke Universitätsklinikum Gießen/Marburg, Marburg, D
Annexin V Bindung Buffer	422201	BioLegend San Diego, USA

BD FACS Flow	342003	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Clean Solution	340345	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Shutdown Solution	334224	BD Biosciences, Heidelberg, D
Biocoll-Separating-Solution (Density 1,077g/ml)	L6115	Biochrom GmbH, Berlin, D
CliniMACS PBS/EDTA Buffer 1000l 800mg NaCl, 19mg KCl, 115mg Na₂HPO₄, 10mg KH₂PO₄, 37mg Na₂EDTAx 2 H₂O, 100ml H₂O	700-25	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Fötales Kalbsserum	S0115 P30-0602 A11-151	Biochrom GmbH, Berlin, D PAN-Biotech GmbH, Aidenbach PAA Laboratories, AUT
Freka-NOL AF (Alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel)	FR-311-010	Dr. Schuhmacher GmbH, Malsfeld, D
HEPES Buffer Solution (1M)	15630	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Humanes Immunglobulin G (Gammunex 10% 100mg/ml)	-	Grifols Deutschland GmbH, Frankfurt
Lymphocyte Separation Media	AC-AF-0018	Anprotec, Bruckberg, D
MEM Non-Essential Amino Acid Solution (100x)	M7145	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, D
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x)	AC-BS-0015	Anprotec, Bruckberg, D
Penicillin/Streptomycin 5000Units/ml Penicillin, 500µg/ml Streptomycin	15070-063	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RPMI 1640 Medium	P04-18500 AC-LM-0056	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D Anprotec, Bruckberg, D
Sodium Pyruvat 100mM (100x)	11360-039	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

X-Vivo 15 Chemically Defined, Serum-free Hematopoietic Cell Medium	BE02-060Q	Lonza, Basel, CHE
---	-----------	-------------------

Tab. 7: Chemikalien

2.1.7 Beads

Beads	Kat. Nr.	Hersteller
SPHERO AccuCount Fluorescent Particles 7,9µm	ACFP-70-5	Spherotech Inc., Lake Forrest, IL, USA
UltraComp eBeads Compensation Beads	01-2222-42	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tab. 8: Beads zur FACS-Kompensation sowie zur Ermittlung der absoluten Zellzahl

2.2 Methoden

2.2.1 Experimentelle Photopherese

Der Ausdruck Experimentelle Photopherese bezieht sich im Folgenden auf die experimentell nachgestellte Photopheresebehandlung an Zellen gesunder Blutspender. Im Gegensatz dazu wird der Begriff Extrakorporale Photopherese benutzt, wenn eine therapeutische Photopheresebehandlung an Patienten durchgeführt wurde.

2.2.1.1 Gewinnung von peripheren humanen mononukleären Zellen

Die kultivierten und untersuchten PBMCs (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) stammten aus Restblutproben von sogenannten Buffy Coats gesunder Blutspender (Ethikvotum: AZ 05/00). Der Buffy Coat wird im Deutschen auch als Leukozytenfilm bezeichnet. Die Herstellung erfolgte im Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Gießen. Im Buffy Coat sind hauptsächlich Leukozyten, Thrombozyten und einige Resterythrozyten enthalten. Um die experimentelle Photopherese durchführen zu können, müssen die verbliebenen Erythrozyten und Thrombozyten von den Leukozyten getrennt werden. Dazu wurde ein Verfahren mit „Ficoll-Paque“ angewendet (Böyum, 1968). Bei dem Ficoll-Paque handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit

einer Dichte von 1,077g/ml. Im ersten Schritt der Trennung wurden 8ml des Buffy Coats mit 27ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 1-fach konzentriert) verdünnt und das PBS/ Blutgemisch langsam mittels Stabpipette auf eine in einem zweitem Tube vorgelegte Ficollschicht (15ml) gebettet. Die beiden Schichten sollten dabei nicht vermischt werden. Die Blutbestandteile wurden anschließend nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt. Dazu erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt (1700rpm, ohne Bremse für 30 Minuten), wobei Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte die Ficollschicht passierten und sich am Boden des Tubes sammelten. Beschleunigt wurde dieser Prozess zusätzlich durch die Agglutination der Erythrozyten bei Kontakt mit der Ficollschicht. Alle Zellen, deren Dichte unter 1,077g/ml lag, verblieben über der Ficollphase, was als Interphase bezeichnet wird. Sie besteht vor allem aus Monozyten und Lymphozyten. Darüber bildete sich eine klare Schicht aus PBS, Blutplasma und Thrombozyten, da deren Dichte ebenfalls für die Sedimentation nicht ausreicht. Mit einer Pasteurpipette wurde der Interphasering vorsichtig aufgenommen und weiter aufgereinigt: Verbliebene Ficollreste wurden durch Waschen mit PBS und anschließender Zentrifugation (bei 1500rpm mit Bremse für 5 Minuten) entfernt und der Überstand dekantiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS und Zentrifugation (bei 800rpm mit Bremse für 10 Minuten), wobei die restlichen Thrombozyten entfernt werden konnten. Nach Ermittlung der Zellzahl an einem automatischen Zellzähler (Sysmex KX-21N), erfolgte die Überführung der PBMCs in das Kulturmedium bei einer Konzentration von 2×10^6 /ml und die Ausplattierung der Zellen auf eine 12-Well-Zellkulturplatte (1000 μ l/Well). Es wurden ausschließlich sterile Materialien und Geräte verwendet; die Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank.

Zellkulturmedium:

- RPMI-Medium
- Nicht essentielle Aminosäuren (1x)
- Natrium-Pyruvat (1mM)
- HEPES (10mM)
- 10% hitzeinaktiviertes Fötales Kalbsserum (FKSi)

2.2.1.2 Versuchsaufbau der experimentellen Photopherese

Die experimentelle Photopherese stellt den Ablauf der in der Klinik angewendeten extrakorporalen Photopherese nach. Dazu wurden die isolierten PBMCs zunächst 30 Minuten mit dem Photosensibilisator 8-MOP (300ng/ml) inkubiert und anschließend in einer speziellen UVA-Bestrahlungskammer bestrahlt (2 Joule/cm²). Während der

Behandlung wurde die Zellkulturplatte zwischen zwei Messelektroden platziert, die die UVA-Intensität an ein externes Dosimeter weiterleiteten. Damit konnte die insgesamt abgegebene Strahlungsintensität und die gleichmäßige Bestrahlung der Zellen überprüft werden. Die Kammer wurde unter der Sterilbank verwendet. Der Abstand (Ruhezeit) zwischen der Bestrahlung und der Zellstimulation betrug, wenn nicht anders angegeben, 2 Stunden.

2.2.2 Extrakorporale Photopherese

2.2.2.1 Durchführung der extrakorporalen Photopherese

Die Durchführung der extrakorporalen Photopherese an Patienten erfolgte am Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Gießen. Zur Blutapherese wurden entweder das Spectra-Optia Apherese System von Terumo BCT oder das MCS+ System von Haemonetics mit entsprechenden Schlauchsystemen eingesetzt. Nach Gewinnung des Apheresats, was einem Buffy Coat entspricht, erfolgte eine Verdünnung mit Kochsalzlösung und die 15-minütige Inkubation des Photosensibilisators 8-MOP. Das Endvolumen im Bestrahlungsbeutel lag bei etwa 300ml. Die Zellen wurden anschließend in der MacoGenic G2 Bestrahlungskammer von Macopharma mit einer Intensität von 2 Joule/cm² bestrahlt.

2.2.2.2 Klinische Proben

Die klinischen Proben wurden vor und nach Photopheresebehandlung der Patienten untersucht. Für die Verwendung erfolgte die Zustimmung der Ethikkommission (Ethikvotum: AZ 136/10) und die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten. Verwendet wurde eine „Pre-ECP“ Probe (vor 8-MOP Zugabe und vor Bestrahlung) und eine „Post-ECP“ Probe (nach 8-MOP-Zugabe und nach Bestrahlung). Nach Probenerhalt wurde zunächst die Zellkonzentration am automatischen Zellzähler (Sysmex) bestimmt und die Proben zweimal mit PBS gewaschen (bei 1500rpm, 5min), um eventuelle Reste der im Plasma zirkulierenden immunsuppressiven Medikamente zu entfernen. Die PBMCs wurden anschließend bei einer Zellkonzentration von 2x10⁶/ml für 26 Stunden in Zellkulturmedium kultiviert (Ruhezeit) bevor sie stimuliert wurden. Für die Kultivierung bzw. Inkubationszeiten wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Der CO₂-Gehalt betrug 5%, die relative Luftfeuchtigkeit 95%.

2.2.3 CFSE-Markierung

Die PBMCs gesunder Blutspender und der Patienten wurden zum Ende der Ruhezeit nach Bestrahlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert. Dazu wurden die Zellen aus den Wells entnommen, in 15ml Falcons überführt, bei 1500rpm fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS aufgenommen, mit CFSE versetzt (0,5 μ M) und 10 Minuten im 37 Grad warmen Wasserbad inkubiert. Für Patientenproben musste eine höhere CFSE-Konzentration (1 μ M) gewählt werden, da die Farbstoffaufnahme der Zellen geringer war. Die Reaktion wurde mit jeweils 5 ml warmem Kulturmedium (37°C) abgestoppt, die Proben zentrifugiert (bei 1500rpm, 5 Minuten) und der Überstand entfernt. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 5ml des warmen Kulturmediums und eine weitere 15-minütige Inkubation im Wasserbad. Nach Zentrifugation der Proben und Dekantieren des Überstandes, wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und stimuliert.

2.2.4 Stimulation der Zellen

Nach Bestrahlung und nach Ablauf der anschließenden Ruhezeit (2 Stunden/ 26 Stunden) erfolgte die Zellstimulation in einer am Vortag mit CD3 beschichteten 96-Well Platte (Flachboden). Jeweils 200 μ l der Proben wurden ausplattiert und lösliches CD28 hinzugegeben, sodass die Stimulationskonzentration von CD3 und CD28 jeweils 1 μ g/ml betrug. In Proben gesunder Blutspender wurde 100U/ml IL-2 hinzugefügt. Entsprechende unstimulierte Kontrollen wurden mitgeführt. Alle Ansätze wurden mit Penicillin/Streptomycin (50 Units/ml Penicillin, 5 μ g/ml Streptomycin) versetzt. Die CD71-Messung erfolgte in Proben gesunder Blutspender nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden und 4 Tagen, in Patientenproben nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden, 3 Tagen und 4 Tagen. Die CFSE- Messung wurde in beiden Gruppen 4 Tage nach Stimulation durchgeführt.

2.2.5 Validierung des CD71-Assays

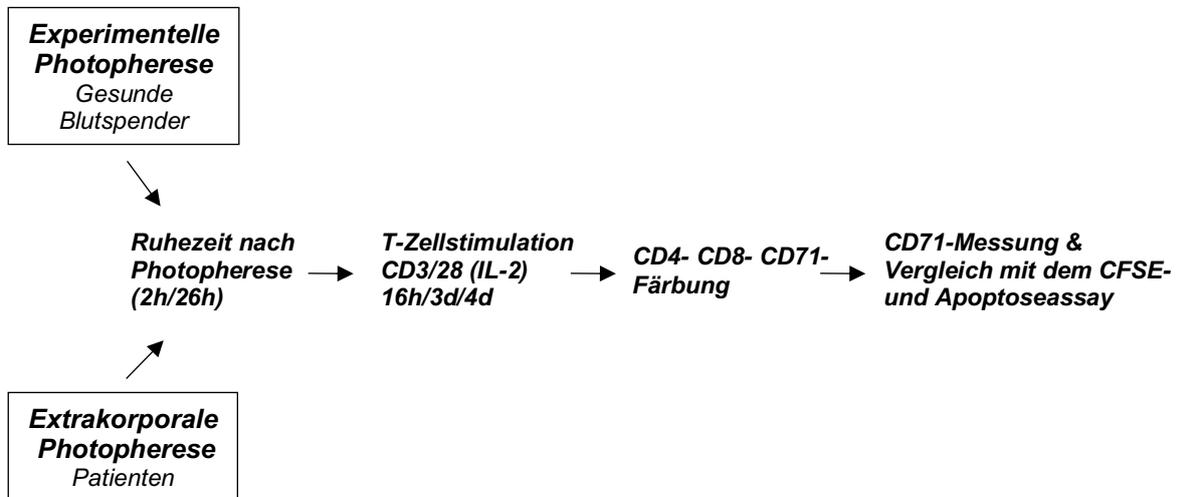


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

2.2.5.1 Gesunde Blutspender

Der CD71-Assay zur Messung der Proliferationsinhibition nach experimenteller Photopherese wurde an PBMCs aus Buffy Coats von 11 gesunden Blutspendern in 5 unabhängigen Experimenten validiert. Vor der experimentellen Photopherese wurden die Proben hinsichtlich ihres Hämatokrits (Hkt) und Lymphozytenanteils (Lym) untersucht:

**Gruppe zur Validierung des CD71-Assays
(gesunde Blutspender)**

<i>n</i>	<i>Hkt %</i>	<i>Lym%</i>
1	0	58.1
2	0.2	36.5
3	0	72
4	0	62.9
5	0.1	80.7
6	0.1	77.7
7	0.2	66.7
8	0.2	75.9
9	0.2	73
10	0	97.4
11	0.1	68

Tab. 9: Hkt (%) und Lym (%) der Proben gesunder Blutspender. Messung am automatischem Hämatologie Analysator (KX-21N Sysmex).

2.2.5.2 Patientenproben

Zur Validierung des CD71-Assays an Patientenproben wurden 6 Patienten (a-f) in insgesamt 10 ECP-Prozeduren untersucht. In der nachfolgenden Tabelle sind die Diagnosen und immunsuppressiven Medikamente der Patienten aufgelistet. Der Hämatokrit und der Lymphozytenanteil wurden, analog zur experimentellen Photopherese, vor 8-MOP-Zugabe und vor Bestrahlung im verdünnten Präparat gemessen.

<i>Experiment/ ECP-Prozedur</i>	<i>Patient</i>	<i>Diagnose</i>	<i>Immunsuppressive Therapie</i>	<i>Hkt %</i>	<i>Lym %</i>
1	a	<i>chron. Transplantatabstoßung, LuTX</i>	<i>Cal-Inh, MMF, P</i>	1.7	58.2
2	b	<i>chron. Transplantatabstoßung, LuTX</i>	<i>Cal-Inh, MMF, P</i>	1.4	53.5
3	c	<i>chron. Transplantatabstoßung, LuTX</i>	<i>Cal-Inh, MMF, P</i>	2	42.9
4	c			3.3	30.9
5	d	<i>chron. GvHD, Fremdtransplantation bei AML</i>	<i>MMF, P</i>	1	34.4
6	d			0.5	55
7	e	<i>chron. Transplantatabstoßung, LuTX</i>	<i>Cal-Inh, MMF, P</i>	2.3	38.9
8	e			2.7	38.2
9	f	<i>chron. Transplantatabstoßung, LuTX</i>	<i>Cal-Inh, mTOR-Inh, P</i>	1.4	60.3
10	f			4.9	60.4

Tab. 10: Überblick der ECP-Patienten und der jeweiligen ECP-Prozeduren LuTX: Lungen Transplantation, GvHD: Graft versus Host Disease, Cal-Inh: Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus, MMF: Mycophenolat-Mofetil, P: Prednisolon, mTOR-Inh: mTOR- Inhibitor Everolimus

2.2.6 Durchflusszytometrie

2.2.6.1 Hintergrund

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (engl. *fluorescence-activated-cell-sorter*) erlaubt die Analyse von Zellen im Hinblick auf Größe, Struktur und Färbung indem diese in sehr hoher Geschwindigkeit an einem Laser- und Detektorensystem vorbeifließen. Vor der eigentlichen Messung erfolgt die Markierung der Zellen mit Antikörpern oder Farbstoffen, die bei energetischer Anregung Fluoreszenzlicht aussenden. Die Zellsuspension wird dann durch eine Kapillare gesaugt und die Zellen vereinzelt bzw. perlschnurartig in eine Messzelle geleitet. Dort werden sie, je nach Fragestellung, von einem oder mehreren Lasern beleuchtet, wodurch die aufgebrauchten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Dadurch wird einerseits ein Streulicht, andererseits ein Fluoreszenzlicht ausgesendet. Das Streulicht wird von zwei Streulichtdetektoren (englisch: „Scatter“) gemessen. Der sogenannte *Forward Scatter* (FSC) misst die Zellgröße; der *Sideward Scatter* (SSC) misst die Granularität der Zellen. Die Fluoreszenzdetektoren zeigen die Menge und Art der Antikörper an, die bei der

Färbung gebunden wurden. Die Messung wurde am FACSCanto II Flow Cytometer der Firma BD Bioscience durchgeführt.

2.2.6.2 Kompensation

Da bei der Messung am FACS verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden, und deren Fluoreszenzsignale gleichzeitig mehrere Detektoren anregen können, musste vor der Messung eine Kompensation erfolgen. Dazu wurden die verwendeten Färbeantikörper auf sogenannte Kompensationsbeads (Mikropartikel, die die Antikörper binden) aufgebracht. CFSE-, Sytox- und Annexin-markierte Zellen müssen ebenfalls in die Kompensation eingebracht werden. In den Kompensationseinstellungen des FACS wurde jeder Farbstoff einzeln gemessen und die Überschneidungen der jeweiligen Farben jeweils rechnerisch korrigiert.

2.2.6.3 Färbeprotokoll

Jeweils 125µl der Proben wurden von der 96-Well-Platte in spezielle FACS-Tubes überführt, 12,5µl Immunglobulin G (IgG) hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. IgG ist ein Antikörper mit großem Spektrum und blockiert Fc-Rezeptoren von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen. Die Fc-Rezeptoren binden unspezifisch Antikörper, also auch Färbeantikörper, und können so zu falsch-positiven oder unbrauchbaren Ergebnissen führen. Anschließend erfolgte die Färbung mit monoklonalen Antikörpern CD4, CD8 und CD71 für 15 Minuten bei RT im Dunkeln. CD4 und CD8 wurden standardmäßig zur Detektion der T-Lymphozyten gefärbt. Zur Messung der Zellproliferation wurde, wenn nicht anders angegeben, die CD71-Expression der Zellen gemessen. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Proben mit 1ml Clinimacs Waschpuffer versetzt und 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet aufgerüttelt. Danach erfolgte die Messung am FACS.

2.2.6.4 CFSE-Bestimmung

Nach CFSE-Färbung der Zellen wurde am nächsten Morgen überprüft, ob die Zellen den CFSE Fluoreszenzfarbstoff hinreichend aufgenommen haben. Dazu wurden unstimulierte, CFSE-gefärbte Zellen mit monoklonalen CD4- und CD8- Antikörpern

gefärbt und am Durchflusszytometer untersucht. CD4+/CFSE+ und CD8+/CFSE+ Zellen wurden in jeweils einem eigenen Histogramm dargestellt. Bei hohem CFSE-Fluoreszenzsignal (mittlere Fluoreszenzrate zwischen 10^4 und 10^5) und symmetrischem, engem Peak wurde die Färbung als ausreichend eingestuft. Die CFSE-Messung zur Überprüfung der Zellproliferation wurde nach gleichem Prinzip vier Tage nach der Zellstimulation durchgeführt. Teilt sich eine gefärbte Zelle, wird der Farbstoff gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben. Das Fluoreszenzsignal, das im FACS gemessen wird ist dementsprechend nur noch halb so stark. Teilen sich diese Zellen erneut, beträgt das Signal nur noch ein Viertel des Ausgangswertes. Um die geteilten Zellen von den nicht-geteilten zu unterscheiden wurde im CFSE-Histogramm ein Gate zwischen die ersten beiden Peaks im rechten Histogrammabschnitt gesetzt. Der erste Peak zeigt die Population ungeteilter Zellen (UnDIV, *undivided*). Alle nachfolgenden Peaks zeigen Zellteilungen an und werden dementsprechend als geteilte Zellen gewertet (DIV, *divided*). Um nun den prozentualen Anteil geteilter Zellen (Percentage of Division, PD) von allen CFSE-gefärbten Zellen zu ermitteln, wurde folgende Formel verwendet:

$$PD (\%) = 100 \times \frac{DIV (Events)}{DIV (Events) + UnDIV(Events)}$$

2.2.6.5 Apoptosebestimmung

Je nach Fragestellung wurde auch eine Bestimmung der apoptotischen Zellen mittels Färbung mit Annexin-V und Sytox Dead Cell Stain durchgeführt. Dazu wurde das Färbeprotokoll erweitert und das Zellpellet nach der Waschung mit 100µl eines Calciumhaltigen Annexin-Bindungspuffer und 1µl Annexin-V aufgefüllt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei RT inkubiert. 10nM Sytox Dead Cell Stain wurde 5 Minuten vor der Messung in die entsprechende Probe gegeben. Annexin-V bindet in Anwesenheit von Calcium Phosphatidylserin. Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der Zellmembran und liegt bei gesunden Zellen intrazellulär. Geht eine Zelle in die Apoptose, gelangt Phosphatidylserin in die äußere Zellmembranschicht und kann von Annexin-V gebunden werden. Die Zellen sind in dieser Phase Annexin-V positiv (Annexin-V⁺) und Sytox negativ (Sytox⁻), was als Frühapoptose bezeichnet wird. Schreitet die Apoptose weiter fort, wird die Zellmembran durchlässig und Sytox gelangt zur DNA, wo es Nukleinsäuren bindet. Im FACS erscheinen diese Zellen entweder Annexin-V⁺/Sytox⁺ oder Annexin-V⁻/Sytox⁺. Die Zellen befinden sich in der Spätapoptose. Bleiben beide Färbungen negativ, sind die Zellen vital. Durch Addition der früh- und spätapoptotischen Zellpopulationen kann der Anteil an gesamtapoptotischen Zellen ermittelt werden:

Gesamtapoptose

$$= (\text{AnnexinV}^+/\text{Sytox}^-) + (\text{AnnexinV}^+/\text{Sytox}^+) + (\text{AnnexinV}^-/\text{Sytox}^+)$$

2.2.6.6 Bestimmung der absoluten Zellzahl

Im FACS werden standardmäßig die Eventanzahl und der daraus ermittelte prozentuale Anteil der Zellen angegeben. Um standardisierte Messungen zu erhalten wird in den meisten Fällen eine bestimmte Eventanzahl (z.B. 100.000 Events) gewählt, nach deren Erreichen die Aufnahme der Zellen automatisch beendet wird. So können jedoch keine Rückschlüsse auf die absolute Zellzahl in der zu messenden Probe geschlossen werden. Deshalb können der Probe vor der Messung sogenannte Beads hinzugegeben werden die im FACS mitgemessen werden. Es handelt sich dabei um fluoreszierende Mikropartikel, mit einer bekannten Anzahl an Beads pro Milliliter. In unseren Messungen wurden Beads der Größe 7,9µm verwendet und ein Lösungstropfen enthielt 10.000 Beads. Mit folgender Formel konnte die absolute Zellzahl berechnet werden:

$$\frac{\text{Aufgenommene Beads (Events)}}{10000} = \frac{\text{aufgenommene Lymphozyten (Events)}}{x}$$

Da nur 125µl jeder Probe von insgesamt 200µl im Well entnommen wurde, wurde das Ergebnis noch mit 1,6 multipliziert. So konnte auf die absolute Zellzahl im Well zurückgeschlossen werden.

2.2.6.7 Gatingstrategie zur Identifizierung proliferierender T-Zellen

Im ersten Dotplot (FSC/SSC) sind alle aufgenommenen Events und die Mikropartikel zur Bestimmung der absoluten Zellzahl (Beads) zu sehen. In diesem Dotplot ist die Morphologie der Zellen zu erkennen, weshalb das erste Gate „Morphology“ genannt wurde. Das Morphologie- Gate schließt kleine Zelltrümmer und große Aggregate aus und soll vor allem lebende und tote Lymphozyten beinhalten. In den nächsten zwei Gatingsschritten (No doublet FSC und No doublet SSC) wurden Zelldoubletten durch Auftragen der Signalthöhe (H) gegen die Signalfäche (A; *engl. Area*) ausgeschlossen. Um nur lebende Zellen (*engl. viable cells*) in die CD71- und CFSE-Messung

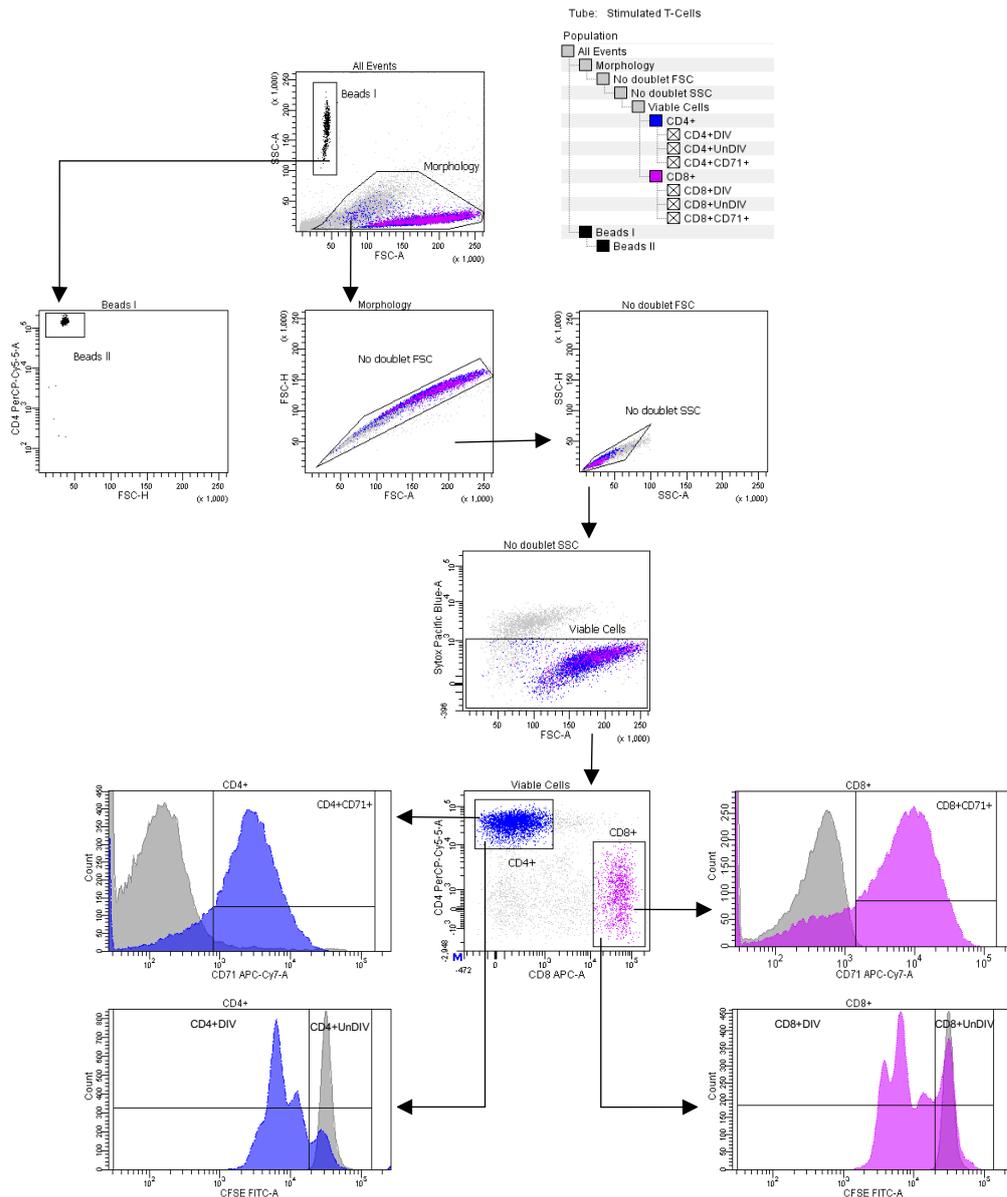


Abb. 5: Gating Strategie zur Identifizierung proliferierender T-Zellen am FACSCanto II (BD) Flow Cytometer Exemplarisch dargestellt sind die T-Zellen eines gesunden Blutspenders vier Tage nach CD3/28/IL-2-Stimulation (farbig) und die unstimulierte Kontrolle (grau). Beads I/II Referenzpartikel zur Bestimmung der absoluten Zellzahl. Morphologie: Ausschluss von kleinen Zelltrümmern und größeren Aggregaten → No doublet FSC/SSC: Ausschluss von Doubletten → Viable Cells: Selektion der lebenden Zellen durch Auswahl der Sytox- negativen Zellen. → Selektion der CD4+/CD8+ positiven T-Zellen → CD71-Histogramm: Gating der unstimulierten T-Zellen (grauer Peak) als Ausgangsgate für die stimulierte Probe; CFSE-Histogramm: Platzierung der linken Seite des UnDiV- (Undivided-Cells) Gates in das Tal zwischen Mutter- und erstem Tochterpeak, Platzierung der rechten Seite des DiV- (divided cells) Gates direkt an das angrenzende UnDiV Gate (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

aufzunehmen, wurden Sytox⁺- Zellen ausgeschlossen. Das „Viable Cells“- Gate wurde also um die Sytox⁻-Zellwolke gelegt. Aus dieser Population wurden die CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellen ermittelt und daraus jeweils die CD71- und CFSE-Messung durchgeführt. Die Messungen der unstimulierten Proben sind in Form der grauen Peaks dargestellt. Für

die CD71-Messung wurde das Gate zur Abgrenzung der CD71⁺-T-Zellen an der rechten Wurzel des grauen Peaks gesetzt. Die Messungen der stimulierten Proben sind farbig dargestellt. Für die CFSE-Messung wurden zwei Gates gesetzt (UnDIV und DIV): Die linke Seite des UnDIV-Gates wurde in das Tal zwischen Mutter- und erstem Tochterpeak platziert, die rechte Seite des DIV-Gates direkt an das angrenzende UnDIV-Gate. Die Gatingstrategie zur Identifikation proliferierender Zellen erfolgte in Anlehnung an Faivre et al. (2015).

2.2.6.8 Gatingstrategie zur Identifizierung apoptotischer Zellen

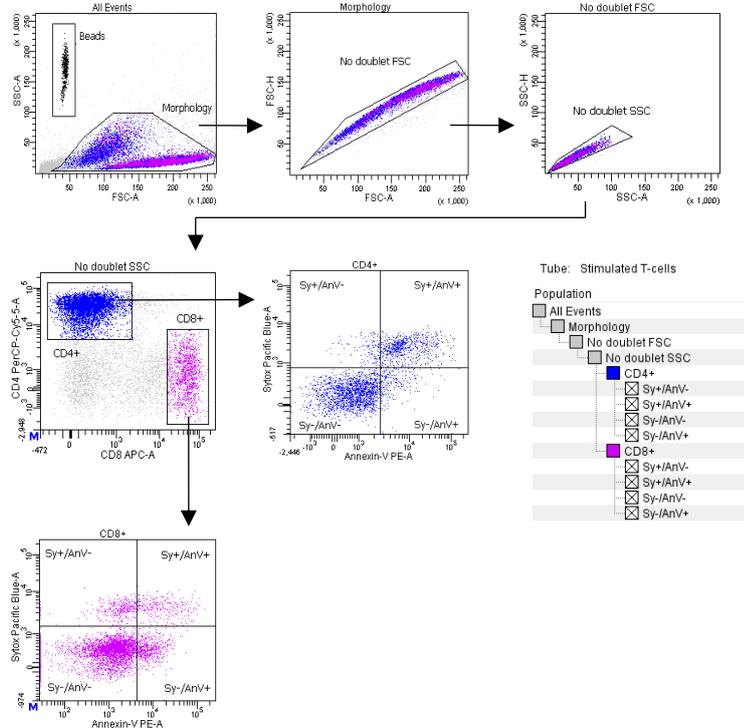


Abb. 6: Gating Strategie zur Identifizierung apoptotischer T-Zellen am FACSCanto II Flow Cytometer Exemplarisch dargestellt sind die T-Zellen eines gesunden Blutspenders vier Tage nach CD3/28/IL-2-Stimulation. Morphologie: Ausschluss von kleinen Zelltrümmern und größeren Aggregaten → No doublet FSC/SSC: Ausschluss von Doubletten → Selektion CD4⁺/CD8⁺ positiver T-Zellen → Identifizierung frühapoptotischer CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen durch Annexin V-Färbung; Identifizierung spätapoptotischer CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen durch Sytox- Färbung (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019).

Bei der Identifizierung apoptotischer Zellen wurde ebenfalls zunächst ein Morphologie-Gate (FSC/SSC) gesetzt und die Doubletten ausgeschlossen (No doublet FSC und No doublet SSC). Es folgte das Gating der CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen und die

Apoptosemessung. Dazu wurden die Sytox⁺-Zellen gegen die Annexin-V⁺-Zellen aufgetragen und durch ein 4-Quadranten-Gate die vitalen (Annexin-V⁻/Sytox⁻) von den frühapoptotischen (Annexin-V⁺/Sytox⁻) und spätapoptischen (Annexin-V⁺/Sytox⁺ und Annexin-V⁻/Sytox⁺) T-Zellen abgegrenzt.

2.2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.02) genutzt. In den folgenden Abbildungen sind die Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler (SEM) dargestellt. Die erhobenen Daten wurden auf ihre Normalverteilung überprüft und anschließend der statistischen Auswertung unterzogen. Zur Signifikanzprüfung wurden der zweiseitige t-Test für abhängige bzw. unabhängige Stichproben, eine One way ANOVA oder eine Two way ANOVA eingesetzt. Anschließend durchgeführte Posttests sind in den jeweiligen Abbildungslegenden vermerkt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche mit PBMCs gesunder Blutspender

Bei der Etablierung eines Qualitätskontrolltests der experimentellen und später extrakorporalen Photopherese wurden verschiedene Schwerpunkte gesetzt: Es sollte eine ausgeprägte und schnelle T-Zellproliferation erzeugt und vor allem eine deutliche Proliferationsinhibition der T-Zellen nach UVA/8-MOP-Behandlung induziert werden. Der Test sollte möglichst einfach und unkompliziert durchzuführen sein. Anhand von Vorversuchen an PBMCs gesunder Blutspender wurden unterschiedliche Stimulationsprotokolle, Zellkulturbedingungen sowie Proliferationsmarker getestet.

3.1.1 Vergleich der Ki-67 Expression nach Einsatz unterschiedlicher T-Zellstimulanzen

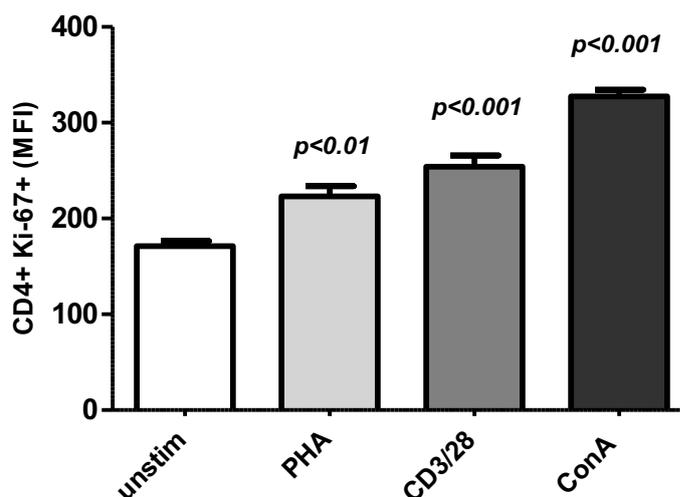


Abb. 7: Vergleich der Ki-67 Expression nach unterschiedlichen Stimulationsprotokollen Stimulation von humanen PBMCs mit PHA (4µg/ml), CD3/28 (löslich, 1µg/ml), oder Concanavalin-A (2,5µg/ml). In allen stimulierten Proben Zusatz von IL-2 (100U/ml). Zellkonz.: 2×10^6 /ml. Messung der CD4+ T-Zellen am FACSCanto nach 24h Kulturdauer; Ki-67-Markierung erfolgte mittels intrazellulärer Färbung. n=3 gesunde Blutspender; mean ± SEM; One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest; p-Werte versus unstim; unstim – unstimuliert, PHA – Phytohämagglutinin, Con A – Concanavalin A, MFI – mittlere Fluoreszenzintensität (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

Phytohämagglutinin (PHA), CD3/28 und Concanavalin A (Con A) sind häufig eingesetzte T-Zell Stimulanzen. Als co-stimulatorisches Signal wurde IL-2 verwendet. Diese Substanzen führen nach Zugabe zur Zellkultur zu Zellwachstum und Zellproliferation. Es existieren unterschiedliche Methoden, diese Zellproliferation zu messen. Eine davon ist

die intrazelluläre Färbung des Proteins Ki-67, das von allen proliferierenden Zellen im Zellkern gebildet wird und durch einen entsprechenden monoklonalen Antikörper gebunden und sichtbar gemacht werden kann. In diesem Experiment wurde der Antikörper „PE Anti-Human Ki-67“ von Biolegend eingesetzt. Damit der Antikörper in den Zellkern vordringen kann, wurde die Zellmembran in mehreren Schritten mit Hilfe eines Permeabilisations-Puffersets behandelt.

Zur Überprüfung der Proliferationszunahme der CD4⁺ T-Zellen wurde der Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des intrazellulären Ki-67 gemessen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten eine vermehrte Ki-67-Expression nach Stimulation der T-Zellen durch das Lektin PHA ($p < 0.01$ versus unstimulierte Kontrolle) und eine deutlich verstärkte Ki-67-Expression nach direkter T-Zellrezeptorstimulation durch CD3/28, sowie durch das Lektin Con A (p -Wert jeweils < 0.001 versus unstimulierte Kontrolle). PHA wurde aufgrund der etwas niedrigeren Ki-67-Expression als T-Zellstimulanz in weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.1.2 Vergleich der Ki-67- und CD71- Expression nach unterschiedlicher T-Zell Stimulation und Einsatz der extrakorporalen Photopherese

Zur Bestimmung der Proliferationsinhibition nach Einsatz der experimentellen Photopherese wurde neben der Ki-67-Expression die Ausbildung des Oberflächenmarkers CD71 gemessen. Der Vorteil der CD71-Verwendung liegt in der deutlich einfacheren Färbung: CD71 ist der Transferrinrezeptor der Zelle und wird bei Zellproliferation auf der äußeren Zellmembran exprimiert. In allen Versuchen mit CD71 wurde der APC/Cy7 Anti-Human CD71 Antikörper von Biolegend verwendet. Dieser monoklonale Antikörper kann eine CD71-Expression der Zelle direkt an der Zelloberfläche detektieren. Es entfallen damit alle Schritte zur Zellpermeabilisierung der Zelle, was eine deutlich schnellere Färbung ermöglicht. Beide Marker wurden nach Bestrahlung und anschließender Stimulation der Zellen untersucht und eine verminderte Expression festgestellt, was auf eine niedrigere Proliferation der Zelle nach Photopherese hinweist. Diese Proliferationsinhibition nach Photopherese wird im Folgenden auch als Photophereseeffekt bezeichnet. Untersucht wurden sowohl CD4⁺ positive als auch CD4⁻ negative T-Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsmusters. CD71 zeigte die Proliferationsinhibition der CD3⁺CD4⁺ Zellen am stärksten an ($p < 0.001$ -exp versus +exp). Auch bei den CD3⁺CD4⁻ Zellen zeigte CD71 eine deutliche Proliferationsinhibition ($p < 0.01$). Ki-67 wurde bei gleicher Stimulationsdauer insgesamt deutlich niedriger exprimiert, außerdem war der Photophereseeffekt nur bei der

Stimulanzienkombination aus Con A und CD3/28 sichtbar. Der Photophereeffekt war bei den Ki-67+CD3+CD4- Zellen nur schwach ausgebildet ($p < 0.05$). Aufgrund dieser Datenlage wurde in weiteren Experimenten CD71 als Proliferationsmarker eingesetzt.

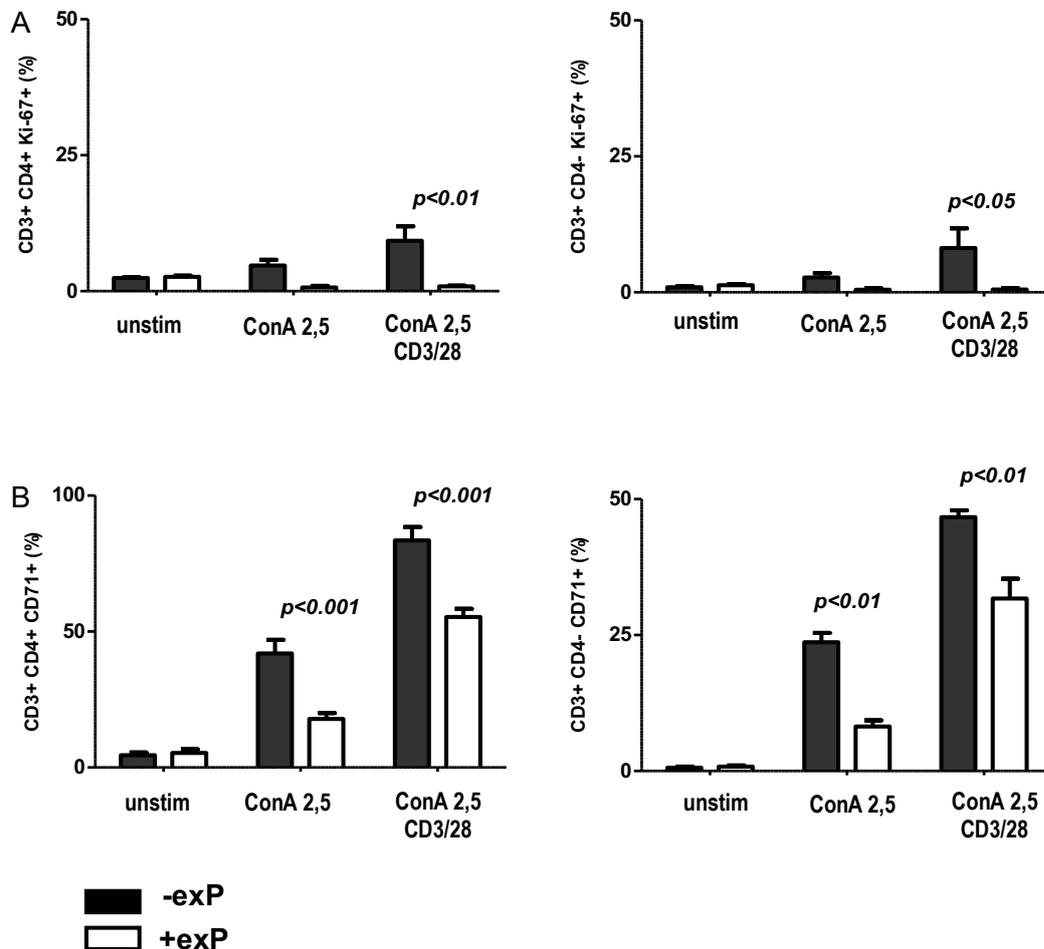


Abb. 8: Vergleich der Expression von Ki-67 (A) und CD71 (B) in humanen T-Zellen nach experimenteller Photophorese Humane PMBCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP); Ruhezeit nach exP 30 Minuten. Anschließende Stimulation mit Con A (2,5µg/ml) und CD3/28 (löslich, jeweils 1µg/ml), in allen stimulierten Proben Zusatz von IL-2 (100U/ml). Zellkonz.: 2×10^6 /ml; Messung der CD3+CD4+ und CD3+CD4- T-Zellen am FACSCanto nach 22h Kulturdauer; CD71-Färbung erfolgte mittels Oberflächenfärbung; Ki-67-Markierung erfolgte mittels intrazellulärer Färbung. n= 3 gesunde Blutspender; mean \pm SEM; Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest; p-Werte > 0.05 nicht dargestellt; exP – experimentelle Photophorese, Con A – Concanavalin A (Abbildung A entnommen aus Schwab et al., 2019)

3.1.3 Optimierung der T-Zellstimulation

Ein Ziel bei der Entwicklung des neuen Qualitätskontrolltestes war die schnelle Durchführbarkeit, weshalb versucht wurde die T-Zellstimulation bei gleicher Stimulationsdauer zu optimieren. Eine Möglichkeit dazu ist die Beschichtung des

Zellkulturplattenbodens mit dem Stimulationsantikörper CD3. CD28 wird danach löslich hinzugegeben. Um die T-Zellpopulationen besser spezifizieren zu können wurde neben dem CD4-Rezeptor auch der CD8-Rezeptor markiert.

Es wurden verschiedene Zellkulturplatten (A, B, C, D) mit Stimulationsantikörper CD3 beschichtet und mit einer unbeschichteten Platte (A) verglichen (Abbildung 9a). In diesem Versuch exprimierten CD8+ T-Zellen auf ihrer Oberfläche vermehrt CD71, wenn sie auf einer CD3 beschichteten Platte kultiviert wurden, wobei CD8+ T-Zellen der Platten C und D die deutlichste CD71-Expressionszunahme zeigten ($p < 0.01$ versus unbeschichtet). In weiteren Versuchen wurde somit eine Beschichtung der Zellkulturplatte mit CD3 durchgeführt. Verwendet wurde dafür die Platte D (*Sarstedt TC-Platte Cell+*).

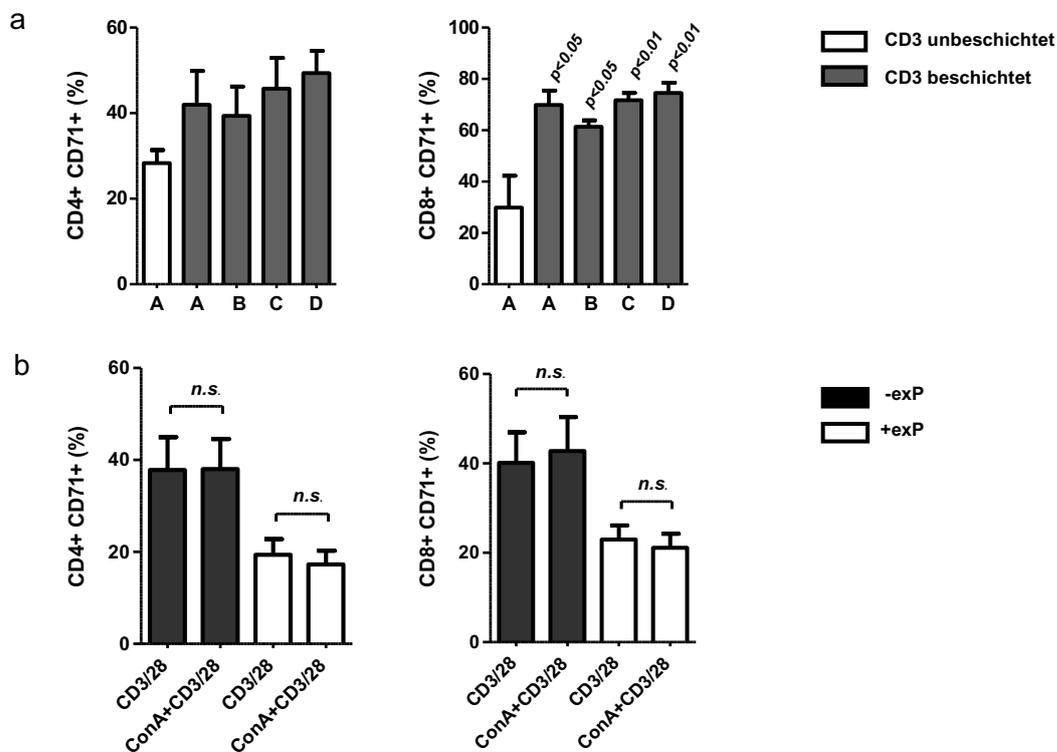


Abb. 9: Untersuchung der Versuchsbedingungen durch Zellkulturplattenvergleich (a) und Überprüfung der Stimulationsreagenzien (b) Kultivierung humaner PBMCs auf vier unterschiedlichen Zellkulturplatten (96-Well, Flachboden, Zellkonz.: 2×10^6 /ml) (a): A (greiner bio-one Cellstar Cell Culture Plate), B (greiner bio-one Microplatte, μ CLEAR, schwarz, hochbindend), C (Sarstedt TC-Platte Standard), D (Sarstedt TC-Platte Cell+); Stimulation mit CD3 (unlöslich und löslich, jeweils $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), CD28 (löslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), Con A ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) und IL-2 ($100 \text{U}/\text{ml}$). (b) Humane PBMCs wurden mit 8-MOP ($300 \text{ng}/\text{ml}$) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP). Ruhezeit nach exP 30 Min, Stimulation mit CD3 (unlöslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), CD28 (löslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), Concanavalin A ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) und IL-2 ($100 \text{U}/\text{ml}$). Messung der CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto nach 9h Kulturdauer; $n = 3$ gesunde Blutspender; $\text{mean} \pm \text{SEM}$; one-way ANOVA mit Tukey Posttest vs. CD3 unbeschichtet (a); unpaired t-test (b), p-Werte > 0.05 nicht dargestellt. n.s. – nicht signifikant, Con A – Concanavalin A, exP – experimentelle Photophorese

In einem weiteren Versuch wurde die T-Zellstimulation im Hinblick auf Ökonomisierung und Vereinfachung untersucht (Abbildung 9b). Es zeigte sich, dass die Kombination aus Con A und CD3/28 im Vergleich zu CD3/28 alleine zu keiner veränderten CD71-Expression bei bestrahlten und unbestrahlten Zellen führt. Somit wurde in den folgenden Experimenten CD3/28 ohne Con A zur T-Zellstimulation verwendet.

3.1.4 Untersuchung des Photophereeffekts nach Verlängerung des Zeitabstandes zwischen UVA/ 8-MOP-Behandlung und Zellstimulation

Weiterhin wurde getestet, ob ein verlängerter zeitlicher Abstand zwischen Photopherebehandlung und der T-Zellstimulation die Proliferationsinhibition nach Photophere verstärken kann. Die theoretische Überlegung dabei war, dass die

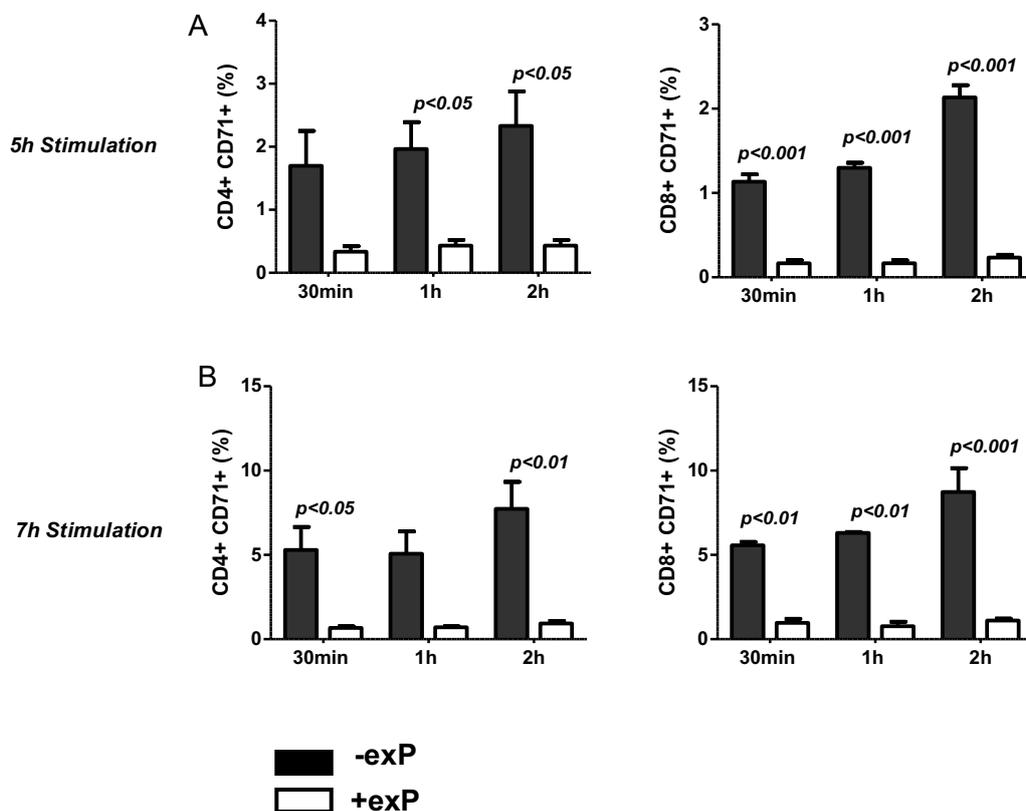


Abb. 10: Eine Verlängerung der Ruhezeit nach experimenteller Photophere vor Zellstimulation führt zu einem deutlicheren Photophereeffekt in humanen T-Zellen Humane PBMCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP). Ruhezeit nach exP 30min/1h/2h, Stimulation mit CD3 (unlöslich, 1µg/ml), CD28 (löslich, 1µg/ml) und IL-2 (100U/ml); Zellkonz.: 2×10^6 /ml; Messung der CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto nach 5h (A) und 7h (B) Kulturdauer; n=3 gesunde Blutspender, mean \pm SEM; Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest; p-Werte > 0.05 nicht dargestellt; exP – experimentelle Photophere

Photopheresebehandlung ihre Wirkung stärker entfalten kann, wenn die Zellen nicht sofort ein Wachstumssignal durch die Stimulation erhalten. Zu den Photopheresewirkungen gehören das Bilden der DNA-Crosslinks zwischen Pyrimidinbasen und dem aktivierten 8-MOP und die Apoptoseinduktion mit allen immunmodulatorischen Folgen. Um diese Überlegung zu überprüfen, erfolgte nach Bestrahlung eine „Ruhezeit“ der Zellen von 30min, 1h und 2h sowie eine anschließende Stimulation mit CD3/28 und IL-2. Die CD71-Expression wurde nach 5h und 7h Stimulationsdauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verlängerung des Zeitabstandes zwischen Photopherese und Stimulation der Zellen von 30 Minuten auf 2 Stunden eine deutlichere CD71-Expressionsinhibition der bestrahlten CD4+ und CD8+ T-Zellen hervorruft. Somit wurde in nachfolgenden Experimenten ein zeitlicher Abstand von 2h zwischen Bestrahlung und Stimulation der Zellen eingehalten.

3.1.5 Untersuchung der Kinetik der CD71-, CD69- und CD25- Expression nach experimenteller Photopherese

Neben CD71 sind noch weitere Proliferationsmarker, wie zum Beispiel CD25 und CD69 beschrieben, die nach Stimulation auf der Zelloberfläche exprimiert werden. CD25 ist ein Teil des IL-2-Rezeptors und wird nach Aktivierung des T-Zellrezeptor (TCR) -Komplexes überwiegend auf CD4+/CD8+ T-Zellen exprimiert. Da die verwendeten Stimulanzen CD3 und CD28 den TCR-Komplex aktivieren, war es naheliegend die CD25-Expression in stimulierten und bestrahlten T-Zellen zu untersuchen. Das Protein CD69 gilt als sehr früher T-Zellaktivierungsmarker, was für einen schnellen Qualitätskontrolltest von Vorteil wäre. Es erfolgte also eine kinetische Untersuchung der Expression dieser Surrogatmarker vor und nach Einsatz der experimentellen Photopherese mit dem Ziel, den Marker zu identifizieren, der den Photophereseeffekt am schnellsten und zuverlässigsten anzeigen kann. Bei der Untersuchung zeigte sich, dass alle getesteten Marker nach einer Kulturdauer von 22h geeignet sind die Photopheresebehandlung der CD4+ und CD8+ T-Zellen anzuzeigen (p-Wert jeweils <0.001 bei 22h).

3.1.5.1 CD71

Über die gesamte Kulturdauer war die CD71-Expression in bestrahlten CD4+ und CD8+ T-Zellen insgesamt niedrig ausgeprägt. Zwischen 6 und 8h nach Stimulation zeigte sich in den unbestrahlten CD4+-Zellen eine deutliche CD71-Expressionszunahme und der Photophereseeffekt wurde gut sichtbar (p<0.01). Die CD8+ T-Zellen scheinen das CD71-Protein nach Stimulation etwas langsamer zu exprimieren. Ein ausgeprägter

Unterschied zur bestrahlten Gruppe war hier erst nach 22h Stimulation zu erkennen. In anschließenden Experimenten wurden weitere Stimulationszeitpunkte untersucht.

3.1.5.2 CD69

Wie in der Literatur beschrieben, konnte auch in unseren Versuchen die schnelle Ausbildung von CD69 nach T-Zellstimulation beobachtet werden: Bereits nach einer Stimulationszeit von 4h zeigte sich eine ausgeprägte CD69- Expression der CD4+ und CD8+ T-Zellen. Außerdem war zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche CD69-Minderexpression in den UVA/ 8-MOP behandelten CD4+ und CD8+ T-Zellen zu erkennen (p -Wert jeweils <0.001). Aufgrund der schnellen Anzeige des Photophoresiseffekts wurde CD69 zu einem weiteren potenziellen Testmarker. Die CD69- Expression behandelter Zellen wurde in weiteren Experimenten neben CD71 gemessen.

3.1.5.3 CD25

Der Oberflächenmarker CD25 wurde von allen drei Markern in stimulierten CD4+ Zellen am langsamsten ausgebildet und konnte erst 22h nach Stimulation einen deutlichen Photophoresiseffekt aufzeigen ($p<0.001$). Auffällig in dieser Untersuchung war das Expressionsverhalten der bestrahlten CD8+ T-Zellen: Sie exprimierten von Messbeginn an (1h nach Stimulation) bis 8h nach Stimulation mehr CD25 auf ihrer Oberfläche als die unbestrahlte Kontrolle. Nach 8h Stimulation kam es dann in der unbestrahlten Kontrollgruppe zu einem ausgeprägten CD25-Expressionsanstieg bei gleichzeitig stagnierender CD25-Expression der bestrahlten Gruppe, wodurch der Photophoresiseffekt sichtbar wurde ($p<0.001$).

Im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Surrogatmarkern zeigte CD25 keine Vorteile. Außerdem scheint er nicht geeignet zu sein, eine schnelle und gleichzeitig konstante Proliferationsinhibition anzuzeigen, weshalb von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

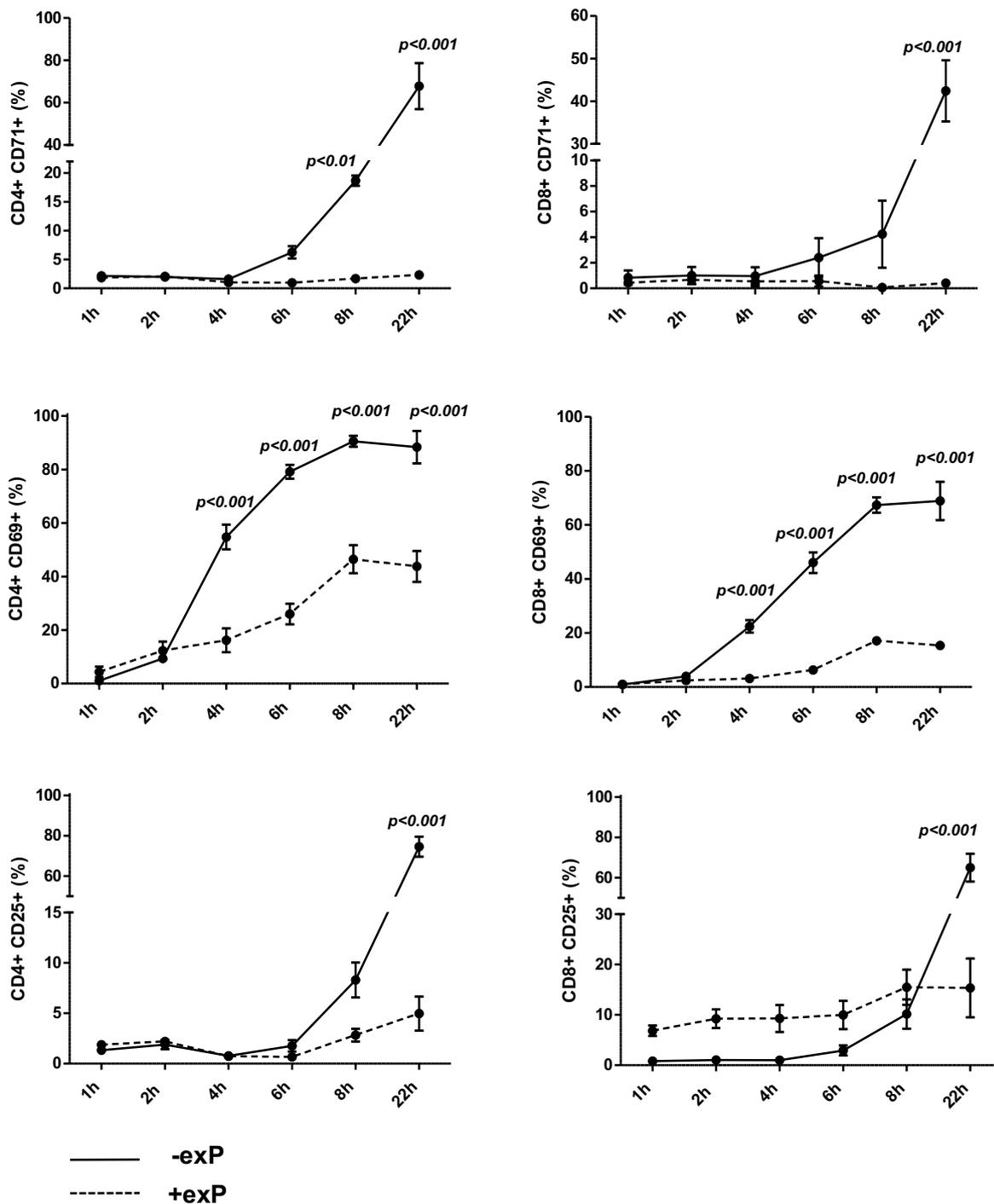


Abb. 11: Kinetik der Expression von CD71, CD69 und CD25 nach experimenteller Photopherese bei gesunden Blutspendern. Humane PBMCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP). Ruhezeit nach exP 2h. Stimulation mit CD3 (unlöslich, 1µg/ml), CD28 (löslich, 1µg/ml) und IL-2 (100U/ml). Oberflächenfärbung der Zellen mit CD71, CD69 und CD25 und Messung der CD4+- und CD8+-T-Zellen am FACSCanto nach 1h/2h/4h/6h/8h und 22h Kulturdauer; Zellkonz.: 2×10^6 /ml; n=3 gesunde Blutspender; mean \pm SEM; Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest; dargestellte p-Werte: -exP vs. +exP; p-Werte > 0.05 nicht dargestellt; exP – experimentelle Photopherese, unstimulierte Kontrolle nicht abgebildet (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

3.1.6 Serumabhängige Expression des Oberflächenmarkers CD69 nach Bestrahlung der Zellen

Da sich CD69 als schneller Indikator der Photoperese zeigte, wurde der Oberflächenmarker in weiteren Experimenten neben CD71 untersucht. Dabei zeigten sich, vor allem nach einem Herstellerwechsel des fötalem Kalbsserums (FKS), Unterschiede in der CD69 Expression in unstimulierten T-Zellen. Um die Wechselwirkungen zwischen Serum und CD69-Expression zu spezifizieren, wurde die

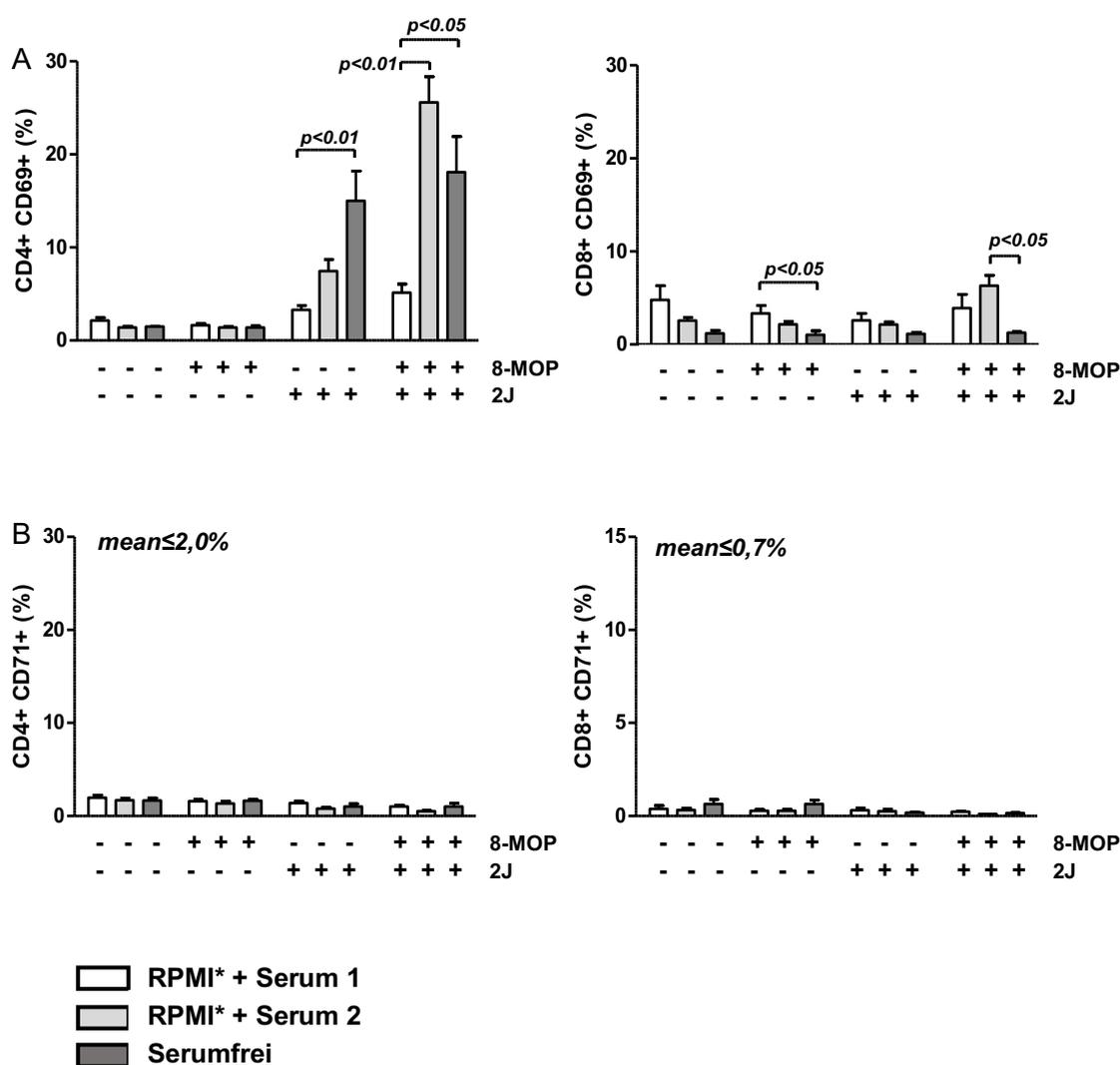


Abb. 12: Chargenabhängige Induktion der CD69- Expression in unstimulierten T-Zellen nach Bestrahlung. Humane PBMCs wurden in unterschiedliche Kulturmedien aufgenommen (Zellkonz.: $2 \times 10^6/ml$) und mit +/-8-MOP (300ng/ml) und +/-UVA-Licht (2J) behandelt. Serum 1: FCSi 10%, Hrst. PAN; Serum 2: FCSi 10% Hrst. PAA,, Serumfreies Medium: Xvivo; Messung der CD69+ (A) und CD71+ (B) T-Zellen (CD4+ und CD8+) am FACSCanto nach 8h Kulturdauer; n= 4; mean \pm SEM, ; One-way ANOVA mit Tukey Posttest; p-Werte > 0.05 nicht dargestellt; Hrst – Hersteller, * versetzt mit Hepes (10mM), NEA (1x), Natrium Pyruvat (1mM) (Abbildung A entnommen aus Schwab et al., 2019)

Expression auch in serumfreiem Medium (Xvivo) getestet. Weiterhin wurde untersucht, wie sich verschiedene Einflüsse der Photopheresebehandlung auf die CD69- Expression auswirken. Vor allem unstimulierte CD4+ T-Zellen reagierten nach Bestrahlung der Zellen mit UVA-Licht (2J) und 8-MOP-Zugabe auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen. Ein Serumwechsel des Herstellers (Serum 1 versus Serum 2) führte zu einem starken Anstieg der CD69-Expression in bestrahlten CD4+ T-Zellen ($p < 0.01$). Auch in serumfreiem Medium (Serum 1 versus Serumfrei) zeigte sich ein deutlicher Anstieg der CD69-Expression nach Bestrahlung ($p < 0.05$). CD8+ T-Zellen reagierten in Medium mit Serum 1 und 2 mit einer leicht erhöhten CD69-Expression. Aufgrund der starken Abhängigkeit der CD69- Expression von der Mediumzusammensetzung, wurde der Marker CD69 nicht weiterverwendet. Herstellerwechsel für Testsubstanzen können in der Routinediagnostik nicht ausgeschlossen werden, weshalb dieser Marker für die Qualitätskontrolle als ungeeignet eingestuft wurde.

Die Ausbildung des Oberflächenmarkers CD71 wurde neben CD69 in der gleichen Zellkultur gemessen. Dabei zeigten sich keine FKS-abhängigen Veränderungen der CD71- Expression nach Bestrahlung der Zellen. Die Ausbildung von CD71 war in den unstimulierten CD4+ und CD8+ T-Zellen insgesamt niedrig (CD4+CD71+: $\text{mean} \leq 2,0\%$; CD8+CD71+: $\text{mean} \leq 0,7\%$).

3.1.7 Weitere kinetische Untersuchungen der CD71-Expression in bestrahlten Zellen zur Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer

Wie in 3.1.5. erläutert, lag der früheste Messzeitpunkt der CD71-Expression der T-Zellen nach Einsatz der experimentellen Photopherese zwischen 8h und 22h nach Stimulation. Als weiterer Untersuchungszeitpunkt wurde 16h nach Stimulation gewählt, was ermöglicht, die CD71-Expression nach einer Übernachtskultur zu messen. Dieser Punkt ist für die Anwendung des Tests im klinischen Alltag relevant, da die Messungen meist zwischen 8:00 und 16:00 erfolgen. Wichtig war es einen Zeitpunkt zu finden, zu dem ein ausreichend hohes CD71- Delta zwischen bestrahlter und unbestrahlter Gruppe vorhanden ist. Start der Messung war die CD71- Expression ab 7h Stimulationsdauer, da zu diesem Zeitpunkt schon ein geringer CD71- Expressionsanstieg zu erwarten war. Um den Verlauf bzw. die Konstanz der CD71- Ausbildung zu überprüfen, wurden die Zellen insgesamt 4 Tage stimuliert. CD4+ und CD8+ T-Zellen wiesen bei dieser Untersuchung nach 16h Stimulation ein ausreichend hohes Delta der CD71- Expression auf (CD4+: $p < 0.001$; CD8+: $p < 0.01$, jeweils -exP versus +exP). Somit wurde die Stimulationsdauer von 16h in weiteren Experimenten als CD71- Messzeitpunkt

übernommen. Nach 4-tägiger Stimulation war sowohl in CD4+ als auch in CD8+ T-Zellen eine starke CD71-Differenz zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen zu erkennen (p -Wert für CD4+ und CD8+ T-Zellen jeweils: 0.001; -exP versus +exP). Somit kann von einer konstanten Anzeige des Photophereeffekts durch die CD71-Expression ausgegangen werden, was theoretisch ermöglicht den Photophereeffekt auch noch nach 4 Tagen zu überprüfen.

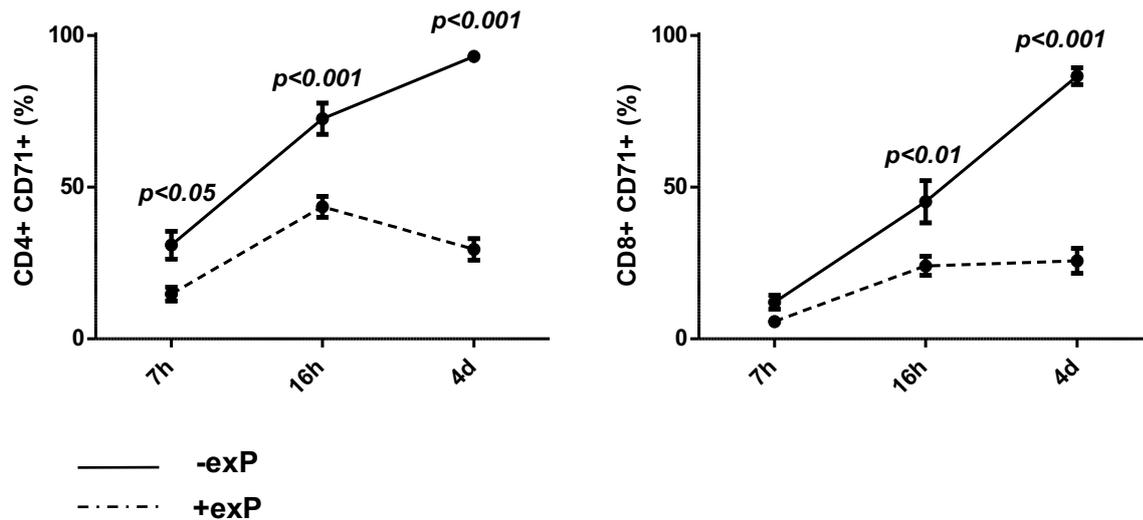


Abb. 13: Der Einsatz der experimentellen Photophere führt nach einer Stimulationszeit von 16h zu einer signifikant niedrigeren CD71-Expression in CD4+ und CD8+ T-Zellen Humane PBMCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP). Stimulation mit CD3 (unlöslich, 1µg/ml), CD28 (löslich, 1µg/ml) und IL-2 (100U/ml). Oberflächenfärbung der Zellen mit CD71 und Messung der CD4+ und CD8+T-Zellen am FACSCanto nach einer Stimulationszeit von 7h/16h und 4d; Zellkonz.: 2×10^6 /ml; $n=7$ gesunde Blutspender, gemessen in 2 unabhängigen Experimenten; mean \pm SEM; Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest, p -Werte > 0.05 nicht dargestellt; exP – experimentelle Photophere, unstimulierte Kontrolle nicht abgebildet (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

3.2 Validierung des CD71- und Apoptose- Assays an PBMCs gesunder Blutspender

3.2.1 Validierung des CD71- Assays und Vergleich mit dem Goldstandard der CFSE-Fluoreszenzmarkierung

Die neue CD71-Methode zur Messung der Proliferationsinhibition nach experimenteller Photopherese wurde an PBMCs aus Buffy Coats von 11 gesunden Blutspendern in 5 unabhängigen Experimenten validiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch (Tab. 11 und 12) und graphisch (Abb. 14) dargestellt.

n	CD71-Assay (CD4+)								CFSE-Assay (CD4+)			
	16h nach Stimulation				4 Tage nach Stimulation				4 Tage nach Stimulation			
	PreExp Delta PD (%)	PostExp Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreExp Delta PD (%)	PostExp Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreExp Delta PD (%)	PostExp Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)
1	82,7	28,6	54,1	65,4	85,2	8,3	76,9	90,3	77,0	6,9	70,1	91,1
2	54,5	12,9	41,6	76,3	91,2	2,9	88,3	96,8	79,6	11,2	68,4	85,9
3	79,7	26	53,7	67,4	86,2	8,5	77,7	90,1	73,4	11,6	61,8	84,2
4	72,6	36,2	36,4	50,1	89,7	4,4	85,3	95,1	80,7	8,3	72,4	89,7
5	87	38,6	48,4	55,6	86,4	5,1	81,3	94,1	81,9	7,3	74,7	91,1
6	90,4	35,5	54,9	60,7	91,3	16,4	74,9	82,0	89,3	9,9	79,4	88,9
7	54,9	14,3	40,6	74,0	43,8	3,2	40,6	92,7	40,6	3,1	37,5	92,3
8	85,5	46,6	38,9	45,5	68,4	11,4	5,07	83,3	62,8	13,9	48,9	77,9
9	74,8	30,7	44,1	59,0	94,2	21,3	72,9	77,4	75,6	8,0	67,7	89,4
10	74,3	32,8	41,5	55,9	52,8	7,5	45,3	85,8	41,1	15,2	25,9	63,1
11	70,1	26,3	43,8	62,5	85,2	6,2	79,0	92,7	57,6	1,1	56,5	98,1
M	75,1	29,9	45,3	61,1	79,5	8,7	70,8	89,1	69,1	8,8	60,3	86,5
SD	11,9	10,0	6,5	9,4	16,9	5,7	16,0	6,2	16,5	4,2	16,7	9,3

Tab. 11: CD4+ T-Zellen; Vergleich des CD71- und CFSE-Assays

n	CD71-Assay (CD8+)								CFSE-Assay (CD8+)			
	16h nach Stimulation				4 Tage nach Stimulation				4 Tage nach Stimulation			
	PreExp Delta PD (%)	PostExp Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreExp Delta PD (%)	PostExp Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreExp Delta PD (%)	PostExp Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)
1	41,9	9,1	32,8	78,3	57,8	8,4	49,4	85,5	54,4	6,4	48,0	88,2
2	26,1	10,0	16,1	61,7	78,2	3,7	74,5	95,3	72,7	4,0	68,7	94,5
3	58,3	3,9	54,4	93,3	82,7	13,1	69,6	84,2	74,8	17,7	57,1	76,4
4	42,8	20,7	22,1	51,6	83,5	2,5	81,0	97,0	72,4	3,8	68,7	94,8
5	53,2	6,9	46,3	87,0	81,9	2,6	79,3	96,8	72,3	12,4	59,9	82,9
6	78,4	7,6	70,8	90,3	89,3	10,9	78,4	87,8	85,7	21,2	64,5	75,2
7	26,7	1,8	24,9	93,3	52,5	1,5	51	97,1	46,8	11,5	35,2	75,4
8	51,3	22,3	29,0	56,5	57,9	13,8	44,1	76,2	57,0	30,4	26,6	46,6
9	35,2	9,6	25,6	72,7	84,3	21,3	63,0	74,7	70,8	5,9	64,9	91,7
10	39,4	9,9	29,5	74,9	43,8	7,7	36,1	82,4	32,7	3,5	29,1	89,2
11	28,5	6,1	22,4	78,6	54,8	2,0	52,8	96,4	41,4	0,6	40,7	98,4
M	43,8	9,8	34,0	76,2	69,7	8,0	61,7	88,5	61,9	10,7	51,2	83,0
SD	15,8	6,3	16,5	14,6	16,3	6,3	15,8	8,5	16,5	9,2	16,0	14,6

Tab. 12: CD8+ T-Zellen; Vergleich des CD71- und CFSE-Assays

Tab. 11 und 12: Vergleich der absoluten und relativen Inhibition der CD71/CFSE-Expression.

n = 11 gesunde Blutspender, gemessen in 5 unabhängigen Experimenten;

M – Mittelwert, SD – Standardabweichung; ExP – Experimentelle Photopherese; h – hours (Stunden)

PD (%) CFSE: Percentage of Division CFSE⁺ Zellen = 100 x divided events / (divided events + undivided events)

PD (%) CD71: Percentage of Division CD71⁺ Zellen, entspricht den CD4⁺CD71⁺ oder CD8⁺CD71⁺ T-Zellen im FACS

Delta PD (%) = Pre oder PostExP stimulierte PD - Pre oder PostExP unstimulierte PD

Δ Expr: Δ Expression = PreExP Delta PD% - PostExP Delta PD%

Inh (%): Percentage of inhibition = 100 - (PostExP Delta PD/PreExP Delta PD) x 100

(Tabelle entnommen aus Schwab et al., 2019)

Die beiden Tabellen zeigen jeweils die Ergebnisse des CD71-Assays (linke Tabellenseite) und des CFSE-Assays (rechte Tabellenseite). Aufgelistet sind zeilenweise die Ergebnisse jedes einzelnen Spenders. Für jede Spalte (Pre- und Post-exP) sind die Ergebnisse in relativen Werten (Absolutwerte abzüglich der unstimulierten, aber CD71/CFSE positiven Zellen) angegeben (Delta PD). Die absoluten Prozentwertwerte (PD: Percentage of Division) sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Das Delta der Expression (Δ Expr) wurde aus den relativen Werten berechnet (Delta PD Werte vor Photopherese abzüglich der Delta PD Werte nach Photopherese). CD4+ Zellen zeigten bei der Validierung nach einer Stimulationszeit von 16h ein mittleres Delta der CD71- Expression von 45.3% (SD: 6.5%; Range: 36.4% - 54.9%). Nach 4 Tagen stieg das Delta der CD71- Expression in CD4+ Zellen auf 70.8% an (SD:16%; Range: 40.6% - 88.3%). CD8+ T-Zellen zeigten, wie auch schon in den Vorversuchen, eine langsamere Ausprägung des CD71-Deltas nach Photopheresebehandlung. Es lag nach 16-stündiger Stimulation bei 34.0% (SD:16.5%, Range: 16.1%-70.8%). Nach 4 Tagen Stimulation wurde ein mittleres Delta von 61.7% (SD:15.8%, Range: 36.1%-81.0%) gemessen. Der CFSE-Assay bestätigte die gemessene Proliferationsinhibition: CD4+ T-Zellen wiesen nach 4-tägiger Stimulation im CFSE-Assay ein Delta der Proliferation von 60.3% (SD:16.7%) mit einer Range von 25.9% bis 79.4% auf. CD8+ T-Zellen zeigten im CFSE- Assay analog zum CD71-Assay ein leicht vermindertes Delta der Proliferation von 51.2% (SD:16%, Range: 26.6%-68.7%). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde zusätzlich die Inhibition der Proliferation berechnet (Inh %). Die Photopherese bewirkte in CD4+ T-Zellen eine Proliferationsinhibition von 61,1% (SD: 9,4, Range: 45,5%-76,3%) nach 16h im CD71-Assay. Nach 4 Tagen konnte eine Proliferationsinhibition von 89,1% (SD: 6,2%) erreicht werden. Im Vergleich dazu, zeigte das CFSE-Assay in CD4+ T-Zellen eine Inhibition der Proliferation nach 4 Tagen von 86,5% (SD: 9,3%) an. Die Proliferation von CD8+ T-Zellen wurde durch die Photopherese vergleichbar inhibiert. Nach 16h lag die Inhibition im CD71-Assay bei 76,2% (SD: 14,6%); nach 4 Tagen bei 88,5% (SD: 8,5) und im CFSE-Assay nach 4 Tagen bei 83,0% (SD: 14,6%).

Die Ergebnisse sind nachfolgend graphisch dargestellt. Statistische Analysen zeigten eine signifikant niedrigere CD71-Expression in photopheretisch behandelten CD4+ und CD8+ T-Zellen nach 16-stündiger und 4-tägiger Stimulation (p-Wert jeweils <0.001). Entsprechende exemplarische Histogramme eines Spenders sind neben den Graphen abgebildet.

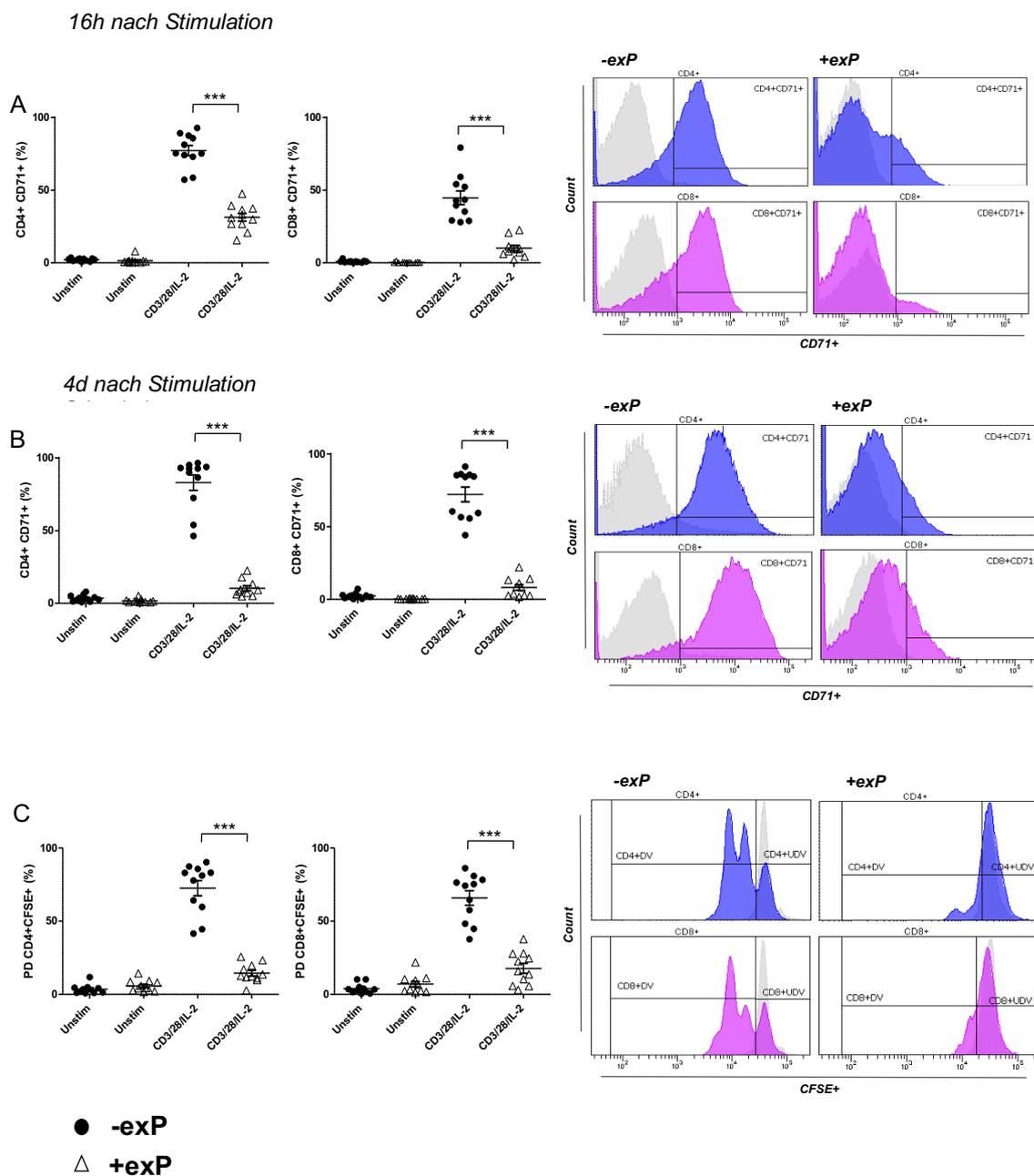


Abb. 14: Der Einsatz der experimentellen Photopherese führt zu einer signifikant verminderten CD71- Expression nach 16h (A) und 4d (B) in stimulierten T-Zellen von gesunden Blutspendern. Vergleich mit dem CFSE-Assay (C) Humane PBMCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP). Ein Teil der Probe wurde mit CFSE gefärbt. Zellkonz.: 2×10^6 /ml. Ruhezeit nach exP 2h. Stimulation mit CD3 (unlöslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), CD28 (löslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) und IL-2 (100U/ml). Messung der CD4+ und CD8+T-Zellen am FACSCanto nach 16h/4Tagen Stimulationsdauer; PD: Percentage of Division der CFSE+Zellen = $100 \times \text{divided events} / (\text{divided events} + \text{undivided events})$; mean \pm SEM; paired t-test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n = 11$ gesunde Blutspender, gemessen in 5 unabhängigen Experimenten. unstim – unstimuliert; exP – experimentelle Photopherese (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

Abbildung C stellt die Ergebnisse des CFSE-Assays graphisch dar: Auch hier ist eine starke Proliferationsinhibition nach Photopherese zu erkennen ($p < 0.001$ -exP versus +exP).

Um zu überprüfen, ob die Daten des neuen CD71-Assays mit dem bekannten CFSE-Assay korrelieren, wurden die Werte, die der Tabellenspalte „Delta Expression“ 4 Tage nach Stimulation zu entnehmen sind, einer linearen Regressionsanalyse unterzogen und der entsprechende Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser lag bei CD4+ T-Zellen bei $r = 0.8717$ ($p = 0.0005$), was einer stark positiven Korrelation der beiden Datensätze entspricht. CD8+ T-Zellen wiesen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9114$ auf ($p < 0.0001$), weshalb auch hier von einer stark positiven Korrelation ausgegangen werden kann.

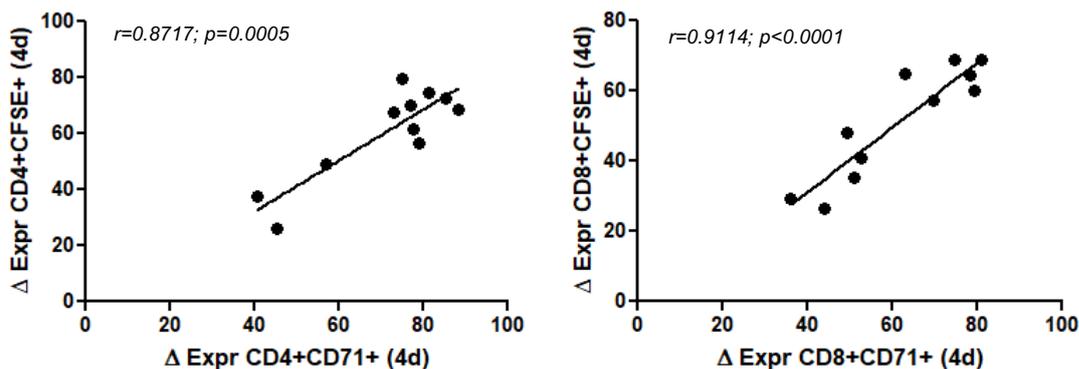


Abb. 15: Das Δ der CD71-Expression korreliert mit dem Δ der CFSE-Expression 4 Tage nach Stimulation in PBMCs gesunder Blutspender. Korreliert wurden die Daten der Spalten „ $\Delta \text{ Expr}$ “ des CD71- und CFSE-Assays 4 Tage nach Stimulation (jeweils für CD4+ und CD8+ T-Zellen); Pearson-Korrelation und lineare Regressionsanalyse, d – days (Tage); (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

Da der CD71-Assay analog zum CFSE-Assay eine ausreichend große CD71-Minderexpression der Zellen nach Einsatz der experimentellen Photopherese zeigte, wurde das CD71-Verfahren an Patientenproben getestet, die eine extrakorporale Photopheresebehandlung erhalten hatten.

3.2.2 Überprüfung der Apoptose nach Einsatz der experimentellen Photophorese

Die Induktion der Apoptose nach Einsatz der experimentellen Photophorese kann Folge des DNA-Schadens nach Bildung der Crosslinks zwischen aktiviertem 8-MOP und Pyrimidinbasen sein. Weil sie ebenfalls für eine Überprüfung des Photophoreseeffekts geeignet sein kann, erfolgte parallel zur CD71- und CFSE-Messung eine Apoptosemessung in unstimulierten T-Zellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Gesamtapoptose (Früh- und Spätapoptose) in CD4+ und CD8+ T-Zellen nach Bestrahlung und 16h Kulturdauer statistisch hoch bis sehr hoch signifikant war ($p < 0.001$ für CD4+ und $p < 0.01$ für CD8+).

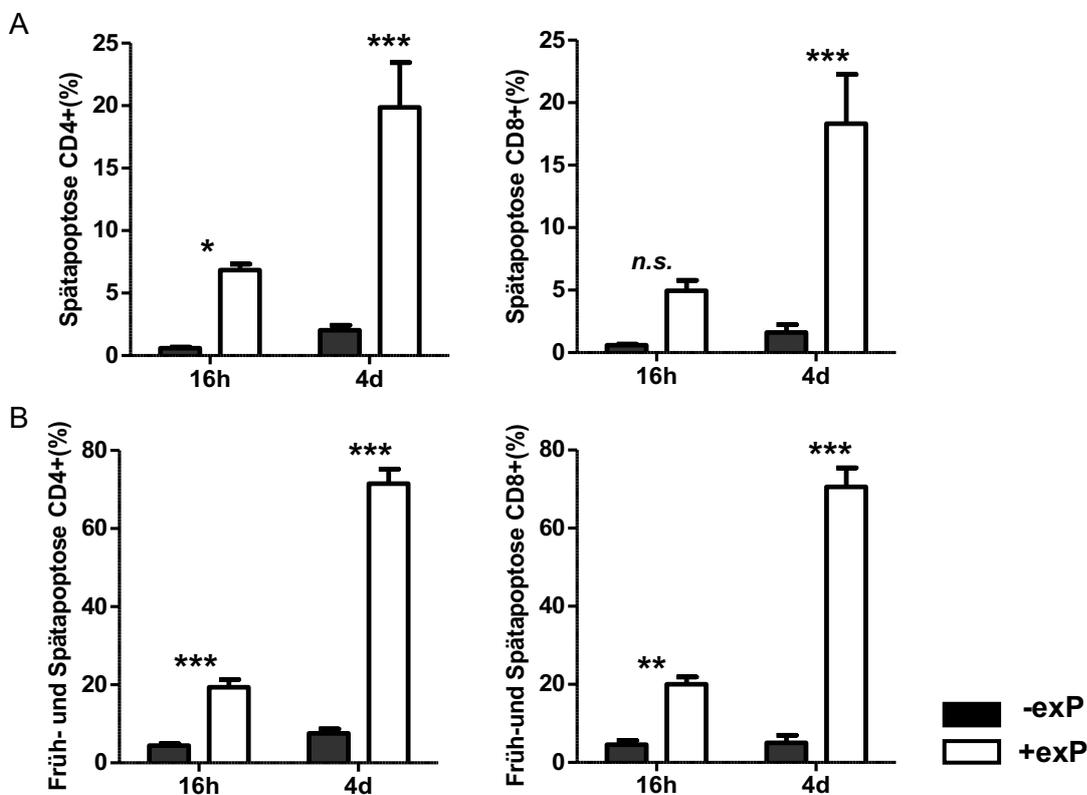


Abb. 16: Nach Einsatz der experimentellen Photophorese zeigt sich eine signifikante Apoptosezunahme in unstimulierten T-Zellen von gesunden Blutspendern. Humane PBMCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt (entspricht exP). Ruhezeit nach exP 2h. Zellkonz.: 2×10^6 /ml. Messung der CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto nach 16h/4d Kulturdauer; Apoptosebestimmung durch Annexin-V und Sytox (Frühapoptose: Annexin-V⁺/Sytox; Spätapoptose: Annexin-V⁺/Sytox⁺ + Annexin-V/Sytox⁺); n = 8 gesunde Blutspender, gemessen in 2 unabhängigen Experimenten; mean \pm SEM; Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. – nicht signifikant; exP – experimentelle Photophorese; h – hours (Stunden), d – days (Tage)

Somit kann bestätigt werden, dass die Apoptosemessung nach Photophoresebehandlung einen eindeutigen Photophoreseeffekt der CD4+ und CD8+

T-Zellen anzeigt. Bei der späteren Untersuchung von Patientenproben wurde ebenfalls eine parallele Apoptosequantifizierung durchgeführt.

3.2.3 Vergleich des CD71- und Apoptoseassays

Um zu überprüfen welcher Test den Photophoresiseffekt in bestrahlten T-Zellen eindeutiger anzeigen kann, wurde ein Delta der Apoptose (Δ Apoptose) gebildet und mit dem Delta der CD71-Expression (Δ CD71) verglichen. Dazu wurde die Differenz der apoptotischen Zellen vor und nach experimenteller Photophorese berechnet. Verwendet wurden die Prozentwerte der unstimulierten gesamtapoptotischen (früh- und spätapoptotischen) Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden Assays ein signifikanter Unterschied in der Anzeige des Photophoresiseffekts besteht. Die Messung der CD71-Expression vor und nach experimenteller Photophorese war in diesem Setting der eindeutigere Test für eine stattgehabte Behandlung. Der Unterschied zwischen den beiden Assays war für CD4+ T-Zellen sehr stark ausgeprägt ($p < 0.001$). Für CD8+ T-Zellen war der Unterschied weniger deutlich, jedoch weiterhin statistisch signifikant ($p < 0.05$).

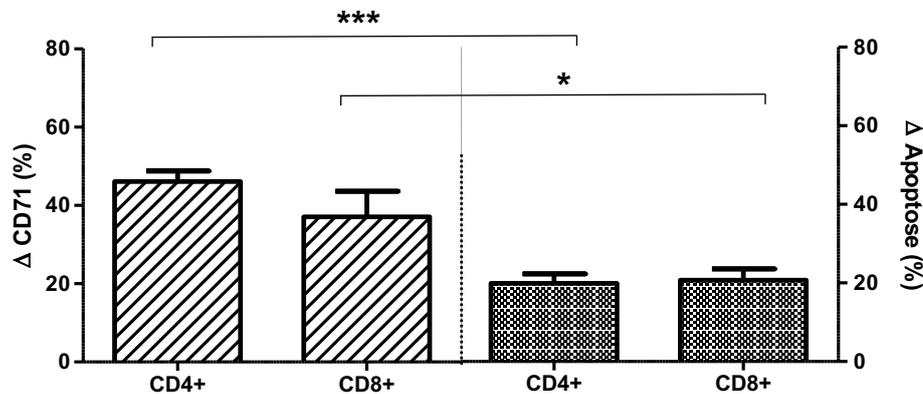


Abb. 17: Der CD71-Assay zeigt nach 16h Kulturdauer ein signifikant größeres Delta als der Apoptose-Assay. Humane PBMCs wurden mit 8-MOP (300ng/ml) und UVA-Licht (2J) behandelt. Ruhezeit nach exP 2h. Zellkonz.: 2×10^6 /ml. CD71-Assay: Stimulation mit CD3 (unlöslich, 1 μ g/ml), CD28 (löslich, 1 μ g/ml) und IL-2 (100U/ml). CD71 Messung von CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto nach 16h Stimulation. Δ CD71 (%) = Pre-exP Delta PD% - Post-exP Delta PD%; Apoptose-Assay: Kultivierung von unstimulierten T-Zellen und Messung der Gesamtapoptose (Annexin-V und Sytox) von CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto nach 16h Kulturdauer. Δ Apoptose (%): Apoptose Post-exP – Apoptose Pre-exP; n=8 gesunde Blutspender, gemessen in 2 unabhängigen Experimenten; mean \pm SEM; unpaired t-test; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

3.3 Vorversuche mit PBMCs aus Patientenproben

3.3.1 Verlängerung des Zeitabstandes zwischen ECP und Stimulation der Zellen

In ersten Versuchen, den an gesunden PBMCs validierten CD71-Assay auf Patientenproben zu übertragen, zeigte sich bei der Messung der CD71- Expression vor und nach der ECP-Behandlung eine schwächere Darstellung des Photophereseeffekts.

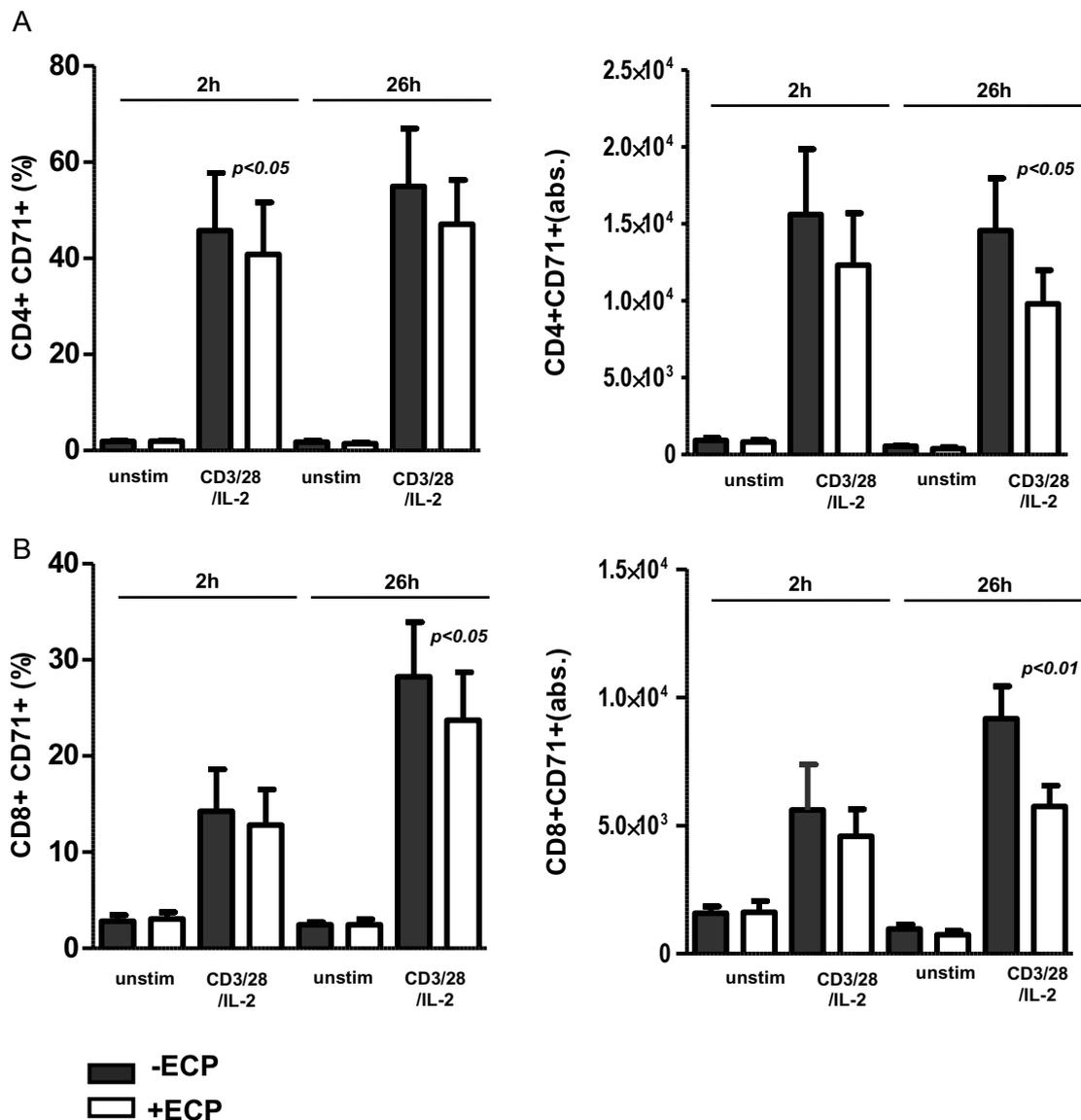


Abb. 18: Untersuchung des Photophereseeffekts in Abhängigkeit der Ruhezeit vor T-Zellstimulation und nach ECP. Ruhezeit der kultivierten PBMCs nach ECP 2h und 26h (Zellkonz.: 2×10^6 /ml). Anschließende Stimulation mit CD3 (unlöslich, $1 \mu\text{g/ml}$), CD28 (löslich, $1 \mu\text{g/ml}$) und IL-2 (100U/ml). Stimulationsdauer 16h. Proliferationsmessung von CD4+T-Zellen (A) und CD8+T-Zellen (B) am FACSCanto; abs. Zellzahl wurde mittels Beads berechnet (aufgenommene Lymphozyten $\times 10000$)/aufgenommene Beads; $n=5$ Experimente (ECP-Behandlungen) von 5 Patienten; mean \pm SEM; paired t-test; p-Werte > 0.05 nicht dargestellt; abs. – absolut

Es folgte ein Vorversuch, bei welchem eine Abstandsverlängerung zwischen ECP und Stimulation von 2h auf 26h untersucht wurde.

In dieser Abbildung ist der schwache Photophereseeffekt nach einer Ruhezeit von 2h zu erkennen. Lediglich CD4+ T-Zellen zeigen bei 2h eine leichte CD71-Minderexpression nach ECP ($p < 0.05$). Bei einer Verlängerung des Abstandes von 2h auf 26h zwischen ECP und Stimulation ist ein etwas deutlicherer Photophereseeffekt, vor allem im absoluten Zellcount der CD8+ T-Zellen ($p < 0.01$), zu erkennen. Aufgrund der Testverbesserung wurde die 26-stündige Ruhezeit nach ECP in weiteren Experimenten übernommen.

3.3.2 Überprüfung der Stimulation in Patientenproben

Bei weiteren Untersuchungen der Patientenproben konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der T-Zellen mit CD3/CD28/IL-2 zu keiner verbesserten CD71-Expression im Vergleich zur Stimulation mit CD3/28 führt ($p > 0.05$). In nachfolgenden Experimenten wurde somit auf die Zugabe von IL-2 verzichtet.

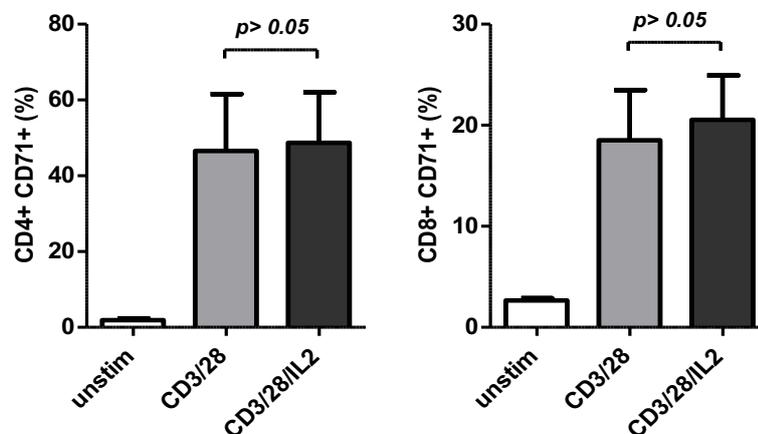


Abb. 19: Es zeigt sich kein Unterschied der CD71-Expression in CD4+/CD8+ T-Zellen von Patienten nach IL-2-Zugabe. Ruhezeit der kultivierten PBMCs nach ECP 26h (Zellkonz.: 2×10^6 /ml). Anschließende Stimulation für 16h mit CD3 (unlöslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), CD28 (löslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) +/- IL-2 ($100 \text{U}/\text{ml}$). Proliferationsmessung von CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto; $n=4$ Experimente (ECP-Behandlungen) von 4 Patienten; $\text{mean} \pm \text{SEM}$; unpaired t-test; unstim – unstimuliert

3.4 Validierung des Apoptoseassays und des CD71-Assays an PBMCs aus Patientenproben

3.4.1 Untersuchung der Apoptose nach ECP

Die Apoptosemessung in unstimulierten PBMCs gesunder Blutspender erwies sich als guter Indikator der Photopherese (3.2.2). Diese Messung wurde in Form einer kinetischen Untersuchung der Apoptoserate nach ECP an Patientenproben wiederholt. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Experiment Patient	24h nach ECP			42h nach ECP			d4 nach ECP			d5 nach ECP		
	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose
1a	5.9	8.6	2.7	7.5	11.8	4.3	7.9	35.4	27.5	13.6	85.3	71.7
2b	4	19.7	15.7	10.3	21	10.7	17.3	37.8	20.5	16.2	56.2	40
3c	2.1	6.8	4.7	7.1	11.1	4	5.8	40.7	34.9	8.6	63.5	54.9
4c	4.8	11	6.2	8.6	9.1	0.5	6	44.7	38.7	11.2	52.6	41.4
5d	12.4	11.1	-1.3	8.1	27.6	19.5	8.9	89.8	80.9	15.5	98.2	82.7
6d	4.1	12.6	8.5	7.5	22.2	14.7	16.1	94.5	78.4	10.5	92.6	82.1
7e	5	7	2	11.1	20.5	9.4	18.4	54.3	35.9	30.6	81.3	50.7
8e	6.6	11.4	4.8	8.3	22.6	14.3	12	57	45	26.5	75.9	49.4
9f	1.7	3.3	1.6	3.4	10.4	7	3.3	60.1	56.8	3.2	49.6	46.4
10f	2.2	7.1	4.9	3.1	8.2	5.1	4	64	60	3.6	86	82.4
M	4.9	9.9	5.0	7.5	16.5	9.0	10.0	57.8	47.9	14.0	74.1	60.2
SD	3.1	4.5	4.6	2.6	7.0	5.9	5.6	20.5	20.6	8.9	17.4	17.6

Tab. 13: CD4+ T-Zellen; Gesamtapoptose (%)

Experiment Patient	24h nach ECP			42h nach ECP			d4 nach ECP			d5 nach ECP		
	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Apoptose
1a	12.5	14.9	2.4	10.8	21.1	10.3	13.6	51	37.4	18.9	86.4	67.5
2b	4.2	17.4	13.2	9.8	16.9	7.1	13.7	47.5	33.8	17.1	69.6	52.5
3c	23.8	30.8	7	17.1	38.3	21.2	6.2	59.5	53.3	12.8	79.6	66.8
4c	5.1	2.8	-2.3	7.6	27.5	19.9	5.5	36.2	30.7	19.2	52.2	33
5d	18.4	16.9	-1.5	20.6	39.7	19.1	4.6	89.8	85.2	10.4	95.4	85
6d	3.6	12.8	9.2	6.7	27.3	20.6	12.2	96.1	83.9	12.9	94.6	81.7
7e	20.9	21.1	0.2	30.2	24.7	-5.5	21.8	68.4	46.6	30.6	90.8	60.2
8e	11.7	24.6	12.9	8.8	33.5	24.7	14.2	72.8	58.6	26.5	89.2	62.7
9f	4.2	8.8	4.6	15.7	25.2	9.5	7.4	80.6	73.2	7.8	68.5	60.7
10f	13.2	24.4	11.2	9.3	42.7	33.4	12.9	68.4	55.5	9.4	85.3	75.9
M	11.8	17.5	5.7	13.7	29.7	16.0	11.2	67.0	55.8	16.6	81.2	64.6
SD	7.5	8.2	5.9	7.4	8.5	10.9	5.3	18.9	19.7	7.5	13.8	15.0

Tab. 14: CD8+ T-Zellen; Gesamtapoptose (%)

Tab. 13 und 14: Kinetik der Gesamtapoptose unstimulierter T-Zellen in Patientenproben. Zellkonz.: $2 \times 10^6/ml$; Apoptosebestimmung am FACSCanto nach 24h/42h/4d/5d durch Färbung der CD4+/CD8+ T-Zellen mit Annexin-V (Frühapoptose) und Sytox (Spätapoptose). M: Mittelwert, SD: Standardabweichung; h – hours (Stunden), d – days (Tage)

Gesamtapoptose: Summe aus früh- und spätapoptotischen Zellen

Frühapoptotische T-Zellen: (Annexin-V⁻/Sytox⁻)

Spätapoptotische T-Zellen: (Annexin-V⁺/Sytox⁺) + (Annexin-V⁻/Sytox⁺)

Δ Apoptose = PostECP Apoptose - PreECP Apoptose

(Tabelle entnommen aus Schwab et al., 2019)

Der prozentuale Anteil apoptotischer CD4+ und CD8+ Zellen wurde 24h, 42h, 4 Tage und 5 Tage nach ECP ermittelt. In den Tabellen 13 und 14 sind die Ergebnisse der Gesamtapoptose-Messung (die Summe der früh- und spätapoptotischen Zellen) von

insgesamt 10 ECP Prozeduren aufgelistet. In den Tabellen 15 und 16 sind die Apoptosemessungen derselben 10 ECP-Prozeduren abzüglich der Frühapoptose-Werte dargestellt. Die Spätapoptose wurde gesondert analysiert, da die Messung schneller und einfacher durchzuführen ist und somit für einen schnellen Qualitätskontrolltest geeigneter wäre. Zur besseren Einschätzung der Messungen wurden ein Delta der Gesamtapoptose (Δ Apoptose) und der Spätapoptose (Δ Sytox+) ermittelt (Pre-ECP-Apoptosewerte abzüglich der Post-ECP-Apoptosewerte) und tabellarisch dargestellt. CD4+ und CD8+ T-Zellen zeigten 24h nach ECP einen niedrigen Anstieg der Gesamt- und Spätapoptose ($p > 0.05$; n.s.). Ab 42h nach ECP zeigten CD8+ T-Zellen in dieser Untersuchung einen sichtbaren Anstieg der Gesamtapoptose ($p < 0.01$). Das Delta der Gesamtapoptose lag hier im Mittel bei 16.0% (SD:10.9%). Vier Tage nach ECP war ein starker Apoptoseanstieg in CD4+ und CD8+ T-Zellen (Gesamt- und Spätapoptose) zu erkennen, der fünf Tage nach ECP noch weiter anstieg (p-Werte jeweils < 0.001). Zum Abschluss des Versuchs lag das Delta der Gesamtapoptose in CD4+ T-Zellen bei 60.2% (SD:17.6%) und in CD8+ T-Zellen bei 64.6% (SD:15.0%). Entsprechende exemplarische Dotplots sind im Folgenden abgebildet. Bei der alleinigen Messung der Spätapoptose zeigte sich nach 24h und 42h kein deutlicher Apoptoseanstieg ($p > 0.05$; n.s.).

Experiment/ Patient	24h nach ECP			42h nach ECP			d4 nach ECP			d5 nach ECP		
	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+
1a	2.8	6.1	3.3	5.8	9.7	3.9	6	27.7	21.7	12.2	81.5	69.3
2b	3.3	9	5.7	9	17.5	8.5	12.9	34.3	21.4	10.6	54.3	43.7
3c	1	2.8	1.8	1.6	8.5	6.9	5.3	35	29.7	7.3	59	51.7
4c	1.4	7.6	6.2	2.4	2.2	-0.2	1.4	17.4	16	8.4	51.1	42.7
5d	7.3	7	-0.3	6.1	14	7.9	7.4	69.4	62	13.1	95.1	82
6d	3	9	6	3.5	16.9	13.4	13.5	89.1	75.6	9.1	87.2	78.1
7e	3.4	4.2	0.8	8.4	15.4	7	15.7	45.1	29.4	27.5	75.4	47.9
8e	3.3	5.3	2	5.2	13.5	8.3	10.7	52.9	42.2	25.1	73	47.9
9f	1.2	2.2	1	2.3	8.1	5.8	2.1	35.6	33.5	2.2	40.5	38.3
10f	0.8	1.5	0.7	1.6	3	1.4	0.9	11.2	10.3	1.6	66.5	64.9
M	2.8	5.5	2.7	4.6	10.9	6.3	7.6	41.8	34.2	11.7	68.4	56.7
SD	1.9	2.7	2.4	2.7	5.5	3.9	5.4	23.6	20.6	8.6	17.2	15.7

Tab. 15: CD4+ T-Zellen; Spätapoptose (%)

Experiment/ Patient	24h nach ECP			42h nach ECP			d4 nach ECP			d5 nach ECP		
	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+	Pre-ECP	Post-ECP	Δ Sytox+
1a	5	9.7	4.7	6.4	17.5	11.1	9.4	46.7	37.3	16.7	84.6	67.9
2b	3.5	6.7	3.2	5.1	12.5	7.4	10.1	43.8	33.7	12.8	68.5	55.7
3c	17.5	20.1	2.6	9.7	31.7	22	4.8	50.2	45.4	11.6	77.2	65.6
4c	1.7	2.1	0.4	0.3	0.6	0.3	0.8	3.5	2.7	15.5	50.7	35.2
5d	13.8	14.8	1	16.9	20.1	3.2	2.6	63.4	60.8	8.7	90.6	81.9
6d	2.5	9.3	6.8	1.9	19.9	18	8.7	90.1	81.4	11.9	93.1	81.2
7e	18	15.8	-2.2	28	17.7	-10.3	18.4	56.9	38.5	26.8	87.8	61
8e	8.3	18.7	10.4	4.1	16.1	12	11.5	70.9	59.4	25.6	88.6	63
9f	3.3	6.5	3.2	11.8	16.2	4.4	4.1	46.9	42.8	5.2	63.9	58.7
10f	9.2	8.6	-0.6	2.6	2.3	-0.3	0.3	1.6	1.3	6	71.6	65.6
M	8.3	11.2	3.0	8.7	15.5	6.8	7.1	47.4	40.3	14.1	77.7	63.6
SD	6.2	5.8	3.7	8.5	8.9	9.5	5.6	27.4	24.7	7.4	13.8	13.2

Tab. 16: CD8+ T-Zellen; Spätapoptose (%)

Tab. 15 und 16: Kinetik der Spätapoptose unstimulierter T-Zellen in Patientenproben.

Zellkonz.: 2×10^6 /ml; Ermittlung der CD4+/Sytox+ und CD8+/Sytox+ Zellen am FACSCanto nach 24h/42h/4d/5d Kulturdauer. M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, h – hours (Stunden), d – days (Tage); Δ Sytox+ = PostECP Sytox+ - PreECP Sytox+ (Tabelle entnommen aus Schwab et al., 2019)

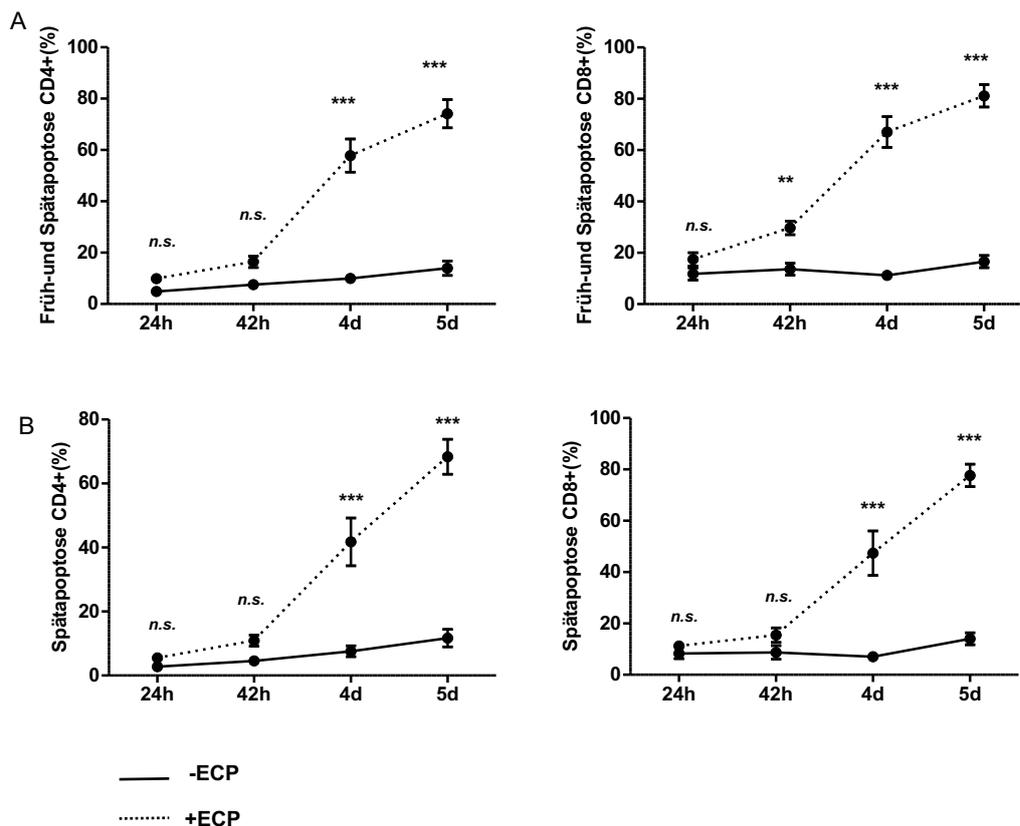
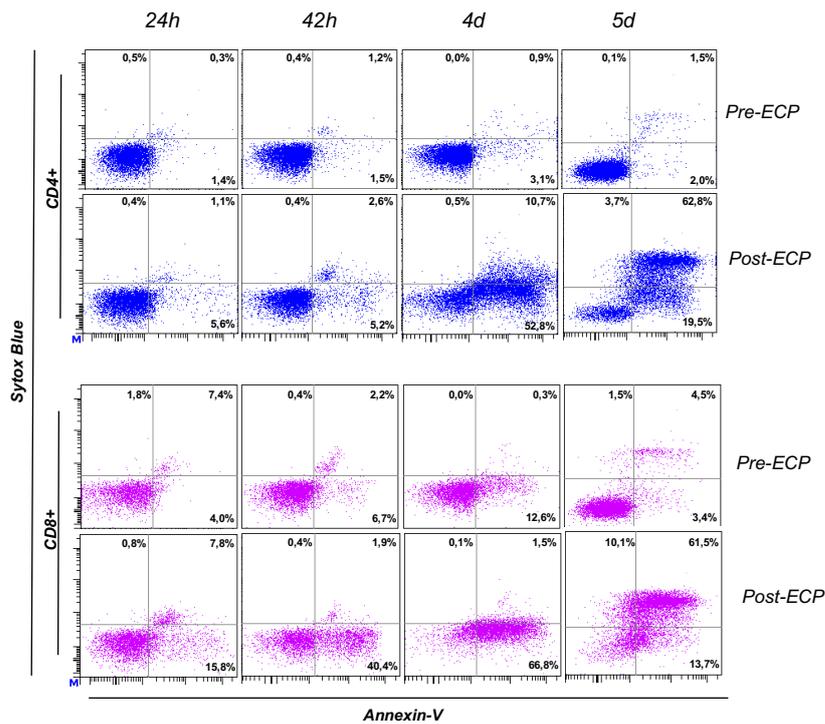


Abb. 20: Kinetik der Gesamapoptose (A) und Spätapoptose (B) in Patientenproben nach ECP. Apoptosebestimmung am FACSCanto nach 24h/42h/4d/5d durch Färbung der CD4+ und CD8+ T-Zellen mit Annexin-V und Sytox; Frühapoptose: Annexin-V⁺/Sytox⁺; Spätapoptose: Annexin-V⁺/Sytox⁺ + Annexin-V⁻/Sytox⁺; n=10 ECP-Prozeduren von 6 Patienten; mean ± SEM; Two-way Anova mit Bonferroni Posttest; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; Dargestellt sind Dotplots der ECP-Prozedur „10P“; n.s. – nicht signifikant; h – hours (Stunde); d – days (Tage) (Abbildung entnommen aus Schwab et al., 2019)

3.4.2 Untersuchung der CD71-Expression in Patientenproben nach ECP und Vergleich mit dem Goldstandard der CFSE-Fluoreszenzmarkierung

Um zu überprüfen, ob der CD71- Qualitätskontrolltest für T-Zellen von Patientenproben geeignet ist, wurde die CD71- Expression in stimulierten T-Zellen vor und nach einer ECP-Behandlung gemessen. Ein Teil der Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert, um die gemessene Proliferationsinhibition der beiden Assays zu vergleichen. Da vorherige Untersuchungen auf einen verzögerten Photophoresiseffekt in Patientenproben hinwiesen, wurde die CD71- Expression 16 Stunden, 3 Tage und 4 Tage nach Stimulation überprüft. Die CFSE- Fluoreszenzabnahme wurde 4 Tage nach Stimulation gemessen. Die Ergebnisse der jeweiligen ECP-Prozeduren sind tabellarisch dargestellt.

Pat./ ECP	CD71-Assay (CD4+)								CFSE-Assay (CD4+)							
	16h nach Stimulation				3d nach Stimulation				4d nach Stimulation				4d nach Stimulation			
	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)
1a	15,8	12,8	3	19,0	18,9	17,6	1,3	6,9	20,8	12,6	8,2	39,4	9,9	4,4	5,5	55,8
2b	14,9	12,5	2,4	16,1	21,6	14,9	6,7	31,0	20,9	8,9	12	57,4	10,6	3,9	6,7	63,6
3c	73,9	62,1	11,8	16,0	94,9	64,4	30,5	32,1	79,2	50,2	29	36,6	22,0	3,7	18,3	83,0
4c	83,6	66,7	16,9	20,2	98,3	57,8	40,5	41,2	83,3	58,0	25,3	30,4	39,3	3,7	35,6	90,6
5d	24,1	16,2	7,9	32,8	42	5	37	88,1	17,9	3,7	14,2	79,3	6,9	4,3	2,6	37,6
6d	28,9	13,7	15,2	52,6	67	4,1	62,9	93,9	72,3	3,0	69,3	95,9	57,9	7,6	50,3	86,8
7e	57	48,7	8,3	14,6	86,4	52,1	34,3	39,7	59,9	46,3	13,6	22,7	7,9	0,1	7,8	99,2
8e	58,4	51,9	6,5	11,1	95,8	60,9	34,9	36,4	79,2	50,2	29	36,6	33,8	0,0	33,8	100,0
9f	75,4	69,9	5,5	7,3	90,7	70,7	20	22,1	79,9	61,0	18,9	23,7	40,9	4,2	36,7	89,7
10f	83,3	76,6	6,7	8,0	95,4	75,3	20,1	21,1	78	65,3	12,7	16,3	61,4	13,9	47,6	77,4
M	51,5	43,1	8,4	19,8	71,1	42,3	28,8	41,2	59,1	35,9	23,2	43,8	29,1	4,6	24,5	78,4
SD	28,0	26,5	4,8	13,6	31,9	28,4	17,7	28,2	27,9	25,6	17,8	26,0	20,7	3,9	18,3	20,2

Tab. 17: CD4+ T-Zellen; Vergleich der absoluten und relativen Inhibition der CD71/CFSE-Expression

Pat./ ECP	CD71-Assay (CD8+)								CFSE-Assay (CD8+)							
	16h nach Stimulation				3d nach Stimulation				4d nach Stimulation				4d nach Stimulation			
	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)	PreECP Delta PD (%)	PostECP Delta PD (%)	Δ Expr	Inh (%)
1a	4,5	3,7	0,8	17,8	13,8	9,4	4,4	31,9	3,8	5,5	-1,7	0,0	10,7	6,7	4,0	37,5
2b	2,7	1,6	1,1	40,7	8,0	6,7	1,3	16,3	2,8	3,1	-0,3	0,0	2,8	2,0	0,8	29,9
3c	42,4	34,1	8,3	19,6	69,2	41,7	27,5	39,7	53,9	41,2	12,7	23,6	15,8	1,4	14,4	90,8
4c	59	49,8	9,2	15,6	93	36,5	56,5	60,8	57	40,9	16,1	28,2	42,4	7,6	34,9	82,2
5d	9,2	7,5	1,7	18,5	18,6	1,2	17,4	93,5	1,4	1,2	0,2	14,3	4,5	2,4	2,1	46,6
6d	7,3	1,6	5,7	78,1	49,6	1,5	48,1	97,0	44,5	1,0	43,5	97,8	43,4	5,5	37,9	87,2
7e	21,8	16,2	5,6	25,7	68,0	34,7	33,3	49,0	31,6	32,4	-0,8	0,0	5,8	4,1	1,6	28,3
8e	17,5	13,2	4,3	24,6	86,3	38,4	47,9	55,5	49,1	21,7	27,4	55,8	13,8	0,9	12,9	93,3
9f	46,7	39	7,7	16,5	79,6	51,3	28,3	35,6	67,8	42,8	25	36,9	28,3	0,0	28,3	100,0
10f	63,7	48,5	15,2	23,9	92,9	57,9	35	37,7	60,9	52,2	8,7	14,3	69,5	29,2	40,3	58,0
M	27,5	21,5	6,0	28,1	57,9	27,9	30,0	51,7	37,3	24,2	13,1	27,1	23,7	5,9	17,8	65,4
SD	23,4	19,4	4,4	19,0	33,4	21,3	18,4	26,2	25,8	20,1	15,1	30,7	21,9	8,6	16,2	28,3

Tab. 18: CD8+ T-Zellen; Vergleich der absoluten und relativen Inhibition der CD71/CFSE-Expression

Tab. 17 und 18: Vergleich der absoluten und relativen Inhibition der CD71/CFSE-Expression.
 Zellkonz.: 2×10^6 /ml. Ein Teil der Probe wurde mit CFSE gefärbt. Ruhezeit nach ECP 26h. Danach Stimulation mit CD3 (unlöslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) und CD28 (löslich, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Messung am FACSCanto nach 16h/3d/4d Stimulationsdauer. M: Mittelwert; SD: Standardabweichung; h – hours (Stunden), d – days (Tage)
 PD (%) CFSE: Percentage of Division CFSE+ = $100 \times \text{divided events} / (\text{divided events} + \text{undivided events})$
 PD (%) CD71: Percentage of Division CD71+, entspricht CD4+CD71+ oder CD8+CD71+ T-Zellen im FACS
 Delta PD (%) = Pre oder PostECP stimulierte PD - Pre oder PostECP unstimulierte PD
 Δ Expr : Δ Expression = Pre-ECP Delta PD% - Post-ECP-Delta PD%
 Inh (%): Percentage of inhibition = $100 - (\text{Post-exP Delta PD}/\text{Pre-exP Delta PD}) \times 100$
 (Tabelle entnommen aus Schwab et al., 2019)

In der Untersuchung konnte bestätigt werden, dass eine Stimulationsdauer von 16 Stunden zu keinem eindeutigen Delta der CD71-Expression in CD4+ (Mittelwert: 8.4%, SD: 4.8%) und CD8+ T-Zellen (Mittelwert: 6.0%, SD: 4.4%) führt. Auch die relative Inhibition betrug in CD4+ T-Zellen lediglich 19,8% mit einer hohen Standardabweichung von 13,6%. Ähnliche Werte zeigen sich mit 28,1% (SD:19%) in CD8+ T-Zellen. 3 Tage nach Stimulation konnte in 8 von 10 ECP-Prozeduren ein deutlicherer Photophereseeffekt gemessen werden: Das Delta der CD71-Expression lag bei diesen 8 Behandlungen zwischen 20.0% und 62.9% (CD4+ T-Zellen) und 17.4% und 56.5% (CD8+ T-Zellen). Die absoluten und relativen Ergebnisse der Inhibition differieren teilweise erheblich. Es zeigte sich in den ersten beiden ECP-Behandlungen (1a, 2b) des CD71-Assays an Tag 3 keine eindeutige absolute CD71-Expressionsminderung nach ECP. Das CD71-Delta lag bei diesen beiden Patienten an Tag 3 bei 1.3% und 6.7% (CD4+ T-Zellen) und 4.4% und 1.3% (CD8+ T-Zellen). Die Berechnung der relativen Werte zeigte jedoch eine Proliferationsinhibition nach Photopherese von beispielsweise 31,0% der ECP-Prozedur 2b in CD4+ T-Zellen und 31,9% der ECP-Prozedur 1a in CD8+ T-Zellen. Der CFSE- Assay zeigte nach 4-tägiger Stimulation 4 ECP-Prozeduren mit geringer absoluter Proliferationsinhibition ($\Delta Expr$) in CD4+ und CD8+ T-Zellen (1a, 2b, 5d, 7e) an. In 6 von 10 ECP-Behandlungen lag die absolute Proliferationsinhibition im CFSE-Assay zwischen 18.3% und 50.3% (CD4+ T-Zellen) und 12.9% und 40.3% (CD8+ T-Zellen). Auch hier zeigten sich erhebliche Unterschiede bei der Berechnung der relativen Proliferationsinhibition, die im Mittel bei 78,4% (SD: 20,2%) in CD4+ T-Zellen und 65,4% (SD: 28,3%) in CD8+ T-Zellen lag. Der CD71-Assay zeigte 4 Tage nach Stimulation, in der Mehrzahl der Behandlungen, keine Verbesserung des Photophereseeffekts im Vergleich zur 3-tägigen Stimulation. Die Ergebnisse des CD71-Assays (3 Tage nach Stimulation) und des CFSE-Assays wurden graphisch gegenübergestellt und statistisch analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden Assays in CD4+ T-Zellen kein signifikanter Unterschied in der Anzeige des Photophereseeffekts besteht. Der Effekt der Photopherese auf CD8+ T-Zellen kann mit dem CD71-Assay etwas deutlicher ermittelt werden ($p < 0.05$ versus CFSE Tag 4).

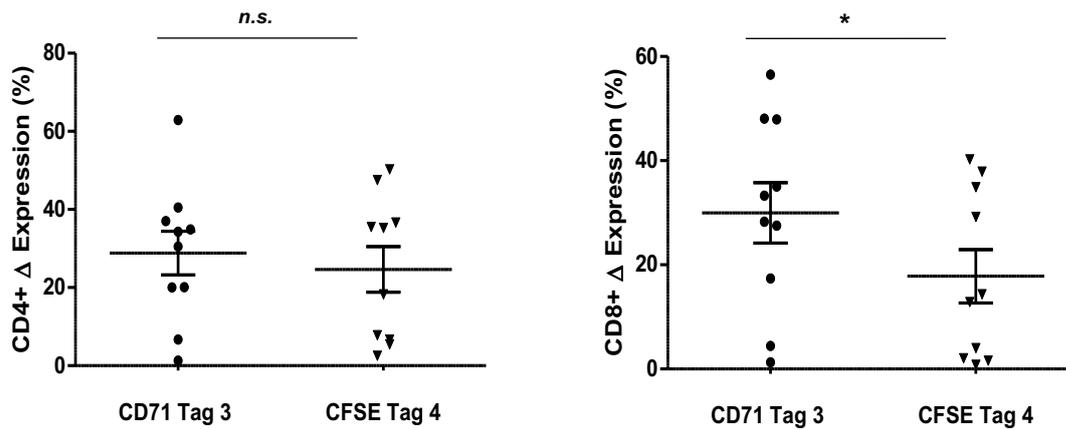


Abb. 21: Vergleich der absoluten CD71- und CFSE- Expressionshemmung nach Photopherese Ruhezeit nach ECP 26h. Stimulation mit CD3 (unlöslich, 1µg/ml) und CD28 (löslich, 1µg/ml). Proliferationsmessung von CD4+ und CD8+ T-Zellen am FACSCanto nach 3 (CD71) und 4 Tagen (CFSE) Stimulationsdauer; n=10 ECP Prozeduren von 6 Patienten; mean ± SEM; paired t-test; *p < 0.05; **p < 0.01; *p < 0.001; n.s. – nicht signifikant; PD – Percentage of Division
 Δ Expression = Pre-ECP Delta PD% - Post-ECP-Delta PD%**

4 Diskussion

4.1 Limitierungen des ^3H -Thymidin-, CFSE- und Apoptoseassays

Seit 2003 wurden 3 unterschiedliche Verfahren zur Überprüfung der ECP untersucht: Die Messung der Proliferationsinhibition mittels ^3H -Thymidin-Assay (Evrard et al., 2010; Faivre et al., 2015; Jacob et al., 2003), mittels CFSE-Assay (Evrard et al., 2010; Faivre et al., 2015; Schmid et al., 2015) und die Messung der Apoptosezunahme (Schmid et al., 2015; Taverna et al., 2015). In den jüngeren Arbeiten wurde zunehmend Abstand vom Gebrauch des ^3H -Thymidin-Assays genommen. Der Grund dafür war vor allem die Radioaktivität des Materials, was das Prozedere durch administrative Hürden und zusätzliche Sicherheitsvorkehrungen erheblich kosten- und zeitintensiver gestaltete (Evrard et al., 2010; Faivre et al., 2015). Außerdem bietet der ^3H -Thymidin-Test keine Möglichkeit apoptotische Zellen zu untersuchen, was mit allen FACS-basierten Verfahren ohne großen Mehraufwand möglich ist (Evrard et al., 2010). Eine weitere Schwäche des Testes ist die lange Kulturdauer von 3 Tagen (Jacob et al., 2003). Der CFSE-Proliferationsassay benötigt bis zur Messung ebenfalls eine Kulturdauer von mindestens 3 Tagen, weshalb er in diesem Punkt keinen Vorteil bietet. Die CFSE-Färbung ist im Vergleich zu einer einfachen Oberflächenfärbung im FACS zudem aufwändig und es konnte gezeigt werden, dass CFSE in hohen Konzentrationen eine toxische Wirkung auf PBMCs ausübt (Last'ovicka et al., 2009). Nachteile beider Proliferationsassays ist die scheinbar fehlende oder verminderte Proliferationsfähigkeit der Zellen bei Patienten unter Immunsuppressivaeinnahme, wie Evrard et al. und Taverna et al. feststellten (Evrard et al., 2010; Taverna et al., 2015). Da die Proliferation der Zellen eingeschränkt war, konnte auch der Test keine ausreichende Proliferationsinhibition nach der ECP messen. Weiterhin wurde beim direkten Vergleich der beiden Verfahren (^3H -Thymidin- und CFSE-Assay) festgestellt, dass die Tests teilweise nicht äquivalente Ergebnisse bei gleichen Proben lieferten (Evrard et al., 2010). Die genannten Punkte zeigen, dass im Bereich der Proliferationsinhibitionsmessung kein optimales Testverfahren zur Verfügung steht. Die Messung der Apoptosezunahme nach ECP könnte deshalb eine mögliche Alternative oder eine Test-Ergänzung darstellen. Die dazu veröffentlichten Untersuchungen von Schmid et al. und Taverna et al. wurden nur an GvHD-Patienten (Taverna et al., 2015), bzw. an gesunden Blutspendern (Schmid et al., 2015) getestet, weshalb weitere Untersuchungen nötig sind. In beiden Arbeiten konnte jedoch eine deutliche Apoptosezunahme in den Post-ECP-Proben nachgewiesen werden.

Neue Erkenntnisse über T-Zellaktivierungsmarker wie zum Beispiel Ki-67 und CD71 und die immer schnellere und einfachere Durchführung von Untersuchungen am Durchflusszytometer legen nahe, diese Verfahren im Bereich der ECP-Qualitätskontrolle zu testen.

4.2 Eignung von Ki-67, CD71 und weiteren T-Zellaktivierungsmarkern zur Überprüfung der UVA-/8-MOP-Behandlung

Das Protein Ki-67 wurde 1983 erstmals als proliferations-assoziiertes Protein beschrieben (Gerdes et al., 1983). Heute stellt die Messung der Ki-67-Expression ein etabliertes Verfahren in der Routinediagnostik von Tumoren da, womit beispielsweise die Wachstumseigenschaften eines Tumors beschrieben werden können (Scholzen & Gerdes, 2000). Da es sich um einen gut untersuchten und bereits standardmäßig eingesetzten Proliferationsmarker handelt, war es naheliegend Ki-67 auch in unseren Arbeiten einzusetzen. Es wurden zunächst T-Zellen gesunder Blutspender untersucht, da eine Immunsuppressiva-assoziierte Proliferationshemmung in Patientenproben nicht auszuschließen ist (Evrard et al., 2010; Taverna et al., 2015). In den bereits getesteten Assays zur ECP-Qualitätskontrolle wurde vorwiegend PHA zur T-Zellstimulation verwendet. Da die Protokolle sich jedoch teilweise sehr stark hinsichtlich untersuchter Kohorte, untersuchter Zellpopulation und eingesetzter Messverfahren unterschieden, führten wir zunächst einen Vergleich der Stimulanzen unter eigenen Testbedingungen durch. Dabei zeigte sich nach PHA-Stimulation im Vergleich zu Con A und CD3/28 die schwächste Ki-67 Ausprägung, wobei insgesamt alle Substanzen nach einer Stimulationsdauer von 24h eine lediglich niedrige Ki-67 Expression auslösten (siehe 3.1.1). In Untersuchungen von Gerdes et al. zur Zellzyklus-assoziierten Ki-67 Expression konnte gezeigt werden, dass das Protein in PBMCs nach PHA Stimulation erst zwischen 24h und 60h hochreguliert wird. Laut Autoren synthetisiert die Zelle während des ersten Zellzyklus nach PHA-Stimulation nukleäre Ki-67 Antigene *de novo*, was eine längere Zeit in Anspruch nimmt (Gerdes et al., 1984). Somit war Ki-67 für eine schnelle Überprüfung der T-Zellproliferationsinhibition nach Photopherese ungeeignet. Neben Ki-67 werden in der Literatur noch weitere Aktivierungsmarker wie zum Beispiel CD71 beschrieben (Caruso et al., 1997; Last'ovicka et al., 2009; Motamedi et al., 2016; Nguyen et al., 2003). CD71 ist der Transferrin-Rezeptor der Zelle. Er ist an der Eisenaufnahme in die Zelle beteiligt und in die Regulation des Zellwachstums involviert (Neckers & Trepel, 1986). CD71 wird normalerweise auf ruhenden Zellen in niedriger Anzahl exprimiert. Eine vermehrte Expression zeigt sich bei erhöhter Proliferationsrate, wie z.B. in den

Basalzellen der Epidermis, den intestinalen Schleimhautzellen oder auf aktivierten PBMCs (Daniels et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Motamedi publizierte 2016 eine detaillierte Gegenüberstellung von Ki-67 und CD71 mit dem Ergebnis, dass die untersuchten T-Zellen ein vergleichbares Expressionsmuster der beiden Marker nach Stimulation aufwiesen (Motamedi et al., 2016). Laut Autoren könne somit die simplere CD71-Oberflächenfärbung statt der intrazellulären Ki-67-Färbung genutzt werden, um eine Zellaktivierung zu messen. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass beide Marker nach Stimulation vermehrt exprimiert werden und nach ECP eine Expressionshemmung erfolgt. Sie zeigen also, wie auch in Motamedis Untersuchungen, das gleiche Expressionsmuster. Da der Photophereseeffekt (also die CD71-Expressionsminderung nach UVA-/8-MOP-Behandlung) bei der CD71-Messung deutlicher hervortrat, wurde CD71 statt Ki-67 für weitere Messungen eingesetzt. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle die kurze Kulturzeit von nur 22h nach der bereits ein Photophereseeffekt zu erkennen war, was ein deutlicher Vorteil zum CFSE-Assay darstellte. Da ein „Single-Day“-Testverfahren der ECP angestrebt wurde, und in der Literatur eine Vielzahl weiterer Oberflächenaktivierungsmarkern beschrieben waren, wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die nach Zellstimulation besonders schnell exprimiert werden. Auffällig waren die beiden Marker CD69 und CD25, die in den Untersuchungen von Motamedi bereits 4h nach CD3/28-Stimulation auf CD4+ und CD8+ T-Zellen exprimiert wurden. CD71 wurde in dieser Untersuchung ab 6h Stimulationsdauer vermehrt ausgebildet (Motamedi et al., 2016). Die Arbeiten von Trickett et al. bestätigten die Ergebnisse zu CD69 und zeigen ebenfalls eine deutliche CD69-Expression bereits 6h nach T-Zellstimulation. CD25 wurde in dieser Untersuchung erst später exprimiert; etwa ab einer Stimulationszeit von 22h (Trickett & Kwan, 2003). Caruso et al. zeigte ebenfalls eine sehr frühe CD69-Expression auf CD3+ T-Zellen ab einer Stimulationszeit von 3h. CD25 und CD71 wurden in dieser Untersuchung nach 15h Kulturdauer deutlich exprimiert (Caruso et al., 1997). Aufgrund der Datenlage wurde eine kinetische Untersuchung der CD71-, CD69- und CD25-Expression nach T-Zellstimulation und Photopherese durchgeführt (siehe 3.1.5). Wie in den vorher beschriebenen Arbeiten konnte auch in diesem Versuch bestätigt werden, dass CD69 sehr früh nach Stimulation exprimiert wird. Ein deutlicher Anstieg von CD69 war bereits nach 4h zu erkennen. CD71 wurde in unseren Untersuchungen zwischen 4h und 6h Stimulationszeit von der T-Zelle gering ausgebildet; eine deutliche Expression zeigte sich erst nach einer Stimulationszeit zwischen 8 und 22h, was die Ergebnisse von Caruso et al. bestätigt. Unsere Daten zu CD25 decken sich mit den Ergebnissen von Trickett et al. und Caruso et al., die zeigen, dass CD25 eine etwas längere

Stimulationszeit benötigt. In unseren Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Hochregulation von CD25 nach einer Kulturdauer von 22h.

4.2.1 CD69

Vor allem die frühe CD69-Expression ab einer Stimulationszeit von 4h und die deutliche Mindereexpression nach ECP waren vielversprechende Ergebnisse, was zu weiteren Untersuchungen des Proliferationsmarkers CD69 führte. Nach Auswertung der Daten zeigte sich jedoch in den unstimulierten Kontrollen eine unerwartete, scheinbar UVA-induzierte und serumabhängige CD69-Expression der CD4⁺ T-Zellen (siehe 3.1.6). Da die Zellen nicht stimuliert waren und die CD71-Expression in den gleichen Proben sehr gering war, handelte es sich vermutlich um keine proliferations-assoziierte CD69-Expression. Die CD69-Expression nahm unter UVA-Exposition vor allem in serumfreiem Medium zu, was durch die Zugabe von 8-MOP noch verstärkt wurde. Auch die CD69-Expression in Medium mit „Serum 2“ des Herstellers PAA war unter Photopherese (UVA/8-MOP) stark erhöht, wohingegen kultivierte Zellen in „Serum 1“ des Herstellers PAN keine deutliche Mehrexpression aufwiesen. Es ist also naheliegend, dass die CD69-Expression vor allem durch die unterschiedliche Medium-Zusammensetzung getriggert wurde. Tatsächlich wurde CD69 erst vor kurzem als „metabolischer Gatekeeper“ betitelt, da die Expression unter bestimmten Bedingungen in Zusammenhang mit dem Glutamin-, Glucose- und Sauerstoffhaushalt der Zelle steht (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). Dies könnte die mediumabhängige CD69-Expression erklären. Außerdem konnte in Mausexperimenten gezeigt werden, dass CD69 unter bestimmten Umständen den Aminosäurehaushalt der Zelle beeinflusst. Dabei tritt CD69 in aktivierten T-Zellen mit verschiedenen Nährstofftransportern in Verbindung, wie zum Beispiel mit LAT-1 und CD98. Der LAT1-CD98 Komplex ist ein Hauptaufnahmerezeptor für aromatische Aminosäuren wie zum Beispiel L-Tryptophan (Cibrian et al., 2016). Da in dieser Studie nur Maus-Zellen untersucht wurden, können keine sicheren Rückschlüsse auf Vorgänge im humanen System geschlossen werden. Sollte CD69 jedoch in den Aminosäurehaushalt der humanen Zelle involviert sein, könnte dies eine Erklärung für die serumabhängige CD69-Expression sein.

Die genauen Eigenschaften von CD69 sind bis heute nicht vollständig geklärt. Durch die Beeinflussung des Ca²⁺-Einstroms, der IL-2-Produktion, der Interferon- γ -Synthese und der Zellproliferation wurden CD69 lange aktivierende bzw. proinflammatorische Eigenschaften zugesprochen (Cebrián et al., 1988; Testi et al., 1989). Immer häufiger treten jedoch die immunregulatorischen Eigenschaften von CD69 in den Vordergrund,

die in diversen Tiermodellen gezeigt werden konnten. Die Abwesenheit von CD69 führte in entzündungs-assoziierten Erkrankungen zu einer Exazerbation der Entzündung und einem erhöhtem Gewebsschaden (Cruz-Adalia et al., 2010; Martín et al., 2010; Sancho et al., 2003). Ob die Expressionszunahme von CD69 in unseren Versuchen mit immunregulatorischen Prozessen in Verbindung steht und deshalb vermehrt nach der UVA/8-MOP-Behandlung gebildet wurde, kann nicht beantwortet werden, da keine weiteren Versuche dahingehend durchgeführt wurden. In einer Studie von Papp et al. wurde die Veränderung der CD69 -Expression auf Lymphozyten vor und 6 Wochen nach einem ECP-Zyklus in Proben von Sklerodermie-Patienten gemessen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der CD69-Ausbildung festgestellt werden (Papp et al., 2012). Die serum- und UVA-abhängige CD69-Expression kann abschließend nicht genau geklärt werden. Da die Expression jedoch durch mehrere Faktoren beeinflusst wird, wurde CD69 in weiteren Versuchen zur Etablierung eines Qualitätskontrolltestes ausgeschlossen. Stattdessen wurde die Verwendung von CD71 favorisiert, welches keine serum-abhängige Expressionszunahme zeigte.

4.3 Validierung des CD71-Assays und Vergleich mit dem Goldstandard der CFSE- Fluoreszenzmarkierung und der Apoptosemessung

In den durchgeführten Vorversuchen an PBMCs gesunder Blutspender konnte der Oberflächenmarker CD71 eine UVA/8-MOP-Behandlung der Zellen zuverlässig durch eine Minderexpression im Vergleich zu den unbestrahlten Proben aufzeigen. Es folgte die Validierung in 5 unabhängigen Experimenten mit Proben von 11 unterschiedlichen Blutspendern.

4.3.1 Darstellung des Delta-Wertes der CD71-Expression

Wichtig für einen Qualitätskontrolltest ist ein ausreichend großes, gut erkennbares und eindeutiges Delta der CD71-Expression zwischen den Proben vor und nach UVA-/8-MOP-Behandlung. Zur Berechnung des Delta-Wertes wurden in dieser Arbeit die Prozentwerte der Proliferation nach Photopherese von den Ausgangswerten (vor Photopherese) subtrahiert. Häufig wurde bei den bisher publizierten Studien die relative Inhibition berechnet, also die Proliferation nach Photopherese ins Verhältnis zum Ausgangswert vor der Photopherese gesetzt, woraus irreführende Ergebnisse

resultierten. So wurde z.B. in der Arbeit von Faivre et. al eine Proliferation Pre-ECP von 3.4% und Post-ECP von 0.5% angegeben, was einer relativen Inhibition von 85.3% entspricht (Faivre et al., 2015). Bei einem niedrigen Ausgangswert von 3,4% muss jedoch davon ausgegangen werden, dass keine suffiziente Proliferation der PBMCs stattgefunden hat und somit eine Berechnung der Inhibition nicht sinnvoll ist. Wir haben uns deshalb einerseits für die Darstellung eines Delta-Wertes entschieden (ΔExpr), wie es auch in der Arbeit von Taverna gezeigt ist (dort als $\Delta\text{Proliferation}$ bezeichnet) (Taverna et al., 2015). Andererseits wurde in einer weiteren Spalte die relative Inhibition der Proliferation in Prozent (Inh%) angegeben, um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu erleichtern.

4.3.2 Vergleich des CD71- und CFSE- Assays

Das Delta der CD71-Expression lag bei der Validierung an gesunden Blutspendern nach einer Stimulationszeit von 16h im Mittel bei 45.3% (CD4+ T-Zellen) bzw. 34.0% (CD8+ T-Zellen). Nach 4 Tagen Stimulation stellte sich das Delta mit 70.8% (CD4+ T-Zellen) und 61% (CD8+ T-Zellen) noch deutlicher dar. Das CFSE-Assay zeigte ein mittleres Delta der Proliferation von 60.3% (CD4+ T-Zellen) und 51.2% (CD8+ T-Zellen) nach 4-tägiger Stimulation. Damit sind die erzielten Delta-Werte im CD71-Assay nach 16h Stimulation etwas niedriger im Vergleich zum CFSE-Assay, nach 4 Tagen Stimulation jedoch etwas höher. Insgesamt konnte in jeder Pre-ECP-Probe nach CD3/28/IL-2 Stimulation eine deutliche CD71-Expression ausgelöst werden, die in den Post-ECP-Proben deutlich herabgesetzt war. Das CFSE-Assay zeigte äquivalente Ergebnisse. Vergleichbar sind diese Ergebnisse mit der Untersuchung von Schmid et al., der das CFSE-Assay ebenfalls an CD3+ PBMCs gesunder Blutspender testete (Schmid et al., 2015). Alle 6 untersuchten Pre-ECP-Proben zeigten dort im CFSE-Assay eine Proliferation von 59.2% (*mean*), die in den Post-ECP-Proben deutlich inhibiert war (*mean*= 4.4%). Damit zeigte sich ein mittleres Delta der Proliferation von 54.8% in den untersuchten CD3+ T-Zellen. Das erhobene Proliferations-Delta im CFSE-Assay der Arbeitsgruppe um Schmid et al. liegt also zwischen den von uns erhobenen Delta-Werten von 60.3% (CD4+) und 51.2% (CD8+) im CFSE-Assay. Die CD71-Expression wurde im Kontext der ECP-Qualitätskontrolle erstmals in dieser Arbeit untersucht, weshalb keine Vergleichswerte in der Literatur verfügbar sind. Da jedoch äquivalente Ergebnisse zu dem Goldstandard der CFSE-Proliferationsmessung erzielt wurden, kann von einer Eignung des CD71-Assays bei der Überprüfung der UVA-/8-MOP-Behandlung an gesunden PBMCs ausgegangen werden.

4.3.3 Apoptosemessung

Wie auch schon in den Arbeiten von Schmid et. al und Taverna et. al, wurde auch in unseren Untersuchungen zur Entwicklung eines Qualitätskontrolltests eine Apoptosemessung vor und nach Photopherese der unstimulierten T-Zellen durchgeführt. Im Folgenden werden einige Aspekte der Apoptoserate in gesunden PBMCs nach Photopherese beleuchtet. Unter 4.4. wird auf die Apoptoserate in Patientenproben eingegangen. Bei der Untersuchung gesunder PBMCs zeigte sich 16h nach Photopherese eine mittlere Zunahme der Gesamtaoptose von 4.4% auf 19.4% (CD4+ T-Zellen) bzw. 4.6% auf 20.1% (CD8+ T-Zellen). 4 Tage nach UVA-/8-MOP-Behandlung war der Effekt noch deutlicher zu erkennen: unbehandelte Proben zeigten eine mittlere Apoptoserate von lediglich 7.6% (CD4+) und 5.1% (CD8+), wohingegen die photopheretisch behandelten Zellen eine mittlere Apoptoserate von 71.5% (CD4+) und 70.6% (CD8+) aufwiesen.

Im Vergleich zu anderen publizierten Studien mit ähnlichen Versuchsbedingungen, sind die gemessenen Apoptosewerte unserer Studie etwas niedriger. So konnte Yoo et al. bereits 12h nach Photopherese einen Anstieg der lymphozytären Apoptose auf circa 20% zeigen; nach 24h waren bereits >50% der Zellen apoptotisch und 48h nach Photopherese zeigte sich eine Apoptoserate von >80-90% der Zellen (Yoo et al., 1996). Die Photopheresebehandlung der Zellen erfolgte nach 15-minütiger 8-MOP-Inkubation und UVA-Exposition in einem separaten Bestrahlungsgerät (2 Joule/cm²) in einer Zellkulturschale. Wie auch in unseren Experimenten wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch gemessen. Auch die Untersuchungen von Wolnicka-Glubisz et al. zeigen höhere Apoptosewerte der Lymphozyten (Wolnicka-Glubisz et al., 2010). In dieser Studie wurden gesunde PBMCs einer experimentellen Photopherese ausgesetzt und die Apoptosezunahme kinetisch am FACS überprüft. 10h nach UVA-/8-MOP-Behandlung waren Apoptose-Werte zwischen 30% und 40% zu erkennen; nach 24h stieg die Apoptoserate auf circa 60% an (Wolnicka-Glubisz et al., 2010). In der bereits erwähnten Untersuchung von Schmid et al. wurde neben der Proliferationsinhibition auch die Apoptosezunahme in gesunden PBMCs nach ECP untersucht. Auch hier konnten höhere Apoptosewerte gemessen werden: 20h nach ECP stieg die lymphozytäre Apoptose auf circa 40% an, nach 46h zeigte sich eine Apoptoserate von circa 70% und nach 70h waren bereits über 80% der Lymphozyten apoptotisch (Schmid et al., 2015). Ein Grund für die geringere Apoptoserate in unserer Untersuchung könnte die reichhaltigere Mediumzusammensetzung sein. Zusätzlich zu den Bestandteilen RPMI 1640, Glutamin und FCS (10%), was in den erwähnten Studien ebenfalls eingesetzt wurde, verwendeten wir die Zusätze HEPES, Natrium-Pyruvat und nicht-

essentielle Aminosäuren. Die Zellen waren somit besser mit Nährstoffen versorgt, was den Eintritt der Apoptose verzögert haben könnte.

4.3.4 Vorzüge des CD71-Assays

Der hier untersuchte und vorgestellte CD71-Assay zur Qualitätskontrolle nach UVA-/8-MOP-Behandlung bietet einige wesentliche Vorteile. Im Gegensatz zur CFSE- bzw. ^3H -Thymidin-Messung zeigte der CD71-Assay bereits 18h nach Photopherese (2-stündige Ruhezeit der Zellen nach Photopherese und 16-stündige Stimulationszeit) eine deutliche CD71-Expressionsinhibition. Durch den Testaufbau ließe sich das Verfahren problemlos in den klinischen Alltag integrieren: Vor und nach der photopheretischen Behandlung werden jeweils Proben entnommen, anschließend erfolgt die 2-stündige Ruhezeit und die Stimulation. Die 16-stündige Kultivierung könnte über Nacht, die Färbung der Zellen am nächsten Morgen stattfinden. Durch das schnelle Testverfahren könnten eventuelle Probleme bei der Photopheresebehandlung zeitnah entdeckt und behoben werden. Der Färbe- und Messprozess selbst ist unkompliziert: Es handelt sich um eine reine Oberflächenfärbung, die etwa 30 Minuten in Anspruch nimmt. Wenige Färbeschritte machen die Durchführung weniger fehleranfällig und die Methode kann leicht erlernt werden. Zur weiteren Vereinfachung ließe sich die Färbung der Zellen auf die CD4+ T-Zellen beschränken, da diese ein eindeutigeres Delta nach Bestrahlung zeigten. Um die Testsensitivität zu erhöhen, kann die schnell durchführbare Annexin-V-/Sytox-Färbung an unstimulierten Proben bei diesem Testverfahren direkt angeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil des Tests ist die Kultivierung der Zellen vor der Färbung im Gegensatz zur CFSE-Markierung. Die CFSE-Färbung wird vor Inkulturnahme der Zellen durchgeführt und kann in bestimmten Konzentrationen proliferationshemmend wirken, was ein gravierender Nachteil des CFSE-Testes darstellt (Last'ovicka et al., 2009). Außerdem ist die CFSE Färbung sehr fehleranfällig und eine Erfolgskontrolle der Färbung ist nach frühestens einem Tag, die Proliferationsmessung selbst erst nach 3-5 Tagen möglich.

Bei der Auswertung des CD71-Assays kann ein Histogramm angelegt werden (siehe 3.2.1, Abb. 14). Somit ist eine direkte visuelle Erfolgskontrolle des Testes möglich. Sollte die Färbung insuffizient oder fehlerhaft sein, könnte man an dieser Stelle eine Nachfärbung durchführen ohne den Test wiederholen zu müssen. Dies ist im CFSE-Assay nicht möglich, da die Färbekontrolle erst am nächsten Tag durchführbar ist. Die genauen Prozentwerte der CD71-Expression werden ebenfalls unmittelbar nach Messung der Probe gezeigt und das Delta der CD71- Expression kann einfach ermittelt

werden. Bei der Kompensation und Einstellung des FACS sind für beide Assays Vorkenntnisse in der Durchflusszytometrie erforderlich; bei der Interpretation der Ergebnisse und beim Setzen der Zell-Gates ist Erfahrung mit durchflusszytometrischen Untersuchungen von Vorteil.

4.3.5 CD71 Test-Limitierung

Für die Untersuchung der Zellen gesunder Blutspender wurde der CD71-Assay nur im experimentellen Rahmen getestet. Das Prozedere der experimentellen Photopherese (exP) stellt den Ablauf der Extrakorporalen Photopherese (ECP) zwar nach, unterscheidet sich jedoch in einigen Punkten. Bei der exP wurden die PBMCs mittels Ficollgradient aus bereits vorhanden Buffy Coats isoliert, dann in Kulturmedium aufgenommen und mit 300ng/ml 8-MOP inkubiert. Während der UVA-Behandlung in der Bestrahlungskammer befanden sich die PBMCs auf einer 12-Well Zellkulturplatte (ohne Deckel) in einem Volumen von 1ml. Bei der ECP hingegen wird der Buffy Coat mit Kochsalzlösung auf ein Volumen von circa 300ml verdünnt, wodurch erstens ein höheres Bestrahlungsvolumen und zweitens ein höherer Hämatokrit im Bestrahlungsbeutel vorliegen. Da das Bestrahlungsvolumen im Bestrahlungsbeutel flach ausgelegt wird, ist davon auszugehen, dass die Volumendifferenz zwischen exP und ECP keine erhebliche Auswirkung auf das Testresultat hat. Der höhere Hämatokrit könnte jedoch einen Einfluss auf den Bestrahlungseffekt haben, da Hämoglobin einen abschirmenden Effekt auf das UVA-Licht hat (Jacob et al., 2003; Lee & Garro, 1989). Dies könnte das Testergebnis unter ECP-Bedingungen negativ beeinflussen. Weiterhin wurde im Rahmen der exP eine etwas höhere 8-MOP-Konzentration im Vergleich zur ECP verwendet (300ng/ml vs. 200ng/ml). Wie in den Untersuchungen von Marks et al. und Yoo et al. jedoch gezeigt werden konnte, hatten 8-MOP-Konzentrationen über 50ng/ml keinen stärkeren Bestrahlungseffekt (bezogen auf die Apoptoseinduktion) zur Folge. Viel entscheidender sei laut Autoren die Bestrahlungsintensität (Marks et al., 1990; Yoo et al., 1996). Diese wurde in unserem experimentellen Studiendesign auf 2Joule/cm² eingestellt und durch ein externes Dosimeter überprüft, was der Standard-Bestrahlungsintensität der ECP entspricht (Schooneman, 2003). Des Weiteren kommt es bei der ECP im Gegensatz zur exP zu Kontakt zwischen Patientenblut und Materialien des Photopheresesystems wie Infusionssystemen sowie Plastikbeutel. Wie unter 1.7.1 beschrieben, kann diese Berührung Auswirkungen auf die Differenzierung der Monozyten haben, was in Teilen den Wirkmechanismus der ECP erklären könnte (Berger et al., 2010, 2001). Welche Bedeutung die verwendeten Kunststoffmaterialien der exP für das Resultat des CD71-Assays haben, wurde in unserer Studie nicht

untersucht. Ein Einfluss kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zusammenfassend wäre der Einsatz des CD71-Assays an gesunden PBMCs vor allem zur Kontrolle der Substanz- und Materialienqualität denkbar. Um sicher zu gehen, dass der Test unter Realbedingungen mit Spender- Buffy Coats funktioniert, sollte eine Testüberprüfung unter ECP-Bedingungen stattfinden.

4.4 Validierung des Apoptoseassays an PBMCs aus Patientenproben

Nachdem der CD71-Assay und die Messung der Apoptoseinduktion unter experimentellen Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden konnten, wurden die Verfahren an Patientenproben nach einer Standard-ECP-Prozedur getestet. Zur Messung der Apoptoserate wurden die Zellen nach ECP unstimuliert in Kulturmedium aufgenommen und an 4 Messzeitpunkten (24h, 42h, 4d und 5d) am FACS überprüft. Es wurden mehrere Messzeitpunkte gewählt, da sich die Apoptoseinduktion nach EPC im Vergleich zu gesunden PBMCs wesentlich langsamer entwickelte. 24h nach ECP war ein geringes mittleres Apoptose-Delta von nur 5.0% (CD4+) und 5.7% (CD8+) zu erkennen, das nach 42h auf 9.0% (CD4+) und 16.0% (CD8+) anstieg. Erst 4 Tage nach ECP konnte ein sehr deutliches mittleres Apoptose-Delta in beiden Zellpopulationen gemessen werden (47.9% CD4+ und 55.8% CD8+). In den Untersuchungen von Taverna et al. wurde die Apoptoseinduktion nach ECP unter gleichen Bedingungen an Patientenproben überprüft. Die Zellen waren ebenfalls unstimuliert und die Gesamtapoptose wurde durchflusszytometrisch ermittelt. In dieser Studie konnte bereits 24h nach ECP ein Apoptose-Delta von 30.3% (Median) ermittelt werden, nach 48h zeigte sich eine weitere leichte Zunahme dieses Wertes. Auffällig in dieser Untersuchung ist die sehr hohe Apoptoserate der Pre-ECP Proben von circa 40% (24h Kulturdauer nach ECP), was eine hohe Vulnerabilität der Zellen nahelegt und somit auch die höheren Post-ECP-Apoptosewerte erklären könnte. Die Grunderkrankung der in dieser Studie untersuchten Patienten, GvHD nach Stammzelltransplantation, könnte der Grund für die höhere Basalapoptoserate sein. Tatsächlich konnte in einer Untersuchung von Bladon et al. gezeigt werden, dass die Apoptoserate in GvHD-Patienten bereits nach Apherese der Zellen (also Pre-ECP) und nach UVA-/8-MOP-Behandlung höher ist im Vergleich zu CTCL-Patienten (Bladon & Taylor, 2002). Eine Studie von Aringer et al. konnte zudem zeigen, dass die Pre-ECP-Apoptosewerte von Patienten mit systemischer Sklerose nach 24h und 48h Kultur unter 10% lagen. Nach ECP stieg die Apoptoserate auf Werte von 15% (24h Kulturdauer) und 30% (48h Kulturdauer) (Aringer et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Messung der Apoptoseinduktion und bei der

Interpretation der Ergebnisse die Grunderkrankung mitberücksichtigt werden muss und sie somit sehr unterschiedlich hoch nach ECP ausfallen kann.

4.5 Validierung des CD71-Assays an PBMCs aus Patientenproben

Bei der Überprüfung des CD71-Assays an Patientenproben fiel nach 16-stündiger Stimulation eine niedrige CD71-Expressionsrate in den Pre-EPC Proben im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf. 3 von 6 Patienten zeigten eine niedrige Aktivierungsrate der CD4+ T-Zellen von unter 30%. Die Aktivierungsrate der CD8+ T-Zellen lag sogar bei 4 von 6 Patienten unter 30%. Auch im CFSE-Assay lag der Anteil proliferierender Zellen vor ECP im Mittel bei 29.1% (CD4+) und 23.7% (CD8+). Das reduzierte Proliferationsverhalten der Zellen ist jedoch bekannt, wie die beiden Studien von Faivre et al. und Evrard et al. bestätigen: In 8 von 20 ECP-Prozeduren lag dort die gemessene Proliferationsrate im CFSE-Assay pre-EPC ebenfalls unter 30% (Faivre et al., 2015). Bei Evrard et al. war der Anteil proliferierender Zellen sogar in 10 von 18 Pre-EPC-Proben vermindert (<30%) (Evrard et al., 2010). Ursächlich für die reduzierte Proliferation könnte die immunsuppressive Therapie der Patienten sein. Alle 10 von uns getesteten ECP-Prozeduren verliefen unterer zeitgleichem immunsuppressivem Regime. Bei den eingesetzten Substanzen handelte es sich um den Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, Prednisolon und den mTOR- Inhibitor Everolimus. Durch die zweifach- (Patient d) und dreifach-Kombination (Patienten a-c, e und f) der Wirkstoffe kann von einer starken Hemmung des Immunsystems ausgegangen werden (siehe Tab.11 unter 2.2.5.2).

Tacrolimus bindet Calcineurin und hemmt somit dessen Signaltransduktion. Calcineurin wird normalerweise für die IL-2 Freisetzung benötigt, welches wiederum eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung spielt. Tacrolimus wird sehr häufig bei der Therapie und Prävention der GvHD und nach Organtransplantationen eingesetzt (Kalt, 2017). Seine Halbwertszeit beträgt etwa 12h (Sikma et al., 2015). Mykophenolat-Mofetil bindet reversibel an das Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, das für die Guaninnukleotid-Synthese und somit für die Zellteilung benötigt wird. Vor allem Lymphozyten sind von diesem Enzym abhängig, weshalb ihre Proliferation durch das Medikament stark unterdrückt wird. Die Halbwertszeit liegt bei etwa 16h (Bullingham et al., 1998). Everolimus inaktiviert das Protein mTOR, was eine Hemmung der T- und B-Zellproliferation und Differenzierung zur Folge hat. Die Halbwertszeit liegt zwischen 18h und 32h (Sánchez-Fructuoso, 2008). Es wird deutlich, dass alle eingenommenen Medikamente vor allem auf die Hemmung der lymphozytären Proliferation abzielen. Um

diesen Effekt zu minimieren, wurden die Medikamentenrückstände im Plasma nach Probenerhalt durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die T-Zellen aufgrund der langen Halbwertszeit der Medikamente von 12h bis 32h trotzdem zumindest teilweise gehemmt sind. In Versuch 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass eine längere Ruhezeit der Zellen nach ECP vor allem in CD8+ T-Zellen eine höhere Proliferationsrate induziert. Dies könnte auf den Abbau der Medikamente zurückzuführen sein. Bestätigt wird diese Vermutung durch die CD71-Messwerte, die 3 Tage nach Stimulation in den Pre-ECP-Proben erhoben wurden: In 8 von 10 Proben konnten nun hohe (42%) bis sehr hohe (67%-99.4%) CD71-Werte der CD4+ Zellen gemessen werden; die CD8+ T-Zellen zeigten bei gleicher Messung in 7 von 10 Prozeduren ebenfalls suffiziente Proliferationsraten (49.6% bis 92.9%). Dass die CFSE-Kontrolle nach 4-tägiger Stimulation vergleichsweise niedrige Proliferationswerte anzeigt, könnte damit zusammenhängen, dass das CFSE-Assay nur die tatsächlich geteilten Zellen anzeigt. CD71 hingegen zeigt eine Aktivierung der Zelle an, was der eigentlichen Zellteilung zeitlich voraus geht. Viele ECP-Patienten sind immunsupprimiert und ihre Zellen reagieren scheinbar stark verzögert und erst nach Metabolisierung des Medikaments auf eine Zellstimulation. Diese Ergebnisse legen nahe, dass nach aktuellem Kenntnisstand eine „single-day“- Überprüfung der Proliferationsinhibition an Patientenproben nicht möglich ist.

Weiterhin auffällig in der Untersuchung der CD71-Expression an Patientenproben ist der weitaus schwächere Photophoresiseffekt im Vergleich zu Proben gesunder PBMCs: 16h nach Stimulation lag das mittlere CD71-Delta in CD4+ und CD8+ Zellen unter 10%, nach 3 Tagen bei circa 30%. Das CFSE-Assay lieferte mit einem Delta der Expression nach Photophoresese von 24.6% (CD4+) und 17.8% (CD8+) nach 4-tägiger Stimulation ähnlich niedrige Werte. Es stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob die ECP-Zyklen der Patienten erfolgreich durchgeführt wurden. Antworten ergeben sich bei Durchsicht der Apoptosemessungen: Da die CD71-Messung und die Messung der Apoptose aus identischen Proben erhoben wurde und 4 Tage post-ECP eine sehr deutliche Apoptoseinduktion eingetreten war, ist davon auszugehen, dass die ECP adäquat durchgeführt wurde. Dieser Umstand zeigt jedoch auch, dass die Messung der Apoptose womöglich der zuverlässigere Test im Umgang mit Patientenproben ist.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz des Aktivierungsmarkers CD71 in der ECP-Qualitätskontrolle systematisch untersucht und mit bereits etablierten Verfahren wie der Apoptoseinduktion und der CFSE-basierten Proliferationsmessung verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass eine schnelle und einfache Messung der Proliferationsinhibition durch die Verwendung PBMCs gesunder Blutspender möglich ist. Denkbar ist der Einsatz dieses Verfahrens in der Qualitätsüberprüfung der eingesetzten Materialien und Substanzen. Eine zeitgleiche Messung der Apoptoseinduktion ist ebenfalls möglich und sollte angewendet werden, um die Aussagekraft des Tests zu verbessern. Da der CD71-basierte Proliferationsassay an gesunden PBMCs lediglich unter experimentellen Photophoresis-Bedingungen getestet wurde, bedarf es einer Überprüfung des Tests unter realen ECP-Bedingungen vor Anwendung im klinischen Alltag.

Bei der Überprüfung der Testverfahren an Patientenproben konnte festgestellt werden, dass die Messung der Proliferationsinhibition mittels CD71 oder CFSE prinzipiell möglich ist, die Ergebnisse jedoch aufgrund der gehemmten T-Zellfunktion nur eingeschränkt interpretierbar sind. Viele ECP-Patienten sind auf die Einnahme immunsupprimierender Medikamente angewiesen, welche das Ergebnis eines proliferationsbasierten Tests verändern können. Außerdem tragen sie womöglich zu einer reduzierten oder verlangsamten T-Zellaktivierung nach Stimulation bei, was die Auswertung des Tests stark verzögert. Sollte eine Qualitätskontrolle der ECP an Patientenproben gewünscht sein, handelt es sich bei der Messung der Apoptoseinduktion um die zuverlässigere Testmethode. Offene Fragen bezüglich des optimalen Messzeitpunktes und welche Auswirkungen die Grunderkrankung auf die Apoptose hat, sollten in weiteren Untersuchungen beantwortet werden. Außerdem sollte eine ausreichend hohe Differenz zwischen der Pre-ECP- und Post-ECP-Apoptose als Schwellenwert definiert werden, bei dem die ECP-Prozedur als erfolgreich gewertet werden kann.

6 Zusammenfassung

Die extrakorporale Photopherese (ECP) ist seit mehr als 30 Jahren klinisch etabliert und gilt als erfolgreiches Verfahren in der Behandlung verschiedener T-zellvermittelter Erkrankungen. Trotz jahrelanger Nutzung gibt es kein standardisiertes Protokoll für die zellbasierte Qualitätskontrolle. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zu entwickeln, das die zelluläre Reaktion nach ECP-Behandlung zeigt. T-Zellaktivierungsmarker wie CD71, CD69, CD25 und Ki-67 wurden dazu systematisch mittels Durchflusszytometrie im Hinblick auf Kinetik und Zuverlässigkeit analysiert und es wurden verschiedene T-Zellstimulanzen sowie Zellkulturbedingungen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit dem Goldstandard der CFSE-T-Zellproliferationsmessung und der Apoptosemessung unter Verwendung von Sytox- und Annexin-V-Färbung verglichen. Untersucht wurden Proben von 11 gesunden Blutspendern und 10 ECP-Verfahren von 6 Patienten. In Vorversuchen an PBMCs gesunder Blutspender erwies sich der Oberflächenmarker CD71 als geeignet, den Photophereseeffekt in Form einer Proliferationsinhibition schnell und verlässlich nach UVA-/8-MOP-Behandlung anzuzeigen. In den folgenden Validierungsversuchen wurde die CD71-Expression nach Zellstimulation mit CD3/CD28/IL-2 bereits 16 Stunden nach der UVA/8-MOP-Behandlung wirksam unterdrückt. Die Ergebnisse konnten durch die CFSE-Färbung und -Messung bestätigt werden. In Patientenproben erwiesen sich beide Assays auf Proliferationsbasis als weniger sensibel und zeitaufwendig, wohingegen die Apoptosemessung eindeutig einen Effekt der UVA-/8-MOP-Behandlung in allen Proben zeigte.

Zusammenfassend stellt die Analyse der CD71-Expression eine neuartige und einfache Qualitätskontrolle dar, um die zelluläre Proliferationsinhibition nach Photopherese in Proben gesunder Blutspender nachzuweisen. Im klinischen Alltag wäre dieses Verfahren in der Kontrolle der Materialien- und Substanzqualität denkbar. In Patientenproben scheint die Messung der Apoptose der zuverlässigere Test zur Überprüfung von ECP-Verfahren zu sein.

7 Summary

Extracorporeal photopheresis (ECP) has been clinically established for more than 30 years and is considered a successful method in the treatment of various T-cell mediated diseases. Despite years of use, there is no standardized protocol for cell-based quality control. The aim of this present work was therefore to develop a quick and reliable method that demonstrates the cellular response after ECP treatment. T-cell activation markers such as CD71, CD69, CD25, and Ki-67 were systematically analysed by flow cytometry for kinetics and reliability, and various T-cell stimulants and cell culture conditions were examined. The results were compared to the gold standard of CFSE-T-cell proliferation measurement and apoptosis measurement using Sytox and Annexin-V staining. Samples were taken from 11 healthy blood donors and 10 ECP procedures from 6 patients. In preliminary experiments on PBMCs of healthy blood donors, the surface marker CD71 proved to be suitable to indicate the effect of photopheresis in form of proliferation inhibition rapidly and reliably after UVA/8-MOP treatment. In the following validation experiments, CD71 expression after CD3/CD28/IL-2 T cell stimulation was effectively suppressed 16 hours after UVA/8-MOP treatment. The results could be confirmed by CFSE staining and measurement. In patient samples, both proliferative based assays were less sensitive and time consuming, whereas apoptosis measurement clearly showed an effect of UVA/8-MOP treatment in all samples.

In summary, analysis of CD71 expression provides a novel and simple quality control to detect the inhibition of ECP-mediated T cell proliferation in healthy blood donor samples. In everyday clinical practice, this method could be conceivable in the quality control of ECP-related materials and substances. In patient samples, the measurement of apoptosis appears to be more reliable for verification of ECP procedures.

8 Literaturverzeichnis

- ANDREU, G., ACHKAR, A., COUETIL, J. P., GUILLEMAIN, R., HESHMATI, F., AMREIN, C., CHEVALIER, P., GUINVARCH, A., DORE, M. F., & CAPRON, F. (1995). **Extracorporeal photochemotherapy treatment for acute lung rejection episode.** *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 14(4), 793–796.
- ARINGER, M., GRANINGER, W. B., SMOLEN, J. S., KIENER, H. P., STEINER, C. W., TRAUTINGER, F., & KNOBLER, R. (1997). **Photopheresis treatment enhances CD95 (fas) expression in circulating lymphocytes of patients with systemic sclerosis and induces apoptosis.** *British Journal of Rheumatology*, 36(12), 1276–1282.
- BARR, M. L., MEISER, B. M., EISEN, H. J., ROBERTS, R. F., LIVI, U., DALL'AMICO, R., DORENT, R., ROGERS, J. G., RADOVANCEVIĆ, B., TAYLOR, D. O., JEEVANANDAM, V., & MARBOE, C. C. (1998). **Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group.** *The New England Journal of Medicine*, 339(24), 1744–1751.
- BENDEN, C., SPEICH, R., HOFBAUER, G. F., IRANI, S., EICH-WANGER, C., RUSSI, E. W., WEDER, W., & BOEHLER, A. (2008). **Extracorporeal Photopheresis After Lung Transplantation: A 10-Year Single-Center Experience.** *Transplantation*, 86(11), 1625–1627.
- BERES, A. J., & DROBYSKI, W. R. (2013). **The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease.** *Frontiers in Immunology*, 4(JUN), 1–9.
- BERGER, C., HOFFMANN, K., VASQUEZ, J., MANE, S., LEWIS, J., FILLER, R., LIN, A., ZHAO, H., DURAZZO, T., BAIRD, A., LIN, W., FOSS, F., CHRISTENSEN, I., GIRARDI, M., TIGELAAR, R., & EDELSON, R. (2010). **Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy.** *Blood*, 116(23), 4838–4847.
- BERGER, C., XU, A., HANLON, D., LEE, C., SCHECHNER, J., GLUSAC, E., CHRISTENSEN, I., SNYDER, E., HOLLOWAY, V., TIGELAAR, R., & EDELSON, R. (2001). **Induction of human tumor-loaded dendritic cells.** *International Journal of Cancer*, 91(4), 438–447.
- BIAGI, E., DI BIASO, I., LEONI, V., GAIPA, G., ROSSI, V., BUGARIN, C., RENOLDI, G., PARMA, M., BALDUZZI, A., PERSEGHIN, P., & BIONDI, A. (2007). **Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease.** *Transplantation*, 84(1), 31–39.
- BLADON, J., & TAYLOR, P. C. (2002). **Extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease induces both immediate and progressive apoptotic processes.** *British Journal of Dermatology*, 146(1), 59–68.

- BLADON, J., & TAYLOR, P. C. (2005). **Lymphocytes treated by extracorporeal photopheresis can down-regulate cytokine production in untreated monocytes.** *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 21(6), 293–302.
- BÖYUM, A. (1968). **Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.** *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, 97, 77–89.
- BULLINGHAM, R. E. S., NICHOLLS, A. J., & KAMM, B. R. (1998). **Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil.** *Clinical Pharmacokinetics*, 34(6), 429–455.
- CARUSO, A., LICENZIATI, S., CORULLI, M., CANARIS, A. D., DE FRANCESCO, M. A., FIORENTINI, S., PERONI, L., FALLACARA, F., DIMA, F., BALSARI, A., & TURANO, A. (1997). **Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation.** *Cytometry*, 27(1), 71–76.
- CEBRIÁN, M., YAGÜE, E., RINCÓN, M., LÓPEZ-BOTET, M., DE LANDÁZURI, M. O., & SÁNCHEZ-MADRID, F. (1988). **Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes.** *The Journal of Experimental Medicine*, 168(5), 1621–1637.
- CIBRIAN, D., SAIZ, M. L., DE LA FUENTE, H., SÁNCHEZ-DÍAZ, R., MORENO-GONZALO, O., JORGE, I., FERRARINI, A., VÁZQUEZ, J., PUNZÓN, C., FRESNO, M., VICENTE-MANZANARES, M., DAUDÉN, E., FERNÁNDEZ-SALGUERO, P. M., MARTÍN, P., & SÁNCHEZ-MADRID, F. (2016). **CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis.** *Nature Immunology*, 17(8), 985–996.
- CIBRIÁN, D., & SÁNCHEZ-MADRID, F. (2017). **CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper.** *European Journal of Immunology*, 47(6), 946–953.
- CRACIUN, L. I., STORDEUR, P., SCHANDENÉ, L., DUVILLIER, H., BRON, D., LAMBERMONT, M., GOLDMAN, M., & DUPONT, E. (2002). **Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease.** *Transplantation*, 74(7), 995–1000.
- CRUZ-ADALIA, A., JIMÉNEZ-BORREGUERO, L. J., RAMÍREZ-HUESCA, M., CHICO-CALERO, I., BARREIRO, O., LÓPEZ-CONESA, E., FRESNO, M., SÁNCHEZ-MADRID, F., & MARTÍN, P. (2010). **CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis.** *Circulation*, 122(14), 1396–1404.
- D'SOUZA, A., LEE, S., ZHU, X., & PASQUINI, M. (2017). **Current Use and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 23(9), 1417–1421.
- DANIELS, T. R., DELGADO, T., RODRIGUEZ, J. A., HELGUERA, G., & PENICHER, M. L. (2006). **The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer.** *Clinical Immunology*, 121(2), 144–158.

- DI BIASO, I., DI MAIO, L., BUGARIN, C., GAIPA, G., DANDER, E., BALDUZZI, A., PARMA, M., D'AMICO, G., PERSEGHIN, P., BIONDI, A., & BIAGI, E. (2009). **Regulatory T Cells and Extracorporeal Photochemotherapy: Correlation With Clinical Response and Decreased Frequency of Proinflammatory T Cells.** *Transplantation*, 87(9), 1422–1425.
- DI RENZO, M., RUBEGNI, P., DE ALOE, G., PAULESU, L., PASQUI, A. L., ANDREASSI, L., AUTERI, A., & FIMIANI, M. (1997). **Extracorporeal photochemotherapy restores Th1/Th2 imbalance in patients with early stage cutaneous T-cell lymphoma.** *Immunology*, 92(1), 99–103.
- DI RENZO, M., RUBEGNI, P., PASQUI, A. L., POMPELLA, G., DE ALOE, G., SBANO, P., CUCCIA, A., CASTAGNINI, C., AUTERI, A., PASINI, F. L., & FIMIANI, M. (2005). **Extracorporeal photopheresis affects interleukin (IL)-10 and IL-12 production by monocytes in patients with chronic graft-versus-host disease.** *British Journal of Dermatology*, 153(1), 59–65.
- DIGNAN, F. L., AMROLIA, P., CLARK, A., CORNISH, J., JACKSON, G., MAHENDRA, P., SCARISBRICK, J., TAYLOR, P. C., SHAW, B. E., & POTTER, M. N. (2012). **Diagnosis and management of chronic graft-versus-host disease.** *British Journal of Haematology*, 158(1), 46–61.
- EDELSON, R. (1989). **Photopheresis: a new therapeutic concept.** *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 62(6), 565–577.
- EDELSON, R., BERGER, C., GASPARRO, F., JEGASOTHY, B., HEALD, P., WINTROUB, B., VONDERHEID, E., KNOBLER, R., WOLFF, K., PLEWIG, G., MCKIERNAN, G., CHRISTIANSEN, I., OSTER, M., HONIGSMANN, H., WILFORD, H., KOKOSCHKA, E., REHLE, T., ... LAROCHE, L. (1987). **Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma by Extracorporeal Photochemotherapy.** *New England Journal of Medicine*, 316(6), 297–303.
- EDELSON, R., FACKTOR, M., ANDREWS, A., LUTZNER, M., & SCHEIN, P. (1974). **Successful Management of the Sézary Syndrome.** *New England Journal of Medicine*, 291(6), 293–294.
- EVARD, B., DOSGILBERT, A., JACQUEMOT, N., DEMEOCQ, F., GILLES, T., CHASSAGNE, J., BERGER, M., & TRIDON, A. (2010). **CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: Use for quality control.** *Transfusion and Apheresis Science*, 42(1), 11–19.
- FAHMY, I. R., & ABU-SHADY, H. (1947). **Ammi majus Linn.; pharmacognostical study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin.** *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 281–291; discussion 426.
- FAIVRE, L., LECOUFLET, L., LIU, W. Q., KHADHER, I., LAHAIE, C., VIDAL, M., LEGOUVELLO, S., BEAUMONT, J. L., BIERLING, P., ROUARD, H., & BIREBENT, B. (2015). **Quality control of extracorporeal photochemotherapy: Proliferation assay using CFSE validated according to ISO 15189:2007 standards.** *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 88(1), 30–39.

- FITZPATRICK, T. B., & PATHAK, M. A. (1959). **Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins.** *The Journal of Investigative Dermatology*, 32(2, Part 2), 229–231.
- FONTENOT, J. D., & RUDENSKY, A. Y. (2005). **A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3.** *Nature Immunology*, 6(4), 331–337.
- GASPARRO, F., DALL'AMICO, R., GOLDMINZ, D., SIMMONS, E., & WEINGOLD, D. (1989). **Molecular aspects of extracorporeal photochemotherapy.** *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 62(6), 579–593.
- GENBERG, H., KUMLIEN, G., SHANWELL, A., & TYDÉN, G. (2005). **Refractory acute renal allograft rejection successfully treated with photopheresis.** *Transplantation Proceedings*, 37(8), 3288–3289.
- GERDES, J., LEMKE, H., BAISCH, H., WACKER, H. H., SCHWAB, U., & STEIN, H. (1984). **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(4), 1710–1715.
- GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H., & STEIN, H. (1983). **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** *International Journal of Cancer*, 31(1), 13–20.
- GESKIN, L. (2007). **ECP versus PUVA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma.** *Skin Therapy Letter*, 12(5), 1–4.
- GILCHREST, B. A. (1979). **Methoxsalen photochemotherapy for mycosis fungoides.** *Cancer Treatment Reports*, 63(4), 663–667.
- GIRARDI, M., BERGER, C., WILSON, L., CHRISTENSEN, I., THOMPSON, K., GLUSAC, E., & EDELSON, R. (2006). **Transimmunization for cutaneous T cell lymphoma: a Phase I study.** *Leukemia & Lymphoma*, 47(8), 1495–1503.
- GUENOVA, E., WATANABE, R., TEAGUE, J. E., DESIMONE, J. A., JIANG, Y., DOWLATSHAHI, M., SCHLAPBACH, C., SCHAEKEL, K., ROOK, A. H., TAWA, M., FISHER, D. C., KUPPER, T. S., & CLARK, R. A. (2013). **TH2 Cytokines from Malignant Cells Suppress TH1 Responses and Enforce a Global TH2 Bias in Leukemic Cutaneous T-cell Lymphoma.** *Clinical Cancer Research*, 19(14), 3755–3763.
- HANNANI, D. (2015). **Extracorporeal Photopheresis: Tolerogenic or Immunogenic Cell Death? Beyond Current Dogma.** *Frontiers in Immunology*, 6(JUN), 349.
- HESHMATI, F. (2003). **Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy.** *Transfusion and Apheresis Science*, 29(1), 61–70.
- HYMES, S. R., ALOUSI, A. M., & COWEN, E. W. (2012). **Graft-versus-host disease: Part I. Pathogenesis and clinical manifestations of graft-versus-host disease.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(4), 515.e1-515.e18.

- JACOB, M., MANCHES, O., DRILLAT, P., RICHARD, M., PLUMAS, J., CHAPEROT, L., HEGELHOFER, H., GARBAN, F., GRESSIN, R., FAVROT, M., BENZA, J., & PERNOLLET, M. (2003). **Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system.** *Transfusion and Apheresis Science*, 28(1), 63–70.
- JAKSCH, P., SCHEED, A., KEPLINGER, M., ERNST, M., DANI, T., JUST, U., NAHAVANDI, H., KLEPETKO, W., & KNOBLER, R. (2012). **A prospective interventional study on the use of extracorporeal photopheresis in patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation.** *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 31(9), 950–957.
- JAMIL, M. O., & MINEISHI, S. (2015). **State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment.** *International Journal of Hematology*, 101(5), 452–466.
- JARDINE, M. J., BHANDARI, S., WYBURN, K. R., MISRA, A. K., MCKENZIE, P. R., & ERIS, J. M. (2009). **Photopheresis therapy for problematic renal allograft rejection.** *Journal of Clinical Apheresis*, 24(4), 161–169.
- JAWED, S. I., MYKOWSKI, P. L., HORWITZ, S., MOSKOWITZ, A., & QUERFELD, C. (2014). **Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part I. Diagnosis: Clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(2), 205.e1-205.e16.
- JUST, U., & KNOBLER, R. (2015). **[Update on extracorporeal photopheresis].** *Der Hautarzt; Zeitschrift Für Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, 66(11), 804–809.
- KALT, D. A. (2017). **Tacrolimus: A Review of Laboratory Detection Methods and Indications for Use.** *Laboratory Medicine*, 48(4), e62–e65.
- KIRKLIN, J. K., BROWN, R. N., HUANG, S. T., NAFTEL, D. C., HUBBARD, S. M., RAYBURN, B. K., MCGIFFIN, D. C., BOURGE, R. B., BENZA, R. L., TALLAJ, J. A., PINDERSKI, L. J., PAMBOUKIAN, S. V., GEORGE, J. F., & MARQUES, M. (2006). **Rejection with hemodynamic compromise: Objective evidence for efficacy of photopheresis.** *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 25(3), 283–288.
- KNOBLER, R. (2014). **Guidelines on the Use of Extracorporeal Photopheresis** **Publication of this supplement was supported by a grant from the European Dermatology Forum.** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, 28(Supp. 1), 1–37.
- KNOBLER, R., BARR, M. L., COURIEL, D. R., FERRARA, J. L. M., FRENCH, L. E., JAKSCH, P., REINISCH, W., ROOK, A. H., SCHWARZ, T., & GREINIX, H. (2009). **Extracorporeal photopheresis: past, present, and future.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(4), 652–665.
- KNOBLER, R., BERLIN, G., CALZAVARA-PINTON, P., GREINIX, H., JAKSCH, P., LAROCHE, L., LUDVIGSSON, J., QUAGLINO, P., REINISCH, W., SCARISBRICK, J., SCHWARZ, T., WOLF, P., ARENBERGER, P., ASSAF, C., BAGOT, M., BARR, M., BOHBOT, A., ... HILLEN, U.

- (2014). **Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis**. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28, 1–37.
- KNOBLER, R., FRENCH, L., KIM, Y., BISACCIA, E., GRANINGER, W., NAHAVANDI, H., STROBL, F. J., KEYSTONE, E., MEHLMAUER, M., ROOK, A. H., & BRAVERMAN, I. (2006). **A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis**. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(5), 793–799.
- KNOBLER, R., TRAUTINGER, F., GRANINGER, W., MACHEINER, W., GRUENWALD, C., NEUMANN, R., & RAMER, W. (1993). **Parenteral administration of 8-methoxypsoralen in photopheresis**. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 28(4), 580–584.
- KUNTE, C., ERLLENKEUSER-UEBELHOER, I., MICHELSEN, S., SCHEERER-DHUNGEL, K., & PLEWIG, G. (2005). **[Treatment of therapy-resistant erosive oral lichen planus with extracorporeal photopheresis (ECP)]**. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 3(11), 889–894.
- KUSZTAL, M., KOSÁCIELSKA-KASPRZAK, K., GDOWSKA, W., ZABIŃSKA, M., MYSZKA, M., KŁAK, R., KRAJEWSKA, M., BORATYŃSKA, M., SZYBER, P., CHUDOBA, P., PATRZAŁEK, D., & KLINGER, M. (2011). **Extracorporeal photopheresis as an antirejection prophylaxis in kidney transplant recipients: Preliminary results**. *Transplantation Proceedings*, 43(8), 2938–2940.
- LAST'OVICKA, J., BUDINSKÝ, V., SPÍSEK, R., & BARTŮNKOVÁ, J. (2009). **Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers**. *Cellular Immunology*, 256(1–2), 79–85.
- LEE, K. H., & GARRO, J. (1989). **Engineering aspects of extracorporeal photochemotherapy**. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 62(6), 621–628.
- LEHRER, M. S., RUCHELLI, E., OLTHOFF, K. M., FRENCH, L. E., & ROOK, A. H. (2000). **Successful reversal of recalcitrant hepatic allograft rejection by photopheresis**. *Liver Transplantation*, 6(5), 644–647.
- MAEDA, A., SCHWARZ, A., KERNEBECK, K., GROSS, N., ARAGANE, Y., PERITT, D., & SCHWARZ, T. (2005). **Intravenous Infusion of Syngeneic Apoptotic Cells by Photopheresis Induces Antigen-Specific Regulatory T Cells**. *J Immunol*, 174(10), 5968–5976.
- MARKS, D. I., ROCKMAN, S. P., OZIEMSKI, M. A., & FOX, R. M. (1990). **Mechanisms of lymphocytotoxicity induced by extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T cell lymphoma**. *Journal of Clinical Investigation*, 86(6), 2080–2085.
- MARSHALL, S. R. (2006). **Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression?** *Nature Clinical Practice. Oncology*, 3(6), 302–314.

- MARTÍN, P., GÓMEZ, M., LAMANA, A., MATESANZ MARÍN, A., CORTÉS, J. R., RAMÍREZ-HUESCA, M., BARREIRO, O., LÓPEZ-ROMERO, P., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., DE LA FUENTE, H., CRUZ-ADALIA, A., & SÁNCHEZ-MADRID, F. (2010). **The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity.** *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(2), 355–365, 365.e1-3.
- MOTAMEDI, M., XU, L., & ELAHI, S. (2016). **Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells : The kinetics of expression of T cell activation markers.** *Journal of Immunological Methods*, 437, 43–52.
- NECKERS, L. M., & TREPPEL, J. B. (1986). **Transferrin receptor expression and the control of cell growth.** *Cancer Investigation*, 4(5), 461–470.
- NGUYEN, X. D., EICHLER, H., DUGRILLON, A., PIECHACZEK, C., BRAUN, M., & KLÜTER, H. (2003). **Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells.** *Journal of Immunological Methods*, 275(1–2), 57–68.
- O'HAGAN, A. R., STILLWELL, P. C., ARROLIGA, A., & KOO, A. (1999). **Photopheresis in the treatment of refractory bronchiolitis obliterans complicating lung transplantation.** *Chest*, 115(5), 1459–1462.
- PAPP, G., BARATH, S., SZEGEDI, A., SZODORAY, P., & ZEHER, M. (2012). **The effects of extracorporeal photochemotherapy on T cell activation and regulatory mechanisms in patients with systemic sclerosis.** *Clinical Rheumatology*, 31(9), 1293–1299.
- PARRISH, J. A., FITZPATRICK, T. B., TANENBAUM, L., & PATHAK, M. A. (1974). **Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light.** *The New England Journal of Medicine*, 291(23), 1207–1211.
- PEROTTI, C., & SNIĘCINSKI, I. (2015). **A concise review on extracorporeal photochemotherapy: Where we began and where we are now and where are we going!** *Transfusion and Apheresis Science*, 52(3), 360–368.
- PIERELLI, L., BOSI, A., & OLIVIERI, A. (2018). **“Best practice” for extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease by Società Italiana di Emaferesi and Manipolazione Cellulare and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo: a national survey to ascertain its degree of applica.** *Transfusion*, 58(1), 217–222.
- PINEDA, A. A., & WINKELMANN, R. K. (1981). **Leukapheresis in the treatment of Sézary syndrome.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 5(5), 544–549.
- RADENHAUSEN, M., MICHELSEN, S., PLEWIG, G., BECHARA, F. G., ALTMAYER, P., & HOFFMANN, K. (2004). **Bicentre experience in the treatment of severe generalised atopic dermatitis with extracorporeal photochemotherapy.** *The Journal of Dermatology*, 31(12), 961–970.

- REINISCH, W., KNOBLER, R., RUTGEERTS, P. J., OCHSENKÜHN, T., ANDERSON, F., VON TIRPITZ, C., KAATZ, M., VAN DER WOUDE, C., PARENTI, D., & MANNON, P. (2013). **Extracorporeal Photopheresis (ECP) in Patients with Steroid-dependent Crohn's Disease.** *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(2), 293–300.
- REINISCH, W., NAHAVANDI, H., SANTELLA, R., ZHANG, Y., GASCHÉ, C., MOSER, G., WALDHÖR, T., GANGL, A., VOGELSANG, H., & KNOBLER, R. (2001). **Extracorporeal photochemotherapy in patients with steroid-dependent Crohn's disease: a prospective pilot study.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15(9), 1313–1322.
- REZVANI, K., MIELKE, S., AHMADZADEH, M., KILICAL, Y., SAVANI, B. N., ZEILAH, J., KEYVANFAR, K., MONTERO, A., HENSEL, N., KURLANDER, R., & BARRETT, A. J. (2006). **High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT.** *Blood*, 108(4), 1291–1297.
- SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, A. I. (2008). **Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials.** *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(6), 807–819.
- SANCHO, D., GÓMEZ, M., VIEDMA, F., ESPLUGUES, E., GORDÓN-ALONSO, M., GARCÍA-LÓPEZ, M. A., DE LA FUENTE, H., MARTÍNEZ-A, C., LAUZURICA, P., & SÁNCHEZ-MADRID, F. (2003). **CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis.** *The Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 872–882.
- SANLI, H., AKAY, B. N., AYYILDIZ, E., ANADOLU, R., & ILHAN, O. (2010). **Remission of severe autoimmune bullous disorders induced by long-term extracorporeal photochemotherapy.** *Transfusion and Apheresis Science*, 43(3), 353–359.
- SCARISBRICK, J. (2009). **Extracorporeal photopheresis: What is it and when should it be used?** *Clinical and Experimental Dermatology*, 34(7), 757–760.
- SCARISBRICK, J., TAYLOR, P., HOLTICK, U., MAKAR, Y., DOUGLAS, K., BERLIN, G., JUVONEN, E., & MARSHALL, S. (2008). **U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease.** *British Journal of Dermatology*, 158(4), 659–678.
- SCHILLER, M., KLEMKE, C.-D., ARNOLD, A., BOOKEN, N., HANNEKEN, S., HÖLZLE, E., KAATZ, M., SCHWARZ, T., WEICHENTHAL, M., HILLEN, U., GRABBE, S., KORRESPONDENZANSCHRIFT, M., & UWE HILLEN, P.-D. (2011). **S1 Leitlinie - extrakorporale Photopherese.** *AWMF Register Nummer 013/072.*
- SCHMID, D., GRABMER, C., STREIF, D., LENER, T., SCHALLMOSER, K., & ROHDE, E. (2015). **T-Cell death, phosphatidylserine exposure and reduced proliferation rate to validate extracorporeal photochemotherapy.** *Vox Sanguinis*, 108(1), 82–88.
- SCHMITT, S., JOHNSON, T. S., KARAKHANOVA, S., NÄHER, H., MAHNKE, K., & ENK, A. H. (2009). **Extracorporeal photopheresis augments function of**

- CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells by triggering adenosine production.** *Transplantation*, 88(3), 411–416.
- SCHOLZEN, T., & GERDES, J. (2000). **Deetz_1989.pdf.** 322(August 1999), 311–322.
- SCHOONEMAN, F. (2003). **Extracorporeal photopheresis technical aspects.** *Transfusion and Apheresis Science*, 28(1), 51–61.
- SCHWAB, L., MICHEL, G., BEIN, G., & HACKSTEIN, H. (2019). **CD71 surface analysis of T cells: a simple alternative for extracorporeal photopheresis quality control.** *Vox Sanguinis*, vox.12850.
- SCHWARTZ, J., PADMANABHAN, A., AQUI, N., BALOGUN, R. A., CONNELLY-SMITH, L., DELANEY, M., DUNBAR, N. M., WITT, V., WU, Y., & SHAZ, B. H. (2016). **Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue.** *Journal of Clinical Apheresis*, 31(3), 149–338.
- SHEPARD, S. E., NESTLE, F. O., & PANIZZON, R. (1999). **Pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen during extracorporeal photopheresis.** *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 15(2), 64–74.
- SIKMA, M. A., VAN MAARSEVEEN, E. M., VAN DE GRAAF, E. A., KIRKELS, J. H., VERHAAR, M. C., DONKER, D. W., KESECIOGLU, J., & MEULENBELT, J. (2015). **Pharmacokinetics and Toxicity of Tacrolimus Early after Heart and Lung Transplantation.** *American Journal of Transplantation*, 15(9), 2301–2313.
- SLOVIS, B. S., LOYD, J. E., & KING, L. E. (1995). **Photopheresis for Chronic Rejection of Lung Allografts.** *New England Journal of Medicine*, 332(14), 962–962.
- SNELL, G. I., WESTALL, G. P., & PARASKEVA, M. A. (2013). **Immunosuppression and allograft rejection following lung transplantation: Evidence to date.** *Drugs*, 73(16), 1793–1813.
- TAMBUR, A. R., ORTEGEL, J. W., MORALES, A., KLINGEMANN, H., GEBEL, H. M., & THARP, M. D. (2000). **Extracorporeal photopheresis induces lymphocyte but not monocyte apoptosis.** *Transplantation Proceedings*, 32(4), 747–748.
- TAVERNA, F., COLUCCIA, P., ARIENTI, F., BIROLINI, A., TERRANOVA, L., MAZZOCCHI, A., RINI, F., MARIANI, L., MELANI, C., & RAVAGNANI, F. (2015). **Biological quality control for extracorporeal photochemotherapy: Assessing mononuclear cell apoptosis levels in ECP bags of chronic GvHD patients.** *Journal of Clinical Apheresis*, 30(3), 162–170.
- TESTI, R., PHILLIPS, J. H., & LANIER, L. L. (1989). **T cell activation via Leu-23 (CD69).** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(4), 1123–1128.
- TIMMERMAN, J., & LEVY, R. (1999). **Dendritic Cell Vaccines for Cancer Immunotherapy.** *Annual Review of Medicine*, 50(1), 507–529.

- TOKURA, Y. (1999). **Modulation of cytokine production by 8-methoxypsoralen and UVA.** *Journal of Dermatological Science*, 19(2), 114–122.
- TRICKETT, A., & KWAN, Y. L. (2003). **T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads.** *Journal of Immunological Methods*, 275(1–2), 251–255.
- URBANI, L., MAZZONI, A., CATALANO, G., DE SIMONE, P., VANACORE, R., PARDI, C., BORTOLI, M., BIANCOFIORE, G., CAMPANI, D., PERRONE, V., MOSCA, F., SCATENA, F., & FILIPPONI, F. (2004). **The use of extracorporeal photopheresis for allograft rejection in liver transplant recipients.** *Transplantation Proceedings*, 36(10), 3068–3070.
- URBANI, L., MAZZONI, A., COLOMBATTO, P., BIANCOFIORE, G., BINDI, L., TASCINI, C., MENICHETTI, F., BRUNETTO, M., SCATENA, F., & FILIPPONI, F. (2008). **Potential Applications of Extracorporeal Photopheresis in Liver Transplantation.** *Transplantation Proceedings*, 40(4), 1175–1178.
- VILLANUEVA, J., BHORADE, S. M., ROBINSON, J. A., HUSAIN, A. N., & GARRITY, E. R. (2000). **Extracorporeal photopheresis for the treatment of lung allograft rejection.** *Annals of Transplantation*, 5(3), 44–47.
- VOWELS, B. R., CASSIN, M., BOUFAL, M. H., WALSH, L. J., & ROOK, A. H. (1992). **Extracorporeal Photochemotherapy Induces the Production of Tumor Necrosis Factor-alpha by Monocytes: Implications for the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma and Systemic Sclerosis.** *Journal of Investigative Dermatology*, 98(5), 686–692.
- WARD, D. M. (2011). **Extracorporeal photopheresis: how, when, and why.** *Journal of Clinical Apheresis*, 26(5), 276–285.
- WOLFE, J. T., TOMASZEWSKI, J. E., GROSSMAN, R. A., GOTTLIEB, S. L., NAJI, A., BRAYMAN, K. L., KOBIRIN, S. M., & ROOK, A. H. (1996). **Reversal of acute renal allograft rejection by extracorporeal photopheresis: a case presentation and review of the literature.** *Journal of Clinical Apheresis*, 11(1), 36–41.
- WOLFF, D., SCHLEUNING, M., VON HARSDFORF, S., BACHER, U., GERBITZ, A., STADLER, M., AYUK, F., KIANI, A., SCHWERDTFEGER, R., VOGELSANG, G., KOBBE, G., GRAMATZKI, M., LAWITSCHKA, A., MOHTY, M., PAVLETIC, S., GREINIX, H., & HOLLER, E. (2011). **Consensus conference on clinical practice in chronic GVHD: Second-line treatment of chronic graft-versus-host disease.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 17(1), 1–17.
- WOLFF, K., HÖNIGSMANN, H., GSCHNAIT, F., & KONRAD, K. (1975). **[Photochemotherapy of psoriasis: clinical experiences with 152 patients (author's trans)].** *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (1946), 100(48), 2471–2477, 1497.
- WOLLINA, U., & LOOKS, A. (1999). **Extracorporeal photochemotherapy in cutaneous lupus erythematosus.** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 13(2), 127–130.

- WOLNICKA-GLUBISZ, A., FRACZEK, J., SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J., FRIEDLEIN, G., MIKOLAJCZYK, T., SARNA, T., & PRYJMA, J. (2010). **Effect of UVA and 8-methoxypsoralen, 4, 6, 4'-trimethylangelicin or chlorpromazine on apoptosis of lymphocytes and their recognition by monocytes.** *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 61(1), 107–114.
- XIE, X., DENG, R., LIU, F., XU, W., YAU LI, S. F., & LIU, X. (2013). **Colorimetric anticancer drug detection by gold nanoparticle-based DNA interstrand cross-linking.** *Analytical Methods*, 5(5), 1116.
- YAKUT, E., JAKOBS, C., PERIC, A., MICHEL, G., BAAL, N., BEIN, G., BRÜNE, B., HORNING, V., & HACKSTEIN, H. (2015). **Extracorporeal photopheresis promotes IL-1 β production.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(6), 2569–2577.
- YOO, E. K., ROOK, A. H., ELENITSAS, R., GASPARRO, F. P., & VOWELS, B. R. (1996). **Apoptosis induction by ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: Relevance to mechanism of therapeutic action.** *Journal of Investigative Dermatology*, 107(2), 235–242.
- ZIC, J. (2003). **The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis.** *Dermatologic Therapy*, 16(4), 337–346.
- ZIC, J., MILLER, J., STRICKLIN, G., & KING, L. (1999). **The North American experience with photopheresis.** *Therapeutic Apheresis: Official Journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis*, 3(1), 50–62.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

8-MOP	8-Methoxypsoralen
Abb	Abbildung
ASFA	Amerikanische Gesellschaft für Apherese (American Society for Apheresis)
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	5,6-Carboxy Fluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
Con A	Concanavalin A
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom (Cutaneous T-Cell Lymphoma)
DIV	Geteilt (Divided)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DZ	Dendritische Zellen
ECP	Extrakorporale Photopherese
ExP	Experimentelle Photopherese
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter
FKS/FCS	Fötale Kalbsserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreuung (Forward Scatter)
GvHD	Graft-versus-Host Disease
Hkt	Hämatokrit
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MF	Mycosis fungoides
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PD	Percentage of Division
PHA	Phytohämagglutinin
PUVA	Psoralen + UVA-Licht
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)
SS	Sézary-Syndrom
SSC	Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter)
Tab	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TH1/TH2	T-Helfer Zelle Typ 1/Typ 2
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
UnDIV	Ungeteilt (Undivided)
UVA	Ultraviolettes Licht der Kategorie A

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Bildung von "Cross-Links" im DNA-Doppelstrang durch 8-MOP zwischen Thymin-Basenpaaren. Republished with permission of the Royal Society of Chemistry from Analytical Methods; Xie, X., Deng, R., Liu, F., Xu, W., Yau Li, S. F., & Liu, X. Colorimetric anticancer drug detection by gold nanoparticle-based DNA interstrand cross-linking (2013)., 5(5), 1116. Copyright 2013; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.	2
Abb. 2: Illustration des ECP- Ablaufs. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature Clinical Practice. Oncology] Marshall, S. R. (2006). Technology insight: ECP for the treatment of GvHD-can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? 3(6), 302–314, copyright 2006	7
Abb. 3: Wirkmechanismen der ECP, Überblick. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature Clinical Practice. Oncology] Marshall, S. R. (2006). Technology insight: ECP for the treatment of GvHD-can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? 3(6), 302–314, copyright 2006	8
Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	24
Abb. 5: Gating Strategie zur Identifizierung proliferierender T-Zellen am FACSCanto II (BD) Flow Cytometer	29
Abb. 6: Gating Strategie zur Identifizierung apoptotischer T-Zellen am FACSCanto II Flow Cytometer	30
Abb. 7: Vergleich der Ki-67 Expression nach unterschiedlichen Stimulanzienprotokollen	32
Abb. 8: Vergleich der Expression von Ki-67 (A) und CD71 (B) in humanen T-Zellen nach experimenteller Photopherese	34
Abb. 9: Untersuchung der Versuchsbedingungen durch Zellkulturplattenvergleich (a) und Überprüfung der Stimulationsreagenzien (b)	35
Abb. 10: Eine Verlängerung der Ruhezeit nach experimenteller Photopherese vor Zellstimulation führt zu einem deutlicheren Photophereseeffekt in humanen T-Zellen	36
Abb. 11: Kinetik der Expression von CD71, CD69 und CD25 nach experimenteller Photopherese bei gesunden Blutspendern	39
Abb. 12: Chargenabhängige Induktion der CD69- Expression in unstimulierten T-Zellen nach Bestrahlung.	40
Abb. 13: Der Einsatz der experimentellen Photopherese führt nach einer Stimulationszeit von 16h zu einer signifikant niedrigeren CD71-Expression in CD4+ und CD8+ T-Zellen	42

Abb. 14: Der Einsatz der experimentellen Photopherese führt zu einer signifikant verminderten CD71- Expression nach 16h (A) und 4d (B) in stimulierten T-Zellen von gesunden Blutspendern. Vergleich mit dem CFSE-Assay (C)	45
Abb. 15: Das Δ der CD71-Expression korreliert mit dem Δ der CFSE-Expression 4 Tage nach Stimulation in PBMCs gesunder Blutspender.....	46
Abb. 16: Nach Einsatz der experimentellen Photopherese zeigt sich eine signifikante Apoptosezunahme in unstimulierten T-Zellen von gesunden Blutspendern.....	47
Abb. 17: Der CD71-Assay zeigt nach 16h Kulturdauer ein signifikant größeres Delta als der Apoptose-Assay	48
Abb. 18: Untersuchung des Photophereseeffekts in Abhängigkeit der Ruhezeit vor T-Zellstimulation und nach ECP.....	49
Abb. 19: Es zeigt sich kein Unterschied der CD71-Expression in CD4+/CD8+ T-Zellen von Patienten nach IL-2-Zugabe	50
Abb. 20: Kinetik der Gesamtapoptose (A) und Spätapoptose (B) in Patientenproben nach ECP	53
Abb. 21: Vergleich der absoluten CD71- und CFSE- Expressionshemmung nach Photopherese.....	56

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte und Zubehör.....	14
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.....	16
Tab. 3: Stimulationsantikörper.....	16
Tab. 4: Lektine	16
Tab. 5: Zytokine (Interleukin-2).....	17
Tab. 6: Monoklonale Antikörper und Reagenzien zur durchflusszytometrischen Analyse	18
Tab. 7: Chemikalien	20
Tab. 8: Beads zur FACS-Kompensation sowie zur Ermittlung der absoluten Zellzahl.	20
Tab. 9: Hkt (%) und Lym (%) der Proben gesunder Blutspender	24
Tab. 10: Überblick der ECP-Patienten und der jeweiligen ECP-Prozeduren.....	25
Tab. 11: CD4+ T-Zellen; Vergleich des CD71- und CFSE-Assays.....	43
Tab. 12: CD8+ T-Zellen; Vergleich des CD71- und CFSE-Assays.....	43
Tab. 13: CD4+ T-Zellen; Gesamtapoptose (%).....	51
Tab. 14: CD8+ T-Zellen; Gesamtapoptose (%).....	51
Tab. 15: CD4+ T-Zellen; Spätapoptose (%).....	52
Tab. 16: CD8+ T-Zellen; Spätapoptose (%).....	52
Tab. 17: CD4+ T-Zellen; Vergleich der absoluten und relativen Inhibition der CD71/CFSE-Expression.....	54
Tab. 18: CD8+ T-Zellen; Vergleich der absoluten und relativen Inhibition der CD71/CFSE-Expression.....	54

10 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden für folgende Publikationen verwendet:

- Vortrag: **Laura Schwab**, Gabriela Michel, Gregor Bein, Holger Hackstein:
Ein neuer und einfacher Qualitätskontrolltest zur Analyse der Inhibition der T Zell Proliferation nach extrakorporaler Photopherese
51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI) 19.-21.09.2018, Lübeck
- Veröffentlichung: **Laura Schwab**, Gabriela Michel, Gregor Bein, Holger Hackstein;
CD71 surface analysis of T cells: a simple alternative for extracorporeal photopheresis quality control, *Vox Sang* 2019;
10.1111/vox.12850

11 Danksagung

Das Gelingen der vorliegenden Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht möglich gewesen. Es ist mir ein großes Anliegen mich an dieser Stelle bei allen Beteiligten zu bedanken.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die hervorragende Betreuung und die professionelle sowie konstruktive Zusammenarbeit während den Arbeiten am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin. Insbesondere schätze ich die stetige Bereitschaft, mich bei allen Fragen, Hindernissen und Anliegen zu unterstützen, sowie die klare und strukturierte Vorgehensweise in allen Belangen. Herzlichen Dank!

Für die großartige Unterstützung und die lehrreiche Zeit während meiner experimentellen Arbeiten, danke ich von Herzen allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunologie und Transfusionsmedizin für ihre bereitwillige und beständige Hilfe in allen Angelegenheiten und Fragen. Mein besonderer Dank gilt Gaby Michel, die mich jederzeit auf fachlicher und menschlicher Ebene mit beständiger Geduld und Zuversicht unterstützt hat und durch ihre außerordentliche Expertise am Durchflusszytometer und im Umgang mit humanen Zellkulturarbeiten einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat. Ich danke Dr. Nelli Baal für die herzliche Aufnahme in das Team, die Einarbeitung im Labor sowie die zahlreichen guten fachlichen Ratschläge.

Großer Dank gebührt ebenfalls dem Zentrumsleiter Herrn Prof. Dr. Gregor Bein, für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin. Ich bedanke mich an dieser Stelle ebenfalls herzlichst bei allen Mitarbeitern, insbesondere der Photophereseeinheit, der Fraktionierung und der Blutbank, die durch ihre tatkräftige Unterstützung einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke allen Patienten und Blutspendern, die an der Studie teilgenommen, und meine Arbeit auf diese Weise unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich für die Aufnahme in das Prägraduiertenkolleg des Fachbereiches Medizin bedanken, sowie die fachliche und finanzielle Unterstützung im Rahmen dessen.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner, für den unermüdlichen Rückhalt, den beständigen Zuspruch, die investierte Zeit und die Hilfe bei der Überwindung kleiner und großer Hürden. Ich danke euch von Herzen.