Aus der Medizinischen Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Verzögerte B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation in Patienten mit GvHD

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maike Ronya Xiao Xi Oey

aus Berlin

Datum der Promotion: 02. März 2018

Meinen Eltern,

Hiang Oey und Peter Dähling gewidmet.

ABSTRAKT

Einleitung: Nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT) sind Patienten stark infektionsgefährdet. Die Neubildung und das Überleben von immunkompetenten Zellen, wie B-Zellen, ist daher essentiell. Im Menschen ist eine verzögerte Rekonstitution der Immunzellen häufig mit dem Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion (engl. graft-versus-host-disease, GvHD) assoziiert. Im Mausmodell wurde zudem eine erhöhte T-Zell-Infiltration des Knochenmarks festgestellt. Dies wirft die Frage auf, ob das Knochenmark eine Zielstruktur der GvHD ist. Zur Beurteilung ob eine GvHD des Knochenmarks die B-Zellrekonstitution im Menschen beeinträchtigt, wurde für diese Arbeit ein Monitoring der B-Zellneogenese, Analyse sowie eine von Knochenmarkstanzen durchgeführt.

Methoden: Um die Rekonstitutionskinetik von B-Zellen innerhalb des ersten Jahres nach allo-HSZT untersuchen zu können, wurde die Anzahl verschiedener B-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Knochenmarkstanzen wurden histologisch auf eine Infiltration mit T-Zellen und die Anzahl von Osteoblasten untersucht. Klinische Daten wurden im Verlauf der Transplantation erfasst.

Ergebnisse: Patienten, die einen verzögerten Beginn der B-Zell-Rekonstitution zeigten, wiesen signifikant häufiger eine akute systemische GvHD auf. Der verzögerte Beginn war mit einer vermehrten Infiltration von T-Zellen im Knochenmark, sowie einer Verminderung von Osteoblasten assoziiert. Patienten mit verzögertem Beginn der B-Zell-Rekonstitution zeigten häufiger atypische Pneumonien, sowie BK-Virus-Zystitiden und eine Varizella-Zoster-Virus-Reaktivierung.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das humane Knochenmark ein direktes Zielorgan der akuten GvHD ist. Diese ist durch eine erhöhte T-Zell-Infiltration des Knochenmarks sowie einer Schädigung der Osteoblastennische charakterisiert und verzögert die B-Zell-Rekonstitution um etwa zwei Monate.

ABSTRACT

Introduction: Immune system dysfunction after allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) leaves patients prone to severe infections. Hence the *de novo* production and survival of immunocompetent cells like B cells is essential. In humans, a delayed B cell reconstitution is often associated with graft-versus-host-disease (GvHD) and in mice, bone marrow trephines have shown an increased infiltration with T cells. This poses the question if the bone marrow itself is a target of graft-versus-host disease. To analyze if bone marrow GvHD impairs B cell reconstitution, the *de novo* production of B cells after allo-HSCT was monitored and bone marrow trephines were examined.

Methods: Flow cytometry was used to estimate cell counts and characterize differences in the reconstitution kinetics. Histological analyses of bone marrow trephines were used to detect T cell infiltration and osteoblasts. Clinical data was obtained during routine examination following allo-HSCT.

Results: B cell reconstitution started either early or late. Patients with a delayed onset showed a significantly higher rate of acute GvHD and this was correlated with an increased T cell infiltration in the bone marrow and fewer osteoblasts. Patients with a late onset of B cell reconstitution showed more atypical pneumonia, BK-virus cystitis and reactivation of varicella zoster virus.

Conclusion: The results show a correlation of T cell infiltration and osteoblast niche destruction, paralleled by a delayed regeneration of B cells, and therefore possible acute bone marrow GvHD.

INHALTSVERZEICHNIS

Αвкü	IRZUNGSVERZEICHNIS	I
1.	EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG	1
1.1	ALLOGENE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION	1
1.1.1	Haupthistokompatibilitätskomplex und Typisierung	1
1.1.2	Konditionierung	2
1.1.3	Transplantation	3
1.1.4	Infektionen	3
1.1.5	Graft-versus-Host Disease	4
1.2	IMMUNREKONSTITUTION NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION	6
1.2.1	Knochenmarknische und Immunrekonstitution der B-Lymphozyten	7
1.3	ZIELSETZUNG/FRAGESTELLUNG	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	GESUNDE PROBANDEN	12
2.2	PATIENTEN	12
2.3	GERÄTE	13
2.4	SOFTWARE	13
2.5	VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.6	CHEMIKALIEN	14
2.7	Antikörper	14
2.8	ISOLIERUNG PERIPHERER BLUT MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS VOLLBLUT	15
2.9	IMMUNFÄRBUNG VON B-ZELLSUBPOPULATIONEN	16
2.10	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	16
2.11	KNOCHENMARK-HISTOLOGIE	17
2.12	CHIMÄRISMUS-ANALYSE	18
2.13	STATISTIK	18
3.	ERGEBNISSE	19
3.1	KLINISCHE DATEN	19
3.2	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	25
3.3	T-ZELLREKONSTITUTION	28
3.4	B-Zellrekonstitution	29
3.5	FRÜHER UND SPÄTER BEGINN DER B-ZELL-REKONSTITUTION	31
3.5.1	Assoziationen zwischen klinischen Daten und Immunrekonstitution	37
3.5.2	B-Zell-Rekonstitution und GvHD	40
3.5.3	Knochenmark-Histologien	42
3.5.4	Infektionen	49
4.	DISKUSSION	52
4.1	REKONSTITUTION DER T-ZELLEN	52
4.2	REKONSTITUTION DER B-ZELLEN	53
4.3	VERZÖGERTER BEGINN DER B-ZELLREKONSTITUTION	54
4.4	HINWEISE AUF EINE AKUTE GVHD DES KNOCHENMARKS	55
4.5	INFEKTIONEN	59
4.6	AUSBLICK	60

TABELLENVERZEICHNIS	62
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	63
Schriftenverzeichnis	64
DANKSAGUNGEN	75
CURRICULUM VITAE	76
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	78
ANTEILSERKLÄRUNG AN PUBLIKATIONEN	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aGvHD	akute GvHD
ALL	akute lymphatische Leukämie
alloHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
APC	engl. antigen presenting cells, dt. Antigen-präsentierende Zellen
ATG	Antithymozytenglobulin
BAFF	engl. B cell activating factor, dt. B-zell-aktivierender Faktor
BD	Beckton- Dickinson
ca.	circa
CD	engl. cluster of differentiation, dt. Differenzierungsmarker
cGvHD	chronische GvHD
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
DN	doppelt-negative
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting, dt. Durchflusszytometrie
FSC	engl. forward scatter, dt. Vorwärtsstreulicht
G-CSF	engl. granulocyte-colony stimulating factor, dt. Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor
GK	gesunde Kontrollgruppe
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GSC	engl. Glucksbergs-Seattle-Criteria, dt. Glucksbergs-Seattle-Kriterien
GvHD	engl. graft-versus-host disease, dt. Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion
GvL	engl. graft-versus-leukemia effect, dt. Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt
HE	Hämatoxylin und Eosin
HLA	engl. human leukocyte antigen, dt. humanes Leukozytenantigen
HSV	Herpes simplex- Virus
IBMTR	engl. <i>International Bone Marrow Transplant Registry,</i> dt. Internationales Knochenmarkspenderegister
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
KOF	Körperoberfläche
KREC	engl. kappa-deleting-element rearrangement excision circles
MHC	engl. major histocompatibility complex, dt. Haupthistokompatibilitätskomplex

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

min.	Minute
MMF	Mycophenolat- Mofetil
MTX	Methotrexat
MZ- ähnliche	Marginal-Zonen-ähnliche
NIH	engl. National Institutes of Health, dt. nationale Gesundheitsinstitute
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells, dt. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	engl. polymerase-chain-reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
RIC	engl. reduced intensity conditioning, dt. Konditionierung mit reduzierter Intensität
SEM	engl. standard error of the mean, dt. Standardabweichung
SIRS	engl. systemic inflammatory response syndrom, dt. Systemisches Inflammatorisches Antwort Syndrom
SSC	engl. side scatter, dt. Seitwärtsstreulicht
ТВІ	engl. total body irradiation, dt. Ganzkörperbestrahlung
VZV	Varizella-Zoster-Virus

1. EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG

1.1 ALLOGENE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION

Bei der allogenen hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT) werden blutbildende Zellen eines anderen Individuums der gleichen Spezies transplantiert. Diese Therapie stellt heutzutage für verschiedene Erkrankungen des blutbildenden Systems die einzige kurative Behandlungsoption dar.

Die erste alloHSZT gelang 1968: Gatti et al. transplantierten einem Jungen mit schwerem kombiniertem Immundefekt das Knochenmark eines Humanen- Leukozyten-Antigen (engl. *human leukocyte antigen*, HLA)-passenden Geschwisterteils¹. Die Grundlage dafür war die Entdeckung der Vererblichkeit der HLA. Die HLA werden bei den Wirbeltieren im Allgemeinen auch Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility *complex*, MHC) genannt, sie sind Proteinkomplexe auf der Zellmembran von fast allen Geweben des Körpers. Sie erlauben es dem Immunsystem, eigenes von fremdem Gewebe zu unterscheiden. Haben Spender und Empfänger unterschiedliche MHC, droht eine Abstoßung des Transplantats. Die Knochenmarktransplantation eines nichtverwandten Spenders wurde das erste Mal von Hansen et al. durchgeführt. Eine Mitarbeiterin des Labors war im Rahmen der Studie MHC-typisiert worden und wurde zufällig als passende Spenderin identifiziert^{2,3}. Seit den 70er Jahren werden international Spenderdateien aufgebaut, seit 1991 mit der Deutschen Knochenmarkspenderdatei auch in der Bundesrepublik. In ihr sind mehr als 5 Millionen Spender typisiert (Stand 2015). Laut dem Deutschen Register für Stammzelltransplantationen wurden im Jahr 2014 über 3000 allogene Transplantationen vorgenommen, die Tendenz ist steigend⁴.

1.1.1 HAUPTHISTOKOMPATIBILITÄTSKOMPLEX UND TYPISIERUNG

Die Funktion der MHC-Moleküle ist die Präsentation von endogenen oder exogenen Peptidketten an T-Lymphozyten. Sie können aber auch selber als Antigene für T-Lymphozyten fungieren und rufen dann schwere Abstoßungsreaktionen hervor^{5,6}. Beim Menschen liegen die meisten MHC-Loci auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Sie werden in drei Klassen eingeteilt. Die für die Unterscheidung in körpereigenes und körperfremdes Gewebe wichtigsten sind die Klasse I und II: Die α -Kette der MHC Klasse I Proteine kodieren die Gene HLA-A, -B, -C und die α - und β -Kette der MHC Klasse II Proteine kodieren die Gene HLA-DP, -DQ, -DR. Durch ihr polygenes Vorliegen erhalten die MHC-Proteinkomplexe eine intraindividuell unterschiedliche Gestalt⁷. Und auch interindividuell sind sie durch das Vorliegen vieler verschiedener Allele hochpolymorph, so sind bislang schon mehr als 10.000 Allele beschrieben⁸.

Für eine Typisierung werden fünf Loci erfasst: HLA-A, -B, -C, -DRB1 und –DQB1. Da es zwei Merkmalssätze gibt, jeweils einen von der Mutter und einen vom Vater, ergibt sich daraus ein Satz von insgesamt 10 Genen. Die Haplotypen werden als Merkmalssätze vererbt, bei Geschwistern ergibt sich somit eine 25%-Chance auf eine Übereinstimmung. Eine vollständige Übereinstimmung wird als 10/10 angegeben. Gibt es eine Abweichung, beispielsweise 9/10, wird von einem Mismatch gesprochen. Die allogenen MHC werden in diesem Fall häufiger als fremd erkannt und die allogenen Zellen angegriffen. Bei der alloHSZT werden immunkompetente Zellen eines Spenders übertragen. Die Immunzellen des Empfängers werden durch eine vorangegangene Konditionierung, bestehend aus Chemotherapie und Bestrahlung, weitgehend abgetötet. Daher sind es bei dieser Art der Transplantation hauptsächlich die Zellen des Transplantats, die eine teilweise lebensbedrohliche Gewebsschädigung beim Empfänger auslösen. Diese Komplikation wird Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion genannt (engl. graft-versus-host*disease*, GvHD). Das Risiko für ihr Auftreten ist bei einem Mismatch stark erhöht⁶, aber auch bei einer MHC-Übereinstimmung von 10/10 kann es zu einer Abstoßungsreaktion kommen. Der Grund dafür sind sogenannte Minor Histokompatibilitätsantigene. Diese entstehen insbesondere durch Einzel-Nukleotid-Polymorphismen oder es handelt sich beispielsweise um gonosomale Gene des Y-Chromosoms⁹.

1.1.2 KONDITIONIERUNG

Das Ziel der sogenannten Konditionierung ist es, durch die Zerstörung des blutbildenden Systems des Empfängers die ursächliche hämatologische Erkrankung zu beseitigen. Gleichzeitig wird dadurch einer Immunreaktion des Rezipienten auf das Transplantat vorgebeugt. Dafür werden verschiedene Zytostatika in hohen Dosen häufig mit einer Ganzkörperbestrahlung (engl. *total body irridiation*, TBI) von 8-12 Gray kombiniert. Beides geht mit schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie systemischer Entzündung und Immunpression, einher. Insbesondere Patienten mit verminderten Organfunktionen, weit fortgeschrittener Erkrankung und Patienten höheren Alters sind davon betroffen¹⁰.

Daher wird nun vielfach eine reduzierte Konditionierungsintensität (engl. *reduced intensity conditioning*, RIC) mit geringeren Strahlendosen und einer weniger aggressiven Chemotherapie eingesetzt^{11,12}. Der Schwerpunkt liegt dabei weniger auf dem antileukämischen Effekt der Medikation, als auf der Immunsuppression zur Verhinderung

einer Abstoßung. So konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der von der akuten Form der GvHD Betroffenen unter der RIC verringert^{13,14}.

1.1.3 TRANSPLANTATION

Die Stammzellen, die dem Empfänger transplantiert werden, können aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder konserviertem Nabelschnurblut von Stammzellspendern isoliert werden. Aufgrund der einfacheren Handhabung und der verbesserten Immunrekonstitution hat sich die Isolation aus dem peripheren Blut als Standard durchgesetzt¹⁵. Hier wird vor der Entnahme des Blutes dem Spender ein Hormon verabreicht, der sogenannte Granulozyten-Kolonie-Stimulierende Faktor (engl. *granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF), der die Zellen aus dem Knochenmark mobilisiert. Mittels Leukapherese werden im Anschluss die Stamm- und Immmunzellen herausgefiltert und dem Patienten intravenös appliziert. In Metaanalysen konnte für dieses Verfahren kein Nachteil in Bezug auf das Gesamtüberleben festgestellt werden, auch wenn es Hinweise gibt, dass die Gefahr für eine alloreaktive Abstoßungsreaktion leicht erhöht ist¹⁵.

1.1.4 INFEKTIONEN

Das 5-Jahres Überleben nach alloHSZT liegt momentan etwas höher als 50%¹⁶. Der Grund ist vor allem, dass in der Nachsorge die Immunsuppression als Abstoßungsprophylaxe und das neuentstehende Immunsystem in Balance gehalten werden müssen. Durch die Konditionierung verlieren die Patienten zunächst ihre eigenen immunkompetenten Zellen, zudem wird die Schleimhautbarriere angegriffen und so erleiden viele lebensbedrohliche Infektionen¹⁷. Besonders häufig treten dabei Bakteriämien und Pneumonien auf. Die gram-positiven Keime der Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus*^{17,18} spielen dabei eine große Rolle, zudem aber auch atypische Erreger, wie *Mycoplasma pneumoniae* und Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Candida*¹⁷.

Des Weiteren kann durch die Immunsuppression eine endogene Reaktivierung des Cytomegalievirus (CMV)¹⁹, Herpesviren oder dem Ebstein-Barr-Virus (EBV) hervorgerufen werden. Für erstere steht mit dem Guanin-Analogon Ganciclovir ein potentes Virostatikum bereit. Die EBV-Reaktivierung wird derzeit mit einer Gabe des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab behandelt, um eine Reduktion der EBV-tragenden B-Zellen zu erzielen²⁰. Bei beiden Reaktivierungen ist die Überlebensrate stark herabgesetzt^{19,20}.

1.1.5 GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE

Die GvHD ist eine allogene Immunreaktion und die am häufigsten zum Tode führende Komplikation einer alloHSZT²¹. Im Zentrum dieses multifaktoriellen Geschehens stehen zu Beginn die T-Zellen des Spenders, die das Gewebe des Empfängers angreifen²², vor allem die epithelialen Zellen von Haut, Darm, Leber, und Lunge^{23,24}. Der Auslöser für die Entwicklung einer GvHD ist der durch Konditionierung und Chemotherapie ausgelöste Gewebsschaden (Abbildung 1.1). Durch ihn wird es möglich, dass Rezipienten-Antigene von antigenpräsentierende Zellen (engl.: *antigen presenting cells*, APC) des Rezipienten^{25,26} aufgenommen und präsentiert werden. Dieser Vorgang wird durch Spender-APC verstärkt²⁵. Welche APC-Populationen Auslöser sind, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung²⁷. Die APC sind häufig durch einen von der Konditionierung und der damit verbundenen systemischen Inflammation ausgelösten "Zytokin-Sturm" aktiviert^{28,29} und geben den T-Lymphozyten des Spenders das Signal zur Differenzierung und Proliferation³⁰. Die aktivierten T-Effektorzellen wandern von den sekundären lymphoiden Organen zu ihren Zielgeweben und bewirken dort eine Gewebezerstörung²⁴.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1.1 Mechanismen der Entstehung einer akuten GvHD

Darstellung aus Blazar *et al.*, 2012³¹ Schematische Entstehung einer GvHD, bestehend aus initialem Zellschaden der in einer Aktivierung der APC mündet. Nach der Präsentation der Antigene entsteht eine ausgeprägte Zytokinantwort, die hier als "Zytokinsturm" bezeichnet wird. Letztendlich werden so CD4⁺⁻ T-Zellen aktiviert, die den Endorganschaden hervorrufen. In diesem Modell gibt es mehrere Feedbackmechanismen, die dazu beitragen, dass der Prozess selbsterhaltend abläuft.

EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG

Nach der Transplantation erhalten alle Patienten zur GvHD-Prophylaxe eine immunsupprimierende Therapie, meist bestehend aus Calcineurinhemmern und Methotrexat, hingegen wird bei RIC- Patienten häufig Mycophenolat-Mofetil verabreicht^{32,33}. Zur Behandlung einer manifesten GvHD kommen zusätzlich auch Glukokortikoide zum Einsatz³⁴. Als therapierefraktär wird die GvHD eingestuft, wenn sie unter den ersten drei Tagen mit systemischer Glukokortikoidgabe progressiv verläuft oder aber nach sieben Tagen keine Besserung zeigt³⁴. Es existiert keine evidenzbasierte Zweitlinientherapie und so ist die Prognose der steroid-refraktären höhergradigen GvHD oft infaust³⁴. Die GvHD wird in zwei Formen unterteilt: in die akute (aGvHD) und die chronische (cGvHD) Form. Obwohl das Auftreten einer aGvHD einen Risikofaktor für die cGvHD darstellt, kann die cGvHD auch ohne eine vorangegangene aGvHD auftreten³⁵. Dieser Umstand lässt vermuten, dass es sich um zwei pathophysiologisch unterschiedliche Vorgänge handelt, die sich beeinflussen, aber nicht unabdinglich verknüpft sind.

Die akute Form der GvHD ist weitestgehend eine klinische Diagnose, auch wenn sie durch Biopsien, in welchen die T-Zellinfiltration oder eine typische Gewebsveränderung sichtbar wird, bestätigt werden kann³⁶. Sie beginnt klassischerweise in den ersten 100 Tagen nach Transplantation und ihre Zielorgane sind die Haut, der Gastrointestinaltrakt und die Leber. Bei Befall der Haut zeigt sich ein juckendes erythematösmakulopapulöses Exanthem²³. Eine Darm-GvHD geht mit Durchfällen einher, die hohe Stuhlmassen bis zu mehr als zwei Litern pro Tag umfassen können²³. Zur Einschätzung der Involvierung der Leber wird das Bilirubin im Serum gemessen²³. Klinisch können sich die Patienten mit einer Hepatomegalie, hellem Stuhl, Pruritus und dunklem Urin präsentieren. In murinen Modellen wurden auch in anderen Organsystemen vermehrte Organschädigungen während einer GvHD beschrieben, zum Beispiel im Knochenmark³⁷ und Thymus³⁸. Auf die verschiedenen Gradingsysteme der aGvHD wird im Ergebnisteil dieser Arbeit spezifischer eingegangen. Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer aGvHD Grad II-IV, die einer systemischen Therapie bedarf, sind neben MHC-Disparität auch die Verwendung eines weiblichen Spenders für einen männlichen Empfänger und die Ganzkörperbestrahlung (TBI)³⁵.

Die chronische Form der GvHD wird gemäß der National Institutes of Health (NIH) Konsensus von 2005 frühestens ab einem Auftreten nach 100 Tagen nach

Transplantation diagnostiziert³⁹, sie kann aber innerhalb der ersten drei Jahre post-Transplantation auftreten³⁹. Bei der cGvHD werden zusätzlich subkutanes Bindegewebe, Gelenke, die orale und genitale Mukosa und Tränen- und Speicheldrüsen angegriffen. Nach den NIH Richtlinien werden auch eine prolongierte Form der aGvHD und eine Mischform, das sogenannte *Overlap*-Syndrom (dt. überlappen), anerkannt. Beide können ebenfalls nach Tag 100 beobachtet werden (Tabelle 1), haben aber eine andere prognostische Implikation³⁹. Aus diesem Grunde wurde eine extensive Liste mit distinkten Merkmalen der chronischen GvHD erstellt, von denen mindestens eines auftreten muss, damit die Diagnose gesichert gilt. Die frühere Einteilung in "limitierte" und "extensive" Form der Erkrankung gilt als überholt⁴⁰.

•				
Kategorie	Zeit nach Transplantation	Symptome der akuten GvHD	Symptome der chronischen GvHD	
Klassische akute GvHD	= 100 Tage</td <td>Ja</td> <td>Nein</td> <td></td>	Ja	Nein	
Persistierende, spät- auftretende akute GvHD	>100 Tage	Ja	Nein	
Klassische chronische GvHD		Nein	Ja	
Overlap- Syndrom		Ja	Ja	

Tabelle 1 Einteilung der akuten und chronischen GvHD

Dieser Einteilung liegen die Keystone Kriterien und die Richtlinien der National Institutes of Health zugrunde.

1.2 IMMUNREKONSTITUTION NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION

In einigen Studien konnte gezeigt werden konnte, dass das Immunsystem des Spenders einen transienten Antikörperschutz gewährleistet⁴². Dennoch ist es für die Immunkompetenz der Patienten essentiell, dass sie über die *de novo* Produktion von Immunzellen wieder im Stande sind eine eigene Abwehr aufzubauen. Nach alloHSZT sind es die Zellen der angeborenen Immunantwort, wie natürliche Killerzellen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten, die als erstes beginnen sich zu rekonstituieren, allerdings sind sie in ihrer Funktion eingeschränkt⁴³. Die Rekonstitution der Zellen der adaptiven Immunantwort dauert länger⁴³ und wird durch eine GvHD verzögert⁴⁴. Durch die Wirkung von Chemotherapie, Immunsuppression, der Transplantation selbst und eine GvHD ist diese Immunrekonstitution oft noch Jahre nach der Transplantation gestört. Die Patienten weisen B- oder T-Zelldefekte auf^{44,45}.

Der T-Zell-Pool regeneriert sich zunächst durch die periphere Proliferation von reifen Zellen, das heißt, dass diese Zellen nicht die im Thymus stattfindende Selektion durchlaufen, in der autoreaktive Zellen aussortiert werden. Aus dem Thymus stammende

EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG

Zellen zeigen sich erst Monate später und *de novo* produzierte naive T Zellen bleiben teilweise über Jahrzehnte unterdurchschnittlich hoch^{46,47}. Dies ist auf den zurückgebildeten Thymus der älteren Patienten zurückzuführen, der zudem durch die Chemotherapie zusätzlich geschädigt ist⁴⁸. Die CD8-Effektorzellzahl steigt nach der Transplantation schneller als die der CD4 T-Zellen, deren Zahlen noch mindestens ein Jahr unterdurchschnittlich sind. Eine Diversifizierung des CD4 T-Zell-Pools ist erst ab 6 Monaten zu beobachten⁴⁹. Es wird angenommen, dass es sich bei den schnell expandierenden CD8-Effektorzellen vor allem um virusspezifische Zellen vom Gedächtnistyp handelt. Angeregt durch Antigene steigt die Zahl mitunter massiv an (dies wird auch *Antigen-getriggerte Expansion* genannt)⁵⁰.

1.2.1 KNOCHENMARKNISCHE UND IMMUNREKONSTITUTION DER B-LYMPHOZYTEN

Die Knochenmarknische ist eine anatomisch wie funktionell definierte Mikroumgebung, die direkten Einfluss auf eine Stamm- oder Progenitorzelle besitzt⁵¹. Die Nischen unterscheiden sich jedoch auf zellulärer Ebene⁵². So sind für den Erhalt von B-Zell-Progenitor-Zellen das Endosteum und die Osteoblasten von großer Bedeutung. Sie geben über Interleukine und Chemokine Signale für die Proliferation oder Differenzierung⁵³ der B-Zellvorläufer. Eine Inhibierung dieser Signale dezimiert die B-Zellzahlen im Knochenmark, sowie im peripheren Blut^{52,54}. In Mäusen wurde gezeigt, dass auch das Knochenmark eine Zielstruktur der GvHD sein kann³⁷.

In den ersten zwei Monaten nach der Transplantation sind die B-Zellen nahezu undetektierbar, die wenigen vorhandenen Zellen sind fast ausschließlich Zellen des Spenders⁵⁵. Die Neuproduktion von B-Zellen, die danach beginnt, entspricht ihrer ontogenetischen Entwicklung⁵⁶: Die Identifizierung der B-Zellgesamtpopulation erfolgt zunächst über den spezifischen Marker CD19, der in Assoziation mit dem B-Zell-Rezeptor die Schwelle für eine antigenabhängige Aktivierung herabsetzt. In allen Stufen ihrer Entwicklung präsentieren die B-Zellen weitere distinkte Oberflächenmarker, anhand derer man sie mittels Durchflusszytometrie identifizieren kann⁵⁷. Nachdem die B-Zelle im Knochenmark bis zur Prä-B-Zell Stufe herangereift ist, kann sie über eine Umgruppierung der leichten Kette das erste Mal ihr spezifisches Immunglobulin M (IgM) exprimieren und an der Zelloberfläche präsentieren. Damit wird die Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle. Diese wird im Knochenmark auf Autoreaktivität geprüft, wobei die stark autoreaktiven Zellen in Apoptose gehen.

Als Transitionale B-Zelle (IgM⁺IgD⁺CD38⁺⁺CD24⁺⁺) verlässt die B-Zelle das Knochenmark (Abbildung 1.2)⁵⁸. Diese B-Zell-Subpopulation ist demnach die erste, die im peripheren Blut sichtbar wird, jedoch ist sie noch nicht in der Lage auf Antigene zu reagieren. Sie wird in der Peripherie in sekundären lymphoiden Organen ein weiteres Mal auf Autoreaktivität geprüft ⁵⁹. Die Zellen, die diese zweite negative Selektion überleben, werden zu reifen naiven B-Zellen (CD27⁻IgM⁺IgD⁺⁺), sie sind nun in der Lage auf Antigene zu reagieren und können aktiviert werden. Sie exprimieren geringe Level an IgM und hohe Level an IgD. Naive B-Zellen machen mehr als die Hälfte aller zirkulierenden B-Zellen aus⁶⁰. Wird ihnen kein Antigen präsentiert, rezirkulieren sie 3-8 Wochen im peripheren Blut.



Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen der B-Zellen und ihrer exprimierten Oberflächenmarker

Die Darstellung der Entwicklung der B-Zellsubpopulationen erfolgte nach Warnatz et.al., 2008. Die angegebenen Oberflächenmarker sind die für die Phänotypisierung in der Durchflusszytometrie maßgeblichen und stellen keine vollständige Auflistung dar. Darstellung der exprimierten Immunglobuline: dunkelgrau: IgM, hellgrau: IgD, grün: IgG/A. Pfeile: durchgehende stellen gesicherte Wege der Entwicklung dar, unterbrochene zeigen debattierte Entwicklungswege an.

Präsentiert eine Antigen-präsentierende Zelle jedoch ein Antigen im Lymphfollikel und die B-Zellen werden durch CD4 T-Zellen aktiviert, verbleiben sie in den lymphoiden

EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG

Organen und bilden in den Follikeln sogenannte Keimzentren aus. Im Keimzentrum wird durch die somatische Hypermutation der Antikörpergene die Affinität der spezifischen Antikörper zu ihrem Antigen erhöht, zudem findet in diesem Stadium bei vielen Zellen ein Klassenwechsel des exprimierten Immunglobulins statt. An Stelle von IgM produzieren die Zellen nun IgG oder IgA. Für diese follikulären Zellen gibt es bei einer Aktivierung zwei mögliche Differenzierungswege: Der erste Weg ist die Differenzierung zu Plasmablasten, die über das periphere Blut in das Knochenmark migrieren können und dort als langlebige Plasmazellen (CD27⁺⁺IgM⁻IgD⁻CD38⁺⁺CD24⁻) dauerhaft spezifische Antikörper sezernieren. Plasmablasten exprimieren nur noch geringe Level CD19 und ihre Zahl kann sich bei Infektionen oder als Antwort auf eine Impfung rapide erhöhen⁶¹. Normalerweise machen sie unter zwei Prozent der zirkulierenden B-Zellen aus⁶². Der zweite Weg ist die Differenzierung zu sogenannten Gedächtniszellen, die im ruhenden Modus keine Immunglobuline sezernieren, aber bei einem erneuten Antigenkontakt schnell aktiviert werden können⁶³.

Neben diesen "klassischen" isotypgewechselten Gedächtniszellen (CD27⁺ IgD⁻), welche nach der Keimzentrumsreaktion CD27 exprimieren und wie beschrieben einen Immunglobulinklassenwechsel von IgM und IgD zu IgG oder IgA vollzogen haben, sind auch nicht-klassengewechselte, IgM-produzierende "Gedächtniszellen" (CD27⁺IgM⁺IgD⁺) bekannt, die auch Marginal-Zonen-ähnliche (MZ-ähnliche) B-Zellen genannt werden. Wie murine Marginalzonen-B-Zellen sind sie in der Marginalzone der Milz zu finden. Da sie im Menschen jedoch im Gegensatz zur murinen MZ B-Zelle auch rezirkulieren, werden sie beim Menschen als MZ-ähnliche B-Zelle bezeichnet. Ihre genaue Herkunft, und die Frage, ob sie eine Keimzentrumsreaktion durchmachen, wird debattiert⁶⁴⁻⁶⁶. Aufgrund ihrer Fähigkeit, ihre Antikörpergene ohne die typische T-Zell-Hilfe zu diversifizieren, wird angenommen, dass sie ähnlich wie murine Marginal-Zonen B-Zellen in der Lage sind, antigenunabhängig aktiviert zu werden und auf Polysaccharidantigene zu reagieren⁶⁷. Ihre Rekonstitution nach alloHSZT bleibt auf lange Zeit defizient und trägt unter Umständen dazu bei, dass das Infektionsrisiko mit bekapselten Bakterien erhöht ist⁶⁸.

Eine Sonderstellung nehmen die noch weitgehend unerforschten doppelt-negativen (DN), klassengewechselten B-Zellen (CD27⁻ IgD⁻) ein, die weder CD27 noch IgD produzieren. Diese DN B-Zellen machen in Gesunden ca. 1-4% der B-Zellen im

peripheren Blut aus⁶⁹ und sind sowohl in geriatrischen Patienten als auch in Patienten mit der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematosus erhöht^{69,70}. Sie haben an Hypermutationen ihrer Antikörpergene eine ähnliche Rate wie CD27+ Gedächtniszellen. Es wird daher angenommen, dass sie deren extrafollikuläre Vorgänger oder Nachkommen darstellen, deren Klassenwechsel T-Zell-unabhängig und außerhalb des Keimzentrums geschieht⁷⁰. Die Erhöhung im Rahmen von systemischen Inflammationen wird von einigen als Hinweis auf einen erhöhten Umsatz von Gedächtniszellen interpretiert⁷¹, wobei die DN B-Zellen die ,erschöpfte' Population darstellen sollen. Sie sind aber weiterhin in der Lage Immunglobuline zu produzieren und haben die Fähigkeit über Chemokine zu Entzündungsherden zu gelangen⁷¹. Über ihre Rekonstitution nach alloHSZT ist nichts bekannt. Eine Regeneration der B-Zellpopulation ist vor allem wichtig für die Abwehr von Infektionen, die noch immer 10-20% der Mortalitätsrate nach alloHSZT ausmachen⁷². Über die frühe Kinetik der Rekonstitution der B-Zell-Subpopulationen nach alloHSZT ist bislang nur sehr wenig bekannt.

1.3 ZIELSETZUNG/FRAGESTELLUNG

Die Fragestellung für diese Arbeit lautete wie folgt:

- 1. Wie verläuft die Rekonstitutionskinetik der B-Zell-Subpopulationen?
- 2. Gibt es eine Assoziation der B-Zell-Rekonstitutionskinetik mit der Konditionierung, dem Auftreten einer GvHD, oder Infektionen?
- 3. Gibt es eine Assoziation der B-Zell-Rekonstitutionskinetik mit der Integrität der Knochenmarknische?

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlich in:

Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, **Oey M**, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, Wittenbecher F, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. Blood 2014;124(6):963-972.

Poster: **Oey M**, Mensen A, Demski S, Na IK. B-Cell Neogenesis is delayed in acute Graftversus-Host-Disease, Posterkongress der Summer School of Immunology, Ettal September 2014

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 GESUNDE PROBANDEN

Es wurden 12 gesunde Spender (6 weibliche, 6 männliche) für die Kontrollgruppe akquiriert (gesunde Kontrollgruppe, GK). Bei allen Probanden handelt es sich um Studenten und Mitarbeiter des Instituts für medizinische Immunologie der Charité, Campus Virchow Klinikum, sowie deren Angehörige. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme lag bei keinem von ihnen eine aktive Infektions- oder Immunerkrankung vor. Für die Kontrollgruppe ergab sich ein mittleres Alter von 53 Jahren (Spannweite 40-78). Von jedem gesunden Probanden wurden etwa 30ml Citratblut abgenommen und in einem S1 Labor des Institutes für medizinische Immunologie der Charité für die Experimente aufbereitet.

2.2 PATIENTEN

Von den 52 Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, wurden 50 in den hämatoonkologischen Virchow Charité Stationen des Campus Klinikum der stammzelltransplantiert. Zwei weitere Patienten im Klinikum Kassel. Die Geschlechterverteilung betrug 56% männliche und 44% weibliche Probanden und zum Zeitpunkt der Transplantation ergab sich ein mittleres Alter von 58 Jahren (Standardabweichung 13 Jahre, Median 53 Jahre). Eingeschlossen wurden Patienten mit beiden Formen der akuten Leukämie; 45 waren an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt und 7 wurden aufgrund einer akuten lymphatischen Leukämie stammzelltransplantiert. Den Patienten wurde mittels venöser Punktion zu den Messzeitpunkten an Tag 14, Tag 28, Tag 60 und Tag 90 etwa 30 ml und an Tag 180 und Tag 360 nach Transplantation etwa 48 ml-Citratblut abgenommen. Dies geschah im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahmen zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs. Von den Patienten waren 21% einer Konditionierung mit voller Intensität unterzogen worden, 79% hingegen wurden mit einem reduzierten Konditionierungsschema auf die Transplantation vorbereitet. Die Transplantate stammten zu 75% von unverwandten Spendern und zu 25% von verwandten Spendern. Eine akute GvHD konnte bei 47% festgestellt werden, eine chronische bei 29% der ursprünglichen Kohorte. Von den 52 eingeschlossenen Patienten verstarben im Laufe der Studie 27, zwei lehnten die weitere Teilnahme ab.

Die Einteilung der aGvHD wurde nach den Konsens-Kriterien von Keystone 1994, die auf den Glucksberg-Seattle- Kriterien (engl. *Glucksbergs-Seattle-Criteria*, GSC) basieren, vorgenommen und die Einteilung der cGvHD erfolgte nach den Konsenskriterien der National Institutes of Health.

2.3 GERÄTE

Tabelle 2 Geräte

Auflichtmikroskop Bx300	Will, Wetzlar, Deutschland
BD LSR II	BD Bioscience, CA, USA
BD FACS Canto	BD Bioscience, CA, USA
Gefrierschrank -80°C	Cotech, Berlin, Deutschland
Kühlschrank Z 160 M	Hermle, Wehingen, Deutschland
Micropipettes Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ ND1000	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
akkuPipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sterilwerkbank HERA-Safe	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Vortex Genie2	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellenzählgerät	Scientific Industries, NY, USA
Zellkulturinkubator	Sanyo Fisher Sales, München, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Christ, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 58	Eppendorf,Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 32R+	Thermo Fisher Scientific,MA, USA
Zentrifuge Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Olympus CK2 Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Rocking Platform Shakers	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer, Deutschland
und autoMACS® Separator	Miltenyi Biotec

2.4 SOFTWARE

Tabelle 3 Software

FACS™DIVA Software v 6.1.3	BD Biosciences, CA, USA
FlowJo Version 9.2	Tree Star, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism v5.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
SPSS PASW Statistics v18	IBM, New York, USA
GeneMapper 3.7	Applied Biosystems, USA

2.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien

14 ml Polystyrene Rundbodengefäß	BD Biosciences, CA, USA
5 ml Polystyrene Rundbodengefäß	BD Biosciences, CA, USA
MicroAmp™Optical 96-well Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Pipettenspitzen (10µl,100µl,1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (Falcon) (15ml,50ml)	BD Biosciences, CA, USA
Reaktionsgefäße (0,5ml,1,5ml,2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5ml,10ml,25ml)	BD Biosciences, CA, USA
4 ml Polystyrene Rundbodengefäß	BD Biosciences, CA, USA
QIAamp [®] DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
AmpF λ STR Identifier PCR Amplification Kit	Applied Biosystems
Whole Blood MicroBeads	Miltenyi Biotec

2.6 CHEMIKALIEN

Tabelle 5 Chemikalien

Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
FACS™ Clean Solution	BD Biosciences, CA, USA
FACS™ Rinse Solution	BD Biosciences, CA, USA
Dulbecco´s PBS	PAA, Pasching, Österreich
Ethylendinitrilotetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Flebogamma, human IgG	Biotest, Dreieich, Deutschland
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, 99.8%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
FACS™ Clean Solution	BD Biosciences, CA, USA
FACS™ Flow Solution	BD Biosciences, CA, USA
FACS™ Rinse Solution	BD Biosciences, CA, USA
Dulbecco's PBS	PAA, Pasching, Österreich
Ethylendinitrilotetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Flebogamma, human IgG	Biotest, Dreieich, Deutschland
Ficoll PM400	GE Healthcare
RPMI1640 Medium	Thermo Fisher Scientific,MA, USA
Lysepuffer	BD Biosciences, CA, USA

2.7 ANTIKÖRPER

Tabelle 6 Antikörper

Tube 1	Fluorochrom	Klon	Spezies	Konzentration	Hersteller
CD3	Pacific Blue	UCHT1	Maus	1:40	BD BioSciences
CD14	Pacific Blue	HCD14	Maus	1:143	Biolegend

CD16	Pacific Blue	3G8	Maus	1:20	Biolegend
CD19	V500	HIB19	Maus	1:80	BD BioSciences
CD27	eFluor650 NC	O323	Maus	1:80	eBioscience
lgD	APC-H7	IA6-2	Maus	1:80	BD BioSciences
CD38	APC	HIT2	Maus	1:40	eBioscience
CD24	PerCP-Cy5.5	ML5	Maus	1:80	BD BioSciences
Propidiumiodid					Biolegend
Tube 2					
CD3	eFluor650 NC	OKT3	Maus	1:40	eBioscience
CD45	Pacific Blue	30-F11	Ratte	1:40	Biolegend
CD11c	AF700	B-ly6	Maus	1:40	BD BioSciences
CD4	FITC	OKT4	Maus	1:200	Biolegend
CD8	PE	SK1	Maus	1:800	Biolegend
CD303	APC	AC144	Mensch	1:20	Miltenyi
Propidiumiodid					Biolegend

MATERIAL UND METHODEN

2.8 ISOLIERUNG PERIPHERER BLUT MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS VOLLBLUT

Die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells; PBMC) aus den Citrat-Vollblutproben wurde mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt: Das Citratblut wurde im Mischungsverhältnis von 1:2 mit PBS gemischt und über die Ficoll-Lösung geschichtet. Die in Ficoll-Lösung (Ficoll PM 400) befindlichen Sucrose-Polymere verleihen ihr eine spezifische Dichte, welche höher ist als die der zu isolierenden PBMC. Da die Dichte der Erythrozyten aufgrund ihres Eisengehaltes höher ist als die des Ficoll, kann ein mehrschichtiger Dichtegradient aufgebaut werden. Die PBMC sammeln sich durch die Zentrifugation (2000 rpm, 15 min., RT, ohne Bremse) zwischen den Dichtebereichen des Serums und des Ficoll an, während die dichteren Erythrozyten zum Boden des Reaktionsgefäßes sinken. Durch die geringe Osmolarität des Ficoll ist die morphologische und physiologische Integrität der PBMC bei der Isolierung gewährleistet. Der PMBC-enthaltende Ring wurde mit einer Pasteurpipette aspiriert und zweifach in PBS gewaschen (1300 rpm, 10 min., RT). Im Anschluss wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert. 5 µl der PBMC Suspension wurden 1:2 mit Trypanblau gefärbt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.9 IMMUNFÄRBUNG VON B-ZELLSUBPOPULATIONEN

Für die Immunfluoreszenzfärbung zur Charakterisierung der B-Zell-Populationen wurden die isolierten PBMC mit PBS + 2% Flebogamma inkubiert und auf eine Zellzahl von 1x10⁶ /100 µl eingestellt. Flebogamma enthält Immunglobuline der Klasse G, die durch eine Blockade der Fc-Membranrezeptoren unspezifische Bindungen der Immunfluoreszenzfärbung verhindern.

Die Oberflächenmarker (engl. *cluster of differentiation;* CD) von B-Lymphozyten repräsentieren sowohl ihre Funktion, als auch ihren Grad der Differenzierung. Die Phänotypisierung der B-Zell-Subpopulationen wurde nach der EUROClass Definition vorgenommen^{57,73}. Je 1x10⁶ Zellen wurden mit 100µl des jeweiligen Antikörpermix (Tabelle 6) in PBS + 2% Flebogamma eingesetzt und für 20 min. im Dunklen bei +4° C inkubiert. Nach der Inkubation mit der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte eine Waschung mit 100 µl PBS + 2% Flebogamma und die Aufnahme in 100 µl PBS + 2% Flebogamma für die durchflusszytometrische Messung. Unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer wurde jeder Probe 1 µl Propidiumiodid hinzugefügt, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Die gefärbten Zellen wurden mithilfe des BD Fortessa Durchflusszytometers und der BD FacsDIVA Software detektiert und gemessen, die Analyse erfolgte mit der Software FlowJo v.9.5. Als Negativkontrolle der Färbungen wurden entsprechende Isotypkontrollen gemessen. Diese gleichen den eingesetzten Fluoreszenzantikörpern in Klasse und Subtyp, besitzen jedoch keine Spezifität und erlauben daher die Detektion von unspezifischen Bindungen.

2.10 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Bestimmung der B-Zell-Subpopulationen erfolgte am Durchflusszytometer BD LSRFortessa. Dieses besitzt vier Laser mit den Farbspektren blau, rot, grün und ultraviolett, was die Detektion von bis zu 18 verschiedenen Fluoreszenzen erlaubt. Der Zellstrom der Probe wird durch ein druckbetriebenes hydrodynamisches System fokussiert, so dass einzelne Zellen von den Lasern erfasst werden können. Das Volumen und die Granularität der Zellen werden durch Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC, *forward scatter*, FSC) bestimmt.

Dabei wird ein im 90° Winkel zum Zellstrom ausgerichteter Laserstrahl durch das Auftreffen auf eine Zelle gebrochen und das Lichtsignal an zwei Stellen detektiert: Das Vorwärtsstreulicht zur Volumenmessung in Richtung des Laserstrahlverlaufs, das Seitwärtsstreulicht zur Granularitätsmessung in fast 90°-Winkel zum ursprünglichen

Laserstrahl. Zusätzlich zur Messung von Granularität und Volumen wurden die Frequenzen der PBMC-Populationen anhand fluoreszenzmarkierter Oberflächenmarker gemessen. Diese an Antikörper konjugierten Fluorophore werden durch die vier weiteren Laser zunächst angeregt und emittieren in der Folge ein Fluoreszenzsignal in einem spezifischen Spektrum, welches von Photodetektoren aufgezeichnet wird. Da sich diese Spektren bei einigen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern überschneiden, wurde vor den Messungen eine Kompensation mit gefärbten Beads angefertigt. Die BD FACSDiva Software subtrahiert die überlappenden Fluoreszenzanteile, sodass das Signal der Fluoreszenzen für die Messungen in den einzelnen Kanälen korrigiert wird.

Die aus frischen Blutproben der Patienten isolierten PBMC wurden mit Fluorophorkonjugierten Antikörpern, die spezifisch gegen Oberflächenmarker sind, angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nach der durchflusszytometrischen Messung wurden mit Hilfe der FlowJo 9 Software die verschiedenen Zellpopulationen identifiziert. Die Analyse erfolgte durch das schrittweise digitale Auftragen der Zellen an einer X- und Y-Achse. Dabei kann der Parameter für die Achsen gewählt werden, beispielsweise die Granularität oder ein spezifischer Fluorochrom-konjugierter Antikörper bzw. eine von ihm emittierte Wellenlänge des Lichts. So lassen sich in mehreren Schritten einzelne sogenannte Gates (dt. Tore) setzen, bis die Wunschpopulation identifiziert ist. Wird ein Oberflächenmarker von einer spezifischen Zellpopulation exprimiert, so haftet sich der Fluorophor-konjugierte Antikörper daran und wird durch die Laser angeregt. In der Folge emittiert er ein Fluoreszenssignal mit bestimmter Wellenlänge, welches durch einen Photosensor detektiert wird. Dementsprechend werden einzelne Populationen, welche nicht fluoreszieren mit einem Minuszeichen (-) und diejenigen, die den Marker tragen, mit einem Pluszeichen (+) bezeichnet. Außerdem werden in einigen Fällen Abstufungen der Fluoreszenz bezeichnet: (low) für niedrig, intermediate (int) für intermediär, und high (hi) für eine starke Fluoreszenz.

2.11 KNOCHENMARK-HISTOLOGIE

Die Daten zur Knochenmarkpräparation und –evaluation wurden durch zwei unabhängige Hämatopathologen, des Instituts für Pathologie der Charité Berlin erhoben, abgeglichen und für diese Arbeit mit den durchflusszytometrischen Daten korreliert. Die Knochenmarkzylinder wurden dazu in 4 %-igem Formaldehyd gepuffert, mithilfe von EDTA entkalzifiziert und in Paraffin fixiert. Die 4 µm Sektionen wurden für die Untersuchung auf die Osteoblastenanzahl mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

Außerdem erfolgten die Färbungen durch *periodic acid-Schiff*-Reaktion, Giemsafärbung und Gomori-Versilberung, sowie eine Eisen-Färbung.

Für die Immunmarkierung wurden Sektionen entparaffiniert bevor sie mit dem primären Antikörper inkubiert wurden (Leica BondMax system; Leica). Zur Detektion von CD3⁺ Zellen wurden der Klon LN10 und das Detektionskit *Bond Polymer Refine Diaminobenzidine* genutzt. Zunächst wurden die Paraffinschnitte einzeln auf die Anzahl der T-Zellen und der Osteoblasten (HE) gefärbt, im Anschluss wurden auch Ko-Färbungen durchgeführt, die eine gleichzeitige Betrachtung von T-Zellen und Osteoblasten ermöglichen.

2.12 CHIMÄRISMUS-ANALYSE

Drei bis vier Wochen nach allo-HSZT wurden für die Chimerismus-Analysen CD34⁺ und CD3⁺ mononukleäre Zellen aus Knochenmarkaspiraten magnetisch aktiviert und sortiert (Whole Blood MicroBeads und autoMACS® Separator, Miltenyi Biotec). Die DNS wurde dann aus diesen sortierten Zellen extrahiert und mittels AmpFλSTR Identifier PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) vervielfältigt. Diese wurden verglichen mit vor der Transplantation detektierten *short tandem repeats* aus dem peripheren Blut der Patienten und des Spenders. Die Software GeneMapper 3.7 wurde zur Quantifizierung genutzt.

2.13 STATISTIK

Für die statistische Auswertung wurde die Computersoftware Graphpad Prism v6.01 genutzt (GraphPad Software, Kalifornien, USA). Für die Analyse kategorialer Variablen wurde der zweiseitige exakte Fisher-Test genutzt. Eine Überschreitungs-Wahrscheinlichkeit von p≤0.05 wird als signifikant angesehen. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

3. ERGEBNISSE

3.1 KLINISCHE DATEN

Da durch die Erprobung neuer Kombinationen und neuer Wirkstoffe stets neue Regime Einzug halten, existieren für die reduzierte Konditionierung ausschließlich Arbeitsdefinitionen^{74,75}. Wir haben uns für die Betrachtung nach den Champlin Kriterien gerichtet, über welche in der Klinik weitgehend Konsens herrscht⁷⁴:

- 1. Das Regime resultiert in einer reversiblen Myelosuppression (normalerweise innerhalb von 28 Tagen), wenn es ohne Stammzellunterstützung gegeben wird.
- 2. Das Regime resultiert bei einem Teil der Patienten in einem gemischten Chimärismus der Zellen aus dem Knochenmarkspunktat bei der ersten Untersuchung nach Transplantation
- 3. Das Regime hat eine niedrige Rate an nicht-hämatologischen Toxizitäten

Basierend auf dieser Grundlage wurde nur das Regime mit Cyclophosphamid mit einer Ganzkörperbestrahlung von 12 Gray als volles Konditionierungsregime betrachtet. Dieses erhielten 11 der 52 Patienten. Die Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität (RIC), die ebenfalls in Tabelle 7 aufgelistet sind, basieren allesamt auf einer Kombination des Purin-Analogons Fludarabin mit weiteren Zytostatika und/oder einer geringeren Strahlendosis von 2 bis 8 Gray. Dieses Regime hatten 41 Patienten erhalten.

Konditionierungs-Regime	n=52	Prozent
Reguläres Regime		
Cyclophosphamid, 12 Gy TBI	11	21
RIC Fludership, Busulfap	21	60
	31	80
Fludarabin, Cytosin-Arabinosid, Amsacrin, 4Gy TBI	1	2
Fludarabin, Cytosin-Arabinosid, Amsacrin und Cyclophosphamid 4Gy TBI	3	6
Fludarabin, Cytosin-Arabinosid, Amsacrin und Cyclophosphamid 2Gy TBI	1	2
Fludarabin, 8 Gy TBI	1	2
Fludarabin, 4 Gy TBI	1	2
Fludarabin, 2 Gy TBI	3	6

Tabelle 7 Konditionierungsregime

TBI: engl. total body irridiation; Ganzkörperbestrahlung. Diese Tabelle basiert auf Mensen et al., 2014⁷⁶.

ERGEBNISSE

Die klinischen Daten wurden durch den behandelnden Arzt während der Vor- und Die Nachsorgetermine erhoben. Nachsorgetermine nach der waren Stammzelltransplantation eng gestaffelt angesetzt (alle sieben bis vierzehn Tage) und wurden bei einem unproblematischen Verlauf nach Tag 30 auf eine monatliche Kontrolle reduziert. Zu diesen Terminen wurde neben einer Anamneseerhebung auch eine Untersuchung durchgeführt vollständige körperliche und das Blut für die durchflusszytometrischen Messungen entnommen. Außerdem wurden in monatlichen Abständen Knochenmarkaspirate auf den Spenderzellchimärismus hin untersucht. Die Diagnose der akuten GvHD wurde gemäß den Glucksberg-Seattle-Konsens-Kriterien von 1994 und die der chronischen GvHD nach dem National Institutes of Health- Konsensus gestellt.

Es sind verschiedene Grading-Systeme für die aGvHD entwickelt worden: Bei den Glucksberg-Seattle-Kriterien (GSC) aus dem Jahr 1974 wird den einzelnen betroffenen Organsystemen (Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber) ein Stadium zugeteilt. Aus den Stadien, von denen mindestens zwei größer null sein müssen, ergibt sich unter Einbeziehung des klinischen Allgemeinzustandes ein prognostischer Gesamtgrad²³. Dieses Gradingsystem wurde 1994 in einer Konsens-Konferenz unter Einbeziehung neuer Daten validiert und geringfügig geändert. Seitdem wird auch eine anhaltende Übelkeit schon als Stadium 1 des Darms bewertet⁷⁷. Diese Konsenskriterien werden mitunter auch als Keystone 1994 Kriterien bezeichnet. Das System der International Bone dt. Marrow Transplant Registry (IBMTR, internationales Knochenmarkspenderegister) von 1995 differenziert zusätzlich die Stadien 1 und 2 der Haut und stuft einen alleinigen Befall von Leber oder Darm als gravierender ein als die GSC/Keystone 1994 Kriterien⁷⁸.

ERGEBNISSE

Beide Systeme bringen ähnliche prognostische Gruppen hervor^{79,80} In der klinischen Anwendung sind noch immer die *GSC*, bzw. die *Keystone* Konsens-Kriterien von 1994 gebräuchlich und auch für diese Arbeit wurden die *Keystone*-Kriterien angewendet (Tabelle 8).

Stadium	Haut	Darm	Leber
0	kein Exanthem	Diarrhoe <500ml	Bilirubin <2mg/dL
1	Exanthem bis 25% der KOF	Diarrhoe 500-1000ml oder anhaltende Übelkeit	Bilirubin 2-3mg/dL mit oder ohne Erhöhung der GOT
2	Exanthem 25%- 50% der KOF	Diarrhoe 1000-1500ml	Bilirubin 3-6mg/dL mit oder ohne Erhöhung der GOT
3	generalisiertes Exanthem	Diarrhoe 1500-2000ml	Bilirubin 6-15mg/dL
4	Hautablösung, Blasenbildung	Diarrhoe >2000ml oder Kolik oder Ileus oder Blutung	Bilirubin >15mg/dL mit oder ohne Erhöhung der GOT

Tabelle 8 Organstadien der akuten GvHD gemäß Keystone-Konsenskriterien 1994

KOF: Körperoberfläche, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Die chronische Form der GvHD wird gemäß des *National Institutes of Health* Konsens von 2005 in dem Zeitraum vom 100. Tag bis zu drei Jahren nach Transplantation diagnostiziert³⁹. Hinzu kommt ein Punktesystem, das nur zum Tragen kommt, wenn die chronische GvHD durch ein distinktes Merkmal diagnostiziert werden konnte. Dieses System umfasst, anders als bei der *GSC*, eine Einteilung in vier Punktwerte (0-3) (Tabelle 9). Zusätzlich zu Haut, Leber, Gastrointestinaltrakt und Allgemeinzustand werden auch Mundschleimhaut, Tränenproduktion, Lungenfunktion, Faszien und Gelenke sowie die Vaginalschleimhaut bewertet³⁹. Zusätzlich zu den schon bei der aGvHD angewendeten Diagnosekriterien wird auch auf eine Beteiligung der oralen und genitalen Mukosa und Tränen- und Speicheldrüsen geachtet. Um die Merkmale der cGvHD nicht mit der im gleichen Zeitraum auftretenden prolongierten oder spätauftretenden akuten GvHD zu verwechseln, existiert eine Liste mit distinkten Merkmalen der cGvHD, von der immer mindestens ein Kriterium erfüllt sein muss, damit die Diagnose gestellt werden darf.

Tabelle 9 Gradeinteilung der chronischen GvHD nach den National Institutes of H	ealth
---	-------

Grad	Anzahl involvierter Organsysteme	Punktwert des Organsystems
keine (0) mild (I)	keine 1-2	1
moderat (II)	1-2 3 oder >3 oder Lunge	2 1 1
ausgeprägt (III)	1 oder Lunge	3 2

Bei einer Einstufung der cGvHD als moderat (II) oder höher wird eine systemische Glukokortikoidtherapie empfohlen³⁹. Diese Einteilung konnte auch in neueren Studien validiert werden⁸¹. Die Risikofaktoren für eine cGvHD sind eine aGvHD höheren Grades (III-IV)³⁵ und höheres Patientenalter, sowie die Verwendung von mobilisierten Zellen aus dem peripheren Blut für die Transplantation³⁵.

In der Tabelle 10 sind neben dem Auftreten einer GvHD auch diejenigen klinischen Charakteristika aufgelistet, die Risikofaktoren für das Auftreten einer GvHD darstellen; wie beispielsweise das Alter der Patienten, die Konditionierungsintensität und auch die Art der immunsuppressiven GvHD-Prophylaxe.

Tabelle 10 Klinische Daten bis ein Jahr nach der Transplantation

		n=52	% von n
Mittleres Alter	58 (22-72) <50 >50	52 17 33	33 67
Geschlecht	weiblich	23	44
	männlich	29	56
Diagnose	AML	45	87
	ALL	7	13
Konditionierung	volle Intensität	11	21
	reduzierte Intensität	41	79
Spender	matched- verwandt	15	29
	matched- unverwandt	37	71
	10/10 MHC-matched	39	75
	9/10 MHC-mismatched	13	25
ATG vor alloHSZT	ja	44	85
	nein	8	15
GvHD Prophylaxe nach alloHSZT	Cyclosporin A, Mycophenolat-Mofetil Cyclosporin A, Methotrexat Cyclosporin A, Mycophenolat-Mofetil, Methotrexat unbekannt	35 8 1 8	67 15 2 15
aGvHD (bis D100)	ja	18	35
	nein	17	33
	späte aGvHD/ Overlap	6	12
	unbekannt/ verstorben	11	21
cGvHD	ja	12	23
	nein	12	23
	unbekannt/ verstorben	28	54
aGvHD (bis D100)	Grad 0-I	23	44
	Grad II-IV	13	25
	unbekannt/ verstorben	16	31
cGvHD	Grad 0-I	14	27
	Grad II&III	10	19
	unbekannt/ verstorben	28	54
Reaktivierung	EBV	7	13
	CMV	21	40
	Keine Reaktivierung/unbekannt/ verstorben	24	46

Rezidiv (bis D360)	ja	10	19
	nein	17	33
	unbekannt/ verstorben	25	48
Verstorben (bis D360)	ja	27	52
	nein	23	44
Teilnahme abgelehnt		2	4

AML: Akute myeloische Leukämie, ALL: Akute lymphatische Leukämie, ATG: Antithymozytenglobulin, aGvHD: akute *Graft-versus-Host-Disease*; cGvHD: chronische *Graft-versus-Host-Disease*, EBV: Ebstein-Barr-Virus, CMV: Cytomegalievirus. Diese Tabelle basiert auf Mensen et al., 2014⁷⁶.

Für die eingeschlossenen Patienten ergab sich ein mittleres Alter von 58 Jahren mit einer Standardabweichung von 13 Jahren. Wie für dieses Alter zu erwarten war, wiesen sie in der Mehrzahl eine AML auf und in 79 % der Fälle wurden die Patienten mit einem reduzierten Konditionierungsregime behandelt. Ein Großteil der Patienten (85 %) erhielt Antithymozytenglobulin (ATG). Diese polyklonalen Antikörper depletieren sowohl T-Zellen des Transplantats, als auch die verbleibenden T-Zellen des Patienten und verringern so das Risiko einer Abstoßung³⁴. Die Patienten bekamen es an den Tagen -4,-3,-2 und -1 vor der Stammzellübertragung, um zu gewährleisten, dass der Spiegel dieses T-Zell-depletierenden Medikaments am Tag der Transplantation am höchsten ist. Fast ein Drittel der Patienten erhielten Stammzellen von MHC-passenden verwandten Spendern, wohingegen das Transplantat von den verbleibenden Patienten von unverwandten Fremdspendern stammte. Von diesen wiederum wiesen ca. ein Drittel einen 9/10 MHC-Mismatch auf. Nach der Transplantation erhielten alle Patienten den Calcineurinhemmer Cyclosporin A, in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil (MMF), einem reversiblen Hemmer der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, welches häufig nach einer RIC verwendet wird. Weitere acht Patienten bekamen die Kombination mit Methotrexat (MTX), einem Folsäure-Antagonisten. Nur ein einzelner Patient bekam alle drei Medikamente.

Eine klassische akute GvHD während der ersten 100 Tage nach der Transplantation entwickelten 18 der 52 Patienten, 13 von ihnen eine aGvHD mit Grad II oder höher, welche eine systemische Immunsuppression notwendig macht. Weitere sechs zeigten erst nach 100 Tagen Symptome einer aGvHD, fünf von ihnen mit einem sogenannten *Overlap*-Syndrom, wobei zeitgleich distinkte Zeichen einer chronischen GvHD vorhanden sind. Für die Bewertung der cGvHD wurden nur Patienten eingeschlossen, die bis mindestens Tag 180 überlebt hatten und während dieser Zeit nicht aufgrund eines

manifesten Rezidivs behandelt wurden; hier zeigten zwölf Symptome einer cGvHD, zehn davon mit einem Grad II oder höher.

Nach erfolgter Transplantation kann es zu einer Reaktivierung von latenten Viruserkrankungen kommen. Zu den häufigsten zählen hier die Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus und Cytomegalievirus. Auf beide Reaktivierungen wird bei jedem Kontrolltermin untersucht. Sie werden mittels quantitativer PCR nachgewiesen. Sieben Patienten wiesen innerhalb der 360 Tage nach Transplantation eine Reaktivierung von EBV auf und 21 zeigten eine Reaktivierung von CMV. Diese Patienten wurden mit Rituximab, beziehungsweise mit Valganciclovir behandelt. Fast ein Fünftel aller Patienten entwickelten bis zum Tag 360 ein Rezidiv und mehr als die Hälfte (27 von 52) verstarb binnen dieser Zeit.

3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die PBMC wurden zunächst in Propidium-Iodid (PI)-positive tote und PI negative lebendige Zellen unterteilt (Abbildung 3.1). Als nächstes folgten die Identifikation der Gesamtlymphozyten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, engl. *forward scatter (FSC)* und *side scatter (SSC)* und der Ausschluss von Dubletten. Danach wurden anhand der CD3 Expression die T-Zellen identifiziert.



Abbildung 3.1 Gating-Strategie zur Identifikation der T-Zell-Population

Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel eines gesunden Probanden. Hier ist gezeigt wie mittels der Marker die Anzahl der T-Zellen aus den gefärbten PBMC ermittelt wurde. Die Beschriftung der X-Achse und Y-Achse geben an, welches Fluoreszenzsignal mit der Durchflusszytometrie untersucht wurde und welcher Marker hier dargestellt wird. Zunächst wurde auf die lebendigen Zellen gegatet (PI), dann aus diesen die Lymphozyten abgegrenzt. Im Anschluss wurden all jene Zellen digital aussortiert, die zusammenklebten, die sogenannten Dubletten. Durch das Auftragen des Markers CD3 lässt sich so eindeutig die T-Zellpopulation identifizieren.

Die im vorangegangenen Schritt identifizierte CD3⁺ Population wurde dann jeweils auf die Anzahl der CD4⁻ und CD8⁺ T-Zellen untersucht (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2 Gating-Strategie zur Identifikation der T-Zell-Subpopulationen.

Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel eines gesunden Probanden. Nach der Identifizierung der T-Zellpopulation muss noch in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden werden. Die Beschriftung unter dem Bild benennt das jeweilig gezeigte Gate. In der Darstellung ist zudem der Prozentsatz der benannten Population innerhalb der aufgetragenen Gesamtpopulation verzeichnet.

In Abbildung 3.3 ist die Gating-Strategie für die B-Zellpopulationen aufgezeigt. Hier wurden nach dem Ausschluss der toten Zellen (Abbildung 3.3) anhand von SSC und FSC zunächst die Gesamtlymphozytenpopulation markiert und die Dubletten ausgeschlossen (Abbildung 3.3). Im nächsten Schritt wurden über das Auftragen von CD3⁺, CD16⁺ und CD14⁺- Zellen entlang der Y-Achse die Natürlichen Killerzellen, Makrophagen, die Monozyten, neutrophile Granulozyten und T-Zellen ausgeschlossen.



Abbildung 3.3 Gating-Strategie zur Identifikation von B-Zellen.

Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel eines gesunden Probanden. Von den Lymphozyten ohne Dubletten ausgehend werden anhand der Marker CD3, CD16 und CD14 die Zellen der angeborenen Immunantwort und T-Zellen aussortiert.

Im nächsten Schritt wurde im CD27/CD19 Plot auf die CD19⁺ B-Zellen gegatet. Innerhalb dieser konnten nun mit Hilfe der Marker CD24 und CD38 zunächst die CD38hiCD24⁻ Plasmablasten identifiziert werden. Im Folgenden wurden durch vier verschiedene Gates die Frequenzen an klassengewechselten Gedächtnis B-Zellen (CD27⁺IgD⁻), Marginalzonen-ähnlichen B-Zellen (CD27⁺IgD⁺) und doppelt negativen B-Zellen (CD27⁻IgD⁻) erhoben. Im CD27⁻IgD⁺ Gate konnten naive (CD38^{int}CD24^{int/low}) von transitionalen (CD38^{int}CD24^{hi}) B-Zellenunterschieden werden (Abbildung 3.4).





Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel eines Patienten am Tag 360. Im Anschluss werden mithilfe des Markers CD19 die B-Zellen ausgewählt. Dann werden die einzelnen Subpopulationen identifiziert. Zunächst die Plasmablasten, welche CD38⁺⁺ sind. Im Anschluss können Gedächtniszellen, Marginalzonen (MZ)-ähnliche B-Zellen und doppelt-negative (DN) differenziert werden. Im Gate der naiven und transitionalen B-Zellen können in einem letzten Schritt anhand der Marker CD24 und CD38 die beiden B-Zellpopulationen unterschieden werden, die als erstes im peripheren Blut erscheinen.

3.3 **T-ZELLREKONSTITUTION**

Um B- und T-Zelldefekte der Patienten nach der Transplantation zu evaluieren, wurden PBMC aus Vollblut extrahiert, mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und die absoluten Zahlen pro Mikroliter Blut über das bei der Probenentnahme angefertigte Blutbild errechnet. Wir analysierten auf diesem Wege die absoluten Zahlen der CD19⁺ B-Zellen und deren Subpopulationen, sowie der CD3⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen. Im Folgenden werden diese Zahlen immer als mittlere Zellzahl/µl Blut± Standardabweichung (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Die Gesamtzahl der CD3⁺ T-Zellen der Patienten stieg nach der Transplantation beständig (Abbildung 3.5) und war an Tag 180 bereits nicht mehr signifikant geringer als die der GK.



Abbildung 3.5 Die T-Zell-Rekonstitution bis Tag 360 nach Transplantation

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der CD3⁺ T-Zellen, sowie der CD4⁺ Helfer-T-Zellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen an den Tagen 14 (n=27), 28 (n=44), 60 (n=35), 90 (n=36), 180 (n=28) und 360 (n=23) nach alloHSZT erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte pro Mikroliter Blut±SEM. Die grauen Balken zeigen die Referenzbereiche der GK (n=12). Darstellung nach Mensen et al., 2014^{76} *P \leq .05, **P \leq .001

Bei der Analyse der Subpopulationen wurde deutlich, dass der Anstieg vor allem auf die schnell ansteigende Zahl der CD8⁺ zytotoxischen T- Zellen zurückzuführen war. Diese erreichten bereits an Tag 60 das Niveau der GK und stiegen bis zum Tag 360 signifikant an. Die Zahl der CD4⁺ Helfer-T- Zellen hingegen stieg langsamer und war auch ca. ein Jahr nach der Transplantation noch signifikant niedriger als die Zellzahlen der GK.
3.4 B-ZELLREKONSTITUTION

Die Zahl der CD19⁺ B-Zellen blieb nach der Transplantation niedrig, bis an Tag 60 nach alloHSZT die Rekonstitution beginnt (Abbildung 3.6). Betrachtet man die einzelnen Subpopulationen, so waren die ersten neugebildeten B-Zellen, die transitionalen B-Zellen, in den ersten 28 Tagen nahezu nicht detektierbar. Zwischen Tag 60 und Tag 90 waren die Zahlen im Vergleich zu den GK erhöht, die Mittelwerte zeigten jedoch besonders an Tag 90 eine große Standardabweichung.



Abbildung 3.6 Die Zahl aller B-Zellen, sowie der transitionalen und naiven B-Zellen bis Tag 360 nach allo-HSZT

Gezeigt sind hier Zellzahlen der gesamten CD19⁺ B-Zellen, sowie die Subpopulationen der IgM⁺IgD⁺CD38⁺⁺CD24⁺⁺ transitionalen Zellen und CD27⁻IgM⁺IgD⁺⁺ naiven B-Zellen an den Tagen 14 (n=27), 28 (n=44), 60 (n=35), 90 (n=36), 180 (n=28) und 360 (n=23) nach alloHSZT. Dargestellt sind Mittelwerte pro Mikroliter Blut± SEM. Die grauen Balken zeigen die Mittelwerte der GK (n=12). Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶ *P ≤.05, **P≤.001

Anschließend verringerten sich die Zahlen wieder und erreichten ca. ein Jahr nach der Transplantation ungefähr das gleiche Level wie die GK, mit einer sehr geringen Standardabweichung und damit recht gleichmäßigen Zahlen in der gesamten Kohorte. Im Anschluss regenerierten sich- entsprechend der ontogenetischen Entwicklung- die Zahlen der naiven B-Zellen, die bereits in der Lage sind auf Antigene zu reagieren. Ab Tag 90 waren sie nicht mehr signifikant verringert und stiegen in den folgenden Monaten weiter an. Ein Jahr nach der alloHSZT waren sie sogar signifikant erhöht.

Weder die IgM-produzierenden MZ-ähnlichen B-Zellen, noch die klassengewechselten Gedächtnis B-Zellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchgemacht haben und nun IgGoder IgA produzieren, konnten sich zahlenmäßig während des ersten Jahres nach der Transplantation vollständig erholen (Abbildung 3.7). Beide Populationen konnten einen steten Anstieg verzeichnen, aber auch an D360 blieben ihre Mittelwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert.



Abbildung 3.7 Die Zahl der Marginal-Zonen-ähnlichen B-Zellen und der klassengewechselten Gedächtniszellen bis Tag 360 nach allo-HSZT

Die Mittelwerte der Zellzahlen der CD27⁺IgD⁻ klassengewechselten Gedächtniszellen, sowie der CD27⁺IgM⁺IgD⁺ MZ-ähnlichen Zellen an den Tagen 14 (n=27), 28 (n=44), 60 (n=35), 90 (n=36), 180 (n=28) und 360 (n=23) Die grauen Balken zeigen die Mittelwerte der GK (n=12). Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶ *P ≤.05, **P≤.001

Die Mittelwerte der doppelt negativen (DN)- B-Zellen, die weder CD27 noch IgD exprimieren, blieben bis zum dritten Monat nach alloHSZT verringert. Sie erreichten aber durchschnittlich zum Messzeitpunkt Tag 180 eine Zellzahl, die gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war. Schon an Tag 60 ist ihre Zahl fast fünf Mal so hoch wie die der CD27⁺ klassengewechselten Gedächtniszellen (Abbildung 3.8). Die Zahl der Plasmablasten blieb bis zum Tag 60 niedrig, an Tag 90 war sie signifikant erhöht. Zu den Messzeitpunkten an Tag 180 und 360 erreichten sie ein normales Level.



Abbildung 3.8 Regeneration der CD27⁻IgD⁻ Gedächtniszellen und Plasmablasten bis Tag 360 nach allo-HSZT

Die Zellzahlen der CD27⁻IgD⁻ doppeltnegativen Gedächtniszellen, sowie der CD27⁺⁺ CD38⁺⁺CD24⁻ Plasmablasten wurden an den Tagen 14 (n=14/9), 28 (n=19/16), 60 (n=17/13), 90 (n=19/15), 180 (n=13/15), 360 (n=10/12) nach alloHSZT erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte pro Mikroliter Blut± SEM. Die grauen Balken zeigen die Mittelwerte der GK (n=12). Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶ *P ≤.05, **P≤.001

3.5 FRÜHER UND SPÄTER BEGINN DER B-ZELL-REKONSTITUTION

In der Analyse des Rekonstitutionsbeginns, gekennzeichnet durch den Anstieg an transitionalen B-Zellen, konnte beobachtet werden, dass ein Teil der Patienten bereits zwischen Tag 60 und 90 einen Anstieg dieser B-Zellen zeigte, während die anderen zu diesem Zeitpunkt noch nahezu undetektierbare Zellzahlen aufwiesen. Bei diesen Patienten konnte erst an Tag 180 ein Anstieg der B-Zellen verzeichnet werden.

Um diese Verzögerung der B-Zellneuproduktion detaillierter untersuchen zu können wurden zwei Gruppen definiert: War der Anstieg der absoluten Zellzahl der B-Zellen zwischen der Messung an Tag 28 und der Messung an entweder Tag 60 oder Tag 90 statistisch signifikant, so wurden sie der Gruppe des *frühen Rekonstitutionsbeginns*, (n=19, 37 % der Patienten) zugeordnet. War zwischen diesen Messzeitpunkten hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt worden und ihre B-Zellzahl stieg frühestens zum Tag 180 signifikant an, wurden sie der Gruppe des *späten Rekonstitutionsbeginns* (n=17, 33 % der Patienten) zugeordnet. Etwa ein Drtittel der Patienten (30 %) waren

während der ersten drei Monate nach der Transplantation entweder verstorben, hatten ein Rezidiv oder bekamen aufgrund einer EBV-Reaktivierung Rituximab und wurden deshalb in keine der Gruppen eingeschlossen. Die folgenden B-Zellen-Mittelwerte pro Mikroliter Blut± SEM wurden gemessen: **Tag 60**: 56±14 früher Beginn, 3±1 später Beginn; **Tag 90:** 173±76 früher Beginn, 15±13 später Beginn; **Tag 180**: 159±38 früher Beginn, 62±25 später Beginn.

Diese Gesamt-B-Zellzahlen wurden vor allem von den transitionalen B-Zellen dominiert, die auch in der Durchflusszytometrie deutlich sichtbar wurden (vergleiche Abbildung 3.6). Hier zeigte sich bei der Gruppe des frühen Rekonstitutionsbeginns entsprechend der in Abbildung 3.3 bis Abbildung 3.4 gezeigten *Gating*-Strategie im Gate der CD27⁻ und IgD⁺ Zellen die Population der transitionalen B-Zellen, die deutlich sowohl CD38⁺ als auch CD24⁺ war. Bei den Patienten des späten Beginns war diese Population frühestens an Tag 180 sichtbar (Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9 Beginn der B-Zell-Rekonstitution ließ zwei Gruppen unterscheiden

Gezeigt sind die CD38⁺⁺CD24⁺⁺ B-Zellen eines Patienten mit frühen Beginn der B-Zellrekonstitution an Tag 60, sowie eines zweiten Patienten mit späten Beginn der B-Zellrekonstitution an Tag 60 und Tag 180. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Da sich der monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab direkt gegen das B-Zelloberflächenmolekül CD20 richtet und damit die B-Zellzahl dezimiert, wurden Patienten, die nach der Transplantation mit Rituximab behandelt worden waren ausgeschlossen. Zwölf Patienten verstarben noch zwischen Tag 60 bis Tag 90 nach alloHSZT.

Die Einteilung in zwei Gruppen wurde über signifikant unterschiedliche Zahlen der Gesamt-B-Zellen an den Tagen 60 bis 180 definiert. Der Unterschied ließ sich vor allem

auf eine unterschiedliche Kinetik der Rekonstitution der zwei Subpopulationen der transitionalen und naiven B-Zellen zurückführen (Abbildung 3.10): Infolge des Anstiegs der transitionalen B-Zellen in der frühen Rekonstitutionsgruppe erholten sich auch die **B-Zellen** signifikant Zahlen der naiven rascher. als es in der späten Rekonstitutionsgruppe zu beobachten war. In der Gruppe mit spätem Beginn war zu keinem Zeitpunkt eine so starke Erhöhung der transitionalen Zellen zu verzeichnen, wie sie zu Tag 60 und 90 in der Gruppe mit frühem Beginn bestand. Dennoch ist es denkbar, dass auch sie eine Spitze ähnlich der Gruppe des frühen Beginns aufwiesen, die durch die größeren zeitlichen Abstände zwischen den Messungen nicht erfasst wurde. An Tag 90 gab es in der Gruppe des frühen Beginns zwar eine große Standardabweichung, aber der Unterschied zur Gruppe des späten Beginns war hochsignifikant, da deren durchschnittliche Zellzahl gegen null tendierte. Die durchschnittliche B-Zellzahl der gesunden Kontrollen (GK), die bei ca. 75 Zellen pro Mikroliter lag, überholte die Gruppe mit früher Rekonstitution bereits zwischen Tag 60 und 90, die Gruppe mit spätem Beginn ca. an Tag 180 (nicht abgebildet).



Abbildung 3.10 Unterschiede der B-Zell-Rekonstitution in den Patientengruppen

Gezeigt sind hier Zellzahlen der gesamten CD19+ B-Zellen, sowie die Subpopulationen der IgM+IgD+CD38++CD24++ transitionalen Zellen und CD27-IgM+IgD++ naiven B-Zellen (früher Beginn /später Beginn)14 (n=14/9), 28 (n=19/16), 60 (n=17/13), 90 (n=19/15), 180 (n=13/15), 360 (n=10/12) nach alloHSZT erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte pro Mikroliter Blut± SEM. Die schwarze Linie zeigt die Zellzahlen der Gruppe mit frühem Beginn der Rekonstitution, die graue die derer mit einem späten Beginn. Darstellung nach Mensen et al., 2014^{76} *P \leq .05, **P \leq .001

Die Zahlen der reifen, aber noch antigenunerfahrenen naiven B-Zellen, die sich aus dem Pool der transitionalen Zellen generieren, waren ebenfalls an Tag 60 in beiden Gruppen das erste Mal signifikant unterschiedlich. Sie stiegen in der Gruppe mit spätem Beginn um einen Monat zeitversetzt an. Sie stiegen bedeutend langsamer als die Zahlen der naiven Zellen der Patienten mit frühem Beginn. So erreichten sie erst an Tag 180 einen leichten Anstieg auf ca. 25 Zellen pro Mikroliter- eine Zahl, welche die frühe Rekonstitutionsgruppe bereits zwischen Tag 60 und Tag 90 erreicht haben musste, da ihre durchschnittliche Zellzahl zum Messzeitpunkt an Tag 360 nach der Transplantation war in der Subpopulation der naiven B-Zellen kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen.

Die Zahl der Marginalzonen-ähnlichen B-Zellen war bei den Patienten mit frühem Beginn an Tag 90 und Tag 180 gegenüber der Zellzahl derer mit spätem Beginn signifikant erhöht. Letztgenannte erreichten erst zwischen Tag 180 und 360 eine Zellzahl die mit der Zellzahl der Frührekonstitutionsgruppe an Tag 60 vergleichbar war. Der weitere Rekonstitutionsverlauf war in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 3.11). Beide Gruppen blieben auch ein Jahr nach Transplantation hinter dem niedrigsten gemessenen Mittelwert bei den GK von 4 Zellen pro Mikroliter zurück.



Abbildung 3.11 Marginalzonen-ähnliche B-Zellen und klassengewechselte Gedächtniszellen in Patienten mit früher und später Rekonstitution

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der CD27⁺IgD⁻ klassengewechselten Gedächtniszellen sowie der CD27⁺IgM⁺IgD⁺ MZ-ähnlichen Zellen an den Tagen (früher Beginn/ später Beginn) 14 (n=14/9), 28 (n=19/16), 60 (n=17/13), 90 (n=19/15), 180 (n=13/15), 360 (n=10/12) nach alloHSZT erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte pro Mikroliter Blut± SEM. Die schwarze Linie zeigt die Zellzahlen der Gruppe mit frühem Beginn der Rekonstitution, die graue die derer mit einem späten Beginn. Darstellung nach Mensen et al., 2014^{76} *P $\leq .05$, **P $\leq .001$

Bei den klassischen klassengewechselten Gedächtniszellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchmachen, konnten sehr ähnliche Verläufe in beiden Gruppen festgestellt werden. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Abweichung zwischen den beiden Gruppen. Auch sie blieben ein Jahr nach der allogenen Transplantation hinter der niedrigsten durchschnittlichen Zellzahl der Gesunden von 10 Zellen pro Mikroliter zurück.

Anders bei den doppelt-negativen B-Zellen und den Plasmablasten (Abbildung 3.12): Die durchschnittliche Zahl der DN B-Zellen bei den Gesunden lag bei ca. 7 Zellen pro Mikroliter, die Patienten mit frühem Beginn überholten diese Zahl zwischen Tag 28 und Tag 60, die Patienten mit spätem Beginn zwischen Tag 60 und Tag 90. Im Vergleich der beiden Gruppen miteinander waren die Zellzahlen der frühen Rekonstitutionsgruppe an Tag 60 und Tag 90 gegenüber der Gruppe der späten Rekonstitution noch signifikant erhöht, an den Zeitpunkten ein halbes Jahr und ein Jahr nach Transplantation war eine Angleichung der Populationsgröße im peripheren Blut zu sehen.



Abbildung 3.12 Zellzahlen der DN Gedächtniszellen und der Plasmablasten bis Tag 360 in Patienten mit früher und und später Rekonstitution

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der CD27⁻IgD⁻ doppeltnegativen Gedächtniszellen sowie der CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD24⁻ Plasmablasten an den Tagen (früher Beginn /später Beginn)14 (n=14/9), 28 (n=19/16), 60 (n=17/13), 90 (n=19/15), 180 (n=13/15), 360 (n=10/12) nach alloHSZT erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte pro Mikroliter Blut±SEM. Die schwarze Linie zeigt die Zellzahlen der Gruppe mit frühem Beginn der Rekonstitution, die graue die derer mit einem späten Beginn. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶ *P ≤.05, **P≤.001

Der Beginn der Rekonstitution der Plasmablasten erfolgte bei den Patienten des frühen Beginns zwischen Tag 60 und Tag 90 (Abbildung 3.12). Die Zellzahl im peripheren Blut fiel jedoch von Tag 90 zu Tag 180 ab und sank bis zum Tag 360 weiter. Der erste sichtbare Anstieg der Zellzahlen bei der späten Rekonstitutionsgruppe erfolgte zwischen Tag 90 und Tag 180. Sie stiegen bis zum Tag 360 noch weiter an, wobei sie die fallenden Zellzahlen der frühen Gruppe im Zeitraum zwischen Tag 180 und Tag 360 überholten. Folglich war nun mehr an Tag 360 wieder ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit frühem und spätem Beginn zu beobachten, wobei die Zahl derer mit spätem Beginn auf das Niveau der Zahlen derer mit frühem Beginn von Tag 90 stiegen. Hier konnte erkannt werden, dass die Zweigipfligkeit der Gesamtzellzahl der Plasmablasten in Abbildung 3.8 auf den unterschiedlichen Beginn in den zwei Gruppen zurückzuführen war. Die niedrige durchschnittliche Zellzahl der Gesunden von ca. 1,5 Zellen pro Mikroliter überstiegen beide Gruppen: Die frühe Gruppe zwischen Tag 60 und Tag 90 und die späte zwischen Tag 90 und Tag 180.

3.5.1 ASSOZIATIONEN ZWISCHEN KLINISCHEN DATEN UND IMMUNREKONSTITUTION

Um den Grund für die unterschiedliche Kinetik der B-Zellrekonstitution in den zwei Gruppen des frühen und des späten Beginns zu analysieren, wurden sie unter Verwendung des zweiseitigen Fisher-Exakt-Tests auf die statistische Verteilung verschiedener klinischer Parameter untersucht: Von den insgesamt 36 Patienten, die in die zwei Gruppen mit frühem und spätem Rekonstitutionsbeginn aufgeteilt wurden, waren 16 unter 50 Jahre alt und 20 über 50. Für die Altersverteilung in den Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 3.13, A). Auch bei der Herkunft des Transplantats zeigte sich eine konsistente Verteilung für beide Gruppen. Bei denen des frühen Rekonstitutionsbeginns hatten sieben einen verwandten Spender und zwölf einen Fremdspender, während es bei den Patienten mit spätem Beginn fünf verwandte und ebenfalls zwölf Fremdspender gab. Von diesen Transplantaten wiesen bei denen des frühen Rekonstitutionsbeginns drei einen 9/10 MHC-Mismatch auf, bei denen mit spätem Beginn waren es fünf (Abbildung 3.13, B und C). Die Geschlechterverteilung war in der Gruppe des späten Beginns bei zehn weiblichen zu sieben männlichen Patienten und in der Gruppe des frühen Beginns bei sieben weiblichen zu zwölf männlichen Patienten. Auch hier ergab sich für die Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung (Abbildung 3.13, D).



Abbildung 3.13 Alter, Transplantat, MHC Mismatch und Geschlecht in Patienten mit frühem und spätem Rekonstitutionsbeginn.

Gezeigt ist die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe. A) dunkelgrau: Patientenalter \geq 50 Jahre, hellgrau: Patientenalter \leq 50 Jahre B) dunkelgrau: Fremdspender, hellgrau: verwandter Spender C) dunkelgrau: MHC-Mismatch mit 10/10, hellgrau: MHC-Mismatch mit 9/10 D) dunkelgrau: RIC, hellgrau: Konditionierung mit voller Intensität. Statistische Assoziation wurde mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test berechnet. ns = nicht signifikant. Früher Beginn n=17, später Beginn n=19. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Da in RIC-Regimes häufig eine niedrig-dosierte Bestrahlung eingesetzt wird, haben wir diese noch einmal gesondert für beide Gruppen betrachtet; hier bekamen in der frühen Rekonstitutionsgruppe 4 von 19 Patienten eine Bestrahlung, in der späten hingegen 9 von 17. Diese Verteilung war nicht signifikant bei einem p-Wert von 0.082 (Abbildung 3.14, A).

Konditionierungsregime in Bei Verteilung der den Gruppen war iedoch ein Ungleichgewicht verzeichnen. Bis der frühen zu auf einen Patienten Rekonstitutionsgruppe hatten alle eine reduzierte Konditionierung erhalten. Bei den Patienten des späten B-Zell-Rekonstitutionsbeginns hatte über die Hälfte eine Konditionierung mit voller Intensität bekommen und sieben Patienten eine RIC. Diese Assoziation zwischen spätem Rekonstitutionsbeginn und einer Konditionierung mit voller Intensität war mit einem p-Wert von 0,016 signifikant (Abbildung 3.14, B).



Abbildung 3.14 Bestrahlung, Konditionierung, Behandlung mit Antithymozytenglobulin und GvHD-Prophylaxe in den Rekonstitutionsgruppen

Gezeigt ist die Anzahl der Patienten in den beiden Gruppen mit frühem und spätem B-Zellrekonstitutionsbeginn. A) dunkelgrau: Patienten die keine Ganzkörperbestrahlung (*total body irridiation*, TBI) hatten, hellgrau: Patienten mit TBI B) dunkelgrau: Patienten mit reduziertem Konditionierungsregime (RIC), hellgrau: Konditionierung mit voller Intensität C) dunkelgrau: Patienten ohne ATG, hellgrau: Patienten, die ATG erhielten D) dunkelgrau: Patienten, die Methotrexat (MTX) in Kombination mit Cyclosporin erhielten, hellgrau: Patienten, die Mycophenolat. Mofetil (MMF) mit Cyclosporin erhielten. Statistische Assoziation wurde mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test berechnet. Ein *P≤.05 wird als signifikant betrachtet, ein **P≤.001 als hochsignifikant. Früher Beginn n=17, später Beginn n=19. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Zur Prophylaxe einer GvHD bekam ein Großteil der Kohorte Antithymozytenglobulin. Die Gabe wird bereits vier Tage vor der Stammzellübertragung begonnen, um einen höchstmöglichen Blutspiegel bei der Transplantation zu gewährleisten. Das ATG wirkt dabei sowohl auf die T-Zellen des Empfängers, als auch auf die des Spenders und wird

vor allem Patienten mit besonders hohem GvHD-Risiko verabreicht. In der Verteilung derer, die ATG erhalten hatten, ließ sich in den beiden Gruppen der frühen und späten Rekonstitution kein signifikanter Unterschied feststellen (Abbildung 3.14, C).

Alle Patienten erhielten zur GvHD Prophylaxe den Calcineurinhemmer Cyclosporin in Kombination mit Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil. Die Gabe von Mycophenolat-Mofetil wird häufig mit der RIC kombiniert⁸². Hier ergab sich, dass in der Gruppe des frühen Beginns alle Patienten bis auf einen MMF erhalten hatten, wohingegen in der späten Gruppe 6 von 16 Patienten MTX bekamen. Diese Verteilung war mit einem P-Wert von 0,035 statistisch signifikant.

Die Anzahl an Rezidiven war während des ersten halben Jahres annährend gleich hoch. Jeweils vier Patienten in beiden Gruppen zeigten Rezidive. Bis an Tag 360 stieg die Zahl der Rezidive der späten Gruppe auf sechs. In der frühen Gruppe trat kein weiteres Rezidiv auf. Alle Rezidive waren auf eine AML zurückzuführen. Die Einjahres-Mortalität in den beiden Gruppen war mit sieben von 17 verstorbenen Patienten in der frühen Rekonstitutionsgruppe und sieben aus 19 verstorbenen Patienten in der Gruppe mit spätem Beginn ähnlich hoch.

3.5.2 B-ZELL-REKONSTITUTION UND GVHD

Als wir die beiden Rekonstitutionsgruppen auf klinische Parameter während der ersten 100 Tage – der Phase des sogenannten Anwachsens der Immunzellen (engl. *engraftment*) untersuchten, fiel auf, dass die frühe Gruppe seltener eine akute GvHD zeigte als die späte Rekonstitutionsgruppe. In Abbildung 3.15 ist das Auftreten einer GvHD in den Gruppen nach der Gradeinteilung gemäß den Keystone Konsens-Kriterien von 1994 gegenübergestellt. In der frühen Gruppe zeigten 13 von 19 Patienten keine Anzeichen einer GvHD, in der späten Gruppe waren es nur fünf von 17 die symptomlos blieben. Diese Verteilung war statistisch signifikant (P= 0.044).



Abbildung 3.15 Patienten in der Gruppe mit spätem Beginn der B-Zellrekonstitution zeigten häufiger eine akute GvHD

Die prozentualen Anteile der verschiedenen Grade der akuten GvHD (Grade 0- IV) sind für die Gruppen des frühen und des späten B-Zellrekonstitutionsbeginns gezeigt. Die Abstufung der Grade ist dabei farblich markiert von hellblau = keine GvHD, bis dunkelblau = Grad IV. Statistische Assoziation wurde mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test berechnet. Ein *P<.05 wird als signifikant betrachtet, ein **P<.001 als hochsignifikant. Früher Beginn n=17, später Beginn n=19. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Da eine cGvHD sich auch Monate nach den ersten 100 Tagen entwickeln kann wurden nur Patienten bewertet, die mindestens 180 Tage überlebt hatten. Ausgeschlossen wurden Patienten auch, wenn sie innerhalb der ersten 180 Tage ein Rezidiv entwickelten und daraufhin eine erneute Chemotherapie erhielten. Eine chronische GvHD wurde nur dann diagnostiziert, wenn distinkte Symptome der cGvHD gemäß der National Institutes of Health- Kriterien nach Tag 100 nach der Transplantation aufgetreten waren. Die Patienten der frühen Gruppe zeigten mit 8 symptomfreien und fünf Personen, die an einer cGvHD erkrankten zwar tendenziell weniger häufig eine cGvHD als Patienten der späten Gruppe, aber diese Assoziation war statistisch nicht signifikant (P= 0.413). In der Gruppe des späten B-Zellrekonstitutionsbeginns waren es insgesamt vier Patienten, die keine cGvHD zeigten, fünf Patienten, die eine intermediäre GvHD zweiten Grades und zwei Patienten, die eine schwere Ausprägung dritten Grades zeigten (Abbildung 3.16). Interessanterweise zeigten zudem fünf Patienten der späten Gruppe ein sogenanntes *Overlap* – Syndrom von akuter und chronischer GvHD, das heißt sie wiesen zeitgleich Symptome beider GvHD-Formen auf. In der frühen Gruppe wurde dies bei keinem Patienten beobachtet (nicht gezeigt).



Abbildung 3.16 Die Patienten mit spätem B-Zellrekonstitutionsbeginn zeigten häufiger eine chronische GvHD

Gezeigt sind hier die prozentualen Anteile des Auftretens einer chronischen GvHD eingeteilt nach den zwei B-Zellrekonstitutionsgruppen und dem Grad der cGvHD. Die Abstufung der Grade ist dabei farblich markiert von hellblau = keine GvHD, bis dunkelblau = Grad III. Ein *P≤.05 wird als signifikant betrachtet, ein **P≤.001 als hochsignifikant. Früher Beginn n=13, später Beginn n=11.

Wie eingangs beschrieben ist ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten und der chronischen GvHD bekannt³⁵ und auch in unserer Kohorte entwickelten viele Patienten, die eine akute GvHD gezeigt hatten, auch Symptome einer chronischen GvHD (Abbildung 3.17). Dabei wurden auch zwei Patienten miteinbezogen, die vermutlich aufgrund einer Spenderlymphozyteninfusion eine späte akute GvHD entwickelt hatten. Das bedeutet, diese Patienten zeigten eindeutige Symptome einer aGvHD, allerdings erst nach den ersten 100 Tagen nach der Transplantation. Insgesamt waren es zehn Patienten von 15, die alle eine aGvHD gezeigt hatten, die im Anschluss auch eine cGvHD aufwiesen. Von den 9 Patienten, die keine aGvHD hatten entwickelten nur zwei eine cGvHD. Diese Verteilung zeigte eine Tendenz, war aber mit einem P-Wert von 0,09 statistisch nicht signifikant.



Abbildung 3.17 Ein Großteil der Patienten, die eine akute GvHD aufzeigten entwickelten auch eine chronische GvHD

Dargestellt ist der Anteil an Patienten, der eine chronische GvHD entwickelte und vorher die akute Form aufwiesen. Eingeteilt nach dem Auftreten einer akuten GvHD werden die Grade der chronischen GvHD (von keiner cGvHD bis Grad 3 der cGvHD) prozentual dargestellt. Die Abstufung der Grade ist dabei farblich markiert von hellgrau = keine GvHD bis anthrazit = Grad III. Statistische Assoziation wurde mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test berechnet. Ein *P≤.05 wird als signifikant betrachtet, ein **P≤.001 als hochsignifikant. aGvHD n=15, keine aGvHD n=9.

3.5.3 KNOCHENMARK-HISTOLOGIEN

Im Mausmodell war das Knochenmark als ein Zielorgan einer GvHD bereits identifiziert³⁷. Und in der Gruppe der frühen B-Zellrekonstitution trat weit weniger häufig eine klassische akute GvHD auf. Der Gedanke lag nahe, dass die Abstoßungsreaktion ein effektives Anwachsen der Spenderstammzellen im Wirtsknochenmark und damit die schnellere Rekonstitution der B-Zellpopulationen verhinderte.

Um diese These zu überprüfen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité die Knochenmarkstanzen von Patienten der späten und frühen Rekonstitutionsgruppen auf eine Infiltration mit reifen T-Zellen und auf die Anzahl und Morphologie der Osteoblasten untersucht. Die Proben wurden innerhalb des Zeitraums von 19-33 Tagen nach alloHSZT entnommen und analysiert. Um sicher zu gehen, dass es sich bei etwaigen T-Zellinfiltrationen auch tatsächlich um T-Zellen des Spenders handelt, wurde der Spenderzellchimärismus untersucht. Er wies in beiden Gruppen für die Gesamtheit der mononukleären Zellen des Knochenmarks 100 % und für die CD34+ hämatopoetischen Progenitorzellen in beiden Gruppen durchschnittlich 98 % auf. Zusätzlich wurde eine kleine Kohorte von insgesamt 8 Patienten auf eine Übereinstimmung von Chimärismus von mononukleären Zellen des Knochenmarks, CD34⁺ und CD3⁺ T- Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass ein hoher prozentualer Spenderchimärismus der CD34⁺ Zellen mit einem hohen Chimärismus der T-Zellen einherging. Daher ist von einer Infiltration durch Spender T-Zellen auszugehen (Tabelle 11). Die hier gezeigten Abbildungen der Knochenmarkhistologien sind Bestandteil der Publikation mit dem Titel "T cell infiltration of the human bone marrow during acute GVHD is associated with impaired B cell reconstitution and function after allogeneic HSCT^{"76}.

Patient	Knochenmark (%)	CD34+ (%)	CD3⁺ (%)
1	100	100	100
2	92	85	87
3	99	88	100
4	98	92	97
5	98	91	99
6	100	97	99
7	100	98	99
8	20	50	5

Tabelle 1	1 S	penderchimärismus-Analyse
-----------	-----	---------------------------

Knochenmark: Gesamtheit der aus dem Knochenmark extrahierten Zellen, CD34⁺: hämatopoetische Progenitorzellen, CD3⁺: T-Zellen. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Der Grad der T-Zell-Infiltration wurde über die Anzahl der mit Anti-CD3-Antikörper angefärbten Zellen an den gesamten mononukleären Zellen des Knochenmarks bestimmt. Patienten mit frühem Rekonstitutionsbeginn (Abbildung 3.18, links) zeigten dabei wesentlich weniger der braungefärbten T-Zellen als Patienten mit spätem Beginn (Abbildung 3.18, rechts).



Abbildung 3.18 Knochenmarkbiopsien der Patienten mit spätem Rekonstitutionsbeginn wiesen eine höhere T-Zell-Infiltration auf

Zu sehen sind repräsentative histologische Schnitte einer Probe entnommen in den Wochen 3-4 nach alloHSZT von je einem Patienten der jeweiligen Gruppe. Die CD3⁺ T-Zellen sind durch die CD3-Antikörper-Färbung braun markiert (schwarzer Pfeil). Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Etwa 64 % der Patienten mit spätem Beginn zeigten eine Infiltration von gleich oder mehr als 5 % T-Zellen bezogen auf alle mononukleären Zellen. Unter den Patienten des frühen B-Zellrekonstitutionsbeginns waren es hingegen nur 17 % die eine Infiltration von gleich oder mehr als 5 % aufwiesen. Der Rest der Patienten hatte eine Infiltrationsrate von weniger als 5 %. Dazu war bei keinem Patienten der frühen Rekonstitutionsgruppe eine Rate von höher als 5 % gezählt worden (Abbildung 3.19), wohingegen die Patienten mit einem späten Beginn in der Hälfte der Fälle sogar eine Infiltration von 10-15 % T-Zellen aufzeigten. Der Zusammenhang von B-Zell-Rekonstitutionsbeginn und einer Infiltration von \geq 5 % war statistisch signifikant (P=0.01).



Abbildung 3.19 Patienten mit spätem Rekonstitutionsbeginn zeigten eine hochgradige T-Zell-Infiltration des Knochenmarks

Gezeigt sind die Prozentsätze der T-Zellen innerhalb der gesamten mononukleären Zellen. Eine Infiltration von <5 ist rosa, ≥5-9 % hellbraun und 10-15% dunkelbraun dargestellt. Statistische Assoziation wurde mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test berechnet. Ein *P≤.05 wird als signifikant betrachtet, ein **P≤.001 als hochsignifikant. Früher Beginn n=18, später Beginn n=14. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Eine funktionierende Hämatopoese im Knochenmark ist nur gewährleistet, wenn die hämatopoetischen Stammzellen auf eine spezialisierte Mikroumgebung von Zellen treffen, die die sogenannte hämatopoetische Nische darstellen. Die Zellen der hämatopoetischen Nische sind funktionell und physisch eng mit den hämatopoetischen Stammzellen verbunden. Sie synthetisieren Schlüsselfaktoren, welche die Balance zwischen Differenzierung, Proliferation und Apoptose der Stamm- und Progenitorzellen regulieren.

Für die Mikroumgebung von B-Zellprogenitorzellen von besonderer Bedeutung sind die Osteoblasten, welche als Teil des Endosteum die Knochenoberfläche auskleiden und über verschiedene Signalwege die B-Zellproduktion und –reifung bestimmen, wie in murinen Modellen gezeigt werden konnte^{37,53}. Um den Zustand der Knochenmarknische zu evaluieren, wurde daher die Anzahl der Osteoblasten entlang der Knochentrabekel ebenfalls bestimmt (Abbildung 3.20).



Abbildung 3.20 Bestimmung der Osteoblastenanzahl und –morphologie mittels Hämatoxylin- und Eosinfärbung in Knochenmarkbiopsien

Gezeigt sind repräsentative histologische Schnitte einer Probe entnommen in der 3-4 Woche nach Transplantation von je einem Patienten der Gruppe mit frühem und spätem Rekonstitutionsbeginn. Einzelne Osteoblasten entlang der Knochentrabekel sind durch schwarze Pfeile markiert. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Dabei fiel auf, dass in Präparaten mit einer hohen T-Zell-Infiltration von gleich oder mehr als 5% in 83% der Fälle nur wenige Osteoblasten zu finden waren, die zudem eine verschmälerte Morphologie aufwiesen, was im Allgemeinen auf eine Inaktivierung deutet.

Bei einer Infiltration mit weniger als 5% T-Zellen waren nur bei 35% der Patienten wenige Osteoblasten zu sehen. Auch hier ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration mit 5% und mehr T-Zellen und der geringen Anzahl an Osteoblasten (P=0,01, zweiseitiger exakter Fisher-Test). In der Abbildung 3.21 ist die durchschnittliche Osteoblastenanzahl für jede Stufe der T-Zellinfiltration dargestellt.



Abbildung 3.21 Patienten mit einem hohen Prozentsatz an T-Zellen im Knochenmark hatten weniger Osteoblasten

Gezeigt sind die Prozentsätze an Patienten, die eine geringe Osteoblastenzahl (hellgrau) und eine mittlere bis hohe (dunkelgrau) innerhalb der Gruppen mit <5 % und ≥5 % T-Zell-Infiltration aufwiesen. Statistische Assoziation von einer T-Zellinfiltration ≥5 % und einer geringen Anzahl an Osteoblasten wurde mit dem zweiseitigen exakten Fisher-Test berechnet. Ein *P≤.05 wird als signifikant betrachtet, ein **P≤.001 als hochsignifikant. <5 % n=20, ≥5 % -9 % n=19, 10-15 % n=7. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

Auch in Ko-Färbungen (Abb. 4.22) von Schnitten entlang der Knochentrabekel konnte in der Gruppe von Patienten mit früh einsetzender Rekonstitution eine deutlich höhere Zahl an Osteoblasten und ein geringer Anteil an T-Zellen gezeigt werden.



Abbildung 3.22 Osteoblasten und T- Zellen in Knochenmarkhistologien

In diesen Ko-Färbungen sind die Osteoblasten entlang der Knochentrabekel durch Pfeile gekennzeichnet. Die immunhistochemische Färbung für CD3⁺ Zellen lässt die T-Zellen braun hervortreten. Im Beispiel für die Gruppe mit früher Rekonstitution ist deutlich erkennbar, dass die Zahl der Osteoblasten höher ist. Im Beispiel für die Gruppe mit später Rekonstitution überwiegen die T-Zellen. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

3.5.4 INFEKTIONEN

Durch die Konditionierung verlieren alloHSZT-Patienten ihr eigenes Immunsystem. Bis das neue Immunsystem aus Spenderstammzellen sich vollständig rekonstituiert hat, kann es mehrere Jahre benötigen. Hinzu kommt die jatrogene Immunsuppression zur GvHD-Prophylaxe. Diese beiden Faktoren machen die Empfänger einer Stammzellspende besonders anfällig für Infektionen und Reaktivierungen, die häufig einen komplizierten Verlauf nehmen und in vielen Fällen lebensbedrohlich sind. Um zu evaluieren, ob zu verschiedenen Zeitpunkten in der Rekonstitution verschiedene Arten von Infektionen eine Rolle spielen wurden diese in zwei Phasen untersucht: Die erste Phase erstreckt sich vom Tag der Transplantation bis zum Tag 180. Die zweite Phase beinhaltet alle Infektionen von Tag 180 bis Tag 360 (Tabelle 12).

	Früher Beginn, n= 19 (%)	Später Beginn, n=17 (%)	Rituximab, n=5 (%)
Pneumonie	2 (11)	5 (29)	2 (40)
davon atypisch	1 (5)	5 (29)	keine Angabe
Sepsis	11 (58)	8 (47)	3 (60)
reines SIRS	2 (11)	2 (12)	1 (20)
VZV- Reaktivierung	1 (5)	1(6)	1 (20)
Herpes simplex- Virus- Reaktivierung	3 (16)	1 (6)	1 (20)
BK-Virus-Zystitis	1 (5)	3 (18)	2 (40)
Cytomegalievirus- Reaktivierung	6 (32)	4 (24)	3 (60)
Gesamt	27	29	13

Gezeigt ist die Anzahl der Patienten, die im Laufe der ersten 180 Tage nach der Transplantation eine der genannten Infektionen entwickelten, unterteilt nach dem Beginn der Rekonstitution und gesondert die Patientengruppe, die nach der Transplantation Rituximab erhielt. Früher/später Beginn: Patienten mit frühem bzw. spätem Beginn der B-Zell-Rekonstitution, SIRS: Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom, BK-Virus: Humanes Polyomavirus 1. Darstellung nach Mensen et al., 2014⁷⁶

In der ersten Phase war zu sehen, dass in der Gruppe mit spätem B-Zellrekonstitutionsbeginn insgesamt etwas mehr Infektionen aufgetreten waren; hier waren es 29 Infektionen in 17 Patienten, bei der Gruppe des frühen Beginns waren es 27 Infektionen und Reaktivierungen auf 19 Patienten. Diejenigen Patienten, die aufgrund einer EBV-Reaktivierung Rituximab, den CD20-Antikörper, erhalten hatten betrachteten

wir gesondert: Hier hatten die fünf Patienten insgesamt 13 Infektionen zu verzeichnen. Die beiden B-Zell-Rekonstitutionsgruppen zeigten vor allem bei der Anzahl der Pneumonien eine Abweichung: Fünf Patienten, etwa 29 % derer mit spätem Beginn entwickelten eine Pneumonie. Diese waren allesamt sogenannte atypische Pneumonien, das bedeutet, sie wurden durch Infektionen mit Viren, Pilzen, oder bestimmten Bakterien ausgelöst, welche häufig eine interstitielle Lungenentzündung bewirken. In der Gruppe des frühen Rekonstitutionsbeginns trat nur eine dieser atypischen Pneumonien auf, dies entspricht 5 %. Diese Verteilung war statistisch jedoch nicht signifikant (p=0.08).

Auch alle anderen Infektionen zeigten keine statistisch signifikante Verteilung. So wiesen die Patienten der frühen Gruppe zwar weniger häufig eine BK-Virus-Zystitis auf, hier war nur ein Patient der Gruppe mit frühem Beginn erkrankt, in der Gruppe mit spätem Beginn waren es hingegen drei Patienten. Allerdings zeigte sich in der frühen Gruppe ein geringfügig häufigeres Auftreten von Sepsis Erkrankungen, als auch Herpes simplex-Virus (HSV)- und Cytomegalievirus (CMV)-Reaktivierungen. Ein sogenanntes Systemisches inflammatorisches Response Syndrom (SIRS), konnte in beiden Gruppen zwei Mal festgestellt werden. Hier ist im Gegensatz zur Sepsis kein Erreger nachweisbar, es kann bei Transplantationspatienten auch durch eine GvHD, durch Zytostatika oder Immunglobulinadministration hervorgerufen werden.

Die mit Rituximab behandelten Patienten zeigten deutlich mehr Infektionen, insgesamt waren es 13 auf nur fünf Patienten. Am häufigsten trat eine Sepsis sowie eine Reaktivierung des Cytomegalievirus auf. Bei den späteren Infektionen von Tag 180 bis Tag 360 zeigte die Gruppe mit früher B-Zellrekonstitution insgesamt etwas mehr Infektionen als die Patienten der späten Gruppe (Tabelle 13). Den auffälligsten Unterschied jedoch gab es bei den VZV-Reaktivierungen, von denen die späte Gruppe drei aufwies, die frühe jedoch keine. Dafür zeigte die frühe Gruppe geringfügig mehr Pneumonien, Sepsen, HSV- und CMV-Reaktivierungen.

Alle fünf Patienten, die mit Rituximab behandelt worden waren, verstarben innerhalb des zweiten Halbjahres, und sind daher nicht mehr aufgeführt.

	Früher Beginn, n= 13	Später Beginn, n=11
Pneumonie	4 (31)	2 (18)
davon atypisch	2 (15)	1 (9)
Sepsis	4 (31)	2 (18)
reines SIRS	0 (0)	0 (0)
VZV- Reaktivierung	0 (0)	3 (27)
Herpes simplex- Virus- Reaktivierung	2 (15)	1 (9)
BK-Virus-Zystitis	0 (0)	1 (9)
Cytomegalievirus- Reaktivierung	3 (23)	2 (18)
Gesamt	15	12

Tabelle 13 Infektionen 6 Monate bis ein Jahr nach der Transplantation

Gezeigt ist die Anzahl der Patienten, die bis zum Tag 360 nach der Transplantation eine der genannten Infektionen entwickelten, unterteilt nach dem Beginn der Rekonstitution und gesondert die Patientengruppe, die nach der Transplantation Rituximab erhielt. Früher/später Beginn: Patienten mit frühem bzw. spätem Beginn der B-Zell-Rekonstitution, SIRS: Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom, BK-Virus: Humanes Polyomavirus 1.

4.1 **REKONSTITUTION DER T-ZELLEN**

Bereits vor der Vorbereitung auf die Stammzelltransplantation wurde mit der Erfassung der absoluten Lymphozytenzahlen der Patienten begonnen und es war zu sehen, dass alle Patienten schon durch die Chemotherapie defiziente Lymphozytenzahlen im Vergleich mit den gesunden Kontrollen aufwiesen. Wie aufgrund der Ergebnisse anderer Studien zu erwarten war, blieb diese Defizienz der Lymphopoese während der ersten Monate für sowohl T- als auch B-Zellen bestehen^{83–85}. Im Folgenden konnten innerhalb der Kohorte unterschiedliche Verläufe der Rekonstitutionskinetik beobachtet werden, die zum Teil auch deutlich mit klinischen Parametern korrelierten.

Da sich die beiden Lymphozytenpopulationen der B- und T-Zellen auf verschiedene Weise beeinflussen, ist es wichtig sie nicht isoliert zu betrachten. An erster Stelle ist dabei die Aktivierung von B-Zellen durch die CD4⁺ T-Helferzellen zu nennen, die B-Zellen in den Keimzentren zur Proliferation und Isotypenwechsel ihrer Antikörper stimulieren und so ein unverzichtbares Element zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses bilden. Über die T-Zellrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation konnten verschiedene Studien bereits Aufschluss geben^{46,86,87}. Wie in unseren Messungen zeigte sich auch dort, dass die konstant ansteigende Zahl der CD3⁺ T-Zellen bis an Tag 360 nach der Transplantation vor allem auf eine Expansion der CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 3.5). In der Literatur wird dieses Phänomen auf eine periphere Expansion von reifen Spender-T-Zellen zurückgeführt, da die CD8⁺ Population nicht ausschließlich thymusabhängig generiert wird, sondern auch thymusunabhängig expandiert⁸⁸. Es wird angenommen, dass es sich dabei um eine Reaktion auf virale Antigene handelt, daher wird sie auch "antigengetriggerte Expansion" genannt⁸⁹.

Die Anzahl der CD4⁺T-Zellen blieb in unseren Messungen signifikant hinter den Zellzahlen der gesunden Kontrollen zurück. Auch dieses Ergebnis ist deckungsgleich mit den Beschreibungen anderer Studien⁸⁸. In diesen Studien konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Zahlen der CD4⁺ T-Zellen bis mindestens ein Jahr nach der Transplantation vermindert bleiben^{90,91}. Noch länger dauert die Rekonstitution der CD4⁺ T-Zellen bei älteren Patienten und wenn eine Behandlung mit Antithymozytenglobulin stattgefunden hat^{92–94}. Die CD4⁺ T-Zellrekonstitution ist streng thymusabhängig und CD4⁺ T-Zellen sind essentiell um eine B-Zellreifung zu Gedächtniszellen zu erwirken⁹⁴.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T-Zellrekonstitution auch ein Jahr nach der Transplantation nicht abgeschlossen ist und vermutlich aufgrund der fehlenden Thymusfunktion ein erhebliches Ungleichgewicht zwischen den beiden großen Subpopulationen besteht⁹⁴.

4.2 **REKONSTITUTION DER B-ZELLEN**

Über die Rekonstitution der einzelnen B-Zellsubpopulationen nach alloHSZT war bislang wenig bekannt. Die ersten im peripheren Blut sichtbaren B-Zellen nach der Transplantation stammen vom Spender⁹⁵. Diese wenigen Zellen sind in der Lage über Antikörper einen transienten Schutz zu gewährleisten⁴². Danach ist es jedoch wichtig, dass die Patienten in der Lage sind, über die *de novo* Produktion von B-Zellen eine eigene Abwehr aufzubauen.

Wie in der Literatur beschrieben⁸⁴, konnten auch wir einen ersten Anstieg der B-Zellzahlen zwischen den Messungen an Tag 28 und 60 feststellen (Abbildung 3.6). Bei Betrachtung der Subpopulationen wurde klar, dass dieser Anstieg erwartungsgemäß auf die transitionalen Zellen zurückzuführen war. Die Zahlen der naiven B-Zellen, die sich aus den transitionalen Zellen generieren, stiegen zwischen dem zweiten und dritten Monat als nächstes an. Diese Zellen, welche reif, aber antigenunerfahren sind, bilden den Pool für alle weiteren von uns untersuchten Stufen der B-Zellentwicklung. Da die Patienten zu diesem Zeitpunkt keine weiteren B-Zellen besitzen, ist es möglich, dass die Zellzahlen der naiven B-Zellen reaktiv auf den generellen B-Zellmangel anstiegen. Am Messzeitpunkt 360 Tage nach der Transplantation waren sie sogar signifikant höher als die Zahlen der Gesunden. Dies wurde während einer chronischen GvHD bereits beschrieben^{96,97}. Eine Erhöhung von B-Zellüberlebenssignalen, wie zum Beispiel *B cell activating factor (BAFF*), während einer akuten GvHD ist ebenfalls bekannt und könnte der Grund für diese erhöhten Zellzahlen sein^{98–101}.

Sowohl die Zahlen der klassengewechselten Gedächtniszellen, als auch die Zahlen der IgM-produzierenden MZ-ähnlichen B-Zellen blieben auch ein Jahr nach der Transplantation signifikant erniedrigt (Abbildung 3.7). Für die Gedächtniszellen ist bekannt, dass sie eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen. Bei den MZ-ähnlichen Zellen, die bis zu ein Viertel der rezirkulierenden B-Zellpopulation ausmachen⁶⁷, wird dies diskutiert^{65,66}. Eine mögliche Erklärung für die geringen Zahlen beider Populationen wäre, dass die Keimzentrumsreaktion therapiebedingt gestört ist, wozu auch die geringen Zahlen der CD4⁺ Helfer-T-Zellen beitragen dürften^{45,68,102}. Auch andere Arbeiten zeigten,

dass klassengewechselte Gedächtniszellen; deren Reaktivierungseffekt man sich bei Impfungen zu Nutze macht, bei einigen Patienten jahrelang defizient bleiben^{45,68}.

Die Rekonstitution der Population der doppelt negativen B-Zellen nach alloHSZT wurde für diese Arbeit das erste Mal nach allo-HSZT analysiert (Abbildung 3.8). In der Literatur war zuvor nichts über ihre Rekonstitutionskinetik bekannt. Da sie zu den CD27+ Gedächtnis-B-Zellen ähnliche Hypermutationsraten aufweisen^{69,70} wurde vermutet, dass sie eine erste Welle von Gedächtniszellen darstellen könnten¹⁰³, oder aber eine erschöpfte Gedächtniszellpopulation¹⁰⁴. Unseren Beobachtungen zufolge stieg ihre Zahl nach der Transplantation stetig an und erreichte ein Jahr danach einen supranormalen Level. Die Zahl der CD27⁺ Gedächtniszellen blieb auch ein Jahr nach der Transplantation hochsignifikant hinter den Zellzahlen der Gesunden zurück, wobei ihre Zahl vor allem ab Tag 60 stets geringer war als die der doppelt negativen B-Zellen. Dies unterstützt die These der doppelt-negativen B-Zellen als einer frühe Gedächtniszellpopulation¹⁰³ die entsteht, wenn die Keimzentrumsreaktion gestört ist⁷⁰. Auch die Plasmablasten, deren Entwicklung über eine Keimzentrumsreaktion fakultativ ist, zeigten bereits an Tag 60 wieder ein normales Niveau. Daher ist anzunehmen, dass die doppelt negativen B-Zellen zumindest fakultativ eine eigenständige Diversifizierung und extrafollikulären Isotypenwechsel durchlaufen.

4.3 VERZÖGERTER BEGINN DER B-ZELLREKONSTITUTION

Aufgrund der großen Standardabweichung zum Messzeitpunkt an Tag 90 wurden von uns zwei Gruppen des Beginns der Rekonstitution der B-Zellen eingeteilt (Abbildung 3.9). Bei der Betrachtung der Subpopulationen innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation zeigte sich, dass die Patienten mit spätem Rekonstitutionsbeginn eine sehr ähnliche Kinetik der *de novo* Produktion der B-Zellen durchliefen, diese begann lediglich um etwa zwei Monate versetzt. Alle Subpopulationen der zwei Gruppen, bis auf die Zahlen der Plasmablasten, glichen sich bis zum Messzeitpunkt an Tag 360 nach der Transplantation zahlenmäßig einander an. Bei den Plasmablasten zeigte die frühe Rekonstitutionsgruppe eine supranormale Spitze bei Tag 90, dann fiel ihre Zahl ab. Nach Tag 90 fielen die Zellzahlen auf den gleichen Wert der GK. Der Grund dafür könnte eine Sättigung der B-Zellnischen im Knochenmark sein. Aber auch eine Migration in das Knochenmark zur Differenzierung zu Plasmablasten ist denkbar. Bei der späten Gruppe hingegen zeigte sich der Gipfel der Plasmablastenzahlen an Tag 360 (Abbildung 3.12).

Die insgesamt nahezu identisch verlaufende Rekonstitutionskinetik unterschied sich vor allem in der Zahl der transitionalen B-Zellen (Abbildung 3.10). Hier zeigte die frühe Gruppe einen ersten Anstieg der Zahlen an Tag 28. Die Zellzahlen stiegen bis zu einem Gipfel an Tag 90 stark an und fielen dann innerhalb der drei Monate bis zum Tag 180 ab. Die späte Gruppe zeigte den ersten Anstieg etwa an Tag 90. Am Tag 180 jedoch wiesen sie in etwa die gleichen Zahlen wie die frühe Gruppe auf. Geht man von einer ähnlich verlaufenden Kinetik aus, so müsste man zu diesem Zeitpunkt mit noch weitaus höheren Zellzahlen rechnen, sodass anzunehmen ist, dass dieser Gipfel lediglich in der Gruppe des frühen Beginns auftrat.

Die zwei Gruppen mit frühem und spätem Beginn der Rekonstitution wurden auf klinische Parameter untersucht (Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14), die mit einer B-Zelldefizienz nach alloHSZT assoziiert sind, insbesondere Unterschiede in der Zusammensetzung, wie Alter, Geschlecht und Matchinggrad des Transplantats^{35,105}. Da sich hier keine signifikanten Unterschiede zeigten, ist anzunehmen, dass der Grund für die zeitliche Abweichung der Rekonstitution ein anderer war.

4.4 HINWEISE AUF EINE AKUTE GVHD DES KNOCHENMARKS

In der von uns untersuchten Kohorte entwickelten 35 % der Patienten eine akute GvHD und 23 % eine chronische, dies stimmt in etwa mit den in der Literatur angegebenen Werten überein: In einer großen Studie mit 6848 Stammzellrezipienten konnten Nakasone *et al.* eine akute GvHD in 39 % der Patienten, die eine Konditionierung mit voller Intensität erhalten hatten und 35 % bei RIC Patienten nachweisen können¹⁰⁶. Zwei Drittel unserer Patienten, die eine akute GvHD auf (Abbildung 3.17), auch in der Literatur ist dieser Zusammenhang wohlbekannt: So hatten Flowers *et al.* in einer Studie mit 2941 Patienten in 31,3 % der Patienten ein Auftreten beider Formen der GvHD beobachten können³⁵. Dass in unserer Kohorte die Zahlen höher waren könnte damit zusammenhängen, dass bei Flowers *et al.* auch pädiatrische Patienten eingeschlossen waren. In der gleichen Studie konnten Sie ein höheres Alter als unabhängigen Risikofaktor für die chronische GvHD identifizieren³⁵.

Die GvHD kann verschiedene Organsysteme betreffen, darunter neben den klassischen wie Haut und Gastrointestinaltrakt auch die Lunge und das zentrale Nervensystem^{107,108}.

Auch eine Schädigung lymphohämatopoetischer Reservoire wie des Thymus ist bekannt³⁸. Da Patienten weniger B-Zellen aufweisen, wenn sie eine GvHD ausbilden^{109–111} war anzunehmen, dass eine GvHD eine direkte Wirkung auf das Knochenmark hat. Auch bei unserer Betrachtung der zwei Gruppen mit früher und später B-Zellrekonstitution fiel auf, dass der späte Beginn signifikant häufiger auftrat bei Patienten, die auch eine akute GvHD entwickelten (Abbildung 3.15).

Wir konnten nachweisen, dass bei denjenigen Patienten, die eine spätere B-Zellrekonstitution aufwiesen, die Zahl der Spender-T-Zellen im Knochenmark signifikant höher war, gegenüber der Gruppe mit einem frühen Beginn. Eine sehr hohe Infiltration mit T-Zellen von 10-15% wiesen tatsächlich nur Patienten auf, die auch einen späten Rekonstitutionsbeginn zeigten (Abbildung 3.19). Gleichzeitig waren die Zahlen der Osteoblasten in Patienten mit hoher T-Zell-Infiltration erniedrigt (Abbildung 3.21). Es existiert bislang eine weitere Studie von Shono *et al.*, die ebenfalls einen Zusammenhang von GvHD und verminderter Osteoblastenzahl im Menschen nachgewiesen hat¹¹². Hier wurde mit Hilfe von Knochenmarkaspiraten und histologischen Schnitten eine Korrelation mit dem Auftreten einer extensiven chronischen GvHD mit einer Verminderung bis zu einem vollständigen Verlust der Osteoblasten aufgezeigt.

In der durch Shono *et al.* durchgeführten Studie wurde eine idiopathische Zytopenie über die durchflusszytometrische Evaluation von Knochenmarkaspiraten definiert. Leider wurden in dieser Studie diejenigen Patienten, die ohne medikamentöse Unterstützung eine ausreichende Hämatopoese entwickelten ausgeschlossen und nicht wie von uns in verschiedene Gruppen eingeteilt. Zudem wurden die Knochenmarksschnitte nicht auf eine Infiltration mit T-Zellen untersucht. Aufgrund dessen ist ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich. Ein direkter Zusammenhang zwischen akuter GvHD und der Osteoblastenzahl wurde von ihnen nicht festgestellt. Dies entspricht auch unseren Beobachtungen. Obwohl eine T-Zellinfiltration im Knochenmark häufiger auftrat, wenn auch eine systemische akute GvHD höheren Grades (III, IV) festzustellen war, gab es keine signifikante Korrelation zwischen dem generellen Auftreten einer akuten GvHD und der Anzahl der Osteoblasten. Der von uns festgestellte Zusammenhang von Infiltration mit Spender-T-Zellen und der Verminderung der Osteoblastenzahlen weist daher darauf hin, dass das Knochenmark am ehesten eine eigene Zielstruktur der GvHD ist, und die T-Zell-Infiltration nicht nur als Nebeneffekt einer akuten GvHD auftrat.

Schlussfolgernd scheint die verringerte Zahl der Osteoblasten direkt durch alloreaktive T-Zellen bedingt zu sein. Osteoblasten exprimieren MHC I. Außerdem wurde in einigen Studien gezeigt, dass sie während bakterieller Entzündungen und unter Einfluss von Entzündungsfaktoren wie TNF- α die Expression von MHC II erhöhen, was sie leicht zu einem Ziel der GvHD macht^{113,114}. Wir konnten zeigen, dass es sich bei den im Knochenmark befindlichen T-Zellen um T-Zellen des Spenders handelte. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die B-Zellnische ein Ziel von alloreaktiven T-Zellen darstellen kann³⁷. Die Osteoblasten bilden einen wichtigen Teil der B-Zellnische, sind aber nicht die einzige Zellart, die notwendig ist für eine Reifung der B-Zell-Vorläufer^{115,116}. Dies spiegelt sich auch darin wieder, dass einige Patienten einen verspäteten Beginn der Rekonstitution zeigten, obwohl ihre Osteoblastenzahl nicht erniedrigt war. Welche Strukturen im Knochenmark das genaue Ziel von alloreaktiven Zellen sind und ob Osteoblasten dabei nur einen Kollateralschaden darstellen, ist ebenfalls Gegenstand der derzeitigen Forschung. So haben beispielsweise Medinger et al. feststellen können, dass die Zellen der perivaskulären Knochenmarknische, die das intermediäre Filament Nestin enthalten, während einer akuten GvHD ebenfalls verringert sind¹¹⁷.

Letztendlich scheint die während der ersten Monate aufgetretene B-Zelldefizienz der Gruppe des späten Rekonstitutionsbeginns transient zu sein. Die Rekonstitutionskinetik der Patienten mit dem späten Beginn beginnt lediglich zeitverzögert und gleicht sich zwölf Monate nach der Transplantation an die Zellzahlen der frühen Gruppe an.

Åhnliches ist auch von Glauzy *et al.* beobachtet worden. In ihrer Arbeit wurde über die Messung von KREC (engl.: *kappa-deleting-element rearrangement excision circles*) der Knochenmark-Output von Patienten mit und ohne GvHD evaluiert¹¹⁸: KREC entstehen beim fehlerhaften Rearrangement einer der Leichtketten (*κ*) des B-Zellrezeptors noch bevor der B-Zellrezeptor exprimiert wird. Sie sind von der Replikation ausgeschlossen und werden daher mit jeder Zellteilung zweifach verdünnt¹¹⁹. Sie haben eine spezifische Sequenz, den *signal joint*; der mithilfe von Primern in der Real-time PCR quantifiziert werden kann⁸⁵. Ungefähr 50% der neuproduzierten B-Zellen des Knochenmark enthalten KREC^{85,120}. Sie können folglich Aufschluss darüber geben, wie hoch die B-Zellproduktion ist. Sie sahen in Patienten mit akuter GvHD zunächst signifikant öfter eine B-Zelldefizienz, die sich zurückbildete, sofern sich nicht auch eine chronische GvHD entwickelte. Die Patienten mit chronischer GvHD entwickelten zudem eine B-Zelldefizienz unabhängig von ihrem aGvHD-Status, was sich auch mit den Ergebnissen von Shono *et al.* deckt¹¹².

Die Ergebnisse dieser Studien lassen darauf schließen, dass es zwei unterschiedliche Mechanismen der Defizienzentwicklung gibt, einen frühen, der hier beschrieben ist und einen zweiten, während der chronischen GvHD auftretenden, welcher zu einer langanhaltenden Defizienz führt.

Interessanterweise haben viele unserer Patienten der späten Rekonstitutionsgruppe auch eine chronische GvHD entwickelt (Abbildung 3.16). Noch mehr waren es bei denjenigen Patienten, bei denen eine generelle akute GvHD festgestellt worden war (Abbildung 3.17). Auffällig war auch, dass all diejenigen Patienten, die ein *Overlap*-Syndrom von Symptomen der akuten sowie der chronischen GvHD zeigten, in der späten Rekonstitutionsgruppe waren. Auch wenn die Verteilung in unserer kleinen Kohorte nicht statistisch signifikant war, so ist diese Korrelation von akuter und chronischer GvHD in der Literatur schon vielfach nachgewiesen^{35,121,122}.

Über welchen Zusammenhang ein später Rekonstitutionsbeginn, beziehungsweise eine akute GvHD auch die Entstehung einer chronischen GvHD zur Folge haben könnte, ist schon seit längerem Gegenstand der Forschung¹²³. So ist bekannt, dass auch eine Korrelation zwischen signifikant erhöhten Zahlen der B-Zellen oder ihrer Vorläufer und dem Ausbleiben einer chronischen GvHD besteht^{96,97}. Für diesen protektiven Mechanismus werden momentan insbesondere zwei Theorien beforscht: Zum einen die Überlegung, dass je mehr B-Zellen um den Überlebensfaktor BAFF konkurrieren eine stärkere Selektion weniger autoreaktive bzw. alloreaktive B-Zellen hervorbringt^{101,124}.Und zum anderen, dass unter den transitionalen B-Zellen ein Prozentsatz sogenannter B-Zellen besteht, die über verschiedene Mechanismen eine regulatorischer immunologische Toleranz vermitteln, wie beispielsweise über die Sekretion des Interleukin 10¹²⁵.

Auf der Suche nach den Ursachen, weshalb die Patienten der späten Gruppe signifikant häufiger eine T-Zell-Infiltration des Knochenmarks aufzeigten, wurden beide Gruppen auf die vorangegangene Konditionierung untersucht (Abbildung 3.14). Es fiel auf, dass viele der Patienten, die einen frühen Rekonstitutionsbeginn gezeigt hatten, eine Konditionierung mit reduzierter Intensität erhalten hatten. Auch in anderen Studien war bereits gezeigt worden, dass Patienten, die mit vollen Konditionierungsregimen behandelt worden waren, häufiger eine GvHD aufwiesen als diejenigen, die ein reduziertes Regime erhalten hatten^{13,14}. Als Grund dafür wird angenommen, dass die

reduzierten Regime eine geringere Schädigung der Zielstrukturen der GvHD bewirken und somit weniger häufig eine Alloimmunreaktion zur Folge haben¹³. Zusätzlich erhielten die mit einer RIC behandelten Patienten signifikant häufiger eine GvHD-Prophylaxe mit Mycophenolat-Mofetil. Diesem Wirkstoff wurde in verschiedenen Studien gegenüber MTX eine stärkere prophylaktische Wirkung zugeschrieben. Dies wurde jedoch in einer Metaanalyse der Cochrane Datenbank widerlegt⁸². Die Auswirkung einer Knochenmarkassoziierten GvHD auf die Mortalität muss in größeren Kohorten überprüft werden. Denkbar sind verschiedene Ergebnisse: Eine Senkung der Mortalität beispielsweise über einen Graft-versus-Leukämie-Effekt, bei dem alloreaktive T-Zellen leukämische Zellen eliminieren, und damit vielleicht weniger Rezidive auftreten¹¹. Oder aber eine Erhöhung, zum Beispiel durch vermehrte lebensbedrohliche Infektionen aufgrund der Immundefizienz⁷².

4.5 INFEKTIONEN

Nach der Transplantation sind die Patienten stark gefährdet, lebensbedrohliche Infektionen zu entwickeln^{83,126}. Bis zu 20 % der Mortalität nach der Stammzelltransplantation zurückzuführen^{72,127}. sind auf sie Neben der Immunsuppression ist auch der weitgehende Verlust des eigenen immunologischen Gedächtnisses in Form von Plasmazellen und Gedächtniszellen der Grund dafür, weswegen auch eine erneute Grundimmunisierung vorgenommen werden muss¹²⁸.

Unterschiede in der Anzahl der Infektionen zwischen den Gruppen gab es vor allem bei den Pneumonien, der BK-Virus-Zystitis und den VZV-Reaktivierungen (Tabelle 12 und Tabelle 13). Die Pneumonie ist eine der Infektionen mit der höchsten Mortalität nach der alloHSZT¹²⁹. Unterschiede in der Verteilung der Infektionen in den beiden Gruppen mit frühem und spätem Beginn der B-Zellrekonstitution gab es vor allem bei den atypischen Pneumonien. Diese werden nach der alloHSZT vor allem durch Aspergillen und CMV ausgelöst¹²⁹. In der Gruppe mit späten B-Zellrekonstitutionsbeginn gab es fünf dieser Infektionen (29 %). In der Gruppe des frühen Rekonstitutionsbeginns trat nur eine dieser atypischen Pneumonien auf, was ca. 5 % entsprach. Und auch bei anderen B-Zelldefekten, wie beispielsweise der Hypogammaglobulinämie im Rahmen von Organtransplantationen treten diese atypischen Erreger häufiger auf und gehen mit einer erhöhten Mortalität einher¹³⁰. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass diejenigen Patienten, die einen späten Beginn der Rekonstitution zeigten,

auch signifikant weniger IgM und IgG produzierten⁷⁶. Dies könnte den Grund für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber diesen opportunistischen Erregern darstellen.

Daneben zeigte die frühe Gruppe auch weniger häufig eine BK-Virus- Zystitis. Diese Reaktivierung oder Neuinfektion spielt ausschließlich bei immunsupprimierten Patienten eine Rolle, bei Gesunden verläuft eine Infektion normalerweise symptomlos. In der neueren Fachliteratur wird ein Zusammenhang mit der schweren GvHD konsistent berichtet^{131–133}. Während der zweiten Hälfte des ersten Jahres nach Transplantation gab es in der späten Gruppe außerdem drei VZV- Reaktivierungen (27 %), in der frühen Gruppe trat keine auf. Auch bei dieser Reinfektion ist bekannt, dass die schwere GvHD einen unabhängigen Risikofaktor darstellt^{134,135}.

Wie wichtig die B-Zellabwehr bereits im ersten Halbjahr nach der Transplantation ist, zeigt sich auch an denjenigen Patienten, die wegen einer EBV-Reaktivierung mit Rituximab behandelt worden waren. Sie zeigten eine sehr hohe Rate an Infektionen (insgesamt 13 bei fünf Patienten bis Tag 180). Gerade auch die hier genannten opportunistischen Erreger verursachten bei Ihnen häufiger eine Infektion als bei den anderen Patientengruppen (Tabelle 12). Vor allem im Zusammenhang mit einer Chemotherapie zur Konditionierung sind diese Patienten besonders infektionsgefährdet¹³⁶. Ob die B-Zelldefizienz, die durch eine akute GvHD des Knochenmarks ausgelöst wird, ebenfalls zu einer erhöhten Mortalität führt, war anhand der von uns untersuchten Kohorte nicht sicher festzustellen und sollte unbedingt durch größere prospektive Studien überprüft werden.

4.6 AUSBLICK

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten wir das Wissen um die Rekonstitutionskinetik der B-Zellen nach der alloHSZT um ein beträchtliches Maß erweitern. Natürlich eröffnen die von uns erhobenen Analysen auch Fragen für die zukünftige Forschung. So wird interessant sein, inwiefern sich der Pathomechanismus der frühen transienten von der langanhaltenden B-Zelldefizienz unterscheidet. Wir konnten einen Zusammenhang von T-Zellinfiltration und Osteoblastenverminderung darstellen. Um zu beweisen, dass es sich bei den T-Zellen tatsächlich um alloreaktive Zellen handelt, sollten in der Zukunft weitere Analysen z.B. mithilfe von Zytokinassays¹³⁷ erfolgen. Für die nähere Beleuchtung der langanhaltenden B-Zelldefizienz wäre vor allem eine erneute Untersuchung von Knochenmarkstanzen auf eine T-Zellinfiltration zu späteren Messzeitpunkten interessant, die bislang noch nicht erfolgt ist.

Die Messung von alloreaktiven B-Zellen und alloreaktiven Antikörpern in Patienten mit spätem Rekonstitutionsbeginn könnte einen Ansatz zur Überprüfung der Theorie geben, dass eine supranormale Zellzahl von transitionalen B-Zellen eine protektive Wirkung gegenüber Alloreaktivität aufweist^{101,124}. In diesem Zusammenhang wären auch B-Zellaktivierungsmarker interessant. So wurde zum Beispiel eine erniedrigte Schwelle für den B-Zellrezeptor während der chronischen GvHD beschrieben¹³⁸. Daneben könnten Messungen von Interleukin 10 Aufschluss über die Funktion von regulatorischen B-Zellen geben, deren Zahlen während einer chronischen GvHD verringert sind¹³⁹.

Eine Evaluierung des Knochenmark-Outputs könnte zukünftig in der Nachsorgeroutine für Patienten nach alloHSZT eine zentrale Rolle spielen. So wurden in unserer Arbeitsgruppe KREC als aussagekräftiger Biomarker identifiziert^{76,140} der dazu beitragen könnte, dass eine Knochenmark-GvHD frühzeitig erkannt wird und Maßnahmen zum Schutz vor Infektionen oder weitreichende Zerstörung der Knochenmarknische ergriffen werden können. Zudem wäre es denkbar gemäß der KREC-Kinetik einen individuellen Plan für die Grundimmunisierung zu erstellen, die momentan in den Leitlinien ab dem zwölften Monat nach der Transplantation empfohlen wird¹⁴¹.

Darüber hinaus müssen die Zielstrukturen von alloreaktiven Zellen identifiziert werden. Wie bereits erläutert, stehen hier vor allem die Zellen der Stammzellnischen im Mittelpunkt^{76,117}. Um die Stammzellnische zu schützen gibt es zumindest im Mausmodell schon medikamentöse Ansätze mit dem Cholesterinsenker Simvastatin¹⁴². Im Menschen haben verschiedene neue Ansätze in Konditionierung und Immunsuppression eine Auswirkung auf die Entwicklung einer GvHD, so auch in unserer Kohorte. Da der RIC bislang nur eine Verbesserung der Prognose in >50-jährigen Patienten nachgewiesen werden konnte¹⁴³, muss es Ziel sein die Knochenmarknische auch auf andere Weise zu schützen, um die therapeutischen Möglichkeiten der alloHSZT besser ausschöpfen zu können.

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Einteilung der akuten und chronischen GvHD	6
Tabelle 2 Geräte	13
Tabelle 3 Software	13
Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 5 Chemikalien	14
Tabelle 6 Antikörper	14
Tabelle 7 Konditionierungsregime	19
Tabelle 8 Organstadien der akuten GvHD gemäß Keystone-Konsenskriterien 1994	21
Tabelle 9 Gradeinteilung der chronischen GvHD nach National Institutes of Health	21
Tabelle 10 Klinische Daten bis ein Jahr nach der Transplantation	22
Tabelle 11 Spenderchimärismus-Analyse	43
Tabelle 12 Infektionen bis sechs Monate nach der Transplantation	49
Tabelle 13 Infektionen 6 Monate bis ein Jahr nach der Transplantation	51

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Mechanismen der Entstehung einer akuten GvHD4
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen der B-Zellen und ihrer
	exprimierten Oberflächenmarker
Abbildung 3.1	Gating-Strategie zur Identifikation der T-Zell-Population
Abbildung 3.2	Gating-Strategie zur Identifikation der T-Zell-Subpopulationen
Abbildung 3.3	Gating-Strategie zur Identifikation von B-Zellen
Abbildung 3.4	Gating-Strategie zur Identifikation der B-Zellsubpopulationen27
Abbildung 3.5	Die T-Zell-Rekonstitution bis Tag 360 nach Transplantation
Abbildung 3.6	Die Zahl aller B-Zellen, sowie der transitionalen und naiven B-Zellen bis Tag
	360 nach allo-HSZT 29
Abbildung 3.7	Die Zahl der Marginal-Zonen-ähnlichen B-Zellen und der klassengewechselten
	Gedächtniszellen bis Tag 360 nach allo-HSZT 30
Abbildung 3.8	Regeneration der CD27 ⁻ IgD ⁻ Gedächtniszellen und Plasmablasten bis Tag 360 nach allo-HSZT
Abbildung 3.9	Beginn der B-Zell-Rekonstitution ließ zwei Gruppen unterscheiden
Abbildung 3.10	Unterschiede der B-Zell-Rekonstitution in den Patientengruppen
Abbildung 3.11	Marginalzonen-ähnliche B-Zellen und klassengewechselte Gedächtniszellen in
	Patienten mit früher und später Rekonstitution
Abbildung 3.12	Zellzahlen der DN Gedächtniszellen und der Plasmablasten bis Tag 360 in
	Patienten mit früher und und später Rekonstitution35
Abbildung 3.13	Alter, Transplantat, MHC Mismatch und Geschlecht in Patienten mit frühem und
	spätem Rekonstitutionsbeginn
Abbildung 3.14	Bestrahlung, Konditionierung, Behandlung mit Antithymozytenglobulin und
	GvHD-Prophylaxe in den Rekonstitutionsgruppen
Abbildung 3.15	Patienten in der Gruppe mit spätem Beginn der B-Zellrekonstitution zeigten
	häufiger eine akute GvHD40
Abbildung 3.16	Die Patienten mit spätem B-Zellrekonstitutionsbeginn zeigten häufiger eine
	chronische GvHD
Abbildung 3.17	Ein Großteil der Patienten, die eine akute GvHD aufzeigten entwickelten auch
	eine chronische GvHD
Abbildung 3.18	Knochenmarkbiopsien der Patienten mit spätem Rekonstitutions-beginn wiesen
	eine höhere T-Zell-Infiltration auf 44
Abbildung 3.19	Patienten mit spätem Rekonstitutionsbeginn zeigten eine hochgradige T-Zell-
	Infiltration des Knochenmarks
Abbildung 3.20	Bestimmung der Osteoblastenanzahl und –morphologie mittels Hämatoxylin-
	und Eosintarbung in Knochenmarkbiopsien
Abbildung 3.21	Patienten mit einem hohen Prozentsatz an T-Zellen im Knochenmark hatten
	weniger Osteoblasten
Abbildung 3.22	Osteoblasten und T- Zellen in Knochenmarkhistologien

SCHRIFTENVERZEICHNIS

- 1. Gatti R, Allen H, Meuwissen H, Hong R, Good R. Immunological Reconstitution of Sexlinked Lymphopenic Immunological Deficiency. Lancet 1968;2(7583):1366-1369.
- 2. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of Marrow from an Unrelated Donor to a Patient with Acute Leukemia. N Engl J Med 1980;303(10):565-567.
- 3. Donnal Thomas E. Bone Marrow Transplantation from the Personal Viewpoint. Int J Hematol 2005;81:89-93.
- 4. Deutsches Register für Stammzelltransplantationen. Jahresbericht 2014.
- 5. Petersdorf EW, Malkki M, Horowitz MM, Spellman SR, Haagenson MD, Wang T. Mapping MHC haplotype effects in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. Blood 2014;121(10):1896-1905.
- Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J, Dc W. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation : a retrospective collaborative analysis High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation : a retrospective collaborative analysis. Blood 2013;122(18):3220-3229.
- 7. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex : a model for understanding graft-versus-host disease. Blood 2013;122(11):1863-1872.
- 8. Pingel J, Giani AS, Cereb N, Sauter J, Schmidt AH, Ehninger G, Yang SY. Identification of 2127 new HLA class I alleles in potential stem cell donors from Germany, the United States and Poland. Tissue Antigens 2014;83(3):184-189.
- 9. Markiewicz M, Siekiera U, Zielinska P. The Impact of H-Y Mismatches on Results of HLA-Matched Unrelated. Transplant Proc 2010;42(8):3297-3300.
- 10. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, Tallman MS, Buck G, Fielding AK, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Foroni L, Paietta E, Litzow MR, Marks DI, Durrant J, Mcmillan A, Franklin IM, Luger S, Rowe JM. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/. Blood 2008;111(4):1827-1833.
- Mcclune BL, Weisdorf DJ, Pedersen TL, Tunes G, Tallman MS. Effect of Age on Outcome of Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Older Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission or With Myelodysplastic Syndrome. J Clin Oncol 2010;28(11):1878-1887.
- 12. Marks DI, Wang T, Pérez WS, Antin JH, Copelan E, Gale RP, George B, Gupta V, Halter J, Khoury HJ, Klumpp TR, Lazarus HM, Lewis VA, McCarthy P, Rizzieri DA, Sabloff M, Szer J, Tallman MS, Weisdorf DJ. The outcome of full-intensity and reduced-intensity conditioning matched sibling or unrelated donor transplantation in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first and second complete remission. Blood 2010;116(3):366-374.
- Pérez-Simón JA1, Díez-Campelo M, Martino R, Brunet S, Urbano A, Caballero MD, de León A, Valcárcel D, Carreras E, del Cañizo MC, López-Fidalgo J, Sierra J SMJ. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft- versus -host disease after allogeneic transplantation. Br J Haematol 2005;130(3):394-403.
- 14. Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, Lima M De, Hosing C, Anderlini P, Donato M, Cleary K, Gajewski J, Neumann J, Ippoliti C, Rondon G, Cohen A, Champlin R. Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Ablative and
Nonmyeloablative Conditioning for Allogeneic Hematopoietic Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2004;10(3):178-185.

- 15. Holtick U, Albrecht M, Jm C, Theurich S, Skoetz N, Scheid C. Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults (Review). Cochrane Database Syst Rev 2014;(4).
- 16. Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2009/2010, Leukämien.
- 17. Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl MG, Runde V, Kolb H-J, Holler E, Beck R, Schwerdfeger R, Schumacher U, Hebart H, Martin H, Kienast J, Ullmann AJ, Maschmeyer G, Krüger W, Niederwieser D, Link H, Schmidt CA, Oettle H, Klingebiel T. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Ann Hematol 2003;82:175-185.
- Engelhard D, Cordonnier C, Shaw PJ, Parkalli T, Guenther C, Martino R, Dekker AW, Prentice HG, Gustavsson A. Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation : a European Bone Marrow Transplantation survey. Br J Haematol 2002;117(2):444-450.
- Schmidt-Hieber M, Labopin M, Beelen D, Volin L, Ehninger G, Socié G, Schwerdtfeger R, Kröger N, Ganser A, Niederwieser D, Polge E, Blau IW, Mohty M. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. Blood 2014;122(19):3359-3364.
- 20. Rouce RH, Louis CU, Heslop HE. Epstein Barr virus lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplant. Curr Opin Hematol 2014;21(6):476-481.
- 21. Pasquini MC, Wang Z, Horowitz MM, Gale RP. 2013 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. Clin Transpl 2013:87-105.
- 22. Hobo W, Broen K, Van der Velden WJFM, Greupink-Draaisma A, Adisty N, Wouters Y, Kester M, Fredrix H, Jansen JH, van der Reijden B, Falkenburg JHF, de Witte T, Preijers F, Schattenberg T, Feuth T, Blijlevens NM, Schaap N, Dolstra H. Association of Disparities in Known Minor Histocompatibility Antigens with Relapse-Free Survival and Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2013;19(2):274-282.
- 23. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift R a, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation 1974;18(4):295-304.
- 24. Gilliam AC, Whitaker-Menezes D, Korngold R MG. Apoptosis Is the Predominat Form of Epithelial Target Cell Injury in Acute Experimental Graft-versus-Host Disease. J Invest Dermatol 1996;107(3):377-383.
- 25. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. Nat Med 2004;10(9):987-992.
- 26. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ ES. Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells. Science (80-) 1999;285(5426):412-415.
- 27. Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don ALJ, Lineburg KE, Cheong M, Robb RJ, Markey KA, Varelias A, Malissen B, Hämmerling GJ, Clouston AD, Engwerda CR, Bhat P, MacDonald KP a, Hill GR. Recipient nonhematopoietic antigen-

presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. Nat Med 2011;18(1):135-142.

- 28. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, James LM. Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. Blood 1997;90(8):3204-3213.
- 29. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. Blood 1994;83(8):2360-2367.
- 30. Kwon B. Intervention with costimulatory pathways as a therapeutic approach for graft-versus-host disease. Exp Mol Med 2010;42(10):675-683.
- 31. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. Nat Rev Immunol 2012;12(6):443-458.
- 32. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, Dazzi F, Dreger P, Duarte R, Finke J, Garderet L, Greinix H, Holler E, Kröger N, Lawitschka A, Mohty M, Nagler A, Passweg J, Ringdén O, Socié G, Sierra J, Sureda A, Wiktor-Jedrzejczak W, Madrigal A, Niederwieser D. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. Bone Marrow Transplant 2014;49(2):168-173.
- 33. Ostronoff F, Milano F, Gooley T, Gutman JA, McSweeney P, Petersen FB, Sandmaier BM, Storb R, Delaney C. Double umbilical cord blood transplantation in patients with hematologic malignancies using a reduced-intensity preparative regimen without antithymocyte globulin. Bone Marrow Transplant 2013;48(6):782-786.
- Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, Litzow MR, Nieto Y, Savani BN, Schriber JR, Shaughnessy PJ, Wall DA, Carpenter PA. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2012;18(8):1150-1163.
- 35. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H, Petersdorf W, Pereira SE, Nash RA, Mielcarek M, Fero ML, Edus H, Sanders JE, Storb RF, Appelbaum FR, Storer BE, Paul J, Petersdorf EW, Warren EH, Martin PJ. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and f. Blood 2011;117(11):3214-3219.
- 36. Aslanian H, Chander B, Robert M, Cooper D, Proctor D, Seropian S, Jain D. Prospective evaluation of acute graft-versus-host disease. Dig Dis Sci 2012;57(3):720-725.
- 37. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K, Sugiyama T. Bone marrow graft-versus-host disease : early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation Bone marrow graft-versus-host disease : early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoiet. Blood 2010;115(26):5401-5411.
- 38. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, Wang M, Wang A, Todorov I, Wang J, Zeng D. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. J Immunol 2013;191(1):488-499.
- 39. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers MED. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-

versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2005;11(12):945-956.

- 40. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn J, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, Philip L, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Mccarthy PL. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. Blood 2002;100(2):406-414.
- 41. Vigorito AC, Campregher P V, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem H, Fero ML, Warren EH, Lee SJ, Appelbaum FR, Martin PJ, Flowers MED. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. 2009:702-708.
- 42. Lausen BF, Hougs L, Schejbel L, Heilmann C, Barington T. Human memory B cells transferred by allogenic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient. J Immunol 2004;172(5):3305-3318.
- 43. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, Passweg J, Roosnek E. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. Semin Immunopathol 2008;30(4):425-437.
- 44. Podgorny PJ, Liu Y, Dharmani-Khan P, Pratt LM, Jamani K, Luider J, Auer-Grzesiak I, Mansoor A, Williamson TS, Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Stewart DA, Daly A, Khan FM, Russell JA, Storek J. Immune cell subset counts associated with graft-versushost disease. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20(4):450-462.
- 45. Avanzini MA, Locatelli F, Santos C Dos, Maccario R, Lenta E, Oliveri M, Giebel S, De Stefano P, Rossi F, Giorgiani G, Amendola G, Telli S, Marconi M. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. Exp Hematol 2005;33(4):480-486.
- 46. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, Odom J, Vance BA, Christensen BL, Mackall CL, Gress RE. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. J Clin Invest 2005;115(4):930-939.
- 47. Le RQ, Melenhorst JJ, Battiwalla M, Hill B, Memon S, Bipin N, Shenoy A, Hensel NF, Koklanaris EK, Keyvanfar K, Frances T, Douek DC, Barrett AJ, Savani BN, Hakim FT. Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2011;117(19):5250-5256.
- 48. Storek J, Joseph A, Dawson M a, Douek DC, Storer B, Maloney DG. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Transplantation 2002;73(7):1154-1158.
- 49. Dumont-Girard F, Roux E, van Lier R a, Hale G, Helg C, Chapuis B, Starobinski M, Roosnek E. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. Blood 1998;92(11):4464-4471.
- 50. Puissant-Lubrano B, Huynh A, Attal M, Blancher A. Evolution of peripheral blood T lymphocyte subsets after allogenic or autologous hematopoietic stem cell transplantation. Immunobiology 2014;219(8):611-618.
- 51. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature 2014;505:327-334.
- 52. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature 2013;495(7440):231-235.
- 53. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, Gerard J, Hexner E, Choi Y, Taichman RS, Emerson SG, Joe GJ. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells Osteoblasts support B-lymphocyte

commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. 2007:3706-3712.

- 54. Wu JY, Purton LE, Rodda SJ, Chen M, Weinstein LS, McMahon AP, Scadden DT, Kronenberg HM. Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs{alpha}dependent signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(44):16976-16981.
- 55. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon P, Bensinger W, Flowers MED, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M, Witherspoon RP. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. Blood 2001;97(11):3380-3389.
- 56. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. Blood 1990;76(8):1647-1656.
- 57. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, Bernuth H Von, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van F, Cruyssen D, Garff M Le, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Hagen PM Van, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter H, Warnatz K, Vlkova M, Cruyssen FB Der, Litzman J, Quinti I, Peter HH. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Blood 2008;111(1):77-85.
- 58. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood 2005;105(11):4390-4398.
- 59. Carsetti R, Kohler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. J Exp Med 1995;181(6):2129-2140.
- 60. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med 1998;188(9):1679-1689.
- Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng N, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. Nature 2008;453(7195):667-671.
- Reid KB, Jones LH, Lerner RA, Roitt IM, Diego S, Helman WP, Ross AB, Muller RP, Kang JW, Chapin DH, Zhong L, Zappi ME, Hong AP, Takeuchi I, Kutsuna S, Ibusuki T, Gorman AA, Rodgers MAJ, Alexander EL, Titus JA, Segal DM, Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ, Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells Nadia. Science 2002;298(5601):2199-2202.
- 63. Goins CL, Chappell CP, Shashidharamurthy R, Selvaraj P, Jacob J. Immune complexmediated enhancement of secondary antibody responses. J Immunol 2010;184(11):6293-6298.
- 64. Wu YC, Kipling D, Leong HS, Martin V, Ademokun AA, Dunn-Walters DK. Highthroughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. Blood 2010;116(7):1070-1078.
- Seifert M, Küppers R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+ (IgD +) CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. J Exp Med 2009;206(12):2659-2669.
- Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, He B, Biermann K, Lange JF, Van Der Burg M, Van Dongen JJM, Van Zelm MC. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and independent maturation pathways. Blood 2011;118(8):2150-2158.

- 67. Weller S, Mamani-matsuda M, Picard C, Cordier C, Lecoeuche D, Weill J, Reynaud C-A, Gauthier F, Weill J, Reynaud C-A. Somatic diversification in the absence of antigendriven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. J Exp Med 2008;205(6):1331-1342.
- D'Orsogna LJ, Wright MP, Krueger RG, McKinnon EJ, Buffery SI, Witt CS, Staples N, Loh R, Cannell PK, Christiansen FT, French MA. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients have defects of both switched and igm memory B cells. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15(7):795-803.
- 69. Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. J Immunol 2006;177(6):3728-3736.
- 70. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, Lee E-H, Milner ECB, Sanz I. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol 2007;178(10):6624-6633.
- 71. Bulati M, Buffa S, Martorana A, Candore G, Lio D, Caruso C, Colonna-Romano G. Trafficking phenotype and production of granzyme B by double negative B cells (IgG+IgD-CD27-) in the elderly. Exp Gerontol 2014;54:123-129.
- 72. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, Einsele H, Cordonnier C. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. Bone Marrow Transplant 2005;36(9):757-769.
- 73. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. Cytometry B Clin Cytom 2008;74(5):261-271.
- 74. Giralt S, Ballen K, Rizzo D, Bacigalupo A, Horowitz M, Pasquini M, Sandmaier B. Reduced-Intensity Conditioning Regimen Workshop: Defining the Dose Spectrum. Report of a Workshop Convened by the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15(3):367-369.
- 75. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. Biol Blood Marrow Transplant 2010;15(12):1628-1633.
- 76. Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, Wittenbecher F, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R NI. Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. Blood 2014;124(6):963-972.
- 77. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant 1995;15(6):825-828.
- 78. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, Cahn JY, Calderwood S, Gratwohl A, Socié G, Abecasis MM, Sobocinski KA, Zhang MJ HM. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade . Br J Haematol 1997;97(4):855-864.
- Martin PJ, Schoch G, Gooley T, Anasetti C, Deeg HJ, Nash R, Storb R, Appelbaum F, St L, Dc W. Methods for Assessment of Graft-Versus-Host Disease. Blood 1998;92(9):3479-3481.
- 80. Martino R, Romero P, Subirá M, Bellido M, Altés A, Sureda A, Brunet S, Badell I, Cubells J, Sierra J. Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. International Bone Marrow Transplant Registry. Bone Marrow Transplant

1999;24(3):283-287.

- 81. Moon JH, Sohn SK, Lambie A, Ellis L, Hamad N, Uhm J, Gupta V, Lipton JH, Messner HA, Kuruvilla J, Kim D. Validation of National Institutes of Health to Overall and GVHD-Speci fi c Survival. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20(4):556-563.
- 82. Kharfan-Dabaja M, Mhaskar R, Reljic T, Pidala J, Perkins JB, Djulbegovic B KA. Mycophenolate mofetil versus methotrexate for prevention of graft-versus-host disease in people receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Review). Cochrane Database Syst Rev 2014;(7).
- 83. Corre E, Carmagnat M, Busson M, de Latour RP, Robin M, Ribaud P, Toubert A, Rabian C, Socié G. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. Haematologica 2010;95(6):1025-1029.
- 84. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, Contentin N, Tilly H, Tron F, Vannier J-P, Jacquot S. Transitional B cells in humans: Characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Immunol 2008;127(1):14-25.
- 85. Sottini A, Ghidini C, Zanotti C, Chiarini M, Caimi L, Lanfranchi A, Moratto D, Porta F, Imberti L. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. Clin Immunol 2010;136(2):217-227.
- Mackall CL, Bare C V, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymicindependent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. J Immunol 1996;156(12):4609-4616.
- 87. Mackall CL, Fleisher T a, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Horowitz ME, Magrath IT, Shad a T, Steinberg SM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. N Engl J Med 1995;332(3):143-149.
- Parkman R, Cohen G, Carter SL, Weinberg KI, Masinsin B, Guinan E, Kurtzberg J, Wagner JE, Kernan NA. Successful Immune Reconstitution Decreases Leukemic Relapse and Improves Survival in Recipients of Unrelated Cord Blood Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12(9):919-927.
- 89. Hoegh-Petersen M, Sy S, Ugarte-Torres A, Williamson TS, Eliasziw M, Mansoor A, Liu Y, Liu S, Podgorny P, Khan F, Duggan PR, Stewart D a, Russell J a, Storek J. High Epstein-Barr virus-specific T-cell counts are associated with near-zero likelihood of acute myeloid leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. Leukemia 2011;26(2):1-4.
- 90. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Cutler C, Ballen K, McDonough S, Reynolds C, Herrera M, Liney D, Ho V, Kao G, Armand P, Koreth J, Alyea E, McAfee S, Attar E, Dey B, Spitzer T, Soiffer R, Ritz J, Antin JH, Boussiotis VA. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. Blood 2010;115(20):4111-4119.
- 91. Sauter C, Abboud M, Jia X, Heller G, Gonzales A, Lubin M, Hawke R, Perales M, Brink MR Van Den. Serious Infection Risk and Immune Recovery after Double Unit Cord Blood Transplantation without Anti-thymocyte Globulin. Biol Blood Marrow Transplant 2012;17(10):1460-1471.
- 92. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, Ugarte-Torres A, Khan FM, Luider J, Auer-Grzesiak I, Mansoor A, Russell JA, Daly A, Stewart DA, Maloney D, Boeckh M, Storek J. Immune Reconstitution After Antithymocyte Globulin-Conditioned Hematopoietic Cell Transplantation. Cytotherapy 2012;14(10):1258-1275.
- 93. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, Lankester AC, Bierings MB, Egberts TCG, van Tol MJD, Knibbe CAJ, Bredius RGM, Boelens JJ. Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic

cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis. Lancet Haematol 2015;2(5):e194-e203.

- 94. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS GR. Distinctions between CD8 + and CD4 + T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy . Blood 1997;89(10):3700-3707.
- 95. Panse JP, Heimfeld S, Guthrie KA, Maris MB, Maloney DG, Baril BB, Little MT, Chauncey TR, Storer BE, Storb R, Sandmaier BM. Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after nonmyeloablative conditioning. Br J Haematol 2005;128(5):659-667.
- Fedoriw Y, Samulski TD, Deal AM, Dunphy CH, Sharf A, Shea TC, Serody JS, Sarantopoulos S. Bone Marrow B cell Precursor Number after Allogeneic Stem Cell Transplantation and GVHD Development. Biol Blood Marrow Transplant 2012;18(6):968-973.
- 97. Jacobson CA, Sun L, Kim HT, McDonough SM, Reynolds CG, Schowalter M, Koreth J, Cutler CS, Ho VT, Alyea EP, Armand P, Blazar BR, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J, Sarantopoulos S. Post-Transplantation B Cell Activating Factor and B Cell Recovery before Onset of Chronic Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20(5):668-675.
- 98. Ahmed SS, Wang XN, Norden J, Pearce K, El-Gezawy E, Atarod S, Hromadnikova I, Collin M, Holler E, Dickinson AM. Identification and validation of biomarkers associated with acute and chronic graft versus host disease. Bone Marrow Transplant 2015;50(12):1563-1571.
- 99. Kim JS, Kim S-J, Cheong J-W, Kim Y, Hwang DY, Yoon S, Jang J, Hyun SY, Min YH. Clinical significance of B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Korean J Hematol 2011;46(3):175-179.
- Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, Ho VT, Alyea EP, Koreth J, Blazar BR, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. Blood 2009;113(16):3865-3874.
- 101. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J. High Levels of B-Cell Activating Factor in Patients with Active Chronic Graft-Versus-Host Disease. Clin Cancer Res 2007;13(20):617-632.
- 102. Bulati M, Buffa S, Candore G, Caruso C, Dunn-Walters DK, Pellicanò M, Wu YC, Colonna Romano G. B cells and immunosenescence: A focus on IgG+IgD-CD27- (DN) B cells in aged humans. Ageing Res Rev 2011;10(2):274-284.
- 103. Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. J Exp Med 2005;201(4):545-554.
- Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, Longhi R, Ferrante P. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. Neurobiol Aging 2007;28(8):1163-1169.
- 105. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, Mccarthy PL, Corey S, Urbano-ispizua A, Pavletic SZ, Haagenson MD, Zhang M, Joseph H, Bolwell BJ, Bredeson C, Cahn J, Cairo M, Gale RP, Gupta V, Lee SJ, Litzow M, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Hahn T, Cutler CS, Antin JH. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. Blood 2012;119(1):296-307.
- 106. Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kanamori H, Iwato K, Uchida N, Mori S, Nagamura-Inoue T, Ichinohe T, Atsuta Y,

Teshima T, Murata M. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2015;50(4):559-565.

- 107. Harvey CM, Gottipati R, Schwarz S, Auer D, O'Donoghue M, Russell NH, Fox CP. Acute disseminated encephalomyelitis following allo-SCT: central nervous system manifestation of GVHD. Bone Marrow Transplant 2014;49(6):854-856.
- 108. Abedin S, Yanik GA, Braun T, Pawarode A, Magenau J, Goldstein SC, Levine JE, Kitko CL, Couriel DR. Biology of Blood and Marrow Transplantation Predictive Value of Bronchiolitis Obliterans Syndrome Stage 0p in Chronic Graft-versus-Host Disease of the Lung. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21(6):1127-1131.
- 109. Olkinuora H, von Willebrand E, Kantele JM, Vainio O, Talvensaari K, Saarinen-Pihkala U, Siitonen S, Vettenranta K. The impact of early viral infections and graft-versus-host disease on immune reconstitution following paediatric stem cell transplantation. Scand J Immunol 2011;73(6):586-593.
- Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood 2001;98(2):489-491.
- 111. Xie M, Fu H-X, Chang Y-J, Xu L-P, Liu D-H, Zhang X-H, Han W, Liu K-Y, Huang X-J. Characteristics and influencing factors of CD19+ B cell reconstitution in patients following haploidentical/mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Int J Hematol 2012;96(1):109-121.
- 112. Shono Y, Shiratori S, Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Hashino S, Matsuno Y, Matsushima K, Tanaka J, Imamura M, Teshima T. Bone Marrow Graft-versus-Host Disease: Evaluation of Its Clinical Impact on Disrupted Hematopoiesis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20(4):495-500.
- 113. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y, Fujiyama K, Kiriyama T, Aoyagi T, Maeda K, Eguchi K. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. J Lab Clin Med 1999;134(3):222-231.
- Schrum LW, Bost KL, Hudson MC, Marriott I. Bacterial infection induces expression of functional MHC class II molecules in murine and human osteoblasts. Bone 2003;33(5):812-821.
- 115. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003;425(6960):841-846.
- 116. Hooper AT, Butler JM, Nolan DJ, Kranz A, Iida K, Kobayashi M, Kopp H-G, Shido K, Petit I, Yanger K, James D, Witte L, Zhu Z, Wu Y, Pytowski B, Rosenwaks Z, Mittal V, Sato TN, Rafii S. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. Cell Stem Cell 2009;4(3):263-274.
- 117. Medinger M, Krenger W, Jakab A, Halter J, Buser A, Bucher C, Passweg J, Tzankov A. Numerical impairment of nestin+ bone marrow niches in acute GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for AML. Bone Marrow Transplant 2015;50(11):1453-1458.
- 118. Glauzy S, Latour P De, Maki G, Robin M. Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. Blood 2014;124(15):2459-2463.
- 119. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJM. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. J Exp Med 2007;204(3):645-655.

- 120. Beishuizen A, de Bruijn M a, Pongers-Willemse MJ, Verhoeven M a, van Wering ER, Hählen K, Breit TM, de Bruin-Versteeg S, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease. Leukemia 1997;11(12):2200-2207.
- 121. Kerry Atkinson, Mary M. Horowitz, Robert Peter Gale, Dirk W. van Bekkum, Eliane Gluckman, Robert A. Good, Niels Jacobsen, Hans-Jochem Kolb, Alfred A. Rimm, Olle Ringden, Ciril Rozman, Kathleen A. Sobocinski, Ferry E. Zwaan and MMB. Risk Factors for Chronic Graft-Versus-Host Disease After HLA-Identical Sibling Bone Marrow Transplantation. Blood 1990;75(12):2459-2464.
- 122. Remberger M, Kumlien G, Aschan J, Barkholt L, Hentschke P, Ljungman P, Svennilson J, Ringdén O. Risk factors for moderate-to-severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2002;8(12):674-682.
- 123. Storek J, Witherspoon RP, Webb D, Storb R. Lack of B cells precursors in marrow transplant recipients with chronic graft-versus-host disease. Am J Hematol 1996;52(2):82-89.
- 124. Allen JL, Fore MS, Wooten J, Roehrs P a, Bhuiya NS, Hoffert T, Sharf A, Deal AM, Armistead P, Coghill J, Gabriel D a, Irons R, Essenmacher A, Shea TC, Richards K, Cutler C, Ritz J, Serody J, Baldwin AS, Sarantopoulos S. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF mediated pathways. Blood 2012;120(12):2529-2536.
- 125. Rowe V, Banovic T, Macdonald KP, Kuns R, Don AL, Morris ES, Burman AC, Bofinger HM, Clouston AD, Hill GR. Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. 2014:2485-2492.
- 126. Kim S-H, Kee SY, Lee D-G, Choi S-M, Park SH, Kwon J-C, Eom K-S, Kim Y-J, Kim H-J, Lee S, Min C-K, Kim D-W, Choi J-H, Yoo J-H, Lee J-W, Min W-S. Infectious complications following allogeneic stem cell transplantation: reduced-intensity vs. myeloablative conditioning regimens. Transpl Infect Dis 2012;15(1):49-59.
- 127. Storek J, Espino G, Dawson MA, Storer B, Flowers ME, Maloney DG. Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation. Blood 2000;96(9):3290-3293.
- 128. Ljungman P, Engelhard D, de la Cámara R, Einsele H, Locasciulli a, Martino R, Ribaud P, Ward K, Cordonnier C. Vaccination of stem cell transplant recipients: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. Bone Marrow Transplant 2005;35(8):737-746.
- 129. Aguilar-Guisado M, Jiménez-Jambrina M, Espigado I, Rovira M, Martino R, Oriol A, Borrell N, Ruiz I, Martín-Dávila P, de la Cámara R, Salavert M, de la Torre J CJ. Pneumonia in allogeneic stem cell transplantation recipients: A multicenter prospective study. Clin Transplant 2011;25(6):E629-E638.
- 130. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Schmidt CM SU. What Is the Impact of Hypogammaglobulinemia on the Rate of Infections and Survival in Solid Organ Transplantation? A Meta-Analysis. Am J Transplant 2013;13(10):2601-2610.
- 131. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different Risk Factors Related to Adenovirus- or BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2012;18(3):458-465.
- 132. Uhm J, Hamad N, Michelis F V, Shanavas M, Kuruvilla J, Gupta V, Lipton JH, Messner H

a, Seftel M, Kim DD. The risk of polyomavirus BK-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT is associated with myeloablative conditioning, CMV viremia and severe acute GVHD. Bone Marrow Transplant 2014;49(12):1528-1534.

- 133. Peterson L, Ostermann H, Fiegl M, Tischer J, Jaeger G, Rieger CT. Reactivation of polyomavirus in the genitourinary tract is significantly associated with severe GvHD and oral mucositis following allogeneic stem cell transplantation. Infection 2016;44(4):483-490.
- 134. Koc Y, Miller KB, Schenkein DP, Griffith J, Akhtar M, DesJardin J, Snydman DR. Varicella zoster virus infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and clinical outcome. Biol Blood Marrow Transplant 2000;6(1):44-49.
- 135. Steer CB, Szer J, Sasadeusz J, Matthews JP, Beresford J a, Grigg a. Varicella-zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low-dose aciclovir and ganciclovir. Bone Marrow Transplant 2000;25(6):657-664.
- 136. Nissen JC, Hummel M, Brade J, Kruth J, Hofmann W-K, Buchheidt D, Reinwald M. The risk of infections in hematologic patients treated with rituximab is not influenced by cumulative rituximab dosage - a single center experience. BMC Infect Dis 2014;14(1):364.
- 137. Mehrotra A, Leventhal J, Purroy C, Cravedi P. Monitoring T cell alloreactivity. Transplant Rev 2015;29(2):53-59.
- 138. Allen J, Tata P, Fore M, Wooten J, Rudra S, Deal A, Sharf A, Hoffert T, Roehrs P, Shea T, Serody J, Richards K, Jagasia M, Lee S, Rizzieri D, Horwitz M, Chao N, Sarantopoulos S. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. Blood 2014;123(13):2108-2116.
- 139. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, Mielke S, De Lavallade H, Muftuoglu M, Curbelo IF, Liu E, Muraro PA, Alousi A, Stringaris K, Parmar S, Shah N, Shaim H, Yvon E, Molldrem J, Rouce R, Champlin R, McNiece I, Mauri C, Shpall EJ, Rezvani K. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. Blood 2014;124(13):2034-2045.
- 140. Mensen A, Ochs C, Stroux A, Wittenbecher F, Szyska M, Imberti L, Fillatreau S, Uharek L, Arnold R, Dörken B, Thiel A, Scheibenbogen C, Na I-K. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Transl Med 2013;11:188-197.
- 141. Hilgendorf I, Freund M, Jilg W, Einsele H, Gea-Banacloche J, Greinix H, Halter J, Lawitschka A, Wolff D, Meisel R. Vaccination of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: Report from the International Consensus Conference on Clinical Practice in chronic GVHD. Vaccine 2011;29(16):2825-2833.
- 142. Bajaj MS, Ghode SS, Kulkarni RS, Limaye LS, Kale VP. Simvastatin improves hematopoietic stem cell engraftment by preventing irradiation-induced marrow adipogenesis and radio-protecting the niche cells. Haematologica 2015;100(8):e323-327.
- 143. Savani BN, Labopin M, Kroger N, Finke J, Ehninger G, Niederwieser D, Schwerdtfeger R, Bunjes D, Glass B, Socie' G, Ljungman P, Craddock C, Baron F, Ciceri F, Gorin NC, Esteve J, Schmid C, Giebel S, Mohty M, Nagler A. Expanding transplant options to patients over 50 years- Improved outcome after reduced intensity conditioning mismatched-unrelated donor transplantation for patients with acute myeloid leukemia: A report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. Haematologica 2016;101(6):773-780.

DANKSAGUNGEN

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie und der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, die mich im Verlauf meiner Arbeit unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr.med. II-Kang Na und Dr. rer. nat. Angela Mensen für die wissenschaftliche Betreuung und Förderung dieser Dissertation. Sonya Becker danke ich herzlich für das Korrekturlesen dieser Promotionsschrift.

Außerdem möchte ich mich bei der Berliner Krebsgesellschaft e.V. bedanken, die diese Dissertation durch ein Promotionstipendium unterstützte.

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. CURRICULUM VITAE

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

"Ich, Maike Oey, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Verzögerte B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation in Patienten mit GvHD selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

ANTEILSERKLÄRUNG AN PUBLIKATIONEN

Maike Oey hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, **Oey M**, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, Wittenbecher F, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. Blood 2014;124(6):963-972.

Beitrag im Einzelnen:

Organisation und Akquise der Patientenproben, Durchführung der durchflusszytometrischen Experimente, Auswertung und Interpretation der Endergebnisse.

Publikation 2:

Poster: **Oey M**, Mensen A, Demski S, Na IK. B-Cell Neogenesis is delayed in acute Graftversus-Host-Disease, Posterkongress der Summer School of Immunology, Ettal September 2014

Beitrag im Einzelnen:

Organisation und Akquise der Patientenproben, Durchführung der durchflusszytometrischen Experimente, Auswertung und Interpretation der Endergebnisse.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin