Induktion von Transplantationstoleranz mittels CAR-T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marieke Alina Sander

aus

Itzehoe

2025

Betreuer / Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Michael Boettcher
Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Jun Oh

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jun Oh
Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Katja Weisel
Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Boris Fehse

Datum der mündlichen Prüfung: 07.07.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung 1

2. Einleitung 2
2.1 Komplikationen nach Transplantation und Immunsuppression 2
2.2 Immunmodulation zur Transplantattoleranz 4
2.3 Entwicklung der CAR-T-Zelltherapie 6
2.4 CAR-T-Zellen im Transplantationskontext 9

3. Material und Methoden 11
3.1 Verbrauchsmaterialien 11
3.2 Chemikalien 11
3.3 Antikörper und Isotypkontrollen 12
3.4 Geräte und Softwareprodukte 14
3.5 *In-vitro*-Versuche 15
3.5.1 Gewinnung humaner PBMC 15
3.5.2 Zellkultur 15
3.5.3 Bestrahlung der PBMC 16
3.5.4 Priming alloreaktiver T-Zellen 16
3.5.5 Reexposition geprimter T-Zellen 18
3.5.6 Zytokinassay 19
3.5.7 Durchflusszytometrie 19
3.6 *In-vivo*-Versuche 22
3.6.1 Versuchstiere 22
3.6.2 Gewinnung von humanem Hautgewebe 23
3.6.3 Xenogene Hauttransplantation 23
3.6.4 Herstellung und Aufbau der CAR-T-Zellen 24
3.6.5 Etablierung des humanisierten Mausmodells 25
3.6.6 Therapeutische Intervention der Immunreaktion 26
3.6.7 Gewinnung muriner Proben 27
3.7 Statistik 27

4. Ergebnisse 28
4.1. *In-vitro*-Versuche 28
4.1.1 Bestrahlung von PBMC 28

4.1.2 Priming alloreaktiver T-Zellen 29
4.1.3 Reexposition geprimter T-Zellen 31
4.1.4 Zytokinassay 34
4.2. *In-vivo*-Versuche 34
4.2.1 Scoring der Versuchstiere 34
4.2.2 Analyse des Mausblutes 35
4.2.3 Histologische Auswertung der Transplantate 40

5. Diskussion 45
5.1 *In-vitro*-Ergebnisse 45
5.1.1 Bestrahlung von Stimulationszellen 45
5.1.2 Priming alloreaktiver T-Zellen 47
5.1.3 Reexposition geprimter T-Zellen 49
5.1.4 Zytokinprofile nach Restimulation 51
5.2 *In-vivo*-Ergebnisse 53
5.2.1 Analyse des Mausblutes 53
5.2.2. Histologische Ergebnisse 56
5.3 Stärken, Limitationen und Ausblick der Studie 60

6. Zusammenfassung 65

7. Literaturverzeichnis 66

8. Abkürzungsverzeichnis 81

9. Abbildungsverzeichnis 83

10. Tabellenverzeichnis 85

11. Erklärung des Eigenanteils 86

12. Eidesstattliche Erklärung 87

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Transplantatabstoßungen stellen nach wie vor die größte Hürde für den Langzeiterfolg solider Organtransplantationen dar (Boardman *et al.* 2017). Zur Prävention einer akuten oder chronischen Abstoßung werden Immunsuppressiva eingesetzt. Diese Therapie geht mit erheblichen Nebenwirkungen einher und gewährleistet langfristig keine ausreichende Kontrolle der allogenen Immunantwort und damit der chronischen Abstoßungsreaktion (Kant *et al.* 2009). Daher nimmt die gezielte Induktion einer Transplantationstoleranz eine Schlüsselrolle in der aktuellen Forschung ein (Wood *et al.* 2012).

Während sich chimäre Antigenrezeptor-(CAR)-T-Zellen als innovativer und effektiver Therapieansatz in der Onkologie etabliert haben (Maude *et al.* 2018), wird ihr Potenzial nun auch zur gezielten Modulation des Immunsystems im Transplantationskontext untersucht (Vaikunthanathan *et al.* 2017). Insbesondere regulatorische CAR-T-Zellen zeigten in präklinischen Modellen vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf die Induktion transplantationsspezifischer Toleranz. Ihr Einsatz ist jedoch aufgrund der komplexen Herstellung und begrenzter Anwendbarkeit derzeit eingeschränkt (Noyan *et al.* 2017). Als alternativer Ansatz wird die gezielte Depletion alloreaktiver αβ-T-Zellen untersucht. Die Entfernung von αβ-T-Zellen kann eine tolerogene Immunlage fördern (Abdelhakim *et al.* 2017), während gleichzeitig andere T-Zellsubpopulationen, wie γδ-T-Zellen, ihre antiinfektiöse und immunregulatorische Funktion aufrechterhalten (Handgretinger und Schilbach 2018).

Die vorliegende Arbeit untersucht ein CAR-basiertes Therapiekonzept, bei dem αβ-CAR-T-Zellen der dritten Generation gezielt den αβ-T-Zellrezeptor (TCR) erkennen und aufgrund eines genetischen Knockouts selbst TCR-defizient sind. Dieses duale Design soll die selektive Elimination alloreaktiver T-Zellen ermöglichen, ohne dabei eine eigene Alloreaktivität oder Fratricide-Effekte zu entfalten (Torikai *et al.* 2012). In einem xenogenen Hauttransplantationsmodell mit immundefizienten Mäusen wird analysiert, ob dieser Ansatz die durch geprimte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) ausgelöste Abstoßungsreaktion modulieren kann. Ziel ist es, erste präklinische Daten zur gezielten αβ-T-Zelldepletion zu generieren, die als Grundlage für zukünftige Strategien einer spezifischen, zellbasierten Immunsuppression dienen können.

2. Einleitung

2.1 Komplikationen nach Transplantation und Immunsuppression

Die Transplantation solider Organe gilt als einer der bedeutendsten Fortschritte der modernen Medizin. Sie ermöglicht Patient:innen mit terminalem Organversagen nicht nur eine Verlängerung der Lebenszeit, sondern auch eine Verbesserung der Lebensqualität. Darüber hinaus bieten hämatopoetische Stammzelltransplantationen (HSZT) bei hämatologischen Erkrankungen, malignen Neoplasien, Immundefekten oder angeborenen Stoffwechselstörungen eine potenziell kurative Therapieoption (McDonald-Hyman *et al.* 2015). Die Zahl der weltweit durchgeführten Transplantationen ist in den vergangenen Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen. Derzeit erfolgen jährlich über 100 000 Organtransplantationen sowie mehr als 90 000 HSZT (Atsuta *et al.* 2024, Symeou *et al.* 2025).

Der therapeutische Erfolg von Transplantationen wird von immunologischen Abwehrreaktionen limitiert. Dabei stellen insbesondere allogene Immunantworten gegenüber soliden Organtransplantaten ein zentrales Hindernis dar, das akute und chronische Abstoßungsreaktionen auslösen kann (Boardman *et al.* 2017). Obwohl es in den letzten Jahren Fortschritte in der chirurgischen Technik und in der perioperativen Versorgung gab, bleibt die Morbidität und Mortalität nach Transplantationen durch Transplantatabstoßungen hoch. Ihre Inzidenz variiert je nach Organ und ist ein entscheidender Risikofaktor für den langfristigen Verlust von Transplantaten (McDonald-Hyman *et al.* 2015).

Klassischerweise wird zwischen drei Formen der Abstoßungsreaktion unterschieden: hyperakut, akut und chronisch. Die hyperakute Abstoßung entsteht, wenn bereits vorhandene Anti-Humanes-Leukozytenantigen-(HLA)-Antikörper in der empfangenden Person auf das eingebrachte Organ reagieren. Durch Aktivierung des Komplementsystems können dabei endotheliale Schäden und Thrombosen ausgelöst werden, was zum sofortigen Transplantatversagen führt. Prätransplantative serologische Untersuchungen, insbesondere Kreuzproben, verhindern diese Form der Abstoßung heutzutage nahezu vollständig (Nankivell und Alexander 2010).

Nach einer Transplantation erkennt das Immunsystem im Verlauf der Immunreaktion über die beiden Hauptwege der direkten und indirekten Antigenpräsentation Alloantigene der spendenden Person, die den Verlauf der

Immunantwort entscheiden (Sagoo *et al.* 2011). Die akute Abstoßung entsteht in den ersten Wochen bis Monaten postoperativ und wird über den direkten Weg der Antigenpräsentation vermittelt. Dabei greifen alloreaktive T-Zellen das Transplantat entweder direkt durch zytotoxische Mechanismen an oder aktivieren das angeborene Immunsystem sekundär (Issa *et al.* 2010b). Zudem kann es zu einer Aktivierung von B-Zellen führen, was zur Produktion von Anti-Spender-Antikörpern, sogenannten Alloantikörpern, führt. Diese Antikörper spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung chronischer Abstoßungsreaktionen, die sich durch persistierende Immunaktivierungen und progrediente Transplantatschädigungen auszeichnen (Kelishadi *et al.* 2010).

Zur Prävention und Therapie der Abstoßungsreaktionen werden Immunsuppressiva eingesetzt, die je nach Wirkstoffklasse die Zytokinproduktion, Zytokinwirkung, Zellaktivierung oder DNA-Synthese der Lymphozyten hemmen. Allerdings haben diese Medikamente ein großes Spektrum an Nebenwirkungen, die bei den Patient:innen auftreten können. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen opportunistische Infektionen, sekundäre Malignome, Organschäden, sowie metabolische Komplikationen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und kardiovaskuläre Erkrankungen. Außerdem können pharmakologische Wechselwirkungen sowohl den Stoffwechsel von Transplantatempfänger:innen als auch die Wirksamkeit vieler Immunsuppressiva beeinflussen (Kant *et al.* 2009).

Eine weitere schwerwiegende immunologische Komplikation nach Transplantationen stellt die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) dar, die insbesondere nach allogener HSZT mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher geht. Die akute GvHD entsteht infolge von Gewebeschädigungen durch Konditionierung oder Infektionen. Diese Schädigungen aktivieren Spender-T-Zellen, die entweder das Zielgewebe direkt angreifen oder proinflammatorische Zytokine freisetzen. Klinisch äußert sich die akute GvHD klassischerweise in Form eines makulopapulösen Hautausschlags, einer Hyperbilirubinämie mit Ikterus und gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe. Das therapeutische Spektrum reicht je nach Schweregrad von topischen Kortikosteroiden bis hin zur systemischen immunsuppressiven Therapie. Zur Prophylaxe hat sich eine Kombinationstherapie

aus Calcineurininhibitoren mit Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) etabliert (Holtan *et al.* 2014).
Die chronische GvHD unterscheidet sich immunbiologisch von der akuten Form durch eine persistierende B-Zellaktivierung, einen Mangel an regulatorischen T-Zellen und fortschreitende Fibroseprozesse. Typischerweise sind mehrere Organsysteme betroffen, am häufigsten Haut, Augen und Mund. Die Standardtherapie und Prophylaxe beruhen derzeit ebenfalls auf unspezifischer Immunsuppression, unter anderem mit Kortikosteroiden, Calcineurininhibitoren, mTOR-Inhibitoren, MMF oder Antithymozytenglobulin (ATG) (Martini *et al.* 2022).
Akute Abstoßungsreaktionen konnten in den letzten Jahren sukzessiv besser kontrolliert werden, jedoch konnte die Inzidenz von späten Transplantatverlust nicht signifikant reduziert werden (Halloran 2004). Die chronische Abstoßungsreaktion bleibt nach wie vor eine der Hauptursachen des langfristigen Transplantatversagens und führt häufig zu dem Bedarf einer Re-Transplantation, was den Mangel an verfügbaren Organen zusätzlich verschärft (Issa *et al.* 2010b, Sagoo *et al.* 2011). Selbst bei funktionierendem Transplantat bleibt die Mortalität der Transplantatempfänger:innen hoch. Dies lässt sich vor allem durch kardiovaskuläre und andere Langzeitkomplikationen der Immunsuppression erklären (Halloran 2004). Die aufgezeigten Limitationen der derzeitigen Immunsuppression verdeutlichen die Notwendigkeit neuer, spezifischer Therapieansätze, um die Langzeitprognose von Transplantatempfänger:innen nachhaltig zu verbessern.

2.2 Immunmodulation zur Transplantattoleranz

Das Verständnis der immunologischen Prozesse, die der Transplantatabstoßung und GvHD zugrunde liegen, hat in den letzten Jahren den Forschungsschwerpunkt verstärkt auf Therapien zur Modulation des Immunsystems verschoben. Dabei ist das Ziel solcher neuartigen Ansätze, eine spenderspezifische Transplantationstoleranz unter Erhalt der physiologischen Immunfunktion zu erreichen (Wood *et al.* 2012). Eine immunologische Toleranz umfasst dabei sowohl frühe Induktionsmechanismen, die eine initiale Transplantatakzeptanz ermöglichen, als auch Mechanismen der Erhaltungsphase, die einen stabilen immunregulatorischen Zustand aufrechterhalten. Durch die gezielte Depletion alloreaktiver T-Zellen sowie die Induktion eines hämatopoetischen Chimärismus mittels kombinierter Knochenmark- und Organtransplantation von derselben

spendenden Person konnten erste Erfolge im Hinblick auf die Entwicklung einer immunologischen Toleranz erzielt werden (Li *et al.* 2001).

Als Erfolg versprechender Ansatz zur Induktion antigenspezifischer Toleranz gelten zudem regulatorische T-Zellen (Tregs), da sie alloreaktive Immunantworten unterdrücken können, ohne das gesamte Immunsystem zu kompromittieren. Präklinische und erste klinische Studien zeigen, dass Tregs insbesondere zur Prävention und Therapie einer GvHD nach HSZT sicher und wirksam sind (Brunstein *et al.* 2011, Di Ianni *et al.* 2011, Trzonkowski *et al.* 2013). Während polyklonale Tregs eine breite, unspezifische Immunsuppression vermitteln, können antigenspezifische Tregs nach Organtransplantation gezielter alloreaktive Immunreaktionen unterdrücken (Issa *et al.* 2010b). Herausforderungen bei der klinischen Anwendbarkeit der Tregs bestehen vor allem in den komplexen technischen Anforderungen der Herstellung und den hohen Produktionskosten sowie der Anwendbarkeit patienteneigener Zellen, der Auswahl geeigneter Subpopulationen und der Herstellung hochreiner, funktionell stabiler Zellpräparate (Ferreira *et al.* 2019).

Neben den Tregs rücken auch andere T-Zellsubpopulationen in den Fokus. Periphere T-Zellen im menschlichen Blut setzen sich zu etwa 95 % aus αβ-T-Zellen zusammen. Diese werden abhängig vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) aktiviert und spielen damit eine Schüsselrolle in der adaptiven Immunantwort. Sie sind maßgeblich an der Vermittlung von Transplantatabstoßungen und der Entstehung der GvHD beteiligt (Abdelhakim *et al.* 2017). Im Gegensatz dazu machen γδ-T-Zellen etwa 5 % der peripheren T-Zellen aus. Sie lassen sich über alternative Signalwege wie natürliche Killerzell-Rezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren aktivieren. Sie sind nicht alloreaktiv und besitzen wichtige immunregulatorische, antitumorale und antiinfektiöse Eigenschaften (Bonneville *et al.* 2010, Handgretinger und Schilbach 2018).

Aus diesen funktionellen Unterschieden lassen sich neue therapeutische Ansätze ableiten, wie die gezielte Depletion von αβ-T-Zellen im Rahmen haploidentischer HSZT. Da αβ-T-Zellen als Hauptverursacher der GvHD gelten, ermöglicht ihre selektive Entfernung eine Transplantation ohne pharmakologische Prophylaxe, während die immunmodulatorischen und antileukämischen Funktionen von γδ-T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erhalten bleiben. Klinische Daten und laufende Studien zeigen, dass die Depletion von αβ-T-Zellen einen

aussichtsreichen Ansatz zur Überwindung von HLA-Disparitäten bei haploidentischen wie auch HLA-kompatiblen HSZT darstellt. Vergleichende Untersuchungen zu alternativen Verfahren sowie zur therapeutischen Rolle der γδ-T-Zellen stehen jedoch noch aus. Die Kombination aus αβ-T-Zelldepletion und γδ-T-Zellerhalt eröffnet damit einen immuntherapeutischen Ansatz, der das Gleichgewicht zwischen Toleranz, Infektionskontrolle und Tumorabwehr neu definieren könnte (Handgretinger und Schilbach 2018).

Darüber hinaus weisen insbesondere γδ-T-Zellen der Vδ1-Subpopulation das Potenzial auf, antitumorale Effekte auszulösen. Aktuelle Studien prüfen sowohl die *Ex-vivo*-Expansion (Chargui *et al.* 2010, Kondo *et al.* 2008) als auch die *In-vivo*-Aktivierung dieser Zellen (Kunzmann *et al.* 2000) als Therapieansätze zur Behandlung verschiedener Tumorentitäten.

Neben T-Zellen werden auch andere Immunzelltypen wie B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen zunehmend erforscht, die ebenfalls zur Transplantatabstoßung und -toleranz beitragen können (Li 2010). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der Entwicklung zellbasierter Strategien zur gezielten Modifikation von Immunzellen. Weiterentwicklungen der Therapie mit T-Zellen umfassen auch die CAR-T-Zelltherapie, die in der Onkologie bereits erfolgreich etabliert wurde und deren Prinzipien zunehmend auf neue Anwendungsfelder übertragen werden.

2.3 Entwicklung der CAR-T-Zelltherapie

Neben natürlichen immunregulatorischen Zellpopulationen rücken auch gentechnisch veränderte Immunzellen in den Fokus translationaler Forschung. Dabei stellt die Therapie mit CAR-T-Zellen einen bedeutenden Fortschritt dar. CAR-T-Zellen wurden zunächst vor allem in der modernen Immunonkologie eingesetzt und bieten eine Behandlungsoption für Patient:innen mit refraktären hämatologischen Malignomen sowie zunehmend auch mit soliden Tumoren (Yeku und Brentjens 2016). Bei dieser Therapieform werden autologe oder allogene T-Zellen so modifiziert, dass sie synthetische chimäre Antigenrezeptoren exprimieren. Diese bestehen aus einer extrazellulären, antigenbindenden Einzelketten-Variablenfragment-(scFv)-Domäne, einer Transmembranregion und intrazellulären Signaldomänen, welche die T-Zell-Aktivierung nach Antigenerkennung ermöglichen (Renuka *et al.* 2024). Die Bindung des CAR an ein Zielantigen auf der Tumorzelloberfläche löst eine Immunantwort aus, die die

Tumorzellen durch Zytokinfreisetzung und direkte Zytotoxizität angreift, sowie zur Proliferation der CAR-T-Zellen führt (Chen *et al.* 2023). Klinisch hat sich die CAR-T-Zelltherapie vor allem mit dem Zielantigen Cluster of Differentiation-(CD)-19 bewährt. Erste Zulassungen erfolgten für rezidivierte oder refraktäre diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (Neelapu *et al.* 2017) sowie für die akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindes- und Jugendalter. Selbst bei zuvor therapieresistenten Verläufen konnten so hohe Raten kompletter Remission erreicht werden (Maude *et al.* 2018). Seit 2017 wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika insgesamt sechs CAR-T-Zellprodukte von der Food and Drug Administration für die Therapie hämatologischer Malignome zugelassen *(Chen et al.* 2023).

Der Erfolg der CAR-T-Zelltherapie beruht auf ihrer zielgerichteten Wirkung, der Fähigkeit zur antigenspezifischen Zytotoxizität, sowie einem potenziellen Langzeiteffekt durch persistierende CAR-T-Zellen (June und Sadelain 2018). Ihre Anwendung ist jedoch durch einige Herausforderungen eingeschränkt. Dazu zählen Faktoren, die CAR-T-Zellen selbst betreffen, wie eine unzureichende Expansion und Persistenz, sowie äußerliche limitierende Faktoren wie die tumorinduzierte Immunsuppression in der Mikroumgebung der Zieltumore (Lin *et al.* 2021).

Zu den häufig beobachteten Nebenwirkungen der CAR-T-Zelltherapie zählen das Zytokinfreisetzungssyndrom (CRS), disseminierte intravasale Koagulopathien, das Vascular-Leak-Syndrom sowie neurotoxische Komplikationen durch erhöhte Zytokinspiegel im zentralen Nervensystem infolge einer veränderten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Chen *et al.* 2023). Weitere Einschränkungen betreffen die hohen Kosten und den arbeitsintensiven Herstellungsprozess der Zellen. Zudem leiden viele Patient:innen durch wiederholte Chemotherapien an therapieinduzierter Lymphozytopenie, und auch angeborene Immundefekte können zu funktionell eingeschränkten T-Zellen führen, die für die CAR-T-Zellherstellung ungeeignet sind (Lin *et al.* 2021).

Um diese Limitationen zu überwinden, wurden CAR-T-Zellen der zweiten und dritten Generation entwickelt. Diese enthalten eine oder zwei zusätzliche kostimulatorische Signaldomänen, wie CD28 und 4-1BB, die der intrazellulären Region hinzugefügt werden. Dadurch wird bei CAR-T-Zellen der zweiten Generation die Expansion und T-Zell-Aktivierung verbessert (Chen *et al.* 2023). CAR-T-Zellen der dritten

Generation steigern durch eine zweite kostimulatorische Domäne ihre Persistenz und Effektorfunktionen (Kong *et al.* 2025).

CAR-T-Zellen der vierten Generation zeichnen sich durch folgende zusätzliche Eigenschaften aus: Ein- und Ausschalter, Suizidgene oder Moleküle zur Verbesserung der T-Zellfunktion, Proliferation oder Resistenz gegen Seneszenz (Zhao *et al.* 2018). Zu dieser Kategorie gehören auch „Armored" CAR-T-Zellen (Yeku und Brentjens 2016) und „T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing" (TRUCK) (Renuka *et al.* 2024). Beide Konzepte kombinieren tumorspezifische Antigenerkennung mit der Freisetzung immunmodulierender Zytokine, unterscheiden sich jedoch im Aktivierungsmechanismus. „Armored" CAR-T-Zellen entstehen aus CAR-T-Zellen der zweiten oder dritten Generation und produzieren unabhängig vom Antigenkontakt konstitutiv Zytokine oder Liganden wie Interleukin-(IL)-12 oder CD40L, um Zellinfiltration, Persistenz oder Resistenz zu steigern (Yeku und Brentjens 2016). TRUCK hingegen sezernieren ihre Zytokine erst nach Antigenbindung, wodurch systemische Nebenwirkungen minimiert und die Immunstimulation lokal begrenzt werden sollen (Chen *et al.* 2023, Renuka *et al.* 2024).

Eine weitere Innovation stellt die fünfte Generation von CAR-T-Zellen dar, die universell einsetzbar sein soll. Durch die gezielte Modifikation allogener T-Zellen von gesunden Spender:innen werden entweder die HLA-, die TCR-Moleküle oder beide ausgeschaltet. Damit sollen Immunreaktionen verhindert und universell verfügbare CAR-T-Zellen geschaffen werden, die unabhängig von einzelnen Patient:innen einsetzbar und schneller verfügbar sind sowie kostengünstiger produziert werden können (Kong *et al.* 2025). Eine Studie konnte bereits zeigen, dass durch den Knockout des endogenen αβ-TCR die Entstehung einer GvHD ohne Beeinträchtigung der CAR-abhängigen Effektorfunktionen verhindert werden kann (Torikai *et al.* 2012).

Insgesamt bieten diese Weiterentwicklungen das Potenzial, bisherige Einschränkungen wie Immunogenität, begrenzte Verfügbarkeit, komplexe Herstellungsprozesse und unerwünschte Nebenwirkungen zu überwinden und so eine wirksame, sichere und breitere Anwendung der CAR-T-Zelltherapie in der onkologischen Behandlung zu ermöglichen (Chen *et al.* 2023). Die bisherigen Erfolge der CAR-T-Zelltherapie in der Onkologie zeigen, dass gentechnisch

veränderte T-Zellen hochspezifische und effektive Immunantworten vermitteln können. Vor diesem Hintergrund sind neue Anwendungsgebiete jenseits der Tumortherapie, insbesondere in der Immunologie, zunehmend im Interesse der Forschung.

2.4 CAR-T-Zellen im Transplantationskontext

In der Transplantationsmedizin stellt die gezielte Induktion immunologischer Toleranz eine der größten Herausforderungen dar. Neben der onkologischen Anwendung rückt das Potenzial von CAR-T-Zellen zur Modulation immunologischer Prozesse bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen und im Transplantationskontext in den Fokus. Gerade hier ist die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Immunaktivierung und -toleranz von entscheidender Bedeutung (June und Sadelain 2018). Das zentrale Ziel besteht darin, eine Umgebung zu schaffen, die eine langfristige Transplantatakzeptanz ermöglicht, ohne die physiologische Immunüberwachung einzuschränken (Sawitzki *et al.* 2020). Hierfür konnten immunologische Signaturen und klinische Parameter als Marker für das Entstehen operationeller Toleranz identifiziert werden, was die Entwicklung gezielter Toleranzprodukte zukünftig erleichtern könnte (Vaikunthanathan *et al.* 2017).

Besonders regulatorische T-Zellen werden in vielen Ansätzen erforscht, da sie durch ihre Fähigkeit zur Suppression alloreaktiver Immunantworten wesentlich zur Induktion von Transplantationstoleranz beitragen (Joffre *et al.* 2008, Sawitzki *et al.* 2020). Die Kombination ihrer immunsuppressiven Eigenschaften mit der Antigenspezifität von CAR-T-Zellen, die gezielt gegen Spenderantigene gerichtet sind, könnte eine hochspezifische Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen ermöglichen, ohne das gesamte Immunsystem der Patient:innen nach einer Transplantation zu beeinträchtigen (Arjomandnejad *et al.* 2022). Studien mit allospezifischen CAR-Tregs, die auf spenderspezifische MHC-Moleküle abzielen, haben in Tier- und humanisierten Mausmodellen gezeigt, dass diese effektiver als polyklonale Tregs die Abstoßung von Hauttransplantaten und soliden Organen verhindern können (Boardman *et al.* 2017, MacDonald *et al.* 2016, Vaikunthanathan *et al.* 2017).

Während Tregs in der Induktionsphase der Transplantationstoleranz eine entscheidende Rolle spielen, deuten aktuelle Studien darauf hin, dass für deren langfristige Aufrechterhaltung insbesondere anergische $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen sowie die selektive Elimination alloreaktiver Effektorzellen wichtig sind. Diese

Beobachtungen legen nahe, auch nicht-regulatorische CAR-T-Zellen therapeutisch zu nutzen, etwa durch gezielte Modulation oder Depletion alloreaktiver T-Zellen (Besançon *et al.* 2017). Ein weiterer wesentlicher Aspekt in der Entwicklung zellulärer Therapien für den Transplantationskontext ist die technische Umsetzung und klinische Anwendbarkeit. Obwohl CAR-Tregs aufgrund ihrer Spezifität und suppressiven Kapazität vielversprechend erscheinen, ist ihre Herstellung bislang technisch anspruchsvoll, kostenintensiv und hinsichtlich Expansion und Stabilität im Körper mit Unsicherheiten verbunden (Noyan *et al.* 2017).

Ein alternativer, bisher wenig untersuchter Ansatz, besteht in der gezielten Depletion alloreaktiver T-Zellen mittels CAR-T-Zellen, die gegen den αβ-T-Zellrezeptor gerichtet sind. Da konventionelle $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen, einschließlich der für akute und chronische Abstoßungsreaktionen verantwortlichen Klone, überwiegend αβ-TCR-exprimierend sind, könnte deren selektive Elimination eine effektive immunsuppressive Wirkung entfalten (Abdelhakim *et al.* 2017). Um Fratricide-Effekte innerhalb der CAR-T-Zellpopulation zu verhindern und gleichzeitig das Risiko einer GvHD zu minimieren, ist ein genetischer Knockout des endogenen TCR erforderlich. Während CAR-T-Zellen mit TCR-Knockout im onkologischen Kontext bereits in ersten präklinischen Studien untersucht wurden (Torikai *et al.* 2012), liegen bislang keine Studien zur Effektivität dieses Ansatzes in Bezug auf die Induktion oder Aufrechterhaltung von Transplantationstoleranz vor.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob CAR-T-Zellen, die gezielt alloreaktive T-Zellpopulationen eliminieren, eine effektive und selektive Induktion von Transplantationstoleranz ermöglichen können. Aufbauend auf bisherigen Beobachtungen wird in dieser Studie deshalb ein neuartiger zelltherapeutischer Ansatz vorgestellt, der dieses therapeutische Potenzial systematisch untersucht

3. Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platte	TC-Zellkulturplatte (Sarstedt; Nürnbrecht, Deutschland) #83.3920
12-Well-Platte	TC-Zellkulturplatte (Sarstedt; Nürnbrecht, Deutschland) #83.3921
48-Well-Platte	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #677102
96-Well-Platte	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #655846
EDTA S-Monovette	(Sarstedt; Nürnbrecht, Deutschland) #04.1921.001
MACSPlex Cytokine Basic Kit	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-701
MACSPlex Cytokine Standard, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-106-197
MACSPlex IFN-γ Reagents Kit, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-695
MACSPlex IL-2 Reagents Kit, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-704
MACSPlex TNF-α Reagents Kit, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-694
Prolene blau monofil, 5-0 nicht resorbierbar	(Ehticon; Norderstedt, Deutschland) #8661H
Rundboden Polysystrolröhrchen 5 ml	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #115101
Zentrifugenröhrchen 15 ml	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #188271
Zentrifugenröhrchen 50 ml	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #2227261

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien entsprechen den üblichen Laborstandards.

3.2 Chemikalien

Annexin Binding Buffer	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #556454

autoMACS Rinsing Solution	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-091-222
Betadine	(iNova Pharmaceuticals; Zug, Schweiz) #QD08AG02
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	(Gibco; Massachusetts, USA) #14190-094
Ficoll- Paque PLUS	(GE Healthcare; Chicago, USA) #17-1440-02
Formaldehyd 4 %	(Engelbrecht GmbH; Edermünde, Deutschland) #S08481
Grafalon 20 mg/ml	(Neovii Biotech; Gräfelfing, Deutschland)
Human IL-7	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-095-363
Isofluran	(Baxter; Unterschleißheim, Deutschland)
Penicillin Streptomycin	(Gibco; Massachusetts, USA) #11548876
Recombinant human IL-15	(BioLegend; San Diego, USA) #570308
Temgesic 0,3 mg/ml	(Eumedica Pharmaceuticals GmbH; Lörrach, Deutschland)
TexMACS Medium	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-097-196
Tramal 100 mg/ml	(Grünenthal; Aachen, Deutschland)
Trypan Blue Stain 0,4%	(Gibco; Massachusetts, USA) #15-250-061

3.3 Antikörper und Isotypkontrollen

APC Mouse Anti-Human CD8	(BD Biosciences Heidelberg; Deutschland) #561421
APC Mouse IgG1, κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #554681
APC-Cy 7 Mouse Anti-Human CD45	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #557833

APC-Cy 7 Mouse IgG1, κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #557873
BV421 Mouse Anti-Human CD25	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #564033
BV421 Mouse IgG1, κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #562438
BV605 Rat Anti-Mouse CD45RB	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #740337
BV605 Rat IgG2a, κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #563144
BV711 Mouse Anti-Human CD69	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #563836
BV711 Mouse IgG1, κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #563044
CD271(LNGFR) Antibody, Anti-Human, FITC	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-113-420
CD3 Antibody, Anti-Human, APC	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-113-135
FITC Annexin V	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #556419
HLA-B27 Monoclonal Antibody (HLA-ABC-m3), FITC	(Invitrogen; Kalifornien, USA) #MA1-82540
Mouse IgG2a Isotype Control, FITC	(Invitrogen; Kalifornien, USA) #PA5-33206
Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12	(Dako; Glostru, Dänemark) #IR649
Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C8/144B	(Dako; Glostru, Dänemark) #IR623
NGFR Monoclonal Antibody (NGFR5)	(Invitrogen; Kalifornien, USA) #MA5-13314

PE Annexin V	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #556421
PE Mouse Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #553457
PE-Cy 7 Mouse Anti-Human CD4	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #557852
PE-Cy 7 Mouse IgG1 κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #557872
PerCP-Cy 5.5 Mouse anti-Human CD279 (PD-1)	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #561273
PerCP-Cy 5.5 Mouse IgG1 κ Isotype Control	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #552834
Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3	(Dako; Glostru, Dänemark) #IR503
Propidium Iodide Staining Solution	(BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland) #51-66211 E

3.4 Geräte und Softwareprodukte

Blutgasanalysator	ABL 90 Flex Plus (Radiometer; Krefeld, Deutschland)
Bestrahlungsgerät	Gulmay RS225 (Gulmay Medical Ltd.; Surrey, England)
Brutschrank	CO_2 Incubator, MCO-19AIC (Panasonic Healthcare; Tokio, Japan)
Durchflusszytometer	LSR Fortessa (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland)
Orbital Shaker	Thermomixer comfort (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
Software	Affinity Designer v2.6.3 (Serif; Nottingham, England) BioRender (BioRender Inc.; Toronto, Kanada) FACS Diva v8.0.1 (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland) FlowJo 10 (FlowJo LLC; Ashland, USA), GraphPad Prism 10.0 (GraphPad; San Diego, USA) Microsoft Excel 16.98 (Microsoft; Washington, USA)

	Microsoft Word 16.96.2 (Microsoft; Washington, USA)
	Zotero 7.0.20 (George Mason University; Fairfax, USA)
Tierkäfig	IVC Greenline GM 500 (Tecniplast; Buguggiate, Italien)
Tischmikroskop	Olympus IX50 Mikroskop (Olympus; Tokio, Japan)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5430 R (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer Improved (Marienfeld; Lauda-Königshofen, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

3.5 *In-vitro*-Versuche

3.5.1 Gewinnung humaner PBMC

Für die Isolation von PBMC wurde frisches humanes peripheres Blut verwendet. Die Blutentnahmen erfolgten anonym in Übereinstimmung mit allen geltenden ethischen Richtlinien und nach schriftlicher Einwilligung der Teilnehmenden. Die Venenpunktion wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt und das Blut wurde in Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Monovetten (Sarstedt) gesammelt und unmittelbar weiterverarbeitet. Alle Entnahmen erfolgten auf Basis des genehmigten Ethikantrags PV5921. Die PBMC wurden für immunologische *In-vitro*-Assays sowie zur Humanisierung von Versuchstieren verwendet.

Zur gezielten Rekrutierung von HLA-B27-typisierten Spender:innen wurden Personen angesprochen, die bereits im Rahmen der Deutschen Knochenmarkspenderdatei typisiert wurden oder sich freiwillig zur Typisierung bereit erklärt hatten. Die HLA-Typisierung diente ausschließlich der Differenzierung der Zellpopulationen in den *In-vitro*-Versuchen.

3.5.2 Zellkultur

Aus 18 ml EDTA-Vollblut gesunder Spender:innen wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach einer 15-minütigen Temperierung auf Raumtemperatur (RT) wurde das Blut mit TexMACS-Medium (Miltenyi Biotec) auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt, vorsichtig auf 15 ml Ficoll (GE Healthcare) geschichtet und anschließend zentrifugiert (400 g, 30 min, 4/2, RT; Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG). Der entstehende Zellteppich wurde abgenommen, einmal mit

Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) (Gibco) gewaschen und in sterilem TexMACS-Medium resuspendiert.
Vor jedem experimentellen Ansatz erfolgte eine Zellzählung mittels Trypanblau-Vitalfärbung (0,4 %, 1:10-Verdünnung; Gibco) in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved, Marienfeld), gefolgt von einer Einstellung auf die in den jeweiligen Experimenten spezifizierte Zelldichte. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Aussaat in die entsprechenden Zellkulturplatten bei 37°C und 5 % CO_2 in Zellkulturmedium (TexMACS-Medium, humanes IL-7 (10 ng/ml; Miltenyi Biotec), rekombinantes humanes IL-15 (10 ng/ml, trägerfrei; BioLegend) sowie Penicillin-Streptomycin (1:100; Gibco)). Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage ausgewechselt.

3.5.3 Bestrahlung der PBMC

Für die Bestrahlung wurden 4 ×10^5 PBMC pro Well in 12-Well-Platten in je 2 ml Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden in den jeweiligen Versuchsansätzen mit 30 Gray (Gy), 40 Gy und 50 Gy bei einer Dosisrate von 2 Gy/min bestrahlt (200 kV, 15 mA, 0,8 mm Blei und 0,5 mm Kupferfilter, RT) (Gulmay RS225, Gulmay).
Im Anschluss wurden die Zellen in 6-Well-Platten überführt und 96 Stunden kultiviert. Alle Experimente wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach 0, 24, 48 und 96 Stunden mit CD3 (Miltenyi Biotec) zur Identifizierung von T-Zellen sowie Annexin V und Propiumiodid (PI) (beides BD Biosciences) zur Quantifizierung vitaler Zellen.

3.5.4 Priming alloreaktiver T-Zellen

Zum Priming alloreaktiver T-Zellen wurden zunächst die PBMC der Empfänger:in vor dem Kokulturansatz mit 30 Gy bestrahlt und als Stimulatorzellen eingesetzt. Anschließend wurden jeweils insgesamt 4 × 10^5 nicht bestrahlte PBMC der Spender:in, die Responderzellen, mit den Stimulatorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen (Spender:in : Empfänger:in = 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1) in 12-Well-Platten in jeweils 2 ml Zellkulturmedium kultiviert (Gruppe 1 und Gruppe 2) (Abbildung 1). Die Unterscheidung von Stimulator- und Responderzellen erfolgte über Expression von HLA-B27 (Spenderzellen: HLA-B27-negativ, Empfängerzellen: HLA-B27-positiv). Alle Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt.
Für den Messzeitpunkt an Tag 12 wurden pro Verhältnis zwei separate Ansätze angelegt. Als Kontrolle dienten kultivierte Spenderzellen (4 × 10^5 Zellen) (Gruppe 3)

(Abbildung 1). Zwei Tage nach Beginn der Kokultivierung erfolgte eine Überführung in 6-Well-Platten mit Anpassung des Volumens auf 3 ml pro Well. Alle zwei Tage wurde 500 µl des Überstandes durch Frischmedium ersetzt. Vor jedem Wechsel wurden zudem 100 µl Überstand entnommen, um den pH-Wert, die Glukose- sowie die Laktatkonzentrationen mittels Blutgasanalysator (ABL 90 Flex Plus, Radiometer) zu bestimmen.

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Reexposition wurden an Tag 6 in der Hälfte der Ansätze erneut bestrahlte Stimulatorzellen in gleicher Zellzahl wie an Tag 0 zugegeben (Gruppe 2) (Abbildung 1). An Tag 12 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse zur Charakterisierung von Zellpopulationen (CD45, CD4, CD8), Aktivierungsmarkern (CD25, CD69) sowie Vitalitäts- und Erschöpfungsmarkern (Annexin V, „Programmed cell death protein“-(PD)-1; alle BD Biosciences).

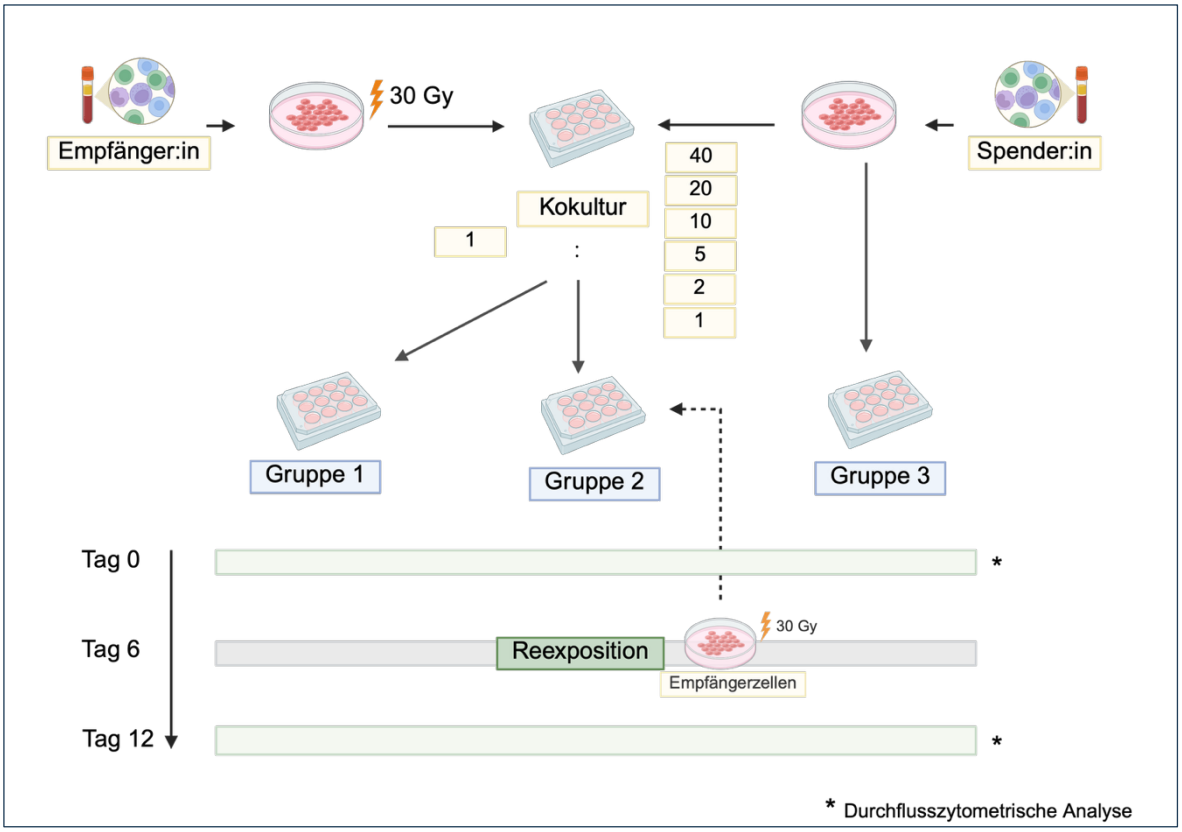


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *In-vitro*-Primings alloreaktiver T-Zellen. Übersicht des experimentellen Ablaufs zur *In-vitro*-Konditionierung alloreaktiver Spenderzellen durch Kokultur mit allogenen Empfängerzellen. Dargestellt sind die Zusammensetzung der Zellfraktionen, das Verhältnis von Spender- zu Empfängerzellen sowie der zeitliche Ablauf des Priming-Prozesses.

3.5.5 Reexposition geprimter T-Zellen

In einem weiteren Versuchsansatz wurden zuvor geprimte Kokulturen im Verhältnis 10:1 (Gruppe 1) und 10:1 mit Reexposition an Tag 6 (Gruppe 2), wie in 3.5.4 beschrieben, nach zwölf Tagen mit unbestrahlten Empfängerzellen in gleicher Zellzahl wie an Tag 0 reexponiert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit ungeprimten Spenderzellen, die ebenfalls exponiert wurden (Gruppe 3), sowie nicht exponierte Spenderzellen (Gruppe 4) (Abbildung 2). Alle Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Durchflusszytometrische Analysen zur Charakterisierung der Zellpopulationen sowie der Aktivierungs- und Vitalitätsmarker erfolgten an den Tagen 0, 6 und 12 sowie 24, 48 und 96 Stunden nach der Reexposition gemäß den zuvor beschriebenen Methoden. Zwölf Stunden nach der Reexposition wurden pro Ansatz 500 µl Zellkulturüberstand in Cryo Tubes überführt und bei -80 °C gelagert, um eine spätere Zytokinbestimmung durchzuführen.

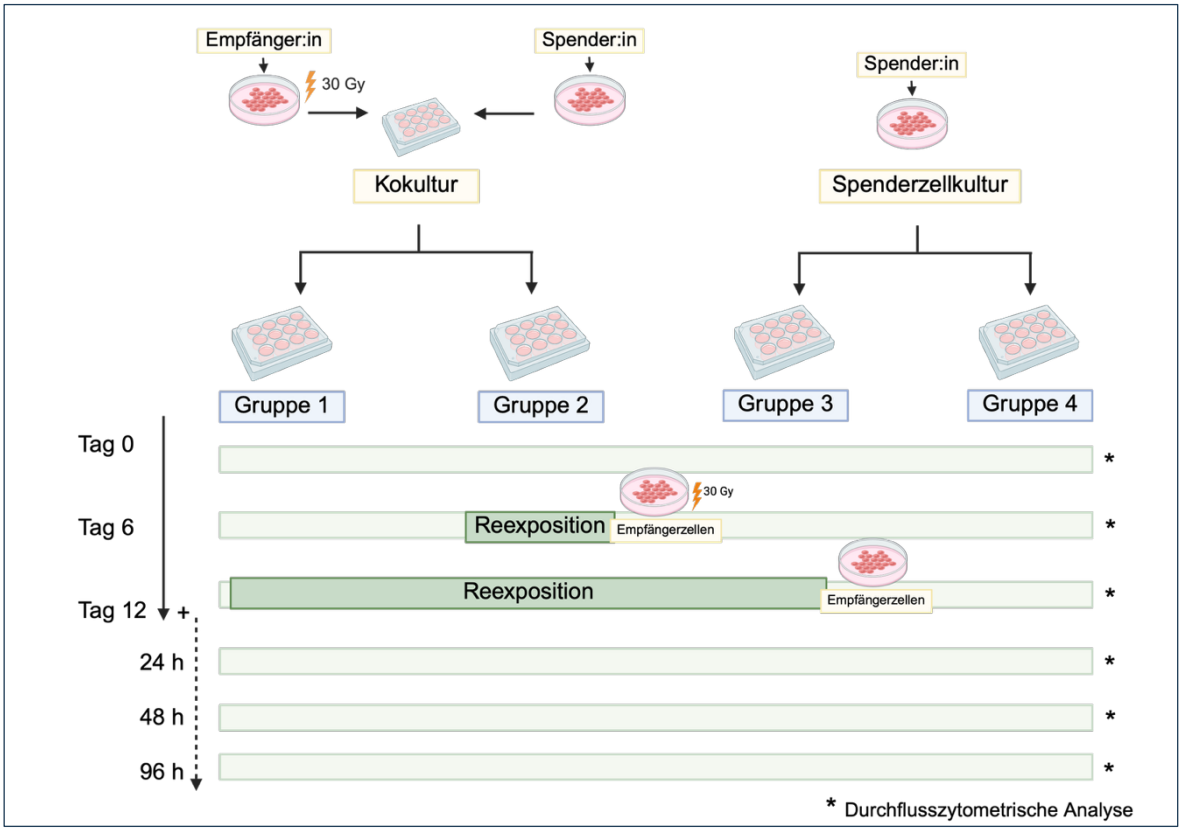


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Reexposition alloreaktiver T-Zellen. Übersicht des Versuchsablaufs zur Reexposition zuvor geprimter Spenderzellen mit allogenen Empfängerzellen. Dargestellt sind die zeitliche Abfolge der Priming-und Reexpositionsphase sowie die jeweiligen Zellkomponenten.

3.5.6 Zytokinassay

Zur quantitativen Bestimmung der löslichen Zytokine Tumornekrosefaktor-(TNF)-α, Interferon-(IFN)-γ und IL-2 wurden zuvor eingefrorene Zellkulturüberstände aufgetaut und mit dem MACSPlex Cytokine Kit (Miltenyi Biotec) gemäß Herstellerprotokoll analysiert. Die Proben wurden sowohl unverdünnt als auch in einer 1:10 Verdünnung in zwei 96-Well-Platten pipettiert und gemeinsam mit titrierten Zytokinstandards verarbeitet.

Jede Probe wurde mit fluoreszenzmarkierten Mikropartikeln (Beads) inkubiert, die mit zytokinspezifischen Antikörpern beschichtet waren (2 h, RT, 450 U/min; Thermomixer comfort, Eppendorf). Nach dreifachem Waschen wurden die Beads mit einem Detektionsantikörper konjugierten Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT, 450 U/min, Dunkelheit). Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt, bevor die Beads in Resuspensionspuffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit FlowJo (Version 10.10, BD Biosciences). Die Zytokinkonzentrationen wurden anhand einer Standardkurve berechnet. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten durchgeführt.

3.5.7 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen überführt, zweimal mit DPBS gewaschen und gemäß den Herstellerangaben für 20 Minuten bei RT im Dunkeln mit fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern in DPBS inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Resuspension der Zellen in autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec) und die Analyse auf einem LSR Fortessa (BD Biosciences).

Die Identifikation von Zellpopulationen erfolgte über CD45, CD4 und CD8. Aktivierungsmarker umfassten CD25 und CD69. Zur Bestimmung der Vitalität und Erschöpfung wurden Annexin V und PD-1 eingesetzt. Zur Kontrolle unspezifischer Antikörperbindungen wurden isotypische Kontrollantikörper verwendet. Die Kompensation der Fluorochrome erfolgte mittels Single-Stain-Kontrollen und einer automatischen Kompensationsmatrix.

Tabelle 1: Übersicht der *in vitro* und *in vivo* eingesetzten fluorochrom-konjugierten Marker für die Durchflusszytometrie

	In vitro	***In vivo***
Annexin V	FITC	
PI		
Anti-Human CD3	APC	
Annexin V	PE	
Anti-Human CD279 (PD-1)	PerCP-Cy 5.5	
Anti-Human CD45	APC-Cy 7	
Anti-Human CD4	PE-Cy 7	
Anti-Human CD8	APC	
Anti-Human CD69	BV711	
Anti-Human CD25	BV421	
Anti-Human HLA-B27	FITC	
Anti-Murin CD45		BV605
LNGFR		FITC

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse erfolgte mit FlowJo 10 (Version 10.10, BD Biosciences). Die Gating-Grenzen wurden anhand von Fluorenszens-Minus-Eins-(FMO)-Kontrollen, bei denen alle Antikörper außer dem zu untersuchenden enthalten waren, gesetzt. Diese Kontrollen ermöglichen eine präzise Abgrenzung schwach positiver Populationen unter Berücksichtigung von Spillover- und Hintergrundfluoresenzen. Zusätzlich wurden ungefärbte Zellen zur Beurteilung der Autofluoreszenz herangezogen.

Im ersten *In-vitro*-Versuch zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Bestrahlungsintensitäten wurde eine vereinfachte Gating-Strategie angewandt. Zu Beginn der Analyse wurden die PBMC mittels Freihandgating im Forward-Scatter-(FSC)/Side-Scatter-(SSC)-Dot-Plot (Abbildung 3A) selektiert. Anschließend erfolgte das Gating der $CD3^+$-Zellen im FSC/APC-Plot, welche danach bezüglich ihrer Vitalität über Annexin V (PE) und PI analysiert wurden.

Bei den folgenden *In-vitro*-Versuchen wurde eine differenziertere Analyse nach Gating der PBMC durchgeführt. Zunächst erfolgte im FSC/APC-Cy 7-Plot die Auswahl von $CD45^+$-Zellen (Abbildung 3B). Diese wurden anhand der

HLA-B27-Expression in HLA-B27$^+$- und HLA-B27$^-$-Populationen im FSC / FITC-Plot unterteilt (Abbildung 3C). Innerhalb der HLA-27$^-$-Population erfolgte die Differenzierung in CD8$^+$ -und CD4$^+$-T-Zellen im APC/PE-Cy 7-Plot (Abbildung 3D). Diese Subpopulationen wurden im PE/PerCP-Cy 5.5-Plot in Bezug auf Vitalität (Annexin$^-$) und Erschöpfung (PD-1) (Abbildung 3E) sowie im BV421/BV711-Plot hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus (CD25$^+$, CD69$^+$) (Abbildung 3F) untersucht.

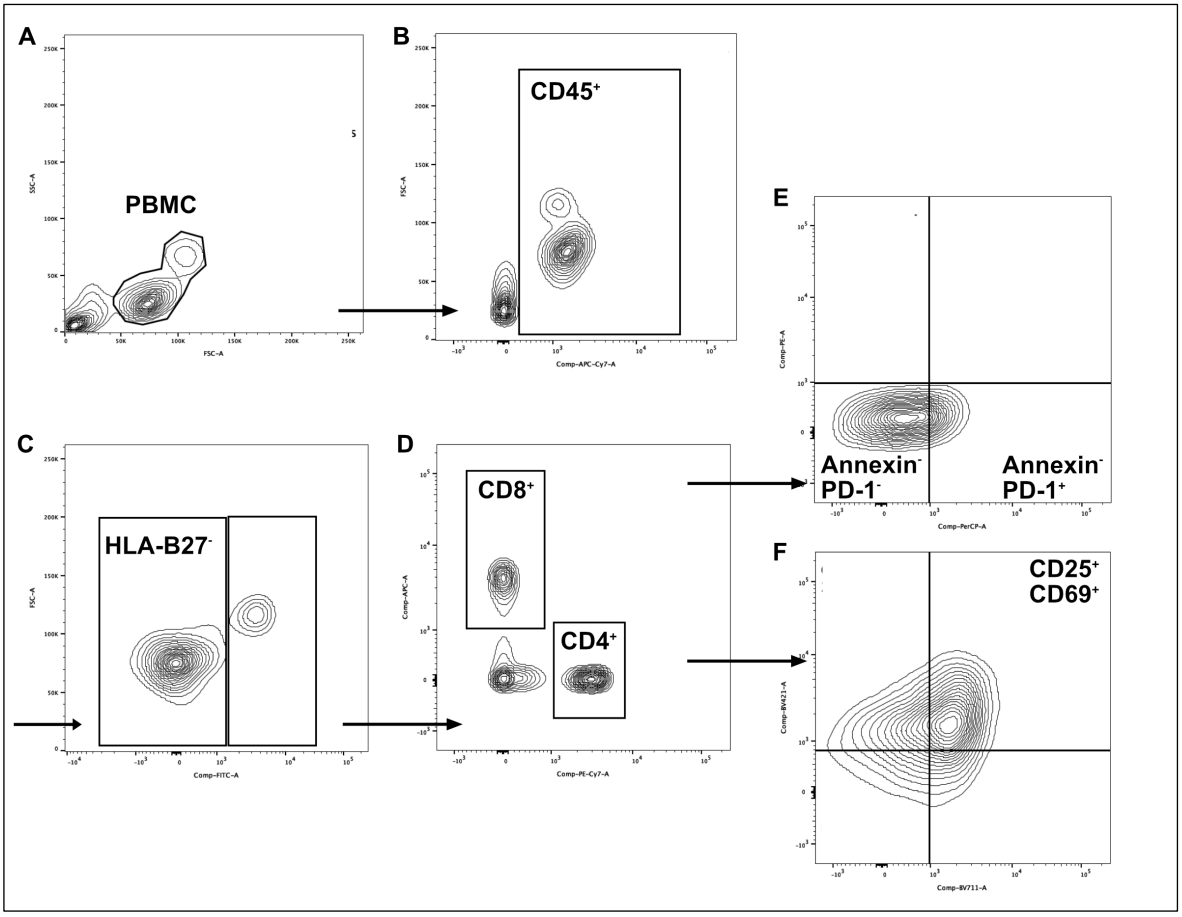


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie. Schematische Übersicht des Ablaufs der gesetzten Gates zur Analyse der durchflusszytometrischen Daten. **A-F:** Die Abbildungen zeigen die jeweilige Reihenfolge der Gating-Schritte und die dazugehörigen Subpopulationen für die weiterführende Auswertung von Vitalität, Aktivierungsstatus und Erschöpfung.

Für die Analyse des peripheren Blutes in den *In-vivo*-Experimenten wurde eine analoge Gating-Strategie angewendet. Nach Selektion der PBMC und der CD45$^+$-Zellen erfolgte eine Unterscheidung zwischen humanen und murinen CD45$^+$-Zellen im APC-Cy 7/BV605-Plot. Innerhalb der humanen Population wurde anhand der LNGFR-Expression im FSC/FITC-Plot zwischen geprimten T-Zellen (LNGFR$^-$) und CAR-T-Zellen (LNGFR$^+$) differenziert. Beide Zellpopulationen

wurden anschließend analog zu den *In-vitro*-Analysen hinsichtlich Aktivierung ($CD25^+/CD69^+$), Vitalität ($Annexin^-$) und Erschöpfung (PD-1) untersucht.

3.6 *In-vivo*-Versuche

3.6.1 Versuchstiere

Für die *In-vivo*-Experimente wurden NOD.Cg-$Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}$/SzJ-(NSG)-Mäuse verwendet, die aufgrund der scid-Mutation im *Prkdc*-Gen eine schwere kombinierte Immundefizienz (SCID) aufweisen. Der zusätzliche Knockout des *IL2rγ*-Gens verhindert die Entwicklung von NK-Zellen und verbessert die Etablierung humaner Zelllinien in diesem Mausmodell. Das Fehlen funktioneller T- und B-Zellen macht diese Tiere besonders geeignet für die Etablierung humanisierter Mausmodelle. Insgesamt wurden 23 weibliche Mäuse (*Mus musculus*) im Alter von acht Wochen aus der Versuchstierhaltung (VTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) verwendet.

Die Tierversuche wurden in zwei unabhängigen Durchgängen auf Grundlage des genehmigten Versuchsvorhabens Nummer 81/16 (Genehmigungsdatum: 15.12.2016) durchgeführt. Alle Arbeiten erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Haltung und Aufzucht der Tiere sowie die Durchführung der Experimente fanden in der VTH sowie in den zugehörigen Operationsräumen statt. Die Tiere wurden gruppenweise (1–5 Tiere pro Käfig) in belüfteten Käfigen (IVC Greenline GM500, Tecniplast) unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur 21 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50–55 %, 12-h-Tag-Nacht-Rhythmus, Futter und Wasser *ad libitum*) gehalten.

Handhabung und Euthanasie erfolgten durch geschultes Personal. Das Monitoring des Tierwohls wurde gemäß dem im Versuchsantrag festgelegten Beobachtungsschema durchgeführt. Beurteilt wurden Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und Wundinfektion mittels des murinen Sepsis-Scores. Auf Basis dieser Kriterien mit Bewertung von A bis C erfolgte eine Gesamtbeurteilung, auf deren Grundlage über weitere Maßnahmen oder medizinische Versorgung entschieden wurde. Alle Belastungsminimierungsmaßnahmen wurden entsprechend den Tierschutzanforderungen umgesetzt.

3.6.2 Gewinnung von humanem Hautgewebe

Für die Transplantationsexperimente wurde humane Haut verwendet, die als Restgewebe im Rahmen elektiver chirurgischer Eingriffe in der Kinderchirurgie am UKE anfiel. Dieses Gewebe wurde nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der sorgeberechtigten Personen der Patient:innen für die Forschungszwecke zum Transplantationsmodell im Tierexperiment freigegeben. Die Verwendung erfolgte auf Grundlage des genehmigten Ethikantrags PV5488 und unter strikter Einhaltung aller datenschutz- und forschungsethischen Vorgaben. Die Hautproben wurden unmittelbar nach der Entnahme verarbeitet und für die xenogene Transplantation auf immundefiziente Mäuse vorbereitet.

3.6.3 Xenogene Hauttransplantation

Für die Versuche wurden insgesamt 23 NSG-Mäuse verwendet. In den ersten drei Versuchsgruppen waren jeweils sechs Tiere, in Versuchsgruppe 4 waren fünf Mäuse. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Vor Beginn des operativen Eingriffs wurden die Mäuse gewogen und erhielten eine präemptive Analgesie mit Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht, subkutan; Eumedica Pharmaceuticals). Nach einer Präoxygenierung mit Sauerstoff (1 l/min) wurde die Narkose durch Inhalation von Isofluran (3–4 %; Baxter) über 2 Minuten in einer Induktionskammer eingeleitet. Zur Vermeidung perioperativer Hypothermie erfolgte die Transplantation auf einem beheizten Operationstisch (37°C).

Unmittelbar vor der Operation erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme. Anschließend wurde der Nackenbereich der Tiere rasiert und zunächst außerhalb des Operationstisches mit Betadine (iNova Pharmaceuticals) antiseptisch gereinigt. Nach Fixierung auf dem Operationstisch erfolgte eine erneute Desinfektion des Operationsfeldes. Die Narkose wurde während des Eingriffs mittels Isofluran (2 %) über eine Nasenmaske aufrechterhalten und die Narkosetiefe wurde vor der Inzision durch Prüfung auf schmerzhafte Reflexe kontrolliert.

Etwa 30 Minuten nach Applikation des Analgetikums wurde eine Hautinzision im zuvor rasierten Nackenbereich vorgenommen. Als Transplantat diente ein anonymisiertes humanes Hautstück von circa 0,5 x 0,5 cm Größe, das als Xenotransplantat mit Prolene 5–0 (Ethicon) auf der Rückenhaut fixiert wurde.

Nach Abschluss des Eingriffs wurden die Tiere aus der Narkose ausgeleitet und in vorgewärmte, saubere Käfige überführt. Das Erwachen erfolgte innerhalb von drei

bis fünf Minuten. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere für sieben Tage Tramadol (1 mg/ml; Grünenthal) über das Trinkwasser. Die Wasseraufnahme wurde täglich dokumentiert, das Trinkwasser alle zwei Tage erneuert. Das klinische Monitoring erfolgte, wie in 3.6.1 beschrieben, in den ersten drei postoperativen Tagen zweimal täglich und anschließend einmal täglich.

3.6.4 Herstellung und Aufbau der CAR-T-Zellen

Die in den Versuchen eingesetzten CAR-T-Zellen wurden im Labor der Pädiatrischen Hämatoonkologie der Universität Tübingen generiert und von PD Dr. Patrick Schlegel zur Verfügung gestellt. Ausgangsmaterial waren humane periphere T-Zellen, die mittels Genomeditierung so modifiziert wurden, dass sie einen CAR der dritten Generation exprimieren, der spezifisch gegen αβ-T-Zellrezeptoren gerichtet ist.

Der CAR bestand aus einer Antigenbindungsdomäne in Form eines Einzelkettenvariablenfragments, welches über eine IgG4-Hinge-Region mit der Transmembrandomäne von CD8α verbunden ist. Der intrazelluläre Signalbereich enthielt die kostimulatorischen Domänen CD28 und 4-1BB sowie die Aktivierungsdomäne CD3ζ. Zur Vermeidung einer gegenseitigen T-Zellerkennung wurde der endogene TCR in den modifizierten Zellen deaktiviert (Abbildung 4). Nach Transduktion und Selektion wurden die Zellen im Labor der pädiatrischen Hämatoonkologie der Universität Tübingen expandiert, kryokonserviert und hinsichtlich ihrer Vitalität sowie der Oberflächenmarker überprüft.

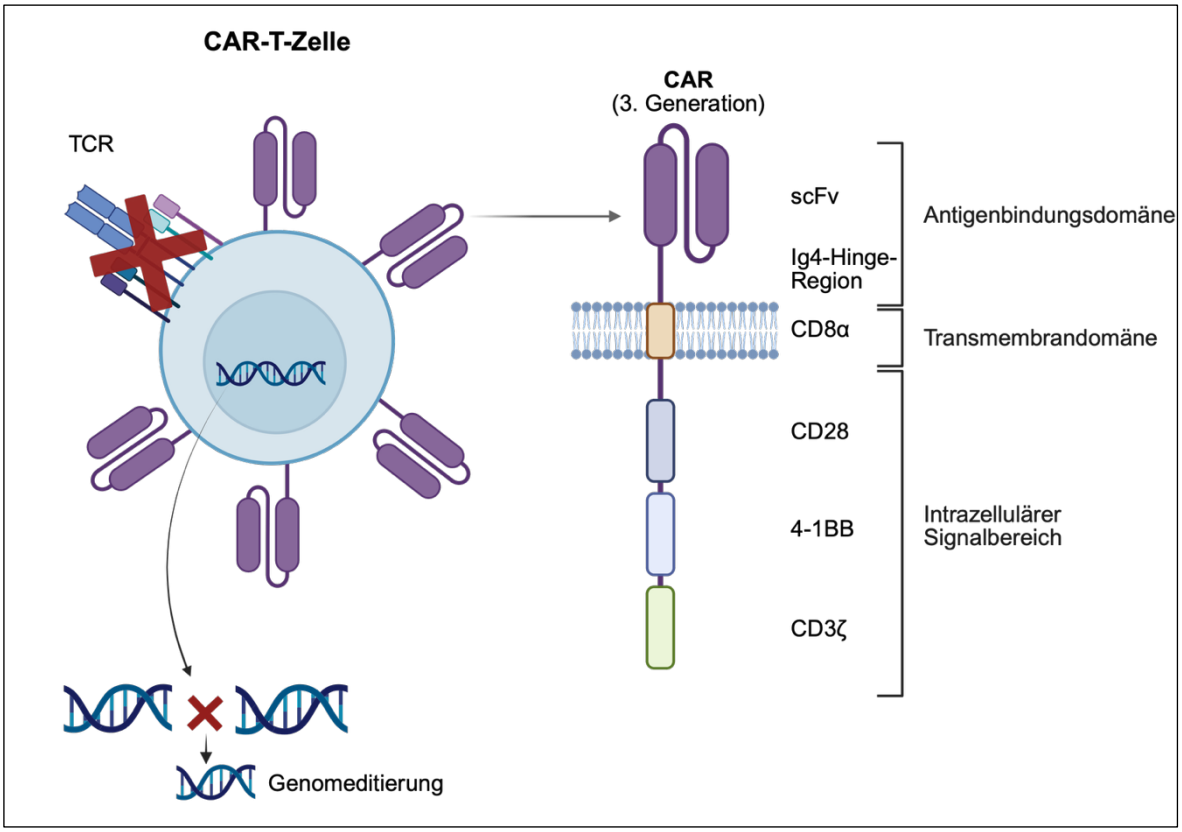


Abbildung 4: Aufbau der verwendeten CAR-T-Zellen. Darstellung der modifizierten humanen T-Zellen mit Exprimierung eines CARs der dritten Generation sowie Knockout des endogenen TCR. Schematischer Aufbau des CAR bestehend aus einer Antigenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne sowie einem intrazellulären Signalbereich.

3.6.5 Etablierung des humanisierten Mausmodells

Am Tag der Transplantation wurden ein Teil des Spenderhauttransplantats sowie peripheres Blut des spendenden Kindes an das Labor der pädiatrischen Hämatoonkologie der Universität Tübingen übermittelt. Die Verarbeitung der Proben erfolgte mittels magnetischer Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotec). Anschließend wurde ein Priming der PBMC einer zweiten spendenden Person gegen bestrahlte PBMC des hautspendenden Kindes durchgeführt. Nach erfolgreichem Priming und Anreicherung wurden die alloreaktiven Zellen kryokonserviert. Zur Analyse des Primings-Effekts wurden ebenfalls ungeprimte Zellen der gleichen zweiten spendenden Person kryokonserviert.

Für den adoptiven Transfer wurden jeweils $3{,}9 \times 10^6$ Zellen der geprimten PBMC in 200 µl DPBS resuspendiert und den Versuchstieren der Gruppen 2 bis 4 intravenös über die Schwanzvene injiziert. Die Tiere der Gruppe 1 erhielten entsprechend $3{,}9 \times 10^6$ ungeprimte PBMC der spendenden Person zur Analyse des Priming-Effekts. Zur Beurteilung der Immunreaktion der humanen PBMC und des

Einflusses der geprimten Zellen wurden die Gruppen 1 und 2 an Tag 28 unter Isofluran-Narkose (5 %) durch zervikale Dislokation euthanasiert (Abbildung 5).

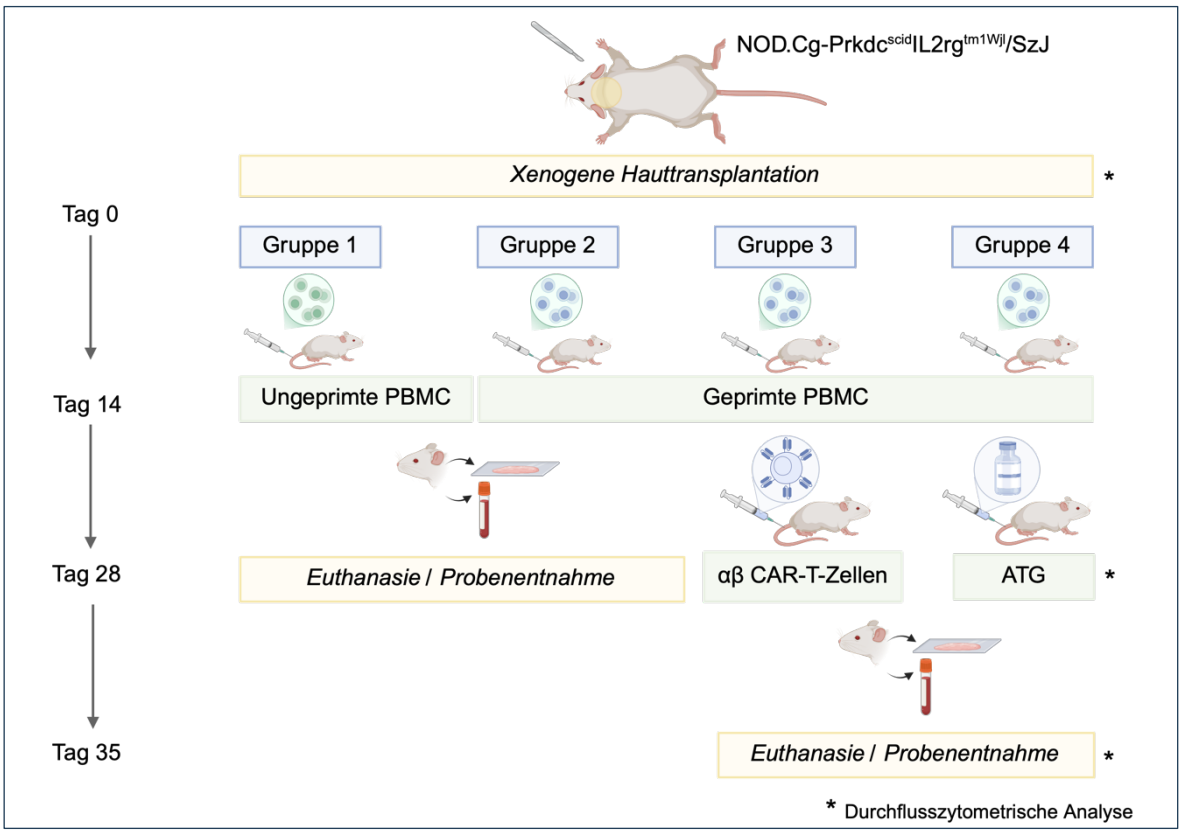


Abbildung 5: Schematische Übersicht des *In-vivo*-Versuchsablaufs. Darstellung des experimentellen Designs, der zeitlichen Abfolge in den jeweiligen Versuchsgruppen sowie der Zeitpunkte der Zellgaben und Probenentnahmen.

3.6.6 Therapeutische Intervention der Immunreaktion

Zur Modulation der transplantatspezifischen Immunantwort erhielten die Mäuse der Versuchsgruppen 3 und 4 an Tag 28 nach der Transplantation eine gezielte Therapie. Gruppe 3 erhielt αβ-CAR-T-Zellen (50×10^6 Zellen, LNGFR-positiv, Transduktionseffizienz 11,8 %) hergestellt aus den T-Zellen der gleichen spendenden Person wie der geprimten T-Zellen. Die Verabreichung erfolgte in 200 µl DPBS über die Schwanzvene. Gruppe 4 wurde mit ATG (Grafalon 20mg/ml, Neovii) behandelt, jede Maus erhielt 100 µl als konventionelles Immunsuppressivum. Die Euthanasie der Versuchsgruppen 3 und 4 erfolgte an Tag 35 ebenfalls unter Isofluran-Narkose (5 %) durch zervikale Dislokation (Abbildung 5).

3.6.7 Gewinnung muriner Proben

Die Blutentnahme erfolgte zu drei definierten Zeitpunkten: zu Beginn des Experiments (Tag 0), nach Immuntherapie (Tag 28) sowie unmittelbar vor der Euthanasie (Tag 35) (Abbildung 5). Das Blut wurde retrobulbär unter kurzer Isofluran-Narkose (3–5 %) gewonnen. Die Isolierung der PBMC erfolgte unmittelbar nach der Entnahme mittels Erythrozytenlysepuffer (NH_4Cl, $KHCO_3$, EDTA, Aqua bidest; pH 7,28). Nach zweifachem Waschen in DPBS wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie, wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben, weiterverarbeitet. Analysiert wurden humane und murine Leukozyten (CD45), T-Zellpopulationen (CD4, CD8) sowie LNGFR (Miltenyi Biotec) zur Identifikation transduzierter CAR-T-Zellen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Viabilität (Annexin V, PD-1) und des Aktivierungsstatus (CD25, CD69).

Nach der Euthanasie wurde das Transplantat postmortal entnommen und in 4 % Formalin (Engelbrecht) fixiert. Die histologische Aufarbeitung einschließlich Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) sowie immunhistochemische Färbung von CD3, CD4 und CD8 (alle Dako), erfolgte im Institut für Pathologie des UKE. Die Beurteilung der Transplantate bezüglich einer Abstoßungsreaktion erfolgte durch eine hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit verblindete Pathologin. Die immunhistochemische Färbung von LNGFR (Invitrogen) zum Nachweis von CAR-T-Zellen erfolgte im Labor der Kinderchirurgie in Mannheim.

3.7 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 10.5.0, GraphPad Software) durchgeführt. Je nach Versuchsdesign kamen einfaktorielle Varianzanalysen (One-way ANOVA) für den Vergleich von Mittelwerten zwischen mehr als zwei unabhängigen Gruppen ohne zusätzliche Einflussgröße sowie zweifaktorielle Varianzanalysen (Two-way ANOVA) für Gruppenvergleiche unter Berücksichtigung eines zweiten Faktors zum Einsatz. Im Anschluss an signifikante ANOVA-Ergebnisse wurden als Post-hoc-Verfahren der Tukey-Test oder die Šidák-Korrektur angewendet. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte t-Test mit Welch-Korrektur eingesetzt, um Varianzhomogenitätsverletzungen zu berücksichtigen. Die Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

4. Ergebnisse

4.1. *In-vitro*-Versuche

4.1.1 Bestrahlung von PBMC

Zur Untersuchung der Zellvitalität bestrahlter PBMC wurden diese über einen Zeitraum von 96 Stunden in Kultur gehalten und mit 30 Gy, 40 Gy sowie 50 Gy bestrahlt. Das Ziel der Bestrahlung der Zellen soll eine Inhibierung der Proliferationsfähigkeit sein ohne direkte Induktion einer Apoptose, damit diese in Folgeversuchen als Stimulatorzellen in Kokulturen dienen können. Stimulatorzellen sind wachstumsinaktivierte Zellen, die die Expansion und das Überleben von Zielzellen induzieren. Die Analyse der vitalen $CD3^+$-Zellen (Annexin V^-/PI^-) erfolgte mittels Durchflusszytometrie zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 96 Stunden.

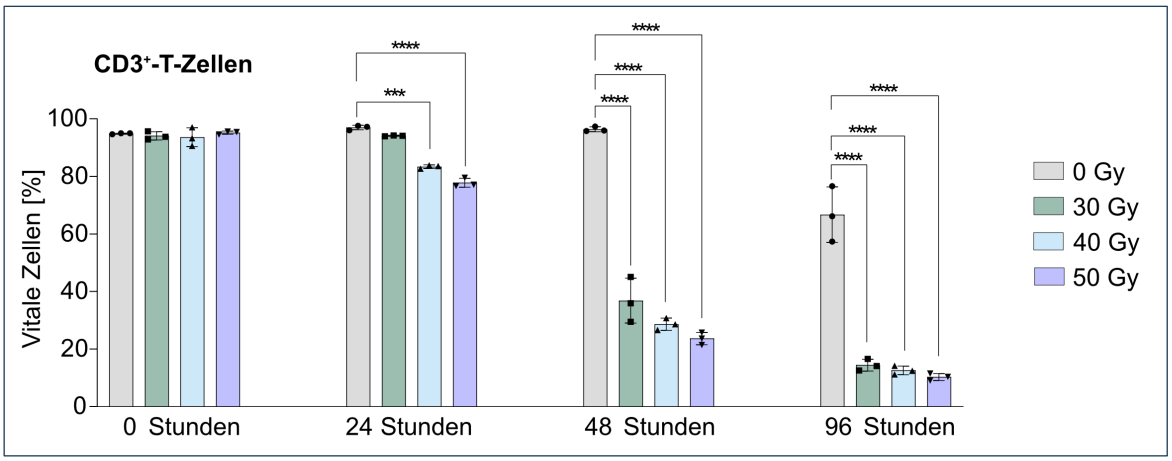


Abbildung 6: Vitalitätsverlust der $CD3^+$-T-Zellen innerhalb von 96 Stunden nach Bestrahlung mit verschiedenen Intensitäten. Darstellung des Anteils vitaler $CD3^+$-T-Zellen (Annexin V^-/PI^-) mittels Durchflusszytometrie nach Bestrahlung mit 30, 40 und 50 Gy im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte unabhängiger biologischer Triplikate (n=3) ± SD. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Tukey-Post-hoc-Test. Signifikanzniveaus: ***$p < 0{,}001$, ****$p < 0{,}0001$.

Abbildung 6 stellt einen zeitabhängigen Rückgang der Zellvitalität in allen bestrahlten Gruppen dar. Nach 24 Stunden zeigte sich bei einer Bestrahlung mit 40 und 50 Gy im Vergleich zu den unbestrahlten $CD3^+$-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellvitalität ($p < 0{,}001$). Die Bestrahlung mit 30 Gy führte zu dem Zeitpunkt zu vergleichbaren Anteilen vitaler Zellen wie die Kontrollgruppe. Zwischen 24 und 48 Stunden kam es in allen bestrahlten Gruppen zu einem signifikanten Abfall der Zellvitalität ($p < 0{,}0001$), wobei die höchsten Dosen den stärksten Rückgang zeigten. Nach 96 Stunden lagen die Anteile vitaler Zellen in allen

bestrahlten Gruppen unter 15 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Versuche eine Bestrahlungsdosis von 30 Gy gewählt, da diese Dosis eine ausreichende Zeitspanne zur Aktivierung der Zielzellen bis zum Eintritt der Apoptose ermöglichte.

4.1.2 Priming alloreaktiver T-Zellen

Zur Bestimmung des optimalen Stimulationsverhältnisses von Spenderzellen durch bestrahlte Empfängerzellen wurde eine zwölftägige Kokultur mit unterschiedlichen Verhältnissen (Spender:in : Empfänger:in = 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1) angelegt und mit nicht exponierten Spenderzellen verglichen. Neben einer einmaligen Exposition an Tag 0 wurde ein Ansatz mit Reexposition an Tag 6 untersucht. Durchflusszytometrische Analysen erfolgten an den Tagen 0 und 12.

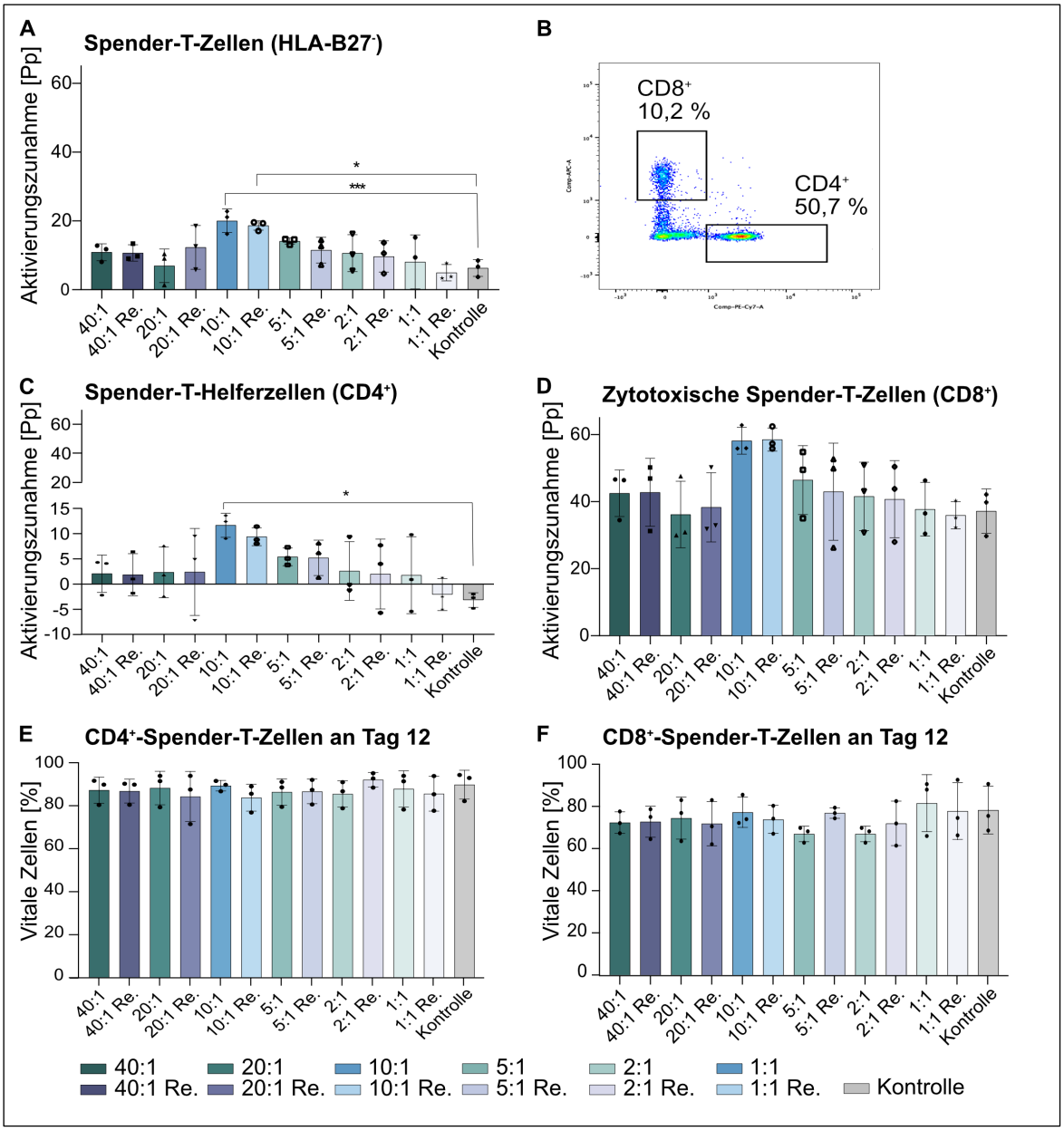


Abbildung 7: Titration der optimalen Stimulationsverhältnisse bestrahlter Empfängerzellen für das Priming alloreaktiver T-Zellen. Aktivierung ($CD25^+/CD69^+$) geprimter T-Zellen über einen Zeitraum von zwölf Tagen in verschiedenen Spender-zu-Empfänger-Verhältnissen, mit und ohne Reexposition (Re.) an Tag 6. Als Referenz diente eine ungeprimte Spender-T-Zell-Kontrollgruppe. **A:** Zunahme aktivierter Spenderlymphozyten ($HLA\ B27^-$) in den einzelnen Titrationen über zwölf Tage. **B:** Zusammensetzung der $CD45^+$-Spender-T-Zellen ($HLA\ B27^-$). **C:** Entwicklung der aktivierten $CD4^+$-Zellen im Zeitverlauf. **D:** Aktivierung der $CD8^+$-Zellen im Zeitverlauf. **E:** Anteil vitaler ($Annexin^-$) $CD4^+$-Zellen an Tag 12. **F:** Anteil vitaler ($Annexin^-$) $CD8^+$-Zellen an Tag 12. **A-F:** Datenpunkte werden als Mittelwerte unabhängiger biologischer Triplikate (n=3) ± SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Tukey-Post-hoc-Test. Signifikanzniveaus: $*p < 0{,}05$, $***p < 0{,}001$. Pp: Prozentpunkte.

Abbildung 7 zeigt die Zunahme in Prozentpunkten (Pp) der aktivierten ($CD25^+/CD69^+$) T-Zellen im Verlauf von zwölf Tagen sowie den Anteil vitaler

(Annexin$^-$) Zellen der Subpopulationen der CD4$^+$-und CD8$^+$-T-Zellen an Tag 12. In allen geprimten Gruppen nahm der Anteil aktivierter (CD25$^+$/CD69$^+$) Spender-T-Zellen stärker zu als in der ungeprimten Kontrollgruppe. Der stärkste signifikante Anstieg wurde in den Verhältnissen 10:1 und 10:1 mit Reexposition (Re.) erreicht (10:1: $p < 0{,}001$; 10:1 Re.: $p < 0{,}05$). Zwischen den Bedingungen mit und ohne Reexposition bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 7A). Die Zusammensetzung der CD45$^+$-Spender-T-Zellen (HLA B27$^-$) war in allen Ansätzen durch einen höheren Anteil an CD4$^+$-T-Zellen (50,7 %) gegenüber den CD8$^+$-T-Zellen (10,2 %) gekennzeichnet (Abbildung 7B). Bei den CD4$^+$-T-Helferzellen zeigte sich in fast allen Verhältnissen eine Aktivitätssteigerung, mit Ausnahme der Titration 1:1 Re. und der Kontrolle, wobei der Zuwachs bei 10:1 signifikant war ($p < 0{,}05$) (Abbildung 7C). Die CD8$^+$ zytotoxischen T-Zellen zeigten insgesamt eine stärkere relative Aktivierungszunahme als CD4$^+$-T-Helferzellen, wobei der größte Zuwachs ebenfalls in den Verhältnissen 10:1 und 10:1 Re. zu beobachten war, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 7D). Der Anteil vitaler (Annexin$^-$) CD4$^+$-und CD8$^+$-T-Zellen an Tag 12 unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Titrationsverhältnissen und der Kontrolle (Abbildungen 7E, 7F). Die durchgeführten Blutgasanalysen zeigten in allen Ansätzen zu jedem Zeitpunkt physiologische pH-Werte, sowie unauffällige Glukose- und Laktatkonzentrationen.

Aufgrund der Kombination aus hoher Aktivierung und gleichbleibender Zellvitalität wurden die Verhältnisse 10:1 und 10:1 Re. in beiden Bedingungen für nachfolgende Experimente ausgewählt, da mit und ohne Reexposition kein signifikanter Unterschied bestand.

4.1.3 Reexposition geprimter T-Zellen

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Reexposition von Spenderzellen auf die Expansion, Aktivierung und Vitalität geprimter T-Zellen im Vergleich zu ungeprimten T-Zellen, wurden Spender- und Empfängerlymphozyten im Verhältnis 10:1 und 10:1 mit Reexposition an Tag 6 kokultiviert. Ungeprimte T-Zellen wurden unter identischen Bedingungen kultiviert. Diese drei Gruppen wurden an Tag 12 mit unbestrahlten Empfängerzellen exponiert. Als Kontrolle dienten Spender-T-Zellen ohne Antigenexposition. Durchflusszytometrische Analysen erfolgten an den Tagen 0, 6 und 12 sowie 24, 48 und 96 Stunden nach der Reexposition.

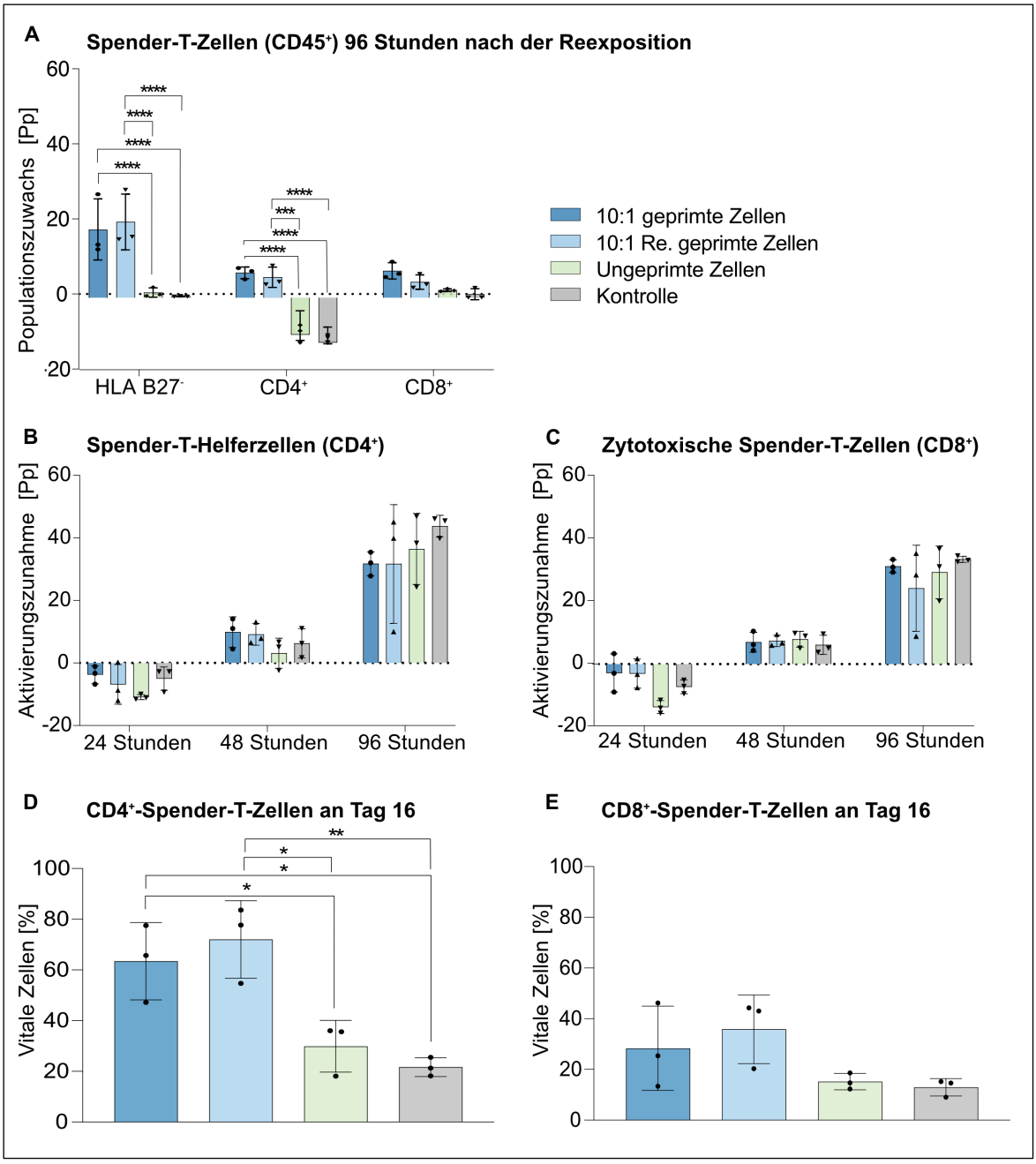


Abbildung 8: Zuwachs der Populationen und Dynamik der Aktivierung von Spender-T-Zellen über 96 Stunden nach Reexposition sowie deren Vitalitätsanteil an Tag 16. Verglichen wurden Spender-T-Zellen nach Zugabe zu geprimten Zellen im Verhältnis 10:1 und 10:1 Re., zu ungeprimten Zellen sowie zu einer Spenderkontrolle ohne Antigenexposition. **A:** Zuwachs der CD45$^+$-Zellpopulation sowie der Subpopulationen der CD4$^+$-und CD8$^+$-Spender-T-Zellen. **B:** Zuwachs aktivierter (CD25$^+$/CD69$^+$) CD4$^+$-Spender-T-Zellen. **C:** Zuwachs aktivierter (CD25$^+$/CD69$^+$) CD8$^+$-Spender-T-Zellen. **D:** Anteil vitaler (Annexin$^-$) CD4$^+$-Spender-T-Zellen an Tag 16. **E:** Anteil vitaler (Annexin$^-$) CD8$^+$-Spender-T-Zellen an Tag 16. **A-E:** Daten repräsentieren unabhängige biologische Triplikate (n=3) und sind als Mittelwert ± SD angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (A-C) sowie einfaktorieller Varianzanalyse (D-E) mit Tukey-Post-hoc Test. Signifikanzniveaus: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Der Vergleich des Populationszuwachses der $CD45^+$-Spender-T-Zellen in den 96 Stunden nach Reexposition zeigte in den Gruppen der geprimten Zellen (10:1 und 10:1 Re.) sowohl bei der Gesamtpopulation der Spenderzellen (HLA $B17^-$) als auch bei den Subpopulationen der $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen einen durchgehend positiven Zuwachs. In den Gruppen der ungeprimten Zellen sowie der Spenderzellen ohne Antigenexposition war der Zuwachs der $CD45^+$- und $CD8^+$-T-Zellen deutlich geringer, während die $CD4^+$-Zellen eine Abnahme zeigten. Die statistische Analyse ergab eine signifikant höhere Zunahme der Spenderzellen und der $CD4^+$-T-Zellen in beiden geprimten Gruppen im Vergleich zu den ungeprimten- und Kontrollzellen (10:1: $p < 0{,}0001$; 10:1 Re.: $p < 0{,}001$) (Abbildung 8A).

Die Analyse der Dynamik der Aktivierung ($CD25^+/CD69^+$) von $CD4^+$-T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen zeigte über die drei Messzeitpunkte (24, 48, 96 Stunden) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Bei beiden Subpopulationen nahm der Aktivierungsgrad nach 24 Stunden zunächst ab und stieg anschließend zum Zeitpunkt 48 Stunden wieder an. Dieses Muster war sowohl bei geprimten als auch bei ungeprimten Zellen sowie in der Kontrolle erkennbar. Zwischen 48 Stunden und 96 Stunden zeigte sich in allen Gruppen der größte Zuwachs der Aktivierung, sowohl bei den $CD4^+$-T-Zellen als auch bei den $CD8^+$-T-Zellen (Abbildungen 8B, 8C).

An Tag 16 zeigte der Vergleich der Zellvitalität ($Annexin^-$) eine insgesamt höhere Vitalität bei $CD4^+$-T-Zellen im Vergleich zu $CD8^+$-T-Zellen. Der Anteil vitaler $CD4^+$-T-Zellen war in beiden geprimten Gruppen signifikant höher als bei den ungeprimten Zellen und der Kontrollgruppe (10:1: $p < 0{,}05$; 10:1 Re. versus ungeprimt: $p < 0{,}05$, versus Kontrollgruppe: $p < 0{,}01$) (Abbildung 8D). Bei den $CD8^+$-Zellen war der Anteil vitaler Zellen in den geprimten Gruppen ebenfalls höher, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 8E).

Insgesamt wies das Priming alloreaktiver T-Zellen im Verhältnis 10:1, unabhängig von einer zusätzlichen Reexposition an Tag 6, nach der Reexposition an Tag 12 eine vergrößerte Zellpopulation mit erhöhter Vitalität auf. Die Effekte waren im Vergleich zu ungeprimten und nicht exponierten T-Zellen besonders ausgeprägt für $CD4^+$-T-Helferzellen.

4.1.4 Zytokinassay

Zur weiteren Analyse der Exposition geprimter Zellen im Vergleich zu ungeprimten Zellen und der Spenderkontrolle erfolgte zwölf Stunden nach der Reexposition mit unbestrahlten Empfängerzellen an Tag 12 die Entnahme des Überstandes der Zellkulturen. Die Konzentrationen [pg/ml] der inflammatorischen Zytokine IL-2, TNF-α und IFN-γ wurden gemäß den Herstellerangaben mittels Zytokinassay und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung bestimmt.

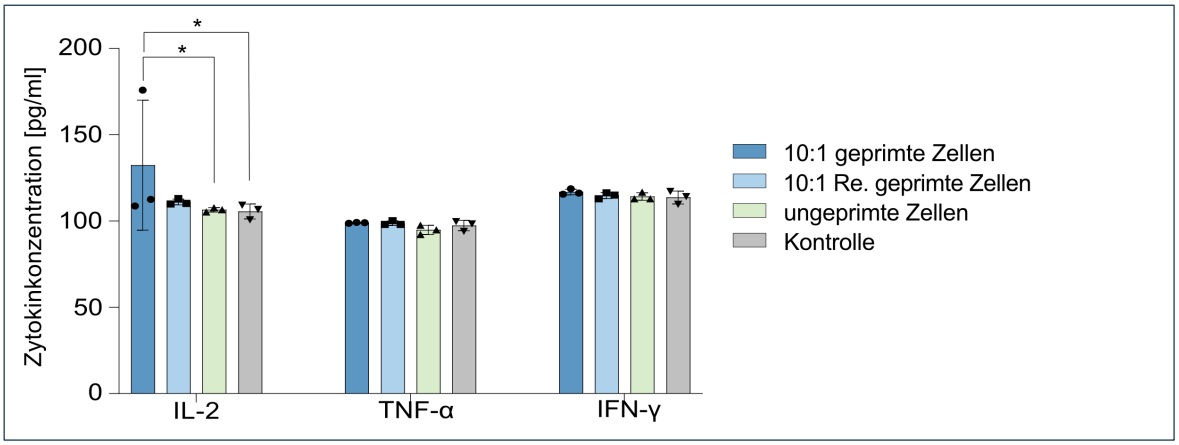


Abbildung 9: Konzentration inflammatorischer Zytokine (IL-2, TNF-α, IFN-γ) zwölf Stunden nach Reexposition. Dargestellt sind die Zytokinkonzentrationen in den Überständen geprimter T-Zellen (10:1 und 10:1 Re.), ungeprimter T-Zellen sowie einer Spenderkontrolle ohne vorherige Antigenexposition. Datenpunkte repräsentieren unabhängige biologische Triplikate (n=3) und sind als Mittelwert ± SD angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Tukey-Post-hoc-Test. Signifikanzniveau: *$p < 0,05$.

In der Versuchsgruppe der 10:1 geprimten Zellen zeigte sich eine signifikant höhere IL-2-Konzentration im Vergleich zu den ungeprimten Zellen und der Spenderkontrolle ($p < 0,05$). Die Gruppe 10:1 Re. wies ebenfalls höhere IL-2-Werte auf, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Für TNF-α und IFN-γ bestanden zwischen den geprimten, ungeprimten T-Zellen und den Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 9).

4.2. *In-vivo*-Versuche

4.2.1 Scoring der Versuchstiere

Im Versuchsverlauf erfolgte eine engmaschige Überwachung der Versuchstiere mit wöchentlichen Gewichtsmessungen und täglichem Scoring der Tiere zur Beurteilung des Körpergewichts, Allgemeinzustandes, Spontanverhaltens und des Auftretens einer Wundinfektion. Dabei erfolgte eine Beurteilung von A bis C.

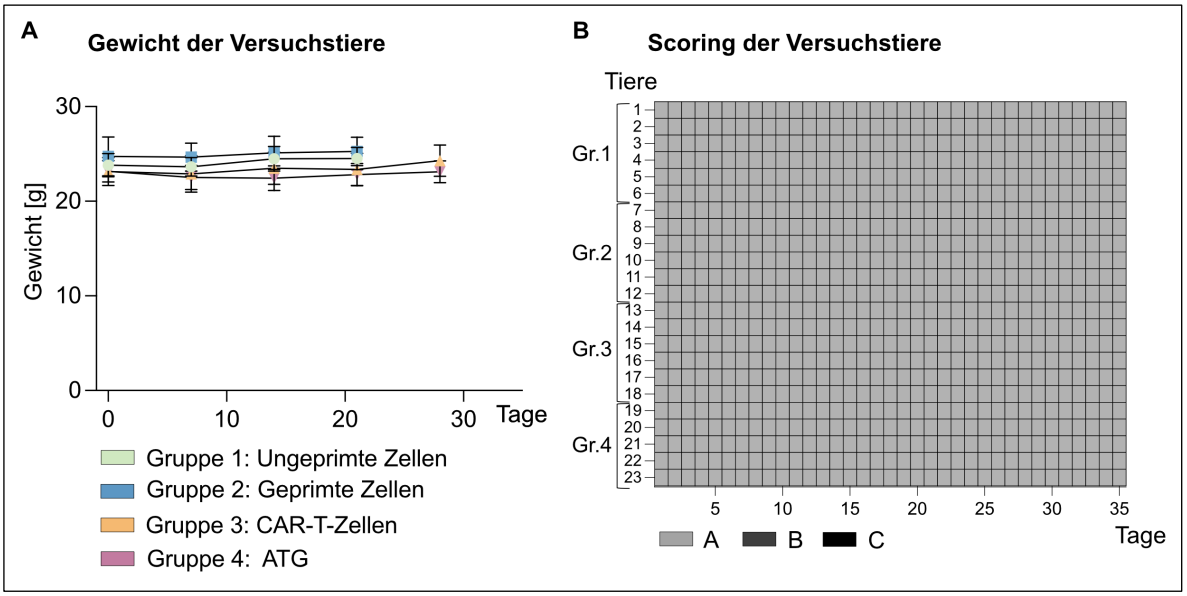


Abbildung 10: Gewichtsentwicklung und klinisches Scoring der Versuchstiere. Übersicht der verschiedenen Überwachungskriterien der Mäuse im Versuchsverlauf. **A:** Verlauf des Körpergewichts der Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum. **B:** Klinisches Scoring der Versuchstiere anhand eines semiquantitativen Schemas von A (keine Belastung) über B (mittlere Belastung) zu C (starke Belastung).

Die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere zeigte sich in allen vier Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum stabil. Es trat bei keiner Maus eine Gewichtsreduktion über 5 % auf (Abbildung 10A). Das Monitoring des Tierwohls mittels Scoring-Schema zeigte, dass alle Tiere während des gesamten Untersuchungszeitraums in Kategorie A eingestuft waren. Es waren keine klinischen Anzeichen einer Belastung erkennbar und es musste keine medizinische Versorgung eingeleitet werden (Abbildung 10B).

4.2.2 Analyse des Mausblutes

Im Verlauf des *In-vivo*-Versuchs wurden zu drei definierten Zeitpunkten durchflusszytometrische Analysen des Mausblutes durchgeführt. An Tag 0 erfolgte die Analyse zum Zeitpunkt der Transplantation. Zwei Wochen nach der Injektion ungeprimter T-Zellen in Gruppe 1 sowie geprimter T-Zellen in den Gruppen 2 bis 4 wurde an Tag 28 erneut Blut untersucht. Eine Woche nach Applikation der Immuntherapie erfolgte die abschließende Analyse in Gruppe 3 nach CAR-T-Zelltherapie und in Gruppe 4 nach ATG-Gabe an Tag 35.

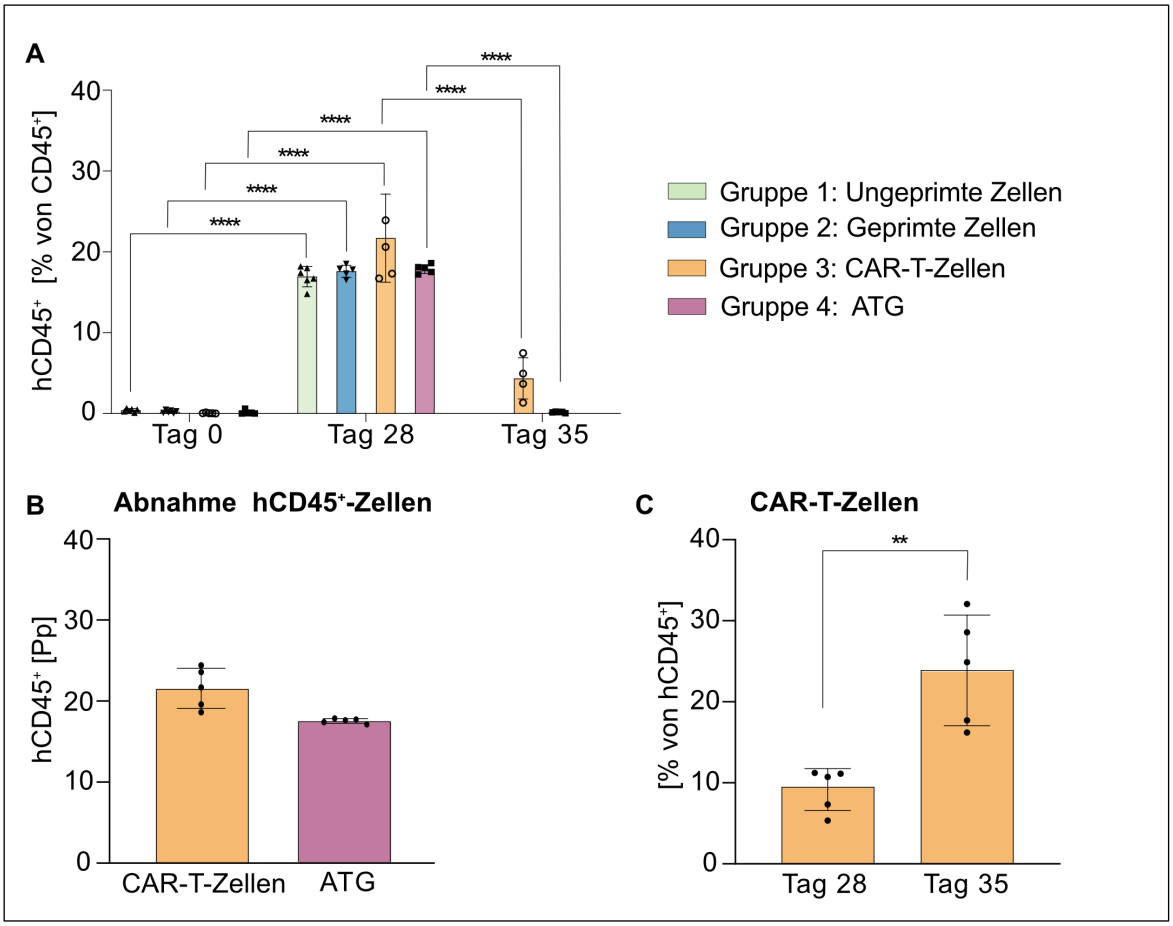


Abbildung 11: Analyse der Verteilung von humanen CD45⁺-Lymphozyten im Verlauf des *In-vivo*-Versuchs vor und nach Gabe der Immuntherapie. Dynamik muriner (mCD45⁺) und humaner (hCD45⁺) Leukozyten sowie CAR-T-Zellen über 35 Tagen unter Berücksichtigung der vier Versuchsgruppen. **A:** Zeitlicher Verlauf des Anteils mCD45⁺- und hCD45⁺-Leukozyten an der Gesamtheit der CD45⁺-Zellen. **B:** Differenz des Anteils hCD45⁺-Zellen zwischen Tag 28 und Tag 35 in den Gruppen 3 und 4. **C:** Anteil der CAR-T-Zellen an den hCD45⁺ in Versuchsgruppe 4 an Tag 28 und Tag 35. **A-C:** Die Datenpunkte repräsentieren unabhängige biologische Replikate (n=5) und sind als Mittelwert ± SD angegeben. Statistische Analysen erfolgten mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Tukey-Post-hoc-Test (A) sowie ungepaartem t-Test mit Welch Post-hoc-Test (B, C). Signifikanzniveaus: $^{**}p < 0{,}01$, $^{****}p < 0{,}0001$.

Nach dem Gating der humanen CD45⁺-Zellen (hCD45⁺) aus der Gesamtheit der CD45⁺-Leukozyten zeigte sich die Dynamik der humanen Lymphozyten im Versuchsverlauf. Vor den Interventionen (Tag 0) waren in keiner Versuchsgruppe humane Lymphozyten nachweisbar. Zwei Wochen nach der Hauttransplantation und Zellgabe an Tag 14 konnte in allen Gruppen, die humane Immunzellen erhalten hatten, ein signifikanter Anstieg des Anteils an hCD45⁺-Zellen [%] im Vergleich zu Tag 0 festgestellt werden ($p < 0{,}0001$). Nach Gabe der Immuntherapie an Tag 28 zeigte sich bis Tag 35 ein signifikanter Rückgang des Anteils an hCD45⁺-Zellen in

den Gruppen, die CAR-T-Zellen oder ATG erhalten hatten ($p < 0{,}0001$) (Abbildung 11A).
Die Analyse der Differenz der hCD45$^+$-Anteile zwischen Tag 28 und Tag 35 zeigte, dass es sowohl in der Gruppe der CAR-T-Zellen als auch in der ATG-Gruppe zu einer deutlichen Reduktion kam, mit einer stärkeren, jedoch nicht signifikanten, Abnahme in der CAR-T-Zell-Gruppe (Abbildung 11B).
Eine detaillierte Untersuchung des Anteils der CAR-T-Zellen an den hCD45$^+$-Zellen [%] in der CAR-T-Zell-Gruppe ergab zudem eine signifikante Zunahme von Tag 28 auf Tag 35 ($p < 0{,}01$) (Abbildung 11C).
Insgesamt zeigte sich, dass die Injektion humaner Immunzellen zu einer Etablierung humaner T-Zellen im peripheren Blut des Mausmodells führte. Die Immuntherapie bewirkte eine Abnahme des Anteils humaner Leukozyten, während gleichzeitig in der CAR-T-Zell-Gruppe eine relative Anreicherung der spezifischen Effektorzellen innerhalb der humanen Population beobachtet werden konnte.

Die durchflusszytometrischen Analysen dieser Veränderungen der Zellpopulationen, inklusive der Verteilung der geprimten Zellen und CAR-T-Zellen, lassen sich beispielhaft in Gruppe 3 veranschaulichen.

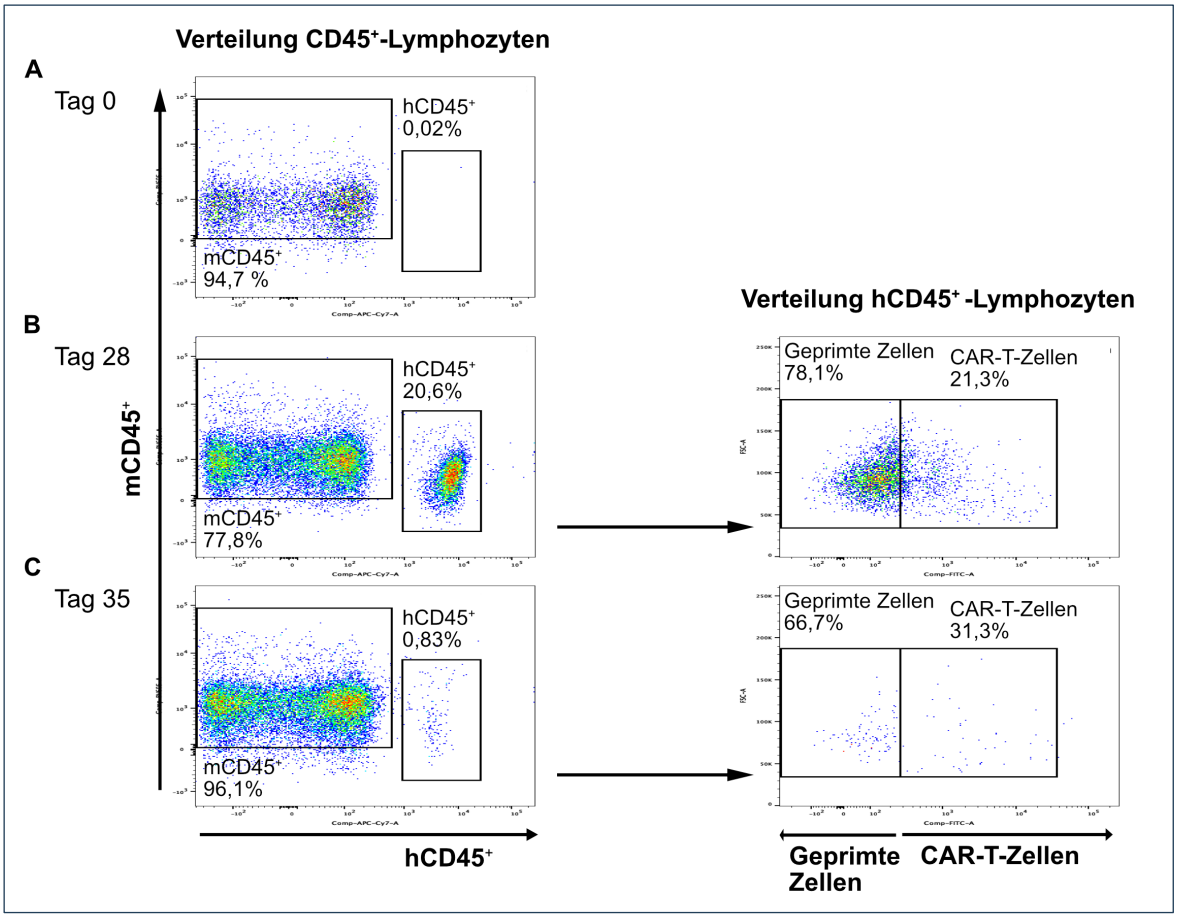


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der CD45⁺- und hCD45⁺-Lymphozytenverteilung während des Versuchsverlauf der Gruppe 3 (CAR-T-Zellen). Gegenüberstellung von FACS-Plots der jeweiligen Messzeitpunkte sowie detaillierte Analyse der Verteilung der hCD45⁺-Verteilung an Tag 28 und Tag 35. **A:** Darstellung der murinen CD45⁺-Lymphozyten an Tag 0 vor der Injektion humaner Zellen. **B:** Verteilung der CD45⁺-Lymphozyten zwei Wochen nach Injektion der geprimten PBMC zum Zeitpunkt der CAR-T-Zellapplikation. **C:** Verteilung der CD45⁺-Lymphozyten eine Woche nach CAR-T-Zelltherapie. Repräsentative FACS-Plots aus Gruppe 3.

Zu Beginn lag der Anteil an mCD45⁺-Zellen im Mausblut zum Messzeitpunkt an Tag 0 bei 94,7 % (Abbildung 12A). Zwei Wochen nach der Injektion der geprimten PBMC, unmittelbar nach der CAR-T-Zell-Applikation, stieg der Anteil der hCD45⁺-Zellen auf 20,6 % an der Gesamtheit der PBMC. Das Gating der hCD45⁺-Zellen zur Unterscheidung der CAR-T-Zellen von den geprimten Zellen ergab einen Anteil der CAR-T-Zellen von 21,3 % innerhalb der hCD45⁺-Population (Abbildung 12B). Eine Woche nach der Gabe der CAR-T-Zellen an Tag 35 sank der Anteil der hCD45 -Zellen auf 0,83 %, während der Anteil mCD45⁺-Zellen auf 96,1 % anstieg. Innerhalb der hCD45⁺-Zellen entfielen 66,7 % auf geprimte Zellen und 31,3 % auf CAR-T-Zellen (Abbildung 12C).

Für eine detaillierte Analyse der humanen Effektorzellen in der Versuchsgruppe 3 (CAR-T-Zellen) erfolgte ein separates Gating zur Erfassung von Verteilung, Aktivierung und Vitalität von geprimten Zellen und CAR-T-Zellen an den Messzeitpunkten Tag 28 und Tag 35.

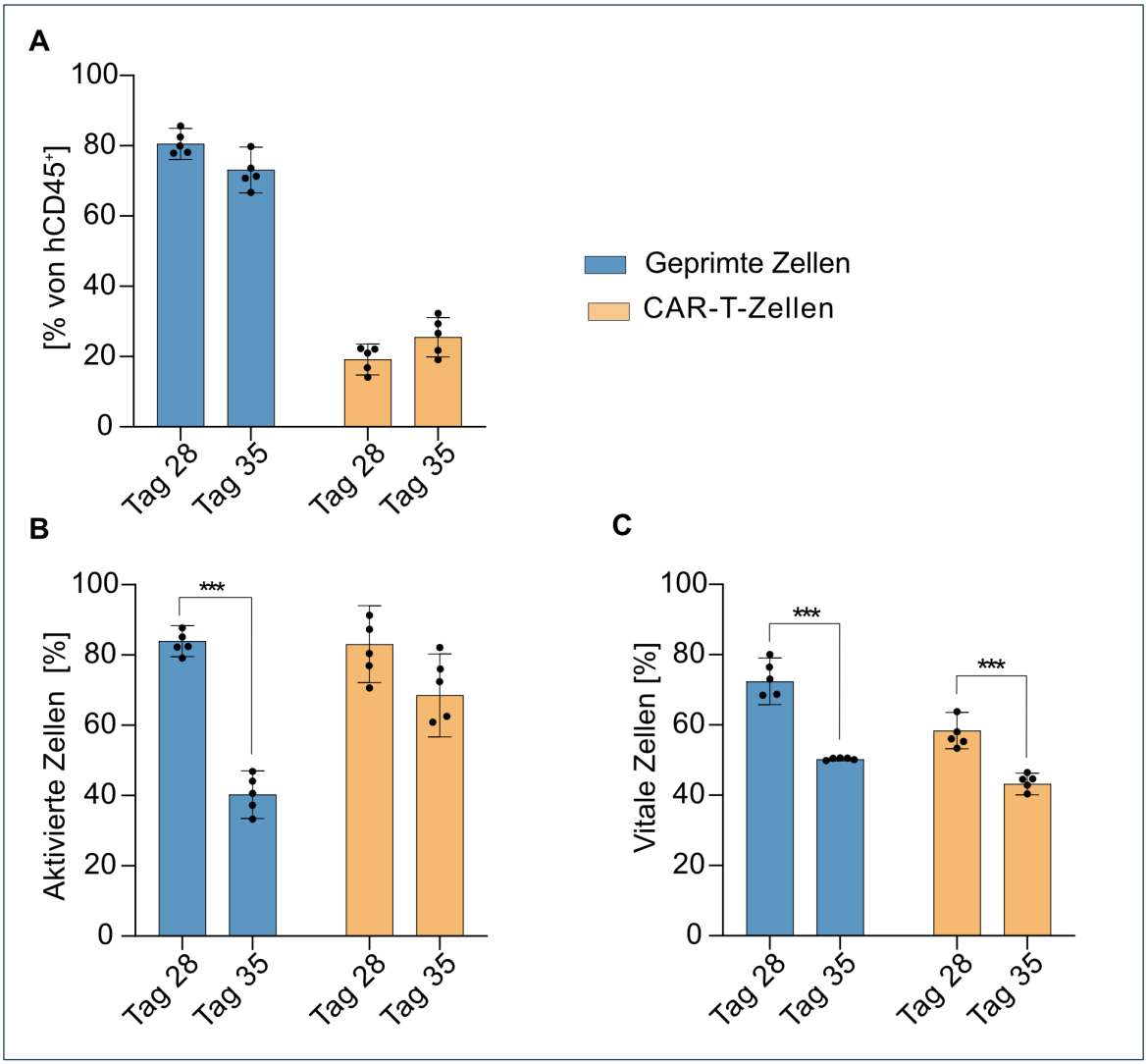


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung und funktionelle Analyse der humanen Effektorzellen der Versuchsgruppe 3 (CAR-T-Zellen) an Tag 28 und Tag 35. Gegenüberstellung der jeweiligen Anteile der Zellpopulationen. **A:** Anteile der geprimten Zellen und CAR-T-Zellen an $hCD45^+$-Zellen im Zeitverlauf. **B:** Anteil der aktivierten ($CD25^+/CD69^+$) Zellen unter den geprimten Zellen und CAR-T-Zellen. **C:** Anteile der vitalen (Annexin V^-) geprimten Zellen und CAR-T-Zellen an der Population der $hCD45^+$. **A-C:** Datenpunkte repräsentieren unabhängige biologische Replikate (n=5) und sind als Mittelwert ± SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Šidák-Post-hoc-Test. Signifikanzniveau: ***$p < 0{,}001$.

Im Vergleich des Anteils an der Gesamtheit der $hCD45^+$-Zellen zeigte sich bei den geprimten Zellen ein Rückgang vom Messzeitpunkt Tag 28 bis Tag 35, während der Anteil der CAR-T-Zellen im gleichen Zeitraum anstieg, jedoch ohne statistische

Signifikanz (Abbildung 13A). Die Analyse des Anteils aktivierter ($CD25^+/CD69^+$) Zellen innerhalb der $hCD45^+$-Population zeigte in beiden Gruppen einen Rückgang im zeitlichen Verlauf. Bei den geprimten Zellen war dieser Abfall statistisch signifikant ($p < 0{,}001$), während der Aktivitätsverlust der CAR-T-Zellen keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 13B).
Auch der Anteil vitaler ($Annexin^-$) Zellen nahm in beiden Gruppen zwischen Tag 28 und Tag 35 ab. Sowohl bei den geprimten Zellen als auch bei den CAR-T-Zellen war dieser Vitalitätsverlust statistisch signifikant ($p < 0{,}001$), wobei die Abnahme der geprimten Zellen numerisch ausgeprägter war (Abbildung 13C).
Insgesamt zeigen diese Daten, dass die CAR-T-Zellen nach Applikation einen stabileren Anteil innerhalb der humanen Zellpopulation aufrechterhalten konnten als die geprimten Zellen und gleichzeitig eine geringere Abnahme der Aktivierung aufwiesen.

4.2.3 Histologische Auswertung der Transplantate

Zur weiteren Auswertung der *In-vivo*-Versuche erfolgte die Entnahme der Transplantate zum Zeitpunkt der Euthanasie. In den Kontrollgruppen 1 und 2 wurde die Entnahme an Tag 28 nach der Transplantation durchgeführt, um die Wirkung der Gabe humaner Immunzellen zu analysieren. In den Versuchsgruppen 3 und 4 erfolgte die Entnahme an Tag 35 zur Beurteilung der therapeutischen Effekte der CAR-T-Zellen und der ATG-Gabe.

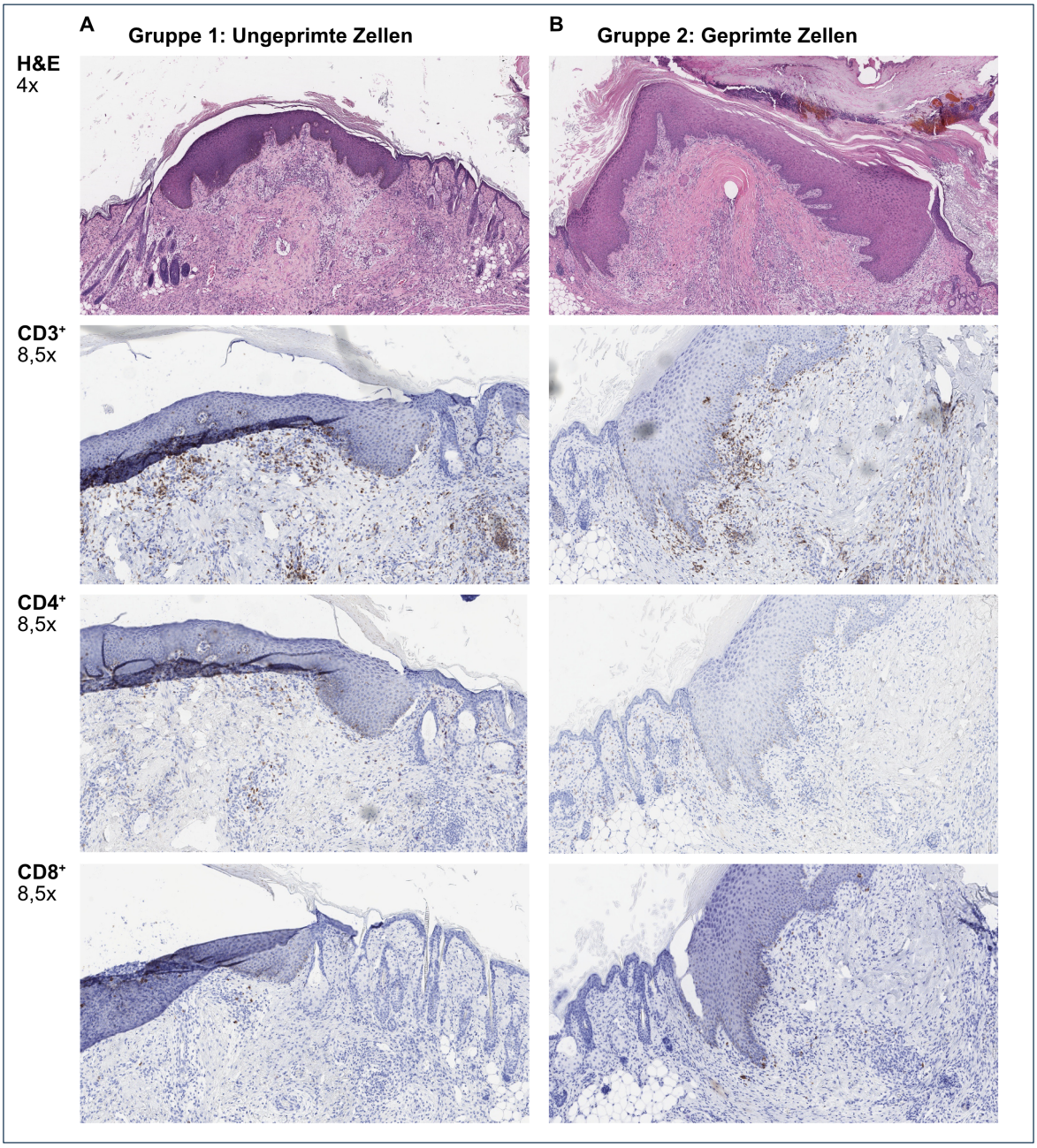


Abbildung 14: Histologische und immunhistochemische Gegenüberstellung der humanen Hauttransplantate von Versuchsgruppe 1 (A: Ungeprimte Zellen) und 2 (B: Geprimte Zellen). Vergleichende Analyse nach Induktion einer Immunreaktion durch ungeprimte und geprimte T-Zellen. Die erste Reihe zeigt die H&E-Färbung in 4-facher Vergrößerung als Übersicht. Die folgenden Reihen zeigen die immunhistochemische Detektion der humanen T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 jeweils bei 8,5-facher Vergrößerung. **A:** Präparat von Versuchsgruppe 1 nach Injektion ungeprimter Zellen an Tag 28. **B:** Präparat aus Versuchsgruppe 2 nach Injektion geprimter Zellen an Tag 28. Repräsentative Bilder aus zwei Aufnahmen pro Tier pro Kohorte.

Abbildung 14 zeigt histologische Schnitte mit den morphologischen und immunhistochemischen Veränderungen der Versuchsgruppen 1 (Abbildung 14A) und 2 (Abbildung 14B) zum Zeitpunkt Tag 28. In der H&E-Übersichtsaufnahme

präsentierten sich beide Gruppen mit vollständig erhaltenem Transplantatgewebe, einschließlich regelrechter Epidermis und intakter Basalschicht. Es waren keine vollständigen Gewebszerstörungen erkennbar. In beiden Gruppen zeigten sich überwiegend fokale, perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate. Unterschiede in der Gewebeintegrität zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden.

Die immunhistochemische Färbung für CD3 wies in beiden Gruppen T-Lymphozyten im Bereich des Transplantats nach. In Gruppe 1 waren $CD3^+$-T-Zellen vereinzelt bis mäßig in der Dermis nachweisbar, insbesondere perivaskulär und an der Übergangszone zum Transplantat. Gruppe 2 zeigte ein dichteres und ausgedehnteres Infiltrat von $CD3^+$-T-Zellen, teilweise in Form von Zellaggregaten, vor allem an der Grenzfläche zwischen Transplantat und umliegenden Gewebe. Die Anzahl der $CD4^+$-T-Helferzellen war in beiden Gruppen gering und ohne fokale Anhäufung. Ein relevanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht erkennbar. In der CD8-Immunhistochemie wurden in beiden Gruppen wenige $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen gefunden. In Gruppe 2 war die $CD8^+$-T-Zellinfiltration nach Gabe geprimter Zellen diskret größer und überlappte perivaskulär mit den $CD3^+$-T-Zellinfiltraten.

Die hinsichtlich der Gruppenzuordnung verblindete Pathologin bewertete das Transplantat der Gruppe 1 als von resorptiv und vernarbenden Veränderungen geprägt, begleitet von geringen lymphohistiozytären Infiltraten und einer Vermehrung fibroblastärer Zellen. Es zeigten sich keine Anzeichen von Interfaceaktivität und zytotoxischen T-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde das Transplantat aus Gruppe 2 als Interfacedermatitis mit Basalzellvakuolisierung und basal gelegenen Einzelzellnekrosen, auch im Bereich des Follikelepithels, bewertet. Es lagen perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate mit Beteiligung zytotoxischer $CD8^+$-T-Zellen vor.

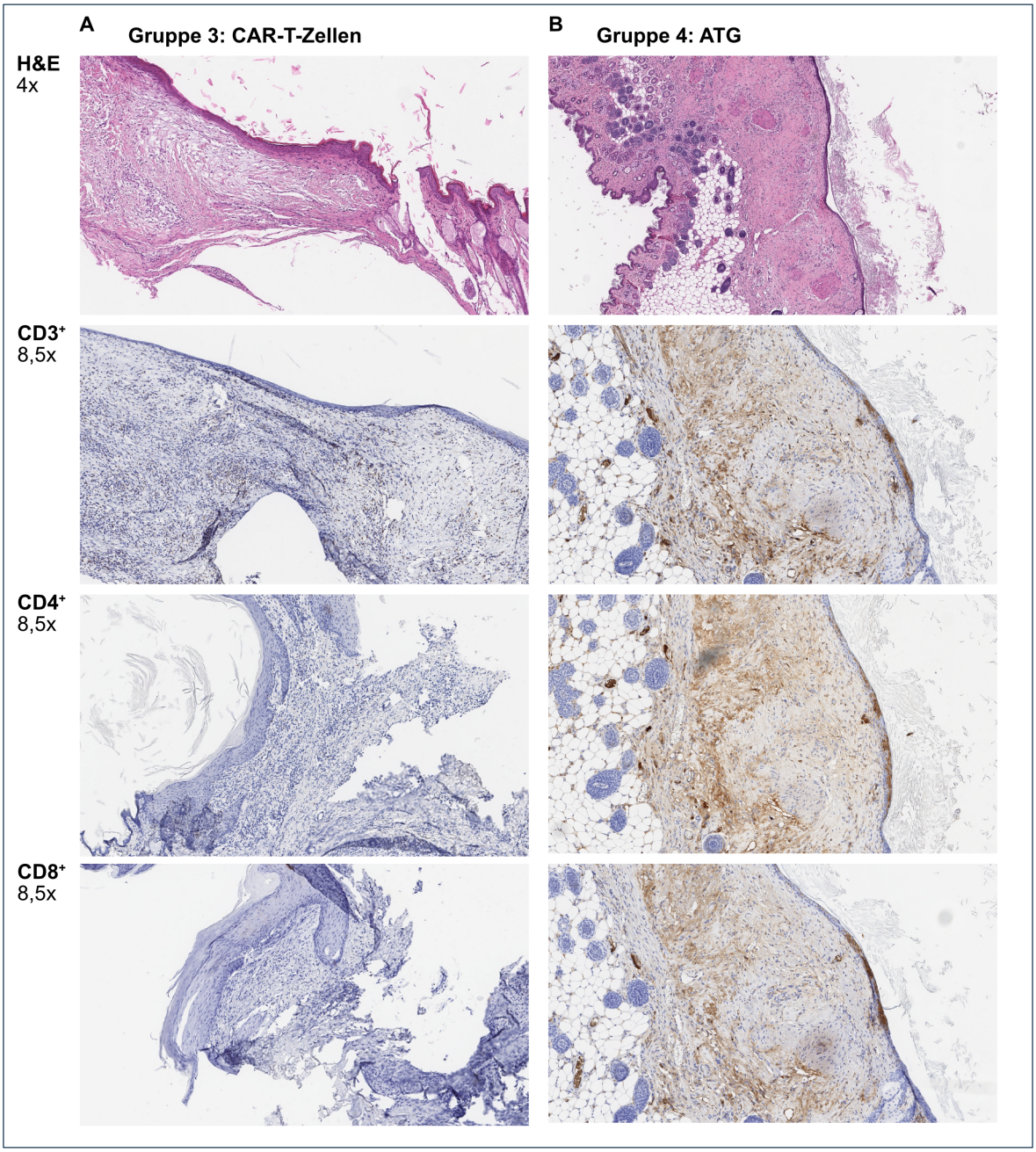


Abbildung 15: Histologische und immunhistochemische Gegenüberstellung der humanen Hauttransplantate nach Gabe der Immuntherapie von Versuchsgruppe 3 (A: CAR-T-Zellen) und 4 (B: ATG). Vergleichende Analyse nach Induktion einer Immunreaktion durch geprimte T-Zellen anschließender Immuntherapie an Tag 35. Die oberste Reihe zeigt H&E-Übersichtsaufnahmen bei 4-facher Vergrößerung. Die folgenden Reihen zeigen die immunhistochemischen Färbung für humane CD3, CD4 und CD8 (jeweils 8,5-fach) T-Zellen. **A:** Schnittpräparate von Versuchsgruppe 3 nach Applikation von CAR-T-Zellen. **B:** Schnittpräparate von Versuchsgruppe 4 nach ATG-Behandlung. Repräsentative Bilder aus 2 Aufnahmen pro Tier pro Kohorte.

Abbildung 15 zeigt histologische sowie immunhistochemische Schnitte der Versuchsgruppen 3 (Abbildung 15A) und 4 (Abbildung 15B). Beide Gruppen

erhielten nach Gabe geprimter humaner T-Zellen zur Induktion einer Abstoßungsreaktion unterschiedliche therapeutische Ansätze zur Suppression der Immunantwort. In Gruppe 3 erfolgte an Tag 28 die Injektion von CAR-T-Zellen, in Gruppe 4 die Gabe von ATG als Standard Immunsuppressivum.

Die H&E-Übersichtsaufnahmen zeigten in Gruppe 3 ein fest integriertes Transplantat mit intakter Epidermis und Dermis sowie erhaltener Gewebearchitektur. Es zeigten sich keine ausgeprägten zellulären Infiltrate oder strukturellen Veränderungen. Die Hautstruktur wirkte homogen mit regulärem Hautrelief. Im Gegensatz dazu zeigte das Transplantat der Gruppe 4 eine Gewebsschädigung mit Strukturauflösung und vermehrten Zellansammlungen, insbesondere am Übergang vom Transplantat zum umgebenden Gewebe, was auf eine zelluläre Reaktion hinweist.

Die immunhistochemische Färbung für CD3 veranschaulichte in Gruppe 3 vereinzelte perivaskuläre sowie diffus verteilte $CD3^+$-Zellen ohne fokale Verdichtungen. In Gruppe 4 waren dagegen vermehrte, flächige $CD3^+$-T-Zell-Ansammlungen an der Grenzfläche zwischen Transplantat und umliegendem Gewebe sichtbar, mit erhöhter Färbungsintensität und Zellzahl im Vergleich zu Gruppe 3. Die CD4-Färbung zeigte in Gruppe 3 wenige, unauffällig verteilte $CD4^+$-T-Zellen ohne Aggregatbildung, während in Gruppe 4 zahlreiche $CD4^+$-T-Zellen, oft in dichten Zellansammlungen mit starker Färbung, sowohl im Transplantat als auch am Rand nachweisbar waren.

Die CD8-Immunhistochemie zeigte in Gruppe 3 eine geringe, gleichmäßige Verteilung einzelner $CD8^+$-T-Zellen ohne Verdichtung, während in Gruppe 4 viele $CD8^+$-T-Zellen sowohl einzeln als auch in Gruppen, insbesondere an der Grenzfläche von Transplantat und umliegendem Gewebe, gefunden wurden.

Die bezüglich der Gruppenzuordnung verblindete Pathologin bewertete das Transplantat in Gruppe 3 als angewachsen mit mäßiger Entzündungsreaktion und kaum erkennbarem Abstoßungsgeschehen. Das Transplantat der Gruppe 4 wurde ohne Interfaceaktivität beurteilt, jedoch mit vereinzelten subepidermalen Einblutungen, einer geringen Vermehrung interstitieller Fibroblasten sowie einer minimalen perivaskuläre Entzündung. Die immunhistochemische Färbung für LNGFR in den Präparaten der Gruppe 3 ergab keinen nachweisbaren Befund.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zunächst *In-vitro*-Modelle etabliert, mit denen sich eine allogene Immunantwort durch das Priming peripherer mononukleärer Blutzellen nachweisen und funktionell untersuchen ließ. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Entwicklung eines humanisierten Mausmodells, in dem der adoptive Transfer geprimter T-Zellen eine reproduzierbare Transplantatreaktion hervorrief. Dabei zeigte sich, dass sich die transplantatspezifische Immunantwort sowohl unter konventioneller Immunsuppression mit ATG als auch beim experimentellen Einsatz von αβ-CAR-T-Zellen veränderte. Mittels Durchflusszytometrie konnten die übertragenen Zellen hinsichtlich ihrer Präsenz sowie ihres funktionellen Zustands anhand spezifischer Aktivierungs- und Erschöpfungsmarker quantifiziert und charakterisiert werden. Ergänzend lieferten histologische Untersuchungen des Transplantatgewebes, einschließlich immunhistochemischer Färbungen, Hinweise auf Unterschiede in der zellulären Infiltration und trugen damit zur Beurteilung der Wirksamkeit der jeweiligen Therapieansätze bei.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse detailliert diskutiert, kritisch eingeordnet und in den aktuellen Stand der Forschung verortet.

5.1 *In-vitro*-Ergebnisse

5.1.1 Bestrahlung von Stimulationszellen

Ein *In-vitro*-Modell zur Simulation von Abstoßungsreaktionen muss die drei Phasen der T-Zellaktivierung abbilden: Induktionsphase, Expansionsphase und Effektorphase (Shipkova und Wieland 2012). In der untersuchten Kokultur wurde hierfür eine Spender-PBMC-Population durch Zugabe einer bestrahlten Empfänger-PBMC-Population aktiviert. Nach einer Proliferationsphase wurden die Spenderzellen dann erneut mit unbestrahlten Empfängerzellen für die Effektorphase exponiert.

Die Etablierung solcher *In-vitro*-Modelle zur Simulation allogener Immunantworten wurde erstmals1963 beschrieben (Bain *et al.* 1963) und hat sich seitdem in Form der gemischten Lymphozytenkulturen (MLR) seit Jahrzenten in der Forschung bewährt. Dabei werden durch die gemeinsame Kultivierung von Lymphozyten zweier genetisch unterschiedlicher Individuen die Erkennung und Proliferation

fremder Alloantigene abgebildet (Kornbluth *et al.* 1981). Häufig werden dabei zellbasierte Ansätze mit Stimulatorzellen eingesetzt, um die Expansion von T-Zellen zu ermöglichen. Diese imitieren die physiologische Aktivierung von T-Zellen, da sie über den T-Zell-Rezeptor auch kostimulatorische Liganden bereitstellen (Benavidez Arias *et al.* 2024). Dabei wird der Übergang von naiven zu aktivierten T-Zellen als T-Zell-Priming bezeichnet (Chen und Flies 2013).

Stimulatorzellen sind adhärente, wachstumsinaktivierte, aber weiterhin bioaktive Zellen, die über lösliche und membrangebundene Faktoren das Überleben und die Expansion von Zielzellen unterstützen. Diese Zellen werden bestrahlt, um eine unkontrollierte Proliferation der Stimulatorzellen zu verhindern. Durch Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wird die Zellteilung unterdrückt, ohne den Stoffwechsel oder die Fähigkeit zur Bereitstellung kostimulatorischer Signale unmittelbar zu beeinträchtigen. Das macht sie für MLR-Experimente geeignet (Llames *et al.* 2015).

Für die durchgeführten Experimente war es entscheidend, eine Bestrahlungsintensität zu wählen, die vor dem Eintritt der Apoptose eine ausreichende Zeitspanne zur Aktivierung der Spenderzellen ermöglichte. Bei 30 Gy war der Vitalitätsverlust im Vergleich zu höheren Bestrahlungsintensitäten erst nach 48 Stunden signifikant. Nach 96 Stunden wiesen alle bestrahlten Gruppen vergleichbar niedrige Überlebensraten unter 15 % auf. Diese Ergebnisse deckten sich mit Daten aus der Literatur, die zeigen, dass ab einer Bestrahlung mit 25 Gy keine T-Zellproliferation mehr nachweisbar ist, während die Antigenpräsentation erhalten bleibt (Aboufazeli *et al.* 2017, de Andrade *et al.* 2014). Viele Studien verwenden deshalb eine Bestrahlungsintensität von 30 Gy, um die Proliferationsfähigkeit der Stimulationszellen sicher auszuschließen (Cao *et al.* 2004, Juhl *et al.* 2021, Kwon *et al.* 2018, Lin *et al.* 2009).

Damit bestätigte sich, dass unser experimentelles Setting eine isolierte allospezifische T-Zellantwort ermöglichte, indem unerwünschte Hintergrundreaktionen durch proliferierende Empfängerzellen zuverlässig unterbunden wurden. Die Bestrahlung stellt somit eine effektive Methode dar, um die Expansion der Stimulatorzellen zu verhindern, während die für das Priming notwendige Antigenpräsentation erhalten bleibt.

5.1.2 Priming alloreaktiver T-Zellen

Die beschriebene Art der MLR wird als unidirektionale MLR bezeichnet, bei der die Proliferation der Zellen auf eine Spenderpopulation beschränkt ist, die durch eine bestrahlte Empfängerpopulation stimuliert wird (Juhl *et al.* 2021).

In dieser Studie wurde beobachtet, dass das Verhältnis von Empfänger- zu Spenderzellen einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß der T-Zellaktivierung hatte. In allen allogen stimulierten Gruppen nahm der Anteil aktivierter Spender-T-Zellen ($CD25^+/CD69^+$) stärker zu als in der ungeprimten Kontrollgruppe. Dabei wurde die Aktivierung der geprimten Zellen über die Rezeptorproteine CD25 und CD69 gemessen, die typischerweise auf proliferierenden Lymphozyten hochreguliert sind (Shipkova und Wieland 2012). Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei einem Verhältnis von 10:1, bei dem sich die stärkste Zunahme aktivierter Zellen sowie die größten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe zeigte. Eine weitere Anhebung des Verhältnisses auf 20:1 oder 40:1 führte hingegen zu keiner zusätzlichen Steigerung der Aktivierung. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei höheren Zellzahlen nicht ausreichend antigenpräsentierende Zellen zur Verfügung standen oder weil Nährstoffe und Wachstumsfaktoren limitierend wirkten (Benavidez Arias *et al.* 2024).

In der Kokultur über zwölf Tage erwies sich demnach ein Überschuss an Spender-T-Zellen (10:1) als vorteilhaft. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in diesem Verhältnis eine ausreichende Kooperation zwischen T-Zellen ermöglicht wird, ohne die Vitalität der Population zu beeinträchtigen. Tatsächlich zeigten alle Ansätze vergleichbare Anteile vitaler Zellen, was darauf hindeutet, dass alle Zellen im Beobachtungszeitraum zum Ende genug Nährstoffe zur Verfügung hatten und keine Apoptose der Zellen induziert wurde. Zudem wurde die Entwicklung, Funktion und das Überleben der T-Zellen durch die Zugabe der Zytokine IL-7 und IL-15 unterstützt, die beide unterschiedliche, aber komplementäre Funktionen in der T-Zellhomöostase einnehmen (Tan *et al.* 2001, 2002). Andere Forschungsergebnisse zeigen, dass verschiedene Zytokine neben oder zusätzlich zu IL-2, wie IL-7, IL-12 oder IL-15, die T-Zellproliferation in Kultursystemen steigern können (Ramanathan *et al.* 2008). Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Zugabe exogener Zytokine die in dieser Studie beobachteten Priming-Ergebnisse beeinflusst haben könnten, da diese unabhängig von alloantigenspezifischen Stimuli insbesondere $CD8^+$-T-Zellen aktivieren können.

Der beobachtete Einfluss der Zytokine könnte auch zur Erklärung der Unterschiede zwischen $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen in diesen Analysen beitragen. Während $CD4^+$-T-Zellen in der geprimten Gruppe im Vergleich zu ungeprimten Zellen eine signifikante Zunahme der Aktivierung zeigten, fiel der Anstieg bei $CD8^+$-T-Zellen weniger spezifisch aus. Auch in den Kontrollgruppen war eine Aktivierungszunahme erkennbar, was auf eine unspezifische, zytokinvermittelte Stimulation hinweist. Diese Beobachtungen stehen damit im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls zeigen konnten, dass $CD4^+$-T-Zellen in der MLR effizientere und zielgerichtetere Immunantworten entwickeln als $CD8^+$-T-Zellen (Mangelinck *et al.* 2024). Die unspezifische verstärkte Aktivierung der $CD8^+$-T-Zellen könnte außerdem durch Hilfsfunktionen der $CD4^+$-T-Zellen unterstützt worden sein (Kitagawa *et al.* 1991).

Als weiterer Ansatz wurde in dieser Studie der Einfluss der Zugabe frischer, bestrahlter Empfängerzellen an Tag 6 auf die allogene Stimulation untersucht. Ein vergleichbares experimentelles Vorgehen wurde bereits in einem sogenannten „Zwei-Runden-MLR“-Modell beschrieben, bei dem nach einer initialen Allostimulation an Tag 0 dieselben Spenderzellen an Tag 6 erneut mit frischen Stimulatorzellen exponiert wurden (Kwon *et al.* 2018). In der vorliegenden Untersuchung führte diese Reexposition jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der T-Zell-Aktivierung im Vergleich zur einfachen Priming-Bedingung. Dies deutet darauf hin, dass das System bei einem Verhältnis von 10:1 möglicherweise bereits eine Sättigung erreicht hatte oder ein zusätzlicher Stimulus keine weitere Steigerung der Aktivierung bewirken konnte. Alternativ ist denkbar, dass Unterschiede erst im Verlauf einer verlängerten Kultivierungsdauer detektierbar wären. Eine ergänzende Analyse der Zytokinfreisetzung könnte in diesem Zusammenhang zusätzliche funktionelle Unterschiede zwischen den Ansätzen aufzeigen und sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Um eine ausreichende Proliferation der geprimten Spenderlymphozyten sicher zu stellen, wurde ein Zeitraum der Kokultur von zwölf Tagen gewählt. Frühere Studien zeigen, dass bereits nach wenigen Tagen Gedächtnis-MLR-Reaktionszellen gebildet werden können (Roy *et al.* 2001). Solche Gedächtniszellen lassen sich bei erneuter Antigenexposition schnell reaktivieren, proliferieren und entfalten Effektorfunktionen. So vermitteln diese auch bei erneutem Kontakt mit

Alloantigenen nach Transplantationen beschleunigte Abstoßungsreaktionen (Sabins *et al.* 2016). In den durchgeführten Versuchen sollten naive T-Zellen geprimt werden, um solche Effektorfunktionen auslösen zu können. Die Daten legen nahe, dass eine solche Konversion erfolgt ist, es fehlen jedoch Analysen der Phänotypen der generierten Zellen um eine eindeutige Aussage dazu treffen zu können. Ob und welche Art von Gedächtniszellen gebildet wurden, kann mit diesen Untersuchungen demnach nicht sicher belegt werden.

Zusammenfassend legen die beobachteten Ergebnisse nahe, dass in den durchgeführten Versuchen $CD4^+$-T-Zellen in der unidirektionalen MLR die Hauptträger der spezifischen Immunantwort darstellen, während $CD8^+$-T-Zellen anfälliger für unspezifische Stimuli sind. Ein Verhältnis von 10:1 zwischen Spender- zu Empfängerzellen zeigte in diesen Experimenten die größte Zunahme an aktivierten T-Zellen ohne Vitalitätsabfall. Deshalb wurden geprimte Zellen in diesem Verhältnis im folgenden Versuch erneut mit Empfängerzellen exponiert, um eine allogene T-Zellantwort auszulösen.

5.1.3 Reexposition geprimter T-Zellen

Zur Simulation der Effektorphase einer Transplantatabstoßung (Shipkova und Wieland 2012) wurden die zuvor geprimten Lymphozyten erneut mit unbestrahlten Stimulatorzellen exponiert. Im Vergleich zu naiven T-Zellen zeigten die voraktivierten Spenderzellen eine deutlich stärkere Expansion, während der Zuwachs der T-Zellen in den Kontrollgruppen klar begrenzt blieb.

Dieses Ergebnis spiegelt das Prinzip der immunologischen Gedächtnisbildung wider. Geprimte T-Zellen reagieren bei erneutem Antigenkontakt schneller und effizienter mit einer proliferativen Antwort (Kornbluth *et al.* 1981). Besonders deutlich war dieser Effekt bei $CD4^+$-T-Zellen, deren Zuwachs in den geprimten Gruppen signifikant höher war als in den Kontrollgruppen. Auch $CD8^+$-T-Zellen zeigten eine verstärkte Proliferation, allerdings ohne statistische Signifikanz, da auch in den Kontrollgruppen eine gewisse unspezifische Zellvermehrung nachweisbar war. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in diesem Experiment die $CD4^+$-T-Zellen die Hauptträger der spezifischen immunologischen Erinnerung darstellen, während die $CD8^+$-T-Zellen stärker durch unspezifische Stimuli beeinflusst wurden.

Kokulturzeiten über zehn bis 14 Tage können mit abnehmenden Proliferationsraten einhergehen. In früheren Arbeiten wurden maximale Zellzahlen bereits zehn Tage nach Aussaat beschrieben (Lin *et al.* 2009). Zukünftige Experimente sollten deshalb untersuchen, ob ein Sekundärreiz die maximale Proliferationskapazität erhöht.
Eine mögliche Erklärung für die limitierte Proliferation der ungeprimten Zellen ergibt sich aus dem Vergleich mit der bidirektionalen MLR. In diesem Ansatz führt die wechselseitige Stimulation zweier Zelllpopulationen, ohne vorherige Inaktivierung der Stimulatorzellen, zu einer gegenseitigen Hemmung der Proliferation (Vodopick *et al.* 1969). Hinzu kommt, dass die Zellen um essentielle Nährstoffe konkurrieren, was das Wachstum zusätzlich einschränkt (Benavidez Arias *et al.* 2024). Insgesamt stützen diese Beobachtungen die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse, wonach die unidirektionale MLR eine direktere und physiologisch relevantere Modellierung alloantigenspezifischer Immunreaktionen ermöglicht.
Die Analyse der Aktivierungsmarker der T-Zellen nach Reexposition zeigte in allen Gruppen eine vergleichbare Kinetik. Der Anteil $CD25^+/CD69^+$-positiver T-Zellen nahm nach 24 Stunden zunächst ab, bevor er zum Zeitpunkt 48 Stunden erneut anstieg. Dieses biphasische Muster lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass hochaktivierte Zellen unmittelbar nach Antigenkontakt ihre Oberflächenmarker im Zuge der Zellteilung oder infolge regulatorischer Mechanismen verlieren, bevor eine erneute Aktivierungsphase einsetzt. Die Expressionsdynamik der untersuchten Marker unterstützt diese Interpretation. CD69 wird typischerweise innerhalb der ersten 24 Stunden hochreguliert, während CD25 als Spätaktivierungsmarker erst nach 72 bis 96 Stunden sein Expressionsmaximum erreicht (Antas *et al.* 2002, Biselli *et al.* 1992, Böhler *et al.* 2007, Reddy *et al.* 2004, Shipkova und Wieland 2012). Dieses zeitliche Muster erklärt, weshalb in diesem Ansatz durch die Analyse von $CD25^+/CD69^+$-doppelpositiven Zellen potenzielle Unterschiede zwischen geprimten und ungeprimten Gruppen weitgehend nivelliert wurden.
Das in den Kontrollansätzen beobachtete Aktivitätsprofil ohne Antigenexposition lässt sich vermutlich ebenfalls durch die Zugabe von IL-7 und IL-15 erklären. Beide Zytokine fördern, wie bereits erläutert, das Überleben und die Proliferation von T-Zellen und können dadurch die Expression beider Aktivierungsmarker auch in Abwesenheit einer TCR-spezifischen Allostimulation erhöhen (Tan *et al.* 2001, 2002).

Ein entscheidender Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bestand in den Überlebensraten. An Tag 16 wiesen die geprimten $CD4^+$-T-Zellen einen signifikant höheren Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu ungeprimten Zellen und der Kontrollgruppe auf. Auch die $CD8^+$-T-Zellen zeigten tendenziell höhere Überlebensraten im Vergleich zu ungeprimten Zellen und Spenderzellen ohne Antigenexposition, wenngleich ohne statistische Signifikanz und insgesamt auf niedrigerem Niveau. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass das Priming die Zellen weniger anfällig für aktivierungsinduzierte Apoptose macht, was mit früheren Arbeiten übereinstimmt (Inaba *et al.* 1999) und den Vorteil der unidirektionalen- gegenüber der bidirektionalen MLR unterstreicht.

Zusammenfassend stützen die generierten Ergebnisse die Hypothese, dass geprimte T-Zellen *in vitro* in Richtung eines gedächtnisähnlichen Phänotyps übergehen und bei erneuter Antigenexposition eine verbesserte Expansion und Überlebensrate zeigten. Dieses Verhalten entspricht klassischen sekundären Immunantworten von Gedächtniszellen (Kornbluth *et al.* 1981). Vor allem $CD4^+$-T-Zellen zeigten in diesen Analysen eine spezifischere und robustere Reaktion, während $CD8^+$-T-Zellen stärker unspezifisch beeinflusst wurden. Damit bestätigt sich, dass die unidirektionale MLR ein geeignetes Modell zur Abbildung sekundärer alloantigenspezifischer Immunantworten darstellt und zugleich eine mögliche translationale Relevanz für das Verständnis von Transplantatabstoßungen bietet.
Um den Priming-Effekt zur gezielten Induktion einer Transplantatabstoßungsreaktion in einem humanisierten Mausmodell zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt geprimte Lymphozyten *in vivo* getestet.

5.1.4 Zytokinprofile nach Restimulation

Zur funktionalen Charakterisierung der geprimten T-Zellen wurde zwölf Stunden nach deren Reexposition an Tag 12 die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-2, TNF-α und IFN-γ bestimmt. Dabei zeigte ausschließlich die geprimte 10:1-Gruppe eine signifikant erhöhte IL-2 Produktion im Vergleich zu den ungeprimten Zellen und den Kontrollgruppen. Für TNF-α und IFN-γ ergaben sich keine messbaren Unterschiede. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die

verbesserte Expansion der geprimten T-Zellen auch funktionell in einer selektiv erhöhten IL-2-Sekretion widerspiegelt.

Im Vergleich zu den Referenzwerten des Herstellerhandbuchs des MACSPlex Human Cytokine Kit lagen die in diesem Versuch gemessenen Konzentrationen insgesamt im Bereich einer milden Stimulation. Während unstimulierte Kontrollen im Herstellerhandbuch IFN-γ-Werte von etwa 47,3 pg/ml, IL-2 von 2,0 pg/ml und TNF-α von 16,9 pg/ml aufweisen, können laut MACSPLex Kit nach starker Stimulation Werte von über 10.000 pg/ml bei IFN-γ erreicht werden. Die in diesen Experimenten erzielten Werte deuten folglich auf eine moderate Immunaktivierung hin und bestätigen die Annahme, dass das gewählte Zeitfenster von zwölf Stunden eher eine frühe Zytokinantwort erfasste.

Die Kinetik der Zytokinsekretionen in MLR-Modellen ist in der Literatur detailliert beschrieben. TNF-α erreicht meist innerhalb weniger Stunden bis zu einem Tag nach Stimulation sein Maximum, IL-2 nach zwei bis drei Tagen, während IFN-γ typischerweise erst zwischen Tag 7 bis Tag 9 Spitzenwerte erreicht (Jordan und Ritter 2002, Reddy *et al.* 2004). Gedächtnis-T-Zellen zeigen jedoch deutlich schnellere Antwortmuster (Volk und Kern 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Gedächtnis-T-Zellen nach Reexposition TNF-α bereits innerhalb von zwei Stunden und IL-2 und IFN-γ bereits nach acht Stunden maximal ausschütten (Mascher *et al. 1999)*. Vor diesem Hintergrund deutet die selektiv erhöhte IL-2-Produktion darauf hin, dass die geprimten $CD4^+$-T-Zellen einen gedächtnisähnlichen Phänotyp entwickelt haben.

IL-2 spielt eine zentrale Rolle für die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen (Shipkova und Wieland 2012). Die gesteigerte IL-2-Produktion stimmt mit der stärkeren Expansion der geprimten T-Zellen überein und unterstützt damit die Hypothese eines funktionell erfolgreichen Primings. Dass TNF-α und IFN-γ keine signifikanten Unterschiede zeigten, könnte auf eine unspezifische Aktivierung durch die exogenen Zytokine IL-7 und IL-15 zurückzuführen sein. Diese können $CD8^+$-T-Zellen unabhängig von alloantigenspezifischen Stimuli aktivieren und dadurch ein Grundniveau an TNF-α und IFN-γ erzeugen (Tan *et al.* 2001, 2002).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das allogene Priming von T-Zellen zu einer selektiv erhöhten IL-2-Sekretion führte, während TNF-α und IFN-γ unverändert blieben. Dieses Muster entspricht nicht der klassischen proinflammatorischen Kaskade einer akuten Abstoßung (Shipkova und Wieland

2012), deutet jedoch auf eine gedächtnisähnliche Konditionierung der geprimten Zellen hin. Für eine genauere Bewertung wären zusätzliche Analysen über mehrere Zeitpunkte, eine erweiterte Zytokinpalette sowie Experimente ohne exogene Interleukinzusätze sinnvoll.

Die *In-vitro*-Daten zeigen deutlich, dass das Priming von Spenderzellen zu einer selektiv gesteigerten Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führte, wodurch diese im Vergleich zu ungeprimten Lymphozyten einen klaren funktionellen Vorteil aufwiesen. Damit konnte bestätigt werden, dass das verwendete Modell grundlegende Mechanismen einer allogenen Immunreaktion abbildet und ein gedächtnisähnliches Antwortmuster erzeugt. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden für die anschließenden *In-vivo*-Experimente gezielt geprimte T-Zellen eingesetzt, die zuvor mit bestrahlten Stimulatorzellen in Kontakt gebracht worden waren. Da diese Stimulatorzellen vom gleichen Spender wie das Hauttransplantat stammten, waren die infundierten Lymphozyten in der Lage, alloantigene Strukturen schneller zu erkennen und entsprechend eine verstärkte Immunreaktion auslösen. Das *In-vitro*-Priming stellt somit einen entscheidenden methodischen Schritt dar, um im humanisierten Mausmodell eine reproduzierbare und klinisch relevante Transplantatabstoßung zu induzieren.

5.2 *In-vivo*-Ergebnisse

5.2.1 Analyse des Mausblutes

Um *In-vivo*-Studien an humanen Zellen und Geweben durchzuführen, ohne den Menschen zu gefährden, wurden verschiedene Modelle mit humanisierten Mäusen entwickelt. Diese entstehen durch Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder PBMC in immundefizienten Mäusen und ermöglichen die Untersuchung menschlicher Immunantworten im Tiermodell (Shultz *et al.* 2007). Mit der Entwicklung der NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ-(NSG)-Maus (Ishikawa *et al.* 2005, Ito *et al.* 2002, Shultz *et al.* 2005) konnte die Effizienz der Humanisierung weiter gesteigert werden. Aufgrund der fehlenden adaptiven Immunantwort eignet sich dieser Mausstamm in besonderem Maße für die Etablierung humaner Immunsysteme aus mehreren Zelllinien (Brehm und Shultz 2012, Ito *et al.* 2012).
Im Studiendesign dieser Arbeit wurde zunächst humanes Hautgewebe in die Nackenregion der Tiere transplantiert. Nach zweiwöchiger Wundheilung erfolgte die intravenöse Gabe von jeweils $3{,}9 \times 10^6$ ungeprimten oder geprimten PBMC.

Letztere wurden zuvor *in vitro* gegen bestrahlte PBMC des Hautspenders sensibilisiert um den Unterschied allogen vorgeprimter Zellen zur Induktion einer Immunantwort zu evaluieren. Zwei Wochen nach Zellapplikation zeigte die FACS-Messung in allen Gruppen einen deutlichen Anstieg von $hCD45^+$-Leukozyten.

Die Engraftment-Raten, also die Ansiedlung $hCD45^+$-Zellen im Mausblut, lagen zwischen 17 % und 21 % und damit im unteren Bereich der in der Literatur beschriebenen erfolgreichen Humanisierungsraten. Während bereits Anteile von über 0,1 % $hCD45^+$-Zellen als erfolgreiche Ansiedelung gelten (King *et al.* 2009), wurden in vergleichbaren NSG-Mausmodellen Werte zwischen 20 bis 60 %(Verma und Wesa 2020) teils bis zu 80 % berichtet (Chen *et al.* 2022). Das Jackson Laboratory empfiehlt Raten über 25 % als Standard für eine stabile Humanisierung (Yip *et al.* 2019).

Bekannt ist, dass die injizierte Zellrate an PBMC einen wesentlichen Einfluss auf das Engraftment der $hCD45^+$-Zellen hat. Die Gabe von höheren Zellzahlen verbessert in der Regel die Humanisierung (King *et al.* 2008, Verma und Wesa 2020). In einem vergleichbaren Modell lag das Optimum für eine erfolgreiche Ansiedlung humaner $CD45^+$-Zellen bei einer Injektion von 8×10^6 PBMC (Ajith *et al.* 2021). Auch der Applikationsweg der Zellen beeinflusst das Ergebnis. Eine intravenöse Injektion der PBMC, wie in dieser Studie durchgeführt, führt zu höheren Anteilen von $hCD45^+$-Zellen im Vergleich zu intraperitonealen oder intrasplenischen Injektionen (King *et al.* 2008).

Auf diese Weise konnte in diesem Ansatz eine erfolgreiche Ansiedelung humaner Immunzellen erreicht werden. Für zukünftige Experimenten sollte jedoch die Gabe höherer Zellzahlen geprüft werden, um ein verbessertes Engraftment zu evaluieren.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Studie ist der gezielte Einsatz geprimter Spenderzellen zur Induktion einer allogenen Abstoßungsreaktion. Während in anderen Modellen meist allogene, aber nicht voraktivierte Zellen eingesetzt werden (Issa *et al.* 2010a, Putnam *et al.* 2013, Racki *et al.* 2010), sollte durch das Priming in diesem Ansatz eine schnellere und klinisch relevantere Immunantwort erzielt werden. Die Bedeutung alloreaktiver Gedächtnis-T-Zellen für das Langzeitüberleben von Transplantaten ist gut belegt. Vorsensibilisierte Patient:innen zeigen häufig ein verkürztes Transplantatüberleben und das Vorhandensein solcher Gedächtniszellen steht mit einer erhöhten Rate akuter

Abstoßungsreaktionen in Zusammenhang (Chen *et al.* 2004, Tang *et al.* 2006, Valujskikh *et al.* 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen befassen sich daher mit *Ex-vivo*-Priming-Strategien von T-Zellen, um diese Mechanismen genauer zu analysieren. Im untersuchten Mausmodell konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Humanisierungsgrad festgestellt werden, gemessen am Anteil $hCD45^+$-Leukozyten, zwischen Immunreaktionen, die durch geprimte oder ungeprimte PBMC induziert wurden. Detailliertere Analysen in Folgeexperimenten, etwa durch erweiterte Phänotypisierung, Zytokinmessungen, längere Beobachtungszeiträume oder höhere Zellzahlen, könnten potenzielle Unterschiede aufdecken.

Eine wesentliche Limitation von PBMC-basierten humanisierten Mausmodellen ist die unvermeidbare Entwicklung einer GvHD, da die humanisierten T-Zellen murine MHC-Komplexe erkennen können (Brehm und Shultz 2012). In diesem Experiment zeigten Gewichtskontrolle und klinisches Scoring keine Hinweise auf eine GvHD innerhalb des Beobachtungszeitraums. Dieses deckt sich mit der Literatur, die für die hier verwendeten Zellzahlen eine sichere Untersuchungsdauer von vier bis fünf Wochen beschreibt, bevor erste klinische Zeichen einer GvHD in anderen Studien auftraten (King *et al.* 2009).

In den Versuchsgruppen 1 und 2 konnte eine stabile Humanisierung mit einer deutlichen Population humaner Leukozyten im Mausblut erreicht werden. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede und innerhalb des Beobachtungszeitraums traten keine klinischen Anzeigen einer GvHD auf. Damit bestätigen die *In-vitro*-Ergebnisse die grundsätzliche Eignung des Modells zur Untersuchung allogener Immunreaktionen und bilden die Grundlage für die nachfolgenden Analysen.

Die Tiere der Versuchsgruppen 3 und 4 erhielten nach der Humanisierung mit geprimten T-Zellen an Tag 28 entweder CAR-T-Zellen oder ATG. In beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Abfall des Anteils $hCD45^+$-Zellen innerhalb einer Woche. Dieser Effekt war nach der Therapie mit CAR-T-Zellen stärker ausgeprägt als nach Gabe von ATG.

Für ATG wurde die T-Zelldepletion als Wirkmechanismus nach intravenöser Gabe von 100 µg (20 mg/ml) in einem humanisierten Mausmodellen beschrieben (Buszko *et al.* 2017, Mashima *et al.* 2021) und konnte auch in den vorliegenden Messungen bestätigt werden.

Bei den hier eingesetzten αβ-CAR-T-Zellen der dritten Generation, die gezielt gegen den αβ-TCR gerichtet sind, zeigte sich ebenfalls eine deutliche Depletion der humanen T-Zellen. Die Analyse dieser Versuchsgruppe ergab neben dem Rückgang der $hCD45^+$-Zellen eine gleichzeitige Abnahme der geprimten T-Zellen sowie einen Anstieg der CAR^+-T-Zellpopulation. Parallel dazu nahm sowohl die Aktivierung als auch die Vitalität der verbliebenen geprimten Zellen ab.
Neben diesen erwünschten Effekten war jedoch auch ein Rückgang der absoluten Zahl und der Vitalität der CAR-T-Zellen selbst zu beobachten. Mehrere Mechanismen könnten hierfür verantwortlich sein, darunter Immunogenität gegenüber den CAR-T-Zellen, eine fehlende Langzeitstimulation sowie das Einsetzen von Apoptoseprozessen. Um Fratricide-Effekte zwischen CAR-T-Zellen zu verhindern, wurde der αβ-TCR in diesen Zellen genomisch ausgeschaltet. Sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Studien zeigten, dass ein TCR-Knockout die Alloreaktivität deutlich reduziert, ohne die funktionale Wirksamkeit der CAR-T-Zellen wesentlich zu beeinträchtigen. Allerdings geht dieser Zustand mit einer verringerten Persistenz der Zellen *in vivo* einher, deren Ursachen bislang noch nicht vollständig geklärt sind (Stenger *et al.* 2020, Torikai *et al.* 2012).
Diese Befunde bieten mögliche Erklärungen für den beobachteten Rückgang und Vitalitätsverlust der CAR-T-Zellen in diesem Modell. Sie könnten zugleich auf eine kontrollierte, selbstlimitierende Wirkung hinweisen. Zukünftige *In-vitro*-Untersuchungen, serielle Messzeitpunkte sowie Analysen von Aktivierungs- und Erschöpfungsmarkern könnten helfen, die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu erfassen und zu klären, ob die begrenzte Persistenz als Sicherheitsmerkmal einer transienten Immunsuppression ohne dauerhafte Immunkompromittierung zu werten ist.
Insgesamt zeigten die durchflusszytometrischen Analysen somit sowohl eine erfolgreiche Humanisierung der NSG-Mäuse als auch eine signifikante Reduktion geprimter alloreaktiver T-Zellen durch ATG und αβ-CAR-T-Zellen.

5.2.2 Histologische Ergebnisse

Menschliche Hautallotransplantate werden seit über 20 Jahren als Modell zur Untersuchung allogener Abstoßungsreaktionen in humanisierten Mäusen verwendet (Kenney *et al.* 2016). Die Nutzung menschlicher Haut bietet zahlreiche Vorteile für Transplantationsexperimente. Gewebeproben von gesunden Personen sind vergleichsweise leicht verfügbar, die Aufbereitung und Transplantation

technisch unkompliziert und das eingewachsene Gewebe ähnelt in seiner Struktur weitgehend gesunder menschlicher Haut. Darüber hinaus ermöglicht dieses Modell die Gewinnung autologer PBMC der spendenden Person, was einen autologen Zellabgleich erlaubt (Brehm und Shultz 2012). Hauttransplantate gelten zudem als ausgesprochen immunogen und lösen in der Regel robuste Immunreaktionen aus (Lee *et al.* 1991). Im Vergleich zu HSZT enthalten PBMC-humanisierte Mausmodelle reife Lymphozyten und myeloide Zellen, die teilweise die Immunität der spendenden Person widerspiegeln (Kametani 2024).

In dem hier verwendeten Modell wurde Vollhaut unmittelbar nach der Entnahme in die Nackenregion der Tiere transplantiert. Nach zweiwöchiger Heilungsphase erfolgte die Injektion ungeprimter beziehungsweise geprimter Zellen. Histologisch zeigte sich in beiden Gruppen ein insgesamt geringer Abstoßungsgrad, wobei die Infiltration der $CD3^+$- und $CD8^+$-Immunzellen in der Gruppe mit geprimten Zellen etwas ausgeprägter war.

In der histologischen Beurteilung zeigte sich, dass nicht alle Transplantate als vollständig eingeheilt gewertet werden konnten, was auf eine unzureichende Integration hindeutet. Andere Arbeitsgruppen beobachteten in vergleichbaren Modellen deutlich stärkere Immunreaktionen. Dieses Ergebnis lässt sich vermutlich durch mehrere methodische Unterschiede erklären.

Erstens berücksichtigen viele Hauttransplantationsmodelle ein Intervall von vier bis sechs Wochen zwischen Transplantation und Injektion humaner Zellen, um eine stabile Einheilung und Revaskularisation zu ermöglichen (Kirkiles-Smith *et al.* 2009; Issa *et al.* 2010b; Racki *et al.* 2010; Dawson *et al.* 2019). Es wurde gezeigt, dass erst nach 28 Tagen eine vollständige Transplantatintegrität ohne Zeichen einer Inflammation erreicht wird (Racki *et al.* 2010). In anderen Studien erfolgte die histologische Untersuchung zudem erst vier bis sechs Wochen nach Gabe der humanen Zellen sowohl zur Evaluation der Abstoßung (Kirkiles-Smith *et al.* 2009; Issa *et al.* 2010a) als auch zur Analyse therapeutischer Ansätze wie CAR-Tregs (Boardman *et al.* 2017, Dawson *et al.* 2019, Putnam *et al.* 2013).

Zweitens wurde beschrieben, dass NSG-Mäuse mit humaner Haut etwa zehn Tage nach der Transplantation ein murines Infiltrat aus mononukleären und granulozytären Zellen entwickeln, das die Integrität des Transplantats beeinträchtigt und über 28 Tage bestehen bleibt (Kirkiles-Smith *et al.* 2009; Racki *et al.* 2010). In diesen Arbeiten führte die Behandlung mit einem anti-Gr1-monoklonalen

Antikörper, der die neutrophile Immunantwort der Maus hemmt, zu einer deutlich verbesserten Transplantatmorphologie (Racki *et al.* 2010).
Drittens könnte auch die Transplantatdicke eine Rolle spielen. Während in der vorliegenden Arbeit Vollhaut transplantiert wurde, zeigte eine andere Studie, dass eine Transplantatstärke von etwa 300 µm optimale Bedingungen für Wundheilung, Integrität und nachfolgende histologische Analysen bietet (Racki *et al.* 2010). Diese drei methodischen Punkte sollten bei zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden, um eine bessere Integration und Stabilität der Transplantate zu erreichen.
Auch die Auswahl der histologischen Marker stellt eine mögliche Einflussgröße dar. In dieser Arbeit erfolgte die Analyse anhand der Marker CD3, CD4 und CD8 zum Nachweis humaner Immunzellen. Zusätzliche Marker wie CD31 zur Anfärbung von Endothelzellen, Involucrin zur Darstellung reifer Keratinozyten in der Epidermis und Vimentin zur Anfärbung von Mesenchymalzellen und Endothelzellen, könnten strukturelle Veränderungen im Transplantat noch präziser abbilden (Kenney *et al.* 2016, Putnam *et al.* 2013, Racki *et al.* 2010). Weiterführende Analysen zur Differenzierung von Zellphänotypen oder die Einbeziehung muriner Marker könnten helfen, subtile Unterschiede zwischen ungeprimten und geprimten Zellinjektionen besser zu erfassen.
Die histologischen Befunde der Kontrollgruppen stützen die Ergebnisse der *In-Vitro*-Analysen und belegen, dass sowohl ungeprimte als auch geprimte Zellen eine Immunreaktion auslösten. Um künftig eine stärkere Reaktion zu induzieren, sollten die genannten methodischen Faktoren zur verbesserten Transplantatintegrität, Proliferationsdauer der Effektorzellen und histologischer Marker angepasst werden.

Im direkten Vergleich der Interventionsgruppen zeigten sich deutliche Unterschiede. Nach Gabe von CAR-T-Zellen blieb die Gewebearchitektur weitgehend intakt und die lymphozytäre Infiltration war gering. In der ATG-Gruppe hingegen fanden sich ausgeprägte lymphozytäre Infiltrate, fortgeschrittene Gewebeschädigungen und unspezifische Hintergrundfärbungen. Die polyklonale Wirkung von ATG, die auf der Depletion peripherer T-Zellen durch komplementabhängige Lyse, Apoptose und der Modulation von Zelloberflächenmolekülen beruht (Mohty 2007), erklärt diese unspezifischen Effekte und stimmt mit den Literaturangaben überein, die eine höhere Wirksamkeit im Blutraum als im Gewebe beschreiben (Acharya *et al.* 2023). Auch der Zeitpunkt der Gabe spielt für den Therapieerfolg eine entscheidende Rolle

(van der Zwan *et al.* 2018). Darüber hinaus können Artefakte aus nekrotischem Gewebe oder Zellzerfall durch Antigendiffusion die Färbeergebnisse verfälschen (Kim *et al.* 2016). Residuale Antigenfragmente könnten zudem als Folge der ATG-Behandlung im Gewebe persistieren (Acharya *et al.* 2023). Entsprechend sind weiterführende Analysen notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen klarer zu differenzieren.

Diese Befunde erklären die Unterschiede der Transplantate nach ATG-Gabe und stützen zugleich die Annahme, dass eine längere Proliferationszeit geprimter PBMC eine verstärkte Effektorfunktion und somit eine ausgeprägtere Abstoßungsreaktion begünstigt. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe mit CAR-T-Zellen eine weitgehend intakte Hautarchitektur mit geringer lymphozytärer Infiltration. Zusammen mit den durchflusszytometrischen Befunden weist dies auf eine erfolgreiche Eliminierung allogener T-Zellen hin. Mit der gezielten Depletion von αβ-T-Zellen, den Hauptträgern allogener Immunreaktionen, wird ein zentrales Problem der konventionellen Immunsuppression adressiert: ihre fehlende Selektivität. Durch die spezifische Ausschaltung αβ-T-zellvermittelter Immunität können Abstoßungsreaktionen reduziert werden, während Teile der restlichen Immunabwehr, insbesondere γδ-T-Zellen, erhalten bleiben. γδ-T-Zellen übernehmen eine wichtige Rolle an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität und gewinnen zunehmend an Bedeutung in der zellulären Immuntherapie. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von αβ-T-Zellen eine GvHD nach HLA-inkompatibler HSZT verhindern kann (Abdelhakim *et al.* 2017). Die verbliebenen γδ-T-Zellen besitzen keine alloreaktive Kapazität, können aber Infektionen und Tumore kontrollieren (Rådestad *et al.* 2019), womit ihr Erhalt auf mögliche additive Vorteile gegenüber globaler Immunsuppression hinweisen kann. Allerdings ist hierfür eine ausreichende Expansion der γδ-T-Zellen erforderlich, um das Gleichgewicht zwischen Toleranz, Infektionsabwehr und Tumorkontrolle zu gewährleisten (Handgretinger und Schilbach 2018). Eine Depletion der αβ-T-Zellen durch die CAR-T-Zellen kann somit, im Gegensatz zur Therapie mit ATG, ohne polyklonale Depletion oder breite Immunsuppression erfolgen und bestätigt damit ein zentrales Prinzip der gezielten, zellbasierten Immuntherapie.

Neben den hier eingesetzten αβ-CAR-T-Zellen existieren bereits Daten zum erfolgreichen Einsatz von CAR-Tregs im Transplantationskontext. Der adoptive Transfer alloantigenspezifischer regulatorischer T-Zellen kann eine dauerhafte

Transplantatfunktion ohne generalisierte Immunsuppression ermöglichen (Wagner und Tang 2020). Tregs sind entscheidend bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase, insbesondere in Prozessen der Selbsttoleranz, Infektabwehr und Transplantatreaktionen (Eggenhuizen *et al.* 2020). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass HLA-A2-spezifische CAR-Tregs die Abstoßung von Hauttransplantaten effektiv verhindern und die Entwicklung einer GvHD reduzieren (Bézie *et al.* 2019, Boardman *et al.* 2017, MacDonald *et al.* 2016, Noyan *et al.* 2017). Dabei wurden PBMC nicht-identischer HLA-Spender:innen fünf bis sechs Wochen nach der Hauttransplantation injiziert und die parallele Gabe von CAR-Tregs induzierte eine stabile Transplantattoleranz. Die in dieser Studie eingesetzten αβ-CAR-T-Zellen bieten gegenüber den CAR-Tregs zwei mögliche Vorteile. Zum einen ist ihre Herstellung im Gegensatz zu Tregs technisch einfacher und bietet eine höhere Stabilität im Vergleich zur Treg-Expansion (Noyan *et al.* 2017). Zum anderen ermöglicht der Knockout des TCR eine universellere Anwendbarkeit. CAR-T-Zellen mit Knockout der α- oder β-Kette des TCR rückten zuletzt verstärkt in den Fokus der universellen CAR-T-Zelltherapie (Torikai *et al.* 2012). Solche Produkte sind potenziell sofort verfügbar, standardisierbar und können die Produktions- und Qualitätssicherungskosten deutlich senken (Zhao *et al. 2018)*. Zur Vermeidung von GvHD oder HLA-Inkompatibilitäten beim Einsatz allogener CAR-T-Zellen wurden verschiedene Strategien entwickelt, darunter der endogene TCR-Knockout durch gezielte Genomeditierung (Tang *et al.* 2022). Erste klinische Anwendungen von universellen CAR-T-Zellen mit TCR-Knockout bei refraktärer T-Zell-ALL konnten positive Ergebnisse erzielen (Wang *et al.* 2020).
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die gezielte Depletion von αβ-T-Zellen mittels CAR-T-Zellen im humanisierten Hauttransplantationsmodell zu einer deutlichen Reduktion allogener Immunreaktionen führt. Diese Therapie bewirkte eine signifikante Abnahme aktivierter T-Zellen bei weitgehend erhaltener Gewebearchitektur, während ATG eine unspezifische Depletion mit ausgeprägten Gewebeschädigungen verursachte. Damit wurde in diesem Modell die prinzipielle Wirksamkeit eines selektiven, zellbasierten Immunsuppressionsansatzes nachgewiesen.

5.3 Stärken, Limitationen und Ausblick der Studie

Die vorliegende Arbeit untersucht ein zellbasiertes Konzept zur gezielten Depletion von αβ-T-Zellen durch CAR-T-Zellen im humanisierten Hauttransplantationsmodell.

Empfänger:innen von Allotransplantaten benötigen zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung lebenslange Immunsuppression, die mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist. Daher rückt zunehmend die Induktion einer spezifischen Immuntoleranz in den Fokus, um eine stabile Transplantatfunktion ohne generalisierte Immunsuppression zu ermöglichen (Kauke-Navarro *et al.* 2023). Parallel dazu werden CAR-basierte Ansätze weiterentwickelt, die spezifische Immunsubzelltypen gezielt eliminieren oder modulieren (Kong *et al.* 2025). Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass eine gezielte Depletion von αβ-T-Zellen durch CAR-T-Zellen im humanisierten Hauttransplantationsmodell grundsätzlich möglich ist und eine selektive, zellbasierte Form der Immunsuppression darstellt. Damit wurde ein wesentlicher Nachweis für die Machbarkeit eines kontrollierten Eingriffs in die T-Zell-vermittelte Immunität erbracht. Gleichzeitig zeigt sich, dass die vollständige Eliminierung der αβ-T-Zellen keine Transplantationstoleranz induziert, da dies eine aktive Förderung regulatorischer Mechanismen voraussetzt (Besançon *et al.* 2017). Dieses Modell erwirkt eine temporäre Unterdrückung der Immunantwort, während andere Abstoßungsmechanismen fortbestehen und stellt somit einen Machbarkeitsnachweis der gezielten αβ-T-Zelldepletion dar, jedoch keine Strategie zur Toleranzinduktion.

Zu den Stärken dieser Arbeit zählen die Kombination aus *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimenten sowie der translational ausgerichtete Ansatz, der immunologische Grundprinzipien mit therapeutischer Relevanz verknüpft. Die Studie liefert erste Hinweise darauf, dass eine spezifische αβ-T-Zelldepletion in einem humanisierten Transplantationsmodell technisch umsetzbar ist und dabei die Gewebeintegrität erhalten bleibt. Der verwendete Knockout des endogenen TCR stellt zudem einen vielversprechenden Schritt in Richtung universell einsetzbare CAR-T-Zellen dar, die unabhängig vom HLA-Typ sofort verfügbar wären (Torikai *et al.* 2012). Da αβ-T-Zellen zugleich als Hauptverursacher der GvHD gelten, könnte dieser Ansatz künftig auch in anderen klinischen Kontexten, etwa zur Prävention von GvHD oder zur kontrollierten Modulation allogener Immunantworten, eine Rolle spielen (Abdelhakim *et al.* 2017)

Trotz überzeugender Daten weist die Studie einige Einschränkungen auf. Das verwendete *In-vitro*-Modell erlaubt nur eine vereinfachte Abbildung der Komplexität des Immunsystems. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Induktion monoklonaler Lymphozytenaktivierung, etwa durch Phytohämagglutinin oder Concanavalin A,

stellt die MLR jedoch die physiologischere Variante dar (Shipkova und Wieland 2012). Die Etablierung der unidirektionalen MLR basiert auf den Aktivierungsmarkern CD25 und CD69, die lediglich einen kleinen Ausschnitt der T-Zell-Aktivierung abbilden. Weitere Oberflächenmoleküle oder kostimulatorische Moleküle wurden nicht erfasst, sodass eine Unterscheidung zwischen spezifischer allogener Aktivierung und unspezifischer, zytokinabhängiger Stimulation nicht möglich war (Shipkova und Wieland 2012). Zudem beeinflussen Unterschiede in Oberflächenantigenen, Zellkonzentrationen (Juhl *et al.* 2021, Mangi und Kantor 1975) oder der Zusammensetzung der Zellpopulationen (Han und Dadey 1976) die Reproduzierbarkeit erheblich. Mehrere Studien empfehlen daher das Pooling mehrerer Spenderpopulationen, um die Variabilität zu reduzieren, wobei bereits drei bis vier Zielzellpopulationen genügen, um eine stabilere Stimulation zu erzielen (Juhl *et al.* 2021, Mangi und Kantor 1975). Da in dieser Studie kein Pooling erfolgte, ergibt sich eine höhere Variabilität der Daten und damit eine begrenzte Aussagefähigkeit.

Auch die Bestimmung des Populationszuwachs ausschließlich über das FACS-Gating stellt eine methodische Einschränkung dar. Direkte Proliferationsanalysen wie „Proliferating Cell Nuclear Antigen“-(PCNA)-Analysen oder Carboxyfluorescein-Succinimidylester-(CFSE)-Verdünnung, hätten eine genauere Bewertung erlaubt (Shipkova und Wieland 2012).

Beim Zytokinassay sind drei limitierende Aspekte zu nennen. Erstens erfolgte die Messung ausschließlich zu einem Zeitpunkt, wodurch dynamische Veränderungen unberücksichtigt blieben. Zweitens beschränkte sich die Analyse auf drei proinflammatorische Zytokine, während regulatorische oder antiinflammatorische Mediatoren nicht untersucht wurden. Drittens könnte der Zusatz von IL-7 und IL-15 die Ergebnisse beeinflusst haben, da beide Zytokine bekanntermaßen die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen fördern (Tan *et al.* 2001, 2002). Vergleichbare Studien führten die MLR deshalb ohne exogene Interleukinzusätze durch (Mangelinck *et al.* 2024, Volk und Kern 2001).

Das *In-vivo*-Modell mit NSG-Mäusen ermöglicht zwar eine funktionelle Abbildung humaner Immunreaktionen, bleibt jedoch aufgrund des xenogenen Charakters nur eingeschränkt auf klinische Situationen übertragbar, da es die adaptive sowie humorale Immunantwort nicht vollständig abbildet (Brehm und Shultz 2012).

Im gewählten Untersuchungszeitraum zeigte sich eine variable Transplantatintegration und histologische Heterogenität der erwarteten Immunreaktionen in den Kontrollgruppen. Besonders der Zeitraum der Wundheilung (Kirkiles-Smith *et al.* 2009; Issa *et al.* 2010b; Racki *et al.* 2010; Dawson *et al.* 2019) sowie die Proliferationszeit der humanen Effektorzellen (Kirkiles-Smith *et al.* 2009; Issa *et al.* 2010a) stellen dabei methodische Einschränkungen dar.

Eine standardisierte makroskopische Evaluation der Abstoßung, etwa anhand der Banff-Klassifikation (Cendales *et al.* 2008), erfolgte nicht und sollten in weiteren Studien zur besseren Vergleichbarkeit implementiert werden.

Ein weiterer methodischer Aspekt betrifft den fehlenden Nachweis der LNGFR-markierten Zellen in den eingebetteten Hauttransplantaten. Dies könnte auf die lange Lagerzeit der Proben von viereinhalb Jahren oder das tatsächliche Fehlen von CAR-T-Zellen im Gewebe zurückzuführen sein. In anderen Studien konnte ein persistenter Nachweis LNGFR-markierter CAR-Tregs beschrieben werden (Noyan *et al.* 2017). Da der Nachweis von CAR-T-Zellen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe grundsätzlich methodisch herausfordernd ist, bieten kombinierte Verfahren wie In-situ-Hybridisierung und multiplexe Immunhistochemie vielversprechende Perspektiven für nachfolgende Versuche (Wright *et al.* 2021).

Zudem fehlen in den *In-vivo*-Versuchen Negativkontrollen, die für den Vergleich physiologischer Transplantationsreaktionen und Wundheilung unerlässlich sind. Außerdem wurden die Versuchsreihen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Während die Gruppen 1, 2 und 4 parallel liefen, erfolgte die Durchführung von Gruppe 3 aufgrund der CAR-T-Zellentwicklung zeitverzögert. Dadurch ist eine direkte Vergleichbarkeit eingeschränkt. Hinzu kommen mögliche HLA-Inkompatibilitäten zwischen unterschiedlichen Haut- und Blutzellspender:innen in den Durchläufen, die das Ergebnis zusätzlich beeinflusst haben könnten.

Neben diesen methodischen Aspekten besteht eine konzeptionelle Limitation darin, dass auch Tregs über den αβ-TCR erkannt und eliminiert werden. Dadurch könnte die für eine stabile Transplantattoleranz notwendige regulatorische Komponente beeinträchtigt sein (Jiang *et al.* 2004, Waldmann *et al.* 2006).

Trotz dieser Limitationen liefern die erhobenen Daten wichtige Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung des hier vorgestellten CAR-T-Zellkonzepts. Zukünftige Studien

sollten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse erweitern und insbesondere auf eine längere Beobachtungsdauer abzielen, um die Persistenz, Erschöpfung und Gedächtnisbildung der αβ-CAR-T-Zellen zu erfassen. Eine genauere Analyse der αβ-T-Zelldepletion über einen verlängerten Zeitraum könnte zudem Aufschluss über mögliche Langzeitfolgen geben und helfen, die Rolle der verbliebenen γδ-T-Zellen im Immungleichgewicht besser zu verstehen. Dabei sollten auch potenzielle Nebenwirkungen und Kreuzreaktionen, insbesondere CRS und Off-Target-Effekte, systemisch erfasst werden (Yeku und Brentjens 2016).

Da die in dieser Arbeit untersuchte Blockade der klassischen T-Zell-vermittelten Abstoßung einen zentralen Mechanismus adressiert, jedoch antikörpervermittelte- sowie NK-Zell-, Makrophagen- und dendritische zellabhängige Prozesse unbeachtet lässt (Sicard *et al.* 2018), könnten kombinierte Therapieansätze neue Perspektiven eröffnen. Besonders Kombinationen von αβ-CAR-T-Zellen mit Tregs oder TRUCK-Systemen (Renuka *et al.* 2024) können vielversprechend sein, um die Selektivität und Effizienz weiter zu steigern.

Auch das CAR-Design selbst bietet weiteres Optimierungspotenzial. Der Einsatz adaptierbarer scFv-Module könnte eine flexible Steuerung des Zielantigens ermöglichen und die gezielte Aktivierung unterschiedlicher Signalwege oder T-Zell-Subtypen erlauben, um eine sichere, programmierbare und anpassbare CAR-T-Zelltherapie zu entwickeln (Cho *et al.* 2018). Ergänzend sollten immunmodulatorische Biomarker wie γδ-T-Zell-Analysen und Zytokin-Signaturen einbezogen werden, um die Immunkompetenz und Toleranzentwicklung präziser bewerten zu können (Sawitzki *et al.* 2020).

Ein translationaler Ansatz sollte schließlich die Überprüfung der αβ-T-Zelldepletion in klinischen Kontexten beinhalten, wie im Rahmen haploidentischer HSZT oder solider Organtransplantation unter Verwendung „Good Manufacturing Practice“ (GMP) konformer Zellpräparate (Handgretinger und Schilbach 2018). Die hier vorgestellten präklinischen Daten liefern dafür eine solide Grundlage, auf der künftige Arbeiten die klinische Machbarkeit und Sicherheit gezielter, zellbasierter Immunsuppression weiter untersuchen können.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die *In-vivo*-Etablierung eines humanisierten Immunsystems in NSG-Mäusen sowie die Untersuchung der Wirkung von CAR-T-Zellen auf die transplantatspezifische Immunantwort zur Induktion einer Transplantattoleranz. In den *In-vitro*-Experimenten führte das Priming allogener PBMC zu einer verstärkten Proliferation und Aktivierung der T-Zellen, erhöhter Zellvitalität und selektiv gesteigerter IL-2-Sekretion. *In vivo* konnte die erfolgreiche Ansiedlung humaner $CD45^+$-Zellen in den Tieren gezeigt werden. Sowohl ungeprimte als auch geprimte Zellen lösten eine milde Abstoßungsreaktion der transplantierten humanen Haut aus. Nach der Applikation von αβ-CAR-T-Zellen zeigte sich eine signifikante Reduktion humaner T-Zellen mit verminderter Aktivierung und Zellvitalität. Histologisch blieb die Gewebearchitektur weitgehend erhalten, bei nur geringer lymphozytärer Infiltration und ohne relevante Abstoßungszeichen. Im Gegensatz dazu führte ATG ebenfalls zu einer T-Zelldepletion im Blut, war jedoch histologisch mit ausgeprägteren Gewebsdestruktionen und unspezifischen Infiltraten assoziiert. Insgesamt belegt dieses Modell die prinzipielle Wirksamkeit einer gezielten αβ-T-Zelldepletion und zeigt, dass eine selektive, zellbasierte Immunsuppression im humanisierten Hauttransplantationsmodell erreicht werden kann.

Summary: The aim of this study was the *in vivo* establishment of a humanized immune system in NSG mice and the investigation of the effects of CAR-T cells on the transplant-specific immune response to induce transplant tolerance. In the *in vitro* experiments, priming of allogeneic PBMC resulted in enhanced T-cell proliferation and activation, increased cell viability, and a selectively elevated IL-2 secretion. *In vivo*, successful engraftment of human $CD45^+$ cells was demonstrated in the animals. Both unprimed and primed cells induced a mild rejection response of the transplanted human skin. Following administration of αβ CAR-T cells, a significant reduction of human T cells was observed, accompanied by decreased activation and viability. Histologically, the tissue architecture remained largely preserved, showing only minor lymphocytic infiltration and no signs of relevant rejection. In comparison, ATG also caused T-cell depletion in the blood but was histologically associated with more pronounced tissue destruction and unspecific inflammatory infiltrates. Overall, this model demonstrates the fundamental efficacy of targeted αβ T-cell depletion and shows that a selective, cell-based immunosuppression can be achieved in the humanized skin transplantation model.

7. Literaturverzeichnis

Abdelhakim H, Abdel-Azim H, Saad A. (2017). Role of αβ T Cell Depletion in Prevention of Graft versus Host Disease. Biomedicines. 5(3):35.

Aboufazeli B, Tamaddoni A, Monfared AS, Zabihi E, Abedian Z, Mahdavi SR, Karimi M, Borzoueisileh S. (2017). The Evaluation of Optimum Radiation Dose to Prevent Transfusion-Associated Graft-Versus-Host Disease Among the Iranian Population. [Online im Internet.] URL: https://brieflands.com/articles/ijp-62300#abstract [Stand: 27.08.2025, 08:49].

Acharya S, Lama S, Kanigicherla DA. (2023). Anti-thymocyte globulin for treatment of T-cell-mediated allograft rejection. World J Transplant. 13(6):299–308.

Ajith A, Mulloy LL, Musa MA, Bravo-Egana V, Horuzsko DD, Gani I, Horuzsko A. (2021). Humanized Mouse Model as a Novel Approach in the Assessment of Human Allogeneic Responses in Organ Transplantation. Front. Immunol. 12: 687715.

Andrade AVG de, Riewaldt J, Wehner R, Schmitz M, Odendahl M, Bornhäuser M, Tonn T. (2014). Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 18(6):1184–1193.

Antas PR, Oliveira EB, Milagres AS, Franken KC, Ottenhoff TH, Klatser P, Sarno EN, Sampaio EP. (2002). Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97:1097–1099.

Arjomandnejad M, Kopec AL, Keeler AM. (2022). CAR-T Regulatory (CAR-Treg) Cells: Engineering and Applications. Biomedicines. 10(2):287.

Atsuta Y, Baldomero H, Neumann D, Sureda A, DeVos JD, Iida M, Karduss A, Purtill D, Elhaddad AM, Bazuaye NG, Bonfim C, De la Camara R, Chaudhri NA, Ciceri F, Correa C, Frutos C, Galeano S, Garderet L, Gonzalez-Ramella O, Greco R, Hamad N, Hazenberg MD, Horowitz MM, Kalwak K, Ko B-S, Kodera Y, Koh MB, Liu K, McLornan DP, Moon JH, Neven B, Okamoto S, Pasquini

MC, Passweg JR, Paulson K, Rondelli D, Ruggeri A, Seber A, Snowden JA, Srivastava A, Szer J, Weisdorf D, Worel N, Greinix H, Saber W, Aljurf M, Niederwieser D. (2024). Continuous and differential improvement in worldwide access to hematopoietic cell transplantation: activity has doubled in a decade with a notable increase in unrelated and non-identical related donors. Haematologica. 109(10):3282–3294.

Bain B, Vas M, Lowenstein L. (1963). Reaction between leukocytes in mixed peripheral blood cultures. Federation Proceedings. 22: 428

Benavidez Arias M, Nguyen A, Ross D, Eagerton D, und Ritthipichai K. (2024). Lighting the way: an economical alternative to feeder cell irradiation for T-cell expansion. Front. Immunol. 15:1453740.

Besançon A, Baas M, Goncalves T, Valette F, Waldmann H, Chatenoud L, You S. (2017). The Induction and Maintenance of Transplant Tolerance Engages Both Regulatory and Anergic CD4+ T cells. Front Immunol. 8:218.

Bézie S, Charreau B, Vimond N, Lasselin J, Gérard N, Nerrière-Daguin V, Bellier-Waast F, Duteille F, Anegon I, Guillonneau C. (2019). Human CD8+ Tregs expressing a MHC-specific CAR display enhanced suppression of human skin rejection and GVHD in NSG mice. Blood Adv. 3(22):3522–3538.

Biselli R, Matricardi PM, Amelio RD, Fattorossi A. (1992). Multiparametric Flow Cytometric Analysis of the Kinetics of Surface Molecule Expression after Polyclonal Activation of Human Peripheral Blood T Lymphocytes. Scandinavian Journal of Immunology. 35(4):439–447.

Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim M a. A, Hannen RF, Cooper D, Marelli-Berg FM, Watt FM, Lechler RI, Maher J, Smyth LA, Lombardi G. (2017). Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection. Am J Transplant. 17(4):931–943.

Böhler T, Nolting J, Kamar N, Gurragchaa P, Reisener K, Glander P, Neumayer H-H, Budde K, Klupp J. (2007). Validation of Immunological Biomarkers for

the Pharmacodynamic Monitoring of Immunosuppressive Drugs in Humans. Therapeutic Drug Monitoring. 29(1):77.

Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. (2010). γδ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. Nat Rev Immunol. 10(7):467–478.

Brehm MA und Shultz LD. (2012). Human allograft rejection in humanized mice: a historical perspective. Cell Mol Immunol. 9(3):225–231.

Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, DeFor T, Levine BL, June CH, Rubinstein P, McGlave PB, Blazar BR, Wagner JE. (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. Blood. 117(3):1061–1070.

Buszko M, Cardini B, Oberhuber R, Oberhuber L, Jakic B, Beierfuss A, Wick G, Cappellano G. (2017). Differential depletion of total T cells and regulatory T cells and prolonged allotransplant survival in CD3Ɛ humanized mice treated with polyclonal anti human thymocyte globulin. PLoS ONE. 12(3):0173088.

Cao M-D, Chen Z-D, Xing Y. (2004). Gamma irradiation of human dendritic cells influences proliferation and cytokine profile of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction. Cell Biol Int. 28(3):223–228.

Cendales LC, Kanitakis J, Schneeberger S, Burns C, Ruiz P, Landin L, Remmelink M, Hewitt CW, Landgren T, Lyons B, Drachenberg CB, Solez K, Kirk AD, Kleiner DE, Racusen L. (2008). The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. Am J Transplant. 8(7):1396–1400.

Chargui J, Combaret V, Scaglione V, Iacono I, Péri V, Valteau-Couanet D, Dubrel M, Angevin E, Puisieux A, Romagne F, Bergeron C. (2010). Bromohydrin Pyrophosphate-stimulated Vγ9δ2 T Cells Expanded Ex Vivo From Patients With Poor-Prognosis Neuroblastoma Lyse Autologous Primary Tumor Cells. Journal of Immunotherapy. 33(6):591.

Chen Y-J, Abila B, Mostafa Kamel Y. (2023). CAR-T: What Is Next? Cancers. 15(3):663.

Chen L und Flies DB. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol. 13(4):227–242.

Chen Y, Heeger PS, Valujskikh A. (2004). In Vivo Helper Functions of Alloreactive Memory CD4+ T Cells Remain Intact Despite Donor-Specific Transfusion and Anti-CD40 Ligand Therapy1. J Immunol. 172(9):5456–5466.

Chen J, Liao S, Xiao Z, Pan Q, Wang X, Shen K, Wang S, Yang L, Guo F, Liu H, Pan Q. (2022). The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. Front. Immunol. 13: 1007579.

Cho JH, Collins JJ, Wong WW. (2018). Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. Cell. 173(6):1426-1438.

Dawson NA, Lamarche C, Hoeppli RE, Bergqvist P, Fung VC, McIver E, Huang Q, Gillies J, Speck M, Orban PC, Bush JW, Mojibian M, Levings MK. (2019). Systematic testing and specificity mapping of alloantigen-specific chimeric antigen receptors in regulatory T cells. JCI Insight. 4(6):123672.

Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. Blood. 117(14):3921–3928.

Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. (2020). Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 21(19):7015.

Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. (2019). Next-generation regulatory T cell therapy. Nat Rev Drug Discov. 18(10):749–769.

Halloran PF. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med. 351(26):2715–2729.

Han T und Dadey B. (1976). T and B lymphocytes. Exclusive role as responders and stimulators in human one-way mixed lymphocyte reaction. Immunology. 31(4):643–648.

Handgretinger R und Schilbach K. (2018). The potential role of γδ T cells after allogeneic HCT for leukemia. Blood. 131(10):1063–1072.

Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. (2014). Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. Blood. 124(3):363–373.

Inaba M, Kurasawa K, Mamura M, Kumano K, Saito Y, Iwamoto I. (1999). Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. J Immunol. 163(3):1315–1320.

Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chainnull mice. Blood. 106(5):1565–1573.

Issa F, Hester J, Goto R, Nadig SN, Goodacre TE, Wood K. (2010a). Ex Vivo–Expanded Human Regulatory T Cells Prevent the Rejection of Skin Allografts in a Humanized Mouse Model. Transplantation. 90(12):1321.

Issa F, Schiopu A, Wood KJ. (2010b). Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. Expert Rev Clin Immunol. 6(1):155–169.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 100(9):3175–3182.

Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. (2012). Current advances in humanized mouse models. Cell Mol Immunol. 9(3):208–214.

Jiang S, Herrera O, Lechler RI. (2004). New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. Current Opinion in Immunology. 16(5):550–557.

Joffre O, Santolaria T, Calise D, Saati TA, Hudrisier D, Romagnoli P, Meerwijk JPM van. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. Nat Med. 14(1):88–92.

Jordan WJ und Ritter MA. (2002). Optimal analysis of composite cytokine responses during alloreactivity. Journal of Immunological Methods. 260(1–2):1–14.

Juhl M, Christensen JP, Pedersen AE, Kastrup J, Ekblond A. (2021). Cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells for use in proliferation assays: First step towards potency assays. J Immunol Methods. 488:112897.

June CH und Sadelain M. (2018). Chimeric Antigen Receptor Therapy. N Engl J Med. 379(1):64–73.

Kant V, Verma P, Kumar P. (2009). Immunosuppressive drug therapy: An overview. Journal of Immunology and Immunopathology. 11:21–32.

Kauke-Navarro M, Knoedler S, Panayi AC, Knoedler L, Noel OF, Pomahac B. (2023). Regulatory T Cells: Liquid and Living Precision Medicine for the Future of VCA. Transplantation. 107(1):86.

Kelishadi SS, Azimzadeh AM, Zhang T, Stoddard T, Welty E, Avon C, Higuchi M, Laaris A, Cheng X-F, McMahon C, Pierson RN. (2010). Preemptive CD20+ B cell depletion attenuates cardiac allograft vasculopathy in cyclosporine-treated monkeys. J Clin Invest. 120(4):1275–1284.

Kenney LL, Shultz LD, Greiner DL, Brehm MA. (2016). Humanized Mouse Models for Transplant Immunology. American Journal of Transplantation. 16(2):389–397.

Kim S-W, Roh J, Park C-S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. J Pathol Transl Med. 50(6):411–418.

King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, Laning J, Fodor W, Foreman O, Burzenski L, Chase TH, Gott B, Rossini AA, Bortell R, Shultz LD, Greiner DL. (2009). Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. Clin Exp Immunol. 157(1):104–118.

King M, Pearson T, Shultz LD, Leif J, Bottino R, Trucco M, Atkinson MA, Wasserfall C, Herold KC, Woodland RT, Schmidt MR, Woda BA, Thompson MJ, Rossini AA, Greiner DL. (2008). A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-*scid* mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. Clinical Immunology. 126(3):303–314.

Kirkiles-Smith NC, Harding MJ, Shepherd BR, Fader SA, Yi T, Wang Y, McNiff JM, Snyder EL, Lorber MI, Tellides G, Pober JS. (2009). Development of a Humanized Mouse Model to Study the Role of Macrophages in Allograft Injury. Transplantation. 87(2):189.

Kitagawa S, Sato S, Azuma T, Shimizu J, Hamaoka T, Fujiwara H. (1991). Heterogeneity of CD4+ T cells involved in anti-allo-class I H-2 immune responses. Functional discrimination between the major proliferating cells and helper cells assisting cytotoxic T cell responses. J Immunol. 146(8):2513–2521.

Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Sato K, Sato S, Sato K, Hosoi A, Nakajima J, Yoshida Y, Shiraishi K, Nakagawa K, Kakimi K. (2008). Zoledronate facilitates large-scale *ex vivo* expansion of functional γδ T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. Cytotherapy. 10(8):842–856.

Kong Y, Li J, Zhao X, Wu Y, Chen L. (2025). CAR-T cell therapy: developments, challenges and expanded applications from cancer to autoimmunity. Front. Immunol. 15:1519671.

Kornbluth J, Silver DM, Dupont B. (1981). Cloning and Characterization of Primary Alloreactive Human T-Lymphocytes. Immunological Reviews. 54(1):111–155.

Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Tony FW Hans-Peter, Wilhelm M. (2000). Stimulation of γδ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. Blood. 96(2):384–392.

Kwon M, Choi YJ, Sa M, Park S-H, Shin E-C. (2018). Two-Round Mixed Lymphocyte Reaction for Evaluation of the Functional Activities of Anti-PD-1 and Immunomodulators. Immune Netw. 18(6):45.

Lee WPA, Yaremchuk MJ, Pan Y-C, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. (1991). Relative Antigenicity of Components of a Vascularized Limb Allograft. Plastic and Reconstructive Surgery. 87(3):401.

Li XC. (2010). The significance of non-T cell pathways in graft rejection--implications for transplant tolerance. Transplantation. 90(10):1043–1047.

Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. (2001). T cell death and transplantation tolerance. Immunity. 14(4):407–416.

Lin H, Cheng J, Mu W, Zhou J, Zhu L. (2021). Advances in Universal CAR-T Cell Therapy. Front Immunol. 12:744823.

Lin Y, Gallardo HF, Ku GY, Li H, Manukian G, Rasalan TS, Xu Y, Terzulli SL, Old LJ, Allison JP, Houghton AN, Wolchok JD, Yuan J. (2009). Optimization and validation of a robust human T cell culture method for monitoring phenotypic and polyfunctional antigen-specific CD4 and CD8 T-cell responses. Cytotherapy. 11(7):912.

Llames S, García-Pérez E, Meana Á, Larcher F, Río M del. (2015). Feeder Layer Cell Actions and Applications. Tissue Eng Part B Rev. 21(4):345–353.

MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, Broady R, Levings MK. (2016). Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. J Clin Invest. 126(4):1413–1424.

Mangelinck A, Dubuisson A, Becht E, Dromaint-Catesson S, Fasquel M, Provost N, Walas D, Darville H, Galizzi J-P, Lefebvre C, Blanc V, Lombardi V. (2024). Characterization of CD4+ and CD8+ T cells responses in the mixed lymphocyte reaction by flow cytometry and single cell RNA sequencing. Front. Immunol. 14:1320481.

Mangi RJ und Kantor FS. (1975). The multiple mixed lymphocyte reaction: variables important in the test as a measure of lymphocyte competence in man. Yale J Biol Med. 48(3):217–228.

Martini DJ, Chen Y-B, DeFilipp Z. (2022). Recent FDA Approvals in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease. Oncologist. 27(8):685–693.

Mascher B, Schlenke P, Seyfarth M. (1999). Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. J Immunol Methods. 223(1):115–121.

Mashima K, Oh I, Fujiwara K, Izawa J, Takayama N, Nakano H, Kawasaki Y, Minakata D, Yamasaki R, Morita K, Ashizawa M, Yamamoto C, Hatano K, Sato K, Ohmine K, Fujiwara S-I, Ohno N, Kanda Y. (2021). Comparison of alemtuzumab, anti-thymocyte globulin, and post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia in murine models. PLoS One. 16(1):0245232.

Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, Grupp SA. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 378(5):439–448.

McDonald-Hyman C, Turka LA, Blazar BR. (2015). Advances and challenges in immunotherapy for solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. Sci Transl Med. 7(280):280.

Mohty M. (2007). Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. Leukemia. 21(7):1387–1394.

Nankivell BJ und Alexander SI. (2010). Rejection of the kidney allograft. N Engl J Med. 363(15):1451–1462.

Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiezorek J, Go WY. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 377(26):2531–2544.

Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, Hust M, Huehn J, Galla M, Morgan M, Jokuszies A, Manns MP, Jaeckel E. (2017). Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. American Journal of Transplantation. 17(4):917–930.

Putnam AL, Safinia N, Medvec A, Laszkowska M, Wray M, Mintz MA, Trotta E, Szot GL, Liu W, Lares A, Lee K, Laing A, Lechler RI, Riley JL, Bluestone JA, Lombardi G, Tang Q. (2013). Clinical Grade Manufacturing of Human Alloantigen-Reactive Regulatory T Cells for Use in Transplantation. Am J Transplant. 13(11):3010–3020.

Racki WJ, Covassin L, Brehm M, Pino S, Ignotz R, Dunn R, Laning J, Graves SK, Rossini AA, Shultz LD, Greiner DL. (2010). NOD-scid IL2rγnull Mouse Model of Human Skin Transplantation and Allograft Rejection. Transplantation. 89(5):527.

Rådestad E, Sundin M, Törlén J, Thunberg S, Önfelt B, Ljungman P, Watz E, Mattsson J, Uhlin M. (2019). Individualization of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using Alpha/Beta T-Cell Depletion. Front Immunol. 10:189.

Ramanathan S, Gagnon J, Ilangumaran S. (2008). Antigen-nonspecific activation of CD8+ T lymphocytes by cytokines: relevance to immunity, autoimmunity, and cancer. Arch. Immunol. Ther. Exp. 56(5):311–323.

Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. Journal of Immunological Methods. 293(1):127–142.

Renuka D, Aggarwal DJ, Pasha DEH. (2024). CAR T CELL THERAPY. J Popl Ther Clin Pharmacol. 31(3):595–600.

Roy A, Krzykwa E, Lemieux R, Néron S. (2001). Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. J Hematother Stem Cell Res. 10(6):873–880.

Sabins NC, Harman BC, Barone LR, Shen S, Santulli-Marotto S. (2016). Differential Expression of Immune Checkpoint Modulators on In Vitro Primed CD4+ and CD8+ T Cells. Front Immunol. 7:221.

Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. (2011). Human Regulatory T Cells with Alloantigen Specificity Are More Potent Inhibitors of Alloimmune Skin Graft Damage than Polyclonal Regulatory T Cells. Sci Transl Med. 3(83):83ra42.

Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, Tang Q, Guinan EC, Battaglia M, Burlingham WJ, Roberts ISD, Streitz M, Josien R, Böger CA, Scottà C, Markmann JF, Hester JL, Juerchott K, Braudeau C, James B, Contreras-Ruiz L, Net JB van der, Bergler T, Caldara R, Petchey W, Edinger M, Dupas N, Kapinsky M, Mutzbauer I, Otto NM, Öllinger R, Hernandez-Fuentes MP, Issa F, Ahrens N, Meyenberg C, Karitzky S, Kunzendorf U, Knechtle SJ, Grinyó J, Morris PJ, Brent L, Bushell A, Turka LA, Bluestone JA, Lechler RI, Schlitt HJ, Cuturi MC, Schlickeiser S, Friend PJ, Miloud T, Scheffold A, Secchi A, Crisalli K, Kang S-M, Hilton R, Banas B, Blancho G, Volk H-D, Lombardi G, Wood KJ, Geissler EK. (2020). Regulatory

cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. Lancet. 395(10237):1627–1639.

Shipkova M und Wieland E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. Clinica Chimica Acta. 413(17):1338–1349.

Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol. 7(2):118–130.

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. J Immunol. 174(10):6477–6489.

Sicard A, Levings MK, Scott DW. (2018). Engineering therapeutic T cells to suppress alloimmune responses using TCRs, CARs, or BARs. American Journal of Transplantation. 18(6):1305–1311.

Stenger D, Stief TA, Kaeuferle T, Willier S, Rataj F, Schober K, Vick B, Lotfi R, Wagner B, Grünewald TGP, Kobold S, Busch DH, Jeremias I, Blaeschke F, Feuchtinger T. (2020). Endogenous T-cell receptor promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated T-cell receptor knockout CAR. Blood. 136(12):1407–1418.

Symeou S, Avramidou E, Papalois V, Tsoulfas G. (2025). Global transplantation: Lessons from organ transplantation organizations worldwide. World J Transplant. 15(1):99683.

Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surh CD. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 98(15):8732–8737.

Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 Jointly Regulate Homeostatic Proliferation of Memory Phenotype CD8+ Cells but Are Not Required for Memory Phenotype CD4+ Cells. J Exp Med. 195(12):1523–1532.

Tang AL, Bingaman AW, Kadavil EA, Leeser DB, Farber DL. (2006). Generation and Functional Capacity of Polyclonal Alloantigen-Specific Memory CD4 T Cells. American Journal of Transplantation. 6(6):1275–1284.

Tang TCY, Xu N, Nordon R, Haber M, Micklethwaite K, Dolnikov A. (2022). Donor T cells for CAR T cell therapy. Biomark Res. 10:14.

Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, Huls H, Miller JC, Kebriaei P, Rabinovitch B, Lee DA, Champlin RE, Bonini C, Naldini L, Rebar EJ, Gregory PD, Holmes MC, Cooper LJN. (2012). A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. Blood. 119(24):5697–5705.

Trzonkowski P, Dukat-Mazurek A, Bieniaszewska M, Marek-Trzonkowska N, Dobyszuk A, Juścińska J, Dutka M, Myśliwska J, Hellmann A. (2013). Treatment of Graft-versus-Host Disease with Naturally Occurring T Regulatory Cells. BioDrugs. 27(6):605–614.

Vaikunthanathan T, Safinia N, Boardman D, Lechler RI, Lombardi G. (2017). Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation. Clin Exp Immunol. 189(2):197–210.

Valujskikh A, Pantenburg B, Heeger PS. (2002). Primed Allospecific T Cells Prevent the Effects of Costimulatory Blockade on Prolonged Cardiac Allograft Survival in Mice. American Journal of Transplantation. 2(6):501–509.

Verma B und Wesa A. (2020). Establishment of Humanized Mice from Peripheral Blood Mononuclear Cells or Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem Cells for Immune-Oncology Studies Evaluating New Therapeutic Agents. Current Protocols in Pharmacology. 89(1):e77.

Vodopick HA, Rupp EM, und Gengozian N. (1969). THE BIDIRECTIONAL IN VITRO MIXED LEUKOCYTE REACTION: A MUTUAL INHIBITORY PHENOMENON? Transplantation. 7(3):155.

Volk H-D und Kern F. (2001). Insights into the Specificity and Function of (Allo)antigen-reactive T Cells. American Journal of Transplantation. 1(2):109–114.

Wagner JC und Tang Q. (2020). CAR-Tregs as a Strategy for Inducing Graft Tolerance. Curr Transpl Rep. 7(3):205–214.

Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. (2006). Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. Immunological Reviews. 212(1):301–313.

Wang X, Li S, Gao L, Yuan Z, Wu K, Liu L, Luo L, Liu Y, Zhang C, Liu J, Yang C, Li Y, Li Z, He J, Wang D, Ye X, Tan X, Huang R, Ge J, Han Y, Zhang D, Wang Y, Fang L, Chen Y, Cao W, Wang S, Zhang X. (2020). Abstract CT052: Clinical safety and efficacy study of TruUCAR^{TM} GC027: The first-in-human, universal CAR-T therapy for adult relapsed/refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia (r/r T-ALL). Cancer Res. 80(16_Supplement):CT052.

Wood KJ, Bushell A, Hester J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. Nat Rev Immunol. 12(6):417–430.

Wright JH, Huang L-Y, Weaver S, Archila LD, McAfee MS, Hirayama AV, Chapuis AG, Bleakley M, Rongvaux A, Turtle CJ, Chanthaphavong S, Campbell JS, Pierce RH. (2021). Detection of Engineered T Cells in FFPE Tissue by Multiplex In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. J Immunol Methods. 492:112955.

Yeku OO und Brentjens RJ. (2016). Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. Biochem Soc Trans. 44(2):412–418.

Yip H, Haupt C, Maresh G, Zhang X, Li L. (2019). Humanized mice for immune checkpoint blockade in human solid tumors. Am J Clin Exp Urol. 7(5):313–320.

Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. (2018). Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. Journal of Hematology & Oncology. 11(1):132.

Zwan M van der, Clahsen-Van Groningen MC, Roodnat JI, Bouvy AP, Slachmuylders CL, Weimar W, Baan CC, Hesselink DA, Kho MML. (2018). The Efficacy of Rabbit Anti-Thymocyte Globulin for Acute Kidney Transplant Rejection in Patients Using Calcineurin Inhibitor and Mycophenolate Mofetil-Based Immunosuppressive Therapy. Ann Transplant. 23:577–590.

8. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CRS	Zytokinfreisetzungssyndrom
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMO	Fluoreszenz-Minus-Eins
FSC	Forward-Scatter
Gy	Gray
GMP	Good Manufacturing Practice
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LNGFR	Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLR	Gemischte Lymphozyten Reaktion
MMF	Mycophenolat-Mofetil
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSG	NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD	Programmed cell death protein
PI	Propidiumiodid
PP	Prozentpunkte
Re.	Reexposition
RT	Raumtemperatur
scFv	Einzelketten-Variablenfragment
SCID	Schwere kombinierte Immundefizienz

SD	Standardabweichung
SSC	Side-Scatter
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TRUCK	T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VTH	Versuchstierhaltung

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des *In-vitro*-Primings alloreaktiver T-Zellen

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Reexposition alloreaktiver T-Zellen

Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Gating-Strategie

Abbildung 4: Aufbau der verwendeten CAR-T-Zellen

Abbildung 5: Schematische Übersicht des *In-vivo*-Versuchsablaufs

Abbildung 6: Vitalitätsverlust der $CD3^+$-T-Zellen innerhalb von 96 Stunden nach Bestrahlung mit verschiedenen Intensitäten

Abbildung 7: Titration der optimalen Stimulationsverhältnisse bestrahlter Empfängerzellen für das Priming alloreaktiver T-Zellen

Abbildung 8: Zuwachs der Populationen und Dynamik der Aktivierung von Spender-T-Zellen über 96 Stunden nach Reexposition sowie deren Vitalitätsanteil an Tag 16

Abbildung 9: Konzentration inflammatorischer Zytokine (IL-2, TNF-α, IFN-γ) zwölf Stunden nach Reexposition

Abbildung 10: Gewichtsentwicklung und klinisches Scoring der Versuchstiere

Abbildung 11: Analyse der Verteilung von humanen $CD45^+$-Lymphoyzten im Verlauf des *In-vivo*-Versuchs vor und nach Gabe der Immuntherapie

Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der $CD45^+$-und $hCD45^+$-Lymphozytenverteilung während des Versuchsverlauf der Gruppe 3 (CAR-T-Zellen)

Abbildung 13: Prozentuale Verteilung und funktionelle Analyse der humanen Effektorzellen der Versuchsgruppe 3 (CAR-T-Zellen) an Tag 28 und Tag 35

Abbildung 14: Histologische und immunhistochemische Gegenüberstellung der humanen Hauttransplantate von Versuchsgruppe 1 (A: Ungeprimte Zellen) und 2 (B: Geprimte Zellen)

Abbildung 15: Histologische und immunhistochemische Gegenüberstellung der humanen Hauttransplantate nach Gabe der Immuntherapie von Versuchsgruppe 3 (A: CAR-T-Zellen) und 4 (B: ATG)

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der *in vitro* und *in vivo* eingesetzten fluorochrom-konjugierten Marker für die Durchflusszytometrie

11. Erklärung des Eigenanteils

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen des Projekts zur Untersuchung von allogenen Immunreaktionen und deren Modulation im humanisierten NSG-Mausmodell. Die Konzeption der Experimente zur Etablierung der unidirektionalen MLR und der humanisierten Mausmodelle entstand in enger Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe und PD Dr. Patrick Schlegel.

Mein persönlicher Beitrag umfasste:

- die Bestrahlung und Kultivierung der PBMC,
- die Etablierung und Durchführung der *In-vitro*-Experimente zur unidirektionalen MLR,
- die Aufbereitung und Analyse der Proben mittels Durchflusszytometrie,
- die Betreuung der *In-vivo*-Versuche einschließlich der Tierbeobachtung,
- die statistische Auswertung der Daten sowie
- die Erstellung der Abbildungen sowie die vollständige Ausarbeitung der Manuskriptteile.

Die Bereitstellung der CAR-T-Zellen sowie der geprimten und ungeprimten Zellen für die In-vivo-Versuche erfolgte durch PD Dr. Patrick Schlegel. Die Transplantation und Entnahme des humanen Hautgewebes wurden von Prof. Dr. Michael Boettcher durchgeführt. Die intravenöse Injektion der humanen Zellen, der CAR-T-Zellen, sowie von ATG erfolgte durch Mitarbeitende der VTH des UKE. Die Blutentnahme bei den Versuchstieren sowie die Unterstützung bei der Tierbeobachtung übernahm Magdalena Trochimiuk.

Die pathologischen Untersuchungen (Schnittpräparate, Färbungen, Befundung) wurden unter Anleitung von Dr. Anne Menz im Institut für Pathologie am UKE durchgeführt. Die Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor-(LNGFR)-Färbung erfolgte im kinderchirurgischen Labor der Universitätsklinik Mannheim.

Die abschließende Betreuung und fachliche Beratung erfolgten durch Dr. Laia Pagerols-Raluy und Prof. Dr. Michael Boettcher.

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.
Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum Unterschrift

13. Danksagung

Im Verlauf der Anfertigung dieser Dissertation habe ich von vielen Seiten Unterstützung erfahren, für die ich sehr dankbar bin.
An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Boettcher, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und seine fachliche Begleitung während des Projekts.
Herrn PD Dr. Patrick Schlegel gilt mein Dank für die Projektzusammenarbeit, auch aus weiter Ferne, sowie die Bereitstellung der CAR-T-Zellen, die die Grundlage dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.
Für die direkte Betreuung im Labor danke ich Frau Dr. Laia Pagerols-Raluy. Gemeinsam mit Magdalena Trochimiuk habt ihr mich nicht nur im praktischen Alltag unterstützt, sondern auch mit mentalem Beistand und viel Geduld begleitet.
Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Anne Menz aus der Pathologie, der VTH und der FACS Core Facility des UKE, dem Labor der pädiatrischen Hämatoonkologie in Tübingen sowie dem Labor der Kinderchirurgie in Mannheim für die Zusammenarbeit.
Mein großer Dank gilt darüber hinaus meiner Familie und meinen Freund:innen. Ihr habt mich während der langen Laborarbeit und der intensiven Schreibphase mit Motivation, Geduld und Verständnis getragen und unterstützt. Danke Melina, für die gemeinsamen Monate im Labor und dafür, dass du zusammen mit Hannah und Karo in dieser Zeit immer an meiner Seite warst. Danke Antonia, für deine wertvolle technische Unterstützung und dass du mir bei so vielen Fragen weitergeholfen hast.
Und von Herzen danke ich meiner Mutter und Mischa für all die Kraft und Liebe, die Ihr mir in jeder Phase dieser Arbeit gegeben habt.
Ohne euch alle wäre diese Arbeit nicht zu einem Ende gekommen.