

**Untersuchungen zur Immunregulation
durch ECP-behandelte Monozyten
in einem *in vitro* Modell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Franziska Wiese
aus Schorndorf

Tübingen
2019

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	24.05.2019
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	PD Dr. Ursula Holzer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dominik Hartl

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	1
II	Zusammenfassung	3
1	Einleitung	5
1.1	Hintergrundinformationen aus der Immunologie	5
1.2	Grundlagen der Extracorporalen Photophorese.....	12
1.3	Aktueller Stand der ECP Forschung.....	17
1.4	Zielsetzung	23
2	Material	25
2.1	Antikörper	25
2.2	Antikörper für die Zellkultur.....	27
2.3	Chemikalien	27
2.4	Farbstoffe.....	28
2.5	Geräte	28
2.6	Kits	29
2.7	Medien	30
2.8	Oligonukleotide	31
2.9	Puffer und Lösungen	31
2.10	Software.....	32
2.11	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.12	Vitamine	33
2.13	Zytokine und Chemokine	34
2.14	Firmensitze	34
3	Methoden	36
3.1	Zellisolation.....	36
3.2	ECP.....	38
3.3	Kultivierung der ECP-behandelten Zellen	40
3.4	CFSE Markierung der T-Zellen.....	42
3.5	Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflusszytometrie	42
3.6	Zytokinmessungen.....	48
3.7	Differenzierung von Makrophagen	49
3.8	Aufnahmen am Mikroskop.....	49
3.9	Blockade der PD-L1-PD-1 bzw. PD-L2-PD-1 Achse.....	50
3.10	<i>In vitro</i> Kombinationstherapie von Vitamin D3 Vorbehandlung und ECP	50
3.11	Nukleinsäureisolation.....	51
3.12	Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration	51
3.13	Probenvorbereitung für die RT-PCR	53
3.14	Probenvorbereitung für NGS	56
3.15	Sequenzierung am HiSeq 2500.....	56
3.16	Auswertung.....	57

3.17	Patienten und Probenmaterial	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> ECP-Modells	60
4.2	Einfluss ECP-behandelter Monozyten auf T-Zellen im <i>in vitro</i> Modell	62
4.3	Bedeutung des Zellkontakts im <i>in vitro</i> ECP-Modell	65
4.4	Einfluss der <i>in vitro</i> ECP auf Monozyten	72
4.5	Identifizierung von Kontrollstellen und Schlüsselgenen der Immunregulation	82
4.6	Validierung des <i>in vitro</i> ECP-Modells mittels Patientenproben	95
4.7	Auswirkung einer Kombinationstherapie mit Vitamin D3 im Rahmen der ECP	99
5	Diskussion.....	104
5.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> ECP-Modells	104
5.2	Immunregulatorische Effekte <i>in vitro</i> ECP-behandelter Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen	105
5.3	Monozyten als wichtige Mediatoren der ECP-induzierten Effekte	112
5.4	Identifikation ECP spezifischer Targets.....	119
5.5	Validierung und klinische Bedeutung des <i>in vitro</i> ECP-Modells.....	124
5.6	Fazit	128
III	Literaturverzeichnis.....	130
IV	Abkürzungsverzeichnis	147
V	Abbildungsverzeichnis	149
VI	Formelverzeichnis.....	150
VII	Tabellenverzeichnis	151
VIII	Erklärung.....	152
IX	Beteiligung	152
X	Publikationen	153
XI	Danksagung.....	154

II Zusammenfassung

Die Extrakorporale Photophorese (ECP) ist eine immunmodulatorische Therapie zur Behandlung von Patienten mit T-Zell vermittelten Erkrankungen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Während der ECP werden Leukozyten des peripheren Blutes durch Leukapherese separiert, mit einem Photoaktivator (8-MOP) inkubiert sowie mit UV-A-Licht bestrahlt und anschließend dem Patienten reinfundiert. Der klinische Nutzen für ECP-Patienten wurde bereits in der Literatur beschrieben, dennoch konnte der Wirkmechanismus der ECP-Behandlung noch nicht vollständig geklärt werden. Insbesondere ist in der Literatur die Funktion der Monozyten limitiert und kontrovers. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein *in vitro* ECP-Modell etabliert werden, anhand dessen der immunregulatorische Effekt ECP-behandelter Monozyten gesunder Spender auf co-kultivierte T-Zellen und die Monozyten selbst untersucht werden kann.

Bisherige Arbeiten haben bereits gezeigt, dass Dendritische Zellen (DCs) des Photophoreseprodukts von ECP-Patienten keine T-Zellproliferation induzieren können. Weitere Studien berichten von einer Verlagerung der Th1- und Th2-Immunantwort abhängig von der behandelten Indikation. Der immunmodulatorische Effekt ECP-behandelter Monozyten konnte in der hier vorliegenden Arbeit durch eine signifikante Abnahme der Proliferationsfähigkeit von co-kultivierten T-Zellen und signifikante Induktion proinflammatorischer Th1-Zellen, Th17-Th1-Zellen und IL-2+ T-Zellen gezeigt werden, während antiinflammatorische Th2-Zellen anteilmäßig unbeeinflusst blieben. Für diese Effekte war ein Zellkontakt zwischen T-Zellen und ECP-behandelten Monozyten notwendig.

Des Weiteren konnten CD14+ Monozyten in der vorliegenden Arbeit als wichtige Mediatoren der ECP-induzierten Effekte auf T-Zellen identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der CD14+ Zellen nach ECP nicht als alleinige Ursache der auf T-Zellen ausgeübten Effekte bestimmt werden kann. Vielmehr deutete der signifikante Anstieg der CD14+CD209-HLA-DR+CD86+ Monozyten und CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen auf eine Veränderung hinsichtlich des Aktivierungszustandes der *in vitro* ECP-behandelten Monozyten hin. Die in der Literatur beschriebene Induktion von DCs sowie eine Zunahme an myeloiden Suppressorzellen (Englisch: *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Zudem spielten durch ECP-induzierte Makrophagen des M2-Phänotyps keine Rolle für die Abnahme der T-Zellproliferation im *in vitro* ECP-Modell, sondern schienen vielmehr diese zu stimulieren.

Durch die Identifizierung von Kontrollstellen und Schlüsselgenen der Immunregulation sollte überprüft werden, wie die ECP-behandelten Monozyten die zuvor beschriebenen Effekte auf co-kultivierte T-Zellen ausüben können. Aus der Literatur ist bekannt, dass Interaktionen des immunmodulatorischen *Checkpoints* PD-L1 mit PD-1 einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁ Phase hervorrufen und PD-L2-PD-1 Interaktionen die T-Zellrezeptor vermittelte Proliferation inhibieren können. Während eine ECP-Behandlung von Monozyten in der vorliegenden Arbeit keine bzw. sehr geringe Anteile an PD-L2+ Monozyten bzw. T-Zellen induzierte, konnten verstärkt PD-L1+ Monozyten nach ECP nachgewiesen werden. Eine Blockade der PD-L1-PD-1 Achse führte zu einer nur teilweisen Wiederherstellung der T-Zellproliferation im *in vitro* ECP-Modell, was auf einen multifaktoriellen Wirkmechanismus der ECP hindeutet. Dabei konnteIDO als potentiell additiver Modulator der T-Zellproliferation bei ECP

identifiziert werden. Umfangreiche Transkriptomanalysen ECP-behandelter Monozyten mittels *Next-generation-sequencing* identifizierten in der vorliegenden Arbeit potentielle Gene für die Klärung offener Fragestellungen in Bezug auf den Mechanismus der ECP und zur Unterstützung der bisherigen Ergebnisse.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die Übereinstimmung des *in vitro* ECP-Modells mit *ex vivo* ECP-behandeltem Patientenmaterial und *in vitro* ECP-behandelte Monozyten von Patienten konnte hinsichtlich des Einflusses auf die Proliferationsfähigkeit und Zelltypenanteile von T-Zellen verifiziert werden.

Die ECP-Behandlung wird häufig als *second-line treatment* angewendet, wie beispielsweise bei GvHD-Patienten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) in *in vitro* ECP-behandelten Monozyten herunterreguliert ist, welches laut Literatur an der Entwicklung einer Glucocorticoidresistenz von GvHD-Patienten beteiligt sein kann.

Zur Verstärkung des immunregulatorischen Effekts der ECP können GvHD-Patienten mit Vitamin D3 behandelt werden. Eine *in vitro* Kombinationstherapie aus $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation und ECP der Monozyten führte zu einer signifikanten Abnahme der T-Zellproliferation, sowie zu einem niedrigeren Niveau an proinflammatorischen T-Zelltypen und einem leichten Anstieg an antiinflammatorischen Th2-Zellen im *in vitro* ECP-Modell.

Eine Untersuchung immunologischer Fragestellungen mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten *in vitro* ECP-Modells ermöglicht es unabhängig von möglichen Limitationen bei der Verwendung von Patientenmaterial, wie z.B. Diagnose der Erkrankung, Vorbehandlungen der Patienten und Zugang zu Patientenproben und ECP-Zentren, zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus der ECP beitragen zu können. Durch fortführende Analysen sowie eine Erweiterung des *in vitro* ECP-Modells um weitere Zelltypen, könnte zukünftig eine Optimierung der ECP für den klinischen Einsatz erfolgen.

1 Einleitung

1.1 Hintergrundinformationen aus der Immunologie

Die Immunologie ist die Lehre der Verteidigung des Körpers gegen Infektionen [1] und befasst sich mit dem Immunsystem, das sich in drei Immunantworten untergliedern lässt. Die angeborene Immunantwort ist die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene und daher unspezifisch aber schnell verfügbar. Die adaptive Immunantwort hingegen ist erworben und kann erst durch die Initiierung durch Zellen des angeborenen Immunsystems erfolgen. Sollte der Körper wiederholt mit einem Pathogen in Kontakt kommen, so kann eine adaptive Immunantwort für eine schnelle und spezifische Reaktion sorgen [2]. Für die protektive Immunantwort ist ein immunologisches Gedächtnis unausweichlich, die einen zum Teil lebenslangen Schutz vor einer Reinfektion mit einem bereits dem Immunsystem bekannten Pathogen liefern soll und sich aus der adaptiven Immunantwort entwickelt. Neben physischen Barrieren wie der Haut zählen auch Zytokine, Lysozyme oder bestimmte Zelltypen zur angeborenen Immunantwort. Während vornehmlich Zellen der myeloiden Linie wie Makrophagen, DCs und Mastzellen dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, gehört die lymphoide Linie größtenteils mit den Lymphozyten zur adaptiven Immunantwort [1]. NK-Zellen bilden dabei eine Ausnahme und werden auch der angeborenen Immunität zugeordnet. Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort sind die APCs, die eine Aktivierung der adaptiven Immunität erst ermöglichen. Nur das komplexe Zusammenspiel mehrerer Zelltypen ermöglicht eine ausreichende Verteidigung des Körpers gegen Infektionen. Für ein umfassendes Verständnis immunologischer Prozesse ist die genaue Kenntnis und Erforschung des Immunsystems erforderlich.

1.1.1 T-Zellproliferation

T-Lymphozyten werden im Thymus gebildet und sind wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort [1]. Es kann zwischen T-Helferzellen, die die Zellen des Immunsystems unterstützen, Pathogene zu beseitigen und den zytotoxischen T-Zellen unterschieden werden, die eine direkte zytotoxische Wirkung auf virusinfizierte und aberrante Zellen vermitteln. Alle T-Lymphozyten exprimieren T-Zellrezeptoren (TCRs), welche zusammen mit CD3 T-Zellrezeptorkomplexe ausbilden können. Um vollständig arbeiten zu können, benötigt das Immunsystem ein breites Spektrum an T-Zellrezeptoren [3], die unterschiedliche Spezifitäten gegen möglichst viele Pathogene besitzen und durch Genumordnung der TCR-Ketten erzielt werden.

Damit naive T-Zellen aktiviert und zur Differenzierung angeregt werden, benötigen sie drei, sukzessiv auftretende Signale (Abbildung 1). Das erste Signal ist antigen-spezifisch, welches durch die Bindung des T-Zellrezeptors an Antigene charakterisiert ist, die über Rezeptoren der MHC-Moleküle von APCs präsentiert werden [1]. Während CD4+ T-Zellen lediglich an durch APCs exprimierte MHC Klasse II Moleküle binden können, erkennen CD8+ T-Zellen nur Antigene, die auf MHC Klasse I Moleküle

präsentiert werden und auf fast allen kernhaltigen Zelltypen zu finden sind. Die Bindung der Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 ist dabei noch nicht ausreichend, um T-Zellen vollständig zur Proliferation und Differenzierung zu stimulieren. Das zweite Signal wird durch co-stimulatorische Signale vermittelt. Dieselben APCs, die bereits Signal 1 geliefert haben, stellen nun co-stimulatorische Rezeptoren wie beispielsweise die B7-Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) zur Verfügung. Diese binden an den CD28-Rezeptor auf T-Zellen und signalisieren dadurch Überleben und Proliferation der T-Zellen, die bereits Signal 1 erhalten haben.

Es gibt noch weitere co-stimulatorische Rezeptoren, die entweder zur CD28 oder TNF Rezeptor Familie gehören [1], wie z.B. die B7-Rezeptoren *inducible costimulator* (ICOS) und CTLA-4 bzw. CD27 und 4-1BB (CD137) [1]. Das letzte Signal, das in Form von durch APCs sekretierten Zytokinen an die T-Zellen weitergeleitet wird, ist für eine Differenzierung der T-Zellen in die verschiedenen Effektor T-Zellsubtypen notwendig. Nachdem T-Zellen aktiviert wurden, treten sie in die G1-Phase des Zellzyklus ein, um sehr schnell viele Vorläufer bereitzustellen, die anschließend zu Effektor T-Zellen differenzieren können. Wichtig für die Proliferation und Differenzierung ist das Zytokin IL-2, das von den aktivierten T-Zellen selbst produziert wird [1]. Des Weiteren wird die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) gebildet, der durch die Bindung von IL-2 die Aktivierung des mTOR Signalwegs vermittelt und die klonale Proliferation von T-Zellen induziert [4]. Ohne IL-2 ist ein Überleben der aktivierten T-Zellen nicht möglich.

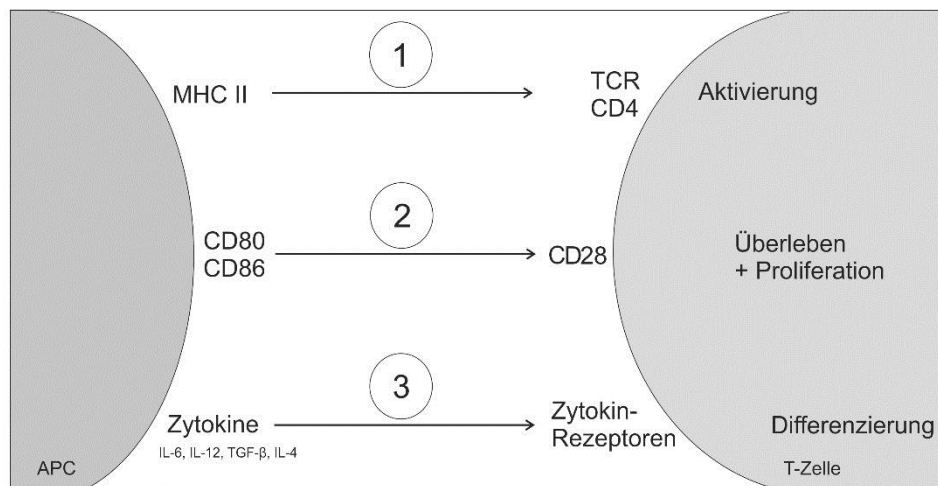


Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei Signale für die vollständige Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch APCs. Für die T-Zellaktivierung sind drei Signale notwendig, die durch APCs vermittelt werden. Signal 1 ist die Bindung von Antigenen an den TCR von T-Zellen, die über MHC Klasse II Moleküle durch APCs präsentiert werden. Eine vollständige Aktivierung wird noch nicht erreicht, obwohl der Co-Rezeptor (hier: CD4) gebunden ist. Durch die Bindung von CD80 und CD86 an den CD28 Rezeptor auf T-Zellen wird das co-stimulatorische zweite Signal vermittelt. Dadurch wird den T-Zellen Überleben und Proliferation ermöglicht. Das Entlassen der Zytokine und die anschließende Bindung an Zytokinrezeptoren stellt das dritte Signal dar, das die T-Zellen zu einer Differenzierung in Effektor T-Zellen befähigt. Abbildung verändert nach Snanoudj et al. [4].

1.1.2 CD4+ T-Zelltypen

T-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem und sind unter anderem an der B-Zellantwort wie auch der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz beteiligt [5]. Neben CD4+ Helfer-T-Zellen gibt es CD8+ zytotoxische T-Zellen. CD4+ T-Zellen sind T-Helferzellen, die eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunantwort übernehmen [6] und lassen sich wiederum in verschiedene T-Zellsubtypen einteilen, was an den für den entsprechenden T-Zelltyp produzierten Zytokinen festgelegt wird. Je nach Erkrankung spielen unterschiedliche T-Zelltypen eine wichtige Rolle. Zu ihren Aufgaben gehört die Unterstützung von B-Zellen bei der Antikörperproduktion, deren Klassenwechsel und Reifung, sowie der Rekrutierung von aktivierten CD8+ T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und anderen Effektorzellen [7].

Damit CD4+ T-Zellen in verschiedene Effektor T-Zelltypen differenzieren können, werden wie bereits zuvor beschrieben insgesamt drei Signale benötigt, wobei die Art der sekretierten Zytokine den T-Zelltyp bestimmt. Zu Beginn der T-Zellforschung wurden CD4+ T-Zellen abhängig von ihren produzierten Zytokinprofilen in zwei Haupttypen eingeteilt, die Typ 1 T-Helferzellen (Th1-Zellen) und die Typ 2 T-Helferzellen (Th2-Zellen) [8, 9]. In der Zwischenzeit wurde dieser „Th1-Th2 Paradigma“ [9] jedoch um eine Vielzahl an T-Zelltypen erweitert. Hierzu gehören Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Th22-Zellen, Tregs und folliculäre T-Zellen [10], die alle unterschiedliche Funktionen vermitteln und von denen einige im Folgenden genauer betrachtet werden.

Die Differenzierung von CD4+ T-Zellen in Th1-Zellen wird durch die Zytokine IFN γ und IL-12 vermittelt, die die Aktivierung der *signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4) und STAT1 und dadurch des Haupttranskriptionsfaktors der Th1-Zelldifferenzierung T-bet (*T-box expressed in T cells*) induzieren [11, 12]. Hauptsächlich produzieren Th1-Zellen IFN γ , welches für die Makrophagen-Aktivierung und Zell-vermittelte Immunität gegen intrazelluläre Pathogene wichtig ist [7, 8, 12] und proinflammatorische Immunreaktionen auslöst. Th1-Zellen spielen bei autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen wie Morbus Crohn und Multiple Sklerose eine pathogene Rolle [12, 13].

Th2-Zellen hingegen sekretieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, welche wichtig für die IgE Produktion durch B-Lymphozyten, die Rekrutierung von Eosinophilen und Beseitigung extrazellulärer Pathogene [7, 14] sowie eine antiinflammatorische T-Zellantwort sind. Insbesondere sind Th2-Zellen an allergischen Erkrankungen beteiligt [15]. Damit naive T-Zellen in Th2-Zellen differenzieren werden durch IL-4 die Transkriptionsfaktoren STAT6 und *GATA-binding protein 3* (GATA-3) aktiviert [16, 17]. Die Haupttranskriptionsfaktoren der Th1- und Th2-Zellen können sich gegenseitig supprimieren, wodurch im Laufe der Immunantwort ein T-Zelltyp dominiert [10].

Th17-Zellen werden früh bei der adaptiven Immunantwort induziert und helfen bei der Verteidigung gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze [1, 18]. Es handelt sich um einen verhältnismäßig neu klassifizierten T-Zelltyp, dessen Induktion 2006 durch die Zytokine TGF β und IL-6 beschrieben wurde [19-21]. Durch die Zytokine IL-6, IL-21 und IL-23 wird STAT3 aktiviert, welches wiederum die Expression IL-23R und IL-21 reguliert [22-24]. Erst durch die STAT3 abhängige Hochregulation des *retinoid-related orphan receptor γ* (ROR γ t), der die Expression von IL-17A und IL-17F induziert, sowie an der Bildung von IL-23R und Produktion von IL-22 beteiligt ist, ist die Th17-Differenzierung

vollständig. Th17-Zellen produzieren viele Zytokine, wie z.B. IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-21 [25, 26], die bei Entzündung und Autoimmunerkrankung von Bedeutung sein können, wie beispielsweise Multiple Sklerose [27], Rheumatoide Arthritis [28] oder Systemische Sklerose [29].

Regulatorische T-Zellen supprimieren Effektor T-Zellantworten und sind an der Eingrenzung der Immunantwort und der Vermeidung von Autoimmunantworten beteiligt [1]. Dabei unterscheidet man Tregs in natürliche, im Thymus gebildete (nTregs) und induzierte (iTregs) Tregs, die aus naiven CD4⁺-T-Zellen generiert werden [1, 30]. Für die Aufrechterhaltung der nTregs sind die Signale IL-2, TGF β und CD28 notwendig, wohingegen iTregs durch die Stimulation des TCR durch Antigene in Kombination mit immunsuppressiven Zytokinen oder durch die Aktivierung durch unreife DCs entstehen [31]. Allerdings sind nTregs *in vitro* anerg [31]. Im Rahmen der Suppression von Effektor T-Zellen produzieren Tregs Zytokine wie IL-10 [32] und IL-35 [33], bauen Zellwachstum förderndes IL-2 ab [34] und töten Zielzellen durch den Perforin-Granzym-Signalweg [35, 36]. Für eine phänotypische Charakterisierung der Tregs sind laut Literatur mindestens die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD25, CD127 und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor *forkhead box protein 3* (FoxP3) notwendig [37]. Mit einer Nachweisgrenze von etwa 1-2 % der Zellen im peripheren Blut sind Tregs allerdings sehr niedrig abundant. Insbesondere bei Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, psoriatische Arthritis oder Typ-1 Diabetes spielen Tregs eine wichtige Rolle [21].

1.1.3 Zelltypen der myeloiden Entwicklungslinie

Hämatopoetische Stammzellen entwickeln sich in zwei Typen von Stammzellen, die als Vorläufer der lymphoiden (T- und B-Zellen, NK-Zellen) oder der myeloiden (restliche Leukozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten) Linie dienen [1]. Zu den Leukozyten der myeloiden Linie gehören Monozyten, DCs, Neutrophile, Eosinophile und Basophile. Einige dieser Zellen werden nachfolgend genauer beschrieben.

Zu den mononukleären Phagozyten gehören Monozyten, Makrophagen und DCs. Monozyten zirkulieren nach ihrer Bildung aus Vorläuferzellen im Knochenmark einige Tage im Blut, bevor sie während einer Infektion ins Gewebe migrieren und zu Makrophagen differenzieren können [38-40]. Die Aufgaben der Monozyten sind sehr heterogen und liegen in der Homöostase, Verteidigung bei der Immunantwort und Gewebereparatur [38]. Monozyten werden über die Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16 charakterisiert, wobei humane Monozyten des Blutes in drei Subtypen eingeteilt werden können. Bei den Subtypen handelt es sich um die klassischen (CD14⁺⁺CD16⁻), die intermediären (CD14⁺⁺CD16⁺) und die nicht-klassischen (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten. Während einer Entzündungsreaktion produzieren Monozyten inflammatorische Zytokine, können Zellen sowie toxische Moleküle aufnehmen und dienen sowohl als Vorläufer von Makrophagen als auch von DCs [38, 40]. Eine genaue phänotypische Abgrenzung der Monozyten, DCs und Makrophagen ist dadurch erschwert, dass Monozyten aus dem Blut zu DCs differenzieren [41, 42] und DCs wiederum zu Makrophagen differenzieren können [43], wodurch die Expression vieler Oberflächenmarker nicht nur auf einen Zelltyp limitiert ist [38].

Makrophagen sind gewebeständig und an der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts bei der Homöostase beteiligt, in dem apoptotische Zellen entfernt und Wachstumsfaktoren nachproduziert werden [40]. Das bedeutet, dass Makrophagen in zwei Subtypen unterteilt werden. Während M2 Makrophagen Reparatur und Wachstum vermitteln, werden M1 Makrophagen mit Inhibition und Abtötung in Verbindung gebracht [44-46]. Makrophagen besitzen eine Vielzahl an *pathogen-recognition receptors* (PRRs), wodurch eine effiziente Phagozytose ermöglicht wird und die Zellen inflammatorische Zytokine produzieren [40, 47].

Bei den DCs unterscheidet man klassische DCs und plasmazytoide DCs. Die klassischen DCs sind in der Lage Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und anschließend zu präsentieren. In ihrem unreifen Status können DCs verstärkt phagozytieren, während sie in ihrer reifen Form insbesondere Zytokine produzieren [48, 49]. DCs können aus dem Gewebe migrieren und die T-Zellantwort sowohl im Gleichgewicht, als auch während einer Infektion regulieren [40]. Im Gegensatz zu den eher kurzlebigen klassischen DCs, sind die plasmazytoiden DCs langlebig und bei der Antwort auf Virusinfektionen durch Produktion von Typ-I-Interferonen, der Antigen-Präsentation und der Kontrolle von T-Zellantworten beteiligt [40, 50].

Ein weiterer Zelltyp der myeloiden Entwicklungslinie sind *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs). MDSCs können in drei Subtypen unterteilt werden, die monozytären (M-) MDSCs, die polymorphonukleären (PMN-) MDSCs und die MDSCs des frühen Stadiums. Für die Charakterisierung der MDSCs stehen verschiedene Oberflächenmarker wie CD14, HLA-DR, CD15 und CD66b zur Verfügung, die teilweise auch auf anderen Zelltypen exprimiert werden. Daher ist eine funktionelle Charakterisierung hinsichtlich der T-Zellsuppression notwendig, um MDSCs eindeutig bestimmen zu können [51]. MDSCs sind eine sehr niedrig abundante Zellpopulation, die erst bei Krankheitsbildern wie Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Krebs akkumulieren [52]. Die Entstehung der MDSCs wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits ist die Differenzierung aus einem myeloiden Vorläufer im Knochenmark zur unreifen myeloiden Zelle durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beschrieben [52, 53]. Unter pathologischen Bedingungen ist die Differenzierung der unreifen myeloiden Zelle zu Makrophagen, DCs und Granulozyten blockiert, die Zellen akkumulieren und NFκB sorgt für die Bildung immunsuppressiver MDSCs. Auf der anderen Seite steht die Theorie einer Reprogrammierung proinflammatorischer Monozyten zu immunsuppressiven MDSCs bei Entzündungen [53] durch die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren (TLRs). Ihre immunsuppressive Funktion können MDSCs durch eine Vielzahl von Mechanismen, abhängig vom Aktivierungsstatus der MDSCs und der vorliegenden Erkrankung, vermitteln [54]. In murinen Modellen spielen insbesondere die Enzyme Arginase 1 und induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (Englisch: *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), die reaktive Sauerstoffspezies (Englisch: *reactive oxygen species*, ROS) und die Induktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) eine wichtige Rolle [55]. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob humane MDSCs dieselben Mechanismen nutzen.

1.1.4 **Checkpoints der Immunregulation PD-L1, PD-L2, PD-1**

Im Immunsystem gibt es verschiedene Kontrollstellen, die eine Regulation der Immunantwort und die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz ermöglichen [56]. Eine Fehlregulation der Kontrollstellen kann schwerwiegende Folgen für die Immunantwort haben. Mit Hilfe von immunmodulatorischen Antikörpern als Inhibitoren der Kontrollstellen kann beispielsweise die Anti-Tumor Antwort im Körper hochreguliert werden [56]. Dabei stellen CTLA-4 und PD-1 die aktuell am häufigsten untersuchten Kontrollstellen dar, die mit Antikörpern adressiert werden. Die Therapie mit Immun-*Checkpoints* blockierenden Antikörpern wird mittlerweile bei der Therapie verschiedener Erkrankungen verwendet und hat ein akzeptables Toxizitätsprofil [56]. Dennoch kann die Entstehung immunvermittelter Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden, die für den Patient sehr gefährlich werden können. Daher ist weitere Forschung auf diesem Gebiet unerlässlich.

Ein Beispiel für einen anti-PD1 Antikörper ist Pembrolizumab, der 2014 für die Behandlung von Melanom-Patienten durch die FDA anerkannt [57] wurde. Pembrolizumab blockiert durch seine Bindung an PD-1 die Interaktion mit seinen Liganden PD-L1 bzw. PD-L2. Die co-stimulatorischen Proteine PD-L1 und PD-L2 gehören zur B7-Familie und werden auch B7-H1 (CD274) und B7-DC (CD273) genannt. Mitglieder der B7-Familie wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) können beispielsweise an den CD28 Rezeptor auf T-Zellen binden und dadurch Überleben und Proliferation vermitteln. Wird neben PD-1 auch der TCR gebunden, so wird ein negatives Signal an T-Zellen weitergeleitet, welches die Proliferation und Zytokinproduktion der Zellen beeinflusst [58-60].

Der Rezeptor PD-1 wird auf CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und aktivierten Monozyten exprimiert [59, 61-63] und wird durch Signalisierung über den TCR oder B-Zellrezeptor induziert, sowie durch TNF Stimulation verstärkt [64]. PD-L1 wird auf Makrophagen und Tumorzellen exprimiert [65], während PD-L2 meist von DCs exprimiert wird [66] und auf APCs beschränkt ist [59]. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass PD-L1-PD-1 Interaktionen einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁ Phase hervorrufen können, während PD-L2-PD-1 Interaktionen die T-Zellrezeptor vermittelte Proliferation inhibieren können [67]. Der genaue Einfluss von PD-L1 auf T-Zellen und APCs sowie PD-L2 auf Makrophagen und DCs ist noch nicht vollständig untersucht, obwohl die Interaktion mit PD-1 der negativen Regulation der T-Zellfunktion zugeordnet wird [60].

1.1.5 **Macrophage migration inhibitory factor (MIF)**

Ein wichtiger Vermittler inflammatorischer Antworten ist der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) [68]. MIF ist ein 12,5 kDa großes Zytokin und besitzt eine Vielzahl an Eigenschaften, die bei der Regulation von Immunantworten eine Rolle spielen [69]. Exprimiert wird MIF von vielen unterschiedlichen Zelltypen [68, 69] wie z.B. T-Zellen [70], Monozyten [71], Makrophagen [71], Endothelzellen [72] und Polymorphnukleären Neutrophilen (PMNs) [73]. Sowohl die große Vielzahl an MIF exprimierenden Zellen, als auch die umfassende Gewebeverteilung von MIF deuten auf das breite Wirkspektrum des Zytokins hin. Die Stimulation der MIF Expression erfolgt über verschiedene

Faktoren [68], wie die proinflammatorischen Moleküle TNF α und LPS [71], IL-5 [74], IFN γ [71] und TGF β [68], sowie über Komplementkomponente C5a [75] und TLR4 Stimulation [71].

Da MIF an einer Vielzahl an Signalwegen beteiligt ist, ist seine genaue Rolle noch nicht vollständig geklärt. Dennoch ist bereits bekannt, dass es sich bei CD74 [76] sowie CXCR2 und CXCR4 [77] um Rezeptoren von MIF handelt. Die Arbeitsgruppe um Calandra hat die verschiedenen molekularen Wirkweisen von MIF zusammengefasst [69], wobei MIF den ERK1/ERK2 Signalweg aktiviert [78], die TLR4 Expression hochreguliert [79, 80], die p53- [81] bzw. JAB1-Aktivität [82] supprimieren bzw. inhibieren kann. Nicht nur bei der Adhäsion und Migration von myeloiden Zellen, der Rekrutierung von Leukozyten sondern auch bei der Induktion von inflammatorischen Zytokinen scheint MIF eine wichtige Rolle zu spielen [68].

Bei Patienten mit steroidresistenter systemischer Lupus Erythematosus Erkrankung konnte gezeigt werden, dass die MIF Konzentration im Serum wie auch in PBMCs höher als in steroidsensitiven Patienten und Kontrollen ist [83]. Zudem ist MIF in der Pathogenese weiterer inflammatorischer Erkrankungen wie beispielsweise Rheumatoide Arthritis [84], Systemische Sklerose [85], Psoriasis [86] und Morbus Crohn [87] involviert. Besonders interessant für die Klinik ist die Interaktion von MIF und Glucocorticoiden, da MIF eine Rolle bei der Entwicklung einer Glucocorticoidresistenz von Sepsispatienten zu spielen scheint [88]. Durch schon sehr geringe Mengen an Glucocorticoiden wird das Zytokin MIF hochreguliert und kann anschließend nach Freisetzung inhibitorisch auf die Glucocorticoidaktivität wirken. MIF kann dabei die Inhibition der Zytokinsekretion von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen aufheben, die durch Glucocorticoide vermittelt wird [68, 70, 89].

1.1.6 Vitamin D3

Die aktive Form des Vitamin D3 ist das Steroidhormon 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH) $_2$ D3) oder auch Calcitriol [90], welches durch die Hydroxylierung der Speicherform 25OHD3 in der Niere [91, 92] oder in Immunzellen entsteht [93]. Der Vitamin D Rezeptor (VDR) ist in der Lage, das im Blut zirkulierende 1,25-(OH) $_2$ D3 zu binden und wird auf kernhaltigen Immunzellen wie beispielsweise Monozyten und aktivierten Lymphozyten exprimiert [94, 95]. Innerhalb der VDR-Bindedomäne wird eine Bindetasche für 1,25-(OH) $_2$ D3 ausgebildet, die eine hohe Affinität und Spezifität besitzt [96, 97]. Nachdem der Ligand 1,25-(OH) $_2$ D3 an den VDR gebunden hat bildet sich ein Komplex, mit Hilfe dessen eine Vielzahl an Genen durch 1,25-(OH) $_2$ D3 als Transkriptionsfaktor reguliert und regulatorische Co-Faktoren und Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutiert werden [96, 98, 99]. Dabei vermittelt 1,25-(OH) $_2$ D3 seine immunmodulatorische Funktion insbesondere durch die Regulation der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose [100].

Vitamin D spielt nicht nur bei der Knochenbildung eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Hämatopoese. Dadurch zeigt sich das Potential von Vitamin D, in der angeborenen und der adaptiven Immunantwort entscheidende Effekte auszulösen [96]. So kann eine Stimulation von Monozyten mit 1,25-(OH) $_2$ D3 zu einer beschleunigten Differenzierung in Makrophagen führen [101]. Eine Stimulation von CD4+ T-Zellen mit 1,25-(OH) $_2$ D3 hingegen verursacht eine erhöhte Produktion von IL-4, IL-5 und

IL-10, wodurch die Th2-Zellentwicklung gefördert wird [102] bei gleichzeitiger Inhibition der Th1-Antwort durch Reduktion der IFN γ und IL-12 Produktion [103].

Vitamin D findet aufgrund seiner immunregulatorischen Funktion Anwendung bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen. Der Zusammenhang zwischen Vitamin D Mangel und Grad der Erkrankung konnte bereits für viele inflammatorische Erkrankungen hergestellt werden. So erkrankten beispielsweise Patienten mit einem Mangel an 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ vor HCT verstärkt an cGvHD und verstarben häufiger [104, 105]. Hervorzuheben ist bei einer Medikation mit Vitamin D insbesondere der 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ vermittelte Effekt auf Th17-Zellen, der die IL-17 Produktion von CD4 $^+$ T-Lymphozyten durch Inhibition der Proliferation und Entwicklung von Th17-Zellen [106, 107] reduziert. Des Weiteren konnte durch die zusätzliche Behandlung mit 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ bei Corticosteroid-Therapien eine Unterstützung des immunsuppressiven Effekts nachgewiesen werden, der durch eine Abnahme der T-Zellproliferation und Th1-Zytokinantwort bedingt ist [108]. Eine weitere Kombinationstherapie findet sich bei einer PUVA Behandlung von Psoriasis Patienten, die ein synthetisches Analogon zu Vitamin D $_3$, das Tacalcitol (1,24-dihydroxyvitamin D $_3$), zur äußerlichen Anwendung erhalten und eine deutliche Verbesserung des therapeutischen Effekts im Vergleich zu einer PUVA-Monotherapie erfahren [109].

1.2 Grundlagen der Extracorporalen Photophorese

Bei der Extracorporalen Photophorese (ECP) handelt es sich um eine immunmodulatorische Therapiestrategie zur Behandlung von Patienten mit u.a. T-Zell vermittelten Erkrankungen, wie beispielsweise dem kutanen T-Zelllymphom [110-112], Sézary Syndrom [113], der Spender-gegen-Empfänger Reaktion (Englisch: *graft-versus-host disease* (GvHD)) [114-116] und verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Systemische Sklerose [117, 118]. Die ECP setzt sich aus den drei Schritten Leukapherese, Photoaktivierung und Reinfusion zusammen [119], wodurch nur die aus dem Blut separierten Leukozyten behandelt werden. Obwohl in der Literatur bereits ein positiver Effekt der ECP-Behandlung auf die unterschiedlichen Krankheitsbilder der Patienten beschrieben wurde, ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Um einen detaillierteren Einblick in die klinische Bedeutung der ECP-Therapie geben zu können, sind daher weitere *ex vivo* aber insbesondere auch *in vitro* Studien unabdingbar.

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die ECP wurde 1986 von Edelson als zelluläre Therapie zur Behandlung des kutanen T-Zelllymphoms (Englisch: *cutaneous T-cell lymphoma*, CTCL) entwickelt [110, 120]. Bei der CTCL proliferieren maligne T-Zellen der Haut, die sich klonal vermehren. Zum damaligen Stand der Forschung war die

CTCL ein geeignetes Krebszellmodell, mit Hilfe dessen neue Immuntherapien etabliert werden konnten [121]. Bereits 1982 konnte Edelson an einem seiner CTCL-Patienten eine Immunisierung gegen und Beseitigung von malignen T-Zellen beschreiben, die durch ECP-Behandlung hervorgerufen wurde [121]. Der Methode zugrunde lag in den 1980er Jahren die Idee der T-Zell Vakzinierung, die die Arbeitsgruppe um Cohen eingeführt hat [122, 123]. Bei der T-Zell Vakzinierung wurden autoreaktive T-Zellen von Ratten im Rahmen einer experimentellen Autoimmunerkrankung *ex vivo* mit Antigen stimuliert, bestrahlt, hydrostatischem Druck ausgesetzt und anschließend mit Glutaraldehyd behandelt [123]. Die Zellen wurden daraufhin zur Impfung der Ratten verwendet und es konnte die Entstehung einer Autoimmunerkrankung verhindert werden [122]. Mit der Entdeckung, dass eine Isolation von T-Zellen bei der Therapie nicht weiter erforderlich ist [124, 125], eröffneten sich neue Möglichkeiten und die Entwicklung der Leukapherese wurde weiter vorangetrieben. Bis heute hat sich das Prinzip auf dem das ECP-System basiert nicht wesentlich verändert. Allerdings wurde erkannt, dass die orale Gabe des Photoaktivators 8-Methoxypsoralen (8-MOP) während der Behandlung mit Psoralen plus Ultraviolettlicht des langwelligen Bereichs A (PUVA) zu Nebenwirkungen und nicht einheitlichen Blutwerten bei den Patienten führte. Die PUVA-Behandlung ist eine Photochemotherapie aus 8-MOP und UV-A-Bestrahlung. Durch die Fähigkeit 8-MOP in flüssiger Form herzustellen und die Option dieses direkt in den Leukapheresebeutel zu injizieren [123, 126], hat seit 1993 ein Wandel weg von der oralen Gabe des 8-MOP stattgefunden.

1988 wurde die ECP von der *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* für die Behandlung von CTCL genehmigt. 12 Jahre später wurde eine Erweiterung um die sterile und flüssige Rezeptur des 8-MOP (UVADEX®) für den extrakorporalen Einsatz durchgeführt [123].

Seit dieser Zeit wird das Indikationsspektrum der ECP stetig erweitert und umfasst beispielsweise die Behandlung von Patienten mit Steroid-resistenter GvHD oder von Patienten mit Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation. Im Laufe der Zeit haben sich bedeutende Eigenschaften identifizieren lassen, die die ECP immunologisch so besonders machen und laut Edelson (1) die immunstimulatorische Rolle der ECP bei Krebs sowie die immunmodulatorische Wirkung nach Transplantation, (2) das förderliche Sicherheitsprofil bei der Anwendung der Therapie, (3) die Induktion von Antigen-präsentierenden Zellen (Englisch: *antigen presenting cells*, APCs) im großen Maßstab, (4) die bemerkenswerte Spezifität gegenüber pathogenen T-Zellen, (5) die Fähigkeit behandelte Leukozyten zu beseitigen und zu modifizieren und (6) der Zuwachs an klinischer Erfahrung sind [121]. Die fortwährende Forschung für ein detaillierteres Verständnis der Wirkweise der ECP rief im Laufe der Zeit neue Fragen und Herausforderungen zu Tage, die bis heute Bestandteil der Forschung sind.

1.2.2 Die Methode

Die ECP-Behandlung besteht aus drei Schritten: Leukapherese, Photoaktivierung und Reinfusion [119]. In der ersten Phase werden Leukozyten des peripheren Blutes durch Leukapherese separiert, um Plasma und Erythrozyten von den Leukozyten zu trennen (Abbildung 2).

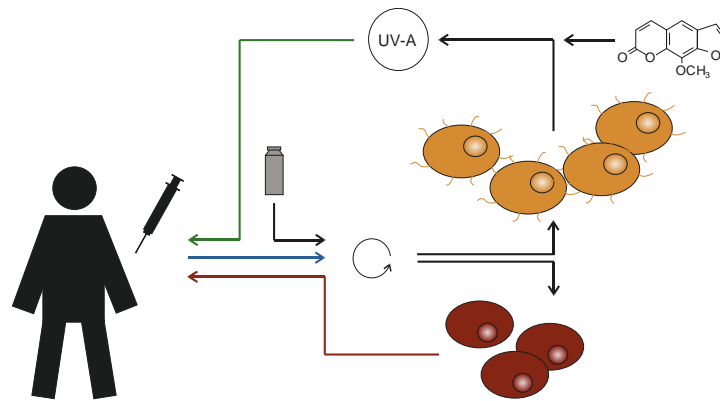


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ex vivo ECP-Behandlung. Leukozyten des heparinisierten, peripheren Blutes werden durch Leukapherese separiert (blauer Pfeil). Erythrozyten und Plasma werden dem Patienten sofort reinfundiert (roter Pfeil), während die Leukozyten ex vivo mit dem Photoaktivator 8-MOP behandelt und mit UV-A-Licht bestrahlt werden. Anschließend werden auch diese behandelten Zellen demselben Patienten reinfundiert (grüner Pfeil). (Grafik verändert nach Trautinger *et al.*, 2013 [123].)

Abhängig vom verwendeten ECP-Apparat sind für die Gewinnung einer für die Therapie ausreichenden Zellzahl aus dem Blut mehrere Sammelzyklen notwendig. Nach jedem Sammelzyklus werden Erythrozyten und Plasma dem Patienten reinfundiert. Die durch Zentrifugation abgetrennten Leukozyten hingegen werden anschließend ex vivo mit dem Photoaktivator 8-MOP versetzt. Bei 8-MOP handelt es sich um ein Furocumarin, welches in biologisch inaktiver Form vorliegt bis eine Photoaktivierung erfolgt. Diese Aktivierung erfolgt mit Hilfe von UV-A-Licht, was eine kovalente Bindung von 8-MOP an Pyrimidinbasen der DNA, Zelloberflächenmoleküle und zytoplasmatische Komponenten [127, 128] und Quervernetzungen der DNA-Stränge sowie zellulärer Proteine verursacht [119]. Dabei ist die Zahl der entstehenden Querverbindungen proportional zur verwendeten 8-MOP-Konzentration und UV-A-Dosis [129]. Aufgrund der niedrigeren Energie des UV-A-Lichts (Wellenlänge 320-400 nm) im Vergleich zum UV-B-Licht (Wellenlänge 280-320 nm) reduziert sich die schädigende Wirkung der Bestrahlung auf die Zellen und deren Letalität erheblich. Nach der UV-A-Bestrahlung zerfällt 8-MOP innerhalb sehr kurzer Zeit in seine inaktive Form und kann dadurch keine Quervernetzungen mehr induzieren [130]. Da die behandelten Zellen nun ebenfalls dem Patienten reinfundiert werden, können keine Schädigungen der Organe oder bislang unbehandelter Zellen verursacht werden. Die behandelten Zellen hingegen werden innerhalb der nächsten 24 bis 48 Stunden apoptotisch [131, 132], wobei der Höhepunkt nach drei Tagen erreicht ist [120]. Zudem werden weitere Effekte auf die verschiedenen Zelltypen bewirkt, die nachfolgend dargestellt werden. Die ECP-Behandlung wird in der Literatur meist von einer PUVA-Behandlung abgegrenzt, die in der Regel durch orale Gabe von 8-MOP oder einem Bad der Patienten oder der betroffenen Körperstellen im verdünnten Photoaktivator und anschließender UV-A-Bestrahlung charakterisiert wird.

1.2.3 Anforderungen und Limitationen

Bei der ECP-Therapie gibt es mehrere Anforderungen im Hinblick auf die technischen Voraussetzungen und praktischen Umsetzungen der Behandlung, die stets individuell berücksichtigt werden müssen.

Für die Durchführung der ECP gibt es verschiedene Geräte, wobei für Systeme mit einer diskontinuierlichen Aphaese nur ein einziger venöser Zugang benötigt wird [119], wie zum Beispiel im Fall des UVAR-XTS™ Systems (Therakos, Inc.). Im Gegensatz dazu, können manche Systeme wie das CELLEX™ System auch im kontinuierlichen Modus verwendet werden, welches mittlerweile das UVAR-XTS™ Instrument (Therakos, Inc.) in vielen Fällen abgelöst hat [116, 119].

Bei jeder der drei Phasen der ECP (Leukapherese, Photoaktivierung und Reinfusion) gibt es ebenfalls Besonderheiten zu beachten. Die Dauer der Leukapherese sollte bis zu drei Stunden betragen und ist abhängig von der Fließgeschwindigkeit des Blutes, die wiederum durch den Typ des venösen Zugangs, wie auch die Hämodynamik der Patienten bestimmt wird. Insgesamt werden nur 5-10 % der zirkulierenden Zellen des peripheren Blutes (Englisch: *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) gesammelt und dadurch in die Behandlung involviert, wodurch laut Literatur die Beseitigung reaktiver T-Zellen alleine nicht zu einem für die Patienten positiv wirkenden Effekt der ECP führen kann [119, 133-135], welcher durch eine Verbesserung der Erkrankung und eine erfolgreiche Therapie definiert werden kann. Bei der Photoaktivierung hängt die Dauer der Inkubation mit 8-MOP, sowie der Bestrahlung von verschiedenen Faktoren wie dem Volumen des Leukozytensammelbeutels oder dem Hämatokritwert der Suspension ab. Daher kann diese Phase unterschiedlich lang sein und wird vom Instrument entsprechend von Formeln berechnet, die das Blutvolumen und den Hämatokrit-Wert berücksichtigen. Unbedingt muss sichergestellt werden, dass das Volumen für die ECP maximal 15 % des Gesamtblutvolumens des Patienten entspricht [119], was ein individuelles Modifizieren des ECP Protokolls notwendig macht. Zudem sollte eine Lipämie mit Hilfe einer empfohlenen, fettarmen Diät der Patienten verhindert werden, damit das Leukaphereseprodukt vom Plasma optimal differenziert werden kann [119]. Zur Verhinderung der Agglutination der Zellen im Sammelbeutel wird in der Regel Heparin verwendet, welches jedoch bei einer Kontraindikation auch durch Acid-Citrat-Dextrose (ACD) ersetzt werden kann [136].

Neben den bereits beschriebenen Anforderungen zeigt die ECP-Behandlung auch Limitationen, die bei einem Einsatz zur Therapie berücksichtigt werden müssen. Als Kontraindikationen, die eine ECP-Therapie ausschließen, gelten eine Sensitivität gegenüber Psoralen oder eine Photosensitivität, eine geringe Thrombozytenzahl (z.B. $< 20 \times 10^9$ pro Liter) [116] und Gerinnungsstörungen, Schwangerschaft oder wenn der Volumenverlust des Blutes nicht gut toleriert werden kann. Anpassungen am ECP-Protokoll müssen vorgenommen werden, wenn das Körpergewicht der Patienten unter 40 kg liegt. Da ein geschlossenes System wie das CELLEX™ System kürzere Behandlungszeiten von bis zu 1,5 Stunden und die Behandlung von Patienten mit geringerem Körpergewicht ermöglicht [116], ersetzt es daher in vielen Behandlungssituationen das UVAR-XTS™ System und findet damit auch Einsatz in der Pädiatrie [137]. Da sich 8-MOP nicht nur in den Aphaesebeutel injizieren lässt sondern auch oral in Form von Tabletten für eine PUVA-Behandlung eingenommen werden kann [138], muss bei oraler Gabe der Serumspiegel beobachtet werden, da

hierdurch verstärkt Konzentrationsschwankungen auftreten können [139-141]. Bei einer ECP-Behandlung wird es bevorzugt, wenn Patienten die Therapie in der Klinik unter Beobachtung erhalten. Der Zugang zu einem ECP-System ist jedoch nicht zwangsweise uneingeschränkt vorhanden. Weltweit gibt es laut Literatur ECP-Zentren an über 200 Adressen [137] und eine Erweiterung der Zugänglichkeit könnte einer Vielzahl an Patienten helfen. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass die ECP eine teure sowie zeitaufwendige Behandlungsmethode [142] ist und nicht alle Patienten, wie beispielsweise bei der Behandlung einer GvHD, auf die Therapie ansprechen [143, 144].

1.2.4 Vorteile und Nebenwirkungen

Die ECP-Behandlung stellt eine sichere Alternative zu anderen Therapien dar v. a. im Vergleich zu einer Behandlung mit Coticosteroiden von beispielsweise GvHD-Patienten und anderen immunsuppressiven Medikamenten [119]. Durch die immunmodulatorische Wirkweise der ECP wird das Immunsystem der Patienten nicht vollständig unterdrückt, wie beim Einsatz von Immunsuppressiva, sondern vielmehr wird eine Immuntoleranz verstärkt [145, 146]. Insbesondere bei der Behandlung von GvHD werden Corticosteroide eingesetzt, zu deren Nebenwirkungen ein Infektionsrisiko, Hyperglykämie, Psychosen und Myopathie gehören [130]. Daher wäre es ideal die ECP so früh wie möglich nach der Indikation einzusetzen, um Nebenwirkungen teilweise verhindern zu können. Allerdings wird die ECP meist als *second-line* Therapie angewendet, wenn die zuvor getesteten Therapien keinen Erfolg haben.

Zu den typischen Nebenwirkung nach einer oralen Verabreichung von 8-MOP für eine PUVA Behandlung gehören Übelkeit, Fieber, Kopfschmerzen, Juckreiz und Diarrhö und um diese Nebenwirkungen zu vermeiden, wird 8-MOP direkt in den Leukapherese-Sammelbeutel injiziert [126, 147]. Außerdem werden Temperaturanstiege und eine gesteigerte Erythembildung beobachtet [110], seltener niedriger Blutdruck [148-150], Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Hypervolämie und Kopfschmerzen [151] und milde Abdominalschmerzen [151, 152]. Ebenfalls selten treten signifikante Reaktionen wie Infektionen durch Dauerkatheter [116] (weniger als 5 % der Patienten [153]) auf. Auch Thrombosen am Katheter sind sehr selten [154, 155]. Mutagene Effekte auf die Haut und daher eine Karzinogenese konnten bisher bei PUVA-Therapie von Psoriasis-Patienten beobachtet werden [156].

1.2.5 Kombinationstherapie

Während die ECP bei der Behandlung der erythrodermischen Mycosis fungoides und dem Sézary Syndrom als *first-line* Therapie eingesetzt wird [5, 157, 158], ist die ECP meist *second-line* Therapie, wenn die zuvor angewandten Methoden keinen Erfolg erzielen konnten oder zu einer Resistenz gegenüber spezifischen Medikamenten geführt haben, wie beispielsweise bei GvHD-Patienten. Daher sollten kombinatorische Effekte berücksichtigt werden, die die ECP mit vorab bzw. simultan angewandten Therapien hat. Beispielsweise wird bei einer Kombinationstherapie die aus ECP,

Interferon- α , PUVA und topischen Corticosteroiden [159] besteht, eine erhöhte Ansprechrate der Patienten bei der Behandlung des Sézary Syndroms verzeichnet.

Wie bereits erwähnt wird die ECP auch zur Behandlung von beispielsweise CTCL-Patienten oder einer auftretenden Steroid-resistenten GvHD-Erkrankung nach Stammzelltransplantation angewandt. Für die Aufrechterhaltung des Spender-gegen-Leukämie (Englisch: *graft-versus-leukemia*, GvL) Effekts bei einer immunsuppressiven GvHD-Behandlung kann sowohl eine Vakzinierung mittels Krebs-spezifischen oder Krebs-assoziierten Antigenen [160] sowie mit Antigen-beladenen Dendritischen Zellen (DCs) eingesetzt werden [161]. In Kombination mit einer ECP-Therapie könnte eine Veränderung der Antigen-präsentierenden DCs oder eine Induktion von Krebs-spezifischen T-Zellen hervorgerufen werden [152], wodurch potentiell der GvL-Effekt reduziert werden könnte. Des Weiteren gibt es Antikörpertherapien, die sich gegen Krebs-assoziierte Antigene richten und durch Natürliche Killer (NK) -Zellen bzw. Komplement System-Aktivierung zu einer Beseitigung der malignen Zellen führen kann [162]. Eine Antikörper-vermittelte Blockade der T-Zell Signalisierung über das *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4) oder die *programmed death ligands* (PD-Ls) könnte allerdings im Rahmen der GvHD-Behandlung zu einer gesteigerten Reaktivität gegenüber dem eigenen Körper führen [152].

Für die genaue Untersuchung der Kombinationstherapien der ECP mit verschiedenen immuntherapeutischen Strategien müssen zukünftig weitere Studien erfolgen.

1.3 Aktueller Stand der ECP Forschung

Seit den 1980er Jahren wurden im Forschungsgebiet der ECP große Fortschritte gemacht. Arbeitsgruppen weltweit widmen sich der Frage, welche Effekte die ECP bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen bewirkt. Trotz der übereinstimmenden Aussage, dass es sich bei der ECP um eine immunmodulatorische Therapie handelt, konnte der genaue Wirkmechanismus bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden, wodurch eine Optimierung der Therapieeffizienz erschwert wird [156]. Ein eindeutiger Vergleich einzelner ECP-Studien wird dadurch beeinflusst, dass diese häufig nur wenige Patienten umfassen und meist retrospektiv ausgewertet werden [151, 163]. Es bestehen ebenfalls große Unterschiede bei der Beurteilung der Indikation bzw. der Ansprechrate nach ECP, der Therapiedauer und Behandlungspläne oder den Therapie begleitenden Immunsuppressiva [163]. Somit sind generalisierte Aussagen über die Erfolgsraten der ECP nur schwer möglich.

1.3.1 Wirkmechanismus der ECP

In der Literatur wurde bereits mit Hilfe verschiedener Studien versucht, den Wirkmechanismus der ECP aufzuklären. Dabei ist zu beachten, dass insbesondere das Wissen aus *in vitro* durchgeführten

Studien, sowohl unter Verwendung von Zellen gesunder Spender als auch von Patienten, sehr limitiert ist. Die meisten Studien befassen sich mit *ex vivo* ECP-Behandlungen von Patienten mit unterschiedlichsten Vorerkrankungen und der daraufhin folgenden Isolation von Zellen aus dem ECP-Produkt. Andere Studien konzentrieren sich vermehrt auf eine retrospektive Auswertung der in der Klinik erhobenen Daten. Daher ist eine generalisierte Aussage über den Wirkmechanismus nur schwer zu treffen. Zudem handelt es sich bei der ECP um eine multifaktoriell wirkende Therapie. Einige der in der Literatur beschriebenen, ECP-induzierten Effekte sind daher im Folgenden dargestellt.

1.3.1.1 Apoptose und Zytotoxizität

Durch die ECP-Behandlung gehen T-Lymphozyten innerhalb von 24 bis 48 Stunden verstärkt in Apoptose [132] mit einer maximalen Rate nach drei Tagen [120]. Die Quervernetzung der DNA-Stränge während der ECP führt zu einer Zytotoxizität, die zu Beginn für den kurativen Effekt bei der Behandlung von CTCL-Patienten verantwortlich gemacht wurde, da sowohl gesunde als auch maligne T-Zellen in Apoptose gehen [164]. Durch monoklonale Antikörper mit Spezifität für DNA-Photoaddukte [165] konnte die Gruppe um Edelson nachweisen, dass drei dieser Quervernetzungen pro einer Millionen DNA Basenpaare zur Apoptose der Lymphozyten führen, während ebenfalls behandelte Monozyten davon unbeeinflusst blieben [121, 166]. Der Literatur zur Folge, sind alloreaktive T-Lymphozyten sensitiver gegenüber der ECP [167]. Insgesamt werden jedoch nur 5-10 % der gesamten PBMCs durch die Behandlung beeinflusst, wodurch die Beseitigung reaktiver T-Zellen alleine nicht zu einem für die Patienten positiv wirkenden Effekt durch die ECP führen kann [119, 133-135].

Der Einfluss der ECP auf Monozyten hinsichtlich Induktion bzw. Resistenz gegenüber Apoptose ist in der Literatur kontrovers diskutiert [127, 168, 169] und unterscheidet sich zudem auch noch in der Angabe der Dauer des Effekts. Hannani *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass ein Tag nach ECP-Behandlung nur 20 % der Monozyten in Apoptose gegangen waren, während an Tag 6 nach ECP bereits 80 % der Zellen apoptotisch sind [167]. Innerhalb dieses Zeitraumes sollen Monozyten ihre Funktionen wie die Befähigung zur Endozytose und T-Zellstimulation beibehalten.

Neben Lymphozyten und Monozyten werden auch B-, NK-Zellen und Natürliche Killer T (NKT)-Zellen von der ECP beeinflusst und überleben die Behandlung nicht [170]. Des Weiteren gehen unreife DCs (Englisch: *immature DCs*, iDCs) innerhalb von drei Tagen in Apoptose [171]. Frühapoptotische Zellen mit einer intakten Zellmembran werden von DCs phagozytiert und sorgen für eine tolerogene Immunantwort, wohingegen spätapoptotische Zellen gleichsam wie nekrotische und tote Zellen Immunität und Entzündungsreaktionen hervorrufen [120, 172].

1.3.1.2 Reifung von Monozyten zu DCs und Induktion tolerogener DCs

Das Schicksal von Monozyten während der ECP-Behandlung ist nicht nur auf eine kontroverse Rolle bei der Induktion von bzw. Resistenz gegenüber Apoptose limitiert. Vielmehr führt die ECP zu einer

Differenzierung von Monozyten zu DCs [121, 173], unabhängig von den Zytokinkonzentrationen, die normalerweise für eine *in vitro* Generierung von DCs notwendig sind. Kunststoffoberfläche und Scherkräfte des ECP-Apparats unterstützen dabei noch die DC-Reifung [174]. Die durch ECP aus Monozyten generierten DCs entsprechen funktional DCs, die selbst ECP-behandelt wurden [5].

Es kann zwischen iDCs und reifen DCs (Englisch: *mature DCs*, mDCs) unterschieden werden, die im Rahmen der ECP durch unterschiedlich lange Bestrahlung der Monozyten induziert werden. Es entstehen reife, immunstimulierende DCs bei einer kurzen und unreife, Toleranz induzierende DCs durch eine lange Bestrahlungsdauer [121, 175].

DCs gehören zu den potentesten APCs und sind dabei effizienter als Monozyten, Makrophagen und B-Zellen [120]. Im unreifen Zustand exprimieren DCs nur wenig co-stimulatorische und Haupthistokompatibilitätsantigene (Englisch: *major histocompatibility antigen*, MHC), wodurch T-Zellen nur schlecht stimuliert werden. Allerdings besitzen sie eine hohe endozytotische Aktivität. Reife DCs hingegen sind sehr gut zur T-Zellstimulation befähigt, da die Expression der co-stimulatorischen und MHC-Moleküle gesteigert ist. Zudem können reife DCs immunmodulatorische Zytokine produzieren, CCR7 exprimieren und zu sekundären lymphoiden Organen migrieren [176]. Außerdem können abhängig vom Reifestatus der DCs T-Zellantworten hoch- oder herunterreguliert werden.

Die Arbeitsgruppe um Spisek *et al.* konnte zeigen, dass eine ECP-Behandlung zu einem unreifen Phänotyp der DCs führt, der resistent gegenüber Apoptose ist [176] und eine verstärkte phagozytische Kapazität besitzt. Zudem wurde in derselben Studie beobachtet, dass DCs nach ECP hohe Mengen Interleukin (IL)-10 produzieren, welches ebenso wie die Aufnahme von apoptotischen Zellen nach der ECP-Behandlung die Induktion tolerogener DCs fördern kann [130, 177]. Die unreifen DCs sind dennoch in der Lage auf inflammatorische Signale zu reagieren und die Reifung ist nicht ausgeschlossen, wodurch die T-Zellproliferation nach Antigen-Präsentation stimuliert werden kann [5]. Die Besonderheit der ECP liegt somit darin, dass die Behandlung einen unreifen, Toleranz-vermittelnden DC-Typ generiert, während das Immunsystem nach wie vor auf Infektionen reagieren kann [5].

Durch ECP Therapie von Patienten mit chronischer GvHD (cGvHD) konnte eine Verschiebung der dominierenden myeloiden DCs vor Behandlung hin zu plasmazytoiden DCs beobachtet werden [178], die über die Sekretion von Typ I Interferon als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dienen. Plasmazytoide DCs können Toleranz und T-Zell Anergie vermitteln, aber auch die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen fördern [179-182], welche nach ECP-Behandlung durch plasmazytoide DCs verstärkt induziert wird [181]. Durch die Induktion von CD4+CD25+ Tregs können DCs immunologische Toleranz vermitteln [183-185], wobei insbesondere Zytokine eine wichtige Rolle zu spielen scheinen [186]. Einen immunmodulatorischen Effekt vermitteln DCs über die Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch Antigen-Präsentation von apoptotischem Material [174, 187].

1.3.1.3 Induktion regulatorischer T-Zellen

Obwohl T-Lymphozyten durch die ECP in Apoptose gehen wurde in der Literatur beschrieben, dass CD4+CD25+FoxP3+ Tregs im Blut nach ECP anteilmäßig zunahmten und ihre suppressive Funktion

gesteigert werden konnte [188]. Auch in ECP-behandelten GvHD-Patienten konnte eine signifikante Zunahme der Tregs beschrieben werden [189].

Tregs bilden eine heterogene Gruppe von T-Zellen, die aktiv eine Immunantwort inhibieren können. Über die Antigen-abhängige Aktivierung ihres T-Zellrezeptors (Englisch: *T cell receptor*, TCR) können Tregs die Proliferation von T-Zellen supprimieren [120]. Hierbei spielen wiederum DCs eine bedeutende Rolle, die durch die Präsentation der Antigene für eine Verstärkung des tolerogenen Signals mittels Aktivierung von Tregs sorgen.

1.3.1.4 Einfluss auf CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen

Im Zusammenhang mit der ECP können in der Literatur kontroverse Aussagen hinsichtlich des Verhältnisses anti- und proinflammatorischer CD4+ T-Zelltypen gefunden werden. Es konnte sowohl eine Verschiebung des vorherrschenden T-Zelltyps im Falle einer Behandlung von GvHD Patienten zu den antiinflammatorisch wirkenden Th2-Zellen oder zu den proinflammatorischen Th1-Zellen bei CTCL-Therapie beschrieben werden [178, 190].

Auch bei der Analyse der CD8+ T-Zellen konnte sowohl eine Stimulation der CD8 T-Zellantwort im Rahmen der CTCL Behandlung durch ECP, als auch eine Suppression der kontraproduktiven CD8 T-Zellantwort nach Transplantation, beobachtet werden [121]. Die Beteiligung von DCs an diesem ambivalenten Effekt der ECP konnte erst später geklärt werden und wird als Vakzinierungstheorie oder Transimmunisierung bezeichnet [174]. Durch ECP werden Monozyten zu APCs konvertiert und sind Antigen-abhängig hoch- oder herunterreguliert [121]. Die APCs sind wiederum in der Lage, apoptotisches Material zu phagozytieren und Antigene den CD8+ T-Zellen zu präsentieren [174].

1.3.1.5 Neutrophile Granulozyten

Eine Überprüfung der Rolle der neutrophilen Granulozyten in der ECP-Therapie von GvHD-Patienten zeigte, dass diese die Mehrheit der behandelten Zellen bildeten und verstärkt in Apoptose eintreten [191]. Des Weiteren wird Franklin *et al.* zur Folge die inflammatorische Aktivität von neutrophilen Granulozyten beeinflusst, was sich beispielsweise in der erhöhten Arginase 1-Aktivität, sowie der reduzierten Sekretion inflammatorischer Zytokine und Chemokine zeigt [191]. Arginase 1 ist ein Enzym, das zu einer Suppression der T-Zellaktivität und T-Zellproliferation führen kann. Mit Hilfe der Studie von Franklin *et al.* konnte somit gezeigt werden, dass Neutrophile ebenfalls zum immunmodulatorischen Effekt der ECP beitragen können.

1.3.2 ECP bei Erkrankung

Die Ursprünge der ECP-Therapie liegen in der Behandlung des CTCL. Seither wurde die ECP jedoch bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen etabliert und bei amtlichen Behörden wie der FDA

angezeigt. Tabelle 1 zeigt Indikationen der ECP und die Kategorisierung nach *first-line* und *second-line* Therapie bzw. einer individuell nötigen Abwägung der Therapiestrategie nach Ratcliffe et al. [5].

Zwei interessante Beispiele für den Einfluss der ECP abhängig von der Indikation des Patienten sind die Therapie von CTCL und GvHD Patienten. Für die Behandlung der beiden Erkrankungen kann ein kontroverser, immunmodulatorischer Effekt beschrieben werden, der im Folgenden genauer dargestellt ist.

Tabelle 1: Indikationen der ECP und Kategorisierung. Die Kategorisierung erfolgte durch die *American Society for Apheresis* und wurde in den Richtlinien festgehalten. Definition der Kategorien: I, ECP als *first-line* Therapie akzeptiert, eigenständig oder in Kombination mit anderen Behandlungen; II, ECP als *second-line* Therapie akzeptiert, eigenständig oder in Kombination mit anderen Behandlungen; III, die optimale Rolle der ECP ist nicht bekannt, individuelle Entscheidung über die Behandlung; n.k., nicht kategorisiert. Die Tabelle wurde angelehnt an die Veröffentlichung von Ratcliffe et al., 2015 erstellt [5].

Erkrankung	Kategorie
Kutanes T-Zelllymphom	
Erythroderm	I
Nicht-Erythroderm	III
GvHD	
Haut, akut/ chronisch	II/ II
Nicht-Haut, akut/ chronisch	III/ III
Herztransplantation	
Abstoßungsprophylaxe	II
Zelluläre oder wiederholte Abstoßung	II
Lungentransplantatabstoßung	
Bronchiolitis obliterans Syndrom	II
Chronisch entzündliche Darmerkrankung (Englisch: <i>inflammatory bowel disease</i>)	
Morbus Crohn	III
Skleroderma	III
Mycosis fungoides	n. k.
Vaskulitis der großen Gefäße	
Riesenzellerteriitis	n. k.
Takayasu-Arteriitis	n. k.

1.3.2.1 ECP beim kutanen T-Zelllymphom (CTCL)

Die ECP wird zur palliativen Behandlung des CTCL verwendet, wenn Patienten nicht auf andere Therapien angesprochen haben. Beim CTCL handelt es sich um eine Tumorerkrankung mit unkontrolliertem T-Zellwachstum. Es wird die erythroderme (Haut betreffend) von der nicht-erythrodermen CTCL (Milz, Lunge, Lymphknoten betreffend) unterschieden und nur bei der erythrodermen CTCL wird die ECP als Therapie erster Wahl eingesetzt [147, 159, 192]. Zirkulieren die Tumorzellen im Blut, wird die Erkrankung als Sézary Syndrom bezeichnet.

Bei der CTCL wird davon ausgegangen, dass durch ECP apoptotische CTCL-Zellen spezifische Proteine entlassen, die *ex vivo* durch DCs aufgenommen werden [156]. Die DCs präsentieren

anschließend diese Proteine auf der Zelloberfläche, welche von ruhenden CD8+ T-Zellen erkannt werden und zu deren Reaktivierung führen, wodurch das Immunsystem zu einer *in vivo* Bekämpfung der malignen T-Zellen veranlasst wird [121, 156].

Bei CTCL-Patienten liegt ein Ungleichgewicht zwischen einer Th1- und Th2-Antwort vor, wobei die Th2-Immunität vorherrscht [190]. Es konnte bereits in der Literatur gezeigt werden, dass CTCL Patienten verstärkt IL-4 produzieren [190], welches vornehmlich durch Th2-Zellen exprimiert wird und zur Stimulation von Mastzellen, sowie der Inhibition der Makrophagenaktivierung beiträgt. In derselben Studie war die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und IL-12 im Vergleich zu gesunden Spendern verringert. Die Zytokine können die Th2-Zellaktivierung inhibieren, die Th1-Zellaktivierung hingegen stimulieren. Mit Hilfe der ECP-Behandlung wird das Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen und damit auch die Zytokinproduktion wieder normalisiert [190]. Die ECP bei CTCL Patienten besitzt somit eine immunstimulierende Wirkung.

1.3.2.2 ECP bei der Spender-gegen-Empfänger Reaktion (GvHD)

Eine weitere Indikation, bei der die ECP zur Therapie eingesetzt wird, ist die GvHD. Eine GvHD kann nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation (Englisch: *hematopoietic cell transplantation*, HCT) auftreten, die zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen, aplastischen Anämien und angeborenen Immunerkrankungen eingesetzt wird [193]. Bei der GvHD handelt es sich um eine Abwehrreaktion, bei der die T-Zellen des Spenders vor allem MHC-Moleküle des Empfängers erkennen und daraufhin immunologische Reaktionen einleiten, die zu Organschädigungen führen [194, 195]. Die GvHD bleibt trotz pharmakologischer Prophylaxe und Behandlung, Manipulation der Spenderzellen und Fortschritten bei der unterstützenden Pflege die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität nach allogener HCT [116]. Neben der Haut sind bei einer GvHD ebenfalls der Gastrointestinaltrakt, die Leber und die Lunge betroffen [196]. Es wird anhand des Zeitpunkts des Auftretens und des klinischen Bilds zwischen der akuten GvHD (aGvHD) und der chronischen (cGvHD) unterschieden [197]. Es wird angenommen, dass die aGvHD durch Aktivierung der Empfänger-APCs durch Zytokine entsteht [198]. Diese APCs können daraufhin die T-Zellen der Spender aktivieren. Bei der cGvHD wird davon ausgegangen, dass alloreaktive T-Zellen und eine aberrante B-Zell-Homöostase für die Entstehung verantwortlich sind [199]. Die Pathophysiologie der GvHD ist hoch komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die ECP wird bei steroidrefraktärer bzw. steroidabhängiger aGvHD als adjuvante Therapie eingesetzt. Der Behandlungsplan sieht eine wöchentliche Therapie mit Terminen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vor. Bereits einen Monat nach Beginn der Therapie kann mit einer Ansprechrate gerechnet werden [200]. Bei steroidrefraktärer bzw. steroidabhängiger cGvHD erfährt die ECP als *second-line* Behandlung Einsatz. Insbesondere bei Manifestationen der Haut, Schleimhäute und der Leber zeigt die ECP die höchste Wirksamkeit. Auch hier wird die ECP wöchentlich mit Terminen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen angewendet und zunächst über 12 Wochen eingesetzt. Ab der 13. Woche können die Intervalle dann auf einen Abstand von zwei bis vier Wochen ausgedehnt werden.

Laut Literatur wird bei der ECP-Behandlung von GvHD-Patienten, ein inhibitorischer Effekt der ECP auf das Immunsystem mit dem Ausbleiben größerer Nebenwirkungen angenommen, was durch eine Veränderung der T-Zellfunktion sowie Modulation der DC-Reifung verursacht sein soll [156]. Durch die ECP gehen Lymphozyten in Apoptose, wobei alloreaktive T-Zellen schneller apoptotisch werden als ruhende T-Zellen [167]. Es wird angenommen, dass proliferierende Zellen generell anfälliger gegenüber durch DNA Schädigung induzierte Apoptose sind [201].

Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen ist bei Patienten mit GvHD in Richtung der CD8+ T-Zellen verschoben [178]. Mittels ECP wird nicht nur das Verhältnis der CD4+ zu CD8+ T-Zellen wieder normalisiert, sondern auch eine Verschiebung der Th1- zur Th2-Immunantwort erreicht. Dies führt zu einer verstärkten Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen bei gleichzeitiger Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion [178]. Des Weiteren werden ECP abhängig Tregs induziert [183, 189], die zu einer Suppression des Immunsystems sowie der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz beitragen können [202]. Insgesamt besitzt die ECP im Rahmen der GvHD-Therapie somit eine immunsupprimierende Wirkung.

1.4 Zielsetzung

Die ECP ist eine immunmodulatorische Therapie zur Behandlung von verschiedenen T-Zell vermittelten Erkrankungen wie z.B. dem kutanen T-Zelllymphom (CTCL), der Spender-gegen-Empfänger Reaktion (GvHD) oder systemischer Sklerose. Obwohl der klinische Nutzen, den die ECP bei Patienten bewirkt, in der Literatur beschrieben wurde, ist der zugrunde liegende Mechanismus der ECP-Behandlung noch nicht vollständig aufgeklärt. Während die meisten Leukozyten (T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und DCs) durch die ECP sterben, ist insbesondere das Wissen über den Einfluss der ECP auf CD14+ Monozyten limitiert und wird durch die Literatur kontrovers diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der immunregulatorische Einfluss ECP-behandelter Monozyten auf T-Zellen in einem *in vitro* Modell untersucht werden, um das Verständnis bezüglich der Rolle der Monozyten bei ECP erweitern zu können. Durch die Etablierung eines *in vitro* ECP-Modells, welches durch die Co-Kultur von ECP-behandelten Monozyten und unbehandelten CD4+ T-Zellen definiert wurde, kann dazu beigetragen werden, die Funktion der ECP bei der Behandlung von T-Zell vermittelten Erkrankungen genauer zu beschreiben. *In vitro* Analysen bedeuten eine Unabhängigkeit von den Hindernissen, die bei der Verwendung von Patientenmaterial auftreten können. Hierzu zählen insbesondere die zugrunde liegende Diagnose der Erkrankung, Vorbehandlungen der Patienten und der Zugang zu Patientenproben und ECP-Zentren.

Da der ECP in der Literatur bereits eine immunmodulatorische Rolle zugeschrieben wird, sollte neben der Überprüfung einer Veränderung der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell die Verteilung der anti- und proinflammatorischen T-Zelltypen festgestellt und analysiert werden, welche Bedeutung dem Zellkontakt im *in vitro* ECP-Modell zukommt. Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Effekt die *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten nicht nur auf Seite der co-kultivierten T-Zellen ausübt, sondern auch auf die behandelten Monozyten selbst. Hierbei sollte insbesondere der

Eintritt in die Apoptose, die Expression Monozyten-spezifischer Oberflächenmoleküle sowie das Differenzierungspotential der Monozyten zu Makrophagen, iDCs, mDCs, M-MDSCs und PMN-MDSCs nach ECP genauer betrachtet werden. Zudem sollten immunmodulatorische *Checkpoints* (Kontrollstellen) identifiziert werden, deren Blockaden wiederum Aufschluss geben könnte, ob ein spezifischer Signalweg für die in T-Zellen durch ECP-behandelte Monozyten ausgelösten Effekte verantwortlich ist. Sollte eine multifaktorielle Wirkweise der ECP identifiziert werden können, sollten weitere potentielle ECP-induzierte Faktoren wie die Expression von Effektorenzymen bzw. differentiell regulierte Gene untersucht werden, um weitere Ansatzpunkte zur Klärung des Wirkmechanismus finden zu können. Der Vergleich ausgewählter *in vitro* erhobener Daten mit *ex vivo* bzw. *in vitro* ECP-behandelten Patientenproben sollte dazu beitragen, das *in vitro* ECP-Modell zu verifizieren. Da die ECP-Behandlung bei Patienten jedoch meistens nicht alleine eingesetzt, sondern häufig als *second-line* Behandlung angewandt wird, können die Zellen von Patienten durch verschiedene Medikamente beeinflusst sein. Daher sollte abschließend mit Auswirkung einer Vitamin D3 Behandlung der Monozyten als *in vitro* Kombinationstherapie im ECP-Modell simuliert und überprüft werden. In Tabelle 2 ist eine Übersicht der zu untersuchenden Fragestellungen in Hinblick auf die verschiedenen Kapitel der hier vorliegenden Arbeit dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die Zielsetzung und überprüften Fragestellungen.

Einfluss <i>in vitro</i> ECP-behandelter Monozyten auf die Immunmodulation	Etablierung eines <i>in vitro</i> ECP-Modells	(1) Festlegung der ECP Parameter (2) Co-Kultursystem
	Beschreibung der <i>in vitro</i> ECP-induzierten Effekte von Monozyten in der Co-Kultur	(1) T-Zellproliferation (2) T-Zelltypenverteilung (3) Bedeutung des Zellkontakts
	<i>In vitro</i> ECP-induzierte Effekte in behandelten Monozyten	(1) Überleben der Monozyten (2) Induktion von Apoptose (3) Differenzierungspotential (4) Identifizierung von Checkpoints (5) Effektorenzyme (6) Differentielle Genregulation
	Verifizierung des <i>in vitro</i> ECP-Modells	(1) <i>ex vivo</i> und <i>in vitro</i> ECP-behandeltes Patientenmaterial (1.1) T-Zellproliferation (1.2) T-Zelltypenverteilung
	Einfluss einer Kombinationstherapie mit Vitamin D3 im <i>in vitro</i> ECP-Modell	(1) T-Zellproliferation (2) T-Zelltypenverteilung

Mit Hilfe der in diesem Projekt *in vitro* gewonnenen Informationen, sollte ein detaillierter Einblick in den Wirkmechanismus der ECP gegeben werden, wobei neue, klinisch relevante Erkenntnisse für die Optimierung der ECP-Behandlung und eine gezieltere und effektivere Therapie erhalten werden könnten. Durch die Erweiterung des *in vitro* ECP-Modells auf weitere Zelltypen, könnte nicht nur der ECP-induzierte Einfluss von Monozyten auf T-Zellen untersucht werden, sondern weitere immunologischen Fragestellungen geklärt werden.

2 Material

2.1 Antikörper

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Spezifität	Isotyp	Klon	Format	Hersteller
Anti-human Annexin V	Mouse IgG2a, κ	VAA-33	FITC	eBioscience
Anti-human Arginase 1	Mouse IgG2b, κ	14D2C43	PE	BioLegend
Anti-human CD3	Mouse IgG2a, κ	HIT3a	FITC	BioLegend
Anti-human CD3	Mouse IgG1, κ	UCHT1	PE-CF594	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD4	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	SK3	BUV395	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD4	Mouse IgG1, κ	RPA-T4	PE	BioLegend
Anti-human CD8	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	SK1	BUV805	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD11b	Mouse IgG1, κ	ICRF44	BB515	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD14	Mouse IgG2a, κ	M5E2	APC	BioLegend
Anti-human CD14	Mouse IgG2a, κ	M5E2	BV605	BioLegend
Anti-human CD15	Mouse IgG1, κ	SSEA-1	PE/Cy7	BioLegend
Anti-human CD16	Mouse IgG1, κ	3G8	PE	BioLegend
Anti-human CD16	Mouse IgG1, κ	3G8	Ax700	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD19	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	SJ25C1	BUV395	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD19	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	SJ25C1	BUV737	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD25	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	2A3	BV605	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD33	Mouse IgG1, κ	WM53	APC	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD56	Mouse (BALB/c) IgG2b, κ	NCAM16.2	BUV395	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD80	Mouse IgG1, κ	2D10	BV785	BioLegend

Material

Anti-human CD86	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	2331 (FUN-1)	BUV737	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD161	Mouse IgG1, κ	HP-3G10	PE/Cy7	eBioscience
Anti-human CD163	Mouse IgG1, κ	GHI/61	BV421	BioLegend
Anti-human CD209	Mouse IgG2b, κ	DCN46	PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD273	Mouse IgG1, κ	MIH18	APC	eBioscience
Anti-human CD274	Mouse IgG2b, κ	29E.2A3	PE	BioLegend
Anti-human FoxP3	Rat IgG2a, κ	PCH101	PE/Cy7	eBioscience
Anti-human HLA-DR	Mouse IgG2a, κ	G46-6	BUV395	Becton Dickinson GmbH
Anti-human IDO	Mouse IgG1, κ	eyedio	FITC	eBioscience
Anti-human IFNγ	Mouse IgG1, κ	4S.B3	FITC	eBioscience
Anti-human IL-2	Rat IgG2a, κ	MQ1-17H12	PE	eBioscience
Anti-human IL-4	Mouse IgG1, κ	8D4-8	PE/Cy7	eBioscience
Anti-human IL-10	Rat IgG1, κ	JES3-9D7	PerCP-eF710	eBioscience
Anti-human IL-17A	Mouse IgG1, κ	eBio64DEC17	eF660	eBioscience
Anti-human iNOS	Mouse IgG1, κ	C11	AlexaFluor647	Santa Cruz Biotechnology
Anti-human PD-L1	Mouse IgG2b, κ	29E.2A3	PE	BioLegend
Anti-human PD-L2	Mouse IgG1, κ	MIH18	APC	eBioscience

2.2 Antikörper für die Zellkultur

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Zellkultur.

Spezifität	Isotyp	Klon	Format	Hersteller
Anti-human CD3	Mouse BALB/c IgG1, κ	UCHT1	Purified NA/LE	Becton Dickinson GmbH
Anti-human CD28	Mouse C3H x BALB/c IgG1, κ	CD28.2	purified	Becton Dickinson GmbH
KEYTRUDA® Pembrolizumab (anti- PD1)			Therapeutischer Antikörper	MSD SHARP AND DOHME GmbH
Anti-human CD273 (PD- L2)	Mouse IgG1, κ	MIH18	LEAF™ purified	BioLegend
Anti-human CD274 (PD- L1)	Mouse IgG2b, κ	29E.2A3	LEAF™ purified	BioLegend
Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody		MG1-45	LEAF™ purified	BioLegend
Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody		# 20116	Protein A oder G purified	R&D Systems Inc.

2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol	VWR
Biocoll Trennlösung	Biochrom GmbH
DHR (<i>Dihydrorhodamine 123, 10 mM</i>)	Sigma-Aldrich GmbH
Ethanol	Merck KGaA,
FACS Clean®	Becton Dickinson GmbH
FACS Flow®	Becton Dickinson GmbH
Formaldehydlösung 30 %, methanolfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hyper Ladder, 50 bp	Bioline
Ionomycin	Sigma-Aldrich GmbH
Monensin	Sigma-Aldrich GmbH
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich GmbH
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH
UVADEX®	Therakos Inc.

2.4 Farbstoffe

Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe.

Farbstoff	Hersteller
CellTrace™ CFSE	Invitrogen AG
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780	eBioscience

2.5 Geräte

Tabelle 7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerätebezeichnung	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
autoMACS® Pro Separator	Miltenyi Biotec GmbH
Axioskop20	Carl Zeiss AG
AxioCam MR	Carl Zeiss AG
Behandlungsgerät für <i>ex vivo</i> ECP	
Therakos CellEx 5.0	Therakos Inc.
cBOT	Illumina
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH
Elektrophoresekammer midi, <i>SE 640</i>	VWR
Feinwaage MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius AG, Düsseldorf
Geldokumentationsgerät, <i>Licor</i>	VWR
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG
HiSeq 2500	Illumina
Inkubator HERA Cell	Heraeus Holding GmbH
Inversmikroskop Olympus IX50	Olympus Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Kühlzentrifuge Hettich Rotixa 50RS	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Multikanalpipette	Eppendorf AG
<i>Mr. Frosty</i> Einfrierbehälter	Thermo Fischer Scientific Inc.
NanoDrop1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pipettenset, Reasearch plus	Eppendorf AG
Pipettierhilfe	Integra Biosciences GmbH
<i>Power supply power Pac 1000</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fischer Scientific Inc.

Real-Time PCR Detection System CFX96	Bio-Rad Laboratories GmbH
Shaker Titramax1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH
Tischzentrifuge Hettich Micro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
UV-A Bestrahlungsgerät für <i>in vitro</i> ECP	
PUVA Combi Light 6000 Series	Dermat BVBA
Wasserbad No. 1012	Gesellschaft für Labortechnik
Vortexer MS1	IKA-Werke-GmbH & Co. KG
Zählkammer <i>Neubauer Improved</i>	Karl Hecht GmbH & Co. KG

2.6 Kits

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Kits	Hersteller
AMPure XP Beads	Beckman Coulter GmbH
Agilent DNA High Sensitivity Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH
AMPure XP Beads	Beckman Coulter GmbH
GoTaq® 2-Step RT-qPCR System	Promega, Madison
LEGENDplex™ Human Inflammation Panel (13-plex)	BioLegend
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH
Quick-RNA™ MicroPrep	Zymo Research
TruSeq RNA Sample preparation	Illumina

2.7 Medien

Tabelle 9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Medien und deren Zusammensetzung.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Einfriermedium	90 % FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom GmbH
	10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Monozytenmedium	RPMI 1640	Biochrom GmbH
	2 % Humanserum (Typ AB, hitzeinaktiviert)	in.vent DIAGNOSTICA GmbH Biochrom GmbH
	1 % L-Glutamin (2 mM)	
Makrophagenmedium	RPMI 1640	Biochrom GmbH
	10 % FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom GmbH
	1 % Penicillin Streptomycin (100 units/ml und 100 µg/ml)	Biochrom GmbH Biochrom GmbH
	1 % L-Glutamin (2 mM)	gibco (Thermo Fischer Scientific Inc.)
	1 % NEAA (<i>non-essential amino acids</i>)	Scientific Inc.)
	1 % Natriumpyruvat	gibco (Thermo Fischer Scientific Inc.)
RPMI + 10 % FCS	RPMI 1640	Biochrom GmbH
	10 % FCS	Biochrom GmbH
	1 % Penicillin Streptomycin (100 units/ml und 100 µg/ml)	Biochrom GmbH
	1 % L-Glutamin (200 mM)	Biochrom GmbH
RPMI + 10 % HS	RPMI 1640	Biochrom GmbH
	10 % Humanserum (Typ AB, hitzeinaktiviert)	in.vent DIAGNOSTICA GmbH
	1 % Penicillin Streptomycin (100 Units/ml und 100 µg/ml)	Biochrom GmbH
	1 % L-Glutamin (2 mM)	Biochrom GmbH

2.8 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Primer wurden von der Firma eurofins bezogen.

Tabelle 10: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

PCR	Primerpaar	Nukleotidsequenz (5' – 3')	
Aktivierungstyp Makrophagen	SOCS1_For	GACCTGAACTCGCACCTCCTA	[203]
	SOCS1_Rev	CCCCCAACCCCTGGTTT	
	SOCS3_For	TCCCCCAGAAGAGCCTATTAC	[204]
	SOCS3_Rev	TCCGACAGAGATGCTGAAGAGTG	
	MIF_For	TCATCGTAAACACCAACGTGC	Biomol GmbH, VHPS-5709
	MIF_Rev	GCCGCGTTCATGTCGTAATA	
Housekeeper	RPL13A_For	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	[205]
	RPL13A_Rev	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG	

2.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
1x PBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	Sigma-Aldrich GmbH
6x DNA Loading Dye (#SM1331)	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	Thermo Fischer Scientific Inc.
autoMACS™ Pro Running Buffer	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	Miltenyi Biotec GmbH
autoMACS™ Pro Washing Buffer	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	Miltenyi Biotec GmbH
eBioscience™ Binding Buffer for Annexin V	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	eBioscience
eBioscience™ FoxP3 Staining Buffer Set	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	eBioscience
eBioscience™ IC Fixation Buffer	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	eBioscience

eBioscience™ Buffer (10X)	Permeabilization	<i>Einsatzbereit vom Hersteller</i>	eBioscience
FACS-Puffer	1x PBS 2% FCS		Sigma-Aldrich GmbH Biochrom GmbH
MACS-Puffer	1x PBS 0,5% HSA Serumalbumin, 20%) 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	(humanes	Sigma-Aldrich GmbH CSL Behring GmbH Sigma-Aldrich GmbH

2.10 Software

Tabelle 12: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software.

Software	Version	Hersteller/ Adresse
Bio-Rad CFX Manager	1.6.541.1028	Bio-Rad Laboratories GmbH
CorelDRAW	X7	Corel Corporation
DAVID web tool	6.8	https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp
GraphPad Prism	Prism 7	GraphPad Software
FACS Diva	6.1.3	BD FACS Diva
FLOWJO	10	FlowJo, LLC
LEGENDplex™ Data Analysis Software	8.0	BioLegend
Microsoft Word, Excel, Power Point	Office 14	Microsoft Corporation
Venn Diagramm Generator		http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi

2.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Filterspitzen, SafeSeal Tips [®] Premium (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml)	Biozym Scientific GmbH
MACS [®] Separationssäulen (LS, MS Columns)	Miltenyi Biotec GmbH
Parafilm	American National Can Group
Pasteurpipetten	Carl Roth
PCR Softstripes, Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH
PCR Reaktionsgefäße	Bio-Rad Laboratories GmbH
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc.
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co.KG
Polystyrene-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt AG & Co.KG
Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Reservoir für Reagenzien (100 ml)	Corning Inc.
Reaktionsgefäß, Safe-Lock (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson GmbH
Zellkulturflaschen (250 ml)	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten (F-Boden, 6-well, 96-well)	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten (U-Boden, 96-well)	Greiner Bio-One GmbH
Zellschaber	Corning Inc.
96-Well Platten (V-Boden, V-bottom)	Greiner Bio-One GmbH

2.12 Vitamine

Tabelle 14: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vitamine.

Zytokin	Hersteller
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (1 α ,25-(OH) ₂ D3)	Sigma-Aldrich Co

2.13 Zytokine und Chemokine

Tabelle 15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine und Chemokine.

Zytokin	Hersteller
M-CSF	Peprtech Inc.

2.14 Firmensitze

Tabelle 16: Liste der Firmensitze der in dieser Arbeit verwendeten Hersteller.

Hersteller	Firmensitz
Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten
American National Can Group	Chicago, Vereinigte Staaten
Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland
Applied Biosystems Deutschland GmbH (Thermo Fischer Scientific Inc.)	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
BioLegend	San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Corel Corporation	Ottawa, Ontario, Kanada
Corning Inc.	Corning, New York, Vereinigte Staaten
CSL Behring GmbH	Hattersheim am Main, Deutschland
Dermat BVBA	Leuven, Belgien
eBioscience (Thermo Fischer Scientific Inc.)	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
FlowJo	Ashland, Vereinigte Staaten
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
GraphPad Software	La Jolla, Vereinigte Staaten
Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Deutschland
Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Illumina	San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten
IKA-Werke-GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Integra Biosciences GmbH	Fernwald, Deutschland

in.vent DIAGNOSTICA GmbH	Hennigsdorf, Deutschland
Invitrogen AG (Thermo Fischer Scientific Inc.)	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Karl Hecht GmbH & Co. KG	Sondheim/Rhön, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Microsoft Corporation	Albuquerque, New Mexico, Vereinigte Staaten
MSD SHARP AND DOHME GmbH	Haar, Deutschland
Olympus Deutschland	Hamburg, Deutschland
Peprtech Inc.	Rocky Hill, Vereinigte Staaten
R&D Systems, Inc.	Minneapolis, Vereinigte Staaten
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, Texas, Vereinigte Staaten
Sarstedt AG Co.KG	Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Therakos Inc.	Pennsylvania, Vereinigte Staaten
VWR	Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Zymo Research	Irvine, Kalifornien, Vereinigte Staaten

3 Methoden

Alle Experimente wurden in einem standardisierten Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

3.1 Zellisolation

Zur Gewinnung von Zellen aus Blut für die weitere Analyse wurden entsprechend der erwünschten Zelltypen bestimmte Verfahren der Aufreinigung und Abtrennung ausgewählt.

3.1.1 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus *Buffycoats*

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus *Buffycoats* gesunder Spender isoliert. Die *Buffycoats* wurden über das Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen bezogen. Hierfür wurde Blut mit 1x PBS verdünnt, auf das gleiche Volumen Bicolll Trennlösung geschichtet und 20 Minuten bei RT mit 985 g ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch entsteht ein Dichtegradient, der dafür sorgt, dass sich Erythrozyten am Boden des Gefäßes sammeln. In der darüber liegenden Trennlösung befinden sich hauptsächlich Granulozyten, die durch die Lymphozyten enthaltende Interphase vom Serum getrennt werden. Die Interphase wurde abgenommen, mit 1x PBS gewaschen und 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die isolierten PBMCs bis zur weiteren Verwendung in RPMI + 10 % FCS aufbewahrt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl und -vitalität erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Dafür wurde die Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt, welches die Membran toter Zellen passieren kann, und in die Zählkammer überführt. Lebende und somit ungefärbte Zellen wurden in den vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt und die Zellkonzentration mit Hilfe der Formel 1 berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zählkammerfaktor}$$

Formel 1: Bestimmung der Zellkonzentration.

3.1.3 Kryokonservierung von PBMCs

Für eine Langzeitlagerung der PBMCs wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in Einfriermedium (90 % FCS + 10 % DMSO) eingestellt und 1×10^7 Zellen pro Kryoröhrchen mit Hilfe des mit 2-Propanol befüllten *Mr. Frosty* Einfrierbehälters eingefroren. Die Lagerung der Kryoröhrchen bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, bis nur noch ein kleines Eisstück zurückblieb. Anschließend wurden die Zellen 1:10 in RPMI + 10 % FCS Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt.

3.1.4 Isolation von Monozyten und CD4+ T-Zellen aus PBMCs

Mit Hilfe der *magnetic-activated cell sorting* (MACS) Technologie der Firma Miltenyi Biotec GmbH können verschiedene Zelltypen hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle über ein magnetisches Feld voneinander getrennt werden.

Magnetische Nanopartikel mit einer Größe von etwa 50 nm werden mit hoch spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Antigene auf der Zelloberfläche gekoppelt. Bei Kontakt mit Zellen, die dieses Antigen exprimieren, werden die Nanopartikel (oder auch MicroBeads® genannt) gebunden. Nachdem der gewünschte Zelltyp mit den MicroBeads® markiert wurde, wird die Zellsuspension auf eine Säule gegeben, an der sich ein starkes Magnetfeld befindet. Dadurch wird der markierte Zelltyp mittels der MicroBeads® im magnetischen Feld zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert durchfließen. Erst durch das Entfernen des magnetischen Felds, können die markierten Zellen von der Säule eluiert werden.

Je nach Isolations-Kit können Zellen positiv oder negativ in Bezug auf deren Oberflächenantigene angereichert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden CD4+ T-Zellen durch eine Positivselektion mittels CD4+ MicroBeads® entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Für die Isolation von CD14+CD16+ Monozyten wurde das Pan Monocyte Isolation Kit® entsprechend den Herstellerangaben verwendet, das auf eine Negativselektion der Monozyten zurückgreift und somit alle anderen Zelltypen außer den Monozyten an der Säule gebunden werden. Hierfür ist ein Biotin-Cocktail verantwortlich, der eine simultane Anreicherung der Monozytensubtypen (klassisch, intermediär, nicht-klassisch) ermöglicht.

Während die magnetische Markierung der Zellen stets händisch durchgeführt wurde, erfolgte die magnetische Separation entweder von Hand oder automatisiert mittels autoMACS® Pro Separator und den vom Hersteller empfohlenen Protokollen.

Die Funktionalität der isolierten Zellen soll durch die Bindung der MicroBeads® nicht beeinflusst werden, da diese nicht toxisch und biologisch abbaubar sind und durch die kleine Partikelgröße die Oberflächenepitope nicht abgesättigt werden. Zur Überprüfung der Reinheit nach Isolation wurden die gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.2 ECP

Die ECP-Behandlung in dieser Arbeit wurde an Zellen von gesunden Spendern sowie ECP Patienten durchgeführt. Zudem erfolgte die Behandlung *in vitro* mit dem Auftischgerät PUVA Combi Light 6000 Series wie auch *ex vivo* mit dem ECP-Gerät (Therakos CellEx 5.0) auf der Dialysestation in der Universitätskinderklinik Tübingen.

3.2.1 *Ex vivo* ECP

In die Studie einbezogen wurden ausschließlich Patienten, die zuvor durch einen Arzt oder eine Ärztin aufgeklärt und eine Einverständniserklärung abgegeben haben (Ethikvotum: 360/2016BO1). Die *ex vivo* ECP-Behandlung der Patienten erfolgte auf der Dialysestation der Kinderklinik Tübingen. Hierfür wurden die Patienten an das Gerät (Therakos CellEx 5.0) angeschlossen und eine etwa zweistündige Aphaese durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Photoaktivators UVADEX® in den Leukozytenbeutel und die Bestrahlung mit UV-A-Licht. Die benötigte Menge UVADEX® wurde mittels der vom Hersteller Therakos angegebenen Formel 2 berechnet:

Behandlungsvolumen x 0,017 = Volumen UVADEX® in ml für jede Behandlung

Formel 2: Berechnung des UVADEX®-Volumens.

Für weitere Analysen im Labor wurden 10 ml Probenmaterial aus dem Aphaesat vor Zugabe von UVADEX® (*ex vivo*, ECP-) sowie 5 ml Probenmaterial aus dem Aphaesat nach Zugabe von UVADEX® und UV-A Bestrahlung (*ex vivo*, ECP+) entnommen (Abbildung 3). Anschließend wurden die behandelten Zellen dem Patienten reinfundiert. Die Isolation von Monozyten aus dem entsprechenden Probenmaterial mittels MACS Technologie erfolgte aus PBMCs, die mittels Bicolll Trennlösung und Dichtegradientenzentrifugation aus dem Aphaesat gewonnen wurden. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in RPMI + 10 % FCS bei 37 °C und 5% CO₂ aufbewahrt.

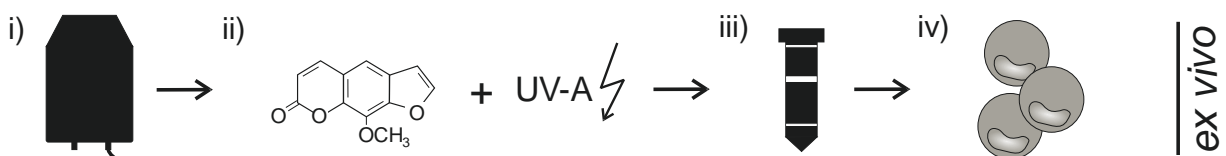


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung im Rahmen der *ex vivo* ECP.

Bei der *ex vivo* ECP werden aus dem Aphaesat-Sammelbeutel (i) 10 ml Probenmaterial vor Zugabe von UVADEX®-Zugabe (*ex vivo*, ECP-) entnommen. Anschließend wird UVADEX® in den Beutel gespritzt, dieser mit UV-A-Licht bestrahlt (ii) und erneut eine Probe von 5 ml entnommen (*ex vivo*, ECP+). Das restliche Aphaesat wird in den Patienten reinfundiert. Nach einer Dichtegradientenzentrifugation (iii) zur weiteren Beseitigung von Erythrozyten, werden Monozyten mittels magnetischer Zellseparation isoliert (iv).

3.2.2 *In vitro* ECP mit Patientenproben

Für den Vergleich von *ex vivo* behandelten Patientenproben mit dem *in vitro* ECP-Modell, wurden nach einer Dichtegradientenzentrifugation Monozyten mittels MACS Technologie aus dem Apharesat der Patienten vor Zugabe von UVADEX® isoliert (Abbildung 4). Daraufhin wurden die Monozyten mit einer Zellkonzentration von $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in 6-Well Platten ausgesät, mit 200 ng/ml bzw. 340 ng/ml UVADEX® 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunklen inkubiert und anschließend mit einer Dosis von 2 J/cm² UV-A-Licht bestrahlt (*in vitro*, ECP+). Zudem wurden Monozyten gleichermaßen in einer 6-Well Platte ausgesät, ohne Zugabe des Photoaktivators 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunklen inkubiert und anschließend ohne Bestrahlung in das Bestrahlungsgerät gestellt (*in vitro*, ECP-). Nach der ECP-Behandlung wurden Monozyten mechanisch mittels Zellschaber und unter Zugabe von eiskaltem 1x PBS abgelöst und mit 1x PBS gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Monozyten bis zur weiteren Verwendung in RPMI + 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

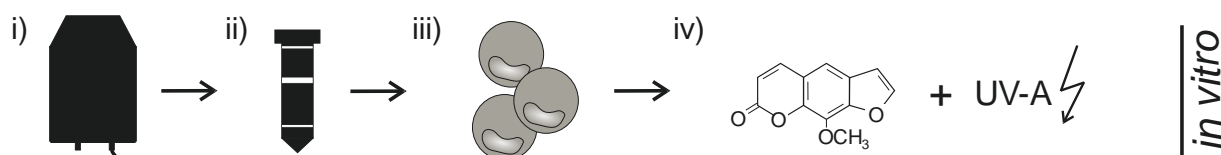


Abbildung 4: Die Probenaufbereitung bei der *in vitro* ECP. Bei der *in vitro* ECP wird das Probenmaterial aus dem Apharesat-Sammelbeutel (i) vor Zugabe von UVADEX® entnommen. Nach einer Dichtegradientenzentrifugation (ii) werden Monozyten mittels magnetischer Zellseparation isoliert (iii). Anschließend werden die Monozyten mit einer Dichte von $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in Zellkulturplatten ausgesät, mit 200 ng/ml UVADEX® für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunklen inkubiert und anschließend mit einer Dosis von 2 J/cm² UV-A-Licht bestrahlt (*in vitro*, ECP+) (iv). Des Weiteren werden Monozyten in gleicher Weise ausgesät, ohne UVADEX®-Zugabe inkubiert und ohne Bestrahlung in das Bestrahlungsgerät gestellt (*in vitro*, ECP-). Im Anschluss an die *in vitro* ECP werden die Monozyten für die weitere Verwendung mechanisch abgelöst.

3.2.3 *In vitro* ECP mit Zellen gesunder Spender

PBMCs, Monozyten oder CD4+ T-Zellen wurden *in vitro* ECP-behandelt. Hierfür wurden zunächst die Zellen mit einer Dichte von $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in 6-Well Platten ausgesät. Für den ECP-behandelten Ansatz (ECP+) wurden die Zellen mit dem Photoaktivator UVADEX® 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunklen inkubiert und anschließend im UV-A-Bestrahlungsgerät PUVA Combi Light 6000 Series bestrahlt. Zur Evaluation der geeigneten Parameter für das *in vitro* ECP-Modell, wurden zwei verschiedene UVADEX®-Konzentrationen (200 ng/ml und 340 ng/ml) bei den Bestrahlungsdosen 0 J/cm² und 2 J/cm² ausgetestet. Außerdem wurde sowohl der Einfluss von UVADEX® bzw. UV-A-Licht alleine auf die Zellen evaluiert. Für den ECP unbehandelte Ansatz (ECP-)

wurden Zellen gleichermaßen in einer 6-Well Platte ausgesät, ohne Zugabe des Photoaktivators 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunklen inkubiert und anschließend ohne Bestrahlung in das Bestrahlungsgerät gestellt.

Nach der ECP-Behandlung wurden PBMCs und CD4⁺ T-Zellen aus der 6-Well Platte in sterile Reaktionsgefäße überführt, mit 1x PBS gewaschen, die Zellzahl bestimmt und bis zur weiteren Verwendung in RPMI + 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Da Monozyten bereits nach kurzer Zeit adhären mussten diese Zellen nach der ECP-Behandlung mechanisch mittels Zellschaber und unter Zugabe von eiskaltem 1x PBS abgelöst werden. Anschließend wurden die Monozyten ebenfalls mit 1x PBS gewaschen, die Zellzahl bestimmt und bis zur weiteren Verwendung in RPMI + 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.3 Kultivierung der ECP-behandelten Zellen

Zur weiteren Analyse der isolierten, ECP un-/behandelten Zellen, waren je nach Zelltyp unterschiedliche Kultivierungsbedingungen erforderlich.

3.3.1 PBMCs

Die Kultivierung von ECP un-/behandelten PBMCs erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Zielkonzentration von $3,0 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI + 10 % FCS bei 37 °C und 5% CO₂ für 24 Stunden.

3.3.2 Co-Kultur

Monozyten und CD4⁺ T-Zellen wurden unter Stimulation mit 10 ng/ml anti-CD3 Antikörper in 96-Well Platten in RPMI + 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 bis 5 Tage co-kultiviert. Dabei wurden verschiedene Verhältnisse von Monozyten zu T-Zellen getestet (1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1, 0,0625:1). Für die Untersuchung der Bedeutung des Zellkontakts zwischen ECP-behandelten Monozyten und CD4⁺ T-Zellen auf die T-Zellen wurde die Co-Kultivierung der Zellen angepasst (Abbildung 5). ECP un-/behandelte Monozyten wurden für 24 Stunden alleine in RPMI + 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die vorinkubierten Zellen mit frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen in RPMI + 10% HS bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Zugabe von 10 ng/ml anti-CD3 Antikörper für 5 Tage co-kultiviert. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die von ECP-behandelten Monozyten sekretierten Zytokine auf CD4⁺ T-Zellen haben, wurden ECP un-/behandelten Monozyten ebenfalls 24 Stunden alleine in RPMI + 10 % HS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde der Zellkulturüberstand auf frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen übertragen und die T-Zellen in RPMI + 10 % HS bei 37 °C und 5 %

CO₂ unter Zugabe von 10 ng/ml anti-CD3 Antikörper sowie 1 µg/ml anti-CD28 Antikörper für 5 Tage kultiviert.

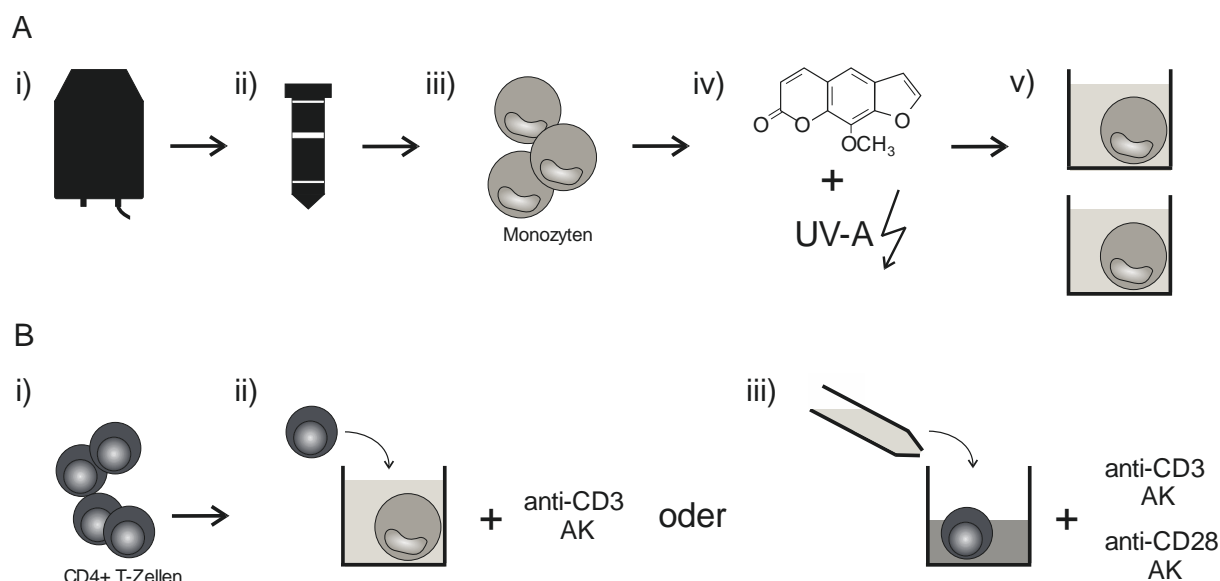


Abbildung 5: Übersicht des Versuchsablaufs zur Untersuchung der Bedeutung des Zellkontakts im *in vitro* ECP-Modell. (A) An Tag 1 werden aus dem *Buffycoat* gesunder Spender (i) PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation (ii) isoliert. Anschließend werden Monozyten durch magnetische Zellseparation (iii) aus den PBMCs isoliert. Nach einer Inkubation der Monozyten mit 200 ng/ml UVADEx® für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ werden diese mit 2 J/cm² UV-A-Licht bestrahlt. Außerdem werden Monozyten ohne Zugabe von UVADEx® für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und ohne Bestrahlung in das Bestrahlungsgerät gestellt. Daraufhin werden die unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten in 96-Well Platten ausgesät. **(B)** An Tag 2 werden aus vom gleichen Spender aufbewahrten PBMCs mittels magnetischer Zellseparation CD4+ T-Zellen isoliert (i). Nach 24 Stunden Inkubation der Monozyten werden die CD4+ T-Zellen in einem Verhältnis von 1:4 (Monozyten:T-Zellen) mit den Monozyten gemischt (ii, Zellkontakt-Ansatz) unter Zugabe von 10 ng/ml anti-CD3 Antikörper. Alternativ wird der Überstand der Monozyten auf die CD4+ T-Zellen übertragen (iii, Zytokin-Ansatz) unter Zugabe von 10 ng/ml anti-CD3 Antikörper und 1 µg/ml anti-CD28 Antikörper. Nach 5 Tagen werden die T-Zellen hinsichtlich verschiedener Fragestellungen analysiert.

3.3.3 Monozyten

Die Kultivierung von ECP un-/behandelten Monozyten erfolgte in 6-Well Platten mit einer Zielkonzentration von 0,5 - 1,0 x 10⁶ Zellen/ml in Monozytenmedium bei 37 °C und 5% CO₂ für 1 bis 2 Tage.

3.4 CFSE Markierung der T-Zellen

Zur Bestimmung der Proliferationsraten von CD4⁺ T-Zellen nach 5 Tagen Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten, wurden die T-Zellen mit 2 µM des Farbstoffes CellTrace™ CFSE markiert. Hierfür wurden die Zellen mit der CFSE-Lösung 15 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit kaltem FCS abgestoppt. Nach einem Waschschrift wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung RPMI + 10 % HS aufbewahrt. Die Überprüfung einer erfolgreichen CFSE-Markierung der T-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Der CFSE Farbstoff kann durch die Plasmamembran der Zellen diffundieren und lagert sich kovalent an freie Amine der Zelloberfläche und im Zellinneren an. Dadurch kann der Farbstoff in der Zelle über längere Zeit zurückgehalten werden. Zelleigene Esterasen spalten die Acetatgruppen im Zellinneren und bewirken somit ein fluoreszierendes Signal. Der CFSE-Farbstoff zeigt eine geringe Zytotoxizität und wird nicht an benachbarte Zellen weitergegeben.

3.5 Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird in der Medizin meistens zur Untersuchung von Zellen des Blutes oder Knochenmarks eingesetzt. Bei dieser Methode, werden verschiedene Charakteristika von mikroskopisch kleinen Partikeln analysiert, wobei diese in Suspension durch eine Messkammer (Englisch: *flow cell*) im Durchflusszytometer fließen, mit einem Lichtstrahl (normalerweise: Laserlicht) angeleuchtet und anschließend elektronisch detektiert werden. Hierbei unterscheidet man verschiedene Eigenschaften, die in der Durchflusszytometrie gemessen werden können. Eine Zelle verursacht Streulicht wenn diese den Laserstrahl passiert. Dabei nimmt das entstehende Streulicht mit der Größe und der Granularität der Zelle zu. Abhängig vom Winkel, in welchem das Streulicht gemessen wird, erhält man unterschiedliche Informationen über die Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (Englisch: *forward scatter*) gibt Aufschluss über die Größe der Zellen und nimmt mit ansteigender Größe zu. Das Seitwärtsstreulicht (Englisch: *side scatter*) hingegen beruht auf der Granularität der Zelle und nimmt mit zunehmender Anzahl an Granula zu.

Des Weiteren können weitere Informationen über die Merkmale einer Zelle erhalten werden, indem Fluoreszenzlicht gemessen wird. Hierfür werden die Zellen mit Hilfe von spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, die das Licht emittieren, wenn sie durch den Laser mit entsprechender Exzitationswellenlänge angeregt werden. Die Verwendung vieler Fluorochrome erlaubt es, verschiedene Zelleigenschaften gleichzeitig zu messen [206].

Die Färbung der Zellen erfolgt in Polystyrenröhrchen oder einer 96-Well Platte (0,1 - 1 x 10⁶ Zellen/Probe). Alle Waschschriftte werden entweder mit 1x PBS oder FACS-Puffer und die Zentrifugationsschriftte bei 400 g für 5 Minuten durchgeführt. Während der Überstand nach der Zentrifugation verworfen wird, wird das Zellpellet im Rückfluss (50- 100 µl) resuspendiert. Für die Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen wurden optimale Verdünnungen durch Titration der Antikörper

bestimmt. Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am BD™ LSR II und BD FACSDIVA™ Software, die Auswertungen der erhobenen Daten sowohl mittels BD FACSDIVA™ als auch mit FlowJo v10 Software.

3.5.1 Oberflächenfärbung allgemein

Um Zellen anhand verschiedener, auf der Zelloberfläche exprimierter Rezeptoren zu unterscheiden, wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Antikörper 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen desselben Zelltyps verwendet, um die Lage der für das Antigen positiven Zellen zu ermitteln und zu überprüfen. Erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer später als 2 Stunden nach Ende der Färbung, wurden die Zellen mit Hilfe von 0,5 % Formaldehydlösung fixiert.

3.5.2 Intrazellulärfärbung allgemein

Da manche Zielproteine intrazellulär lokalisiert sind, ist eine Erweiterung des Färbeprotokolls um eine intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung notwendig.

In dieser Arbeit wurden Zellen für die Analyse intrazellulär befindlicher Zytokine und Interleukine mit Hilfe des eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X) und des eBioscience™ IC Fixation Buffer für die entsprechenden Antikörper zugänglich gemacht. Hierfür wurden die Zellen 20 Minuten bei RT im Dunkeln fixiert und zweimal mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten bei RT im Dunkeln mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und anschließend mit dem Permeabilisierungspuffer und FACS-Puffer gewaschen.

3.5.3 Intranukleärfärbung allgemein

Der intranukleär nachweisbare Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) in T-Zellen wurde mit Hilfe des eBioscience™ FoxP3 Staining Buffer Set detektiert. Hierfür wurden die Zellen 45 Minuten bei RT im Dunkeln fixiert und daraufhin zweimal mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen. Nach Zugabe des anti-FoxP3 Antikörpers wurden die Zellen 45 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und mit dem Permeabilisierungspuffer und FACS-Puffer gewaschen.

3.5.4 Lebend/tot Färbung allgemein

Die Unterscheidung lebender Zellen von toten Zellen erfolgte mit Hilfe des lebend/tot Farbstoff Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience). Hierfür wurden die Zellen entsprechend den Herstellerangaben mit 1x PBS gewaschen, mit 100 µl der 1:1000 Verdünnung des Vitalitätsfarbstoffs versetzt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen.

3.5.5 Analyse der Reinheit isolierter Zellen

Um die Reinheit der isolierten Zelltypen zu bestimmen, wurden die Zellen mittels Fluorochrom gekoppelter Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse inkubiert. CD4⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe von anti-CD3 und anti-CD4 Antikörpern 15 Minuten bei RT im Dunkeln gefärbt. Monozyten wurden mit anti-CD14 und anti-CD16 Antikörpern unter gleichen Bedingungen gefärbt. Ungebundene Antikörper wurden durch einen Waschschrift entfernt und die Zellen am Durchflusszytometer LSR II analysiert. Berechnet wurden die prozentualen Anteile der für die entsprechenden Antigene positiven Zellen an den Gesamtzellen.

3.5.6 Überprüfung der CFSE Markierung

Die Überprüfung der erfolgreichen Markierung von CD4⁺ T-Zellen mit CFSE, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt, wobei alle CFSE markierten Zellen als positives Signal im FITC Kanal detektiert werden. Daher wurden die Zellen nach der Markierung und einem darauffolgenden Waschschrift am Durchflusszytometer LSR II analysiert.

3.5.7 Überprüfung der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten

Die Proliferationsraten von T-Zellen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten wurde mittels CellTrace™ CFSE Kit (Invitrogen) durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden T-Zellen wie bereits beschrieben mit dem Farbstoff markiert und anschließend mit ECP un-/behandelten Monozyten für 5 Tage co-kultiviert.

Die Überprüfung der Abnahme des Fluoreszenzsignals des CFSE-Farbstoffs mit jeder Zellteilung erfolgte nachdem die Zellen zunächst mit Hilfe verschiedener Oberflächenmarker (Tabelle 17) und dem Lebend/tot -Farbstoff gefärbt wurden.

Tabelle 17: Phänotypisierung der T-Zellen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten. Übersicht über untersuchte Oberflächenmarker zur Analyse der T-Zellen aus Co-Kulturen mit ECP un-/behandelten Monozyten.

Zelltyp	Marker
CD4+ T-Zellen	CD14- CD3+ CD4+
Proliferierende CD4+ T-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ CFSE+

3.5.8 Untersuchung von T-Zelltypen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten

Um zu überprüfen, wie sich die prozentualen Anteile verschiedener T-Zelltypen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten verändert, erfolgte eine intrazelluläre Zytokinfärbung 5 Tagen nach *in vitro* ECP. Hierfür wurden die Zellen 5 Stunden mit *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA; 50 ng/ml; Sigma-Aldrich) und Ionomycin (750 ng/ml; Sigma-Aldrich) stimuliert. Monensin (2 μ M; eBioscience) wurde für die letzten 2 Stunden der Stimulation zugegeben, um den Export der exprimierten Zytokine aus der Zelle aufzuhalten. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die T-Zellen der Co-Kulturen zunächst mit Hilfe verschiedener Oberflächenmarker (Tabelle 18) und dem Lebend/tot Farbstoff gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär für verschiedene Zytokine gefärbt, deren Expression durch bestimmte T-Zelltypen erfolgt und somit einen Rückschluss auf den Anteil der entsprechenden T-Zelltypen zuließ.

Zudem wurden die T-Zellen wie bereits beschrieben auf den Transkriptionsfaktor FoxP3 gefärbt.

Tabelle 18: Charakterisierung der T-Zelltypen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten. Übersicht über untersuchte Oberflächen- und intrazellulärer Marker zur Analyse verschiedener T-Zelltypen aus Co-Kulturen von T-Zellen mit ECP un-/behandelten Monozyten.

Zelltyp	Marker
CD4+ T-Zellen	CD14- CD3+ CD4+
CD4+ Tregs	CD14- CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+
Th2-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ IL-4+
IL-10+ T-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ IL-10+
Th1-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ IFN γ +
Th17-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ IL-17A+
Th17Th1-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ IL-17A+ IFN γ +
IL-2+ T-Zellen	CD14- CD3+ CD4+ IL-2+

3.5.9 Apoptosefärbung von Monozyten nach ECP-Behandlung

Die verschiedenen Phasen der Apoptose, sowie die Anteile lebender und toter Monozyten wurden mit Hilfe einer Annexin V Färbung in Verbindung mit einer Lebend/tot Färbung bestimmt (Tabelle 19).

Annexine gehören zur Familie der kalziumabhängigen, Phospholipid-bindenden Proteine und binden in erster Linie Phosphatidylserin (PS) im humanen Organismus. Während PS unter physiologischen Bedingungen in der inneren Schicht der Plasmamembran lokalisiert ist, wird es nach Beginn der Apoptose auf die extrazelluläre Membranschicht umverteilt. Dadurch werden Zellen für die anschließende Phagozytose markiert und können zudem durch fluoreszenzmarkiertes Annexin V kalziumabhängig detektiert werden. Gegen Ende der Apoptose verlieren die Zellen die Membranintegrität, wodurch Annexin V auch das PS im Zellinneren markieren kann. In Tabelle 19 sind die verschiedenen Phasen der Apoptose und deren Detektion aufgelistet.

Tabelle 19: Phasen der Apoptose. Übersicht über die Phasen der Apoptose und deren Detektion mittels Annexin V und Vitalitätsfarbstoff Fixable Viability Dye eFluor™ 780.

Phasen	Detektion
Frühe Apoptose	Annexin V +, Lebend/tot Färbung -
Späte Apoptose / Nekrose	Annexin V +, Lebend/tot Färbung +
Tote Zellen	Annexin V -, Lebend/tot Färbung +
Lebende Zellen	Annexin V -, Lebend/tot Färbung -

In diesem Projekt wurden die isolierten, ECP un-/behandelten Monozyten 2 Tage nach *in vitro* ECP mechanisch abgelöst und mit Hilfe eines anti-CD14 Antikörpers gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mittels Lebend/tot Farbstoff gefärbt und mit 1x *Binding Buffer* gewaschen. Die Färbung mit dem anti-Annexin V Antikörper erfolgte für 15 Minuten bei RT im Dunkeln, woraufhin die Zellen am Durchflusszytometer LSR II analysiert wurden.

3.5.10 Monozytencharakterisierung nach ECP-Behandlung

Unterschiede in den prozentualen Anteilen von Monozyten, Makrophagen und DCs in der Monozytenfraktion 2 Tage nach ECP-Behandlung wurden mit Hilfe von Oberflächenfärbungen für die Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurden die Monozyten mechanisch abgelöst und mittels verschiedener Oberflächenmarker (Tabelle 20) und dem Lebend/tot-Farbstoff gefärbt.

Tabelle 20: Monozytencharakterisierung mittels Durchflusszytometrie. Übersicht über untersuchte Oberflächenmarker zur Analyse der Induktion verschiedener Zelltypen aus den ECP un-/behandelten Monozyten gesunder Spender.

Zelltyp	Marker
Monozyten	CD14+ CD209+ HLA-DR+ CD86+
Makrophagen	CD14+ CD209- HLA-DR+ CD86+
mDCs	CD14- CD209+ HLA-DR+ CD86+
iDCs	CD14- CD209+ HLA-DR+ CD86-
M-MDSCs	HLA-DR- CD33+ CD14+
PMN-MDSCs	HLA-DR- CD33+ CD14- CD15+

3.5.11 Überprüfung der PD-L1 und PD-L2 Expression auf Monozyten und T-Zellen

Die Expression von PD-L1 (CD274) und PD-L2 (CD273) auf CD14+ Zellen und CD3+CD4+ T-Zellen wurde über eine Oberflächenfärbung und anschließende Lebend/tot Färbung überprüft. Hierfür wurden die Monozyten mechanisch abgelöst und die T-Zellen durch Resuspendieren aus der Co-Kultur entnommen. Die Färbung erfolgte zu den Zeitpunkten 16 Stunden, 1 Tage und 2 Tage nach ECP für die Monozyten. Bei der Überprüfung der T-Zellen fand eine Erweiterung um den 5 Tage Zeitpunkt statt.

3.5.12 Detektion von Effektorenzymen von Monozyten nach ECP-Behandlung

Für die Untersuchung der Bedeutung von Effektorenzymen, exprimiert in ECP un-/behandelten Monozyten, für die Reduktion der T-Zellproliferation, wurden Monozyten nach *in vitro* ECP in 6-Well Platten ausgesät ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) und anschließend 1 Tag bzw. 2 Tage kultiviert.

Die Expression von Arginase 1, iNOS und IDO von CD14+ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die Monozyten 2 Tage nach ECP mechanisch abgelöst, mit Hilfe des anti-CD14 Antikörpers markiert und mit dem Lebend/tot-Farbstoff gefärbt. Anschließend wurden die Zellen intrazellulär, dem allgemeinen Protokoll für intrazelluläre Färbung entsprechend, mittels Fluorochromgekoppelter Antikörper für Arginase 1, iNOS und IDO gefärbt.

3.5.13 Messung der ROS Produktion von Monozyten nach ECP-Behandlung

Die Produktion von ROS (Englisch: *reactive oxygen species*) durch ECP un-/behandelte Monozyten wurde mit Hilfe von Dihydrorhodamin 123 (DHR, Sigma-Aldrich) bestimmt. Monozyten wurden nach *in vitro* ECP für 1 Tag in 6-Well Platten bei einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert.

Anschließend wurden die Zellen mechanisch abgelöst, und mit 1 μM DHR-Lösung für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Monozyten verwendet, die mit 1 μM PMA für 30 min stimuliert wurden. Daraufhin erfolgte die Oberflächenfärbung der Monozyten mit Hilfe des anti-CD14 Antikörpers und die Lebend/tot-Färbung.

3.6 Zytokinmessungen

Mit Hilfe des LEGENDplex™ Human Inflammatory Panel (13-plex) wurde die Zytokinexpression von unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten sowie von Co-Kulturen aus ECP un-/behandelten Monozyten mit CD4+ T-Zellen analysiert. Bei dem LEGENDplex™ Human Inflammatory Panel handelt es sich um eine immunologische Analysemethode, die auf der Verwendung von verschiedenen großen, Fluoreszenz markierten Partikeln (*beads*) basiert. Die Partikeloberflächen sind mit spezifischen Antikörpern konjugiert wodurch die Bindung an das entsprechende Analyt in der Probe ermöglicht wird. Auf die Inkubation der Probe mit den *beads* folgen ein Waschschriff sowie die Zugabe eines biotinylierten Detektionsantikörpers. Dieser Detektionsantikörper kann an das zu analysierende Protein binden und es wird ein *bead*-Protein-Antikörper Komplex gebildet. Der Nachweis des Detektionsantikörpers erfolgt über die Zugabe von Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE), welches proportional zur Menge an gebundenem Analyt ein Signal von entsprechender Fluoreszenzintensität liefert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt mittels Durchflusszytometer und die Auswertung mit der Hersteller eigenen Software (LEGENDplex™ Data Analysis Software Version 8.0). Im Fall des LEGENDplex™ Human Inflammatory Panel (13-plex) können die Proteine IL-1 β , IFN α 2, IFN γ , TNF α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 und IL-33 gleichzeitig in einer Probe quantifiziert werden. Durch die Auftrennung der *beads* nach Größe und interner Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer werden verschiedene Protein spezifische Populationen gebildet, deren PE-Fluoreszenzsignal bestimmt werden kann. Um die Konzentration des entsprechenden Proteins bestimmen zu können, wird eine Standardkurve erstellt, die im Kit beinhaltet ist und unter gleichen Bedingungen wie die Proben für die Analyse vorbereitet wird.

Zur Bestimmung der Zytokinexpression von unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten sowie von Co-Kulturen aus ECP un-/behandelten Monozyten mit CD4+ T-Zellen wurden die Zellkulturüberstände der entsprechenden Ansätze zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Für die Untersuchung der Zytokine im Zellkulturüberstand der Monozyten wurden diese nach *in vitro* ECP mit einer Zellkonzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Monozytenmedium in 96-Well Platten ausgesät. Nach 1 Tag bzw. 2 Tagen Kultur wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, für 4 Minuten bei 400 g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und die Zellkulturüberstände anschließend bei -80 °C nach Herstellerangaben bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zellkulturüberstände der Co-Kulturen, die mit einer Zelldichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI + 10% HS Medium in 96-Well Platten ausgesät wurden, wurden in gleicher

Weise nach 1 Tag, 2 Tagen und 5 Tagen Co-Kultur abgenommen und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

3.7 Differenzierung von Makrophagen

Für die Generierung von Makrophagen wurden isolierte CD14+CD16+ Monozyten unter Stimulation mit 100 ng/ml M-CSF in 6-Well Platten mit einer Zelldichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in Makrophagenmedium ausgesät. An Tag 2 und 5 nach Isolation der Monozyten wurde das Medium ersetzt und die Zellen erneut mit 100 ng/ml M-CSF stimuliert (Abbildung 6). Nach 7 Tagen Kultivierungszeit wurden die Makrophagen *in vitro* ECP-behandelt, wie bereits für Monozyten beschrieben.

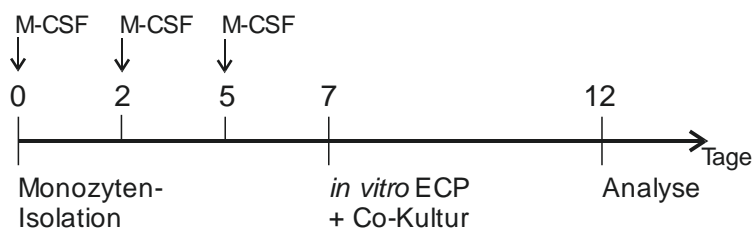


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Makrophagengenerierung. Aus PBMCs isolierte Monozyten wurden mit einer Dichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in 6-Well Platten ausgesät und mit 100 ng/ml M-CSF stimuliert. An den Tagen 2, 5 und 7 der Kultur erfolgte ein Mediumwechsel mit erneuter M-CSF Zugabe. Die *in vitro* ECP wurde an Tag 7 durchgeführt und die behandelten mit CD4+ T-Zellen bis Tag 12 unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper co-kultiviert.

3.8 Aufnahmen am Mikroskop

Die Generierung der Makrophagen wurde phänotypisch am Mikroskop analysiert. Hierfür wurden die Platten mit den ausgesäten, unstimulierten bzw. M-CSF stimulierten CD14+CD16+ Monozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten der M-CSF Zugabe am Mikroskop fotografisch aufgenommen. Verwendet wurden die 16x bzw. 32x Vergrößerung des Mikroskops.

3.9 Blockade der PD-L1-PD-1 bzw. PD-L2-PD-1 Achse

Durch die Blockade verschiedener, durch *in vitro* ECP auf Monozyten hochregulierter Oberflächenmoleküle mittels Antikörpern, sollte überprüft werden, ob eine Veränderung auf die Proliferationsfähigkeit von co-kultivierten T-Zellen festgestellt werden kann.

Hierfür wurden zum wie bisher beschriebenen *in vitro* ECP Modell 25 µg/ml des anti-PD-L1, anti-PD-L2 sowie des therapeutischen anti-PD-1 Antikörpers Pembrolizumab (Keytruda®) in die Co-Kultur zu gegeben. Die eingesetzte Konzentration wurde analog zur Pembrolizumab-Konzentration in der Studie von Patnaik *et al.* (2015) gewählt und ebenfalls für anti PD-L1 und anti PD-L2 Antikörper verwendet [207]. 5 Tage nach ECP-Behandlung erfolgte die Analyse der Proliferationsraten der CD3+CD4+ T-Zellen mit Hilfe des CFSE-Farbstoffs und Durchflusszytometrie. Um einen Einfluss des Antikörpers alleine auf die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen auszuschließen diente als Negativkontrolle der entsprechende Isotyp des anti-PD-L1 und anti-PD-L2 Antikörpers, da für den therapeutischen Antikörper Pembrolizumab kein Isotyp gefunden werden konnte. Dabei soll mit Hilfe der Isotypkontrolle eine unspezifische Bindung des Fc-Teils der Antikörper ausgeschlossen und Hintergrundsignale identifiziert werden.

3.10 *In vitro* Kombinationstherapie von Vitamin D3 Vorbehandlung und ECP

Bei der aktiven Form des Vitamin D handelt es sich um 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (1 α ,25-(OH)₂D3), das in Kombination mit Corticosteroiden in der Studie Anwendung fand. Daher sollte überprüft werden, wie sich eine Therapie der Monozyten mit Vitamin D3 vor *in vitro* ECP auf co-kultivierte T-Zellen auswirkt.

Aus PBMCs gesunder Spender isolierte Monozyten wurden in RPMI + 10 % HS in Polypropylen-Röhrchen (Zelldichte 1,0 x 10⁶ Zellen/ml) bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Zugabe von 0,1 µM Vitamin D3 inkubiert. Nach 4 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit RPMI + 10 % HS gewaschen, um überschüssiges Vitamin D3 aus der Zellsuspension zu entfernen. Die auf diese Weise mit Vitamin D3 vorbehandelten Monozyten wurden anschließend *in vitro* ECP-behandelt. Die Kultivierung der 1 α ,25-(OH)₂D3 stimulierten Monozyten erfolgte in RPMI + 10 % HS mit CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) und unter anti-CD3 Antikörper Stimulation für 5 Tage.

3.11 Nukleinsäureisolation

Die Isolation von RNA aus Monozyten oder CD4+ T-Zellen aus der Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten erfolgte mit Hilfe des Quick-RNA™ MicroPrep Kits (Zymo Research) zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierfür wurden Monozyten an Tag 1 bzw. Tag 2 nach *in vitro* ECP mechanisch abgelöst, sowie T-Zellen aus den Co-Kulturen mit Monozyten an Tag 2 bzw. Tag 5 nach *in vitro* ECP geerntet, entsprechend den Herstellerangaben in Lyse-Puffer resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Durch das Quick-RNA™ MicroPrep Kit wird eine effiziente und schnelle Isolation von DNA-freier RNA ermöglicht, sodass die hoch-konzentrierte RNA für RT-PCR, Hybridisierung, Sequenzierung, usw. verwendet werden kann (Informationen aus Überblick von Zymo Research).

Nachdem dem Auftauen der Zellsuspension, wurde diese 1:1 mit Ethanol (95 % - 100 %) verdünnt und die Mischung auf eine Zymo-Spin IC Column übertragen. Die Säule wurde 30 Sekunden bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem Waschschrift wurde eine DNase Behandlung durchgeführt, indem der vom Hersteller mitgelieferte DNase I Reaktionsmix angesetzt und für 15 Minuten bei RT auf der Säulenmatrix inkubiert. Daraufhin wurde der Reaktionsmix durch erneute Zentrifugation entfernt und die Säule zunächst mit *RNA Prep Buffer*, dann mehrfach mit *RNA Wash Buffer* gewaschen. Die Elution der RNA von der Säulenmatrix erfolgte mittels 15 µl DNase/RNase-freiem Wasser. Die so isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.12 Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Überprüfung der Isolation von Nukleinsäuren wurden die RNA-Konzentrationen mit Hilfe des NanoDrops oder des Qubit RNA HS Assays überprüft und die Qualität der isolierten RNA mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Kit am Bioanalyzer überprüft.

3.12.1 NanoDrop

Die Konzentrationsmessung der RNA für RT-PCR Analysen erfolgte mittels des NanoDrop1000 Spektralphotometer durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm und anschließender Berechnung der RNA-Konzentration mit Hilfe der Beer-Lambert Gleichung (Formel 3):

$$c = (A * e) / b$$

Formel 3: Beer-Lambert Gleichung

Die Variable c steht für die Konzentration (in ng/ml), A für die Absorption (in AU), während e den Wellenlängen-spezifischen Extinktionskoeffizient (für RNA: 40 ng-cm/ μ l) und b die Weglänge (für NanoDrop1000 Spektralphotometer: 1,0 mm und 0,2 mm) beschreibt. Als Referenz wurde RNase freies Wasser für die Messung verwendet.

Um das Verhältnis der Probenabsorption zu berechnen, misst das Spektralphotometer die Absorption außerdem bei 280 nm. Daraus ergibt sich der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} für reine RNA und sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Alle Messungen wurden stets in Duplikaten durchgeführt.

3.12.2 Qubit

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren für die Transkriptomanalysen mittels NGS erfolgte mit Hilfe des Qubit® 2.0 Fluorometers am Fraunhofer IGB. Dabei handelt es sich um eine Fluoreszenzmessmethode, bei der sich mit einem Farbstoff markierte, molekulare Sonden je nach verwendetem Assay an spezifische Zielmoleküle anlagern. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe des Qubit® RNA HS Assays bestimmt, der einen Messbereich von 250 pg/ μ l – 100 ng/ μ l gewährleistet. Mit Hilfe des Qubit® DNA HS Assays wurde die Konzentration der DNA bestimmt, wobei der Messbereich bei 0,2 – 100 ng liegt.

3.12.3 Fragment Analyzer

Konzentration und Qualität der isolierten RNA für die Transkriptomanalysen mittels NGS wurde am Fraunhofer IGB mit Hilfe des RNA 6000 Nano Kits und des 2100 Fragment Analyzer bestimmt. Das zugrunde liegende Prinzip der Messung basiert auf der Übertragung der traditionellen gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren auf Chip-Format. Durch mikrofluidische Kanäle im Chip sind die Wells für Proben, Gel und externen Standard untereinander verbunden. Die Beladung des Chips erfolgte nach Herstellerangaben und erforderte eine initiale Denaturierung der RNA bei 70 °C für 2 Minuten. Anschließend erfolgte die Auslesung im Fragment Analyzer, indem durch Anlegen eines elektrischen Stroms die Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Laser-induzierte Fluoreszenz werden die Komplexe detektiert, die durch Interkalation von Farbstoffmolekülen mit Nukleinsäuren entstehen und als Gel-ähnliches Bild (Banden) sowie im Elektropherogramm dargestellt werden. Die Analyse erfolgte mittels 2100 Expert-Software.

3.13 Probenvorbereitung für die RT-PCR

Analysen der Genexpression mittels RT-PCR erfordern Arbeitsschritte von der RNA Isolation und Quantifizierung, über die Reverse Transkription der RNA in cDNA, hin zur Quantitativen Real Time PCR.

3.13.1 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Im Rahmen der reversen Transkription wird das RNA-Template durch die Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase in komplementäre DNA (Englisch: *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. In dieser Arbeit wurde für die reverse Transkription das GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Zunächst wurden 9 µl der isolierten RNA (bis 5 µg/ Reaktion) mit [Oligo/dT]₁₅ Primern 5 Minuten bei 70 °C und anschließend 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des GoScript Reaktionsmixes angesetzt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Pipettierschema für den GoScript Reaktionsmix.

Komponente	GoScript Reaktionsmix		Gesamtkonzentration in 20 µl Reaktion	
	1 Probe	N Proben		
Nuklease-freies Wasser (ad 10µl)	1,5 µl	N x 1,5 µl		
GoScript 5x Reaktion Buffer	4,0 µl	N x 4,0 µl	1x	
MgCl ₂ , 25 mM	2,0 µl	N x 2,0 µl	2,5 mM	
PCR Nukleotide Mix, 10 mM	1,0 µl	N x 1,0 µl	0,5 mM	
Recombinant RNasin, Ribonuklease Inhibitor	0,5 µl	N x 0,5 µl	20 Units	
GoScript Reverse Transkriptase	1,0 µl	N x 1,0 µl		
Gesamtvolumen	10,0 µl	N x 10,0 µl		

Dieser Reaktionsmix wurde mit der vorbereiteten RNA-Primer Mischung 1:1 versetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl erhalten wurde. Der Umschrieb der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) und dem aufgeführten Programm (Tabelle 22).

Tabelle 22: Programm für die reverse Transkription.

Schritt	Temperatur	Zeit
<i>Anneal</i>	25 °C	5 min
<i>Extend</i>	42 °C	1 h
<i>Inactivate</i>	70 °C	15 min
<i>Chill</i>	4 °C	<i>hold</i>

Die so erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.13.2 Quantitative Real Time PCR

Die Quantitative Real Time PCR (Englisch: *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*, kurz: RT-PCR) ermöglicht eine simultane Amplifikation und Quantifizierung von über Primer spezifizierte DNA-Molekülen. Der Methode zugrunde liegt die Bindung des Farbstoffs BRYT Green® Dye an Doppelstrang-DNA und die Detektion der Akkumulation des PCR-Produkts. In jedem Zyklus der PCR kann die DNA-Konzentration gemessen werden, da sich das Fluoreszenzsignal dann erhöht, wenn sich die Ausbeute des DNA-Produkts erhöht. Mit Hilfe des Real-Time PCR Detection Systems CFX96 (Bio-Rad) wurde die Fluoreszenz einer jeden Probe mit hoher Sensitivität und ohne Überlagerung mit anderen Proben gemessen. Die Ausgabe der Daten erfolgt in den meisten Fällen als Ct-Wert (Englisch: *cycle threshold values*), der als Zyklusnummer definiert ist, bei dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal den Schwellenwert übersteigt. Bei der Analyse der RT-PCR ist eine Normalisierung der Genexpression auf ein ausgewähltes, von den entsprechenden Zellen stabil exprimiertes Referenzgen (Englisch: *housekeeper*) notwendig.

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mit Hilfe des GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) und dem Real-Time PCR Detection System CFX96 (Bio-Rad). 5 ng cDNA wurden pro Reaktion eingesetzt und den Herstellerangaben entsprechend mit dem vorbereiteten GoScript qPCR Reaktionsmix gemischt, wobei das Volumen des cDNA Templates nicht höher als 20% des Reaktionsvolumens sein sollte (Tabelle 23). Für die entsprechenden Gene wurden spezifische Primerpaare (eurofins, biomol) verwendet, die sich aus einem *Forward* Primer und einem *Reverse* Primer zusammensetzen und mit einer Konzentration von 200 nM (SOCS1, SOCS3, RPL13A) bzw. 500 nM (MIF) in der Reaktion verwendet wurden. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser statt cDNA Template.

Tabelle 23: Pipettierschema für den GoScript qPCR Reaktionsmix

Komponente	Volumen	Endkonzentration für 10 µl Reaktion
cDNA	2,0 µl	2,5 ng/µl
GoTaq qPCR Master Mix, 2x	5,0 µl	1x
Nuklease-freies Wasser (ad 10 µl)	2,0 µl	
Forward Primer und Reverse Primer (im Primer-Mix, siehe oben)	1,0 µl	je 200 nM (SOCS1, SOCS3 und RPL13A Primerpaare) je 500 nM (MIF Primerpaar)
Gesamtvolumen	10,0 µl	

Für die Quantifizierung der cDNA wurden die hier aufgeführten PCR-Programme verwendet (Tabelle 24 und 25).

Tabelle 24: Programm für qRT-PCR mit SOCS-1 und SOCS-3 Primerpaaren.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
GoTaq Hot Start Polymerase Aktivierung	1	95 °C	2 min
Denaturierung	40	95 °C	15 s
Annealing/ Extension		60 °C	1 min
Dissoziation	1	60-95 °C	

Tabelle 25: Programm für qRT-PCR mit MIF Primerpaar.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
GoTaq Hot Start Polymerase Aktivierung	1	95 °C	5 min
Denaturierung	40	95 °C	15 s
Annealing		55 °C	30 s
Extension		72 °C	30 s
Dissoziation	1	55-95 °C	

Nach Abschluss des qRT-PCR wurden die Ct-Werte auf das Referenzgen RPL13A [205] normalisiert und anschließend mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode die n-fache Veränderung der Genexpression berechnet, wie bereits in anderen Studien beschrieben [208-210].

Die Größe der erhaltenen PCR-Fragmente wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.13.3 Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR erfolgte mittels Gelelektrophorese, bei der die DNA-Fragmente über ein 2 %-iges (v/v) Agarosegel mit GelRed (100 V, 60 Minuten, 1x TAE-Laufpuffer) ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Als Probenpuffer wurde das 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, #SM1331) und zur Kontrolle der Fragmentgröße der Marker Hyper Ladder 50 bp (Bioline) verwendet.

3.14 Probenvorbereitung für NGS

Für die Sequenzierung der Proben zur Transkriptomanalyse wurde eine cDNA-Bibliothek hergestellt, deren Qualität und Quantifizierung mit Hilfe des Fragment Analyzers (DNA High Sensitivity Kits und DNA 1000 Chips) und des Qubits (RNA HS Kit) überprüft wurde. Die Versuchsdurchführung erfolgte durch die Arbeitsgruppe „Funktionelle Genanalysen“ am Fraunhofer IGB.

3.14.1 cDNA-Bibliotheken

Die Herstellung der cDNA-Bibliotheken erfolgte mit Hilfe des TruSeq RNA Sample preparation v2 Protokolls von Illumina nach Herstellerangaben. Eingesetzt wurden 200 ng der aus Monozyten bzw. T-Zellen isolierten RNA (siehe Abschnitt 3.11).

3.15 Sequenzierung am HiSeq 2500

3.15.1 Erstellung des Sequenzierpools

Für eine genauere Quantifizierung der Sequenzierbibliotheken erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Qubit dsDNA High Sensitivity Assays. Die tatsächliche Stoffmengenkonzentration der Bibliotheken wurde anschließend berechnet und die Bibliotheken auf eine für die Beladung der *flow cell* benötigte Stoffmengenkonzentration von 2 nM in EB-Puffer eingestellt. Zur Erstellung des Sequenzierpools wurden die Sequenzierbibliotheken im gleichen Verhältnis gemischt, um für alle Proben eine einheitliche Sequenziertiefe (insgesamt zu sequenzierende *reads* pro Probe) zu gewährleisten. Dieser Sequenzierungspool wird erneut mit Hilfe des Agilent DNA High Sensitivity Assays am Fragment Analyzer und des Qubit dsDNA High Sensitivity Assays auf seine Qualität

überprüft und dem HiSeq® 2500 System User Guide entsprechend für den Rapid Run weiter aufbereitet.

3.15.2 Cluster Generierung

Die Cluster Generierung für den Rapid Run erfolgte auf dem HiSeq 2500 (*on board*). Dieser Schritt dient der Hybridisierung der einzelnen cDNA-Fragmente über die angefügten Adapter mit den auf der *flow cell*-Oberfläche immobilisierten Oligonukleotiden. Nach einem Denaturierungsschritt der DNA erfolgt eine Amplifikation mittels Brücken-PCR (*bridge-PCR*). Dadurch entsteht nach mehreren Zyklen eine Vielzahl an der flow Cell-Oberfläche gebundener Klone (Cluster).

3.15.3 Sequenzierung am HiSeq 2500

Die Sequenzierung der Bibliotheken erfolgte am HiSeq 2500 von Illumina. Aufgrund der Illumina-Technologie, die auf der Sequenzierung durch Synthese basiert, wird jedes eingebaute Nukleotid mit Hilfe von Bildaufnahmen eines erzeugten Fluoreszenzsignals detektiert. Alle Sequenzierungen erfolgten mit single-end 65 bp langen *reads* entsprechend den Herstellerangaben mit dem Rapid Run des HiSeq2500. Die durchschnittliche Sequenziertiefe lag bei 28,3 Millionen *reads*.

3.16 Auswertung

3.16.1 Auswertung der Daten aus Durchflusszytometrie

Die mit Hilfe der Durchflusszytometrie am LSR II (BD) erhobenen Daten wurden in Form von .fcs-Dateien exportiert und über FACS Diva Version 6.1.3 (BD) oder über FLOWJO Version 10 (FlowJo.LLC) ausgewertet.

3.16.2 Zytokinexpressionsanalyse

Durch die Messung am Durchflusszytometer LSR II (BD) wurden .fcs-Dateien generiert, die für die Auswertung der Zytokinexpression mittels LEGENDplex™ Data Analysis Software Version 8.0 benötigt werden. Anschließend wurden die Konzentrationen der Analyte IL-1 β , IFN α 2, IFN γ , TNF α ,

MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 und IL-33 (LEGENDplex™ Human Inflammatory Panel, 13-plex) mit Hilfe einer mitgeführten Standardkurve durch die Auswertungssoftware unter Vorgabe der Probenverdünnung ausgerechnet.

3.16.3 Transkriptomanalyse

Alle sequenzierten Bibliotheken wurden während der Probenaufbereitung mit Barcodes (Indizes) versehen, damit sie anschließend in dem Sequenzierpool wiedergefunden werden konnten. Mit Hilfe der von Illumina mitgelieferten Software CASAVA (Version 1.8.1 oder höher) wurden die Proben separiert und einzelne *.fastq-Dateien pro sequenzierte Bedingung generiert.

Die durch die Sequenzierung erhaltenen *reads* wurden gegen das humane Referenzgenom GRCh38 mit Hilfe des NextGenMap (v. 0.4.12) mit bereits gegebenen Voreinstellungen gemapped [211]. Die weitere Quantifizierung der Gene als *raw reads* wie auch als RPKM (= *reads per kilobase of exon model per million mapped reads*; entsprechend Mortazavi et al. [212]) erfolgte ausschließlich mit eindeutig gemappten *reads* anhand der Annotation GRCh38.80.

Um differentiell exprimierte Gene zwischen unbehandelten und *in vitro* ECP-behandelten Monozyten sowie den entsprechenden Co-Kulturen zu identifizieren, wurde edgeR (Version 3.4.2) verwendet. Hierbei wurden zwei biologische Replikate pro Bedingung auf Basis der *raw read counts* in die Analysen miteinbezogen [213]. Berücksichtigt wurden für die weiteren Untersuchungen alle Gene, die einen korrigierten p-Wert (Englisch: *false discovery rate*, FDR) < 0,05, einen mean log₂ CPM (Englisch: *counts per million*) > 4 und einen log₂ FC (Englisch: *fold change*) ≤ -1 oder ≥ 1 besaßen und zwischen zwei Bedingungen signifikant differentiell reguliert wurden.

Weitere Untersuchungen der differentiell exprimierten Gene erfolgte mittels DAVID web tool (<https://david.ncifcrf.gov/>). Hierfür wurde zunächst mittels Venn-Diagramm Generator (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>) überprüft, welche Gene nur an einem Zeitpunkt (Monozyten: 1 Tag oder 2 Tage; Co-Kultur: 2 Tage oder 5 Tage) oder an beiden Zeitpunkten durch ECP hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Anschließend wurden die Gene mit Hilfe des DAVID web tools in Überkategorien eingeteilt. Die für weitere Analysen interessanten Kategorien aus den ersten 25 Kategorien, denen die meisten Gene zugeordnet wurden, wurden daraufhin auf ihre Einteilung hin überprüft.

3.16.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism Version 7.0. Soweit nicht anders vermerkt, wurde die statistische Signifikanz beim Vergleich zweier Bedingungen mit Hilfe des gepaarten Studentischen T-Tests ermittelt. Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als signifikant betrachtet (*p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001; **** p≤0,0001).

3.17 Patienten und Probenmaterial

Blut von gesunden Spendern wurde in Form von *Buffycoats* von der Blutspendezentrale Tübingen zur Verfügung gestellt. Sechs ECP Patienten wurden von der Dialysestation der Universitätskinderklinik Tübingen rekrutiert. Die Ethikkommission der Universität Tübingen hat der Studie zugestimmt (360/2016BO1). Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben und wurden von einem Prüfarzt hinsichtlich der Probenverwendung und -dokumentation aufgeklärt. In Tabelle 26 sind die Informationen zu den in der Studie beteiligten Patienten aufgeführt:

Tabelle 26: Patienten-Charakteristika der an der Teilnehmer an der ECP-Studie.

Charakteristik	Zahl	%
Geschlecht		
Männlich	5	83,3
Weiblich	1	16,7
Alter (Jahre \pm SD)	50 \pm 15	
ECP seit (Monaten \pm SD)	32,8 \pm 32,2	
Diagnose		
Transplantatabstoßung	2	33,3
Sézary Syndrom	2	33,3
GvHD	2	33,3
Immunsuppressive Therapie		
Bexaroten	1	16,7
Roferon	1	16,7
Tacrolimus	4	66,7
Prednisolon	4	66,7
Mycophenolate mofetil	2	33,3
Vitamin D3	1	16,7
Azathioprin	1	16,7
Interferon	1	16,7

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines *in vitro* ECP-Modells

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte ein *in vitro* ECP-Modell etabliert werden, anhand dessen der Wirkmechanismus der ECP genauer untersucht werden kann. Dadurch soll es ermöglicht werden, Analysen unabhängig vom Zugang zu Patientenmaterial, der Probenmenge sowie den Indikationen und Vortherapien der Patienten durchführen zu können. Da das Wissen über die Rolle der Monozyten bei ECP in der Literatur limitiert und kontrovers ist, sollte hierbei eine Fokussierung auf die ECP-induzierten Effekte von und auf Monozyten erfolgen.

4.1.1 Auswahl der Parameter und Zelltypen anhand der Literatur

Der erste Schritt bei der Etablierung des *in vitro* ECP-Modells liegt in der Definition ausgewählter Parameter für die Behandlung, um anschließend die erhaltenen Resultate aus den Analysen vergleichen und in den Gesamtzusammenhang einordnen zu können. Bei diesen Parametern handelt es sich um die Konzentration des Photoaktivators UVADEX[®], die Intensität der UV-A Strahlung und die zu untersuchenden Zelltypen. Aus der Literatur sind bereits unterschiedliche Modelle bekannt, die eine Untersuchung des Wirkmechanismus der ECP-Therapie ermöglichen. Angelehnt an zuvor evaluierte ECP-Modelle und an die in der Klinik verwendeten Dosen, wurde für das *in vitro* ECP-Modell eine UVADEX[®]-Konzentration von 200 ng/ml verwendet, die Zellen 15 Minuten mit UVADEX[®] im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 2 J/cm² UV-A-Licht bestrahlt [167, 171]. Da die beiden Komponenten Photoaktivator und UV-A-Licht getrennt voneinander keine Anwendung in der Klinik finden, wurden diese Ansätze falls notwendig als Kontrollansätze herangezogen.

In der Literatur wird bereits beschrieben, dass nicht alle im Blut vorkommenden Zelltypen gleichermaßen auf die ECP-Behandlung reagieren und überleben. Insbesondere die Ansichten in der Literatur zur Überlebensfähigkeit von CD14⁺ Monozyten sind kontrovers. Edelson *et al.* haben Monozyten als wichtigsten Auslöser des positiven Effekts der ECP aufgeführt [121]. Daher sind Monozyten für weitere Analysen zur Aufklärung des Wirkmechanismus der ECP von Interesse und wurden in dem hier vorliegenden *in vitro* ECP-Modell berücksichtigt. Insbesondere der Einfluss ECP-behandelter Monozyten auf CD4⁺ T-Zellen sollte im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht werden, da die ECP eine Behandlungsstrategie für viele Erkrankungen mit aberranten T-Zellen ist und somit Einsicht in die Modulation des Immunsystems durch ECP gewonnen werden könnte.

4.1.2 Festlegung des *in vitro* ECP-Modells

Für die Etablierung des *in vitro* ECP-Modells wurden Monozyten und CD4+ T-Zellen aus PBMCs gesunder Spender mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Die Reinheit der Zellen nach Isolation wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag für CD14+CD16+ Monozyten bei etwa 91 % und für CD3+CD4+ T-Zellen bei etwa 95 %. Anschließend wurden unbehandelte bzw. *in vitro* ECP-behandelte Monozyten mit unbehandelten bzw. *in vitro* ECP-behandelten CD4+ T-Lymphozyten in einem Verhältnis von 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 monoklonalem Antikörper co-kultiviert, analog zu bereits in dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Co-Kultur Versuchen [214]. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob CD3+CD4+ T-Zellen nach Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten vital bleiben. Durch die Behandlung von sowohl Monozyten als auch CD4+ T-Zellen mit dem Photoaktivator UVADEX® bzw. UV-A-Licht alleine, sollte ein separater Effekt der einzelnen Behandlungskomponenten auf die Zellen ausgeschlossen werden. Nach 5 Tagen wurden die CD4+ T-Zellen mit Hilfe von Oberflächenantikörpern gegen CD3 und CD4 phänotypisch charakterisiert und mittels lebend/tot Farbstoff auf ihre Viabilität überprüft.

Der Anteil lebender CD3+CD4+ T-Zellen betrug nach Co-Kultur von unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten mit unbehandelten CD4+ T-Zellen 81,68 % ± 3,85 % bzw. 85,03 % ± 2,32 % (schwarze Umrandung, Abbildung 7).

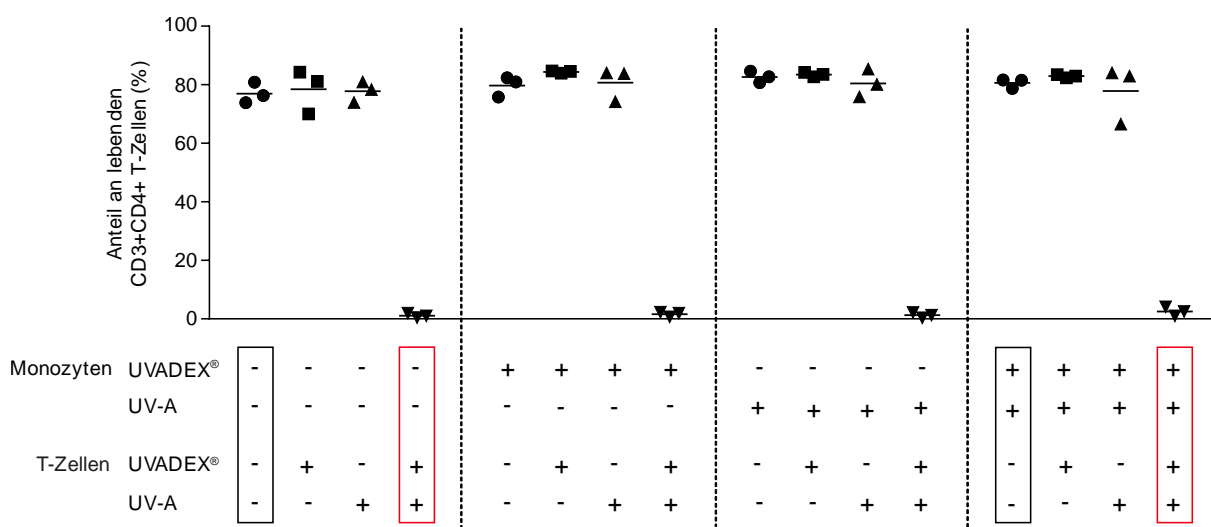


Abbildung 7: Viabilität von CD3+CD4+ T-Zellen in Co-Kulturen aus ECP-behandelten Monozyten und/oder CD4+ T-Zellen. Getestet wurden verschiedene Kombinationen an ECP un-/behandelten Monozyten und CD4+ T-Zellen. Die verwendeten Dosen waren 200 ng/ml UVADEX® und 2 J/cm² UV-A-Licht. Gezeigt ist der Anteil lebender CD3+CD4+ T-Zellen nach 5 Tagen Co-Kultur mit Monozyten im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 monoklonalem Antikörper. Die Messung erfolgte pro Spender in Duplikaten. n=3.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die ECP-Behandlung der isolierten CD4+ T-Zellen der Anteil der lebenden CD3+CD4+ T-Zellen sowohl nach Co-Kultur mit unbehandelten als auch mit ECP-behandelten Monozyten deutlich auf 3,43 % ± 2,27 % bzw. 4,12 % ± 2,53 % reduziert wurde (rote

Umrandung). Eine Behandlung der Monozyten und CD4+ T-Zellen mit UVADEX® und UV-A-Licht alleine führte zu keiner Veränderung der prozentualen Anteile lebender CD3+CD4+ T-Zellen.

Mit Hilfe des hier vorliegenden *in vitro* ECP-Modells wurde eine geeignete Möglichkeit gefunden, um den Einfluss von ECP-behandelten Monozyten auf eine unbehandelte T-Zell Population zu untersuchen, da in der Co-Kultur die CD3+CD4+ T-Zellen überlebensfähig sind. Daher wurden für die nachfolgenden Analysen PBMCs gesunder Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und durch magnetische Zellseparation Monozyten und CD4+ T-Zellen desselben Spenders isoliert. Im *in vitro* ECP-Modell mit gesunden Spendern konnte auf ein autologes Modell zurückgegriffen werden, da ausreichend Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Anschließend wurden die Monozyten unbehandelt (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) belassen bzw. *in vitro* ECP-behandelt (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) und mit unbehandelten CD4+ T-Zellen für fünf Tage im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper co-kultiviert.

4.2 Einfluss ECP-behandelter Monozyten auf T-Zellen im *in vitro* Modell

Nachdem das *in vitro* ECP-Modell festgelegt wurde, sollte überprüft werden, welche Effekte durch die ECP-Behandlung von Monozyten auf CD4+ T-Zellen ausgeübt werden. Die Untersuchung dieser Effekte ist von großem Interesse, da die ECP zur Behandlung von beispielsweise Erkrankungen mit aberranten T-Zellen eingesetzt wird und daher Aufschluss über Veränderungen auf Seiten der T-Zellen geben könnte.

Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass ECP-behandelte DCs, die aus PBMCs des Photophoresesprodukts von Patienten mit refraktärer cGvHD isoliert wurden, keine T-Zellproliferation mehr induzieren können [176]. Außerdem konnte in der Literatur eine Verschiebung der Th1- und Th2-Immunantworten nach ECP abhängig von der behandelten Indikation nachgewiesen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Fragestellung nachgegangen, welchen Einfluss ECP-behandelte Monozyten auf die Proliferationsfähigkeit von CD3+CD4+ T-Zellen, die Veränderung der Anteile von Tregs sowie anti- und proinflammatorischen T-Zelltypen im *in vitro* ECP-Modell ausüben.

4.2.1 Änderung der T-Zellproliferation im *in vitro* ECP-Modell

Die Analyse der Proliferationsfähigkeit von CD3+CD4+ T-Zellen nach Co-Kultur mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten erfolgte mittels Analyse der CFSE markierten der T-Zellen am Durchflusszytometer 5 Tage nach ECP (Abbildung 8 A).

Es konnte gezeigt werden, dass 72,63 % ± 16,68 % der lebenden CD3+CD4+ T-Zellen aus Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten proliferierten (Abbildung 8 B). Der Anteil an proliferierenden T-Zellen in Co-Kultur mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten lag hingegen bei 50,70 % ± 21,34 % der

lebenden CD3+CD4+ T-Zellen, was einer signifikanten Abnahme von $22,06\% \pm 14,37\%$ der Proliferation entspricht ($n=41$, $p<0,0001$).

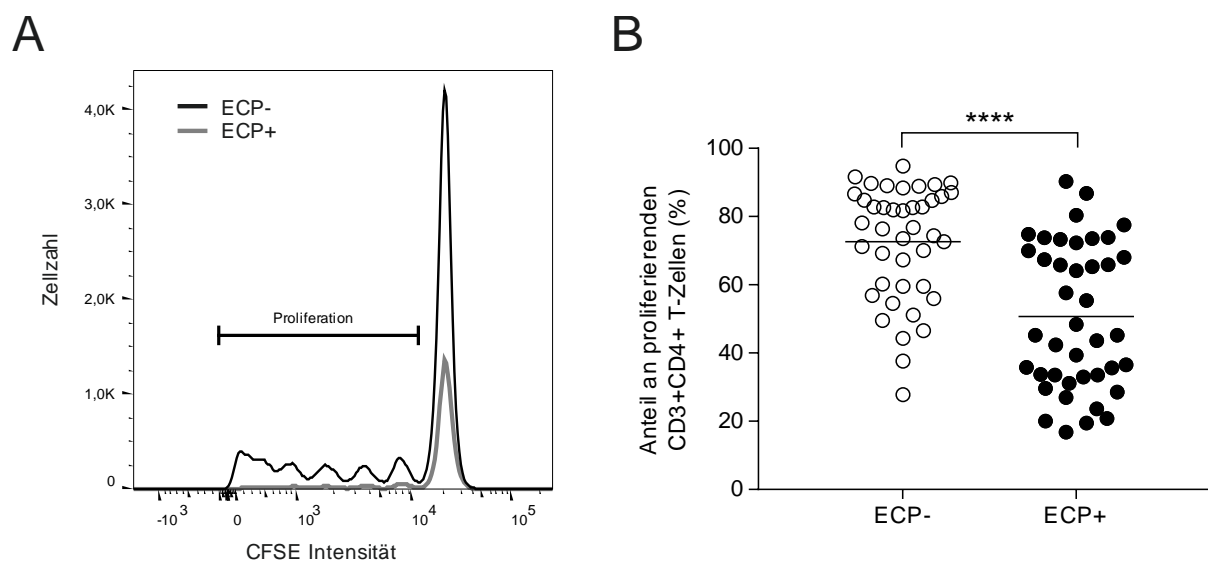


Abbildung 8: Proliferation von CD3+CD4+ T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell. Überprüft wurde die Proliferationsfähigkeit von CD3+CD4+ T-Zellen in Co-Kultur mit unbehandelten (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A-Licht) bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A-Licht) Monozyten im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation. Der Anteil proliferierender CD3+CD4+ T-Zellen wurde mittels CFSE-Markierung am Durchflusszytometer 5 Tage nach Kultur bestimmt. **(A)** Exemplarische Histogrammansicht der Durchflusszytometrieanalyse der T-Zellproliferation in Co-Kulturen von unbehandelten (schwarz) bzw. ECP-behandelten Monozyten (grau) mit CD4+ T-Zellen. **(B)** Darstellung aller untersuchten Spender hinsichtlich der T-Zellproliferation im *in vitro* ECP-Modell. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. $n=41$. **** $p<0,0001$.

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten gesunder Spender und eine anschließende Co-Kultur mit autologen T-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsfähigkeit von CD3+CD4+ T-Zellen führt.

4.2.2 Induktion anti- und proinflammatorischer T-Zelltypen im *in vitro* ECP-Modell

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die *in vitro* ECP von Monozyten auf die Verteilung anti- und proinflammatorischen T-Zelltypen hat, wurden nach 5 Tagen Co-Kultur im *in vitro* ECP-Modell die T-Zellen mittels Oberflächenfärbung und intrazellulärer Färbung für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Untersucht wurden die Veränderungen der Anteile von CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen, sowie von antiinflammatorischen CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen, CD3+CD4+IL-10+ T-Zellen und proinflammatorischen CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen, CD3+CD4+IL-

17A+ Th17-Zellen, CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen und CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen, wie exemplarisch für einen Spender gezeigt (Abbildung 9 A).

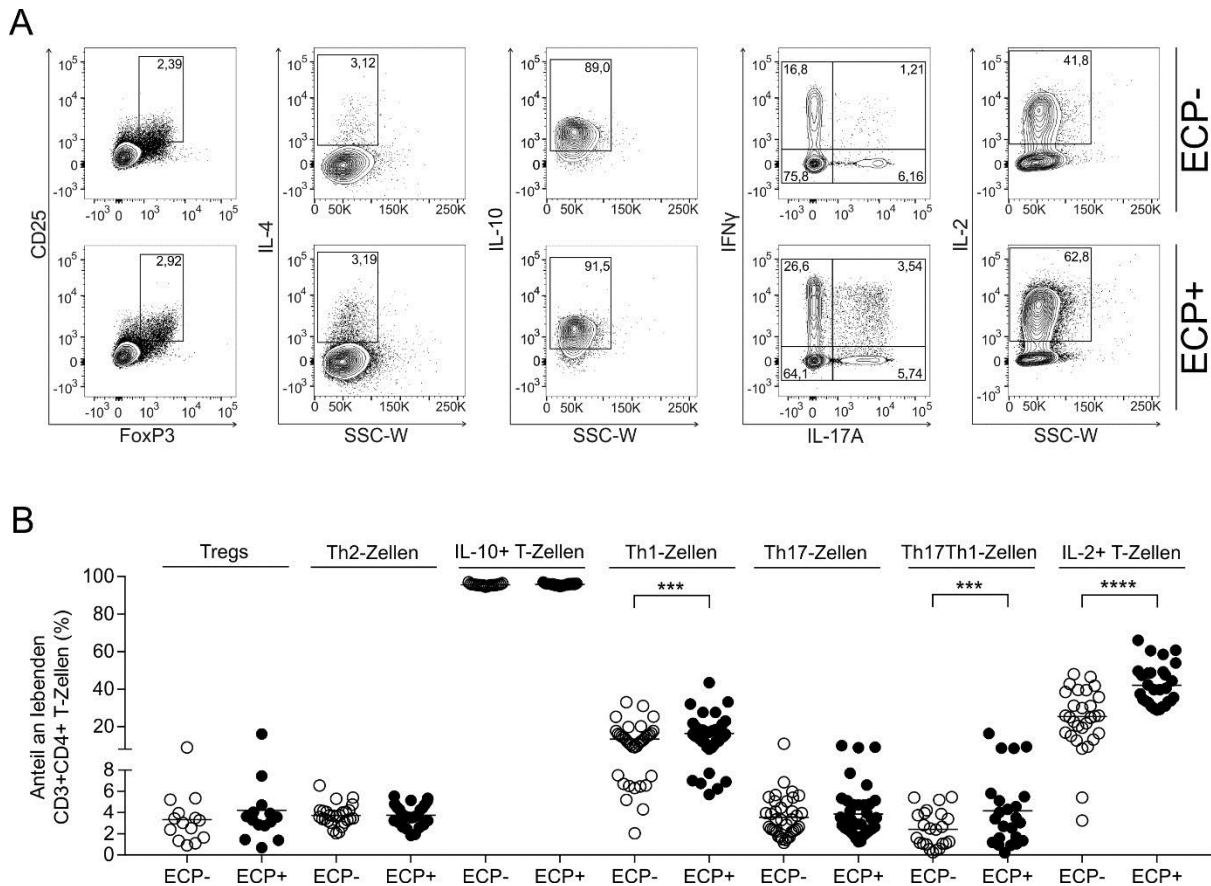


Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Tregs, pro- und antiinflammatorischen T-Zelltypen nach Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte Monozyten (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) wurden mit unbehandelten CD4+ T-Zellen unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) 5 Tage co-kultiviert und anschließend mittels Oberflächen- und intrazellulärer Färbung für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. **(A)** Exemplarische Gating-Strategie für die Induktion von CD3+CD4+CD25+FoxP3+ Tregs, antiinflammatorischen CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen, CD3+CD4+IL-10+ T-Zellen sowie proinflammatorischen CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen, CD3+CD4+IL-17A+ Th17-Zellen, CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen und CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen durch unbehandelte bzw. *in vitro* ECP-behandelte, co-kultivierte Monozyten. **(B)** Anteile der Tregs (n=14), antiinflammatorischen Th2-Zellen (n=27), IL-10+ T-Zellen (n=18) sowie proinflammatorischen Th1-Zellen (n=37), Th17-Zellen (n=37), Th17Th1-Zellen (n=37) und IL-2+ T-Zellen (n=29) an lebenden T-Zellen in Co-Kultur mit unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. ****p<0,0001; ***p<0,001.

Nach ECP-Behandlung der Monozyten und anschließender Co-Kultur mit unbehandelten CD4+ T-Zellen (Ansatz ECP+) nahmen die Anteile der Tregs von 3,33 % \pm 2,12 % in den unbehandelten Ansätzen (ECP-) auf 4,21 % \pm 3,78 % (n=14) (Abbildung 9 B) nicht signifikant zu. Des Weiteren

wurden keine Veränderungen der Anteile der antiinflammatorischen Th2-Zellen und IL-10+ T-Zellen (n=18) an lebenden CD3+CD4+ T-Zellen nach ECP festgestellt (Abbildung 9 B). Das Level der IL-10+ T-Zellen war in allen Spendern bereits vor ECP so hoch, dass die Durchflusszytometrie keine geeignete Methode zur Detektion von Unterschieden zwischen den unbehandelten und ECP-behandelten Ansätzen darstellte und keine Analyse mit weiteren Spendern durchgeführt wurde. Im Gegensatz hierzu konnte eine signifikante Zunahme der Anteile der inflammatorischen Th1-Zellen (n=37, p=0,0005), Th17Th1-Zellen (n=37, p<0,0001) und IL-2+ T-Zellen (n=29, p<0,0001) in den behandelten Ansätzen signifikant nachgewiesen werden (Abbildung 9 B). Der Anteil an induzierten proinflammatorischen Th17-Zellen blieb durch ECP-Behandlung unverändert (n=37).

Die Co-Kultur von ECP-behandelten Monozyten mit autologen CD4+ T-Zellen führte somit zu einer Induktion von proinflammatorischen T-Zelltypen während antiinflammatorische T-Zellen anteilmäßig unbeeinflusst blieben.

4.3 Bedeutung des Zellkontakts im *in vitro* ECP-Modell

Die bisherigen Analysen haben ergeben, dass die *in vitro* ECP von Monozyten die T-Zellproliferation signifikant reduziert sowie die Induktion von proinflammatorischen T-Zelltypen in Co-Kulturen mit unbehandelten CD4+ T-Zellen fördert. Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Expression von IL-17 in humanen CD4+ T-Zellen durch Zellkontakt zu Monozyten via T-Zellrezeptorligation stark erhöht wird [215]. Daher stellte sich die Frage, ob die Abnahme der T-Zellproliferation sowie die Induktion von proinflammatorischen T-Zelltypen im *in vitro* ECP-Modell ebenfalls abhängig vom Zellkontakt zwischen ECP-behandelten Monozyten und unbehandelten T-Zellen ist oder ob von Monozyten sekretierte Zytokine für diesen Effekt ausreichend sind. Zudem sollte eine genaue Charakterisierung der Zellkulturüberstände von ECP-behandelten Monozyten bzw. von Co-Kulturen aus T-Zellen mit ECP-behandelten Monozyten Aufschluss hinsichtlich Veränderungen des vorherrschenden Zytokinmilieus nach ECP geben.

4.3.1 Zellkontakt-Abhängigkeit der im *in vitro* ECP-Modell beschriebenen Effekte auf T-Zellen

Für die Analysen der Bedeutung des Zellkontakts für die zuvor im *in vitro* ECP-Modell beschriebenen Effekte auf T-Zellen, wurde das *in vitro* ECP-Modell an die neue Fragestellung angepasst. Hierfür wurden unbehandelte bzw. ECP-behandelte Monozyten 24 Stunden in Zellkulturplatten inkubiert und anschließend entweder mit frisch isolierten T-Zellen co-kultiviert (Ansatz „Zellkontakt“) oder der Zellkulturüberstand der Monozyten auf frisch isolierte T-Zellen übertragen (Ansatz „Überstand“). Verglichen wurden diese Ansätze mit den Proliferationsraten der T-Zellen in Co-Kultur mit

unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten direkt nach ECP (Ansatz „Referenz“, bisheriges *in vitro* ECP-Modell). Die Ansätze „Zellkontakt“ und „Referenz“ wurden mit anti-CD3 Antikörper stimuliert, wohingegen der Ansatz „Überstand“ zusätzlich einen Stimulus durch anti-CD28 Antikörper erhielt. Für die Analysen der Proliferation wurden die CD4+ T-Zellen zu Beginn der Kultur CFSE markiert, nicht jedoch für die Analyse der T-Zelltypenveränderung.

Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Abnahme ($n=4$, $p<0,01$) der Proliferationsrate in Co-Kulturen aus unbehandelten CD4+ T-Zellen mit ECP-behandelten Monozyten im Vergleich zu Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten nur im „Zellkontakt“ Ansatz sowie im „Referenz“ Ansatz nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10 A). Die Abnahme der Anteile proliferierender T-Zellen war im „Zellkontakt“ Ansatz jedoch deutlich geringer als im „Referenz“ Ansatz. Der Übertrag des Überstandes ECP-behandelter Monozyten auf T-Zellen führte zu keinem Unterschied in der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen im Vergleich zum Übertrag der Überstände unbehandelter Monozyten. Zudem proliferierten die T-Zellen verglichen mit dem „Referenz“ Ansatz nur sehr schwach, egal ob der Zellkulturüberstand unbehandelter oder ECP-behandelter Monozyten auf die T-Zellen übertragen wurde. Für die Reduktion der T-Zellproliferation scheint somit der Zellkontakt zwischen ECP-behandelten Monozyten und CD4+ T-Zellen unbedingt notwendig zu sein. Dennoch lässt sich ein additiver Effekt durch weitere, lösliche Faktoren nicht ausschließen, da Unterschiede zwischen der Abnahme der T-Zellproliferation im „Referenz“ Ansatz zu der Abnahme im „Zellkontakt“ Ansatz zu beobachten sind.

Bei der Untersuchung der Veränderungen der T-Zelltypenanteile durch ECP-behandelte Monozyten, zeigte der „Referenz“ Ansatz eine signifikante Induktion von CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen ($n=7$, $p<0,05$), CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen ($n=7$, $p<0,05$) und CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen ($n=5$, $p<0,01$) (Abbildung 10 C, E, F). Dieser Anstieg der prozentualen Anteile konnte im „Zellkontakt“ Ansatz mit Ausnahme der CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen bestätigt werden, bei denen der Anstieg zwar vorhanden aber nicht signifikant war. Im Gegensatz hierzu zeigen die CD3+CD4+IL-17A+ Th17-Zellen eine anteilmäßige Zunahme in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten, die im „Referenz“ Ansatz nicht signifikant war jedoch im „Zellkontakt“ Ansatz. Die Anteile der CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen änderte sich durch ECP-Behandlung der Monozyten in keinem der drei untersuchten Ansätze (Abbildung 10 B). Durch den Übertrag des Zellkulturüberstandes ECP-behandelter Monozyten auf die T-Zellen konnte keine Veränderung in den prozentualen Anteilen beschrieben werden, mit Ausnahme der CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen, deren Anteile nach Übertrag des Zellkulturüberstandes ECP-behandelter Monozyten signifikant abnahmen ($n=7$, $p<0,01$). Betrachtet man das jeweilige Ausgangsniveau der Anteile des entsprechenden T-Zelltyps an den lebenden CD3+CD4+ T-Zellen in den unbehandelten bzw. ECP-behandelten Ansätzen, so konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem „Referenz“ Ansatz und dem „Zellkontakt“ bzw. „Überstand“ Ansatz nachgewiesen werden.

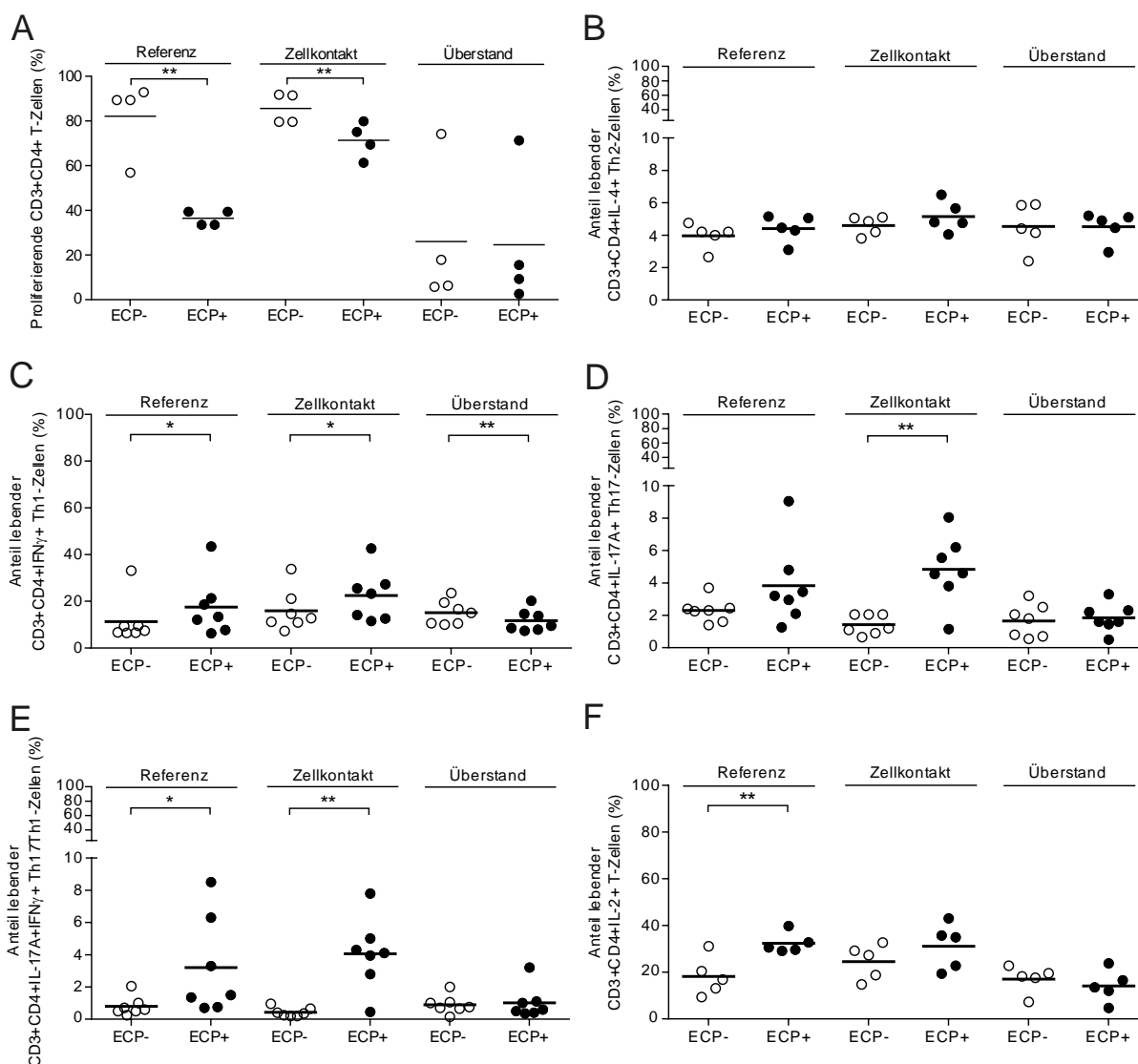


Abbildung 10: Veränderung der T-Zellproliferation und der T-Zelltypenanteile in Abhängigkeit vom Zellkontakt oder von sekretierten Zytokinen. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte Monozyten (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) wurden mit unbehandelten CD4⁺ T-Zellen unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper 5 Tage co-kultiviert (Referenz). Zudem wurden unbehandelte bzw. ECP-behandelte Monozyten 24 Stunden kultiviert und anschließend unter Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper (Überstand) mit frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen 5 Tage co-kultiviert. Für den Nachweis der Proliferation wurden die T-Zellen zu Beginn der Kultur CFSE markiert. **(A)** Die Proliferationsraten der T-Zellen (n=4) wurden am Durchflusszytometer bestimmt. Die Veränderungen der Anteile der **(B)** IL-4⁺ Th2-Zellen (n=5), **(C)** IFN γ ⁺ Th1-Zellen (n=7), **(D)** IL-17A⁺ Th17-Zellen (n=7), **(E)** IL-17A⁺ IFN γ ⁺ Th17Th1-Zellen (n=7) und **(F)** IL-2⁺ T-Zellen (n=5) an den lebenden CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach ECP-Behandlung wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. **p<0,01; *p<0,05.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Zellkontakt zwischen ECP-behandelten Monozyten und CD4⁺ T-Zellen notwendig ist, um die Veränderungen auf Seiten der T-Zellen zu induzieren, wie sie bereits aus den Analysen des *in vitro* ECP-Modells bekannt sind.

4.3.2 Zytokinexpressionsprofil von Monozyten mit und ohne ECP-Behandlung und der Co-Kultur Ansätze

Ein Übertrag des Zellkulturüberstandes von ECP-behandelten Monozyten konnte nicht die gleichen Ergebnisse liefern, wie sie im *in vitro* ECP-Modell beschrieben wurden. Daher stellte sich die Frage, welche Zytokine durch unbehandelte bzw. ECP-behandelte Monozyten wie auch in Co-Kulturen aus unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten mit CD4⁺ T-Zellen sekretiert werden und ob dieses Sekretionsmuster durch ECP-Behandlung verändert wird. Für die Analysen des Zytokinmilieus zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur, wurden Zellkulturüberstände der entsprechenden Ansätze gesammelt und mittels LEGENDplex™ Human Inflammatory Panel (BioLegend) analysiert. Für Monozyten wurde die Zytokinsekretion nach 1 und 2 Tagen Kultur untersucht, wohingegen bei den Co-Kulturen noch ein 5 Tage Zeitpunkt berücksichtigt wurde. Insgesamt wurden 13 Zytokine (IL-1 β , IFN α 2, IFN γ , TNF α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 und IL-33) simultan mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht.

Die Analyse der Zytokinsekretion von unbehandelten und *in vitro* ECP-behandelten Monozyten nach 1 bzw. 2 Tagen Kultur zeigte nur für wenige, nachgewiesene Zytokine einen Unterschied. Die Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-23 wurden nach 1 Tag und nach 2 Tagen Kultur etwa gleich stark von unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten mit einer Konzentration von zwischen 4.500 pg/ml und 7.000 pg/ml sekretiert und es konnte keine Veränderung der Konzentration über die Zeit oder abhängig von der ECP-Behandlung detektiert werden (Abbildung 11 A und B). IFN α 2, IFN γ , IL-6, IL-10 und IL-12p70 wurden ebenfalls an beiden Zeitpunkten etwa gleich stark sekretiert (zwischen 9.000 pg/ml und 12.000 pg/ml) und es konnte auch für diese Zytokine kein Unterschied nach ECP-Behandlung beobachtet werden.

Von den 13 überprüften Zytokinen konnte lediglich IL-17A nicht in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden und das unabhängig von ECP-Behandlung oder Zeitpunkt der Überstand-Abnahme.

TNF α wurde an Tag 1 weniger stark von ECP-unbehandelten Monozyten im Vergleich zu ECP-behandelten Monozyten sekretiert. Nach 2 Tagen Kultur stieg die TNF α Konzentration in beiden Ansätzen auf ein fast gleich hohes Level von etwa 7.500 pg/ml im unbehandelten und 10.700 pg/ml im ECP-behandelten Ansatz an.

MCP-1 wurde nach 1 Tag Kultur von den unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten gleich stark sekretiert, während die Konzentration nach 2 Tagen Kultur in den unbehandelten Ansätzen etwas höher lag als in den behandelten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von in den Zellkulturüberstand sekretiertem IL-8 sowohl nach 1 Tag als auch nach 2 Tagen deutlich geringer war als es für alle anderen Zytokine der Fall war. Während die IL-8 Sekretion an Tag 1 in unbehandelten Ansätzen niedriger als in ECP-behandelten Ansätzen war, war dieser Unterschied an Tag 2 signifikant (n=4, p<0,001).

IL-33 wurde sowohl nach 1 Tag Kultur der unbehandelten als auch ECP-behandelten Monozyten als auch nach 2 Tagen Kultur sehr stark mit einer Konzentration von etwa 56.000 pg/ml sekretiert und lag

deutlich über dem Niveau der anderen Zytokine. Ein Unterschied zwischen unbehandelten und ECP-behandelten Ansätzen bestand nicht.

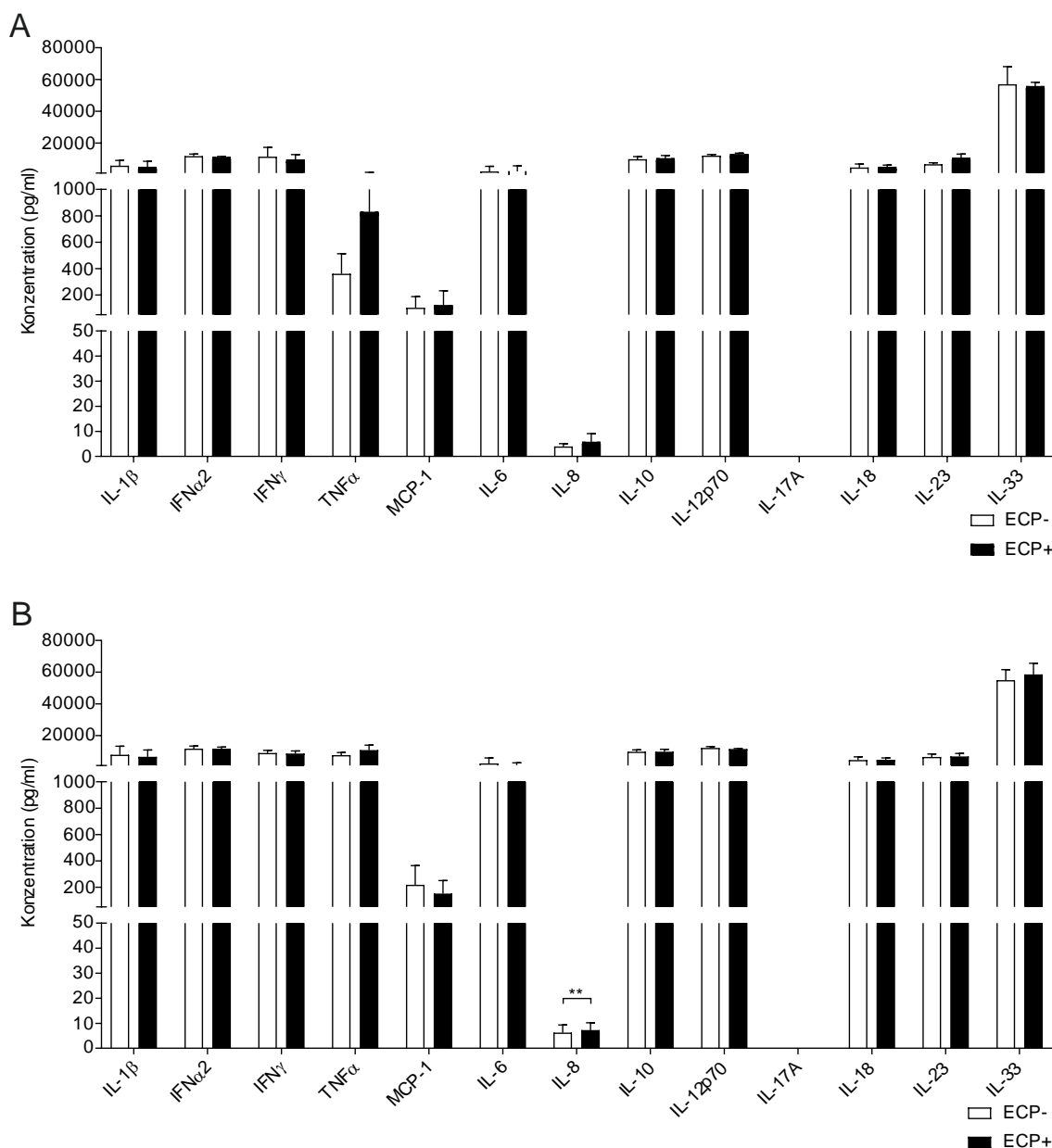


Abbildung 11: Sekretionsprofil der Zytokine in Zellkulturüberständen von Monozyten im *in vitro* ECP-Modell. Nachweis der Zytokine mittels LEGENDplexTM Human Inflammatory Panel (13-plex; IL-1 β , IFN α 2, IFN γ , TNF α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 und IL-33, BioLegend) im Zellkulturüberstand nach Kultur von unbehandelten bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten für **(A)** 1 Tag und **(B)** 2 Tage bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml. $n=4$. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aller Spender und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. $**p<0,01$.

Die Analyse der in den Zellkulturüberstand von Co-Kulturen aus unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten mit CD4⁺ T-Zellen sekretierten Zytokine zeigt ein heterogeneres Bild und deutlich niedrigere Zytokinkonzentrationen als die Untersuchung der Überstände ECP un-/behandelter Monozyten (Abbildung 12 A-C).

Die Sekretion von IFN γ , MCP-1 und IL-6 war sowohl in Co-Kulturen der unbehandelten als auch der ECP-behandelten Monozyten mit T-Zellen sehr gering und zeigte zwischen den betrachteten Zeitpunkten und unabhängig von der Behandlung keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls zeigten die Konzentrationen von IL-12p70 und IL-23 keine deutlichen Unterschiede über die Zeit und in den verschiedenen Ansätzen, jedoch liegt das Niveau deutlich höher.

IL-1 β wurde nach 1 Tag Co-Kultur der unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten mit T-Zellen nur schwach sekretiert und das Niveau ist für unbehandelte und ECP-behandelte Ansätze gleich hoch. Nach 2 Tagen Co-Kultur hingegen nahm die Konzentration in den Überständen der Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten etwas zu, während sie in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten abnimmt. Im Vergleich hierzu nahm die IL-1 β -Konzentration nach 5 Tagen Co-Kultur in allen Ansätzen zu, die Konzentration in den Co-Kulturen mit ECP-unbehandelten Monozyten blieb jedoch deutlich erhöht im Vergleich zu den Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten.

IFN α 2 wurde nach 1 Tag der Co-Kultur in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten signifikant weniger sekretiert als in Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten ($n=4$, $p<0,05$). Dieser Unterschied glich sich allerdings über die Zeit von 5 Tagen hinweg aus.

TNF α zeigte nach 1 Tag Co-Kultur der unbehandelten Monozyten mit T-Zellen eine signifikant niedrigere Konzentration als die Co-Kultur der ECP-behandelten Monozyten mit T-Zellen ($n=4$, $p<0,05$). Die Analyse der Konzentration im zeitlichen Verlauf zeigte einen Anstieg der TNF α Sekretion in beiden Ansätzen mit zunehmender Kulturzeit.

ECP unbehandelte Monozyten in Co-Kultur mit T-Zellen sekretierten IL-8 in nur geringem Maße, allerdings nahm die Konzentration über die Zeit hinweg zu und lag an allen ausgewerteten Zeitpunkten über der Konzentration in Überständen von ECP-behandelten Monozyten in Co-Kultur mit T-Zellen.

Die Konzentration von IL-10 in den Zellkulturüberständen von unbehandelten Monozyten in Co-Kultur mit T-Zellen lag an Tag 1 unter dem Niveau der Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten. Bereits nach 2 Tagen Co-Kultur sanken die IL-10 Konzentrationen in beiden Ansätze leicht ab und waren in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten geringer als in den unbehandelten Ansätzen. Nach 5 Tagen hingegen zeigte sich eine deutliche Zunahme der IL-10 Konzentrationen, jedoch konnte kein Unterschied abhängig von der ECP-Behandlung beobachtet werden.

Die Sekretion von IL-17A nach 1 Tag Co-Kultur der unbehandelten Monozyten mit T-Zellen war etwas stärker als die der Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten. Nach 2 Tagen der Co-Kultur ließ sich eine Abnahme der IL-17A Konzentration in Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten nachweisen, während nach 5 Tagen die Konzentration in den Zellkulturüberstände beider Ansätze deutlich abnahm und nun das Konzentrationsniveau der Co-Kultur der unbehandelten Monozyten mit T-Zellen niedriger als bei den Co-Kulturen der ECP-behandelten Monozyten mit T-Zellen lag.

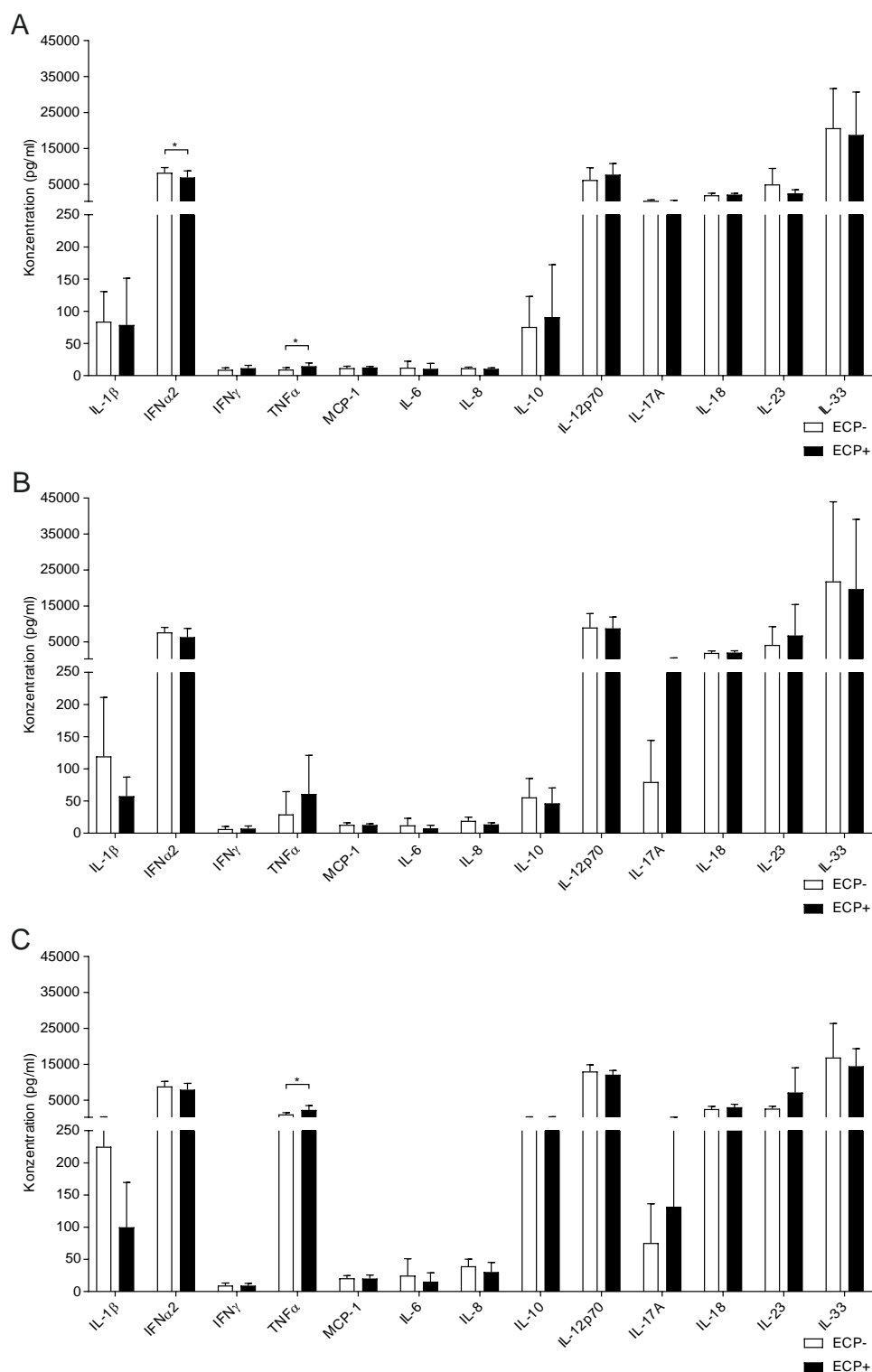


Abbildung 12: Zytokinsekretion der Co-Kulturen in Zellkulturüberstände im *in vitro* ECP-Modell.

Nachweis der Zytokine mittels LEGENDplex™ Human Inflammatory Panel (13-plex; IL-1β, IFNα2, IFNγ, TNFα, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 und IL-33, BioLegend) im Zellkulturüberstand nach Co-Kultur von unbehandelten bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten mit CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation für **(A)** 1 Tag, **(B)** 2 Tage und **(C)** 5 Tage bei einer Zelldichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml. n=5 bzw. n=2 (IL-23). Die Balken geben den Mittelwert aller Spender und die Fehlerbalken die Standardabweichung an **p<0,01.

IL-33 wurde von allen untersuchten Zytokinen in Co-Kulturen der unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten mit T-Zellen am stärksten sekretiert und die Konzentrationen blieben über die Zeit hinweg vergleichbar hoch, genauso wie es für die IL-18 Sekretion gezeigt werden konnte. Es zeigte sich, dass die Konzentration in Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten höher liegt als in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten.

Somit konnte gezeigt werden, dass ein proinflammatorisches Zytokinmilieu bei der Analyse der Zellkulturüberstände vorherrscht und keine deutlichen Änderungen durch eine ECP-Behandlung der Monozyten zu erwarten ist.

4.4 Einfluss der *in vitro* ECP auf Monozyten

Durch die vorausgehenden Ergebnisse im *in vitro* ECP-Modell konnte eine Beschreibung der ECP-induzierten Effekte von Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen erfolgen. Im Gegensatz dazu sollte im Folgenden untersucht werden, welchen Einfluss die *in vitro* ECP von Monozyten auf den Zelltyp selbst hat, damit Monozyten die beschriebenen Effekte vermitteln können. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die ECP-Behandlung einen immunregulatorischen Effekt besitzt, der insbesondere durch aus Monozyten abgeleitete DCs vermittelt werden soll. Das Wissen über Monozyten als deren parentale Zellen ist jedoch limitiert und kontrovers.

Um ECP-induzierte Effekte auf Monozyten gesunder Spender genauer untersuchen zu können, wurden die Zellen wie bereits zuvor beschrieben isoliert, *in vitro* ECP-behandelt und 2 Tage kultiviert. Da Monozyten auf Zellkulturplatten adhärieren mussten sie für alle folgenden Schritte mechanisch aus der Platte abgelöst werden. Unbehandelte Monozyten dienten als Referenz bei den Analysen und wurden ebenfalls mechanisch aus den Platten abgelöst.

Zunächst wurde überprüft, ob sich ECP-behandelte Monozyten in der Zellzahl, der Anteile an toten bzw. lebenden Zellen sowie der Anteile an CD14+ und HLA-DR+ Zellen von unbehandelten Monozyten unterscheiden. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Monozyten verstärkt in Apoptose gehen oder in einem apoptotischen Stadium akkumulieren. Sollte sich dabei ein Unterschied zwischen unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten ergeben, sollte überprüft werden, ob Monozyten nach ECP zu einer aktiven Suppression der T-Zellantwort befähigt sind oder ob sie diese nur noch vermindert aktivieren können.

Monozyten gelten als Vorläufer von Makrophagen und DCs. Auch bei der Entstehung von MDSCs können sie laut Literatur beteiligt sein. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine ECP-Behandlung von Monozyten zu einer Differenzierung zu iDCs stimuliert [216], daher sollte das Differenzierungspotential der Monozyten nach ECP mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Abhängig von diesem Ergebnis sollte anschließend überprüft werden, ob ein potentiell induzierter Zelltyp nach ECP ebenfalls einen Einfluss auf T-Zellen in der Co-Kultur hat.

4.4.1 Einfluss der *in vitro* ECP auf Zellzahlen und Oberflächenmarker

Für die Untersuchung des Einflusses der *in vitro* ECP auf das Überleben der Monozyten wurde die Zellzahl der Monozyten unmittelbar nach ECP mittels Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen für 2 Tage mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Zellkulturplatten kultiviert und die Zellzahl erneut bestimmt. Die Detektion der Anteile an lebenden bzw. toten Zellen wie auch an lebenden CD14+ bzw. HLA-DR+ Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Es konnte gezeigt werden, dass die bestimmten Zellzahlen an Tag 2 sowohl in unbehandelten als auch in ECP-behandelten Ansätzen signifikant niedriger als die an Tag 0 direkt nach ECP ausgesäten Zellzahlen waren ($n=9$, $p<0,01$, Abbildung 13 A). Die Zellzahlen zwischen unbehandelten und ECP-behandelten Ansätzen war nur an Tag 2 der Kultur signifikant niedriger.

Die Analyse der Anteile lebender Zellen mittels Lebend/tot-Färbung für die Durchflusszytometrie bewies darüber hinaus, dass 2 Tage nach ECP der Anteil an lebenden Zellen signifikant reduziert wurde ($n=19$, $p<0,01$, Abbildung 13 B), während der Anteil der toten Zellen in gleichem Maße signifikant zunahm. Der Anteil der lebenden Zellen lag dennoch 2 Tage nach ECP bei über 80 % der gesamten, abgelösten Zellen.

Ein zur Lebend/tot-Färbung zusätzlicher Nachweis des CD14 Oberflächenantigens auf Monozyten zeigte, dass sich durch eine ECP-Behandlung der Monozyten der Anteil lebender CD14+ Zellen signifikant verringerte ($n=19$, $p<0,01$, Abbildung 13 C), wohingegen der Anteil an lebenden CD14- Zellen signifikant zunahm. Die Anteile der lebenden CD14+ Zellen 2 Tage nach ECP-Behandlung lagen mit durchschnittlich 70 % weit unter der direkt nach Isolation bestimmten Reinheit von etwa 91%. Im Gegensatz hierzu konnte beobachtet werden, dass der Anteil der HLA-DR+ Zellen 2 Tage nach *in vitro* ECP signifikant zunahm ($n=18$, $p<0,01$, Abbildung 13 D) und die HLA-DR- Zellen anteilmäßig signifikant durch ECP reduziert wurden.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Anteil an lebenden Zellen und CD14+ Zellen durch ECP signifikant reduziert wurde, während der Anteil an lebenden HLA-DR+ Zellen zunahm.

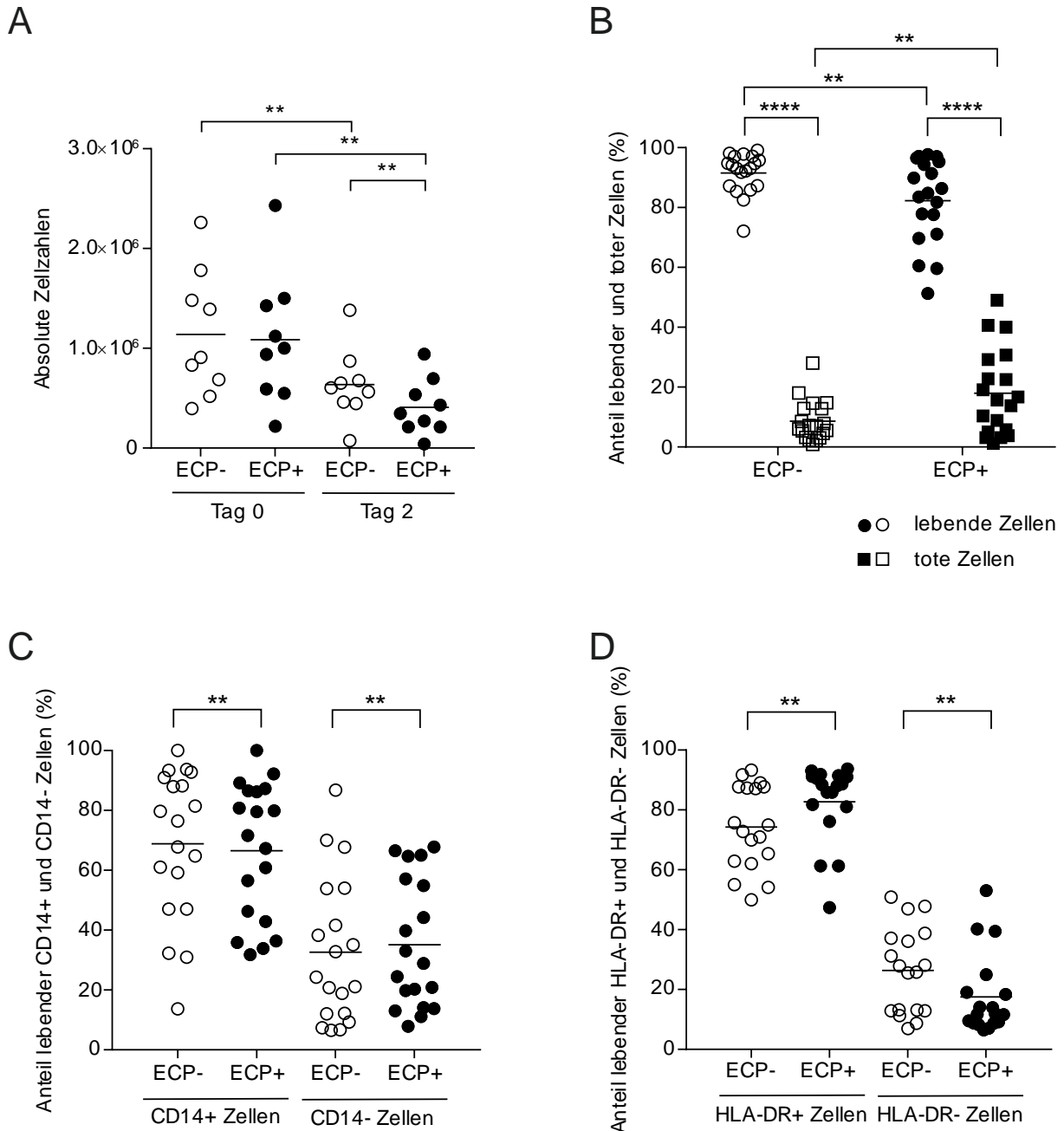


Abbildung 13: Analyse der *in vitro* ECP-behandelten Monozyten hinsichtlich Überleben und Oberflächenmarker. (A) Absolute Zellzahlen, die nach Ablösen un behandelter (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. *in vitro* ECP-behandelter (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten direkt nach ECP (Tag 0) bzw. 2 Tage nach ECP (Tag 2) am Mikroskop gezählt wurden (n=9). Nach 2 Tagen wurden die un behandelten bzw. ECP-behandelten Zellen mechanisch abgelöst, ausgezählt und die identische Zellzahl lebend/tot oder Oberflächen gefärbt. Änderungen der Anteile **(B)** der lebenden und toten Zellen (n=19) an allen Zellen, **(C)** der CD14+ und CD14- (n=19) und **(D)** der HLA-DR+ und HLA-DR- (n=18) Zellen an lebenden Zellen 2 Tage nach ECP. Der Mittelwert aller Spender wird als Strich dargestellt. ****p<0,0001; **p<0,01.

4.4.2 Überprüfung des Apoptoseverhaltens der Monozyten

Die vorausgehende Untersuchung der ECP-behandelten Monozyten zeigte eine signifikante Abnahme der lebenden Zellen 2 Tage nach Kultur. Dennoch konnte ein sehr hoher Anteil an lebenden Zellen von über 80 % nach mechanischem Ablösen der Monozyten detektiert werden. Daher stellte sich die Frage, ob Monozyten nach ECP möglicherweise im früh- oder spätapoptotischen Stadium angereichert werden und dadurch zum Einfluss auf CD4+ T-Zellen in der Co-Kultur beitragen.

Für die Analyse der verschiedenen Apoptosestadien wurden die Monozyten *in vitro* ECP-behandelt, anschließend 2 Tage mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Zellkulturplatten kultiviert und nach dem mechanischen Ablösen die Zellen mit Hilfe einer Lebend/tot- und Annexin-V-Färbung für die Analyse am Durchflusszytometer vorbereitet.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den CD14+ Zellen nach 2 Tagen Kultur sowohl in den unbehandelten als auch in den *in vitro* ECP-behandelten Ansätzen über 90 % der Zellen vital (Quadrant 4, Q4) waren (Abbildung 14 A-C). Bei den prozentualen Anteilen der toten Zellen (Q1) in den *in vitro* ECP-behandelten Ansätzen lässt sich eine leichte Zunahme von $1,73 \% \pm 1,00 \%$ detektieren, jedoch bleibt der Anteil mit etwa 3,5 % sehr gering. Die prozentualen Anteile der Zellen, die sich im spät- (Q2) bzw. frühapoptotischen (Q3) Stadium befinden lagen sowohl in den unbehandelten als auch in den ECP-behandelten Ansätzen unter 2 % aller CD14+ Zellen.

Bei der Untersuchung der CD14- Zellen hinsichtlich der Apoptosestadien konnte gezeigt werden, dass ohne ECP-Behandlung ein deutlich höherer Anteil der CD14- Zellen von etwa 10 % bereits tot (Q1) ist (Abbildung 14 D-F) im Vergleich zu CD14+ Zellen. Der Anteil der toten Zellen mit ECP ist mit etwa 20 % sogar doppelt so groß als ohne ECP-Behandlung. Im Vergleich zu den CD14+ Zellen konnte ebenso gezeigt werden, dass sich mehr CD14- Zellen in den spät- (Q2) bzw. frühapoptotischen (Q3) Stadien befinden.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich die CD14+ Zellen durch *in vitro* ECP nicht verstärkt in einer der apoptotischen Stadien anreicherten. Zudem war der Anteil der toten CD14- Zellen deutlich höher als der Anteil der toten CD14+ Zellen 2 Tage nach ECP.

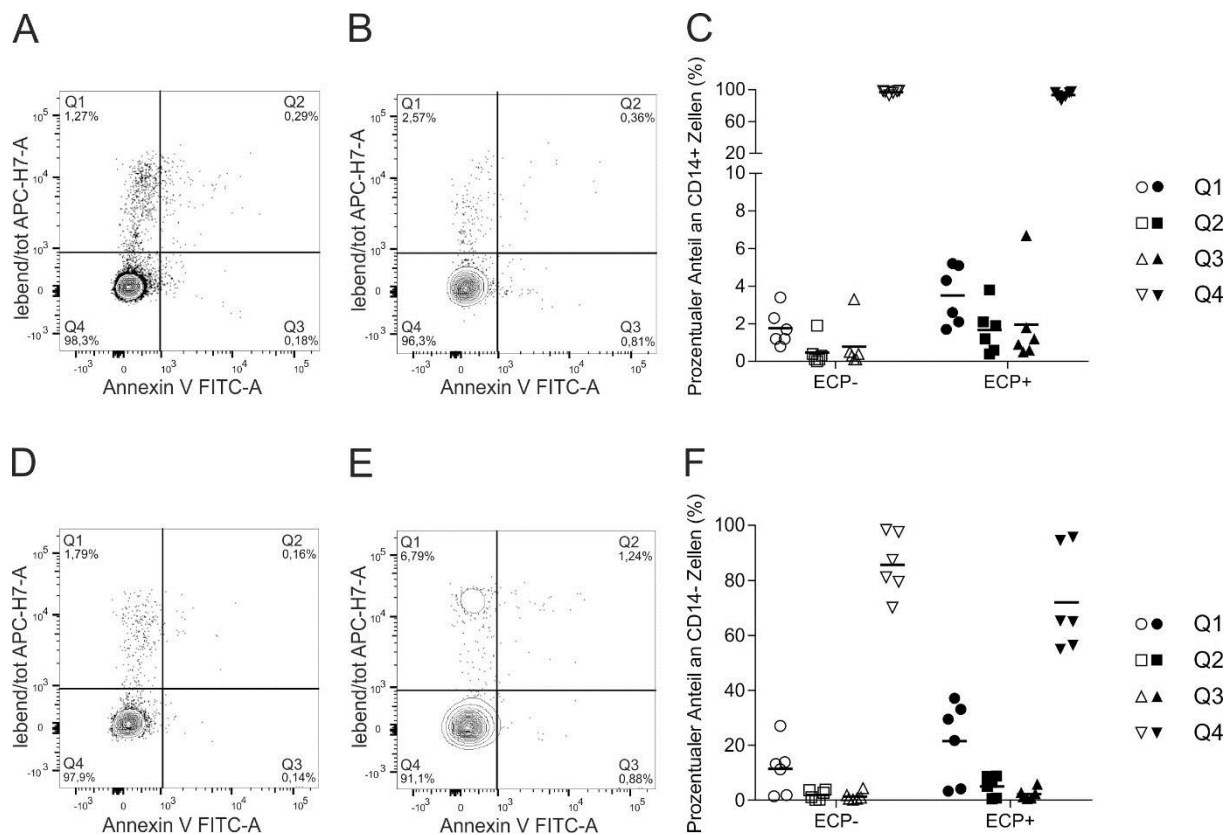


Abbildung 14: Apoptosestadien der Monozytenfraktion mit und ohne *in vitro* ECP-Behandlung.

Zur Untersuchung der Stadien tote, spätapoptotische, frühapoptotische und lebende Zellen, werden Monozyten aus PBMCs gesunder Spender isoliert. Die Monozyten werden entweder unbehandelt belassen (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) oder *in vitro* ECP-behandelt (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A). Nach 2 Tagen Kultur werden die Monozyten mechanisch abgelöst und mittels anti-CD14 Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Zudem werden die Zellen mittels Lebend/tot-Farbstoff und anti-Annexin V Antikörper für die Detektion der Apoptosestadien gefärbt. Die Analyse erfolgte am LSR II und mit Hilfe von FACS DIVA und FlowJo Software. Dargestellt sind beispielhaft an einem Spender die *Gating*-Strategie für die CD14+ Zellen der (A) unbehandelten und (B) ECP-behandelten Ansätze sowie (C) die prozentualen Anteile der CD14+ Zellen, die auf die entsprechenden Apoptosestadien entfallen. Außerdem sind beispielhaft an einem Spender die *Gating*-Strategie für der CD14- Zellen der (D) unbehandelten und (E) ECP-behandelten Ansätze sowie (F) die prozentualen Anteile der CD14- Zellen, die auf die entsprechenden Apoptosestadien entfallen dargestellt. Q1, tote Zellen; Q2, spätapoptotische Zellen; Q3, frühapoptotische Zellen; Q4, lebende Zellen. n=6. Der Mittelwert aller Spender wird als Strich dargestellt. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.4.3 Überprüfung auf aktive Suppression der T-Zellproliferation im *in vitro* ECP-Modell

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist für eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen in Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten, ein Zellkontakt zwischen den beiden Zelltypen notwendig. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Anteil an lebenden Monozyten nach *in vitro* ECP bereits 2 Tage nach ECP signifikant reduziert werden konnte. Daraus ergibt sich die Frage, ob alleine eine durch ECP-Behandlung reduzierte Anzahl an Monozyten und somit potentielle Abnahme des co-stimulatorischen Signals in der Co-Kultur zu einer negativen Beeinflussung der T-Zellproliferation führt. Um zu überprüfen, ob die Monozyten vielmehr durch die *in vitro* ECP zu einer aktiven Suppression der T-Zellproliferation befähigt sind, wurden die unbehandelten bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten 5 Tage mit CFSE markierten CD4⁺ T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen co-kultiviert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, wie sich die prozentualen Anteile der proliferierenden CD3⁺CD4⁺ T-Zellen an allen lebenden T-Zellen der Co-Kultur unter Verwendung der Verhältnisse 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1 und 0,0625:1 (Monozyten:T-Zellen) sowie mit und ohne ECP-Behandlung der co-kultivierten Monozyten verändern.

Es konnte gezeigt werden, dass für alle überprüften Verhältnisse eine signifikante Abnahme der proliferierenden T-Zellen in Co-Kulturen mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten im Vergleich zu Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten erfolgte (Abbildung 15). Diese Abnahme war für alle Verhältnisse mit Ausnahme des 0,0625:1 Verhältnisses (Monozyten:T-Zellen) signifikant.

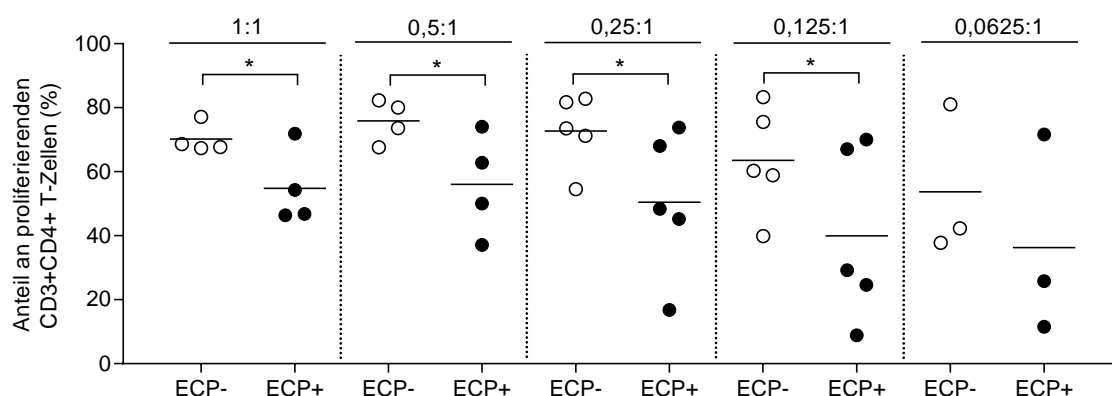


Abbildung 15: Titration des Verhältnisses von eingesetzten Monozyten zu CD4⁺ T-Zellen.

Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten wurden mit unbehandelten T-Zellen in den Verhältnissen 1:1 (n=4), 0,5:1 (n=4), 0,25:1 (n=5), 0,125:1 (n=5) und 0,625:1 (n=3) (Monozyten:CD4⁺ T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper für 5 Tage co-kultiviert. Die Analyse der Anteile proliferierender CD3⁺CD4⁺ T-Zellen an allen lebenden CD3⁺CD4⁺ T-Zellen der Co-Kultur erfolgte mittels CFSE-Markierung der T-Zellen für die Durchflusszytometrie. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. *p<0,05.

Die Anteile der proliferierenden T-Zellen blieben in den unbehandelten Ansätzen bis zu einem Verhältnis von 0,25:1 vergleichbar hoch, während sie in den ECP-behandelten Ansätzen abnahmen. Ab einem Verhältnis von 0,5:1 (Monozyten:T-Zellen) wurde die Abnahme der proliferierenden T-Zellen in den Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen größer.

4.4.4 Analyse des Differenzierungsverhaltens der Monozyten nach *in vitro* ECP

Es sollte weiter der Frage nachgegangen werden, ob durch die *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten der Literatur entsprechend DCs generiert oder inwiefern weitere Zelltypen mit monozytärem Ursprung und T-Zell-supprimierenden Eigenschaften induziert werden. Diese Zelltypen sollten durch die Charakterisierung der unbehandelten und *in vitro* ECP-behandelten Monozyten gesunder Spender 2 Tage nach Kultur mit Hilfe der Oberflächenmarker CD14, CD209, HLA-DR, CD86, CD33 und CD15 und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt werden. Da es sich unter anderem bei CD86 und HLA-DR um Oberflächenmoleküle handelt, die eine bedeutende Rolle bei der T-Zellaktivierung und Stimulation der humoralen Immunantwort spielen, könnte die genauere Untersuchung der Expression dieser Marker auf ECP-behandelten Monozyten Auskunft über den Aktivierungsstatus der Zellen geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die prozentualen Anteile der CD14+CD209-HLA-DR+CD86+ Monozyten, CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen, CD14-CD209+HLA-DR+CD86- iDCs und CD14-CD209+HLA-DR+CD86+ mDCs an allen lebenden CD14+ bzw. CD14- Zellen bestimmt. Die Anteile der HLA-DR-CD33+CD14+ M-MDSCs und HLA-DR-CD33+CD14-CD15+ PMN-MDSCs wurden als prozentualen Anteile der HLA-DR+ bzw. HLA-DR- Zellen ermittelt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen haben gezeigt, dass durch eine *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten ein signifikanter Anstieg der CD14+CD209-HLA-DR+CD86+ Monozyten und CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen (n=19, p<0,0001 bzw. p<0,01, Abbildung 16 A) induziert wird. Im Gegensatz dazu konnte keine anteilmäßige Veränderung bei den CD14-CD209+HLA-DR+CD86- iDCs und CD14-CD209+HLA-DR+CD86+ mDCs nachgewiesen werden. Das Niveau der CD14-CD209+HLA-DR+CD86- iDCs und CD14-CD209+HLA-DR+CD86+ mDCs lag in den unbehandelten und ECP-behandelten Ansätzen sehr niedrig. Der Nachweis von HLA-DR-CD33+CD14+ M-MDSCs und HLA-DR-CD33+CD14-CD15+ PMN-MDSCs 2 Tage nach ECP-Behandlung der Monozyten zeigte, dass beide Zelltypen durch ECP anteilmäßig reduziert wurden (n=18, Abbildung 16 B). Diese Reduktion war für HLA-DR-CD33+CD14-CD15+ PMN-MDSCs signifikant (n=18, p<0,0001) und das Ausgangsniveau der Zellen war in beiden Ansätzen sehr niedrig.

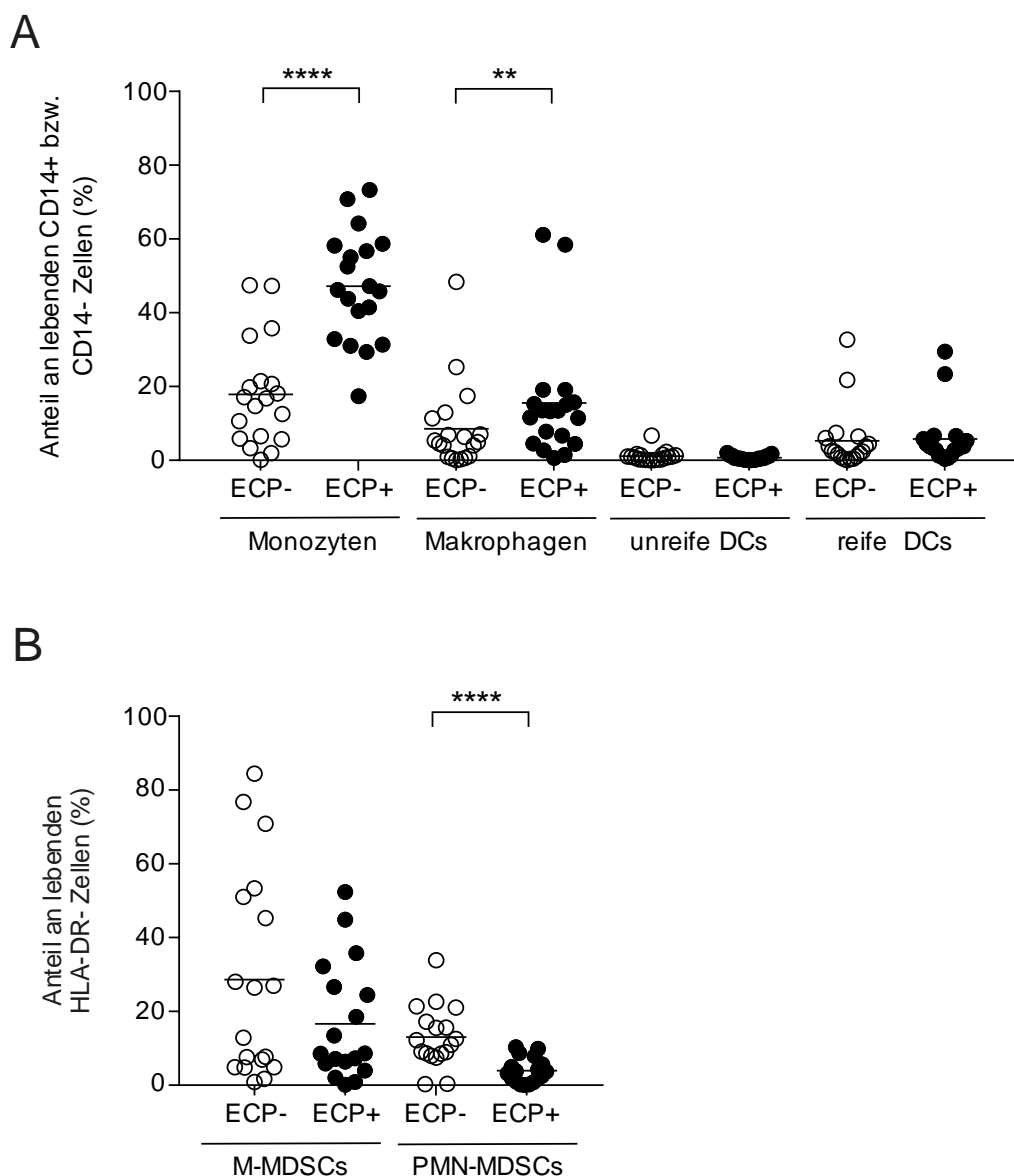


Abbildung 16: Einfluss der *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten auf die Differenzierung. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten wurden nach *in vitro* ECP mit einer Dichte von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml in Zellkulturplatten für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch abgelöst und die induzierten prozentualen Anteile an **(A)** CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Monozyten und CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen an CD14+ Zellen sowie CD14-CD209+HLA-DR+CD86- iDCs (unreife DCs) und CD14-CD209+HLA-DR+CD86+ mDCs (reife DCs) an CD14- Zellen (alle n=19), sowie **(B)** HLA-DR-CD33+CD14+ M-MDSCs und HLA-DR-CD33+CD14-CD15+ PMN-MDSCs an HLA-DR- Zellen (alle n=18) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der Mittelwert aller Spender wird als Strich dargestellt. ****p<0,0001; **p<0,01.

Neben der signifikanten Steigerung der prozentualen Anteile an CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Monozyten konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen nachgewiesen werden. Um deren Einfluss im Rahmen der *in vitro* ECP beschreiben zu können, wurden die Zellen im Folgenden genauer untersucht.

4.4.5 Untersuchung der Bedeutung von Makrophagen im *in vitro* ECP-Modell

Makrophagen lassen sich in einen M1- und einen M2-Phänotyp unterscheiden. Während laut Literatur SOCS-1 bei der Induktion eines M2-Phänotyps beteiligt ist, soll SOCS-3 bei der Differenzierung eines M1-Phänotyps wichtig sein. Insbesondere SOCS-1 spielt der Literatur zur Folge eine wichtige Rolle bei der Th17-Differenzierung und als Suppressor der IFN γ -Signalisierung [217].

Um die Makrophagenpopulation nach *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten zu bestimmen, wurde die Genexpression von SOCS-1 und SOCS-3 mittels qRT-PCR Analysen bestimmt. Hierfür wurden die Monozyten *in vitro* ECP-behandelt oder unbehandelt belassen und anschließend für 1 Tag kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin mechanisch abgelöst und RNA isoliert. Nach Umschrieb der RNA in cDNA wurde mittels qPCR und spezifischer Primerpaare für die Gene SOCS-1 und SOCS-3 die Genexpression ermittelt. Die *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten führte bereits nach 1 Tag zu einer signifikant erhöhten Expression des Gens SOCS-1 ($n=5$, $p<0,05$, Abbildung 17) im Vergleich zu unbehandelten Monozyten. Im Gegensatz hierzu blieb die Expression von SOCS-3 unbeeinflusst.

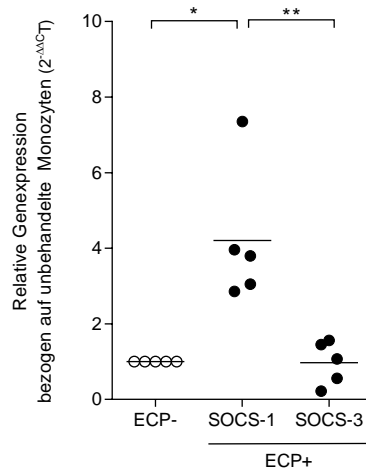


Abbildung 17: Einfluss der *in vitro* ECP-Behandlung auf die Genexpression von Makrophagen spezifischen Genen. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten wurden nach *in vitro* ECP für 1 Tag kultiviert und anschließend die Genexpression mittels qRT-PCR Analysen bestimmt. Dargestellt ist die relative Genexpression von SOCS-1 und SOCS-3 in Bezug auf unbehandelte Monozyten, die mittels der 2^{-ΔΔCt} Methode mit RPL13A als *housekeeper* Gen bestimmt wurde. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

Somit konnte auf Geneebene gezeigt werden, dass eine ECP-Behandlung von Monozyten, Makrophagen vom M2-Phänotyp induziert.

Um zu überprüfen, ob M2-Makrophagen für die Reduktion der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell verantwortlich sein könnten, wurden isolierte Monozyten unter regelmäßiger Zugabe von 100 ng/ml M-CSF für 7 Tage kultiviert, um Makrophagen *in vitro* zu induzieren. In Abbildung 18 A und B sind die Aufnahmen der Makrophagen am Mikroskop gezeigt.

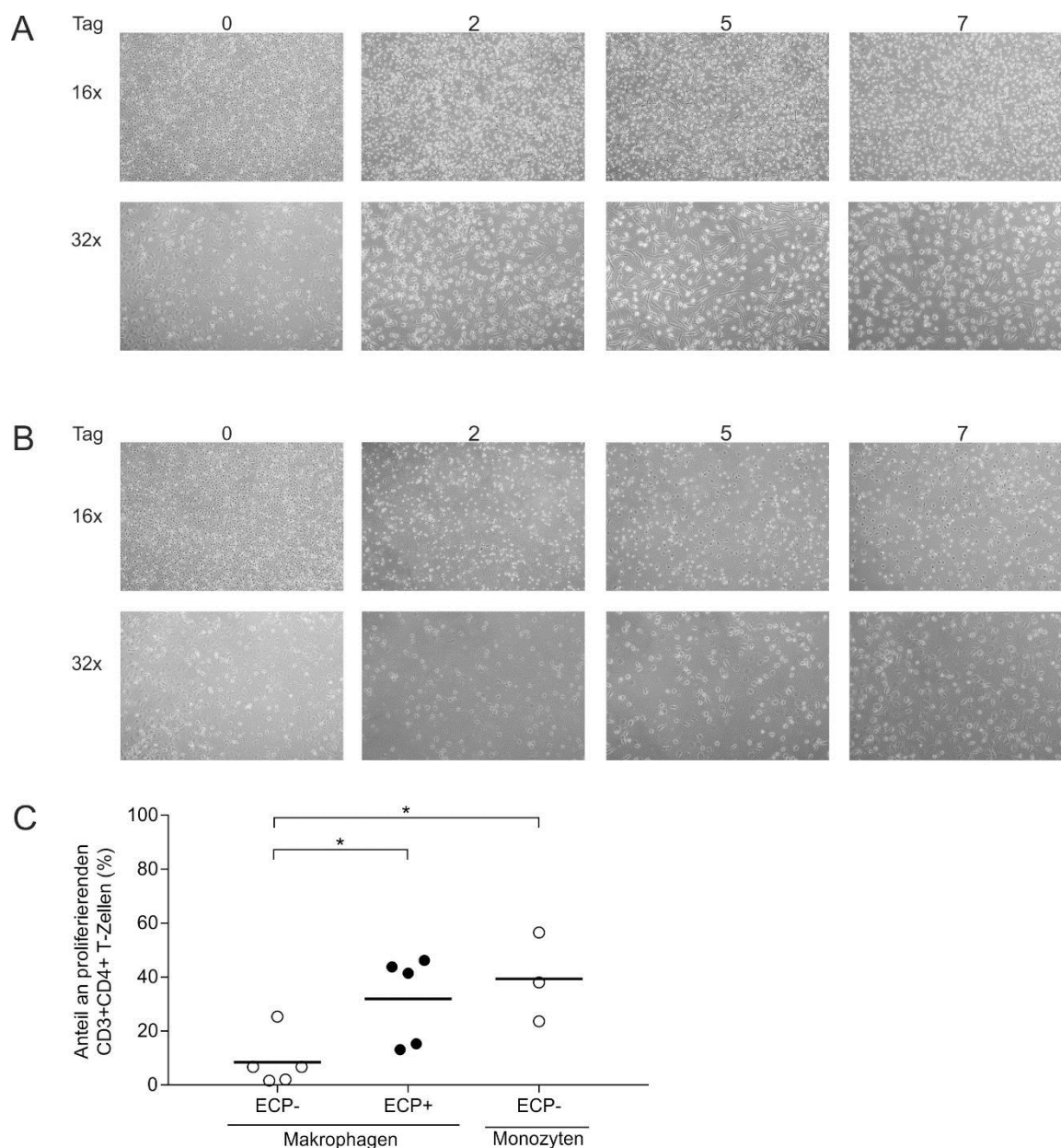


Abbildung 18: Änderung der T-Zellproliferation nach Co-Kultur mit *in vitro* ECP-behandelten Makrophagen. Aus PBMCs isolierte Monozyten wurden ausgesät und mit 100 ng/ml M-CSF stimuliert. An den Tagen 2, 5 und 7 der Kultur erfolgte ein Mediumwechsel mit erneuter M-CSF Zugabe. Die *in vitro* ECP wurde an Tag 7 durchgeführt und die behandelten mit CD4+ T-Zellen bis Tag 12 unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper co-kultiviert. **(A)** Die Aufnahmen der M-CSF stimulierten und **(B)** M-CSF unstimulierten Monozyten am Mikroskop erfolgten an den entsprechenden Tagen (Tag 0, Tag 2, Tag 5, Tag 7) nach Mediumwechsel mit der 16x bzw. 32x Vergrößerung des Mikroskops. **(C)** Änderung der Proliferationsraten von co-kultivierten CD3+CD4+ T-Zellen nach *in vitro* ECP von für 7 Tagen ausdifferenzierten Makrophagen („Makrophagen“, n=5) im Vergleich zu Co-Kulturen mit für 7 Tagen kultivierten, unbehandelten Monozyten („Monozyten“, n=3) nach *in vitro* Behandlung. Proliferationsraten der T-Zellen wurden an Tag 5 nach ECP-Behandlung mittels CFSE am Durchflusszytometer bestimmt. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. *p<0,05.

Durch die Stimulation der Monozyten mit M-CSF bildeten sich lange Fortsätze an den Zellen, sowie große Zellkörper (Abbildung 18 A) und die Makrophagen konnten bereits von den unstimulierten, kultivierten Monozyten (Abbildung 18 B) phänotypisch unterschieden werden. Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass die auf diese Weise induzierten Makrophagen zu $97,19 \% \pm 0,72 \%$ ($n=5$) der lebenden Zellen positiv für den M2-Makrophagen Marker CD163 waren, wohingegen unstimulierte Monozyten der Kontrollgruppe eine CD163 Expression von $22,05 \% \pm 0,49 \%$ ($n=2$) zeigten bezogen auf die lebenden Zellen (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden die induzierten Makrophagen *in vitro* ECP-behandelt und mit frisch isolierten, CFSE markierten T-Zellen unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper co-kultiviert. Nach 5 Tagen wurde der Anteil der proliferierenden T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mit unbehandelten Makrophagen co-kultivierte T-Zellen zeigten eine Proliferationsrate von $8,50 \% \pm 9,73 \%$ ($n=5$) wohingegen diese bei mit unbehandelten Monozyten der Kontrollgruppe, die nicht mit M-CSF stimuliert wurden, bei $39,38 \% \pm 16,52 \%$ ($n=3$) lag (Abbildung 18 C). Die ECP-Behandlung der induzierten Makrophagen führte zu einer signifikanten Zunahme der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen in Co-Kultur ($n=5$, $p<0,05$), was im Gegensatz zu der Proliferationsabnahme der T-Zellen in Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten steht.

Somit konnte gezeigt werden, dass die induzierten Makrophagen die T-Zellproliferation supprimieren können, allerdings wurde diese Fähigkeit durch die *in vitro* ECP-Behandlung der Makrophagen signifikant reduziert, wodurch sich ein zu den Ergebnissen aus dem *in vitro* ECP-Modell mit Monozyten inverser Effekt ergibt.

4.5 Identifizierung von Kontrollstellen und Schlüsselgenen der Immunregulation

Für die Abnahme der T-Zellproliferation scheinen in dieser Arbeit Interaktionen zwischen T-Zellen und APCs von Bedeutung zu sein. Um daher zu überprüfen, welche möglichen Kontrollstellen (*Checkpoints*) der Immunmodulation verantwortlich für die Abnahme der T-Zellproliferation sein könnten, sollte die PD-L1 Interaktion mit dem Rezeptor PD-1 und die PD-L2-PD-1 Achse mit Hilfe blockierender Antikörper genauer untersucht werden. Ein möglicher, unter Umständen additiver Einfluss intrazellulärer Effektormoleküle bei der ECP-induzierten Verringerung der T-Zellproliferation sollte durch den Nachweis von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), Arginase 1 (Arg 1), induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden. Zuletzt sollte mit Hilfe von Transkriptomanalysen von unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten 1 bzw. 2 Tage nach ECP überprüft werden, ob potentielle für das Verständnis der Wirkweise der ECP relevanten Schlüsselgene identifiziert werden können.

4.5.1 Analyse der PD-1 Kontrollstelle im *in vitro* ECP-Modell

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass PD-L1-PD-1 Interaktionen einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁ Phase hervorrufen können, während PD-L2-PD-1 Interaktionen die T-Zellrezeptor vermittelte Proliferation inhibieren können [67]. Daher könnte die Untersuchung der PD-L1-PD-1 bzw. PD-L2-PD-1 Achse einen interessanten und vielversprechenden Ansatzpunkt zur Aufklärung der ECP-induzierten Verringerung der T-Zellproliferation durch co-kultivierte, ECP-behandelte Monozyten liefern. PD-L1 und PD-L2 stellen wichtige Checkpoints der Immunmodulation dar und können sowohl von Monozyten als auch aktivierten T-Zellen exprimiert werden. Daher sollte zunächst überprüft werden, ob sich die Anteile der PD-L1+ bzw. PD-L2+ Monozyten nach *in vitro* ECP und der PD-L1+ bzw. PD-L2+ T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell zu verschiedenen Zeitpunkten verändern. Können sich hierbei Unterschiede im Zusammenhang mit der *in vitro* ECP gezeigt werden, sollte eine Blockade der entsprechenden Achse mittels Antikörper durchgeführt werden, um die Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit von CD3+CD4+ T-Zellen im Modell zu testen.

Die Überprüfung der PD-L1+ bzw. PD-L2+ Monozyten erfolgte zu den Zeitpunkten 16 Stunden, 1 Tag und 2 Tage nach ECP. Es konnte ein leichter Anstieg der lebenden CD14+PD-L1+ Zellen nach 16 Stunden gezeigt werden, während nach 1 Tag nach ECP kein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Monozyten zu erkennen war (n=4, Abbildung 19 A).

Der Anteil der lebenden CD14+PD-L1+ Zellen lag nach 2 Tagen im ECP-behandelten Ansatz niedriger als im unbehandelten Ansatz. Unabhängig vom untersuchten Zeitpunkt konnte sowohl in unbehandelten als auch in ECP-behandelten Monozyten ein vernachlässigbar geringer Anteil von weniger als 0,5 % CD14+PD-L2+ Monozyten bestimmt werden (n=4, Abbildung 19 B).

Die Analyse der CD3+CD4+ T-Zellen erfolgte 16 Stunden, 1 Tag, 2 Tage bzw. 5 Tage nach ECP der Monozyten, die mit unbehandelten, autologen T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation kultiviert wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass keine ECP-induzierte Veränderung der prozentualen Anteile der lebenden CD3+CD4+PD-L1+ T-Zellen erfolgte (n=4, Abbildung 19 C). Sowohl im unbehandelten als auch im ECP-behandelten Ansatz war der Anteil der CD3+CD4+PD-L1+ T-Zellen bereits 1 Tag nach ECP im Vergleich zu 16 Stunden nach ECP angestiegen. Am Tag 5 hingegen konnten keine CD3+CD4+PD-L1+ T-Zellen detektiert werden. Bei der Überprüfung der Anteile an lebenden CD3+CD4+PD-L2+ T-Zellen zeigte sich nach 16 Stunden noch kein Unterschied zwischen unbehandelten und ECP-behandelten Co-Kulturen (n=4, Abbildung 19 D). Allerdings konnte insbesondere 1 Tag und 2 Tage nach ECP der Monozyten ein deutlich höherer Anteil an CD3+CD4+PD-L2+ T-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen beobachtet werden. Dieser Effekt drehte sich 5 Tage nach ECP um. Dennoch muss generell berücksichtigt werden, dass die prozentualen Anteile der CD3+CD4+PD-L2+ T-Zellen mit unter 4 % aller lebender CD3+CD4+ T-Zellen in der Co-Kultur sehr gering waren.

Somit konnten nur wenige Veränderungen hinsichtlich der ECP-induzierten Veränderungen an PD-L1+ bzw. PD-L2+ Monozyten und PD-L1+ bzw. PD-L2+ T-Zellen im *in vitro* Modell beobachtet werden. Dennoch sollte mit Hilfe einer Antikörper-Blockade der PD-L1-PD-1 oder PD-L2-PD-1 Interaktionen getestet werden, ob eine Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen in Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten möglich ist. Dafür wurden unbehandelte bzw. ECP-behandelte

Monozyten mit autologen, CFSE markierten CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation für 5 Tage co-kultiviert. Direkt nach ECP wurden 25 µg/ml anti-PD-L1 Antikörper, anti-PD-L2 Antikörper bzw. Pembrolizumab (therapeutischer anti-PD-1 Antikörper) der Co-Kultur zugegeben. Mit Hilfe von Isotypen-Kontrollantikörpern für anti-PD-L1 und anti-PD-L2 Antikörper wurde ein Effekt der Antikörper selbst ausgeschlossen. Für den therapeutischen Antikörper Pembrolizumab konnte zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Isotyp-Kontrolle kommerziell bezogen werden.

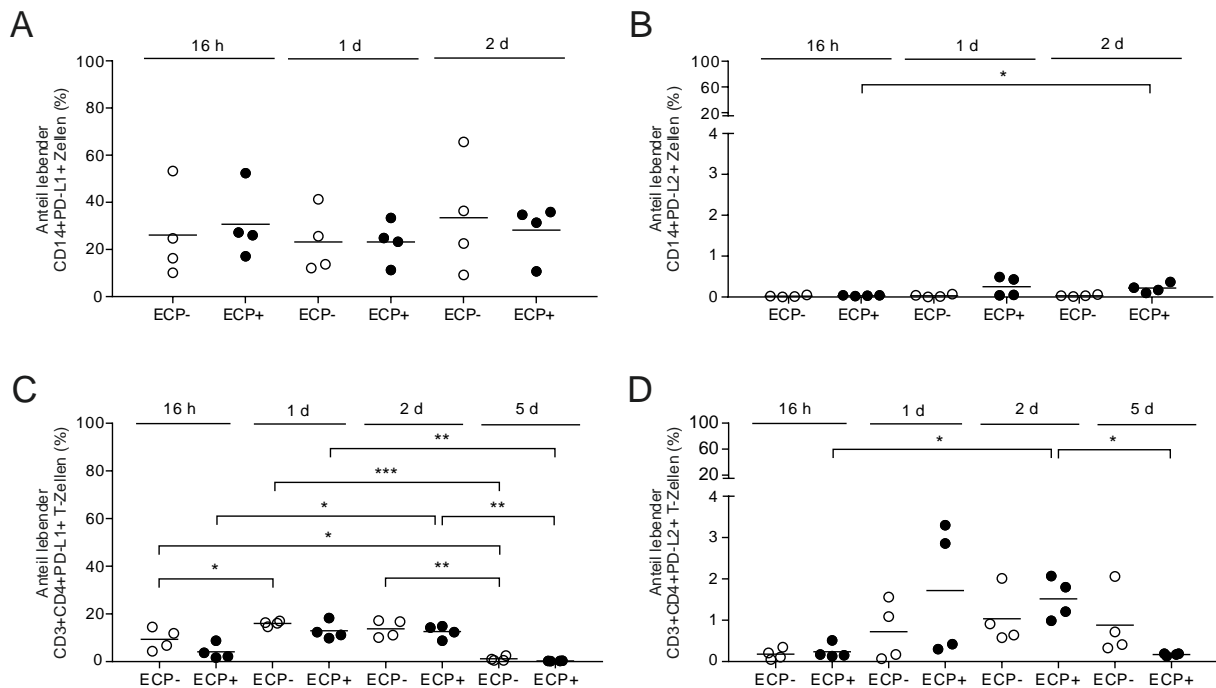


Abbildung 19: ECP-induzierte Veränderungen der Anteile an PD-L1+ bzw. PD-L2+ Monozyten nach *in vitro* ECP und der PD-L1+ bzw. PD-L2+ T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten wurden nach *in vitro* ECP für 16 Stunden, 1 Tag oder 2 Tage kultiviert und anschließend mechanisch abgelöst. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an **(A)** lebenden CD14+PD-L1+ und **(B)** lebenden CD14+PD-L2+ Monozyten zu den entsprechenden Zeitpunkten. Des Weiteren wurden die Monozyten mit CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation für 16 Stunden, 1 Tag, 2 Tage oder 5 Tage co-kultiviert. Daraufhin wurden die prozentualen Anteile der **(C)** lebenden CD3+CD4+CD274PD-L1+ und **(D)** lebenden CD3+CD4+PD-L2+ T-Zellen in den Co-Kulturen mit unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten bestimmt. n=4. Der Mittelwert aller Spender wird als Strich dargestellt. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

Anhand der Analysen konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied bei den Anteilen der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen nach Zugabe der Isotyp-Kontrollen IgG1 und IgG2b im Vergleich zu den Co-Kulturen ohne Antikörper Zugabe detektiert werden konnten (Abbildung 20 A und B).

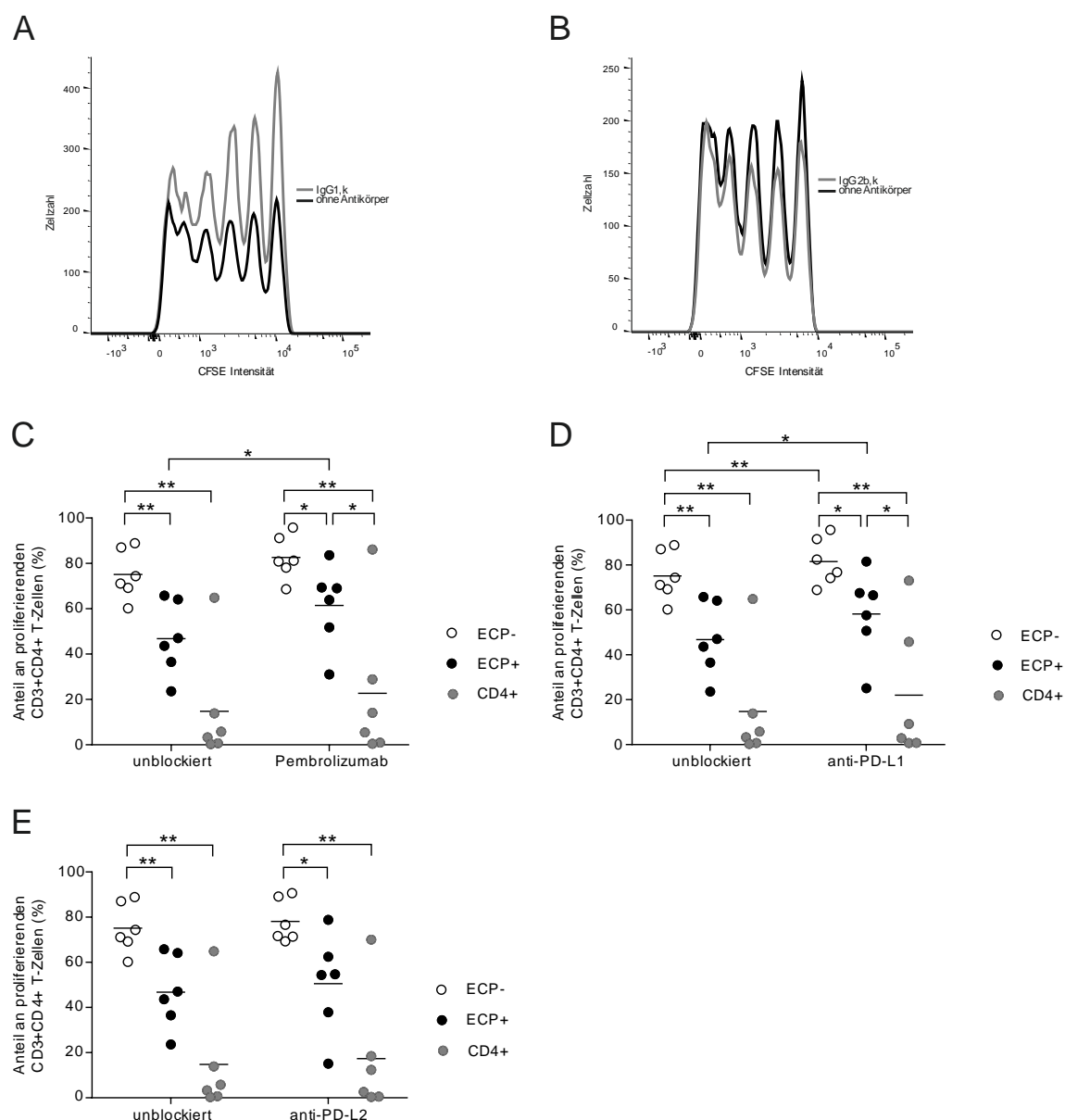


Abbildung 20: Veränderung der T-Zellproliferation nach Zugabe der blockierenden Antikörper Pembrolizumab, anti-PD-L1 und anti-PD-L2 Antikörper. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten wurden nach *in vitro* ECP mit unbehandelten CD4+ T-Zellen desselben Spenders im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper für 5 Tage co-kultiviert und 25 µg/ml der entsprechenden Antikörper direkt nach Ansetzen der Co-Kultur zugegeben. Als Kontrolle wurden CD4+ T-Zellen alleine unter Zugabe des anti-CD3 Antikörpers sowie der blockierenden Antikörper kultiviert. Exemplarische Histogramme der Durchflusszytometrie für Zugabe **(A)** des Isotyps IgG1,k und **(B)** des Isotyps IgG2b,k für einen Spender. Die Veränderungen der prozentualen Anteile an proliferierenden T-Zellen in unblockierten Ansätzen im Vergleich zur Zugabe **(C)** des anti-PD-1 Antikörpers Pembrolizumab, **(D)** des anti-PD-L1 Antikörpers und **(E)** des anti-PD-L2 Antikörpers wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. n=6. Die unblockierten Ansätze dienten als Negativkontrolle und wurden zugunsten der Übersichtlichkeit in den Abbildungen C-E mehrfach dargestellt. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. **p<0,01; *p<0,05.

Die Zugabe von Pembrolizumab in Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen von etwa 7 % im Vergleich zu den Co-Kulturen ohne Pembrolizumab (n=6, Abbildung 20 C). Die Anwesenheit von Pembrolizumab in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten hingegen bedingte einen signifikanten Anstieg der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen um 15 % im Vergleich zu den unblockierten Ansätzen. Sowohl ohne als auch mit Pembrolizumab Zugabe, konnte eine signifikante Abnahme der Proliferationsfähigkeit der CD3+CD4+ T-Zellen nach ECP-Behandlung der co-kultivierten Monozyten nachgewiesen werden (n=6, $p < 0,05$).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Zugabe des anti-PD-L1 Antikörpers einen signifikanten Anstieg der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen sowohl in unbehandelten (etwa 6 %) als auch in ECP-behandelten Ansätzen (etwa 12 %) verursachte (n=6, Abbildung 20 D). Sowohl in Co-Kulturen ohne anti-PD-L1 Antikörper als auch mit dem blockierenden Antikörper konnte nach *in vitro* ECP der Monozyten eine signifikante Abnahme der T-Zellproliferation in Co-Kulturen verzeichnet werden.

Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen der Blockade-Versuche, konnte nach Zugabe von anti-PD-L2 Antikörper keine deutliche Veränderung der Proliferationsfähigkeit der CD3+CD4+ T-Zellen sowohl in unbehandelten (Anstieg etwa 3 %) als auch in ECP-behandelten Ansätzen (Anstieg etwa 4 %) gezeigt werden (n=6, Abbildung 20 E). Dennoch konnte in Co-Kulturen ohne anti-PD-L2 Antikörper und in Co-Kulturen mit anti-PD-L2 Antikörper nach *in vitro* ECP der Monozyten eine signifikante Abnahme der T-Zellproliferation im Vergleich zu Co-Kulturen ohne ECP beschrieben werden.

Die Proliferationsfähigkeit der isolierten CD4+ T-Zellen allein unter anti-CD3 Antikörper Stimulation sollte als Negativkontrolle dienen, da ohne ein co-stimulatorisches Signal der Monozyten keine Proliferation erwartet wurde. Es konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die isolierten T-Zellen auch ohne co-kultivierte Monozyten proliferieren konnten. Allerdings lag der Anteil der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen in den unblockierten Ansätzen durchschnittlich bei etwa 15 %. Die Zugabe der Blockade Antikörper Pembrolizumab, anti-PD-L1 bzw. anti-PD-L2 Antikörper zu den CD4+ T-Zellen führten stets zu einem leichten Anstieg der proliferierenden T-Zellen, der prozentual stets dem Anstieg in den unbehandelten Ansätzen nach Antikörperzugabe entsprach.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der blockierenden Antikörper Pembrolizumab und anti-PD-L1 Antikörper Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen in Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten besaß.

4.5.2 Änderung der Expression von Effektorenzymen in Monozyten nach *in vitro* ECP

Die vorausgehenden Ergebnisse haben gezeigt, dass durch eine Blockade der PD-L1-PD-1 bzw. der PD-L2-PD-1 Achse keine vollständige Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit von CD3+CD4+ T-Zellen in Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten erreicht werden konnte. Dies deutet somit auf eine multifaktorielle Beeinflussung der T-Zellproliferation hin. Des Weiteren konnte in den Analysen

Die Überprüfung der prozentualen Anteile der lebenden CD14+Arg1+ und CD14+iNOS+ Zellen in Monozyten 2 Tage nach *in vitro* ECP zeigte keinen Unterschied zu den Anteilen in unbehandelten Monozyten (n=8 bzw. n=4). Zudem war das Ausgangsniveau der Zellen mit unter 3 % sehr gering. Ein signifikanter Anstieg der lebenden CD14+ROS+Zellen konnte nur 1 Tag nach ECP detektiert werden (n=5, $p < 0,05$, Abbildung 21 B), da die Kultur für 2 Tage zu lange für einen ROS Nachweis war (Daten nicht gezeigt).

Anhand der bisherigen Analysen konnte somit alleineIDO als potentieller, zusätzlich bedeutender Faktor bei der ECP-Behandlung von Monozyten identifiziert werden, der Einfluss auf co-kultivierte T-Zellen haben könnte.

4.5.3 Identifizierung von potentiellen Schlüsselgenen *in vitro* ECP-behandelter Monozyten mittels Transkriptomanalysen

Die bisherigen Analysen konnten zeigen, dass die Monozyten eine wichtige Rolle in dem hier etablierten *in vitro* ECP-Modell spielen. Der Einfluss *in vitro* ECP-behandelter Monozyten auf die co-kultivierten T-Zellen wurde als multifaktoriell identifiziert und macht weitere Analysen notwendig, die zur Aufklärung der ECP-induzierten Veränderungen der Monozyten beitragen könnten.

Mit Hilfe von Transkriptomanalysen von unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten 1 bzw. 2 Tage nach ECP sollte überprüft werden, ob potentielle für das Verständnis der Wirkweise der ECP relevanten Schlüsselgene identifiziert werden können. Hierfür wurden unbehandelte bzw. *in vitro* ECP-behandelte Monozyten 1 bzw. 2 Tage in Monozytenmedium kultiviert. Nach der Ernte der Zellen durch mechanisches Ablösen aus der Kulturplatte wurde aus der isolierten RNA eine Sequenzierbibliothek erstellt und mittels *Next-Generation-Sequencing* in Duplikaten analysiert. Durch die Erstellung dieser Metatranskriptombibliothek wird die gesamte RNA sequenziert (RNA-Seq) und alle Transkripte innerhalb einer Probe erfasst. Die anschließende Auswertung der differentiell regulierten Gene soll Aufschluss geben, welche Gene der entsprechenden Probe durch eine ECP-Behandlung der Monozyten zu einem bestimmten Zeitpunkt hoch- bzw. herunterreguliert werden. Dadurch kann das Wissen um ECP-spezifisch adressierte Zielgene erweitert und eine genetisch fundierte Ausgangslage für weitere Analysen ermöglicht werden.

Die Analyse der differentiellen Genexpression der ECP-behandelten Monozyten an Tag 1 nach ECP mit unbehandelten Monozyten zum selben Zeitpunkt als Referenz ergab eine Gesamtanzahl von 7.014 Genen, die durch das Mapping der sequenzierten Reads erhalten wurden. Unter Berücksichtigung der Kriterien, dass der Betrag der logarithmischen, n-Fachen Anreicherung größer 1 ist ($|\log_{FC}| > 1$) und die Signifikanz der n-fachen Anreicherung unter 0,05 liegt ($p < 0,05$) konnten von diesen 7.014 Genen noch 864 Gene als differentiell reguliert identifiziert werden. Insgesamt wurden 482 Gene (55,8 % der differentiell regulierten Gene) hoch- und 382 Gene (44,2 % der differentiell regulierten Gene) herunterreguliert.

Bereits 2 Tage nach ECP-Behandlung der Monozyten konnten 12.762 Gene durch das Mapping der sequenzierten Reads nachgewiesen werden, was etwa 81 % mehr Gene waren als noch an Tag 1

nach ECP. Durch Anwendung der an Tag 1 definierten Kriterien ($|\log_{2}FC| > 1$; $p < 0,05$) konnten 1.301 Gene als differentiell reguliert beschrieben werden, von denen 713 Gene (54,8 % der differentiell regulierten Gene) hoch- und 583 Gene (44,8 % der differentiell regulierten Gene) herunterreguliert wurden.

Da sich bereits die Anzahl der an Tag 1 und Tag 2 nach *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten nachgewiesenen Gene unterscheiden, stellte sich die Frage, wie viele dieser Gene nur an Tag 1 bzw. 2 und wie viele an beiden Zeitpunkten übereinstimmend differentiell reguliert sind. Eine genaue Untersuchung zeigte, dass 138 Gene (28,63 %) nur an Tag 1, 369 Gene (51,75 %) nur an Tag 2 und 344 Gene an beiden Tagen nach ECP hochreguliert vorlagen (Abbildung 22 A).

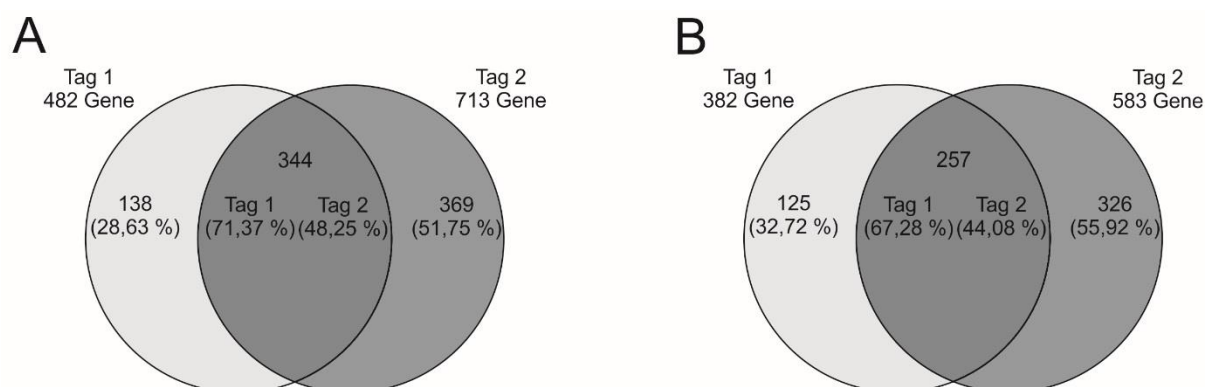


Abbildung 22: Abdeckung der differentiell regulierten Gene der Monozyten im Vergleich zwischen 1 Tag und 2 Tage nach ECP. Schematischer Vergleich der (A) hochregulierten und (B) herunterregulierten Gene der Monozyten nach 1 Tag und 2 Tagen nach ECP-Behandlung. Angabe in Anzahl der Gene und prozentualer Anteil an den differentiell hoch- bzw. herunterregulierten Genen.

Diese 344 Gene machten 71,37% aller an Tag 1 und 48,25% aller an Tag 2 hochregulierten Gene aus. Im Gegensatz dazu wurden 125 Gene (32,72%) nur an Tag 1, 326 Gene (55,92%) nur an Tag 2 und 257 Gene an beiden Tagen nach ECP herunterreguliert (Abbildung 22 B). Dabei entsprachen die 257 Gene 67,28% der an Tag 1 und 44,08% aller an Tag 2 herunterregulierten Gene.

Für eine detaillierte Analyse der hoch- bzw. herunterregulierten Gene, wurden diese zunächst über das DAVID *web tool* in Überkategorien eingeteilt, um eine vereinfachte Betrachtung der durch die ECP veränderten Prozesse auf Genebene zu ermöglichen. Hierbei wurden die Gene untersucht, die sowohl an Tag 1 und Tag 2 hoch- bzw. herunterreguliert wurden.

Von den an Tag 1 und Tag 2 344 hochregulierten Genen konnten 313 Gene durch das DAVID *web tool* in insgesamt 172 Kategorien eingeteilt werden. Abbildung 23 zeigt exemplarisch die 25 Kategorien, die die meisten Gene zugeweiht bekommen haben. Aus diesen Kategorien wurden anschließend diejenigen ausgesucht, die für fortführende Informationen interessant sein könnten (dick markiert). Auf Basis der bisher in dieser Arbeit durchgeführten Versuche waren insbesondere die beiden Kategorien *inflammatory response* und *negative regulation of cell proliferation* von hohem Interesse.

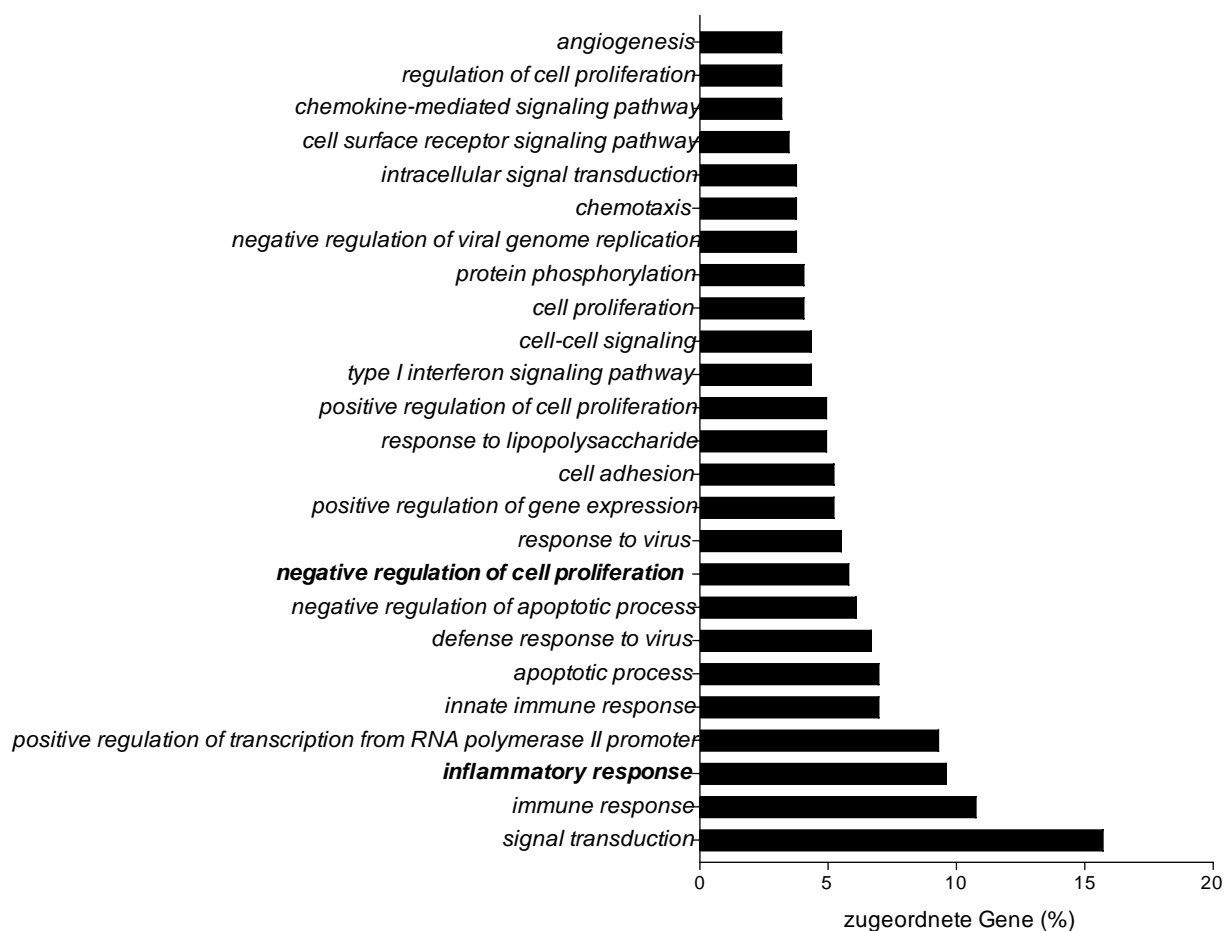


Abbildung 23: Dominierende Kategorien der an Tag 1 und Tag 2 nach *in vitro* ECP hochregulierten Gene. Dargestellt sind exemplarisch 25 Kategorien, in welche die meisten hochregulierten Gene der Monozyten nach 1 Tag und nach 2 Tagen nach ECP eingeteilt werden konnten.

Die beiden ausgesuchten Kategorien wurden dahingehend analysiert, welche Gene durch das DAVID *web tool* den Kategorien zugeordnet wurden (Tabelle 27). Dabei konnten 33 Gene in der Kategorie *inflammatory response* als signifikant, differentiell hochreguliert identifiziert werden, während der Kategorie *negative regulation of cell proliferation* 20 signifikant, differentiell hochregulierte Gene zugeordnet wurden. Um herauszufinden, welche Gene, die den beiden ausgesuchten Kategorien zugeordnet wurden, im Rahmen der ECP eine wichtige Rolle spielen könnten, wurde mittels der Gene-ID und der Beschreibung eine weitere Auswahl getroffen und mit Hilfe des logFC angegeben, wie stark diese Gene nach ECP hochreguliert wurden (dick markiert). Zu diesen Genen gehörten CXCL1, CXCL5, CXCL10, CXCR2, TNFRSF9, CXCL3, IL1B, CXCL2, CXCL8, TNFRSF10B, und TNFRSF10A, von denen manche Gene auch in beiden Kategorien gefunden werden konnten. Insbesondere Chemokinliganden und -rezeptoren mit einem C-X-C Motiv aber auch Gene der TNF-Rezeptorfamilie scheinen somit bei der ECP-Behandlung von Monozyten eine wichtige Rolle zu spielen, wie beispielsweise *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9* bei der inflammatorischen Antwort oder *chemokine (C-X-C motif) ligand 8* bei der negativen Regulation der Zellproliferation.

Tabelle 27: Übersicht der hochregulierten Gene der für interessant erachteten Kategorien nach ECP-Behandlung der Monozyten. Angabe ausgesuchter Kategorien, der zugeordneten Gene mit HGNC Symbol, Beschreibung und logFC. Dick markiert sind für weitere Analysen interessante Gene.

Kategorien	Gene	HGNC Symbol	Beschreibung	logFC
<i>inflammatory response</i>	ENSG00000163739	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	4,95
	ENSG00000163735	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	4,69
	ENSG00000169245	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	4,47
	ENSG00000180871	CXCR2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2	3,85
	ENSG00000188822	CNR2	cannabinoid receptor 2 (macrophage)	3,37
	ENSG00000171049	FPR2	formyl peptide receptor 2	3,31
	ENSG00000108691	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	3,20
	ENSG00000049249	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	3,01
	ENSG00000088827	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	2,90
	ENSG00000163736	PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	2,89
	ENSG00000154451	GBP5	guanylate binding protein 5	2,83
	ENSG00000103313	MEFV	Mediterranean fever	2,79
	ENSG00000151651	ADAM8	ADAM metalloproteinase domain 8	2,78
	ENSG00000026103	FAS	Fas cell surface death receptor	2,73
	ENSG00000163734	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	2,48
	ENSG00000125538	IL1B	interleukin 1, beta	2,31
	ENSG00000081041	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2,29
	ENSG00000171051	FPR1	formyl peptide receptor 1	2,18
	ENSG00000073756	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2,11
	ENSG00000213694	S1PR3	sphingosine-1-phosphate receptor 3	1,94
	ENSG00000102962	CCL22	chemokine (C-C motif) ligand 22	1,60
	ENSG00000167601	AXL	AXL receptor tyrosine kinase	1,55
	ENSG00000169429	CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8	1,55
	ENSG00000173530	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	1,54
	ENSG00000018280	SLC11A1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 1	1,53
	ENSG00000120889	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1,51
	ENSG00000158769	F11R	F11 receptor	1,47
	ENSG00000104689	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	1,30
	ENSG00000173578	XCR1	chemokine (C motif) receptor 1	1,24
	ENSG00000123610	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-	1,11

			<i>induced protein 6</i>	
	ENSG00000134070	IRAK2	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 2</i>	1,07
	ENSG00000125730	C3	<i>complement component 3</i>	1,02
	ENSG00000137801	THBS1	<i>thrombospondin 1</i>	1,02
<i>negative regulation of cell proliferation</i>	ENSG00000163739	CXCL1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)</i>	4,95
	ENSG00000148516	ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>	4,15
	ENSG00000119917	IFIT3	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>	3,08
	ENSG00000049249	TNFRSF9	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</i>	3,01
	ENSG00000175592	FOSL1	<i>FOS-like antigen 1</i>	2,94
	ENSG00000124762	CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>	2,77
	ENSG00000099985	OSM	<i>oncostatin M</i>	2,49
	ENSG00000125538	IL1B	<i>interleukin 1, beta</i>	2,31
	ENSG00000073756	PTGS2	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	2,11
	ENSG00000164938	TP53INP1	<i>tumor protein p53 inducible nuclear protein 1</i>	1,82
	ENSG00000141232	TOB1	<i>transducer of ERBB2, 1</i>	1,72
	ENSG00000122641	INHBA	<i>inhibin, beta A</i>	1,64
	ENSG00000169429	CXCL8	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>	1,55
	ENSG00000180573	HIST1H2AC	<i>histone cluster 1, H2ac</i>	1,45
	ENSG00000139567	ACVRL1	<i>activin A receptor type II-like 1</i>	1,45
	ENSG00000198719	DLL1	<i>delta-like 1 (Drosophila)</i>	1,44
	ENSG00000055332	EIF2AK2	<i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2</i>	1,14
	ENSG00000102096	PIM2	<i>Pim-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>	1,13
	ENSG00000163251	FZD5	<i>frizzled class receptor 5</i>	1,12
	ENSG00000117036	ETV3	<i>ets variant 3</i>	1,09

An Tag 1 und Tag 2 wurden des Weiteren insgesamt 257 Gene herunterreguliert, von denen 229 Gene durch das DAVID web tool zu 55 Kategorien zugeordnet werden konnten. In Abbildung 24 sind exemplarisch 25 Kategorien dargestellt, welche die meisten Gene zugeteilt bekommen haben. Aus diesen Kategorien wurden, wie auch schon zu vor für die hochregulierten Gene durchgeführt, zunächst die Kategorien und daraus die Gene ausgesucht, die für fortführende Informationen interessant sein könnten (dick markiert). Neben der Kategorie *cell adhesion* könnten auch die Kategorien *positive regulation of apoptotic process* und *G1/s transition of mitotic cell cycle* für weitere Analysen wichtig sein.

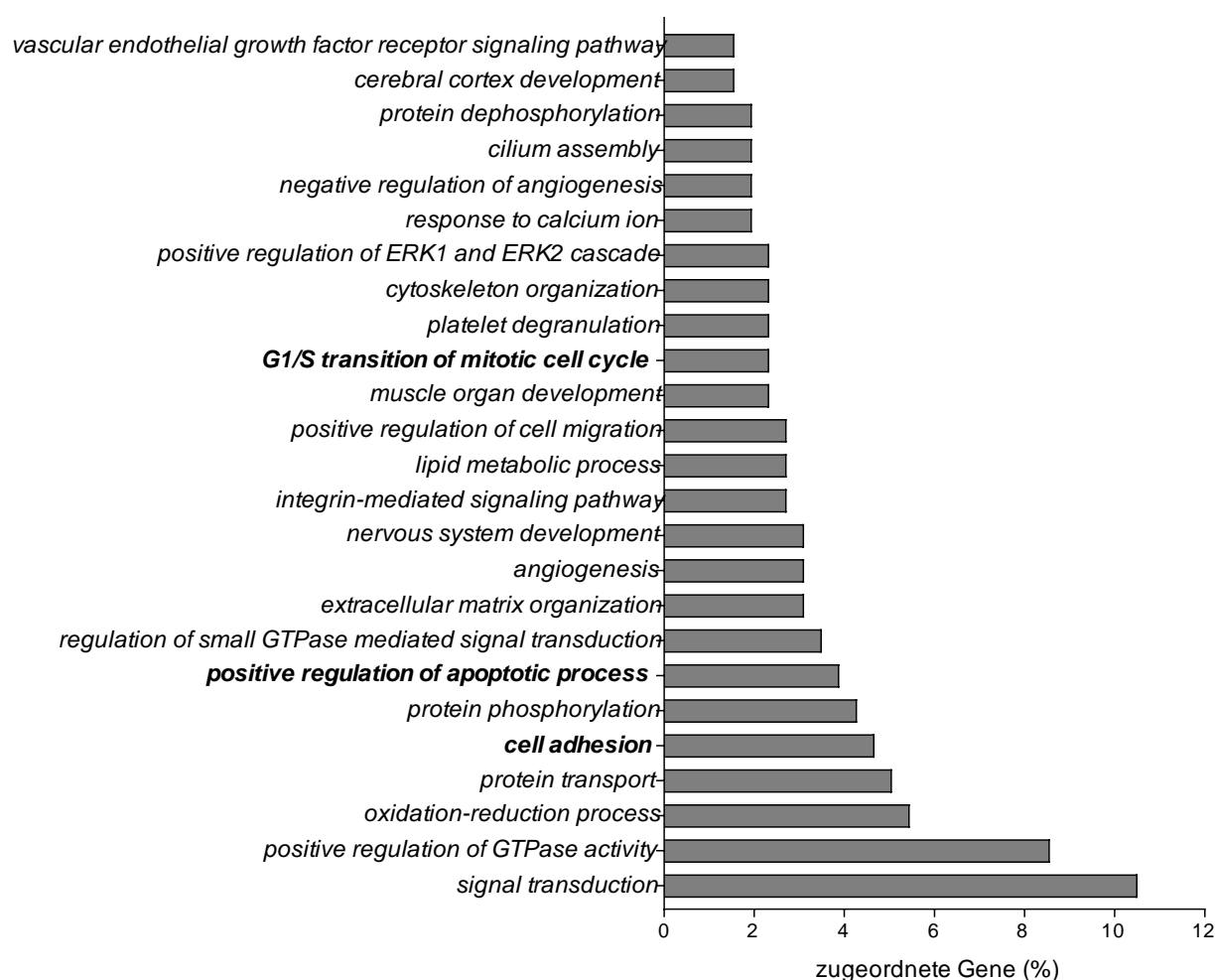


Abbildung 24: Vorherrschende Kategorien der an Tag 1 und Tag 2 nach ECP herunterregulierten Gene. Dargestellt sind exemplarisch 25 Kategorien, in welche die meisten herunterregulierten Gene der Monozyten nach 1 Tag und nach 2 Tagen nach ECP eingeteilt werden konnten.

Für eine detailliertere Analyse wurden die drei Kategorien hinsichtlich der ihnen zugeordneten Gene untersucht. In der Kategorie *cell adhesion* konnten 12 Gene gefunden werden, die signifikant, differentiell herunterreguliert wurden (Tabelle 28). In der zweiten ausgewählten Kategorie *positive regulation of apoptotic process* wurden nur noch 10 signifikant, differentiell herunterregulierte Gene gefunden und in der Kategorie *G1/S transition of mitotic cell cycle* sogar nur noch 6 Gene. Zusammenfassend konnte eine bedeutende Rolle für verschiedene Kinasen identifiziert werden, wie beispielsweise die *protein kinase C, alpha* bei der Zelladhäsion, der *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* bei der Regulation der Apoptose oder der *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta* beim Zellzyklusübergang von der G1- in die S-Phase. Aus allen Genen, aus den drei ausgesuchten Kategorien wurde anschließend eine Auswahl dahingehend getroffen, welche Gene für fortführende Analysen zur Aufklärung des Einflusses der ECP-Behandlung auf Monozyten von Interesse sein könnten (dick markiert). Dazu gehörten CD36, ALCAM, FAF1 und CDKN2A, die zum Teil auch in mehreren Kategorien vertreten waren.

Tabelle 28: Signifikant herunterregulierte Gene der für weitere Analysen potentiell interessanten Kategorien nach *in vitro* ECP. Angabe ausgesuchter Kategorien, der zugeordneten Gene mit HGNC Symbol, Beschreibung und logFC. Dick markiert sind für weitere Analysen interessante Gene.

Kategorien	Gene	HGNC Symbol	Beschreibung	logFC
<i>cell adhesion</i>	ENSG00000145012	LPP	<i>LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma</i>	-2,35
	ENSG00000151422	FER	<i>fer (fps/fes related) tyrosine kinase</i>	-2,29
	ENSG00000154229	PRKCA	<i>protein kinase C, alpha</i>	-2,15
	ENSG00000107282	APBA1	<i>amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1</i>	-2,09
	ENSG00000149294	NCAM1	<i>neural cell adhesion molecule 1</i>	-1,93
	ENSG00000135218	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-1,80
	ENSG00000005884	ITGA3	<i>integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)</i>	-1,58
	ENSG00000170017	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	-1,47
	ENSG00000137809	ITGA11	<i>integrin, alpha 11</i>	-1,35
	ENSG00000010327	STAB1	<i>stabilin 1</i>	-1,31
	ENSG00000115414	FN1	<i>fibronectin 1</i>	-1,25
ENSG00000091409	ITGA6	<i>integrin, alpha 6</i>	-1,19	
<i>positive regulation of apoptotic process</i>	ENSG00000185104	FAF1	Fas (TNFRSF6) associated factor 1	-2,53
	ENSG00000156113	KCNMA1	<i>potassium channel, calcium activated large conductance subfamily M alpha, member 1</i>	-2,19
	ENSG00000006747	SCIN	<i>scinderin</i>	-1,81
	ENSG00000128918	ALDH1A2	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2</i>	-1,57
	ENSG00000147889	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	-1,52
	ENSG00000183049	CAMK1D	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID</i>	-1,47
	ENSG00000091409	ITGA6	<i>integrin, alpha 6</i>	-1,19
	ENSG00000084676	NCOA1	<i>nuclear receptor coactivator 1</i>	-1,18
	ENSG00000129675	ARHGEF6	<i>Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6</i>	-1,08
	ENSG00000197548	ATG7	<i>autophagy related 7</i>	-1,06
<i>G1/S transition of mitotic cell cycle</i>	ENSG00000145349	CAMK2D	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta</i>	-2,22
	ENSG00000020426	MNAT1	<i>MNAT CDK-activating kinase assembly factor 1</i>	-1,63
	ENSG00000101868	POLA1	<i>polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit</i>	-1,57
	ENSG00000147889	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	-1,52
	ENSG00000146143	PRIM2	<i>primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)</i>	-1,45
	ENSG00000138814	PPP3CA	<i>protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme</i>	-1,45

Somit konnten durch die Transkriptomanalyse Gene identifiziert werden, deren Überprüfung zu einem detaillierteren Verständnis des Einflusses der ECP auf Monozyten führen könnte.

4.6 Validierung des *in vitro* ECP-Modells mittels Patientenproben

Die bisherigen Analysen zeigten einen deutlichen Effekt der *in vitro* ECP-Behandlung nicht nur auf die behandelten Monozyten selbst, sondern auch auf co-kultivierte T-Zellen. Um das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *in vitro* ECP-Modell und dessen Auswirkungen zu validieren, sollten mit Hilfe von Patientenmaterial verschiedene, grundlegende Fragestellungen erneut überprüft und mit den *in vitro* generierten Daten verglichen werden. Dadurch sollte die Verlässlichkeit und Aussagekraft des *in vitro* ECP-Modells bestätigt werden. Es wurden ECP-Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten ihres ECP-Behandlungsplans und mit verschiedenen Vorerkrankungen und Indikationen in die Arbeit einbezogen, um einen möglichst heterogenen Spenderpool zu erhalten. Zudem sollten die Patienten in ihrer medikamentösen Vortherapie variieren.

Für die weiteren Untersuchungen wurden Monozyten aus dem Apharesat von Patienten vor Zugabe von UVADEX® (*ex vivo*, ECP-) bzw. nach *ex vivo* ECP (*ex vivo*, ECP+) isoliert. Ein Teil der aus vor *ex vivo* ECP entnommenen Proben isolierten Monozyten wurde entweder unbehandelt belassen (*in vitro*, ECP-) während der andere Teil dieser Zellen *in vitro* mit den bereits festgelegten Parametern behandelt wurden (*in vitro*, ECP+). Anschließend wurden die jeweiligen Monozyten mit CD4+ T-Zellen eines gesunden Spenders für 5 Tage unter anti-CD3 Antikörper Stimulation im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) co-kultiviert, um eine Beeinträchtigung der T-Zellen durch etwaige Vorerkrankungen zu vermeiden. Neben der Frage, ob eine ECP-Behandlung von Monozyten aus Patientenmaterial auch zu einer Abnahme der T-Zellproliferation in Co-Kultur führt, sollte ebenso untersucht werden, inwiefern sich die Anteile der T-Zelltypen verändern. Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass eine Dominanz der Th1- bzw. Th2-Antworten nach ECP abhängig von der zu behandelnden Erkrankung eines Patienten sein kann, sollte überprüft werden wie sich die in dieser Arbeit untersuchten Zellen der ECP-Patienten verhalten.

4.6.1 Vergleich der T-Zellproliferation in Co-Kultur mit *ex vivo* bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten von Patienten

Durch die vorausgehenden Analysen konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* ECP von Monozyten gesunder Spender zu einer signifikanten Abnahme der Proliferationsfähigkeit von co-kultivierten, autologen CD4+ T-Zellen führt. Um das hier vorliegende *in vitro* ECP-Modell zu validieren, sollte überprüft werden, ob sowohl Monozyten aus *ex vivo* behandeltem Apharesat von ECP-Patienten als

auch Monozyten aus unbehandeltem Apharesat, die *in vitro* ECP-behandelt werden, eine Hemmung der T-Zellproliferation verursachen.

CD3+CD4+ T-Zellen, die mit unbehandelten Monozyten co-kultiviert wurden, zeigten nach 5 Tagen eine Proliferationsrate von 67,95 % \pm 14,90 % (Ansatz „*ex vivo*“) bzw. 72,68 % \pm 14,69 % (Ansatz „*in vitro*“) (Abbildung 25). Sowohl die *ex vivo* als auch die *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten führte bei den co-kultivierten T-Zellen zu einer deutlichen Abnahme der Proliferationsfähigkeit, die im Fall der *in vitro* ECP-behandelten Ansätze signifikant war (n=4, p<0,01). Der Anteil der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen war im *in vitro* ECP-Modell im Vergleich zu den *ex vivo* behandelten Ansätzen sowohl in der unbehandelten als auch in der ECP-behandelten Co-Kultur erhöht.

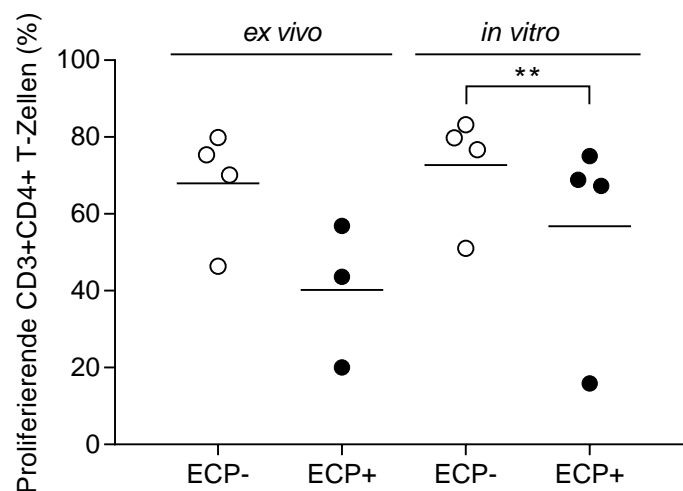


Abbildung 25: Änderung der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen in Co-Kultur mit *ex vivo* im Vergleich zu *in vitro* ECP-behandelten Monozyten isoliert aus Patientenproben. Monozyten von ECP-Patienten vor *ex vivo* UVADEX®-Zugabe wurden aus dem Apharesat isoliert (*ex vivo*, ECP-) und zudem *in vitro* ECP-behandelt (*in vitro*, ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) oder unbehandelt belassen (*in vitro*, ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A). Außerdem wurden Monozyten aus dem Apharesat nach *ex vivo* UVADEX® Zugabe und UV-A Bestrahlung isoliert (*ex vivo*, ECP+). Die *ex vivo* und *in vitro* ECP-behandelten bzw. unbehandelten Monozyten wurden mit CD4+ T-Zellen gesunder Spender für 5 Tage unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper co-kultiviert. Proliferationsraten der T-Zellen wurden mittels CFSE am Durchflusszytometer bestimmt. Darstellung der proliferierenden CD3+CD4+ T-Zellen in Prozent. n=4, ein Datenpunkt bei *ex vivo*, ECP+ fehlt aufgrund von Agglutination der Proben. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. **p<0,01; *p<0,05.

Somit konnte sowohl durch *ex vivo* als auch durch *in vitro* ECP-behandelte Monozyten von ECP-Patienten eine Abnahme der Proliferationsfähigkeit von co-kultivierten T-Zellen verursacht werden.

4.6.2 Induktion von anti- und proinflammatorischen T-Zelltypen in Co-Kultur mit *ex vivo* bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten von Patienten

Die Untersuchung der anteilmäßigen Veränderung von anti- und proinflammatorischen T-Zelltypen zeigte, dass eine Co-Kultur von *in vitro* ECP-behandelten Monozyten gesunder Spender mit autologen CD4⁺ T-Zellen zu einer Induktion von proinflammatorischen T-Zelltypen führte, während antiinflammatorische T-Zellen unbeeinflusst blieben. Daher sollte überprüft werden, ob dieselben Effekte in der T-Zelltypenverteilung erhalten werden, wenn *ex vivo* bzw. *in vitro* ECP-behandelte Monozyten aus Patientenapheresat in der Co-Kultur eingesetzt werden. Analysiert wurden die T-Zellen auf die Veränderung der Anteile von CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen, sowie von antiinflammatorischen CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ Th2-Zellen und proinflammatorischen CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺ Th1-Zellen, CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ Th17-Zellen, CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺IFN γ ⁺ Th17Th1-Zellen und CD3⁺CD4⁺IL-2⁺ T-Zellen 5 Tage nach Co-Kultur im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation.

In Co-Kulturen von *ex vivo* ECP-behandelten Monozyten und CD4⁺ T-Zellen konnte eine leichte Abnahme der prozentualen Anteile der Tregs an allen lebenden CD3⁺CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden, wohingegen in Co-Kulturen mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten keine deutliche Änderung der Anteile zu detektieren war (Abbildung 26 A und B). Antiinflammatorische Th2-Zellen sowie proinflammatorische Th17-Zellen zeigten sowohl in Ansätzen mit *ex vivo* als auch mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten keine Veränderung in ihren prozentualen Anteilen. Im Gegensatz dazu konnte für proinflammatorische Th1-Zellen, Th17Th1-Zellen und IL-2⁺ T-Zellen eine Induktion der entsprechenden T-Zelltypen nach *ex vivo* und *in vitro* ECP festgestellt werden. Der Anstieg der prozentualen Anteile der Th17Th1-Zellen war in den *in vitro* behandelten Ansätzen signifikant (n=6, p<0,05). Sowohl die Th1-Zellen mit 19,42 % \pm 7,77 % (*ex vivo*) bzw. 23,46 % \pm 11,39 % (*in vitro*) als auch die IL-2⁺ T-Zellen mit 42,93 % \pm 23,91 % (*ex vivo*) bzw. 38,82 % \pm 24,08 % (*in vitro*) sind vor ECP-Behandlung prozentual am stärksten vertreten.

Die bisherigen Untersuchungen des Einflusses der ECP anhand von Patientenmaterial haben gezeigt, dass sowohl die *ex vivo* als auch die *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten zu einem vergleichbaren Ergebnis führen.

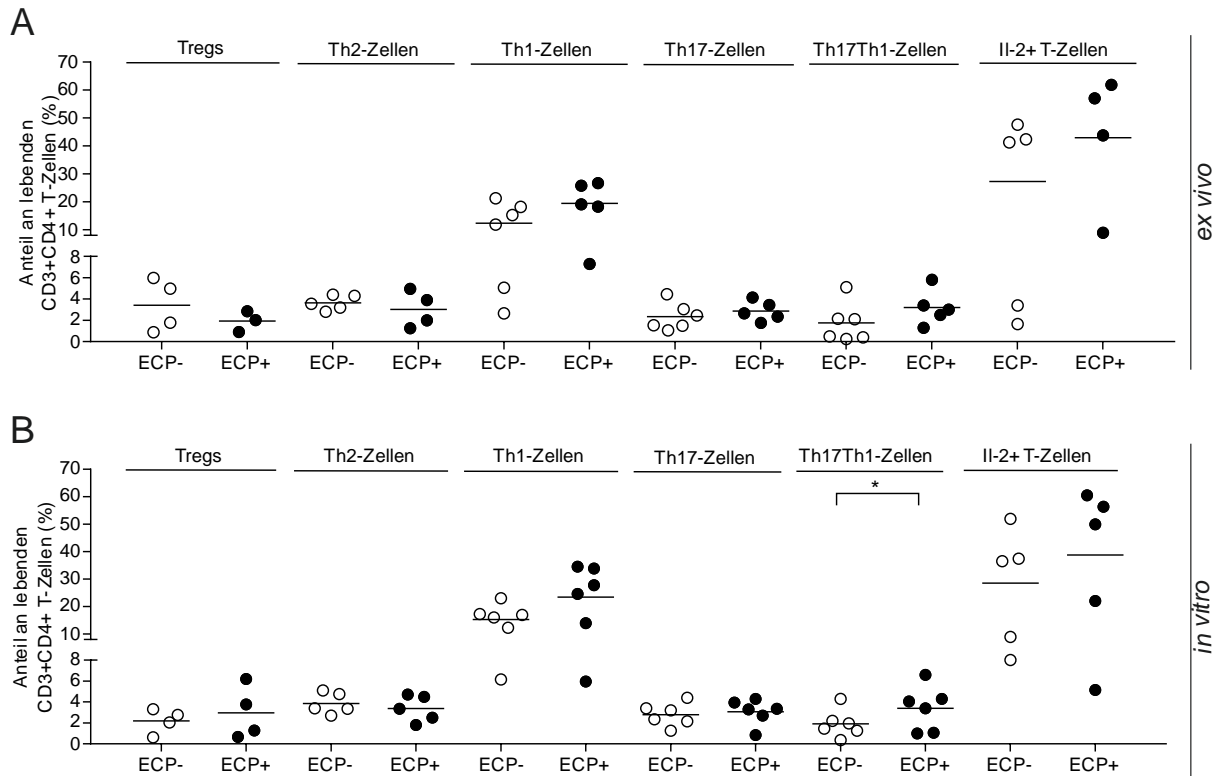


Abbildung 26: Änderungen der T-Zelltypenanteile in Co-Kulturen von *ex vivo* bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten von ECP-Patienten mit CD4+ T-Zellen. Monozyten vor *ex vivo* UVADEX®-Zugabe wurden aus dem Apharesat isoliert (*ex vivo*, ECP-) und zudem *in vitro* ECP-behandelt (*in vitro*, ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) oder unbehandelt belassen (*in vitro*, ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A). Außerdem wurden Monozyten aus dem Apharesat nach *ex vivo* UVADEX® Zugabe und UV-A Bestrahlung isoliert (*ex vivo*, ECP+). Die *ex vivo* und *in vitro* ECP-behandelten bzw. unbehandelten Monozyten wurden mit CD4+ T-Zellen gesunder Spender für 5 Tage unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) co-kultiviert und anschließend mittels Oberflächen- und intrazellulärer Färbung für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Anteile der CD3+CD4+CD25+FoxP3+ Tregs (n=4), antiinflammatorischen CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen (n=5) sowie proinflammatorischen CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen (n=6), CD3+CD4+IL-17A+ Th17-Zellen (n=6), CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen (n=6) und CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen (n=5) an lebenden T-Zellen in den **(A)** *ex vivo* und **(B)** *in vitro* ECP-behandelten Ansätzen. Ein Datenpunkt bei *ex vivo*, ECP+ fehlt aufgrund von Agglutination der Proben. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. *p<0,05.

4.7 Auswirkung einer Kombinationstherapie mit Vitamin D3 im Rahmen der ECP

Glucocorticoide gehören zu den Corticosteroiden und werden u.a. bei der Behandlung von Patienten mit GvHD eingesetzt. Eine mögliche auftretende Glucocorticoidresistenz ist ein Grund, warum die ECP-Behandlung bei GvHD Patienten eingesetzt wird. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass MIF eine Rolle bei der Entwicklung einer Glucocorticoidresistenz von Sepsispatienten zu spielen scheint [88]. Bei Steroid-resistenten Patienten mit systemischer Lupus erythematoses Erkrankung konnte gezeigt werden, dass die MIF Konzentration im Serum wie auch in PBMCs höher als in steroid-sensitiven Patienten und Kontrollen ist [83]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich durch die ECP-Behandlung von Monozyten eine Veränderung in der Genregulation von MIF nachweisen lässt. Sollte die Genexpression von MIF durch *in vitro* ECP herunterreguliert werden, könnte dies ein Anzeichen dafür sein, dass ECP-Patienten gegenüber einer Corticosteroidbehandlung resensibilisiert werden.

Vitamin D3 und Corticosteroide werden in der Klinik häufig zusammen eingesetzt, um zusätzlich den immunregulatorischen Effekt des Vitamin D3 bei Autoimmunerkrankungen therapeutisch zu nutzen [218]. Dabei kommt es zu einer Amplifizierung des immunsuppressiven Effekts [108] durch beispielsweise eine Reduktion der T-Zellproliferation oder der IFN γ Sekretion durch Th1-Zellen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine *in vitro* simulierte Kombinationstherapie aus Vitamin D3 ($1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) und anschließender ECP-Behandlung der Monozyten, einen Einfluss auf im Rahmen des *in vitro* ECP-Modells co-kultivierten CD4+ T-Zellen hinsichtlich Proliferationsfähigkeit und Induktion anti- und proinflammatorischen T-Zelltypen hat. Sollte eine *in vitro* Kombinationstherapie mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ zu einer Verstärkung der antiinflammatorischen Immunantwort führen, könnte diese in der Klinik bei beispielsweise GvHD Patienten eine deutliche Verbesserung der therapeutischen Wirkung der ECP verursachen.

4.7.1 Expression von MIF nach *in vitro* ECP

Für die Überprüfung der MIF-Expression wurden isolierte Monozyten unbehandelt belassen bzw. *in vitro* ECP-behandelt und 1 Tag kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch abgelöst und RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels einer qRT-PCR wurde anschließend die Genexpression von ECP-behandelten Monozyten detektiert, wobei die Genexpression von unbehandelten Monozyten desselben Spenders als Referenz diente.

Bereits 1 Tag nach *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten wurde MIF signifikant in Bezug auf unbehandelte Monozyten herunterreguliert ($n=5$, $p<0,01$, Abbildung 27).

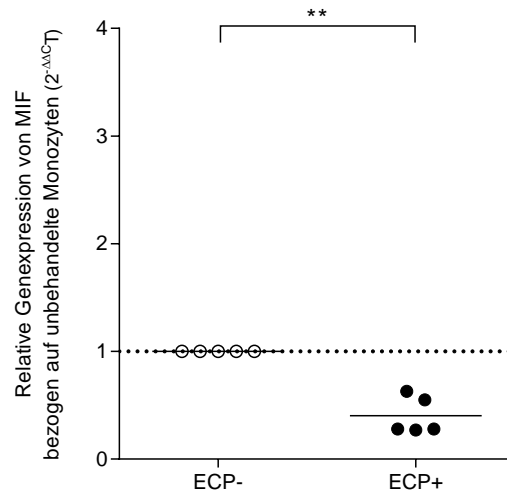


Abbildung 27: Einfluss der *in vitro* ECP-Behandlung auf die Genexpression von MIF. Unbehandelte (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm² UV-A) bzw. ECP-behandelte (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm² UV-A) Monozyten wurden nach *in vitro* ECP für 1 Tag kultiviert und die Genexpression mittels qRT-PCR Analysen bestimmt. Dargestellt ist die relative Genexpression von MIF in Bezug auf unbehandelte Monozyten, die mittels der 2^{-ΔΔCt} Methode mit RPL13A als *housekeeper* Gen bestimmt wurde. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. **p<0,01.

4.7.2 Änderung der T-Zellproliferation durch Kombinationstherapie mit 1α,25-(OH)₂D3

In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass *in vitro* ECP-behandelte Monozyten in Co-Kulturen mit CD4⁺ T-Zellen zu einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen bedingen. Um zu überprüfen, wie sich die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen bei einer Kombinationstherapie mit 1α,25-(OH)₂D3 verhält, wurden Monozyten gesunder Spender für 4 Stunden mit 1α,25-(OH)₂D3 inkubiert. Anschließend wurden die Monozyten *in vitro* ECP-behandelt und mit CFSE markierten, autologen CD4⁺ T-Zellen für 5 Tage im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) und unter anti-CD3 Antikörper Stimulation co-kultiviert. Die Analyse der Proliferationsfähigkeit erfolgte mittels Oberflächenfärbung und Nachweis der CFSE Intensität am Durchflusszytometer.

Sowohl für Co-Kulturen mit unstimulierten (1α,25-(OH)₂D3 -) als auch mit 1α,25-(OH)₂D3 stimulierten (1α,25-(OH)₂D3 +) Monozyten konnte eine signifikante Abnahme der proliferierenden CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach *in vitro* ECP detektiert werden (Abbildung 28).

Bei den Ansätzen mit unstimulierten Monozyten liegt die Reduktion der Proliferation bei 21,68 % ± 12,96 %, bei den Ansätzen mit 1α,25-(OH)₂D3 stimulierten Monozyten bei 26,88 % ± 10,50 %. Ein Vergleich der Anteile proliferierender T-Zellen in Co-Kulturen ohne 1α,25-(OH)₂D3 Stimulation der Monozyten zeigte, dass in Ansätzen ohne ECP-Behandlung der Monozyten mehr CD3⁺CD4⁺ T-Zellen

proliferierten im Vergleich zu den T-Zellen in Co-Kulturen mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation der Monozyten.

Somit führt eine vorab $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Behandlung der Monozyten zu einer Reduktion der T-Zellproliferation in Co-Kulturen in ECP-unbehandelten Ansätzen und verstärkt die Abnahme der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten zusätzlich.

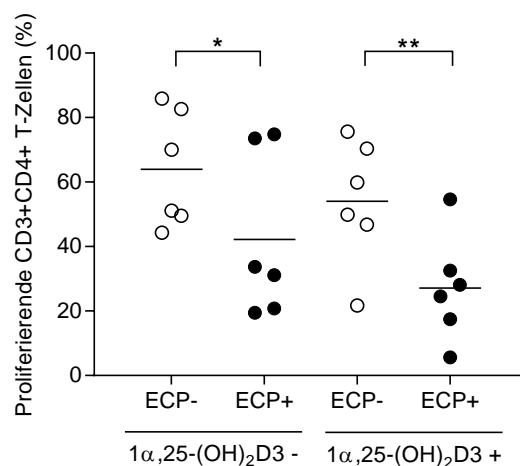


Abbildung 28: Veränderung der prozentualen Anteile proliferierender T-Zellen in Ansätzen mit und ohne $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation der Monozyten im *in vitro* ECP-Modell. Monozyten wurden unstimuliert ($1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -) bzw. mit $0,1 \mu\text{M}$ $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ für 4 Stunden inkubiert ($1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ +) und anschließend unbehandelt belassen (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm^2 UV-A) bzw. ECP-behandelt (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm^2 UV-A). Daraufhin wurden Monozyten mit unbehandelten, CFSE markierten CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper 5 Tage co-kultiviert. Die Veränderung der proliferierenden T-Zellen in den verschiedenen Ansätzen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. $n=6$. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. ** $p<0,01$, * $p<0,05$.

4.7.3 Induktion anti- und proinflammatorischer T-Zelltypen nach Kombinationstherapie

Es konnte in Co-Kulturen aus Monozyten und CD4+ T-Zellen gezeigt werden, dass die *in vitro* ECP von Monozyten zu einer Induktion proinflammatorischer T-Zelltypen führt und antiinflammatorische T-Zelltypen anteilmäßig unbeeinflusst bleiben. Daher stellte sich die Frage, ob eine *in vitro* Kombinationstherapie aus vorab Behandlung der Monozyten mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und anschließender *in vitro* ECP, einen Einfluss auf die Induktion anti- und proinflammatorischer T-Zellen haben könnte. Dafür wurden Monozyten gesunder Spender isoliert, 4 Stunden mit Vitamin D3 (Ansatz „ $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ +“) inkubiert oder unstimuliert belassen (Ansatz „ $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -“). Daraufhin wurden die Monozyten *in vitro* ECP-behandelt bzw. unbehandelt belassen und mit CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter anti-CD3 Antikörper Stimulation für 5 Tage co-kultiviert. Die prozentualen Anteile der antiinflammatorischen CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen sowie proinflammatorischen CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen, CD3+CD4+IL-17A+ Th17-Zellen, CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen und CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen in der Co-Kultur wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Bei der Analyse der prozentualen Anteile der lebenden Th2-Zellen (Abbildung 29 A) zeigte sich, dass in den unbehandelten Ansätzen eine signifikante Reduktion durch $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation erzielt wurde. Die *in vitro* ECP der Monozyten führte in unstimulierten Ansätzen zu keiner Veränderung der prozentualen Anteile der Th2-Zellen in der Co-Kultur, während in den $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ stimulierten Ansätzen eine leichte Zunahme der Anteile detektiert werden konnte.

Es konnte hingegen ein signifikanter Anstieg der prozentualen Anteile der Th1-Zellen (Abbildung 29 B), Th17Th1-Zellen (Abbildung 29 D) und IL-2+ T-Zellen (Abbildung 29 E) nach Co-Kultur mit ECP-behandelten, $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ stimulierten Monozyten nachgewiesen werden. Dieselben T-Zelltypen, mit Ausnahme der Th17Th1-Zellen, nahmen auch in Co-kulturen mit unstimulierten Monozyten nach *in vitro* ECP signifikant zu. Th17-Zellen (Abbildung 29 C) zeigten keinen Unterschied nach ECP unabhängig von einer $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation im Vergleich zu ECP unbehandelten Ansätzen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass außer bei den Th17-Zellen des entsprechend untersuchten T-Zelltyps in Co-Kulturen mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ stimulierten, ECP unbehandelten Monozyten niedriger im Vergleich zu den Anteilen in Co-Kulturen mit nicht stimulierten, ECP unbehandelten Monozyten. Auch durch die Co-Kultur der T-Zellen mit ECP-behandelten Monozyten bleibt das Niveau der Th1-Zellen, der Th17Th1-Zellen und der IL-2+ T-Zellen niedriger in Ansätzen mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation im Vergleich zu einer fehlenden Stimulation.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation von Monozyten zu einem niedrigeren Niveau von proinflammatorischen T-Zelltypen führte, welches auch nach *in vitro* ECP der Monozyten niedriger blieb als im ECP-behandelten Ansatz. Die Anteile der antiinflammatorischen Th2-Zellen hingegen zeigten in Co-Kulturen mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ behandelten Monozyten nach *in vitro* ECP eine leichte Tendenz, anteilmäßig zuzunehmen.

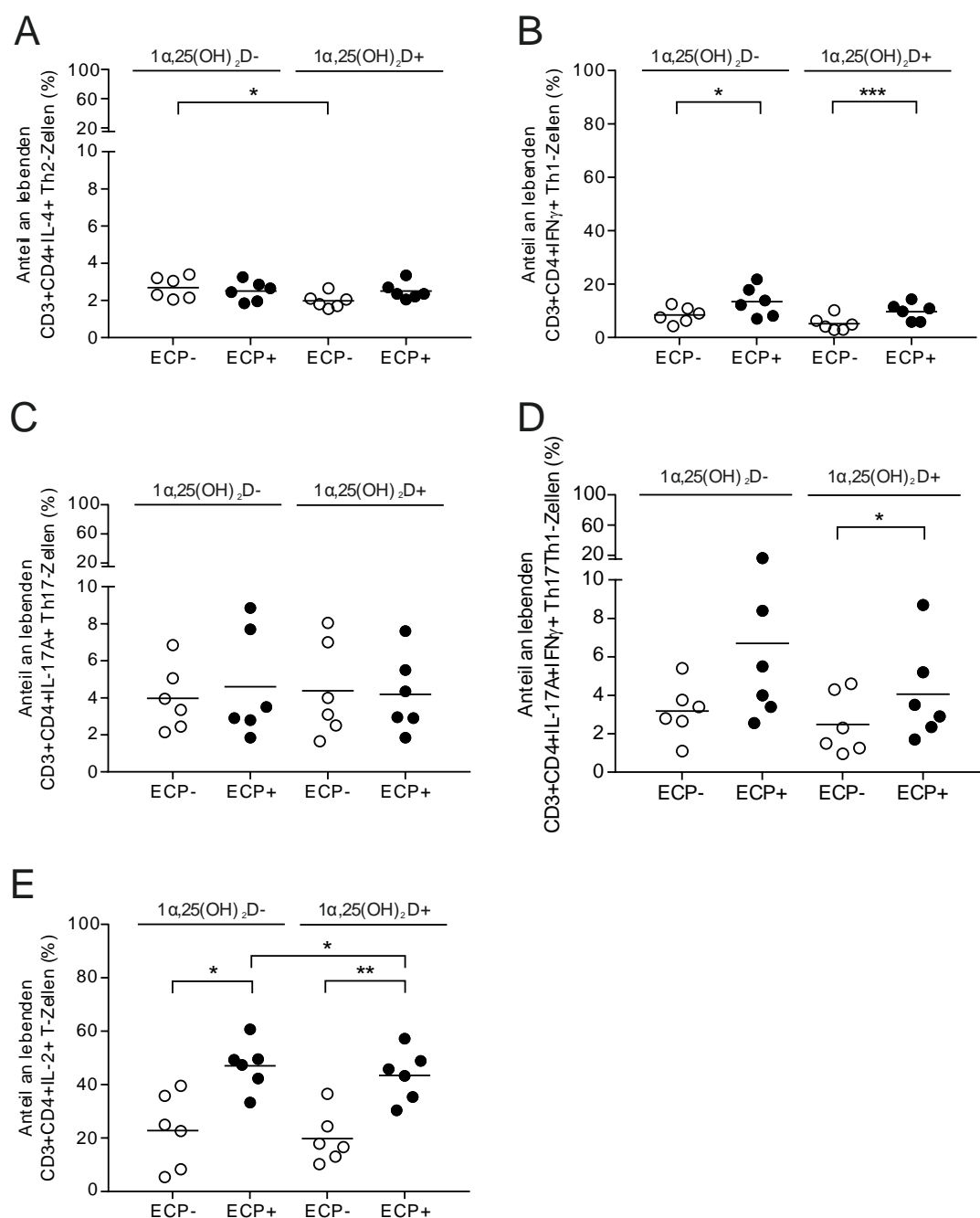


Abbildung 29: Prozentualer Anteil pro- und antiinflammatorischer T-Zelltypen nach Co-Kultur mit Vitamin D3 stimulierten Monozyten. Monozyten wurden unbehandelt ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}^-$) bzw. mit $0,1 \mu\text{M}$ Vitamin D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}^+$) für 4 Stunden stimuliert und anschließend unbehandelt belassen (ECP-, 0 ng/ml UVADEX®, 0 J/cm^2 UV-A) bzw. ECP-behandelt (ECP+, 200 ng/ml UVADEX®, 2 J/cm^2 UV-A). Daraufhin wurden Monozyten mit unbehandelten CD4+ T-Zellen im Verhältnis 1:4 (Monozyten:T-Zellen) unter Stimulation mit anti-CD3 Antikörper 5 Tage co-kultiviert. Veränderungen der **(A)** CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen, **(B)** CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen, **(C)** CD3+CD4+IL-17A+ Th17-Zellen, **(D)** CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen und **(E)** CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen an lebenden T-Zellen nach ECP-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. $n=6$. Die Analysen erfolgten pro Spender in Duplikaten und die Mittelwerte aller Spender der unbehandelten und ECP-behandelten Ansätze sind als Striche dargestellt. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$.

5 Diskussion

Trotz intensiver Forschung ist der exakte Wirkmechanismus der ECP noch nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch konnte durch eine ECP-Therapie ein positiver Effekt für Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen beschrieben werden. Die Besonderheit der ECP liegt in ihrem immunmodulatorischen Effekt, durch den das Immunsystem eines Patienten durch eine Verstärkung der Immuntoleranz reguliert wird [145, 146]. Die Etablierung eines *in vitro* Modells mit Einsatz von Zellen gesunder Spender ermöglicht die Überprüfung verschiedener immunologischer Fragestellungen. Dabei sind die Analysen unabhängig von den bei der Verwendung von Patientenmaterial auftretenden Limitationen, wie beispielsweise hohe Divergenzen bei der Diagnose, Vorbehandlungsstrategien und Probenzugänglichkeit. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein *in vitro* ECP-Modell etabliert werden, mit Hilfe dessen eine Fokussierung auf die Analyse des immunregulatorischen Effekts ECP-behandelter Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen und auf die Monozytenpopulation selbst erfolgen kann. Es ist damit gelungen, sowohl den proinflammatorischen als auch den antiinflammatorischen Einfluss der *in vitro* ECP nachzuweisen. Dies konnte anhand von *ex vivo* und *in vitro* behandeltem Patientenmaterial validiert werden. Durch die Identifikation spezifischer Targets konnten neue Ansatzpunkte gefunden werden, die bei der ECP-Therapie angesprochen werden und zukünftig weitere Informationen zur Klärung des Wirkmechanismus liefern könnten.

5.1 Etablierung eines *in vitro* ECP-Modells

Während laut Literatur T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und DCs nach ECP-Behandlung absterben, sind die Ansichten bezüglich der Überlebensfähigkeit von CD14+ Monozyten kontrovers. Es gibt Studien, bei denen von einem Überleben der CD14+ APCs berichtet wird [134, 168, 219], andere Studien zeigen, dass 48 Stunden nach ECP Monozyten von Patienten mit GvHD in Apoptose gehen [169]. Monozyten wurden in der Literatur als resistenter gegenüber den ECP-induzierten Zellschädigungen beschrieben [168, 220] und als wichtigster Auslöser des positiven Effekts der ECP aufgeführt [121]. Da jedoch der immunregulatorische Effekt der ECP insbesondere den DCs zugeschrieben wird, zu denen Monozyten ECP-induziert differenzieren [216], könnte diese Aussage aus der Literatur irreführend sein. Trotz der hohen Bedeutsamkeit von DCs bei der ECP-Therapie ist das Wissen über Monozyten als deren Vorläuferzellen limitiert und widersprüchlich. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung eines *in vitro* ECP-Modells zur Untersuchung des immunmodulatorischen Einflusses ECP-behandelter Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen. Dieser Effekt ist aufgrund des Anwendungsgebiets der ECP bei u.a. T-Zell vermittelten Erkrankungen von großem Interesse ist.

Die Isolation der Monozyten und T-Zellen für das Co-Kulturmodell erfolgte mit Hilfe von magnetischer Zellseparation. Beim Durchlaufen der magnetischen Aufreinigungssäule könnte es zu einer Aktivierung oder zumindest Beeinflussung der CD4+ T-Zellen (Positivselektion) aber auch der Monozyten (Negativselektion) kommen. Da Monozyten adhärent sind, müssen die Zellen mechanisch

aus den Zellkulturplatten nach *in vitro* ECP abgelöst werden, was wiederum Stress für die Zellen bedeuten könnte. Um labortechnische Einflüsse auszuschließen, wurden daher stets Negativkontrollen in Form von gleichsam isolierten und abgelösten, jedoch ECP unbehandelten Monozyten mitgeführt.

Die Auswahl der bei der *in vitro* ECP verwendeten Parameter erfolgte anhand von bereits in der Literatur publizierter Modelle und sollte sowohl eine Reproduzierbarkeit bereits beschriebener Effekte als auch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Modellen gewährleisten [167, 171, 221]. Dabei wurden Modelle berücksichtigt, bei denen die *in vitro* ECP zur Behandlung sowohl von PBMCs [221], als auch von vorab isolierten Monozyten [167, 171] gesunder Spender angewendet wurde.

Wie bereits in anderen Studien beschrieben [221, 222], konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch vorausgehende Versuche gezeigt werden, dass nach ECP-Behandlung von PBMCs mit den gewählten Parametern (200 ng/ml UVADEX® und 2 J/cm² UV-A-Licht), Lymphozyten absterben (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur und unterstützte die Verwendung der Co-Kultur von ECP-behandelten Monozyten und unbehandelten CD4⁺ T-Zellen. Anders als in den bereits beschriebenen Analysen von Co-Kulturen aus DCs, die aus ECP-behandelten Monozyten gesunder Spender gewonnen wurden, mit naiven T-Lymphozyten [220, 223], wurden in dem hier vorliegenden Modell ECP-behandelte Monozyten mit unbehandelten T-Zellen co-kultiviert. Das verwendete Verhältnis der beiden Zelltypen lag dabei bei 1:4 (Monozyten:T-Zellen), um den physiologisch vorkommenden Anteilen in PBMCs zu entsprechen. Zudem erfolgte eine anti-CD3 Antikörperstimulation der T-Zellen, analog zu dem bereits in dieser Arbeitsgruppe etablierten Co-Kulturmodell [214].

Die Überlebensrate von über 80 % der T-Zellen in Co-Kultur mit unbehandelten bzw. ECP-behandelten Monozyten führte zu der Annahme, dass es sich hierbei um eine geeignete Methode handelt, den ECP-induzierten Einfluss der Monozyten auf unbehandelte T-Zellen zu untersuchen.

5.2 Immunregulatorische Effekte *in vitro* ECP-behandelter Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die ECP einen immunmodulatorischen Effekt bei behandelten Patienten ausübt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein immunregulatorischer Einfluss mit Hilfe des *in vitro* ECP-Modells nachgewiesen werden.

5.2.1 Proliferationsfähigkeit von T-Zellen

Für eine ECP-Behandlung stehen verschiedene ECP-Geräte, -Protokolle und -Behandlungspläne zur Verfügung. Bislang gibt es keine umfassende, einheitliche Qualitätskontrolle der ECP-Therapie, deren

Einführung unter anderem durch die behandlungsassoziierten, immunmodulatorischen Effekte und der Anwendung bei verschiedenen Indikationen erschwert ist. Die Arbeitsgruppe um Jacob *et al.* hat bereits 2003 vorgeschlagen, die Messung einer ECP-induzierten Inhibition der Proliferation von T-Lymphozyten mittels radioaktivem Thymidin zur Validierung der ECP zu verwenden [224]. Weitere Studien mit nicht-radioaktiven Nachweismethoden hinsichtlich eines antiproliferativen Effekts der ECP konnten zeigen, dass die T-Zellproliferation in PBMCs von Patienten mit beispielsweise GvHD und Sézary Syndrom nach 72 Stunden Kultur signifikant reduziert wurde [225].

Die Bestimmung der Lymphozytenproliferation eignet sich zudem zur Überprüfung des immunregulatorischen Effektes bei der Behandlung. Nicht nur in Studien, bei denen PBMCs mit ECP-behandelt wurden [222], konnte eine reduzierte T-Zellproliferation nachgewiesen werden, sondern auch in Co-Kulturen mit myeloiden Zelltypen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ECP-behandelte, neutrophile MDSCs die Proliferation von co-kultivierten T-Zellen supprimieren können [226]. Des Weiteren sind DCs, die aus dem Photophoreseprodukt von cGvHD-Patienten gewonnen werden, nicht in der Lage, T-Zellproliferation zu induzieren [176]. Auch die Arbeitsgruppe von Legitimo *et al.* konnte eine Reduktion der Proliferation allogener T-Zellen in Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten und unbehandelten DCs feststellen [223]. Bereits 2001 postulierte Berger *et al.* mit der Theorie der Transimmunisierung einen immunmodulatorischen Effekt der ECP [174]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten nach ECP apoptotisch werden, Monozyten jedoch einen DC-Phänotyp exprimieren. Eine Co-Kultur beider Zelltypen führt zur Phagozytose des apoptotischen, lymphoiden Zellmaterials durch DCs und anschließender Antigenprozessierung, die verantwortlich für die Hemmung der Proliferation von T-Zellen sein soll [174].

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikante Abnahme der T-Zellproliferation in Co-Kulturen mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten um $22,06 \pm 14,37$ % im Vergleich zu Co-Kulturen mit unbehandelten Monozyten nachgewiesen werden. Es konnte in dem hier vorgestellten *in vitro* ECP-Modell ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferationsfähigkeit von T-Lymphozyten bestätigt werden. Eine Behandlung von ECP-Patienten führt somit dazu, dass einerseits behandelte T-Lymphozyten direkt in Apoptose übergehen und andererseits unbehandelte T-Zellen indirekt durch ECP-behandelte Monozyten in der Proliferation gehemmt werden. Auch Marshall *et al.* beschrieben eine Inhibition der T-Zellproliferation in behandelten Zellen [130], während laut der Arbeitsgruppe um Lee *et al.* unbehandelte Lymphozyten noch Tage nach der Behandlung von GvHD-Patienten in den Zellzyklusarrest eintreten [227].

5.2.2 Einfluss auf T-Zelltypenanteile

Die Veränderungen einzelner T-Zelltypenanteile nach ECP sind abhängig von den zugrundeliegenden Erkrankungen und in der Literatur kontrovers beschrieben. Es zeigt sich bei deren Analyse im Rahmen der ECP ein immunmodulatorischer Effekt.

Tregs sind laut Literatur an der Erhaltung der Selbsttoleranz durch Regulierung der Immunantwort beteiligt. Xia *et al.* beschreiben, dass Tregs bei ECP durch die Aufnahme von apoptotischem

Zellmaterial induziert werden, welches von Leukozyten stammt [186]. Laut Rao *et al.* wird bei CTCL-Patienten der Anteil an CD3+CD4+FoxP3+CD127- Tregs erhöht, die Zellen jedoch nicht stark aktiviert, was dann weiterhin eine Limitation der Expansion maligner T-Zellen bewirken kann. Laut Ergebnissen aus der Literatur erklärt sich die erhaltene Immunreaktion gegenüber Tumorzellen trotz erhöhter Treg-Anteile bei CTCL-Patienten dadurch, dass die Tregs zum Teil pathologisch und nicht funktional sind [228-230]. Des Weiteren konnten Rao *et al.* zeigen, dass sowohl bei ECP-behandelten CTCL- als auch GvHD-Patienten TGF β signifikant ansteigt [230], welches von APCs nach Aufnahme apoptotischer Zellen sekretiert werden kann [231] und essentiell für die Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen zu CD4+CD25FoxP3+ Tregs ist [232]. Die Arbeitsgruppe nimmt an, dass bei einer GvHD Tregs aktiviert werden, was sich durch die hohen TGF β -Mengen im Serum der Patienten zeigt.

Die Arbeitsgruppe um Schmitt *et al.* konnte ebenfalls bei der Analyse von PBMCs ECP-behandelter GvHD-Patienten zeigen, dass nach jedem ECP-Zyklus die Anteile der CD4+CD25+FoxP3+ Tregs im peripheren Blut ansteigen [188]. Zudem konnten die Tregs nach ECP-Behandlung der Patienten ihre suppressive Funktion im Vergleich zum Niveau vor Beginn der ECP-Behandlung steigern. Während die Studie um Denney *et al.* zeigte, dass der prozentuale Anteil an Tregs bis zu 12 Monate nach ECP von cGvHD-Patienten signifikant erhöht werden kann [233], beschreibt eine aktuelle Studie von Gandelman *et al.* von 2018 hingegen, dass nach Ende einer ECP-Therapie mit cGvHD-Patienten kein signifikanter Unterschied in den Treg-Anteilen in Leukozyten des Blutes im Vergleich zu Beginn der ECP-Studie nachweisbar ist [234]. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Gandelman *et al.* keinen Unterschied in den Treg-Anteilen bei auf die ECP-Therapie nicht-ansprechenden bzw. ansprechenden Patienten nachweisen. In der Studie von Zorn *et al.* konnte sogar eine Reduktion der Treg-Anteile nach ECP beschrieben werden [235].

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen nach *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten eine leichte Zunahme der CD3+CD4+CD25+FoxP3+ Tregs in co-kultivierten T-Zellen von etwa 1 %. Dieser Anstieg war nicht signifikant. Damit konnte in dem beschriebenen Modell kein Anstieg der Tregs beobachtet werden, wobei die unterschiedlichen Ansätze und Untersuchungszeitpunkte in der vergleichenden Literatur zu beachten sind. Eine Überprüfung der Funktionalität der Tregs fand im Rahmen dieser Arbeit nicht statt und könnte zukünftig weitere Informationen zur Bedeutsamkeit der Tregs bei ECP geben. Hierbei wäre eine Analyse der TGF β -Produktion durch Tregs im *in vitro* ECP-Modell möglich, ebenso wie die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. IL-10 produzierende Tregs werden durch Antigenstimulation induziert, exprimieren kein FoxP3 [236] und sind ebenso wie natürlich vorkommende Tregs laut Literatur in der Lage sowohl Th1- als auch Th2-Antworten in Mausmodellen zu regulieren [237]. Des Weiteren muss die Optimierung der phänotypischen Charakterisierung in Betracht gezogen werden, da Tregs mit Hilfe der Kombination verschiedener Oberflächenmarker identifiziert werden können, was somit zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Analyse führen kann.

Bei der Analyse der Anteile anti- und proinflammatorischer T-Zelltypen nach ECP ist es wichtig, die Indikation für eine Therapie zu berücksichtigen, da in der Literatur bereits bidirektionale Effekte auf die Verschiebung der T-Zellantworten abhängig von der Erkrankung der Patienten beschrieben wurden.

Di Renzo *et al.* konnten bereits 1997 zeigen, dass die PBMCs von CTCL-Patienten vor einer ECP-Therapie höhere Mengen an IL-4 und weniger IFN γ als die gesunden Kontrollen produzieren [190]. Dies spricht laut Di Renzo *et al.* für eine vorherrschende Th2-Immunantwort. Ein Jahr nach Start der Therapie konnte jedoch kein Unterschied mehr in der Zytokinproduktion zwischen CTCL-Patienten und gesunden Spendern festgestellt werden, was auf einen Ausgleich des bei CTCL-Patienten bestehenden Ungleichgewichts zwischen der Th1- und Th2-Antwort durch ECP hindeutet. In einer *in vitro* Studie der Arbeitsgruppe um Klosner *et al.* konnte eine Zunahme der IL-4 produzierenden Th2-Zellen mit zunehmender 8-MOP Konzentration nachgewiesen werden, während gleichzeitig IL-2 und IFN γ produzierende Th1-Zellen anteilmäßig abnahmen [238]. Bei dieser Studie wurden PBMCs gesunder Spender verwendet, die vor der ECP-Behandlung kultiviert und mit anti-CD3, rh-IL2 und rh-IL4 stimuliert wurden.

Im Gegensatz hierzu stehen in der Literatur ECP-Studien, die mit GvHD-Patientenmaterial durchgeführt wurden. GvHD-Patienten zeigen ein Ungleichgewicht der Th1- und Th2-Antwort, die auf die Seite der Th1-Immunität verschoben ist. Eine ECP-Behandlung führt zu einer Verlagerung der inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen [5, 152] hin zu einer antiinflammatorischen Th2-Antwort [178, 239] und einem Th2-Zytokinprofil [176, 178, 240]. Gorgun *et al.* konnten bei ihren Analysen von PBMCs der ECP-behandelten GvHD-Patienten zeigen, dass nach einer zusätzlichen Stimulation mit Staphylococcus Entertoxin B, der Anteil an IFN γ produzierenden Th1-Zellen bis zu dreifach im Vergleich zum Ausgangsniveau abnahm, wohingegen der Anteil der IL-4 und IL-10 sekretierenden Th2-Zellen bis zu vierfach zunahm [178].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte anders als in der Literatur, kein Anstieg der antiinflammatorischen CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen nach Co-Kultur der T-Zellen mit *in vitro* ECP-behandelten Monozyten gezeigt werden. Der prozentuale Anteil der Th2-Zellen lag sowohl im unbehandelten als auch im ECP-behandelten Ansatz bei etwa 4 % aller lebenden CD3+CD4+ T-Zellen. Daher konnte festgestellt werden, dass die Th2-Zellen anteilmäßig von der *in vitro* ECP-Behandlung der co-kultivierten Monozyten unbeeinflusst blieben. Das Ausgangsniveau der Th2-Zellen ohne ECP lag unter dem der nachgewiesenen proinflammatorischen T-Zelltypen und entsprach trotz der Verwendung von gesundem Spendermaterial daher eher einem GvHD-*Setting*. Interessanterweise konnte jedoch in dem hier vorliegenden ECP-Modell keine verstärkte Verschiebung der T-Zellantwort hin zu einem Th2-Muster nachgewiesen werden. Dennoch kann keine Aussage hinsichtlich der Funktionalität der Th2-Zellen in den ECP-behandelten Ansätzen getroffen werden. Zu berücksichtigen ist auch, dass die meisten veröffentlichten Studien die ECP-Therapie auf Gesamt-PBMCs anwenden und anschließend die Anteile der entsprechenden T-Zelltypen in den PBMCs durchflusszytometrisch bestimmt werden. In der hier vorliegenden Arbeit jedoch, werden ausschließlich Monozyten *in vitro* ECP-behandelt und mit isolierten CD4+ T-Zellen co-kultiviert. Da dieser Versuchsaufbau unterschiedlich ist und Einflüsse durch weitere Zelltypen ausgeschlossen werden, sind abweichende Ergebnisse von der bisherigen Literatur erklärbar.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ECP-behandelte Monozyten zu einem signifikanten Anstieg proinflammatorischer CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen, CD3+CD4+IL-17A+IFN γ + Th17Th1-Zellen und CD3+CD4+ IL-2+ T-Zellen in Co-Kulturen führen. Obwohl das Level der Th17Th1-Zellen sehr gering war, konnte eine *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten und anschließender Co-Kultur

mit unbehandelten T-Zellen zu einem signifikanten Anstieg auf 2,4 % führen, was eine Verdopplung der Th17Th1-Anteile bedeutete. CD3+CD4+IL-17A+ Th17-Zellen in den Co-Kulturen bleiben vergleichbar mit den Th2-Zellen von einer ECP-Behandlung anteilmäßig unbeeinflusst. Die Arbeitsgruppe um Rao *et al.* konnte hingegen einen leichten Rückgang der IL-17 Produktion in GvHD-Patienten zeigen [230]. Th17-Zellen gehören zu den proinflammatorischen CD4+ T-Helferzellen, für deren Differenzierung IL-6 und TGF β , welches den spezifischen Transkriptionsfaktor ROR γ t hochreguliert aber gleichzeitig die IL-17A Expression inhibiert, nicht ausreichen, sondern zusätzliche proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-23 oder IL-21 benötigt werden [241].

Furuhashi *et al.* haben bereits 2013 gezeigt, dass die ECP-Behandlung von Patienten mit Psoriasis zu keiner Veränderung der Th17-Anteile führt [242]. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe ebenfalls zeigen, dass es Psoriasis-Patienten gibt, bei denen ein hohes Ausgangslevel an Th17-Zellen vorliegt und die ECP zu einer signifikanten Reduktion des Th17-Levels führt. Daher könnte das Ausgangsniveau der Th17-Zellen zur Vorhersage einer potentiellen Therapieresistenz eingesetzt werden. Diese Annahme konnte in dem hier vorliegenden *in vitro* ECP-Modell nicht bestätigt werden, da kein Unterschied in den Th17-Zellanteilen nach ECP detektiert und auch durch die Analyse der anderen T-Zelltypen keine Abhängigkeit einer Anteilsänderung vom Ausgangsniveau identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Der Anstieg der proinflammatorischen T-Zelltypen kann insbesondere für Krebspatienten einen Vorteil bieten, da Th1- und Th17-Zellen eine Rolle bei der Tumormunität und -abwehr spielen. Humane Th17-Zellen sind beispielsweise bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (Englisch: *head and squamous cell carcinoma*, HNSCC) in der Lage, Tumoren zu infiltrieren und deren Proliferation und Angiogenese zu beeinflussen [243]. Auch in einem Mausmodell mit Melanomen konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen, die IFN γ co-exprimieren, anti-Tumor Eigenschaften besitzen und den Mäusen im Modell eine gewisse Resistenz gegenüber Tumoren ermöglicht [244]. In Bezug auf diese Ergebnisse, kann das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* ECP-Modell einen Nutzen für Krebspatienten bestätigen, da die beschriebene Induktion von Th1-, Th17- und Th17Th1-Zellen wie auch der leichte Anstieg der Tregs auf eine verbleibende anti-Tumor Aktivität der Zellen nach ECP hindeuten könnte.

5.2.3 Veränderung der Zytokinkonzentration

Die Abnahme der T-Zellproliferation wie auch die Induktion der proinflammatorischen T-Zelltypen in dem hier untersuchten *in vitro* ECP-Modell scheint abhängig vom Zellkontakt zwischen ECP-behandelten Monozyten und T-Zellen zu sein. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Proliferation von T-Zellen geringer ist, wenn Monozyten und CD4+ T-Zellen erst 24 Stunden nach der ECP-Behandlung der Monozyten co-kultiviert werden im Vergleich zu einer sofortigen Co-Kultur nach ECP. Dies könnte auf eine wichtige Rolle des Zellkontaktes innerhalb der ersten 24 Stunden nach ECP hindeuten. Die hohe Bedeutsamkeit des Zellkontaktes zwischen Monozyten und T-Zellen konnte bereits in der Literatur für die Stimulation der Th17-Antwort beschrieben werden [214, 215, 241]. Des

Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Übertrag des Zellkulturüberstandes von ECP-behandelten Monozyten auf T-Zellen eine signifikante Abnahme der Th1-Zellen verursacht. Dies deutet darauf hin, dass der Zellkontakt im *in vitro* ECP-Modell eine bedeutende Rolle für das vorherrschende T-Zellprofil nach Behandlung spielt. Die wichtige Bedeutung des Zellkontakts kann zudem im Rahmen des *in vitro* ECP-Modells auf die Proliferation von T-Zellen und die Induktion von Th1- und Th17/Th1-Zellen erweitert werden.

Studien über die Veränderungen der Zytokinsekretion durch verschiedene ECP-behandelte Zellen sind in der Literatur zahlreich. Dennoch ist die Auslegung, welche Zytokine insbesondere für die Klinik relevant sind schwierig und es gibt viele kontroverse Publikationen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Zytokinsekretion der Monozyten durch ECP-Behandlung nur wenig ändert. Dieses Resultat steht in enger Verbindung zu den Ergebnissen aus der Überprüfung der Bedeutung des Zellkontakts für die T-Zellproliferation und Veränderung der T-Zelltypenanteile. In diesen Analysen konnte kein Unterschied zwischen den Ansätzen beobachtet werden, bei denen ein Übertrag des Zellkulturüberstandes ECP-behandelter Monozyten auf T-Zellen erfolgte im Vergleich zum Übertrag von Überständen unbehandelter Monozyten. Daher könnten die Änderungen der Zytokinsekretion einzelner Zytokine wie die Abnahme der Konzentration von IL-1 β , IL-8 und IL-33 sowie die Zunahme der Konzentration von IL-10, TNF α , IL-17A und IL-23 in den Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten als nicht sehr einflussreich im vorliegenden Modell erachtet werden. Von diesen Zytokinen sind insbesondere IL-10 und IL-33 aus der Literatur bekannt, mit antiinflammatorischen Th2-Zellen in Verbindung zu stehen. IL-10 konnte als antiinflammatorisches Zytokin bereits als Suppressor von DC-Funktionen identifiziert werden [245] und wird unter anderem durch Th2-Zellen produziert [246]. Außerdem kann IL-10 die Produktion von IFN γ und IL-2 durch Th1-Zellen inhibieren [247], sowie die Expression inflammatorischer Zytokine durch Monozyten bzw. Makrophagen reduzieren [248]. IL-33 fördert die *in vitro* Produktion von Th2-spezifischen Zytokinen und kann über den IL-1 Rezeptor ST2 und die Aktivierung von NF κ B und MAP-Kinasen signalisieren [249]. Bereits an diesen beiden antiinflammatorischen Zytokinen lässt sich das komplexe Zusammenspiel mit verschiedenen Zelltypen und anderen Zytokinen erkennen, wobei IL-1 β , IL-8, IL-17A, IL-23 und TNF α mit der Vermittlung von proinflammatorischen Effekten in Verbindung stehen.

Zusammenfassend konnte durch die Analyse der Zytokinsekretion ein heterogeneres Bild für das Milieu in Co-Kulturen im Vergleich von unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten gefunden werden. Dies könnte durch die hohe Diversität der Zelltypen in der Co-Kultur erklärbar sein, die durch die *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten sowohl auf Seite der T-Zellen als auch bei den monozytären Zelltypen induziert wird. In den Co-Kulturen ECP-behandelter Monozyten mit unbehandelten T-Zellen herrscht im dargestellten *in vitro* ECP-Modell vornehmlich ein proinflammatorisches Milieu vor. Allerdings kann keine Angabe gemacht werden, ob diese Zytokine durch ECP-behandelte Monozyten, unbehandelte T-Zellen oder durch apoptotische Zellen in der Co-Kultur sekretiert werden. Weiterführende Analysen könnten zukünftig Aufschluss über die Bedeutung des Zytokinmilieus bei ECP geben.

5.2.4 Potentielle Einteilung der ECP-induzierten Auswirkungen auf T-Zellen

Zusammenfassend induziert die *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten anti- und proinflammatorische Effekte in co-kultivierten T-Zellen. Daher erfolgte eine potentielle Zuordnung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten und beschriebenen Auswirkungen der ECP-behandelten Monozyten auf die T-Zellen (Tabelle 29). Dabei kann die Reduktion der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen sowie der gleichbleibende Anteil an Th2-Zellen in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten einem antiinflammatorischen Effekt zugeordnet werden. Ebenso könnte die Reduktion der Zytokinkonzentration von IL-1 β und IL-8 sowie der Anstieg der IL-10-Konzentration in Zellkulturüberständen der antiinflammatorischen Immunantwort zugeschrieben werden. Im Gegensatz hierzu deutet der nur leichte Anstieg der Tregs und die Induktion von Th1-Zellen, Th17Th1-Zellen und IL-2+ T-Zellen auf einen proinflammatorischen Einfluss ECP-behandelter Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen hin. Der nahezu gleichbleibende Anteil an proinflammatorischen Th17-Zellen könnte für einen erhaltenen anti-Tumor und anti-Virus Effekt sprechen. Sowohl die Konzentration von TNF α , IL-17A und IL-23 werden in Zellkulturüberständen von ECP-behandelten Monozyten mit unbehandelten T-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen über die Zeit hinweg erhöht, was zusammen mit der Abnahme der IL-33 Konzentration in den ECP-behandelten Ansätzen zu einer proinflammatorischen Antwort zugeordnet werden könnte.

Tabelle 29: Potentielle Zuordnung der untersuchten ECP-induzierten Effekte behandelter Monozyten auf T-Zellen zu anti- und proinflammatorischen Effekten.

	Antiinflammatorische Effekte nach <i>in vitro</i> ECP	Proinflammatorische Effekte nach <i>in vitro</i> ECP
Proliferation	Proliferationsfähigkeit der T-Zellen ↓	
T-Zelltypen	Anteile der Th2-Zellen bleiben unbeeinflusst	Anteile der Tregs ↑ (wenig); Anteile der Th1-Zellen, Th17Th1-Zellen und IL-2+ T-Zellen ↑; Anteile der Th17-Zellen bleiben unbeeinflusst
Zytokine	IL-1 β ↓; IL-8 ↓; IL-10 ↑	TNF α ↑; IL-17A ↑; IL-23 ↑; IL-33 ↓
ECP-Effekt	Antiinflammatorisch	Anti-Tumor und anti-virale Reaktivität

Mit Hilfe dieser potentiellen Zuordnung soll keine Entscheidung getroffen werden, welcher der beiden inflammatorischen Effekte überwiegt, da aktuell keine Aussage über die Gewichtung der einzelnen beobachteten Auswirkungen auf die T-Zellen und deren Funktionalität gemacht werden kann. Somit handelt es sich um eine deskriptive Zusammenfassung der immunmodulatorischen, durch ECP-behandelte Monozyten vermittelten Effekte auf unbehandelte T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell.

5.3 Monozyten als wichtige Mediatoren der ECP-induzierten Effekte

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass insbesondere Monozyten wie auch ECP-induzierte DCs, zu denen Monozyten differenzieren können, eine wichtige Rolle bei der Vermittlung eines immunregulatorischen Effekts bei ECP-Patienten spielen [121, 216]. Viele der bisherigen Studien befassen sich mit der Untersuchung des Einflusses der ECP-Behandlung von oder auf *in vitro* generierte DCs. Das Wissen über Monozyten, die Vorläuferzellen der DCs, ist jedoch limitiert sowie nicht einheitlich und eine genauere Analyse dieser Zellen ist daher unbedingt notwendig.

5.3.1 Veränderung der Monozyten nach *in vitro* ECP-Behandlung

Studien haben bereits gezeigt, dass Lymphozyten innerhalb von 24 bis 72 Stunden nach ECP-Behandlung apoptotisch werden [164], während Monozyten eine Resistenz gegenüber dem Eintritt in die Apoptose zugeschrieben wird [168, 220]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten sogar ein Überleben von CD14+ APCs nach ECP detektieren [134, 168, 219]. Maeda *et al.* sprechen hingegen von einer zeitverzögert auftretenden Apoptose bei Monozyten [250] und mindern daher die Aussage über die Resistenz gegenüber ECP-induzierten Zellschädigungen. Hannani *et al.* konnten beispielsweise ebenfalls zeigen, dass ein Tag nach ECP nur 20 % der Monozyten in Apoptose übergegangen sind, während an Tag 6 nach ECP bereits 80 % der Zellen apoptotisch sind [167]. Auch die Arbeitsgruppe um Setterblad *et al.* zeigte, dass Monozyten von ECP-behandelten GvHD-Patienten bereits nach 48 Stunden in Apoptose übergehen [169].

In der hier vorliegenden Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die absolute Zellzahl der Monozyten zwei Tage nach ECP-Behandlung signifikant reduziert. Einhergehend mit den Ergebnissen aus der Literatur, die eine Resistenz gegenüber der Apoptose beschreiben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass keine verstärkte Anreicherung der ECP-behandelten CD14+ Zellen in einem früh- bzw. spätapoptotischen Stadium erfolgt. Der Anteil der lebenden CD14+ Zellen liegt durchschnittlich bei über 90 % der untersuchten Zellen. Dies spricht dafür, dass die CD14+ Zellen zwei Tage nach der *in vitro* ECP-Behandlung weitestgehend vital sind, tote Zellen möglicherweise vollständig lysiert und aus den für die Färbung verwendeten Proben ausgewaschen werden, da trotz der Abnahme der absoluten Zellzahlen der Anteil der gefärbten, toten Zellen nur wenig zunimmt. Des Weiteren könnte das Zellmaterial der toten, lysierten Monozyten durch ECP überlebende Monozyten unspezifisch phagozytiert und dadurch aus der Kultur entfernt werden. Somit bleibt der Anteil der lebenden Zellen innerhalb der reduzierten Zellzahl sehr hoch. Zudem konnten keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten CD14+ Zellen festgestellt werden, was auf einen Zellkultur bedingten und nicht ausschließlich ECP-induzierten Effekt auf die Monozyten hindeutet.

Die CD14+ Monozyten besaßen nach der Isolation aus PBMCs eine Reinheit von etwa 91 %. Zwei Tage nach Mono-Kultur reduzierte sich der Anteil der lebenden CD14+ Zellen auf durchschnittlich 70 % in den unbehandelten und 50 % in den behandelten Monozytenfraktionen. Hinsichtlich des Apoptoseverhaltens sind mehr CD14- Zellen tot im Vergleich zu den CD14+ Zellen. Zwei Tage nach

ECP-Behandlung der Monozyten liegt ebenfalls eine heterogene Zellsuspension an CD14+ und CD14- Zellen vor, bei der die CD14+ Zellen nach wie vor überwiegen. CD14- Zellen gehen vermehrt in Apoptose und die apoptotischen Zellen könnten langfristig Einfluss auf die Funktion der Monozyten und damit auf die Monozyten induzierten Effekte auf co-kultivierte T-Zellen haben.

Eine Abnahme der lebenden CD14+ Zellen durch die *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten, könnte durch die Reduktion der CD28 Co-Stimulation Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen haben und damit zu der beschriebenen Abnahme der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen führen. Durch die Titration der eingesetzten Monozyten im Verhältnis zu den CD4+ T-Zellen im *in vitro* ECP-Modell scheint dies aber nicht alleine für die Proliferationsabnahme co-kultivierter T-Zellen verantwortlich zu sein. Bei den Verhältnissen 1:1, 0,5:1 und 0,25:1 (Monozyten:T-Zellen) unterscheidet sich der Anteil proliferierender T-Zellen in den Ansätzen mit unbehandelten Monozyten kaum, während durch ECP-Behandlung der Monozyten eine signifikante Abnahme der T-Zellproliferation im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen auftritt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Abnahme der T-Zellproliferation durch ECP-behandelte Monozyten nicht alleine auf der Abnahme des Co-Stimulus für T-Zellen beruht, sondern weitere Faktoren berücksichtigt werden müssen. Auch die Arbeitsgruppe um Foss *et al.* untersuchte die Bedeutung des CD28-Rezeptors bei cGvHD-Patienten und konnte zeigen, dass keine nennenswerte Veränderung bei der Expression des CD28-Rezeptors auf Lymphozyten bei auf die Behandlung ansprechenden Patienten gefunden werden konnte [251]. Zudem beschreibt die Arbeitsgruppe einen Anstieg von CD80+ und CD123+ DCs, wodurch laut dieser Publikation keine Effekte auf die T-Zellfunktion ausgeübt wird, die durch MHC Klasse I Moleküle vermittelt werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression der co-stimulatorischen Oberflächenmarker HLA-DR und CD86 untersucht. Da HLA-DR+ Zellen prozentual nach ECP zunahm deutet dies auf eine wichtige, unterstützende Rolle der co-stimulatorischen Antigene für den Einfluss ECP-behandelten Monozyten auf T-Zellen hin, wie es auch für CD86 im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird.

5.3.2 Differenzierungsverhalten von Monozyten nach *in vitro* ECP

Für die Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der *in vitro* ECP-behandelten Monozyten zu anderen myeloiden Zelltypen wurde Nachweis der Oberflächenmarker CD14, CD209, HLA-DR und CD86 zur Charakterisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen verwendet. Da es sich bei diesen Zelltypen sowohl um Vorläuferzellen als auch Zwischenstadien bei der Differenzierung zu anderen myeloiden Zelltypen handelt, ist eine genaue phänotypische wie auch funktionale Abgrenzung zwischen den Zelltypen erschwert. Dennoch stehen alle diese Marker mit einer Antigenpräsentation bzw. T-Zellaktivierung in Verbindung.

CD14 ist ein Differenzierungsmarker von Monozyten [252] und wird auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert. Devitt *et al.* konnten bereits die Beteiligung von CD14 an der Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen beschreiben [253]. Zudem kann CD14 als Rezeptor von bakteriellem LPS dienen, und dadurch die Immunantwort regulieren [254]. CD209 (Englisch: *dendritic*

cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin, DC-SIGN) wird von DCs exprimiert und unter anderem für die Ausbildung des Zellkontakt zwischen DCs und T-Zellen benötigt [255-257]. Daher spielt CD209 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CD4+ T-Zellen [258]. Die Studie von Bullwinkel *et al.* zeigt, dass bei der *in vitro* Differenzierung von humanen Monozyten aus dem Blut zu DCs die Oberflächenexpression von CD14 verloren geht, während die CD209 Expression ansteigt [257]. HLA-DR (Englisch: *human leukocyte antigen – antigen D related*) gehört zu den MHC Klasse II Rezeptoren und ist wichtig für die Initiation einer Immunantwort. Für die Induktion von T-Zellantworten ist die Erkennung von HLA-DR auf APCs wie DCs, Makrophagen oder aktivierten T-Zellen unbedingt erforderlich [259]. Dabei werden durch HLA-DR-Moleküle Antigene gegenüber den CD4+ T-Zellen präsentiert, die Teil des adaptiven Immunsystems sind [260] und durch Aktivierung eine humorale Immunantwort stimulieren können. Für eine vollständige Aktivierung von T-Zellen werden Signale benötigt, die über den TCR Komplex und CD28 vermittelt werden. CD28 benötigt hierfür Liganden, zu denen CD80 und CD86 gehören. CD86 wird konstitutiv auf Monozyten exprimiert und ist nur auf aktivierten T-Zellen zu finden [261]. Als Co-Stimulus für T-Zellen vermittelt CD86 somit die Aktivierung von T-Zellen, deren Proliferation und Zytokinsekretion.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die ECP-Behandlung isolierter Monozyten eine leichte, signifikante Abnahme der CD14+ Zellen und eine stärkere, signifikante Zunahme der HLA-DR+ Zellen zwei Tage nach ECP-induziert wird. Die Arbeitsgruppe um Legitimo *et al.* konnte ebenfalls einen Anstieg der HLA-DR Expression auf DCs in Kulturen mit 10 % ECP-behandelten Monozyten nachweisen [223]. Während CD14 für die Erkennung apoptotischer Zellen benötigt wird, übernimmt HLA-DR eine Rolle bei der Antigenpräsentation. Da die Zunahme der HLA-DR+ Zellen nach ECP deutlich stärker als die Abnahme der CD14+ Zellen ist, kann angenommen werden, dass zwar die Erkennung apoptotischer Zellen reduziert ist, jedoch durch HLA-DR und CD80/86 die Aktivierung von T-Zellen ausgeglichen werden kann. Weiter zu berücksichtigen sind die Ergebnisse der frühen Studie von Bazil *et al.*, in der beschrieben wurde, dass CD14 vor allem auf myeloiden Zellen (reife Monozyten und Makrophagen) exprimiert und bei einer Stimulation der Monozyten beispielsweise durch bakterielles LPS oder IFN γ herunterreguliert wird [262]. Die Arbeitsgruppe nahm an, dass Monozyten durch Aktivierung ihren CD14 Oberflächenmarker abwerfen und dadurch die Oberflächenexpression regulieren können. Dies könnte daher im Rahmen der *in vitro* ECP in der hier vorliegenden Arbeit auf eine ECP-induzierte Aktivierung der Monozyten hindeuten.

Die *in vitro* ECP-Behandlung von isolierten Monozyten verursachte eine signifikante Induktion von CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Monozyten und CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen, wohingegen keine Änderungen bei den Anteilen der CD14-CD209+HLA-DR+CD86- iDCs und CD14-CD209+HLA-DR+CD86+ mDCs nachgewiesen werden konnte. Der größte Anteil an lebenden Zellen nach ECP-Behandlung entfällt auf die CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Monozyten. Wie bereits an der Analyse der Regulation der Rezeptoren CD14 und HLA-DR gesehen werden konnte, könnte eine verstärkte Antigenpräsentation und aktivierter Zustand der Monozyten nach *in vitro* ECP-Behandlung angenommen werden. Die Studie von Yakut *et al.* bestätigt ebenfalls einen Anstieg der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und der MHC Klasse II Expression auf lebenden CD14+ Zellen nach deren *in vitro* ECP-Behandlung [219]. Bereits frühe Analysen hinsichtlich der

Aufklärung der Rolle von Monozyten bei der ECP konnten zeigen, dass behandelte Monozyten einen aktivierten Phänotyp zeigen und verstärkt proinflammatorische Zytokine, Adhäsionsmoleküle und MHC Klasse I Proteine exprimieren [263-265].

Die *in vitro* ECP-Behandlung der Monozyten führte zu einer signifikanten Induktion von CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen. Monozyten können unter inflammatorischen Bedingungen zu Makrophagen differenzieren [54]. Bislang wurde die Bedeutung der Makrophagen im Rahmen einer ECP-Behandlung zumeist für die Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial durch gewebebeständige oder aus Monozyten differenzierte Makrophagen beschrieben [266, 267]. Die Arbeitsgruppe um Yoo *et al.* konnte zudem nachweisen, dass Makrophagen des peripheren Blutes im Vergleich zu T-Zellen gegenüber den apoptotischen Effekten, die durch 8-MOP und UV-A-Licht induziert werden, resistent sind [164, 263]. Zudem konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden, dass CD86 (wie auch CD36) nach Ende der Photophorese schnell auf der Zelloberfläche von Makrophagen hochreguliert wird [268]. ECP-behandelte Monozyten können laut Literatur verstärkt TNF und IL-6 produzieren [264], wobei letzteres die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert [269]. Im Gegensatz dazu beschreibt die Studie von Costanzo-Nordin *et al.* eine signifikante Abnahme von Makrophagen nach ECP-Behandlung im Vergleich zur Steroid-Therapie von Patienten nach Herztransplantation, was mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen wurde [270]. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Nachweistechiken der Makrophagen nach ECP, gehen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit daher mit den Studien einher, die ein Überleben der Makrophagen beschreiben.

Makrophagen lassen sich in einen M1- und einen M2-Phänotyp einteilen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass M1-Makrophagen durch Th1-Zytokine und mikrobielle Stimuli aktiviert werden, wohingegen die Induktion von M2-Makrophagen durch Th2-Zytokine wie beispielsweise IL-4 erfolgt [271]. Während SOCS-1 bei der Induktion eines M2-Phänotyps beteiligt ist, ist SOCS-3 bei der Differenzierung eines M1-Phänotyps wichtig. Tanaka *et al.* konnten zeigen, dass insbesondere SOCS1 eine wichtige Rolle bei der Th17-Differenzierung und Suppression der IFN γ -Signalisierung spielt [217]. Zudem wird SOCS1 eine antiapoptotische Funktion bei oxidativem Stress von Immunzellen zugeschrieben [272]. Des Weiteren sind M2-Makrophagen für die Immunregulation wichtig und besitzen antiinflammatorische Funktionen [271, 273].

Die Überprüfung der Regulation der Genexpression in Monozyten zwei Tage nach *in vitro* ECP zeigte, dass SOCS-1 hochreguliert wird. SOCS-1 fördert die Aktivierung von M2-Makrophagen über die Aktivität von PI3K [274]. Daher deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die *in vitro* ECP M2-Makrophagen induziert, was für eine Verstärkung der bereits in den vorigen Kapiteln beschriebenen antiinflammatorischen, ECP-induzierten Effekte sprechen könnte.

Makrophagen sind laut Literatur in der Lage, die T-Zellproliferation via Stickstoffmonoxid (NO) zu supprimieren, dessen Produktion durch von T-Zellen sekretiertes IFN γ aktiviert wird [275]. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um Doedens *et al.* an einem Mausmodell für Brustkrebs zeigen, dass Tumor-assoziierte Makrophagen die T-Zellfunktion hinsichtlich deren Inhibition des Tumorwachstums supprimieren können, indem sie den Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) exprimieren [276]. Um zu untersuchen, ob Makrophagen in dem hier vorliegenden *in vitro* ECP-Modell

signifikant an der Suppression der T-Zellproliferation beteiligt sind, wurden mit Hilfe von M-CSF Makrophagen induziert und im Modell anstelle der isolierten Monozyten eingesetzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass M-CSF die Differenzierung von Monozyten zu M2-Makrophagen fördert [277] und wurde daher bewusst gewählt, um den durch *in vitro* ECP-induzierten Phänotyp der Makrophagen nachzuempfinden. Überprüft wurde die Induktion des M2-Phänotyps mittels Expression des M2 spezifischen CD163 Oberflächenmarkers, wobei über 97 % der Zellen nach Induktion positiv für CD163 waren (Daten nicht gezeigt). Es konnte weiter gezeigt werden, dass der Anteil an proliferierenden T-Zellen in Co-Kulturen mit unbehandelten Makrophagen signifikant unter den Anteilen in Co-Kulturen mit ECP-behandelten Makrophagen bzw. unbehandelten Monozyten liegt. Diesen Ergebnissen entsprechend müssten die ausdifferenzierten Makrophagen ohne ECP-Behandlung eine starke suppressive Wirkung auf co-kultivierte T-Zellen besitzen, welche durch *in vitro* ECP teilweise aufgehoben werden kann. Daher sollte zukünftig untersucht werden, ob die *in vitro* induzierten Makrophagen durch ECP verstärkt in Apoptose gehen oder ob eine Veränderung in der Expression von co-stimulatorischen Oberflächenmolekülen wie z.B. CD86 erfolgt. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die wiederholten Zyklen aus mechanischem Ablösen und Aussäen der differenzierten Makrophagen für und nach der ECP-Behandlung eine hohe Stressbelastung für die Zellen bedeuten und nicht alle Makrophagen dieses Prozedere überleben. Auch erfolgte die Co-Kultivierung der Makrophagen mit den T-Zellen ohne weitere Zytokinstimulation. Daher könnte bereits durch den Versuchsaufbau eine Beeinflussung der Makrophagen erfolgen und sollte zukünftig durch weitere Analysen ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der T-Zellproliferation wurden unbehandelte Monozyten als Kontrolle mitgeführt, die ebenso wie die Makrophagenansätze sieben Tage nach Isolation in Kultur waren. Dadurch könnte die sehr niedrige Proliferationsfähigkeit der T-Zellen in Co-Kultur mit den unbehandelten Monozyten von etwa 40 % erklärt werden, die deutlich unter den Anteilen der proliferierenden T-Zellen in Co-Kulturen liegt, bei denen die Monozyten sofort nach Isolation eingesetzt werden.

DCs sind an der Immunregulation beteiligt, indem sie (1) Antigene aufnehmen, (2) diese prozessieren, (3) co-stimulatorische Moleküle für Lymphozyten exprimieren, (4) in Lymphorgane migrieren und (5) Zytokine für die Initiation einer Immunantwort sekretieren [48]. Die bedeutende Rolle von DCs bei der ECP-induzierten Immunregulation von Patienten ist in der Literatur bereits in vielen Reviews beschrieben. Spisek *et al.* zeigten beispielsweise, dass der Reifestatus von DCs wichtig bei der Behandlung von Patienten mit chronischer GvHD ist [176]. In dieser Studie konnten DCs aus dem Photophoreseprodukt der Patienten isoliert werden, die einen unreifen Phänotyp mit Expression von CD40, CD80, CD86, CD83, CD11c und MHC Klasse I und II Molekülen zeigen. Dennoch konnten die iDCs z.B. durch LPS aktiviert werden. Di Renzo *et al.* konnten beispielsweise bei GvHD-Patienten zeigen, dass die IL-10-Sekretion von aus Monozyten differenzierten DCs ansteigt, wenn diese *in vitro* durch LPS stimuliert und mit ECP-behandelten T-Zellen co-kultiviert wurden [278]. Außerdem konnte in einer Studie von Berger *et al.* der Anteil an HLA-DR+ DCs erhöht werden, indem das Apharesat von ECP-behandelten CTCL-Patienten über Nacht im Behandlungsbeutel inkubiert wurde [174]. Die Arbeitsgruppe erklärte diesen Effekt durch die ECP-induzierte Differenzierung der Monozyten zu DCs und der darauffolgenden Reifung der DCs im Sammelbeutel. Das bedeutet, dass auch die Verweilzeit

in Behandlungsbeutel und -kammer der Monozyten eine Rolle bei der Induktion von DCs spielen kann [279]. Durch aktivierte, apoptotische T-Zellen können, laut der Studie von Johansson *et al.*, autologe DCs einen reifen Phänotyp erhalten und proinflammatorische Zytokine produzieren [280]. Weiter können DCs durch den Kontakt zu allogenen, aktivierten sowie apoptotischen T-Zellen, Proliferation und IFN γ -Produktion von autologen T-Zellen induzieren. Auch Yakut *et al.* konnten nachweisen, dass ECP-behandelte DCs eine verstärkte Produktion des ebenfalls proinflammatorischen Zytokins IL-1 β verursachten [219], welches auch an einer anti-Tumor Antwort beteiligt sein kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach zwei Tagen Kultur der unbehandelten und ECP-behandelten Monozyten ein nur sehr geringer Anteil an CD14-CD209+HLA-DR+CD86- iDCs nachgewiesen werden, der sich auch durch ECP-Behandlung nicht ändert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich die Anteile der CD14-CD209+HLA-DR+CD86+ mDCs in den *in vitro* ECP-behandelten Ansätzen nicht änderten. Dennoch lag der Anteil der mDCs höher als der Anteil der iDCs. Diese Ergebnisse stehen entgegen der bisherigen Literatur und sollten zukünftig weiter überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der CD14- Zellen festgestellt werden, mit Hilfe dessen eine Differenzierung zu DCs nachgewiesen werden kann. Daher sollte die phänotypische Charakterisierung der DCs mit weiteren Oberflächenmarkern in Betracht gezogen werden, um die fehlende Auswirkung auf DCs in diesem ECP-Modell vollständig ausschließen zu können. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass insbesondere für *in vitro* Analysen der ECP-induzierten Effekte, DCs mit Unterstützung verschiedener DC stimulierender Zytokine generiert wurden. Da nicht klar ist, ob bei der ECP dieselbe Zytokinsekretion verursacht wird, die für die *in vitro* Differenzierung verwendet wurde, kann keine eindeutige Aussage über die Rolle der *in vitro* generierten DCs getroffen werden. Daher lag die Intention der hier vorliegenden Studie auf der Untersuchung der Vorläuferzellen, die unbeeinflusst bleiben von für die Kultur eingesetzten Zytokinen und Stimuli, wie beispielsweise co-kultivierten Zellen. Außerdem sollte zukünftig untersucht werden, ob sich zu einem späteren Zeitpunkt der Kultur ein Unterschied bei der Induktion von iDCs bzw. mDCs nach ECP-Behandlung feststellen lässt, wobei dann auch in den unbehandelten Ansätzen DCs allein durch die Adhärenz auf dem Kunststoffmaterial der Zellkulturplatten generiert werden könnten. Dennoch könnte die Regulation der Expression der ausgewählten Oberflächenmoleküle unterschiedlich schnell ablaufen und somit Einfluss auf das Ergebnis dieser Arbeit nehmen.

Anhand der Marker CD14, CD15, CD33 und HLA-DR konnten in der vorliegenden Arbeit M-MDSCs und PMN-MDSCs analog zur Arbeitsgruppe um Bronte *et al.* identifiziert werden [51]. MDSCs übernehmen eine wichtige Rolle bei der Immunregulation beispielsweise bei Krebs, chronischen Entzündungen, Infektionen, Autoimmunerkrankungen und GvHD [54]. Sowohl M-MDSCS als auch PMN-MDSCS besitzen laut Literatur eine immunsupprimierende Wirkung [52] und können die T-Zellproliferation über verschiedene Mechanismen inhibieren. Laut Huang *et al.* kann hierfür die Induktion von Tregs über Zellkontakt sowie TGF β - und IL-10-Sekretion verantwortlich sein [281], aber auch eine Beteiligung der Induktion der Produktion der Effektorenzyme iNOS und Arg1 wurde bereits beschrieben [282]. Im Kontext der ECP-Behandlung von GvHD-Patienten konnte die Arbeitsgruppe um Rieber *et al.* zum ersten Mal einen Anstieg der PMN-MDSCs nach ECP beschreiben, die eine

Abnahme der Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie der Th1- und Th17-Antwort induzieren [226].

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen eine signifikante Abnahme der HLA-DR-CD33+CD14-CD15+ PMN-MDSCs durch die *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die HLA-DR-CD33+CD14+ M-MDSCs anteilmäßig abnahmen. Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um ein reines *in vitro* ECP-Modell handelt, das Zellen gesunder Spender einschließt. Rieber *et al.* hingegen untersuchten Probenmaterial von GvHD-Patienten, das *ex vivo* im Rahmen einer ECP-Therapie gewonnen wurde.

5.3.3 Potentielle Einteilung der ECP-induzierten Effekte in Monozyten

Die immunregulatorische Rolle der *in vitro* ECP-behandelten Monozyten konnte durch die vorausgehenden Daten deutlich gemacht werden. Insbesondere die CD14+CD209-HLA-DR+CD86+ Monozyten scheinen für die Abnahme der T-Zellproliferation, verantwortlich zu sein. Es konnten sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte beschrieben werden, die die ECP verursacht (Tabelle 30). Der deutliche Anstieg der HLA-DR+ Zellen in den ECP-behandelten Monozytenfraktionen, sowie die Zunahme von CD86 könnte die zahlenmäßige Abnahme der CD14+ Zellen neutralisieren bzw. für einen verstärkten stimulierenden Effekt sorgen. Neben der signifikanten Induktion der CD14+CD209+HLA-DR+CD86+ Makrophagen nach ECP könnte der fehlende ECP-induzierte Einfluss auf DCs einen immunsuppressiven Effekt bedeuten. Die Abnahme der Anteile an M-MDSCs und PMN-MDSCs hingegen deutet auf einen pro-inflammatorischen Effekt nach *in vitro* ECP hin. Durch *in vitro* ECP werden Makrophagen des M2-Phänotyps induziert, die laut Literatur wichtig bei der Th17-Differenzierung und Suppression der IFN γ -Signalisierung sein können und somit sowohl zur anti- als auch proinflammatorischen Seite gezählt werden. Somit setzt sich der bereits in den vorigen Kapiteln diskutierte immunregulatorische Effekt der ECP-behandelten Monozyten auf co-kultivierte T-Zellen auch bei der Analyse der Auswirkung der ECP auf die Monozyten selbst fort.

Tabelle 30: Potentielle Zuordnung der untersuchten ECP-induzierten Effekte auf behandelte Monozyten zu anti- und proinflammatorischen Effekten.

	Antiinflammatorische Effekte nach <i>in vitro</i> ECP	Proinflammatorische Effekte nach <i>in vitro</i> ECP
HLA-DR		HLA-DR+ Zellen \uparrow
CD86		CD86 \uparrow
Differenzierung	Makrophagen \uparrow DCs unbeeinflusst	MDSCs \downarrow
Makrophagen	SOCS1 \uparrow	SOCS1 \uparrow
ECP-Effekt	Antiinflammatorisch	Anti-Tumor und anti-virale Reaktivität

5.4 Identifikation ECP spezifischer Targets

In dem hier vorliegenden *in vitro* ECP-Modell konnte eine immunmodulatorische Wirkung der ECP gezeigt werden. Eine Identifikation von Kontrollstellen der Immunmodulation könnte helfen, den Wirkmechanismus der ECP weiter aufzuklären und eine Optimierung der Therapie zu ermöglichen.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass PD-L1 die T-Zellaktivität supprimieren kann und durch Bindung an den Rezeptor PD-1 die Tumolyse reduziert [283, 284]. PD-L1 kann darüber hinaus als Inhibitor der T-Zellproliferation wie auch der Th17-Differenzierung dienen [283]. Während PD-L1-PD-1 Interaktionen außerdem zu einem Zellzyklusarrest in der G₀/G₁ Phase führen, kann die Bindung von PD-2, dem zweiten Liganden von PD-1, eine Inhibition der TCR vermittelten Proliferation verursachen [67]. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass durch eine PD-L1-PD-1 Ligation *Src homology region 2 domain-containing* (SHP-) Phosphatasen rekrutiert werden, die wiederum eine entscheidende Rolle bei der Inhibition von T-Zell vermittelten Antworten spielen [285-287]. PD-L1 wird insbesondere auf Makrophagen und Tumorzellen exprimiert [65], wohingegen eine PD-L2 Expression auf APCs [59], wie beispielsweise DCs [66], gefunden werden kann. Zudem kann sowohl PD-L1 [288, 289] wie auch der Rezeptor PD-1 [290, 291] auf aktivierten T-Zellen hochreguliert werden. Über das Gleichgewicht der Expression des inhibitorisch wirkenden PD-L1 und den co-stimulatorischen CD80 und CD86 Liganden können plasmacytoide DCs die Interaktion mit DCs regulieren [63, 292].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine ECP bedingte Veränderung der Anteile an PD-L1+ Zellen nur kurzzeitig bei der Analyse der Monozyten gezeigt werden, während sich die Anteile der PD-L2+ Zellen nur bei der Untersuchung der T-Zellen der Co-Kulturen ändern. In der Studie von Holtick *et al.* konnte bereits beschrieben werden, dass die PD-L1 Expression in DCs, die aus Co-Kulturen mit PUVA behandelten Zellen isoliert wurden, signifikant erhöht ist [293]. Dieses Ergebnis entspricht somit der Hochregulation von PD-L1+ myeloiden Zellen in der hier vorliegenden Arbeit. Die Arbeitsgruppe um Holtick *et al.* geht weiter davon aus, dass eine allogene Immunreaktion über PD-L1 Signalisierung herunterreguliert werden kann, da DCs durch PUVA bedingte, apoptotische Zellen moduliert werden.

Eine Blockade der PD-L1-PD-1 Interaktion mit Hilfe von Pembrolizumab bzw. anti-PD-L1 Antikörper, führte im vorliegenden *in vitro* ECP-Modell zu einem signifikanten Anstieg der T-Zellproliferation in den Co-Kulturen mit ECP-behandelten Monozyten im Vergleich zu den nicht blockierten Ansätzen. Diese Ergebnisse unterstreichen daher die Bedeutung der PD-L1-PD-1 Interaktionen für einen immunsuppressiven Effekt der ECP. Pembrolizumab besitzt eine effektive anti-Tumoraktivität bei der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen, wie den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Englisch: *non-small-cell lung cancer* (NSCLC) [294] oder fortgeschrittenen Melanomen [295] und ruft dabei laut der Studie von Garon *et al.* vertretbare Nebenwirkungen hervor. Singh *et al.* konnten 2016 jedoch beschreiben, dass Pembrolizumab bei der Behandlung eines Patienten mit Hodgkin-Lymphom zur Entstehung einer letztendlich tödlichen GvHD führte [296]. Auch Bruserud *et al.* stellen die Hypothese auf, dass bei einer zusätzlichen Behandlung von ECP-Patienten mit Antikörpern, die das inhibitorische Signalisieren von T-Zellen blockieren sollen, eine Steigerung der GvHD-Reaktivität verursacht werden könnte [152]. Die Arbeitsgruppe beschreibt somit, dass das Adressieren von beispielsweise PD-L1/2/3 und CTLA-4 dem Effekt der ECP entgegenwirkt. Daher muss die

Behandlung verschiedener Indikationen mit PD-1 blockierenden Antikörpern weiter erforscht und im Einzelfall abgewogen werden, um einen potentiell förderlichen GvL-Effekt oder aber eine schädigende GvHD-Aktivität zu berücksichtigen.

Da durch die Blockade der PD-L1-PD-1 Interaktion keine vollständige Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit erzielt werden konnte, wird die Theorie einer multifaktoriellen Wirkweise der ECP-Behandlung unterstützt. Auch Effektorenzyme wieIDO, Arg1 und iNOS können eine entscheidende Rolle bei der T-Zellsuppression spielen. MDSCs beispielsweise exprimieren Arg1 und iNOS, welche die Aminosäure L-Arginin metabolisieren und dadurch L-Ornithin, Citrullin und NO produzieren [297-299]. NO wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und Kontrolle von z. B. Infektionserkrankungen, Tumoren und Autoimmunerkrankungen [299]. IDO hingegen kann durch das Hervorrufen eines Tryptophanmangels zu einer Suppression bzw. einem Arrest der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen führen [293, 300, 301]. Hwu *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass Makrophagen IDO exprimieren und dadurch die T-Zellproliferation inhibieren können [302]. In der bereits zuvor erwähnten Studie von Holtick *et al.* konnte die Arbeitsgruppe keine PUVA-induzierte Veränderung der Expressionsrate von IDO in DCs beobachten [293]. Im Gegensatz hierzu konnten Merlin *et al.* einen Anstieg der Arg1-Aktivität bei GvHD-Patienten nach ECP-Behandlung feststellen [303]. Dabei konnten Merlin *et al.* zeigen, dass eine erhöhte Arginin-Konzentration eine Verschiebung des Zytokinprofils weg von IFN γ und TNF α hin zum antiinflammatorischen IL-10 induziert. Eine weitere Arbeitsgruppe geht davon aus, dass die erhöhte Menge an Arg1 im Serum während einer ECP-Behandlung durch Neutrophile verursacht wird und nicht durch mononukleäre Leukozyten [191]. Diese Ergebnisse, ebenso wie die in der Arbeit von Rieber *et al.* beschriebene Induktion von Arg1 im Serum von Patienten mit GvHD [226], stehen in Kontrast zu den Daten der hier vorliegenden Arbeit. Durch die *in vitro* ECP von Monozyten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Anteile der CD14+IDO+ Zellen signifikant nach zwei Tagen ansteigen, während die Anteile der CD14+Arg1+ und CD14+iNOS+ Zellen unbeeinflusst bleiben. Da insbesondere MDSCs eine T-Zellsuppression über Arg1 und iNOS vermitteln und diese nach *in vitro* ECP der Monozyten in dieser Arbeit anteilmäßig reduziert werden, kann IDO als potentieller Kandidat für die Abnahme der T-Zellproliferation in dem hier untersuchten *in vitro* ECP-Modell identifiziert werden. Frühere Studien beschäftigen sich hauptsächlich mit der Arg1 induzierten T-Zellsuppression bei ECP. Daten zu IDO im Rahmen der ECP sind bislang sehr limitiert. Daher sind weitere Analysen hinsichtlich der Bedeutung von IDO erforderlich, um seine genaue Rolle bei ECP zu klären.

Die bisher identifizierten Targets, die zur Aufklärung der Wirkweise der ECP weiter beitragen könnten, wurden in dieser Arbeit auf Proteinebene ermittelt. Die Analyse der RNA von ECP-behandelten Monozyten mittels NGS ermöglicht eine Aussage über die differentielle Genregulation von potentiellen weiteren Targets auf Genebene. Bislang konnte in der Literatur nur die Studie von Berger *et al.* gefunden werden, die sich mit einer ganzheitlichen Analyse der differentiellen Genregulation ECP-behandelter Monozyten beschäftigt [304]. Allerdings erfolgte in dieser Studie die Analyse mit Hilfe eines *microarray*, der auf einem anderen Prinzip beruht als die Untersuchung mittels NGS und die Daten daher nicht vollständig vergleichbar sind. Bei Berger *et al.* wurde zur Überprüfung der

differentiellen Genexpression eine n-fache Anreicherung von $FC > 2$ und eine Signifikanz der n-fachen Anreicherung unter 0,05 festgelegt, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit. Dennoch konnte durch die Arbeitsgruppe um Berger *et al.* insbesondere eine erhöhte Expression von Genen gezeigt werden, die mit einer Differenzierung, Adhäsion und Funktion von DCs in Verbindung stehen und daher laut der Studie die Theorie der Stimulation einer Monozyten-zu-DC Reifung durch ECP unterstützt wird [304]. Dabei ist nicht ganz ersichtlich, ob eine Fokussierung auf diese Gene erfolgte oder es sich dabei um die tatsächlich am stärksten regulierten Gene in Monozyten handelt.

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der sowohl an Tag 1 als auch Tag 2 nach ECP-Behandlung hoch- bzw. herunterregulierten Gene in Monozyten. Dabei wurden basierend auf den bisherigen Analysen Kategorien ausgewählt, in welche die differentiell regulierten Gene durch das DAVID *web tool* eingeordnet werden und die in Bezug zu den im *in vitro* ECP-Modell beobachteten Effekte stehen. Aus diesen Kategorien wurden wiederum Gene untersucht, die für weitere Analysen interessant sein und Aufschluss über die Wirkweise der ECP geben könnten.

Signifikant hochreguliert in Monozyten wurden an Tag 1 und Tag 2 nach ECP-Behandlung z. B. die Gene CXCL1, CXCL5, CXCL10, CXCR2, TNFRSF9, CXCL3, IL1B, CXCL2, CXCL8, TNFRSF10B und TNFRSF10A, von denen CXCL1, CXCL8, TNFRSF9 und IL-1B den beiden ausgewählten Kategorien *inflammatory response* und *negative regulation of cell proliferation* zugeordnet werden konnten.

In der Literatur sind etwa 40 bis 50 Chemokine bekannt, die unterschiedliche Rollen bei der Entwicklung, Homöostase und Funktion des Immunsystems übernehmen. Die Chemokine werden in zwei Hauptfamilien eingeordnet werden, basierend auf der Anordnung ihrer zwei N-terminalen Cysteinreste mit einer Aminosäure dazwischen (CXC) oder aufeinanderfolgend (CC) und binden entsprechend an CXC- bzw. CC-Rezeptoren (CXCR bzw. CCR) [305, 306]. Chemokine können das Rekrutieren von Immunzellen wie Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten durch die Interaktion mit bestimmten G-Protein gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren [305] bei Entzündung und Infektion regulieren. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere nach ECP differentiell hochregulierte Chemokinen mit CXCL-Motiv den Kategorien *inflammatory response* und *negative regulation of cell proliferation* zugeteilt wurden. Dies deutet auf eine hohe Bedeutsamkeit der Chemokine hin, deren Rolle bei ECP in der Literatur ebenso wie die der Chemokinrezeptoren noch wenig untersucht ist. Die Studie von Aoki *et al.* beispielsweise analysierte die Bedeutung mehrerer CCR und identifizierte CCR7 als potentiellen Biomarker zur Vorhersage einer vollständigen Antwort auf ECP-Therapie bei GvHD-Patienten [307]. Des Weiteren unterstützt die Hochregulation der CXCL- und CXCR-Gene die Beobachtung eines proinflammatorischen Effekts der ECP-Behandlung.

Durch differentielle Genanalysen konnte eine potentiell bedeutende Rolle der Signalisierung über den CXCR2 identifiziert werden. Beispielsweise kann CXCL1 an CXCR2 binden und den Rezeptor aktivieren, wodurch die Regulation von Zellwachstum, Zellviabilität und Zellmotilität vermittelt [308]. Zudem ist CXCL1 an der Modulation von Entzündung, Angiogenese, Wundheilung und Tumorgenese beteiligt [308-311]. CXCR2 ist der Rezeptor für CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 und CXCL8 [312] und die in der vorliegenden Arbeit erhöhte Genexpression des Rezeptors wie auch seiner Liganden (mit Ausnahme von CXCL6) in den ECP-behandelten Monozyten könnte auf eine verstärkte Signalisierung über diesen Rezeptor hindeuten. CXCL10 hingegen ist ein Ligand von CXCR3, reguliert Immunantworten über die Aktivierung sowie Rekrutierung von z.B. T-Zellen, Monozyten und

NK-Zellen [313] und wird als proinflammatorisches Th1-Chemokin eingeordnet [314]. Laut Literatur ist CXCL10 bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis [315], systemischer Lupus erythematodes [316] und Multiple Sklerose erhöht [317]. Im Gegensatz zu CXCR2 ist CXCR3 in der hier vorliegenden Arbeit nicht in Monozyten 1 und 2 Tage nach ECP hochreguliert. Daher könnte angenommen werden, dass die Signalisierung über CXCL10 und CXCR3 weniger relevant wie die Vermittlung einer Immunregulation über CXCR2 ist, obwohl CXCL10 sehr stark differentiell hoch reguliert wird.

Neben den Chemokinen, scheinen bei der *in vitro* ECP-Behandlung von Monozyten auch Mitglieder der TNF *receptor superfamily* (TNFRSF) eine wichtige Rolle zu spielen. Die Gene TNFRSF9, TNFRSF10B und TNFRSF10A wurden in der vorliegenden Arbeit als nach ECP signifikant hochreguliert identifiziert. Es gibt mehr als 20 Mitglieder der TNFRSF, die unterschiedliche Aufgaben bei der Immunantwort übernehmen. Besonders gut wurden diese Aufgaben bei der T-Zell vermittelten Immunantwort untersucht und zeigen eine Beteiligung bei der Steigerung von DC-Überleben, der Bildung von Effektor T-Zellen, der Antikörperantworten und der Verstärkung von Entzündungsreaktionen [318]. Das Gen TNFRSF9 codiert für das TNFRSF Mitglied 4-1BB (CD137). 4-1BB kann auf T-Zellen exprimiert werden und an den Liganden 4-1BBL auf APCs binden, um Signale für T-Zellwachstum und Differenzierung zu vermitteln [319-321]. Aber auch myeloide Zellen wie Monozyten, Neutrophile und DCs können 4-1BB exprimieren [318]. Die Arbeitsgruppe um Kienzle *et al.* konnte beispielsweise zeigen, dass 4-1BB auf Monozyten als Rezeptor dient, der bei Bindung durch Antikörper die Produktion von IL-8 und TNF α auf Protein- und Genebene induziert sowie die IL-10-Expression inhibiert [322]. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe eine bedeutende Rolle von 4-1BB bei der Zellkontakt abhängigen Kontrolle des B-Zellüberlebens durch Monozyten zeigen. Weiterführende Analysen hinsichtlich eines aktivierenden Effekts von potentiell hochreguliertem 4-1BB auf ECP-behandelten Monozyten auf die Zellen selbst oder 4-1BBL exprimierende Zellen, könnten zur weiteren Aufklärung der Wirkweise der ECP beitragen.

Die zwei Membran gebundenen Rezeptoren *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) *receptor* 1 (TRAILR1, CD261) bzw. 2 (TRAILR2, CD262) werden von den Genen TNFRSF10A bzw. TNFRSF10B codiert. Die Bindung von TRAIL an diese Rezeptoren induziert Apoptose [323]. Mit ihrer Studie an TRAILR defizienten Mäusen konnten Finnberg *et al.* bereits 2008 zeigen, dass die Abwesenheit von TRAILR die Anfälligkeit für chronische Entzündung und Tumorgenese fördert [324]. Somit könnte eine ECP-induzierte Hochregulation der Gene für TRAILR1 und TRAILR2 in Monozyten, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, sowie eine anschließende verstärkte Expression auf Proteinebene dafür sorgen, dass ein antiinflammatorischer aber auch ein anti-Tumor Effekt vermittelt wird.

Das Gen IL1B codiert für das Zytokin IL-1 β , das in vielen Erkrankungen mit chronischen Entzündungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis eine wichtige Rolle spielt [325]. IL-1 β wird hauptsächlich von myeloiden Zellen produziert und ist in Entzündung und Th17-Differenzierung involviert [326], sowie bei der CD8+ T-Zell vermittelten anti-Tumor Reaktivität von DCs [327]. Die Arbeitsgruppe um Yakut *et al.* konnte bereits zeigen, dass die ECP die Produktion von reifem IL-1 β durch Monozyten fördert [219]. Daher kann die in der hier vorliegenden Arbeit gefundene Hochregulation des IL1B-Gens die Daten von Yakut *et al.* unterstützen

und auf eine wichtige Rolle von IL1B bei ECP hindeuten. Dennoch sollte zukünftig überprüft werden, wie die Expression des IL-1 β auf Proteinebene bei ECP reguliert wird, da in den Zellkulturüberständen von Co-Kulturen aus ECP-behandelten Monozyten und T-Zellen eine Abnahme der IL-1 β -Konzentration nachgewiesen wurde.

Nach ein bzw. zwei Tagen nach ECP-Behandlung wurden die Gene CD36, ALCAM, FAF1 und CDKN2A herunterreguliert und für weitere Analysen als potentiell interessant erachtet. CD36 wird auf Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, DCs und hämatopoetischen Zellen exprimiert [328, 329] und ist ein Rezeptor für Thrombospondin-1 [330, 331] und Kollagen [332], wodurch es eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt. CD36 auf der Oberfläche von Monozyten kann beispielsweise durch M-CSF oder PMA hochreguliert werden, während LPS und Dexamethason für eine Abnahme von CD36 sorgen können [333]. Die Studie von Fadok *et al.* konnte bereits 1998 zeigen, dass Makrophagen CD36 in Zusammenarbeit mit anderen Rezeptoren für die Phagozytose von apoptotischen Zellen benötigen [334]. Die Aufnahme und Beseitigung von apoptotischem Material spielt bei der ECP eine zentrale Rolle, da beispielsweise maligne Zellen entfernt werden sollen. Somit könnte die Analyse der Herunterregulation von CD36 nach ECP weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung von Makrophagen und der Beeinflussung der Phagozytose bei ECP liefern. Interessanterweise konnte in der Studie von Fimiani *et al.* gezeigt werden, dass CD36 nach einer Photophoresebehandlung schnell auf Makrophagen hochreguliert wird [268]. Daher müsste die Expression von CD36 zusätzlich auf Proteinebene überprüft werden.

ALCAM codiert das Protein Alcam (oder CD166) ist ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül und dient als Ligand des Oberflächenrezeptors CD6 von Lymphozyten [335]. Alcam wird auf Melanomen und Darmkrebszellen überexprimiert, wobei es mit einem verkürzten Patientenüberleben assoziiert wird [336]. In der Studie von Soiffer *et al.* konnte ein Zusammenhang zwischen CD6+ T-Zellen und GvHD gezeigt werden [337]. Dabei soll eine Depletion von CD6+ T-Zellen aus dem Knochenmark von allogenen Spendermaterial dazu führen, dass das Auftreten der aGvHD und cGvHD sowie die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Medikation reduziert wird [337]. Die Herunterregulation der ALCAM-Genexpression in ECP-behandelten Monozyten, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, könnte somit zu einem reduzierten Signal über CD6 führen. Dieser Effekt könnte somit bei der Therapie von GvHD-Patienten aus CD6-Depletion und ECP-Therapie einen additiven, förderlichen Einfluss ausüben.

Aus der Kategorie *positive regulation of apoptotic process* wurden insgesamt zwei Gene, FAF1 und CDKN2A als möglicherweise bei ECP relevant erachtet. FAF1 codiert für das Protein *Fas associated factor 1* und ist aus der Literatur bekannt, dass Apoptose durch FAF1 verstärkt aber nicht initiiert werden kann [338]. Die Arbeitsgruppe um Elmetwali *et al.* konnte FAF1 als CD40-Liganden und eine Beteiligung von FAF1 an der NF κ B-Aktivierung identifizieren [339]. Geht die Funktionalität von FAF1 bei Erkrankung verloren, nimmt die Arbeitsgruppe an, dass die Onkogenese durch mangelnde NF κ B-Kontrolle vorangetrieben wird [339]. Durch die Herunterregulation des FAF1-Gens nach ECP-Behandlung von Monozyten konnte in der hier vorliegenden Arbeit ein möglicher Signalweg identifiziert werden, über den die Monozyten einer ECP-induzierten Apoptose entgehen könnten. Diese Daten könnten die Ergebnisse der Arbeit unterstützen, da keine gesteigerte Apoptose von

CD14+ Zellen nach ECP detektiert werden konnte. Dennoch muss diese Annahme weiter überprüft und bewiesen werden.

CDKN2A wurde neben der Kategorie *regulation of apoptotic process* auch der Kategorie *G1/S transition of mitotic cell cycle* zugeordnet und codiert für zwei unterschiedliche Proteine, p16INK4A und p14ARF [340]. p16INK4A bindet an Cyclin-abhängige Kinasen (CDK4 und CDK6) und inhibiert die Bildung eines CDK/Cyclin-D-Komplexes [341], sodass die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins verhindert wird und die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verbleiben [342]. p14ARF kann über den p53-Signalweg Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren [343, 344]. Dabei kann ARF mit der Ubiquitinligase MDM2 interagieren und die Bindung von p53 inhibieren [345]. Somit reguliert CDKN2A sowohl Apoptose als auch Zellproliferation, die in Zellen dann angehalten wird, wenn das Maximum an Zellteilungen erreicht ist. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CDKN2A in Monozyten nach ECP herunterreguliert wird, was unterstützend für die Ergebnisse aus der Analyse des Apoptoseverhaltens von CD14+ Zellen sein könnte, bei der keine verstärkte ECP-induzierte Apoptose von Monozyten gezeigt werden konnte. Somit könnte durch die Identifizierung einer signifikanten Herunterregulation des CDKN2A-Gens ein potentieller Mechanismus für das Apoptoseverhalten von Monozyten gefunden werden und sollte auf eine Anwendbarkeit auf die Apoptose von Lymphozyten nach ECP überprüft werden.

Durch die differentielle Genanalyse konnten somit neue potentielle Targets und relevante Gene identifiziert werden, die zum weiteren Verständnis der ECP-Therapie beitragen könnten. Außerdem wurden durch die Genanalysen die bisherigen Beobachtungen aus dem *in vitro* ECP-Modell hinsichtlich Apoptose von Monozyten, Reduktion der T-Zellproliferation sowie der immunregulatorischen Wirkweise der ECP unterstützt. Wichtig ist es bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Datenbanken und Programme zu verschiedenen Ergebnissen führen können und zukünftig eine Überprüfung mittels qRT-PCR Analysen durchgeführt werden sollte. Zudem kann alleine durch die Analyse der Genregulation keine Aussage über die Proteinexpression getroffen werden, da das Ablesen der Gene durch *silencer* und Promotoren beeinflusst sein kann. Somit sollte zudem eine Überprüfung auf Proteinebene in Betracht gezogen werden.

5.5 Validierung und klinische Bedeutung des *in vitro* ECP-Modells

Bei der Analyse des immunmodulatorischen Einflusses der ECP-Behandlung finden in der Literatur nicht nur prospektive sondern insbesondere retrospektive Studien Anwendung, die den klinischen Nutzen für Patienten nachweisen sollen. Solche Studien umfassen nahezu alle Indikationen, für deren Therapie die ECP empfohlen wird. Da sich die Behandlungspläne wie auch der Beginn einer ECP-Behandlung bei den verschiedenen Indikationen unterscheiden, ist ein Vergleich der mit Hilfe von Patientendaten evaluierten Studien häufig erschwert. Für einen erfolgreichen Vergleich der

Ergebnisse verschiedener ECP-Studien müssten einheitliche, reproduzierbare, verlässliche und standardisierbare Protokolle entwickelt werden [225].

Eine Möglichkeit, ECP-induzierte Effekte auf verschiedene Zelltypen und immunologische Prozesse zu untersuchen bieten Tiermodelle. Allerdings gibt es kein zur ECP-Apparatur äquivalentes Gerät für Tiere, was eine deutliche Limitation für die Forschung bedeutet [121]. Dies könnte jedoch zukünftig durch das bisher erworbene Wissen über das Design der ECP-Apparatur überwunden werden. Dadurch erklärt sich, dass in Tiermodellen bisher der Einfluss ECP-behandelter Zelltypen auf die Immunmodulation bzw. auf die Zelltypen selbst untersucht wurde. Ein Beispiel für die Verwendung von Tiermodellen ist die Induktion von Allergischer Enzephalomyelitis (EAE) in Ratten, bei denen die ECP eine Resistenz gegenüber dem EAE induzierenden Protein MBP vermittelt und zu einer Entwicklung von T-Suppressorzellen gegen auto-reaktive T-Zellen führt [120, 122]. Ebenso wie die ECP-induzierte Verhinderung einer spontanen Entwicklung von Lupus in MRL/1 Mäusen [124], kann eine Kollagen-induzierte Arthritis in DBA/1 Mäusen durch ECP blockiert werden [346]. Auch die Arbeitsgruppe um Edelson konnte mit Hilfe eines Tiermodells die Spezifität des anti-Tumor Effekts der PUVA Behandlung genauer untersuchen [347].

Ein weiterer Versuch, die Effekte der ECP-Behandlung genauer zu untersuchen, erfolgt anhand der Verwendung von *in vitro* durchgeführten Studien. Hierbei gelten wie für alle anderen immunologischen *in vitro* Modelle, die nur einen Teilaspekt eines Ablaufs oder einer Erkrankung beleuchten können, dieselben Limitationen. Der Einfluss bestimmter Parameter auf den Gesamtorganismus kann durch *in vitro* Modelle nicht abgedeckt werden. Dennoch helfen *in vitro* Modelle bei der Untersuchung immunologischer Fragestellungen, da genau vorgegebene Bedingungen erzeugt werden können. So kann nicht nur Patientenmaterial *in vitro* ECP-behandelt werden, sondern beispielsweise die Wirkweise der ECP an Proben gesunder Spender weiter evaluiert werden, wodurch die Analysen unabhängig werden von der Zugänglichkeit zu Patientenmaterial und deren Konditionierung. Im Rahmen der ECP bezogenen Forschung wurden nicht nur *in vitro* Modelle für die Analyse der ECP-induzierten Apoptose in Lymphozyten [221] und verschiedenen Zelltypen [127] eingesetzt, sondern auch zur Untersuchung ECP-induzierter Monozyten zu DC Reifung [223, 304] sowie des Schicksals von Monozyten und *in vitro* generierten DCs nach ECP [171, 220].

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher intensiv mit der Etablierung eines *in vitro* ECP-Modells, mit dessen Hilfe durch ECP hervorgerufene, immunregulatorische Effekte beobachtet und genauer analysiert werden können. Für die Verifizierung des *in vitro* ECP-Modells erfolgte ein Vergleich ausgesuchter Fragestellungen zwischen den *in vitro* an Zellen gesunder Spender erhobenen Daten und *ex vivo* bzw. *in vitro* behandelten Zellen von ECP-Patienten. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* behandelte Monozyten von ECP-Patienten in Co-Kulturen mit unbehandelten T-Zellen gesunder Spender mit den *in vitro* ECP-Ansätzen gesunder Spender entsprechende Ergebnisse hinsichtlich der Abnahme der T-Zellproliferation und der Veränderung der T-Zelltypen induzieren. Die in die Analysen einbezogenen ECP-Patienten weisen verschiedene Vorerkrankungen und Indikationen auf. Auch bei der Medikation während einer Vortherapie oder begleitend zur ECP-Behandlung gibt es in der vorliegenden Studie Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten. Bereits die Arbeitsgruppe um Rizzo *et al.* untersuchte 2005 GvHD-Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der ECP-Therapie, um generalisierte Effekte der ECP

beschreiben zu können [348]. Aufgrund der verhältnismäßig geringen untersuchten Patientenzahl in der vorliegenden Arbeit, die teilweise durch die Agglutination und Thrombusbildung in den Apharesatproben verursacht wurde, müssen für statistisch fundierte Aussagen zukünftig weitere Patienten analysiert werden. Zudem ist eine zusätzliche Applikation von Heparin in die Probensammelgefäße für das Apharesat vor bzw. nach *ex vivo* ECP zu empfehlen, um eine potentielle Agglutination zu verhindern da das im Apharesat bereits enthaltene Heparin nicht ausreichend für die weitere Bearbeitung der Proben im Labor sein könnte.

Zusammenfassend kann das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* ECP-Modell dabei helfen, wichtige immunologische Fragestellungen hinsichtlich der Wirkweise der ECP zu klären, ohne auf Proben von häufig schwer erkrankten und stark vortherapierten Patienten angewiesen zu sein, da auch die *in vitro* ECP-behandelten Zellen gesunder Spender zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Die ECP wird häufig als zusätzliche Behandlungsmethode oder bei einer auftretenden Resistenz gegenüber anderen Therapien eingesetzt. Daher kann die Analyse der ECP-induzierten Effekte einer Kombinationstherapie Auskunft über die Eignung des Modells bei der Analyse ECP verursachter, immunmodulatorischer Effekte geben. Bei Glucocorticoiden handelt es sich um pleiotropische Hormone, die durch die Komplexbildung mit spezifischen Rezeptoren, deren Translokation in den Zellkern und Interaktion mit der DNA, wichtige Gene für die Regulation von Entzündungen und Immunantworten modulieren können [349]. Glucocorticoide sind verantwortlich für die Regulation der Synthese und Sekretion von MIF, einem proinflammatorischen Zytokin [89]. MIF kann wiederum mit Glucocorticoiden interagieren und scheint laut der Studie von Jing *et al.* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Glucocorticoidresistenz bei Sepsis-Patienten zu spielen [88], aber auch bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, systemischer Lupus erythematoses und Atherosklerose [350]. Hohe Mengen des proinflammatorischen Zytokins MIF korrelieren bei Sepsis-Patienten laut Literatur mit der Schwere der Erkrankung und einer schlechten Prognose [351, 352]. Calandra *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass anti-MIF Antikörper in einem Mausmodell vor einer tödlichen Peritonitis schützten und somit durch die Neutralisation von MIF inflammatorische Antworten mildern [353].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* ECP-Behandlung die MIF-Expression auf Genebene in Monozyten signifikant herunterreguliert. Eine auftretende Glucocorticoidresistenz von beispielsweise GvHD-Patienten kann mit einer gesteigerten Sekretion von MIF einhergehen und ist ein Grund, warum die ECP für eine weitere Therapie eingesetzt wird. Die Abnahme der MIF-Genexpression nach *in vitro* ECP deutet somit darauf hin, dass eine ECP-Therapie eine zumindest partielle Wiederherstellung der Ansprechrate von Patienten gegenüber einer Behandlung mit Glucocorticoiden induzieren könnte, was für eine Optimierung des Behandlungsplans genutzt werden könnte. Des Weiteren konnte Stosic-Grujicic *et al.* bereits zeigen, dass in einem murinen Diabetesmodell MIF^{-/-} Mäuse weniger auf eine Diabetesinduktion ansprechen und zudem die Proliferation und Adhäsion der Lymphozyten reduziert ist [354]. Zudem konnte diese Studie zeigen, dass MIF^{-/-} Mäuse weniger IL-23 produzieren, welches die Produktion von IL-17 verstärken kann [355]. Auch bei der Differenzierung von humanen Th17-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen werden die Zytokine TGF- β , IL-1 β und IL-6, IL-21 oder IL-23 benötigt [356-358]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte neben der Abnahme der MIF-Genexpression eine Reduktion der T-Zellproliferation beobachtet

werden, was zu der Annahme führt, dass MIF indirekt an der Regulation der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen sowie des gleichbleibend hohen Anteils an proinflammatorischen Th17-Zellen in dem hier etablierten *in vitro* ECP-Modell beteiligt sein könnte.

Vitamin D liegt in der aktiven Form als Steroidhormon 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) oder auch Calcitriol vor [90]. Die Arbeitsgruppe um Jirapongsananuruk *et al.* konnte zeigen, dass 1,25-(OH)₂D₃ zu einer Verstärkung der immunsuppressiven Effekte von Corticosteroiden bei Th1-Immunantworten führen kann [108]. Des Weiteren konnte bereits in frühen Studien beobachtet werden, dass 1,25-(OH)₂D₃ die *in vitro* Proliferation von Lymphozyten und Produktion von Immunglobulin [359, 360] sowie die Synthese von IL-2 und IFN γ supprimiert [361, 362]. Vor allem zur Behandlung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, Krebs und nach Transplantation hat sich 1,25-(OH)₂D₃ als geeignet erwiesen [363-365]. Außerdem konnte bereits in der Literatur gezeigt werden, dass bei Patienten, die defizient für 1,25-(OH)₂D₃ vor allogener HCT waren, ein erhöhtes Risiko für eine Entwicklung einer cGvHD und einer reduzierten Chance auf Überleben gefunden werden kann [104, 105]. Daher scheint 1,25-(OH)₂D₃ eine wichtige Rolle auch bei der Entstehung einer GvHD zu spielen.

In dem hier vorliegenden *in vitro* ECP-Modell wurde daher überprüft, welchen Effekt die *in vitro* Kombinationstherapie mit 1,25-(OH)₂D₃ auf die T-Lymphozyten im Modell ausübt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Monozyten mit 1,25-(OH)₂D₃ eine Abnahme der Proliferationsfähigkeit von co-kultivierten T-Zellen induziert. Dieses Ergebnis bestätigt den bereits in der Literatur frühzeitig beschriebenen Antiproliferations-effekt von 1,25-(OH)₂D₃ auf Lymphozyten [90, 359]. Eine zusätzliche *in vitro* ECP der 1,25-(OH)₂D₃ stimulierten Monozyten führt zu einer weiteren Reduktion der Proliferationsfähigkeit co-kultivierter T-Zellen, die stärker als die Abnahme der T-Zellproliferation in Ansätzen ohne 1,25-(OH)₂D₃ ist. Daher kann ein indirekter, additiver Effekt der 1,25-(OH)₂D₃ und ECP-Behandlung von Monozyten auf die Proliferationsrate von T-Zellen im *in vitro* Modell angenommen werden. Dies könnte insbesondere bei einer Behandlung von Patienten von Vorteil sein, die für einen kurativen Effekt der Therapie auf eine Beseitigung von malignen T-Zellen angewiesen sind und bei denen dadurch eine Kombinationstherapie aus 1,25-(OH)₂D₃ und ECP förderlich sein könnte. Somit könnte der immunsuppressive Effekt, der für eine kombinatorische Behandlung von Patienten mittels 1,25-(OH)₂D₃ und Corticosteroiden bekannt ist [108] und ebenso im Rahmen einer ECP-Behandlung von GvHD-Patienten beschrieben werden konnte, durch 1,25-(OH)₂D₃ Gabe bei ECP weiter verstärkt werden. Die Studie von Tzaneva *et al.* zeigte bereits 2002, dass eine zusätzliche Behandlung durch das Vitamin D₃ Analogon Tacalcitol von PUVA-Patienten mit chronischer Plaque-Psoriasis, zu einer Verbesserung des therapeutischen Effekts der PUVA-Therapie führte [109].

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass 1,25-(OH)₂D₃ die Proliferation von naiven T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen inhibieren kann [366]. Zudem konnten Tang *et al.* zeigen, dass Th17-Zellen, die in Abwesenheit von APCs über den TCR und CD28 sowie Th17 polarisierenden Zytokinen induziert wurden, ebenfalls in ihrer Proliferation durch 1,25-(OH)₂D₃ Behandlung inhibiert werden [107]. Des Weiteren gibt es in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen hinsichtlich der Zytokinexpression in Anwesenheit von 1,25-(OH)₂D₃. In der Studie von Tang *et al.* wird eine Reduktion der Produktion von

IL-17 durch 1,25-(OH)₂D₃ beschrieben. Auch die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und IL-2 von Th1-Zellen sollen laut Literatur unter Anwesenheit von 1,25-(OH)₂D₃ supprimiert werden, während eine Produktion von IL-4 durch Th2-Zellen gesteigert werden soll [102, 366, 367]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine Abnahme der Anteile an CD3+CD4+IL-4+ Th2-Zellen nach Co-Kultur mit 1,25-(OH)₂D₃ stimulierten Monozyten im Vergleich zu unstimulierten Monozyten detektiert werden. Zudem konnte eine leichte Abnahme der Anteile CD3+CD4+IFN γ + Th1-Zellen oder der CD3+CD4+IL-2+ T-Zellen nachgewiesen werden, was auf eine Herunterregulation der proinflammatorischen Immunantwort hindeutet. Die ECP-induzierten Effekte unstimulierter Monozyten im *in vitro* ECP-Modell hinsichtlich der Änderungen der T-Zelltypenanteile konnten durch 1,25-(OH)₂D₃ stimulierte Monozyten reproduziert werden. Somit könnte angenommen werden, dass eine zusätzliche 1,25-(OH)₂D₃ Behandlung von Patienten keinen negativen Einfluss auf die ECP-induzierten, immunregulatorischen Effekte haben könnte und sich somit als Kombinationstherapie im *in vitro* ECP-Modell für weitere Analysen eignet. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass zukünftig weitere Analysen hinsichtlich des Einflusses von 1,25-(OH)₂D₃ auf die behandelten Monozyten selbst durchgeführt werden sollten. Die Arbeitsgruppe um Penna *et al.* konnte zeigen, dass insbesondere DCs wichtige Targets von 1,25-(OH)₂D₃ sind und 1,25-(OH)₂D₃ die Differenzierung von humanen Monozyten zu iDCs verhindert [368]. Des Weiteren konnte in dieser Studie beschrieben werden, dass die co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und MHC Klasse II Moleküle bei der LPS induzierten Reifung von DCs nicht hochreguliert werden und dass 1,25-(OH)₂D₃ die Apoptose von mDCs fördert. Durch 1,25-(OH)₂D₃ wird außerdem die Differenzierung von monozytären Zelllinien und humanen Vorläuferzellen des Knochenmarks zu Makrophagen induziert [101]. Somit besteht ein enger Zusammenhang zwischen 1,25-(OH)₂D₃ und der Differenzierung und Aktivierung von myeloiden Zellen, für die in der hier vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle in der ECP-Behandlung identifiziert werden konnte.

5.6 Fazit

Trotz intensiver Forschung konnte der immunologische Wirkmechanismus der ECP noch nicht vollständig aufgeklärt werden, da es sich dabei um ein komplexes und multifaktorielles Zusammenspiel verschiedener Immunprozesse handelt. Die aus der Literatur bekannten Auswirkungen der ECP-Behandlung auf die zellulären Bestandteile des Blutes sind sehr heterogen und werden kontrovers diskutiert.

Mit Hilfe der hier vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein stabiles, aussagekräftiges *in vitro* ECP-Modell zu etablieren, das für weitere Analysen herangezogen und zur Klärung verschiedener immunologischer Fragestellungen auch in Hinsicht auf weitere Zelltypen angewendet werden kann. Das Paradox der ECP liegt darin, dass die Methode zum einen eingesetzt wird, um T-Zellerkrankungen zu behandeln, bei denen eine gezielte Immunantwort erwünscht ist und zum anderen um Autoimmunerkrankungen und inflammatorische Bedingungen zu behandeln, bei denen

eine Inhibition der Immunantwort erreicht werden soll [369]. Durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit konnten sowohl ECP-induzierte Effekte auf behandelte Monozyten als auch auf co-kultivierte T-Zellen nachgewiesen werden, die einerseits einer antiinflammatorischen (Immunsuppression) und andererseits einer proinflammatorischen (anti-Tumor, anti-virale Reaktivität) Wirkung zugeordnet werden können. Somit können die *in vitro* durchgeführten Ergebnisse dieser Arbeit die immunmodulatorische Wirkweise der ECP bestätigen und ECP-behandelte Monozyten als potentiell bedeutende Mediatoren dieses Effekts identifiziert werden.

Da jedoch das Wissen aus der Literatur hinsichtlich der Rolle der Monozyten bei der ECP limitiert und kontrovers ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Der Notwendigkeit weiterer, standardisierter Analysen kann durch das etablierte *in vitro* ECP-Modell nachgekommen werden. Es ermöglicht unter Einsatz von Zellen gesunder Spender die Überprüfung unabhängig von den bei der Verwendung von Patientenmaterial auftretenden Limitationen, wie beispielsweise eine hohe Divergenz von Diagnose und Vorbehandlungsstrategien sowie die Probenzugänglichkeit durchzuführen.

Durch die Überprüfung ausgesuchter Ergebnisse, die *in vitro* an gesunden Spenderzellen erhoben wurden, mit *ex vivo* bzw. *in vitro* behandelten Patientenproben, konnte das *in vitro* ECP-Modell als verlässliche Analysemethode bestätigt werden. Auch die Möglichkeit *in vitro* Kombinationstherapien in die Analysen anhand des *in vitro* ECP-Modells einzubeziehen, wie bereits für die Behandlung der Monozyten mit 1,25-(OH)₂D₃ gezeigt, kann dazu beitragen, neue Erkenntnisse zur klinischen Relevanz der ECP zu gewinnen. Darüber hinaus könnten durch das etablierte *in vitro* Modell neue, ECP spezifische Targets zur Unterstützung der Aufklärung des Wirkmechanismus der ECP und vielmehr einer potentiellen Optimierung der Behandlungsstrategie gefunden werden. Dies könnte einen förderlichen Effekt für ECP-Patienten bewirken und daher die Bedeutung der ECP-Therapie als vielversprechende Therapiemöglichkeit steigern.

III Literaturverzeichnis

1. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology, 9th edition*. 2016: CRC Press.
2. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
3. Smith, C.A., et al., *Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 181-4.
4. Snanoudj, R., et al., *The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept*. Biologics, 2007. **1**(3): p. 203-13.
5. Ratcliffe, N., et al., *National Institutes of Health State of the Science Symposium in Therapeutic Apheresis: scientific opportunities in extracorporeal photopheresis*. Transfus Med Rev, 2015. **29**(1): p. 62-70.
6. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
7. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 4-12.
8. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
9. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
10. Ivanova, E.A. and A.N. Orekhov, *T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 327470.
11. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
12. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
13. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.
14. Ansel, K.M., et al., *Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 607-56.
15. Romagnani, S., *The role of lymphocytes in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(3): p. 399-408.
16. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
17. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
18. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
19. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
20. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
21. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
22. Chen, Z., A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation*. Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 400-8.
23. Wei, L., et al., *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
24. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-63.

25. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
26. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
27. Matusevicius, D., et al., *Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis*. Mult Scler, 1999. **5**(2): p. 101-4.
28. Kotake, S., et al., *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1345-52.
29. Kurasawa, K., et al., *Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2455-63.
30. Safinia, N., et al., *Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy*. Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 158-68.
31. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, *Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target*. Immunology, 2008. **124**(1): p. 13-22.
32. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
33. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.
34. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
35. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
36. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
37. Santegoets, S.J., et al., *Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(10): p. 1271-86.
38. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
39. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
40. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
41. Peters, J.H., et al., *Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? Pathobiology, 1991. 59(3): p. 122-6.*
42. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 753-61.
43. Robinson, S.P., et al., *Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(9): p. 2769-78.
44. Mills, C.D. and K. Ley, *M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity*. J Innate Immun, 2014. **6**(6): p. 716-26.
45. Mills, C.D., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(6): p. 463-88.
46. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
47. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. **111**(7): p. 927-30.
48. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
49. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.

50. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
51. Bronte, V., et al., *Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12150.
52. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
53. Millrud, C.R., C. Bergenfelz, and K. Leandersson, *On the origin of myeloid-derived suppressor cells*. Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 3649-3665.
54. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
55. Zhao, Y., et al., *Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells*. Oncoimmunology, 2016. **5**(2): p. e1004983.
56. Palmieri, D.J. and M.S. Carlino, *Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity*. Curr Oncol Rep, 2018. **20**(9): p. 72.
57. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2521-32.
58. Said, E.A., et al., *Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 452-9.
59. Sharpe, A.H., et al., *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 239-45.
60. Rodriguez-Garcia, M., et al., *Expression of PD-L1 and PD-L2 on human macrophages is up-regulated by HIV-1 and differentially modulated by IL-10*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 507-15.
61. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
62. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
63. Okazaki, T. and T. Honjo, *The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance*. Trends Immunol, 2006. **27**(4): p. 195-201.
64. Nakae, S., et al., *Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2238-48.
65. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
66. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 839-46.
67. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
68. Kasama, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases*. Arthritis, 2010. **2010**: p. 106202.
69. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
70. Bacher, M., et al., *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
71. Calandra, T., et al., *The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1895-902.
72. Nishihira, J., Y. Koyama, and Y. Mizue, *Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide*. Cytokine, 1998. **10**(3): p. 199-205.
73. Daryadel, A., et al., *Apoptotic neutrophils release macrophage migration inhibitory factor upon stimulation with tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 2006. **281**(37): p. 27653-61.
74. Rossi, A.G., et al., *Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2869-74.

75. Riedemann, N.C., et al., *Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1355-9.
76. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1467-76.
77. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
78. Mitchell, R.A., et al., *Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 18100-6.
79. Roger, T., et al., *MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4*. Nature, 2001. **414**(6866): p. 920-4.
80. Roger, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4)*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(2): p. 119-23.
81. Hudson, J.D., et al., *A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1375-82.
82. Kleemann, R., et al., *Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 211-6.
83. Wang, F.F., et al., *New insights into the role and mechanism of macrophage migration inhibitory factor in steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(3): p. R103.
84. Leech, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(8): p. 1601-8.
85. Selvi, E., et al., *Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(5): p. 460-4.
86. Steinhoff, M., et al., *Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease*. Br J Dermatol, 1999. **141**(6): p. 1061-6.
87. Murakami, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(4): p. 337-43.
88. Jing, L. and M. Bu, *Role of macrophage migration inhibitory factor in glucocorticoid release and glucocorticoid receptor function in rats*. Ann Clin Lab Sci, 2011. **41**(1): p. 14-9.
89. Calandra, T., et al., *MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production*. Nature, 1995. **377**(6544): p. 68-71.
90. Rigby, W.F., T. Stacy, and M.W. Fanger, *Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol)*. J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1451-5.
91. Zehnder, D., et al., *Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(12): p. 2465-73.
92. Norman, A.W., et al., *Studies on calciferol metabolism. I. Production of vitamin D metabolite 4B from 25-OH-cholecalciferol by kidney homogenates*. Biochem Biophys Res Commun, 1971. **42**(6): p. 1082-7.
93. Reichel, H., H.P. Koeffler, and A.W. Norman, *Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24,25-dihydroxyvitamin D3 by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages*. J Biol Chem, 1987. **262**(23): p. 10931-7.
94. Veldman, C.M., M.T. Cantorna, and H.F. DeLuca, *Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system*. Arch Biochem Biophys, 2000. **374**(2): p. 334-8.
95. Manolagas, S.C., D.M. Provvedini, and C.D. Tsoukas, *Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the immune system*. Mol Cell Endocrinol, 1985. **43**(2-3): p. 113-22.
96. Carlberg, C., *Vitamin D Genomics: From In Vitro to In Vivo*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 250.

97. Molnar, F., M. Perakyla, and C. Carlberg, *Vitamin D receptor agonists specifically modulate the volume of the ligand-binding pocket*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10516-26.
98. Alroy, I., T.L. Towers, and L.P. Freedman, *Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5789-99.
99. Kimmel-Jehan, C., et al., *DNA bending is induced by binding of vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimers to vitamin D response elements*. J Cell Biochem, 1999. **74**(2): p. 220-8.
100. Mora, J.R., M. Iwata, and U.H. von Andrian, *Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 685-98.
101. Provvedini, D.M., L.J. Deftos, and S.C. Manolagas, *1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes in vitro morphologic and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiation into macrophages*. Bone, 1986. **7**(1): p. 23-8.
102. Boonstra, A., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 4974-80.
103. Mattner, F., et al., *Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3)*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 498-508.
104. Wallace, G., et al., *Vitamin D Deficiency and Survival in Children after Hematopoietic Stem Cell Transplant*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(9): p. 1627-31.
105. von Bahr, L., et al., *Increased incidence of chronic GvHD and CMV disease in patients with vitamin D deficiency before allogeneic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(9): p. 1217-23.
106. Chang, J.H., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12925.
107. Tang, J., et al., *Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4624-32.
108. Jirapongsananuruk, O., I. Melamed, and D.Y. Leung, *Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(5): p. 981-5.
109. Tzaneva, S., et al., *A comparison of psoralen plus ultraviolet A (PUVA) monotherapy, tacalcitol plus PUVA and tazarotene plus PUVA in patients with chronic plaque-type psoriasis*. Br J Dermatol, 2002. **147**(4): p. 748-53.
110. Edelson, R., et al., *Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results*. N Engl J Med, 1987. **316**(6): p. 297-303.
111. Knobler, R., et al., *Long-term follow-up and survival of cutaneous T-cell lymphoma patients treated with extracorporeal photopheresis*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2012. **28**(5): p. 250-7.
112. Duvic, M., N. Chiao, and R. Talpur, *Extracorporeal photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma*. J Cutan Med Surg, 2003. **7**(4 Suppl): p. 3-7.
113. Evans, A.V., et al., *Extracorporeal photopheresis in Sezary syndrome: hematologic parameters as predictors of response*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1298-301.
114. Dall'Amico, R. and C. Messina, *Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease*. Ther Apher, 2002. **6**(4): p. 296-304.
115. Flowers, M.E., et al., *A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2008. **112**(7): p. 2667-74.
116. Rafei, H., M.A. Kharfan-Dabaja, and T. Nishihori, *A Critical Appraisal of Extracorporeal Photopheresis as a Treatment Modality for Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease*. Biomedicine, 2017. **5**(4).
117. Zhou, X.A. and J. Choi, *Photopheresis: Advances and Use in Systemic Sclerosis*. Curr Rheumatol Rep, 2017. **19**(6): p. 31.

118. Papp, G., et al., *The effects of extracorporeal photochemotherapy on T cell activation and regulatory mechanisms in patients with systemic sclerosis*. Clin Rheumatol, 2012. **31**(9): p. 1293-9.
119. Marques, M.B. and J. Adamski, *Extracorporeal photopheresis: technique, established and novel indications*. J Clin Apher, 2014. **29**(4): p. 228-34.
120. Heshmati, F., *Updating ECP action mechanisms*. Transfus Apher Sci, 2014. **50**(3): p. 330-9.
121. Edelson, R.L., *Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation*. Transfus Apher Sci, 2014. **50**(3): p. 322-9.
122. Ben-Nun, A., H. Wekerle, and I.R. Cohen, *Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein*. Nature, 1981. **292**(5818): p. 60-1.
123. Trautinger, F., U. Just, and R. Knobler, *Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy)*. Photochem Photobiol Sci, 2013. **12**(1): p. 22-8.
124. Berger, C.L., et al., *Inhibition of autoimmune disease in a murine model of systemic lupus erythematosus induced by exposure to syngeneic photoinactivated lymphocytes*. J Invest Dermatol, 1990. **94**(1): p. 52-7.
125. Perez, M., et al., *Inhibition of antiskin allograft immunity by infusions with syngeneic photoinactivated effector lymphocytes*. J Invest Dermatol, 1989. **92**(5): p. 669-76.
126. Knobler, R.M., et al., *Parenteral administration of 8-methoxypsoralen in photopheresis*. J Am Acad Dermatol, 1993. **28**(4): p. 580-4.
127. Legitimo, A., et al., *Psoralen and UVA light: an in vitro investigation of multiple immunological mechanisms underlying the immunosuppression induction in allograft rejection*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(1): p. 24-34.
128. Barr, M.L., et al., *Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group*. N Engl J Med, 1998. **339**(24): p. 1744-51.
129. Gasparro, F.P., et al., *Molecular aspects of extracorporeal photochemotherapy*. Yale J Biol Med, 1989. **62**(6): p. 579-93.
130. Marshall, S.R., *Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression?* Nat Clin Pract Oncol, 2006. **3**(6): p. 302-14.
131. Kitko, C.L. and J.E. Levine, *Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD*. Transfus Apher Sci, 2015. **52**(2): p. 151-6.
132. Kitko, C.L., et al., *Combination Therapy for Graft-versus-Host Disease Prophylaxis with Etanercept and Extracorporeal Photopheresis: Results of a Phase II Clinical Trial*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015.
133. Im, A. and S.Z. Pavletic, *Deciphering the Mystery: Extracorporeal Photopheresis in Graft-versus-Host Disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(11): p. 1861-2.
134. Goussetis, E., I. Varela, and P. Tsirigotis, *Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children*. Transfus Apher Sci, 2012. **46**(2): p. 203-9.
135. Dall'Amico, R., et al., *Successful treatment of recurrent rejection in renal transplant patients with photopheresis*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(1): p. 121-7.
136. Nedelcu, E., et al., *Exclusive use of acid citrate dextrose for anticoagulation during extracorporeal photopheresis in patients with contraindications to heparin: an effective protocol*. J Clin Apher, 2008. **23**(2): p. 66-73.
137. Alfred, A., et al., *The role of extracorporeal photopheresis in the management of cutaneous T-cell lymphoma, graft-versus-host disease and organ transplant rejection: a consensus statement update from the UK Photopheresis Society*. Br J Haematol, 2017.
138. Heald, P.W., M.I. Perez, and F.P. Gasparro, *Dosage guidelines: extracorporeal photochemotherapy (photopheresis)*. Arch Dermatol, 1990. **126**(10): p. 1369.
139. Wagner, G., et al., *8-MOP plasma levels in PUVA problem cases with psoriasis*. Br J Dermatol, 1979. **101**(3): p. 285-92.

140. Schafer-Korting, M. and H.C. Korting, *Intraindividual variations of 8-methoxypsoralen plasma levels*. Arch Dermatol Res, 1982. **272**(1-2): p. 1-7.
141. Shephard, S.E. and R.G. Panizzon, *Carcinogenic risk of bath PUVA in comparison to oral PUVA therapy*. Dermatology, 1999. **199**(2): p. 106-12.
142. Arulogun, S., et al., *Extracorporeal photopheresis for the treatment of Sezary syndrome using a novel treatment protocol*. J Am Acad Dermatol, 2008. **59**(4): p. 589-95.
143. Foss, F.M., et al., *Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35**(12): p. 1187-93.
144. Couriel, D., et al., *Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work?* Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(1 Suppl 2): p. 37-40.
145. Bladon, J. and P.C. Taylor, *Extracorporeal photopheresis: a focus on apoptosis and cytokines*. J Dermatol Sci, 2006. **43**(2): p. 85-94.
146. Peritt, D., *Potential mechanisms of photopheresis in hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(1 Suppl 2): p. 7-12.
147. Scarisbrick, J.J., et al., *U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease*. Br J Dermatol, 2008. **158**(4): p. 659-78.
148. Salvaneschi, L., et al., *Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood*. Transfusion, 2001. **41**(10): p. 1299-305.
149. Calore, E., et al., *Extracorporeal photochemotherapy may improve outcome in children with acute GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42**(6): p. 421-5.
150. Berger, M., et al., *Extracorporeal photopheresis for steroid resistant graft versus host disease in pediatric patients: a pilot single institution report*. J Pediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(10): p. 678-87.
151. Perotti, C., et al., *Extracorporeal photochemotherapy in graft-versus-host disease: a longitudinal study on factors influencing the response and survival in pediatric patients*. Transfusion, 2010. **50**(6): p. 1359-69.
152. Bruserud, O., et al., *Extracorporeal photopheresis (photochemotherapy) in the treatment of acute and chronic graft versus host disease: immunological mechanisms and the results from clinical studies*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(8): p. 757-77.
153. Dignan, F.L., et al., *Efficacy of bimonthly extracorporeal photopheresis in refractory chronic mucocutaneous GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(6): p. 824-30.
154. Couriel, D.R., et al., *Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3074-80.
155. Apisarnthanarax, N., et al., *Extracorporeal photopheresis therapy in the management of steroid-refractory or steroid-dependent cutaneous chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: feasibility and results*. Bone Marrow Transplant, 2003. **31**(6): p. 459-65.
156. Holien, T., et al., *Comparison between 8-methoxypsoralen and 5-aminolevulinic acid in killing T cells of photopheresis patients ex vivo*. Lasers Surg Med, 2018.
157. Knobler, R., et al., *Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014. **28 Suppl 1**: p. 1-37.
158. Zic, J.A., *Extracorporeal Photopheresis in the Treatment of Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome*. Dermatol Clin, 2015. **33**(4): p. 765-76.
159. Booken, N., et al., *Combination therapy with extracorporeal photopheresis, interferon-alpha, PUVA and topical corticosteroids in the management of Sezary syndrome*. J Dtsch Dermatol Ges, 2010. **8**(6): p. 428-38.
160. Aranda, F., et al., *Trial Watch: Peptide vaccines in cancer therapy*. Oncoimmunology, 2013. **2**(12): p. e26621.
161. Radford, K.J., K.M. Tullett, and M.H. Lahoud, *Dendritic cells and cancer immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 26-32.

-
162. Martner, A., et al., *Immunotherapeutic strategies for relapse control in acute myeloid leukemia*. Blood Rev, 2013. **27**(5): p. 209-16.
163. Malik, M.I., et al., *Extracorporeal photopheresis for chronic graft-versus-host disease: a systematic review and meta-analysis*. Blood Res, 2014. **49**(2): p. 100-6.
164. Yoo, E.K., et al., *Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(2): p. 235-42.
165. Santella, R.M., et al., *Monoclonal antibodies to DNA modified by 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(7): p. 2533-44.
166. Yemul, S., et al., *Selective killing of T lymphocytes by phototoxic liposomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(1): p. 246-50.
167. Hannani, D., et al., *Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function*. Transplantation, 2010. **89**(5): p. 492-9.
168. Tambur, A.R., et al., *Extracorporeal photopheresis induces lymphocyte but not monocyte apoptosis*. Transplant Proc, 2000. **32**(4): p. 747-8.
169. Setterblad, N., et al., *Extracorporeal photopheresis increases sensitivity of monocytes from patients with graft-versus-host disease to HLA-DR-mediated cell death*. Transfusion, 2008. **48**(1): p. 169-77.
170. Budde, H., et al., *In vitro effects of different 8-methoxypsoralen treatment protocols for extracorporeal photopheresis on mononuclear cells*. Cent Eur J Immunol, 2017. **42**(1): p. 1-9.
171. Rao, V., et al., *In vitro experiments demonstrate that monocytes and dendritic cells are rendered apoptotic by extracorporeal photochemotherapy, but exhibit unaffected surviving and maturing capacity after 30 Gy gamma irradiation*. Scand J Immunol, 2008. **68**(6): p. 645-51.
172. Patel, V.A., et al., *Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4663-70.
173. Durazzo, T.S., et al., *Induction of monocyte-to-dendritic cell maturation by extracorporeal photochemotherapy: initiation via direct platelet signaling*. Transfus Apher Sci, 2014. **50**(3): p. 370-8.
174. Berger, C.L., et al., *Induction of human tumor-loaded dendritic cells*. Int J Cancer, 2001. **91**(4): p. 438-47.
175. Futterleib, J.S., et al., *Activation of GILZ gene by photoactivated 8-methoxypsoralen: potential role of immunoregulatory dendritic cells in extracorporeal photochemotherapy*. Transfus Apher Sci, 2014. **50**(3): p. 379-87.
176. Spisek, R., Z. Gasova, and J. Bartunkova, *Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease*. Transfusion, 2006. **46**(1): p. 55-65.
177. Savill, J., et al., *A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 965-75.
178. Gorgun, G., K.B. Miller, and F.M. Foss, *Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2002. **100**(3): p. 941-7.
179. Hadeiba, H. and E.C. Butcher, *Thymus-homing dendritic cells in central tolerance*. Eur J Immunol, 2013. **43**(6): p. 1425-9.
180. Hadeiba, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 438-50.
181. Hadeiba, H., et al., *CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1253-60.
182. Guery, L. and S. Hugues, *Tolerogenic and activatory plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 59.

183. Lamioni, A., et al., *The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo*. *Transplantation*, 2005. **79**(7): p. 846-50.
184. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 685-711.
185. Tsigotis, P., et al., *Extracorporeal photopheresis in refractory chronic graft-versus-host disease: the influence on peripheral blood T cell subpopulations. A study by the Hellenic Association of Hematology*. *Transfus Apher Sci*, 2012. **46**(2): p. 181-8.
186. Xia, C.Q., K.A. Campbell, and M.J. Clare-Salzler, *Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2009. **14**(4): p. 338-43.
187. Bladon, J. and P.C. Taylor, *Photopheresis up-regulates CD36 on monocytes and reduces CD25(+) and CD28(+) T cell numbers*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2005. **2**(2): p. 119-27.
188. Schmitt, S., et al., *Extracorporeal photopheresis augments function of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells by triggering adenosine production*. *Transplantation*, 2009. **88**(3): p. 411-6.
189. Biagi, E., et al., *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*, 2007. **84**(1): p. 31-9.
190. Di Renzo, M., et al., *Extracorporeal photochemotherapy restores Th1/Th2 imbalance in patients with early stage cutaneous T-cell lymphoma*. *Immunology*, 1997. **92**(1): p. 99-103.
191. Franklin, C., et al., *Modulation and Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by Extracorporeal Photopheresis in the Treatment of Chronic Graft-Versus-Host Disease*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0134518.
192. Stadler, R., et al., *Short German guidelines: cutaneous lymphomas*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2008. **6 Suppl 1**: p. S25-31.
193. Blume, K., S. Forman, and F. Appelbaum, *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 2004. **3rd ed. ed. Malden, Massachusetts**.
194. Choi, S.W., J.E. Levine, and J.L. Ferrara, *Pathogenesis and management of graft-versus-host disease*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2010. **30**(1): p. 75-101.
195. Socie, G. and B.R. Blazar, *Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside*. *Blood*, 2009. **114**(20): p. 4327-36.
196. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. *Lancet*, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
197. Filipovich, A.H., et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005. **11**(12): p. 945-56.
198. Paczesny, S., S.W. Choi, and J.L. Ferrara, *Acute graft-versus-host disease: new treatment strategies*. *Curr Opin Hematol*, 2009. **16**(6): p. 427-36.
199. Inamoto, Y. and M.E. Flowers, *Treatment of chronic graft-versus-host disease in 2011*. *Curr Opin Hematol*, 2011. **18**(6): p. 414-20.
200. Greinix, H.T., et al., *Assessing the potential role of photopheresis in hematopoietic stem cell transplant*. *Bone Marrow Transplant*, 2006. **38**(4): p. 265-73.
201. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. *Trends Mol Med*, 2006. **12**(9): p. 440-50.
202. Rubegni, P., et al., *CD4+CD25+ lymphocyte subsets in chronic graft versus host disease patients undergoing extracorporeal photochemotherapy*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2007. **20**(4): p. 801-7.
203. Xiong, H., et al., *Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses JAK2/STAT3 signaling via inducing the promoter-associated histone acetylation of SOCS1 and SOCS3 in human colorectal cancer cells*. *Mol Carcinog*, 2012. **51**(2): p. 174-84.
204. Sutherland, K.D., et al., *Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas*. *Oncogene*, 2004. **23**(46): p. 7726-33.

-
205. Curtis, K.M., et al., *EF1alpha and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells*. BMC Mol Biol, 2010. **11**: p. 61.
206. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. Clin Chem, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1221-9.
207. Patnaik, A., et al., *Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(19): p. 4286-93.
208. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
209. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
210. Reinhardt-Heller, K., et al., *Increase of Intermediate Monocytes in Graft-versus-Host Disease: Correlation with MDR1+Th17.1 Levels and the Effect of Prednisolone and 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3*. Biol Blood Marrow Transplant, 2017.
211. Sedlazeck, F.J., P. Rescheneder, and A. von Haeseler, *NextGenMap: fast and accurate read mapping in highly polymorphic genomes*. Bioinformatics, 2013. **29**(21): p. 2790-1.
212. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 621-8.
213. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 139-40.
214. Reinhardt, K., et al., *Monocyte-induced development of Th17 cells and the release of S100 proteins are involved in the pathogenesis of graft-versus-host disease*. J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3355-65.
215. Evans, H.G., et al., *Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17034-9.
216. Berger, C.L., et al., *Transimmunization, a novel approach for tumor immunotherapy*. Transfus Apher Sci, 2002. **26**(3): p. 205-16.
217. Tanaka, K., et al., *Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3746-56.
218. Antico, A., et al., *Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature*. Autoimmun Rev, 2012. **12**(2): p. 127-36.
219. Yakut, E., et al., *Extracorporeal photopheresis promotes IL-1beta production*. J Immunol, 2015. **194**(6): p. 2569-77.
220. Holtick, U., et al., *Impact of psoralen/UVA-treatment on survival, activation, and immunostimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells*. Transplantation, 2008. **85**(5): p. 757-66.
221. Heng, A.E., et al., *PUVA apoptotic response in activated and resting human lymphocytes*. Transfus Apher Sci, 2003. **28**(1): p. 43-50.
222. Schmid, D., et al., *T-cell death, phosphatidylserine exposure and reduced proliferation rate to validate extracorporeal photochemotherapy*. Vox Sang, 2015. **108**(1): p. 82-8.
223. Legitimo, A., et al., *In vitro treatment of monocytes with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light induces dendritic cells with a tolerogenic phenotype*. Clin Exp Immunol, 2007. **148**(3): p. 564-72.
224. Jacob, M.C., et al., *Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system*. Transfus Apher Sci, 2003. **28**(1): p. 63-70.
225. Evrard, B., et al., *CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: use for quality control*. Transfus Apher Sci, 2010. **42**(1): p. 11-9.
-

226. Rieber, N., et al., *Extracorporeal photopheresis increases neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in patients with GvHD*. Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(4): p. 545-52.
227. Lee, S., B. Dorken, and C.A. Schmitt, *Extracorporeal photopheresis in graft-versus-host disease: ultraviolet radiation mediates T cell senescence in vivo*. Transplantation, 2004. **78**(3): p. 484-5.
228. Berger, C.L., et al., *Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1640-7.
229. Tiemessen, M.M., et al., *Lack of suppressive CD4+CD25+FOXP3+ T cells in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(10): p. 2217-23.
230. Rao, V., et al., *Cutaneous T cell lymphoma and graft-versus-host disease: a comparison of in vivo effects of extracorporeal photochemotherapy on Foxp3+ regulatory T cells*. Clin Immunol, 2009. **133**(3): p. 303-13.
231. Fadok, V.A., D.L. Bratton, and P.M. Henson, *Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 957-62.
232. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
233. Denney, H.A., et al., *Regulatory T Cells in Chronic Graft-Versus-Host Disease After Extracorporeal Photopheresis: Correlation With Skin and Global Organ Responses, and Ability to Taper Steroids*. Transplantation, 2017. **101**(1): p. 204-211.
234. Gandelman, J.S., et al., *A Prospective Trial of Extracorporeal Photopheresis for Chronic Graft-versus-Host Disease Reveals Significant Disease Response and No Association with Frequency of Regulatory T Cells*. Biol Blood Marrow Transplant, 2018.
235. Zorn, E., et al., *Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2903-11.
236. Vieira, P.L., et al., *IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5986-93.
237. Xu, D., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 394-9.
238. Klosner, G., et al., *Treatment of peripheral blood mononuclear cells with 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A radiation induces a shift in cytokine expression from a Th1 to a Th2 response*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(3): p. 459-62.
239. Risoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
240. Plumas, J., O. Manches, and L. Chaperot, *Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy in the control of GVHD: involvement of dendritic cells*. Leukemia, 2003. **17**(11): p. 2061-2.
241. Evans, H.G., et al., *In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6232-7.
242. Furuhashi, T., et al., *Photo(chemo)therapy reduces circulating Th17 cells and restores circulating regulatory T cells in psoriasis*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54895.
243. Kesselring, R., et al., *Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development*. Br J Cancer, 2010. **103**(8): p. 1245-54.
244. Chatterjee, S., et al., *Reducing CD73 expression by IL1beta-Programmed Th17 cells improves immunotherapeutic control of tumors*. Cancer Res, 2014. **74**(21): p. 6048-59.
245. Yssel, H., et al., *IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells*. J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2378-84.
246. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
247. Hsu, D.H., K.W. Moore, and H. Spits, *Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity*. Int Immunol, 1992. **4**(5): p. 563-9.

-
248. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
249. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
250. Maeda, A., et al., *Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5968-76.
251. Foss, F.M., *Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-vs-host disease*. J Cutan Med Surg, 2003. **7**(4 Suppl): p. 13-7.
252. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
253. Devitt, A., et al., *Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells*. Nature, 1998. **392**(6675): p. 505-9.
254. Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias, *Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 437-57.
255. Geijtenbeek, T.B., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. Cell, 2000. **100**(5): p. 575-85.
256. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
257. Bullwinkel, J., et al., *Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells*. Epigenetics, 2011. **6**(1): p. 45-51.
258. Preza, G.C., et al., *Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2014. **30**(3): p. 241-9.
259. Bottazzo, G.F., et al., *Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity*. Lancet, 1983. **2**(8359): p. 1115-9.
260. Palojarvi, A., et al., *Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants*. Pediatr Res, 2013. **73**(4 Pt 1): p. 469-75.
261. Azuma, M., et al., *B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28*. Nature, 1993. **366**(6450): p. 76-9.
262. Bazil, V. and J.L. Strominger, *Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes*. J Immunol, 1991. **147**(5): p. 1567-74.
263. Rook, A.H., et al., *Photopheresis: clinical applications and mechanism of action*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1999. **4**(1): p. 85-90.
264. Vowels, B.R., et al., *Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes: implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(5): p. 686-92.
265. Moor, A.C., et al., *Treatment with 8-MOP and UVA enhances MHC class I synthesis in RMA cells: preliminary results*. J Photochem Photobiol B, 1995. **29**(2-3): p. 193-8.
266. Hivelin, M., et al., *Extracorporeal photopheresis: from solid organs to face transplantation*. Transpl Immunol, 2009. **21**(3): p. 117-28.
267. George, J.F., et al., *Role for CD4(+)CD25(+) T cells in inhibition of graft rejection by extracorporeal photopheresis*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(6): p. 616-22.
268. Fimiani, M., et al., *Extracorporeal photochemotherapy induces a significant increase in CD36+ circulating monocytes in patients with mycosis fungoides*. Dermatology, 1997. **194**(2): p. 107-10.
269. Chomarat, P., et al., *IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 510-4.
270. Costanzo-Nordin, M.R., et al., *Successful treatment of heart transplant rejection with photopheresis*. Transplantation, 1992. **53**(4): p. 808-15.
271. Bouhlel, M.A., et al., *PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties*. Cell Metab, 2007. **6**(2): p. 137-43.
-

272. Oh, J., M.W. Hur, and C.E. Lee, *SOCS1 protects protein tyrosine phosphatases by thioredoxin upregulation and attenuates Jaks to suppress ROS-mediated apoptosis*. *Oncogene*, 2009. **28**(35): p. 3145-56.
273. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 23-35.
274. Whyte, C.S., et al., *Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function*. *J Leukoc Biol*, 2011. **90**(5): p. 845-54.
275. Albina, J.E., J.A. Abate, and W.L. Henry, Jr., *Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway*. *J Immunol*, 1991. **147**(1): p. 144-8.
276. Doedens, A.L., et al., *Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression*. *Cancer Res*, 2010. **70**(19): p. 7465-75.
277. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
278. Di Renzo, M., et al., *Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **151**(3): p. 407-13.
279. Kibbi, N., et al., *Induction of anti-tumor CD8 T cell responses by experimental ECP-induced human dendritic antigen presenting cells*. *Transfus Apher Sci*, 2016. **55**(1): p. 146-52.
280. Johansson, U., et al., *Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs*. *J Immunol*, 2007. **179**(3): p. 1711-20.
281. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
282. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. *Blood*, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
283. Shi, S.J., et al., *CD4(+)T cell specific B7-H1 selectively inhibits proliferation of naive T cells and Th17 differentiation in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(52): p. 90028-90036.
284. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(4): p. 450-61.
285. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
286. Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe, *PD-1 and its ligands in T-cell immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(3): p. 309-14.
287. Sim, W.J., P.J. Ahl, and J.E. Connolly, *Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function*. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: p. 2636701.
288. Butte, M.J., et al., *Interaction of human PD-L1 and B7-1*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(13): p. 3567-72.
289. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. *Nat Med*, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
290. Liang, S.C., et al., *Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(10): p. 2706-16.
291. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(2): p. 116-26.
292. Li, H. and B. Shi, *Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation*. *Cell Mol Immunol*, 2015. **12**(1): p. 24-30.
293. Holtick, U., et al., *Immature DC isolated after co-culture with PUVA-treated peripheral blood mononuclear cells downregulate graft-versus-host reactions in the human skin explant model*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013. **8**(4): p. 324-32.

294. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2018-28.
295. Robert, C., et al., *Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial*. Lancet, 2014. **384**(9948): p. 1109-17.
296. Singh, A.K., et al., *Fatal GvHD induced by PD-1 inhibitor pembrolizumab in a patient with Hodgkin's lymphoma*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(9): p. 1268-70.
297. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
298. Wu, G. and S.M. Morris, Jr., *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Biochem J, 1998. **336 (Pt 1)**: p. 1-17.
299. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
300. Katz, J.B., A.J. Muller, and G.C. Prendergast, *Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 206-21.
301. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
302. Hwu, P., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3596-9.
303. Merlin, E., et al., *Extracorporeal photochemotherapy induces arginase 1 in patients with graft versus host disease*. Transpl Immunol, 2011. **24**(2): p. 100-6.
304. Berger, C., et al., *Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4838-47.
305. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
306. Bruserud, O. and A.O. Kittang, *The chemokine system in experimental and clinical hematology*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **341**: p. 3-12.
307. Aoki, M., et al., *Decreased pro-inflammatory cytokines and increased CCR7 expression on T-lymphocyte subsets are predictive of response to extracorporeal photopheresis in patients with GvHD*. Br J Haematol, 2011. **154**(3): p. 409-13.
308. Dhawan, P. and A. Richmond, *Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 9-18.
309. Devalaraja, R.M., et al., *Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(2): p. 234-44.
310. Haghnegahdar, H., et al., *The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 53-62.
311. Owen, J.D., et al., *Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins*. Int J Cancer, 1997. **73**(1): p. 94-103.
312. Richardson, R.M., et al., *Role of the cytoplasmic tails of CXCR1 and CXCR2 in mediating leukocyte migration, activation, and regulation*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2904-11.
313. Taub, D.D., et al., *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
314. Lee, E.Y., Z.H. Lee, and Y.W. Song, *CXCL10 and autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(5): p. 379-83.
315. Hanaoka, R., et al., *A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(2): p. R74-81.
316. Narumi, S., et al., *Serum levels of ifn-inducible PROTEIN-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus*. Cytokine, 2000. **12**(10): p. 1561-5.
317. Sorensen, T.L., et al., *Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 807-15.

318. Kwon, B., et al., *Involvement of tumor necrosis factor receptor superfamily(TNFRSF) members in the pathogenesis of inflammatory diseases*. *Exp Mol Med*, 2003. **35**(1): p. 8-16.
319. Vinay, D.S. and B.S. Kwon, *Role of 4-1BB in immune responses*. *Semin Immunol*, 1998. **10**(6): p. 481-9.
320. Pollok, K.E., et al., *Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function*. *J Immunol*, 1993. **150**(3): p. 771-81.
321. Schwarz, H., J. Tuckwell, and M. Lotz, *A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family*. *Gene*, 1993. **134**(2): p. 295-8.
322. Kienzle, G. and J. von Kempis, *CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes*. *Int Immunol*, 2000. **12**(1): p. 73-82.
323. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 420-30.
324. Finnberg, N., A.J. Klein-Szanto, and W.S. El-Deiry, *TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(1): p. 111-23.
325. Baxevasis, C.N., et al., *Interleukin 1 beta synergises with interleukin 2 in the outgrowth of autologous tumour-reactive CD8+ effectors*. *Br J Cancer*, 1994. **70**(4): p. 625-30.
326. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. *Immunity*, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
327. Ghiringhelli, F., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors*. *Nat Med*, 2009. **15**(10): p. 1170-8.
328. Greenwalt, D.E., et al., *Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine*. *Blood*, 1992. **80**(5): p. 1105-15.
329. Tandon, N.N., et al., *Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36)*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(13): p. 7570-5.
330. Asch, A.S., et al., *Isolation of the thrombospondin membrane receptor*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(4): p. 1054-61.
331. Silverstein, R.L., et al., *Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(23): p. 16607-12.
332. Tandon, N.N., U. Kralisz, and G.A. Jamieson, *Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(13): p. 7576-83.
333. Yesner, L.M., et al., *Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(8): p. 1019-25.
334. Fadok, V.A., et al., *CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3)*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6250-7.
335. Bowen, M.A., et al., *Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand*. *J Exp Med*, 1995. **181**(6): p. 2213-20.
336. Weichert, W., et al., *ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(11): p. 1160-4.
337. Soiffer, R.J., et al., *Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T lymphocytes from donor bone marrow*. *J Clin Oncol*, 1992. **10**(7): p. 1191-200.
338. Chu, K., X. Niu, and L.T. Williams, *A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(25): p. 11894-8.
339. Elmetwali, T., L.S. Young, and D.H. Palmer, *Fas-associated factor (Faf1) is a novel CD40 interactor that regulates CD40-induced NF-kappaB activation via a negative feedback loop*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1213.
340. Bishop, D.T., et al., *Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(12): p. 894-903.

-
341. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
342. Serrano, M., et al., *Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4*. Science, 1995. **267**(5195): p. 249-52.
343. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. Cell, 1998. **92**(6): p. 725-34.
344. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. Cell, 1998. **92**(6): p. 713-23.
345. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
346. Cohen, I.R., et al., *T lymphocyte clones illuminate pathogenesis and affect therapy of experimental arthritis*. Arthritis Rheum, 1985. **28**(8): p. 841-5.
347. Perez, M.I., et al., *Inhibition of anti-skin allograft immunity induced by infusions with photoinactivated effector T lymphocytes--the congenic model*. Transplantation, 1991. **51**(6): p. 1283-9.
348. Rizzo, R., et al., *Increased production of soluble HLA-G molecules in stimulated peripheral blood mononuclear cells following extracorporeal photopheresis: is it a mechanism involved in the therapeutic effect of the procedure?* J Clin Apher, 2005. **20**(4): p. 222-4.
349. Boumpas, D.T., et al., *Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates*. Ann Intern Med, 1993. **119**(12): p. 1198-208.
350. Ayoub, S., M.J. Hickey, and E.F. Morand, *Mechanisms of disease: macrophage migration inhibitory factor in SLE, RA and atherosclerosis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. **4**(2): p. 98-105.
351. Lehmann, L.E., et al., *Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis*. Intensive Care Med, 2001. **27**(8): p. 1412-5.
352. Bozza, F.A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis*. Shock, 2004. **22**(4): p. 309-13.
353. Calandra, T., et al., *Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 164-70.
354. Stosic-Grujicic, S., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus*. J Cell Physiol, 2008. **215**(3): p. 665-75.
355. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
356. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
357. Volpe, E., et al., *A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 650-7.
358. Yang, L., et al., *IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells*. Nature, 2008. **454**(7202): p. 350-2.
359. Lemire, J.M., et al., *1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells*. J Clin Invest, 1984. **74**(2): p. 657-61.
360. Provvedini, D.M., et al., *1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production*. J Immunol, 1986. **136**(8): p. 2734-40.
361. Bhalla, A.K., E.P. Amento, and S.M. Krane, *Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production*. Cell Immunol, 1986. **98**(2): p. 311-22.
362. Muscettola, M. and G. Grasso, *Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on interferon gamma production in vitro*. Immunol Lett, 1988. **17**(2): p. 121-4.
-

363. Andjelkovic, Z., et al., *Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients*. Clin Exp Rheumatol, 1999. **17**(4): p. 453-6.
364. Imseis, R.E., et al., *Effect of calcitriol and pamidronate in multiple myeloma*. Am J Med Sci, 1999. **318**(1): p. 61-6.
365. Lemire, J.M., et al., *Prolongation of the survival of murine cardiac allografts by the vitamin D3 analogue 1,25-dihydroxy-delta 16-cholecalciferol*. Transplantation, 1992. **54**(4): p. 762-3.
366. Mahon, B.D., et al., *The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells*. J Cell Biochem, 2003. **89**(5): p. 922-32.
367. van Halteren, A.G., et al., *Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3)*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2119-25.
368. Penna, G. and L. Adorini, *1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2405-11.
369. Girardi, M., et al., *Transimmunization and the evolution of extracorporeal photochemotherapy*. Transfus Apher Sci, 2002. **26**(3): p. 181-90.
370. Wiese, F., et al., *Monocytes show immunoregulatory capacity on CD4(+) T cells in a human in-vitro model of extracorporeal photopheresis*. Clin Exp Immunol, 2018.

IV Abkürzungsverzeichnis

1,25-(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
8-MOP	8-Methoxypsoralen
ACD	Acid-Citrat-Dextrose
aGvHD	akute Spender-gegen-Empfänger Reaktion
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Englisch: <i>antigen presenting cell</i>)
Arg1	Arginase 1
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
cGvHD	chronische Spender-gegen-Empfänger Reaktion
CTCL	kutanes T-Zelllymphom (Englisch: <i>cutaneous T-cell lymphoma</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EAE	Allergische Enzephalomyelitis
ECP	Extracorporale Photophorese
et al.	und andere (Latein: <i>et alii</i>)
FCS	fötales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FoxP3	<i>forkhead-box-protein P3</i>
GATA3	<i>GATA-binding protein 3</i>
GvHD	Spender-gegen-Empfänger Reaktion (Englisch: <i>graft-versus-host disease</i>)
GvL-Effekt	Spender-gegen-Leukämie Effekt (Englisch: <i>graft-versus-leukemia effect</i>)
h	Stunde(n)
HCT	hämatopoetische Zelltransplantation (Englisch: <i>hematopoetic cell transplantation</i>)
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1α</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen – antigen D related</i>)
HNSCC	Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich (Englisch: <i>head and squamous cell carcinoma</i>)
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
iDC	unreife Dendritische Zelle (Englisch: <i>immature DC</i>)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (Englisch: <i>inducible nitric oxide</i>

	synthase)
iTregs	Induzierbare regulatorische T-Zellen
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
mDC	reife Dendritische Zelle (Englisch: <i>mature DC</i>)
MDSCs	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigene (Englisch: <i>major histocompatibility antigen</i>)
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
M-MDSCs	Monozytäre <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
nTregs	Natürliche regulatorische T-Zellen
PBMCs	Zellen des peripheren Blutes (Englisch: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-Ls	<i>programmed death ligands</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMN-MDSCs	Polymorphonukleäre <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
PMNs	Polymorphnukleäre Neutrophile
PpIX	Protoporphyrin IX
PRRs	<i>pathogen-recognition receptors</i>
PUVA	Behandlung mit Psoralen plus Ultraviolettlicht des langwelligen Bereichs A
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR γ t	<i>retinoid-related orphan receptor γt</i>
ROS	die reaktive Sauerstoffspezies (Englisch: <i>reactive oxygen species, ROS</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription 4</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	T-Zellrezeptors (Englisch: <i>T cell receptor</i>)
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th-Zellen	T-Helferzellen

V Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei Signale für die vollständige Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch APCs.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der <i>ex vivo</i> ECP-Behandlung.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung im Rahmen der <i>ex vivo</i> ECP.....	38
Abbildung 4: Die Probenaufbereitung bei der <i>in vitro</i> ECP.....	39
Abbildung 5: Übersicht des Versuchsablaufs zur Untersuchung der Bedeutung des Zellkontakts im <i>in vitro</i> ECP-Modell.....	41
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Makrophagengenerierung.....	49
Abbildung 7: Viabilität von CD3+CD4+ T-Zellen in Co-Kulturen aus ECP-behandelten Monozyten und/oder CD4+ T-Zellen.....	61
Abbildung 8: Proliferation von CD3+CD4+ T-Zellen im <i>in vitro</i> ECP-Modell.....	63
Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Tregs, pro- und antiinflammatorischen T-Zelltypen nach Co-Kultur mit ECP-behandelten Monozyten.....	64
Abbildung 10: Veränderung der T-Zellproliferation und der T-Zelltypenanteile in Abhängigkeit vom Zellkontakt oder von sekretierten Zytokinen.....	67
Abbildung 11: Sekretionsprofil der Zytokine in Zellkulturüberständen von Monozyten im <i>in vitro</i> ECP-Modell.....	69
Abbildung 12: Zytokinsekretion der Co-Kulturen in Zellkulturüberstände im <i>in vitro</i> ECP-Modell.....	71
Abbildung 13: Analyse der <i>in vitro</i> ECP-behandelten Monozyten hinsichtlich Überleben und Oberflächenmarker.....	74
Abbildung 14: Apoptosestadien der Monozytenfraktion mit und ohne <i>in vitro</i> ECP-Behandlung.....	76
Abbildung 15: Titration des Verhältnisses von eingesetzten Monozyten zu CD4+ T-Zellen.....	77
Abbildung 16: Einfluss der <i>in vitro</i> ECP-Behandlung von Monozyten auf die Differenzierung.....	79
Abbildung 17: Einfluss der <i>in vitro</i> ECP-Behandlung auf die Genexpression von Makrophagen spezifischen Genen.....	80
Abbildung 18: Änderung der T-Zellproliferation nach Co-Kultur mit <i>in vitro</i> ECP-behandelten Makrophagen.....	81
Abbildung 19: ECP-induzierte Veränderungen der Anteile an PD-L1+ bzw. PD-L2+ Monozyten nach <i>in vitro</i> ECP und der PD-L1+ bzw. PD-L2+ T-Zellen im <i>in vitro</i> ECP-Modell.....	84
Abbildung 20: Veränderung der T-Zellproliferation nach Zugabe der blockierenden Antikörper Pembrolizumab, anti-PD-L1 und anti-PD-L2 Antikörper.....	85
Abbildung 21: Einfluss der <i>in vitro</i> ECP-Behandlung von Monozyten auf deren Expression von Effektorenzymen.....	87
Abbildung 22: Abdeckung der differentiell regulierten Gene der Monozyten im Vergleich zwischen 1 Tag und 2 Tage nach ECP.....	89
Abbildung 23: Dominierende Kategorien der an Tag 1 und Tag 2 nach <i>in vitro</i> ECP hochregulierten Gene.....	90

Abbildung 24: Vorherrschende Kategorien der an Tag 1 und Tag 2 nach ECP herunterregulierten Gene 93

Abbildung 25: Änderung der Proliferationsfähigkeit von T-Zellen in Co-Kultur mit *ex vivo* im Vergleich zu *in vitro* ECP-behandelten Monozyten isoliert aus Patientenproben. 96

Abbildung 26: Änderungen der T-Zelltypenanteile in Co-Kulturen von *ex vivo* bzw. *in vitro* ECP-behandelten Monozyten von ECP-Patienten mit CD4+ T-Zellen. 98

Abbildung 27: Einfluss der *in vitro* ECP-Behandlung auf die Genexpression von MIF..... 100

Abbildung 28: Veränderung der prozentualen Anteile proliferierender T-Zellen in Ansätzen mit und ohne $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ Stimulation der Monozyten im *in vitro* ECP-Modell. 101

Abbildung 29: Prozentualer Anteil pro- und antiinflammatorischer T-Zelltypen nach Co-Kultur mit Vitamin D3 stimulierten Monozyten. 103

VI Formelverzeichnis

Formel 1: Bestimmung der Zellkonzentration.36

Formel 2: Berechnung des UVADEX[®]-Volumens.....38

Formel 3: Beer-Lambert Gleichung.....51

VII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationen der ECP und Kategorisierung.	21
Tabelle 2: Übersicht über die Zielsetzung und überprüften Fragestellungen.	24
Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.	25
Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Zellkultur.	27
Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.	27
Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe.	28
Tabelle 7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.	28
Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits.	29
Tabelle 9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Medien und deren Zusammensetzung.	30
Tabelle 10: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	31
Tabelle 11: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen.	31
Tabelle 12: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software.	32
Tabelle 13: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.	33
Tabelle 14: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vitamine.	33
Tabelle 15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine und Chemokine.	34
Tabelle 16: Liste der Firmensitze der in dieser Arbeit verwendeten Hersteller.	34
Tabelle 17: Phänotypisierung der T-Zellen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten.	45
Tabelle 18: Charakterisierung der T-Zelltypen nach Co-Kultur mit ECP un-/behandelten Monozyten.	45
Tabelle 19: Phasen der Apoptose.	46
Tabelle 20: Monozytencharakterisierung mittels Durchflusszytometrie.	47
Tabelle 21: Pipettierschema für den GoScript Reaktionsmix.	53
Tabelle 22: Programm für die reverse Transkription.	54
Tabelle 23: Pipettierschema für den GoScript qPCR Reaktionsmix.	55
Tabelle 24: Programm für qRT-PCR mit SOCS-1 und SOCS-3 Primerpaaren.	55
Tabelle 25: Programm für qRT-PCR mit MIF Primerpaar.	55
Tabelle 26: Patienten-Charakteristika der an der Teilnehmer an der ECP-Studie.	59
Tabelle 27: Übersicht der hochregulierten Gene der für interessant erachteten Kategorien nach ECP-Behandlung der Monozyten.	91
Tabelle 28: Signifikant herunterregulierte Gene der für weitere Analysen potentiell interessanten Kategorien nach <i>in vitro</i> ECP.	94
Tabelle 29: Potentielle Zuordnung der untersuchten ECP-induzierten Effekte behandelte Monozyten auf T-Zellen zu anti- und proinflammatorischen Effekten.	111
Tabelle 30: Potentielle Zuordnung der untersuchten ECP-induzierten Effekte auf behandelte Monozyten zu anti- und proinflammatorischen Effekten.	118

VIII Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zur Immunregulation durch ECP-behandelte Monozyten in einem *in vitro* Modell“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen (alternativ: Zitate) als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Urbach, den _____

Ort, Datum

Franziska Wiese

IX Beteiligung

Die Daten in der vorliegenden Dissertation entstammen bis auf folgende Ausnahmen meiner alleinigen experimentellen Arbeit:

Frau Mareike Volz führte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät im Fach Biochemie unter meiner inhaltlichen und praktischen Anleitung Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses einer *in vitro* Kombinationstherapie von Vitamin D3 stimulierten, ECP-behandelten Monozyten auf die Proliferation und T-Zelltypenanteile von co-kultivierten T-Zellen durch. Außerdem half sie bei der Bearbeitung von vier Patientenproben.

Als Technische Assistentin half Frau Insa Hirschberg unter meiner inhaltlichen und praktischen Anleitung bei den Messungen der Zytokinexpression von ECP un-/behandelten Monozyten alleine und in Co-Kultur mit CD4+ T-Zellen. Des Weiteren half sie bei der Bearbeitung von einer Patientenprobe.

In enger Absprache mit Herrn Dr. rer. nat. Christian Grumaz erfolgte die Herstellung der Transkriptombibliotheken durch die Arbeitsgruppe „Funktionelle Genomanalysen“ des Fraunhofer IGB, Stuttgart. Ebenso wurden von der Arbeitsgruppe die Sequenzierung sowie initiale Prozessierungsschritte der Daten für die nachfolgenden Analysen durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. med. Ursula Holzer und Herrn Prof. Dr. Dominik Hartl durchgeführt.

X Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation

Wiese, F., Reinhardt-Heller, K., Volz, M., Gille, C., Köstlin, N., Billing, H., Handgretinger, R., Holzer, U., Monocytes show immunoregulatory capacity on CD4(+) T cells in a human *in-vitro* model of extracorporeal photopheresis. Clin Exp Immunol, 2018 [370].

Hierzu gehören Daten der Abbildungen 8, 9, 10, 13, 15, 16, 19, 20, 25 und 26.

Die Zustimmung zur Verwendung der Daten in der hier vorliegenden Dissertation erfolgte durch den Verlag John Wiley and Sons unter der Lizenznummer 4494181409105.

Posterpräsentationen

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 12. bis 15. September 2017, Erlangen.

Franziska Wiese, Katharina Reinhardt, Ursula Holzer. Effects of extracorporeal photopheresis on monocytes and lymphocytes in an *in vitro* assay.

Kongress Novel Concepts in Innate Immunology, 27. bis 29. März 2017, Tübingen.

Franziska Wiese, Katharina Reinhardt, Ursula Holzer. Effects of extracorporeal photopheresis on monocytes and lymphocytes in an *in vitro* assay.

XI Danksagung

Ich möchte mich zunächst ganz herzlich bei *Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger* bedanken, der mir mit seiner wissenschaftlichen Begleitung sowie der Bereitstellung der Labore und des Arbeitsplatzes die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen durchführen zu können.

Frau PD Dr. Ursula Holzer danke ich herzlichst für die Chance, an diesem interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Durch ihre freundliche Art und die vielen offenen Diskussionen herrschte ein freies und motiviertes Arbeitsklima und ich möchte mich für die Möglichkeit bedanken, mich wissenschaftlich und persönlich weiterentwickeln zu können. Außerdem möchte ich mich für die Begutachtung der Arbeit bedanken.

Herzlichen Dank an *Herrn Prof. Dr. Dominik Hartl* für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei der *Jürgen-Manchot-Stiftung* bedanken, die diese Arbeit durch die Vergabe des Doktoranden-Stipendiums und finanzielle Förderung erst ermöglicht hat.

Ein weiterer Dank geht an *Herrn Dr. Christian Grumaz* für die erstklassige Zusammenarbeit bei den Transkriptomanalysen.

Allen Mitarbeiterinnen der Dialysestation der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen danke ich herzlichst für die tatkräftige Unterstützung bei der Probengewinnung von ECP-Patienten. Vielen Dank an *Melanie, Diana, Daniela, Annette* und *Andrea*.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Blutspendern bedanken, die ihre Blutspende auch für die Wissenschaft freigeben, sowie der Transfusionsmedizin Tübingen für ihre wöchentliche Unterstützung bei der *Buffycoat*-Bestellung und -Verteilung.

Ein großer Dank geht auch an alle aktuelle wie ehemalige Mitarbeiter aus den unterschiedlichen Laboren der Kinderklinik, für eure Ratschläge, den Wissensaustausch und die äußerst nette Atmosphäre bei der Arbeit und Aktivitäten abseits davon: *Dr. Katharina Reinhardt-Heller, Dr. Karla Baltner, Insa Hirschberg, Mareike Volz, Sarah Bühler, Dr. Darina Siegmund, Matias Stagno, Jennifer Rottenberger, Andres Lamsfus Calle, Alberto Daniel Moreno, Dr. Karin Cabanillas-Stanchi, Caroline Baden, Katja Kühn, Ann-Christin Krahl, Dr. Marina Pal* und allen anderen, die hier nicht namentlich genannt sind.

Ganz besonders möchte ich mich bei *Jenny Bauer* und *Lisa Schwab* bedanken, die mich nicht nur als Kolleginnen durch die Promotion begleitet haben. Vielen Dank für eure Freundschaft, euer offenes Ohr und eure Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und allen Freunden, die meinen Weg begleitet und mich während der gesamten Zeit stets unterstützt haben. Vielen Dank für Alles, *Lars* und *Monika*.