

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

DISSERTATION

**Sekundäre Immundefekte nach allogener Stammzelltransplantation:
Anhaltender Mangel an Gedächtnis-B-Zellen und Apoptoseneigung
der B-Zellen bei *in vitro* Aktivierung**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Youngseong Oh

aus Busan/Südkorea

Datum der Promotion: 18.09.2020

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Mensen A, Oh Y, Becker S C, Hemmati P G, Jehn C, Westermann J, Szyska M, Göldner H, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. „Apoptosis Susceptibility Prolongs the Lack of Memory B Cells in Acute Leukemic Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation”, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Band. 21, Nr. 11, S. 1895–1906, Nov. 2015. [67]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation	9
1.2 Immunrekonstitution und Infektionen nach der alloHSZT.....	10
1.3 B-Lymphozyt.....	12
1.3.1 Entwicklung der B-Zellen	13
1.3.2 Vorgänge in der Keimzentrumsreaktion.....	16
1.4 Zielsetzung	19
2 Material	21
2.1 Patientenkohorte und gesunde Probanden	21
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	21
2.3 Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen.....	22
2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
3 Methoden	24
3.1 Isolierung von den PBMC aus dem peripheren Blut und Kryokonservierung	24
3.2 Zellkultur.....	25
3.3 Durchflusszytometrie	25
3.3.1 Immunfärbung der Oberflächenmarker.....	26
3.3.2 Apoptose-Färbung mit Annexin V	26
3.4 Statistische Analysen.....	27
3.5 Erhebung klinischer Daten	27
4 Ergebnisse.....	29
4.1 Klinische Charakteristika der Patientenkohorte.....	29
4.2 Immunrekonstitution der Lymphozyten nach der alloHSZT.....	30
4.2.1 Immunrekonstitution des B-Zell-Kompartiments nach der alloHSZT	31
4.2.2 Immunrekonstitution des T-Zell-Kompartiments nach der alloHSZT	34
4.3 Funktionelle Phänotypisierung der B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT	37
4.3.1 CXCR5-, CCR7- und HLA-DR-Expression	38
4.3.2 Fas (CD95)-Expression	40
4.3.3 CD86- und CXCR3-Expression	41
4.3.4 BAFF-R-Expression	43
4.4 Apoptoseneigung der B-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit α-IgM, CD40L und CpG	44
5 Diskussion.....	46
5.1 Diskussion der quantitativen Immunrekonstitution nach der alloHSZT (zu I.).....	46
5.1.1 Mangel an Isotyp-gew. GZ und MZ-ähnlichen B-Zellen nach der alloHSZT	46

5.1.2 Kombiniertes Mangel an Gedächtnis-B-Zellen, CD4 ⁺ T-Zellen und CXCR5 ⁺ Gedächtnis-FTH	48
5.2 Diskussion des funktionellen Phänotyps der B-Zellen nach der alloHSZT (zu II.).....	49
5.2.1 Phänotypisierung der B-Zellen ein Jahr nach der alloHSZT hinsichtlich Migration, Antigenpräsentation und Proliferation.....	49
5.2.2 Proapoptotischer und aktivierter Phänotyp der B-Zellen nach der alloHSZT	51
5.3 Diskussion der vermehrten B-Zell-Apoptose nach <i>in vitro</i> Stimulation (zu III.)	53
5.4 Fazit und Ausblick	57
Literaturverzeichnis	59
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	73
Eidesstattliche Erklärung	74
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	75
Lebenslauf	76
Danksagung.....	77

Abstract

EINLEITUNG: Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT) kann Leukämie heilen, ist jedoch assoziiert mit einer prolongierten Immundefizienz, die das Risiko für infektiöse Komplikationen steigert. Defekte in der Keimzentrumsreaktion führen vermutlich zur verlangsamten Rekonstitution von CD27 positiven Gedächtnis-B-Zellen, die eine wichtige Rolle für die Immunabwehr spielen. Konkrete Mechanismen dahinter sind jedoch kaum bekannt.

METHODEN: Lymphozyten aus peripherem Blut von 35 Leukämie-Patienten wurden am Tag 180 und Tag 360 nach der alloHSZT per Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden B- und T-Zell-Subpopulationen quantitativ bestimmt und die Expression von funktionellen Oberflächenmarkern ausgewertet. Zudem wurden B-Zellen von Tag 360 T-Zell-abhängig mit α -IgM/CD40L/CpG für zwei Tage stimuliert und die Menge der apoptotischen Zellen mit Annexin V/PI-Färbung untersucht.

ERGEBNISSE: I.) Ein Jahr nach der alloHSZT wiesen alle Patienten trotz normalisierter Gesamt-B-Zellzahl einen Mangel an IgD^-CD27^+ Isotyp-gewechselten Gedächtnis-B-Zellen und IgD^+CD27^+ MZ-ähnlichen B-Zellen im Vergleich zur altersadaptierten Kontrollgruppe auf. Darüber hinaus waren ein Jahr nach der alloHSZT sowohl die Gesamtzahl der $CD4^+$ T-Helferzellen als auch die Zahl der $CD4^+CXCR5^+$ folliculären Gedächtnis-T-Helferzellen signifikant vermindert. II.) Naive B-Zellen zeigten verminderte CXCR5- und HLA-DR-Expressionen am Tag 360. Dies weist auf eine reduzierte Fähigkeit zur Migration in den Lymphfollikel und zur Antigenpräsentation hin. Die Expression des BAFF-R war in allen B-Zell-Subpopulationen vermindert, was eine Auswirkung auf das Überleben und die Homöostase der B-Zellen haben könnte. Die inflammatorischen Marker CD86 und CXCR3 waren am Tag 180 signifikant höher exprimiert. Im Verlauf normalisierten sie sich in nahezu allen B-Zell-Subpopulationen, nicht jedoch in den Gedächtnis-B-Zellen. III.) Am Tag 360 zeigte sich nach *in vitro* Stimulation eine gesteigerte Apoptose der B-Zellen von alloHSZT-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Damit ging eine erhöhte Expression von Fas in nahezu allen B-Zell-Subpopulationen einher.

SCHLUSSFOLGERUNG: Mögliche Mechanismen für Keimzentrumsdefekte nach der alloHSZT sind ein systemisches inflammatorisches Milieu sowie eine reduzierte Migrationskapazität und eine erhöhte Apoptoseneigung nach Stimulation bei den B-Zellen. Die Ergebnisse weisen eine bis zu über ein Jahr nach der alloHSZT bestehende Gedächtnis-B-Zell-Immundefizienz aus und unterstreichen die Wichtigkeit der Überprüfung von Immunantworten auf Impfungen.

Abstract (Englisch)

INTRODUCTION: The allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) can cure leukemia but is associated with prolonged immune deficiency, which increases susceptibility to infections post-transplant. Defects in the germinal-center reaction are assumed to cause a slow recovery of CD27 positive memory B cells, but little is known about the contributing mechanisms.

METHODS: Lymphocytes from peripheral blood of 35 acute leukemia patients were flow cytometrically investigated to characterize B and T cell subsets and expression of functional markers at day 180 and 360 after alloHSCT. Additionally, B cells taken on day 360 were T cell dependently stimulated with α -IgM/CD40L/CpG for two days and their apoptosis was analyzed with Annexin V/PI staining.

RESULTS: I.) Despite normalized total B cell count one year post-transplant, all patients lack IgD⁻CD27⁺ class-switched memory B cells and IgD⁺CD27⁺ MZ-like B cells, when compared to the values of age-matched healthy control. In addition, not only total CD4⁺ helper T cells, but also CD4⁺CXCR5⁺ circulating memory follicular helper cells were significantly reduced at day 360. II.) Naïve B cells showed diminished expression level of CXCR5 and HLA-DR at day 360, indicating impaired migration to the follicle and antigen-presentation capacity. Also the level of BAFF-R expression was decreased in all B cell subsets, which can affect B cell survival and homeostasis. Furthermore, inflammatory surface markers CXCR3 and CD86, whose expression levels were aberrantly high in naïve B cells at day 180 but normalized at day 360, didn't normalize on memory B cells at day 360. II.) After *in vitro* stimulation significantly more B cells from patients at day 360 posttransplant underwent apoptosis. This is in line with the increased expression of Fas on almost all B cell subsets at day 360.

CONCLUSION: Decreased migration capacity and apoptosis susceptibility upon stimulation of B cells as well as a systemic inflammatory condition are possible mechanisms leading to germinal-center defects post alloHSCT. These results emphasize the memory B cell immunodeficiency after alloHSCT and underline the importance of analyzing immune response after vaccinations.

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
alloHSZT	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
Ann.V	Annexin V
α -IgM	F(ab') ₂ -Frament-Ziegen-Antihuman-IgM
BAFF	engl. <i>B cell activating factor of the TNF-family</i>
BAFF-R	engl. <i>B cell activating factor of the TNF-family receptor</i>
BCL-2	engl. <i>B cell lymphoma 2</i>
BCL-6	engl. <i>B cell lymphoma 6</i>
BZR	B-Zell-Antigen-Rezeptor
ca.	circa
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CpG	CpG-Nukleotid
CMV	Cytomegalievirus
d. h.	das heißt
DN	Doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dunkle Zone
engl.	englisch
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc-Rezeptor	Rezeptor für den konstanten Teil des Immunglobulins
FDC	engl. <i>follicular dendritic cells</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FTH	Follikuläre T-Helferzelle
ggf.	gegebenenfalls
GvHD	engl. <i>graft-versus-host-disease</i> (Graft-versus-Host-Reaktion)
GZ	Gedächtnis-B-Zellen
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HZ	Helle Zone
ICOS	engl. <i>inducible costimulator</i>

ICOS-L	engl. <i>inducible costimulator ligand</i>
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-21	Interleukin-21
Isotyp-gew.	Isotyp-gewechselt
lat.	lateinisch
LK	Lymphknoten
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MZ	Marginalzone
HLA	engl. <i>human leucocyte antigen</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin
PI	Propidiumiodid
PTLD	engl. <i>post transplant lymphoproliferative disease</i>
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SHN	Somatische Hypermutation
sog.	sogenannte
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
spp.	lat. <i>species pluralis</i>
SSC	engl. <i>side scatter</i>
TI	engl. <i>thymus independent</i>

TLR	engl. <i>toll-like-receptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
NF-kB	Nekrose-Faktor-kappa-B
RT	Raumtemperatur
UpM	Umdrehungen pro Minute
V(D)J	V(D)J-Rekombination <i>synonym</i> somatische Rekombination
vs.	versus
VZV	Varizella-Zoster-Virus
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT) ist eine kurative Therapie für hämatologische maligne und nicht-maligne Erkrankungen [1][2]. Die drei häufigsten Indikationen im Jahr 2017 in Deutschland waren akute myeloische Leukämie (AML), myelodysplastisches Syndrom und Non-Hodgkin-Lymphom [3]. Dabei werden hämatopoetische Stammzellen eines verwandten oder nicht-verwandten Spenders nach einer Konditionierungstherapie mit Chemotherapeutika und/oder Bestrahlung auf den Patienten übertragen. Die wichtigste Voraussetzung für die Durchführbarkeit der alloHSZT ist eine komplette oder zumindest weitgehende Übereinstimmung von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC, engl. *Major histocompatibility complex*) zwischen Spender und Patienten. Diese auf allen Körperzellen ubiquitär vorkommenden Oberflächenproteinkomplexe sind besonders gut nachweisbar auf Leukozyten (HLA-System, engl. *Human leucocyte antigen system*), spielen eine Schlüsselrolle bei allen immunologischen Vorgängen und vermitteln auch Abstoßungsreaktionen im Falle einer Nicht-Übereinstimmung [4]. In Deutschland wird seit Anfang der 1990er Jahre ein zentrales Knochenmarkspender-Register zur effektiven Vermittlung eines potentiellen Spenders geführt. Für den Fall, dass kein passender verwandter Spender zur Verfügung steht, kann über das Register in über 90 % der Fälle erfolgreich ein passender Spender vermittelt werden [5]. Zudem erhöhte der rapide Zuwachs an immunologischen Kenntnissen und klinischen Erfahrungen die Attraktivität der alloHSZT als Therapieoption. Die Erkenntnis des spezifischen anti-tumoralen Effektes der zytotoxischen T-Zellen aus der Spenderhämatopoese bedeutete einen Paradigmenwechsel im Vergleich zur konventionellen unspezifischen Chemotherapie [6]. Mit Etablierung eines weniger aggressiven Konditionierungsregimes wird alloHSZT zunehmend auch bei Patienten in hohem Lebensalter eingesetzt, ohne dabei ein höheres Rezidivrisiko einer malignen Grunderkrankung in Kauf nehmen zu müssen [7]. Insbesondere bei AML mit höherem Risiko eines Rezidivs steigert die alloHSZT die Langzeitüberlebensrate der betroffenen Patienten [8][9].

Obwohl die therapiebedingte Mortalität in den letzten drei Jahrzehnten stetig zurückgegangen ist, bleibt die alloHSZT ein nebenwirkungsreiches Verfahren. Die 2-Jahres-Überlebensrate wird zur Zeit als knapp über 50 % geschätzt [10]. Besonders in

den ersten zwölf Monaten nach einer Transplantation sorgen Infektionen, Organversagen und Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD, engl. *Graft-versus-host-disease*) für eine hohe Mortalitätsrate [11]. Die drei genannten Entitäten verstärken sich gegenseitig und führen zu häufig letalen Krankheitsbildern wie respiratorischem Versagen, septischem Schock oder Nierenversagen [12].

1.2 Immunrekonstitution und Infektionen nach der alloHSZT

Infektiöse Komplikationen sind neben Rezidiv und GvHD die Hauptmortalitätsursache nach erfolgter alloHSZT. Ihre Schwere und das Erregerspektrum hängen von der Dynamik der Immunrekonstitution ab. Die Störung der Barrierefunktion der Mukosa kann, bedingt durch die Toxizität der Konditionierungstherapie und eine ausgeprägte Granulozytopenie, in den ersten 15 bis 45 Tagen schwere Infektionen begünstigen – zum Erregerspektrum zählen hier bakterielle Keime (Staphylokokken, Enterokokken, gramnegative Keime aus dem Gastrointestinal-Trakt und *Clostridium difficile*), ebenso wie Viren (Herpes-Simplex-Virus (HSV), Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) sowie Viren aus dem Gastrointestinal-Trakt) und Pilze (*Candida* spp.) [13]. Dabei entstehen klinische Krankheitsbilder wie Bakteriämie/Sepsis, Pneumonie, Oropharyngitis, Sinusitis, Proktitis und Zellulitis [14]. Zelluläre Akteure des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen normalisieren sich zahlenmäßig im peripheren Blut in den ersten drei Monaten [15]. Die quantitative und funktionelle Rekonstitution der T- und B-Lymphozyten geschieht hingegen langsamer und ihr Verlauf kann durch GvHD wesentlich verzögert werden [16]. Die Zahl der CD8⁺ T-Lymphozyten kann das beim gesunden Menschen übliche Niveau nach einem halben Jahr erreichen. Die CD4⁺ T-Lymphozyten bleiben jedoch auch nach einem Jahr bei den meisten Patienten vermindert. Dieser Mangel kann über Jahre andauern [13]. Der anfängliche Anstieg der T-Lymphozyten im ersten halben Jahr beruht mehrheitlich auf der Proliferation von CD8⁺ T-Lymphozyten und in einem geringeren Umfang auf den CD4⁺CD45RO⁺ T-Lymphozyten vom Spender, die mit den Stammzellen transferiert wurden [15]. Naive CD4⁺CD45RA⁺ T-Lymphozyten werden im Thymus *de novo* synthetisiert [17], ihre Rekonstitution nach der alloHSZT hängt also im Wesentlichen vom Zustand des Thymus ab [18]. Die *de novo* Synthese der T-Lymphozyten im Thymus sorgt für das variable Repertoire der T-Zell-Rezeptoren und ist deshalb wichtig für den Wiederaufbau des adaptiven Immunsystems. Der

Rekonstitutionsverlauf des B-Lymphozyten-Kompartiments ist vergleichbar mit dem ontogenen Verlauf bei Kindern [19][20]. Die Zahl der gesamten B-Lymphozyten erreicht bei den meisten stammzelltransplantierten Patienten zwischen dem dritten und sechsten Monat das Niveau eines Gesunden; dabei überwiegt jedoch der Anteil der Antigen-unerfahrenen naiven Zellen aus dem Knochenmark [21][22]. Die Antigen-erfahrenen Gedächtnis-B-Lymphozyten regenerieren sich in den ersten zwei Jahren in ihrer Zahl kaum [21].

Nach erfolgreichem Einnisten der Spenderstammzellen im Empfängerknochenmark und einer aktiven Spender-Granulopoese (definiert als Nachweis von über 500/ μ l neutrophilen Granulozyten an drei aufeinanderfolgenden Tagen, dies wird im Normalfall zwischen Tag 10 und 25 erreicht) häufen sich ab dem zweiten Monat nach der alloHSZT infektiöse Komplikationen. Diese spiegeln die Funktionsschwäche des adaptiven Immunsystems wider. Typisch sind hierfür Cytomegalie (CMV)-, Epstein-Barr- und Varizella-Zoster-Virus (VZV)-Reaktivierungen, Infektionen mit bekapselten Bakterien (Pneumokokken, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae*) sowie invasive Aspergillosen und *Pneumocystis jirovecii*-Infektionen [13]. Die häufigste klinische Manifestation ist die Pneumonie. Es kann jedoch jedes Organsystem betroffen sein, beispielsweise durch Infektionen wie Enzephalitis, Enterokolitis, hämorrhagische Zystitis oder infektiöse Hautläsionen [14]. Eine Sonderform der infektiösen Komplikation ist die lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (PTLD, engl. *Post transplant lymphoproliferative disease*), dem als Pathomechanismus die Epstein-Barr-Virus-getriggerte Proliferation bis hin zur malignen Entartung der B-Zellen auf dem Hintergrund der therapieassoziierten Immunsuppression zugrunde liegt [23]. Eine engmaschige Infektionsdiagnostik und prophylaktische antimikrobielle Therapien, z. B. mit Aciclovir, Levofloxacin, Voriconazol und Cotrimoxazol, sind elementare Bausteine der posttransplantativen Therapie. Die Wahl der einzelnen Substanzen und die Länge ihrer Gabe richten sich nach den klinischen Situationen und dem Risikoprofil des Patienten.

Wenn Patienten nach der alloHSZT nicht gegen Tetanus, Pneumokokken, Masern, Mumps und Röteln revakziniert werden, verschwindet der vor der alloHSZT vorhandene humorale Schutz innerhalb der ersten Jahre [24][25]. Dementsprechend wird empfohlen, alloHSZT-Patienten zu revakzinieren [26]. Es fehlt jedoch noch an prospektiven Studien, die die Impfantworten nach der alloHSZT systematisch untersuchen.

1.3 B-Lymphozyt

Das angeborene Immunsystem besteht aus bestimmten Immunzellen und Komplementfaktoren, deren funktionales Repertoire genetisch festgelegt vorliegt und im Lebensverlauf eines Organismus unveränderbar ist. Das adaptive Immunsystem hingegen ist in der Lage, maßgeschneiderte Abwehrmechanismen gegen spezifische Erreger zu entwickeln. Dieser funktionelle Unterschied spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass die Entwicklungslinien der zellulären Komponente des angeborenen und adaptiven Immunsystems direkt nach dem Stadium der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle jeweils in die myeloische und lymphoide Reihe abzweigen. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Lymphozyten). Dabei verlaufen ihre Entwicklungsschritte ortsgebunden, zuerst in den zentralen (Knochenmark und zusätzlich Thymus bei T-Lymphozyten) und in der Folge in den peripheren lymphoiden Geweben (Lymphknoten und Milz). Der örtlich und chronologisch geordnete Reifungsprozess der Lymphozyten ist eine wichtige Voraussetzung für deren Selektion und Funktionstüchtigkeit bei den Immunantworten sowie im Hinblick auf die Vermeidung von Autoreaktivität.

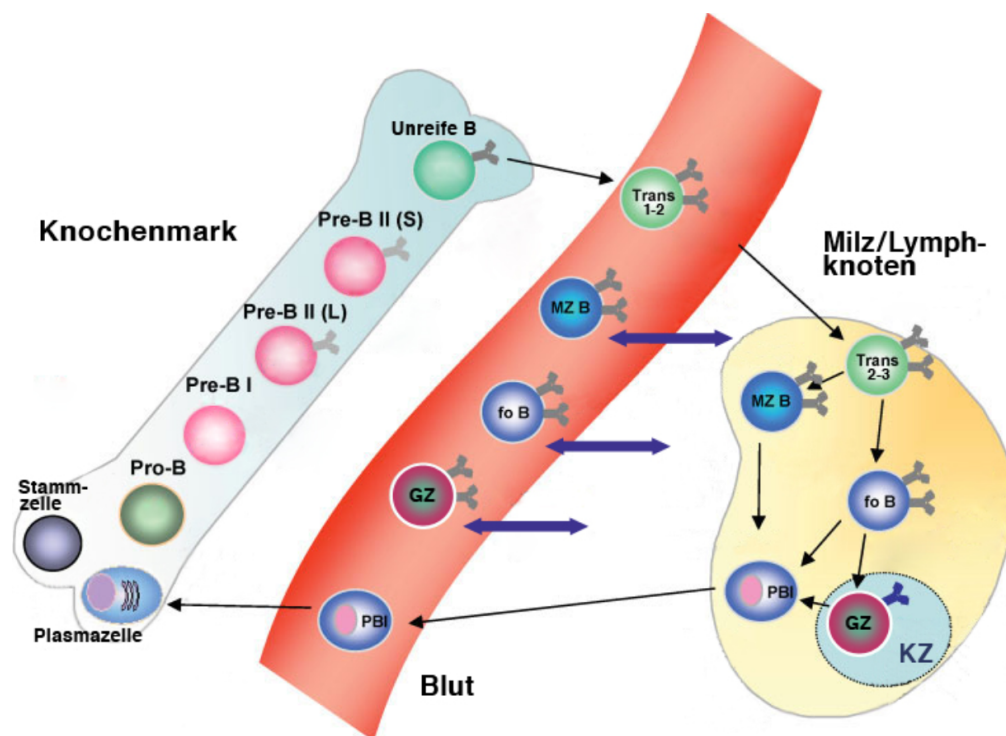


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien

Die Vorläuferzellen für B-Lymphozyten durchlaufen erste Entwicklungsschritte im Knochenmark, bevor sie als transitionale B-Zellen (Trans 1-2) in die Peripherie ausgeschwemmt werden. Die transitionalen B-Zellen reifen in der Milz zu naiven B-Zellen, die zwei Populationen enthalten: Follikuläre B-Zellen (fo B) und Marginalzone-B-Zellen (MZ B). Sie zirkulieren zwischen sekundären Lymphorganen und dem Blut auf der Suche nach eventuellem Antigenkontakt (violette Pfeilen). Wenn follikuläre naive B-Zellen auf ein Antigen treffen, entstehen im Keimzentrum (KZ) der sekundären Lymphorgane die Gedächtnis-B-Zellen (GZ). Diese reifen nach einem kurzzeitigen Plasmablast-Stadium in Antikörper-sezernierende Plasmazellen aus. Die Marginalzone-B-Zellen können bei einem Kontakt mit Thymus-unabhängigen Antigenen ohne T-Zell-Hilfe außerhalb des Keimzentrums zu Plasmablasten differenzieren. GZ zirkulieren wie naive B-Zellen ebenso in der Peripherie. Ausdifferenzierte Plasmazellen lassen sich im Knochenmark nieder und produzieren jahrelang hochaffine Antikörper. Verändert nach Warnatz et al. 2008 [27].

1.3.1 Entwicklung der B-Zellen

Die B-Lymphozyten (B-Zellen) sind Effektorzellen des spezifischen humoralen Immunsystems. Die spezielle Umgebung der Knochenmarknische stellt die notwendigen Signale für die Differenzierung und Proliferation von B-Zellen dar, und zwar in Form von Zytokinen, Chemokinen und Zell-Zell-Kontakten mit Stromazellen [28]. In dem ersten B-Zell-definitiven Reifungsschritt, dem Pro-B-Zell-Stadium, werden zuerst die DNA-Abschnitte für die schwere Immunglobulinkette zusammengefügt (VDJ-Rekombination). In der Folge wird auf der Zelloberfläche der vorläufige B-Zell-Antigen-Rezeptor (BZR) exprimiert; dies ist das Merkmal für das Prä-B-Zell-Stadium [29]. In einer Prä-B-Zelle werden dann DNA-Abschnitte für die leichte Immunglobulinkette zusammengelagert (VJ-Rekombination), die dann mit der schweren Immunglobulinkette den endgültigen BZR der Klasse IgM bildet und auf die Oberfläche erscheint. Die kombinatorische Vielfalt der V(D)J-Rekombination (auch somatische Rekombination genannt) sorgt für eine nahezu endlose Diversität der Antigen-spezifität des BZR. In jedem Stadium der B-Zell-Reifung führt der schrittweise Zusammenbau des funktionstüchtigen BZR zu einem Proliferationssignal, so dass diese Zellen positiv selektioniert werden [29]. Reagieren diese zu stark auf körpereigene Antigene, die von den im Knochenmark ansässigen dendritischen Zellen über die MHC-Moleküle präsentiert werden, münden sie in die Apoptose oder in die Anergie im Sinne einer negativen Selektion [30]. Die positiv selektionierten unreifen B-Zellen dagegen verlassen das Knochenmark in das periphere Blut.

Verschiedene Subgruppen der im peripheren Blut zirkulierenden B-Zellen können mithilfe ihrer Oberflächenproteine nach dem CD (engl. *cluster of differentiation*)-System

und über die membranständigen Immunglobuline eingeteilt werden. B-Zellen in allen Entwicklungsstadien zwischen der Pro-B-Zelle und der Plasmazelle exprimieren CD19. Durch diesen Marker lassen sich sämtliche im Blut vorhandene B-Zellen durchflusszytometrisch erfassen. $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD24}^{++}\text{CD38}^{++}$ transitionale B-Zellen sind die Gruppe der aus dem Knochenmark neu entstandenen Zellen [22][31]. Sie gelangen über die periphere Blutzirkulation in die Milz. Dort werden sie erneut auf die Autoreaktivität geprüft und reifen zu $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD24}^+\text{CD38}^+$ naiven B-Zellen heran, so dass sie bei einem Antigenkontakt aktiviert werden. Für diesen Reifungsschritt von transitionalen zu naiven B-Zellen und das Überleben dieser beiden B-Zell-Subpopulationen ist unter anderem ein B-Zell-Aktivierungsfaktor (BAFF, engl. *B cell activating factor*) notwendig. Der Aktivierungsfaktor bindet sich an den BAFF-Rezeptoren (BAFF-R) der B-Zellen an und induziert in ihnen ein antiapoptotisches transkriptionales Programm [32]. Das Zusammenwirken des tonischen BZR-Signals und der BAFF-R-Aktivierung lassen die transitionalen B-Zellen zu unterschiedlichen Folgestadien reifen. Dabei wird angenommen, dass dies bei einem starken BZR-Signal zu folliculären B-Zellen führt, die beim Antigenkontakt in die Follikel wandern und an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen. Bei einem niedrigen BZR-Signal reifen sie dagegen zu Marginalzone-B-Zellen [33]. Follikuläre naive B-Zellen (im Weiteren als naive B-Zellen bezeichnet) zirkulieren von einem zum nächsten sekundären Lymphorgan. Bei Kontakt mit dem passenden Antigen werden sie aktiviert und initiieren eine Keimzentrumsreaktion im Lymphfollikel. Marginalzone-B-Zellen hingegen bleiben in der Marginalzone der Milz und werden durch Pathogene aktiviert, die über die Blutzirkulation dorthin kommen [33].

Die Antigen-erfahrenen Gedächtnis-B-Zellen (GZ) exprimieren CD27 [34]. Sämtliche CD27 positive B-Zellen sind somatisch hypermutiert, was eine Antigen-Aktivierung und Affinitätsreifung in der Keimzentrumsreaktion voraussetzt. Beim Erwachsenen entsprechen ungefähr 30 % der im Blut zirkulierenden B-Zellen CD27^+ GZ und 65 % $\text{IgD}^+\text{CD27}^-$ naiven, Antigen-unerfahrenen B-Zellen. Hingegen sind bei einem 5-jährigen Kind im peripheren Blut ca. 12 % CD27^+ GZ und 80 % naive B-Zellen [20]. Unter der CD27^+ Gedächtnispopulation kommt der IgD^+IgM^+ Subpopulation eine besondere Stellung zu. Über den Ursprung und die funktionale Eigenschaft dieser B-Zell-Subpopulation besteht nach derzeitigem Forschungsstand noch Uneinigkeit. Vergleichende genetische Analysen lassen sie als zirkulierendes Pendant der Marginalzone-B-Zellen in der Milz einordnen (deshalb „Marginalzone(MZ)-ähnlich“

genannt) [35]. Obwohl die MZ in Mäusen überwiegend aus naiven Antigen-unerfahrenen B-Zellen besteht, machen somatisch hypermutierte und den Gedächtnis-B-Zellmarker CD27 tragende B-Zellen den überwiegenden Teil der menschlichen Milz-MZ aus [36]. Die MZ liegt an der Grenze zwischen weißer und roter Pulpa. Das durch den Milzhilus eintretende Blut kann durch die MZ frei fließen. Die weiße Pulpa ist im Gegensatz dazu von der Blutbahn weitgehend abgekoppelt [37]. Die in der MZ der Milz ansässigen MZ-B-Zellen werden somit primär durch im Blut zirkulierende Pathogene aktiviert. Sie verlassen anders als die IgD⁻CD27⁺ klassischen GZ wesentlich früher die Keimzentrumsreaktion und differenzieren sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen [38]. Dies wird durch spezielle Neutrophile ermöglicht, die beim Kontakt mit einem Thymus-unabhängigen (TI, engl. *thymus independent*)-Antigen ansässige B-Zellen schnell zu Plasmazellen aktivieren [39]. Zudem besteht eine hohe Reaktionsbereitschaft der MZ-B-Zellen für den TLR (engl. *toll-like-receptor*)-Signalweg durch mikrobielle Substanzen, die bei anderen naiven B-Zellen nicht beobachtet wird [40]. Das Vorhandensein von MZ-ähnlichen B-Zellen bei Patienten mit Defektmutation des CD40L-Gens, die in einer Unfähigkeit der Bildung von Keimzentrum und IgD⁻CD27⁺ GZ resultiert, und ihr funktioneller Schwerpunkt in TI-Antigenen lassen nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft annehmen, dass diese auch außerhalb der Keimzentrumsreaktion entstehen können. Somit stellt die von dieser B-Zell-Subpopulation bewohnte Milznische ein eigenständiges funktionelles Kompartiment dar [36]. Beim Menschen sind die MZ-ähnlichen B-Zellen in der Milz bisher am besten untersucht und charakterisiert. Sie sind aber auch in anderen sekundären lymphoiden Organen, beispielsweise in den Lymphknoten und Peyer-Plaques, vorhanden [41]. Neben den IgD⁻CD27⁺ klassischen Isotyp-gewechselten (Isotyp-gew.) GZ und den IgD⁺IgM⁺CD27⁺ MZ-ähnlichen B-Zellen lässt sich eine dritte IgD⁻CD27⁻ doppelt negative (DN) B-Zell-Subpopulation abgrenzen. Aufgrund ihrer IgG-Expression und geringer somatischer Hypermutationen werden sie auch als eine Gedächtnispopulation betrachtet, die jedoch keine Keimzentrumsreaktion durchlaufen, sondern diese verfrüht verlassen hat [42]. Ihr übermäßiges Vorhandensein in Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis [43] und systemischem Lupus erythematoses [42] lässt eine pathogenetische Rolle der DN B-Zellen für die Autoimmunität schlussfolgern. Plasmablasten, die entweder aus der Keimzentrumsreaktion hervorgehen oder außerhalb von dieser gegen TI-Antigene generiert werden, regulieren die Expressionen von CD19 und CD24 herunter und die von CD38 zugleich hoch [27]. Sie treten im

peripheren Blut nur vorübergehend auf und sterben dort entweder innerhalb von wenigen Tagen ab oder wandern nach terminaler Differenzierung in Plasmazellen zurück in das Knochenmark, wo sie über lange Zeit persistieren können [44].

Die GZ befinden sich im Ruhezustand ohne Zellteilung oder Antikörpersekretion ohne Antigenstimulation. Beim erneuten Antigenkontakt differenzieren sie entweder direkt in Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder durchlaufen erneut eine Keimzentrumsreaktion. Dabei geschieht die Aktivierung wesentlich schneller als bei naiven B-Zellen [45]. Dem zugrunde liegt einerseits ein BZR mit höherer Antigenaffinität, die zur vermehrten Antigenaufnahme und stärkeren Aktivierung des BZR-Signalweges führt. Andererseits herrscht in den GZ ein verändertes intrazelluläres Milieu an proliferativen Transkriptionsfaktoren als in den Antigen-unerfahrenen naiven B-Zellen [46].

1.3.2 Vorgänge in der Keimzentrumsreaktion

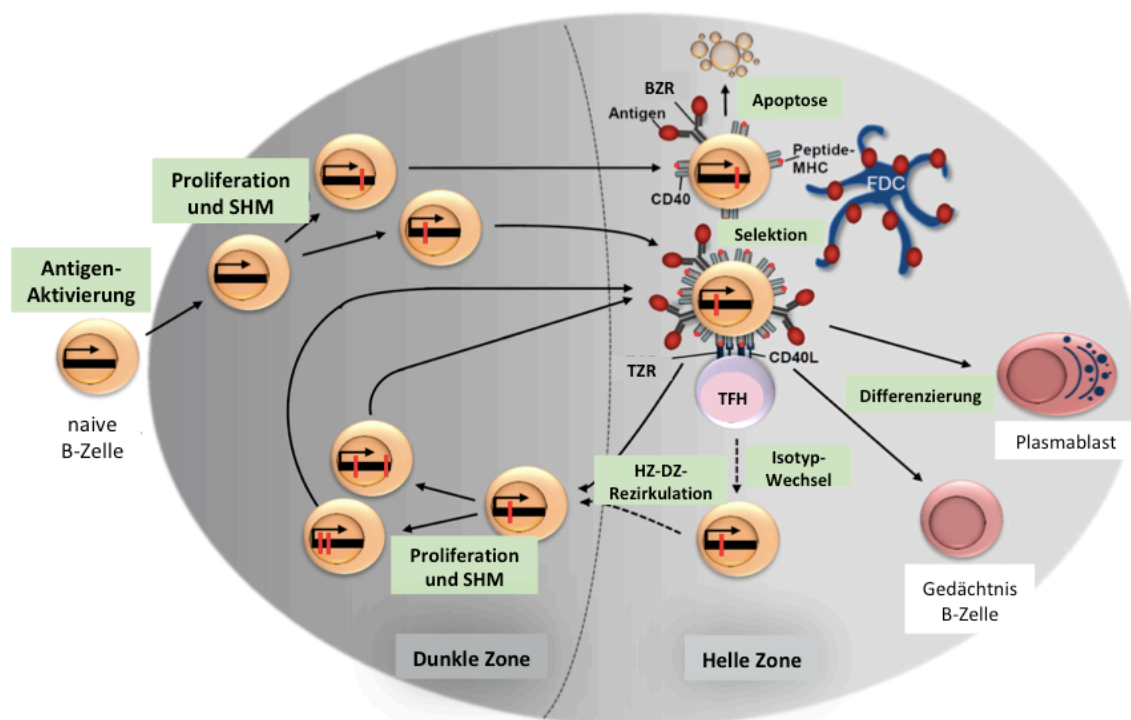


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Vorgänge im Keimzentrum

Die Keimzentrumsreaktion wird mit Eintritt von Antigen-aktivierten naiven B-Zellen in die Lymphfollikel initiiert. Sie beginnen unter Einschaltung der zellulären Programme für somatische Hypermutationen (SHM) und Immunglobulin-Klassenwechsel zu proliferieren. Nach vier bis sieben Tagen bilden sich zwei histologisch unterscheidbare Zonen aus. In der dunklen Zone befinden sich Blasten-ähnliche mitotisch

aktive B-Zellen und in der hellen Zone B-Zellen, folliculäre T-Helferzellen (FTH) und folliculäre dendritische Zellen (FDC). B-Zellen in der hellen Zone phagozytieren Antigene (große rote Punkte), die von den FDC auf ihren Fortsätzen aufgehalten werden und präsentieren sie auf den MHC-II-Molekülen (kleine rote Punkte). Dabei bekommen B-Zellen mit höherer Antigenaffinität ihres B-Zell-Rezeptors (BZR) und in der Folge mit höherer Dichte an den Peptid-MHC-II-Molekülen mehr proliferatives Signal von den FTH in Form von CD40-Ligand (CD40L) und Zytokinen. Wiederholte Rezirkulation zwischen zwei Zonen fördert die Affinitätsreifung der BZR durch Mutation (rote Balken) und Selektion und generiert Isotyp-gew. Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten. Beim Auftreten der Mutanten mit geringer Antigenaffinität oder sogar fehlerhafter Struktur des BZR gehen die B-Zellen aufgrund des Verlustes des BZR-Signalweges und fehlender T-Zell-Hilfe in Apoptose. Verändert nach De Silva und Klein 2015 [47].

Das gemeinsame Merkmal der sekundären lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe ist das Vorhandensein von Lymphfollikeln, einer Ansammlung von reifen B-Zellen. Follikel sind umgeben von einem T-Zell-reichen Areal. In der Mikroarchitektur des sekundären Lymphgewebes spielt sich die adaptive Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen in einer Reihe räumlich und zeitlich geordneter Vorgänge in verschiedenen Zelltypen ab, deren Migrationsverhalten per Chemotaxis beeinflusst wird. Wenn über afferente Lymphe ein Antigen in die subkapsuläre Zone eines Lymphknotens oder über das Blut in die MZ einer Milz transportiert wird, wird es durch dortige Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder B-Zellen in das Follikelinnere transportiert [48][49]. Das so in den Follikel gelangte Antigen wird an die folliculären dendritischen Zellen (FDC, engl. *follicular dendritic cells*) weitergegeben. Auf deren weitreichenden Fortsätzen werden sie entweder frei oder in Form von Immunkomplexen, gebunden an den durch die Immunantwort generierten Antikörper, präsentiert. Die FDC produzieren CXCL13, den Liganden für den Chemokinrezeptor CXCR5. So werden CXCR5⁺ naive B-Zellen entlang des CXCL13-Konzentrationsgefälles vom Follikelinneren angezogen [50]. Wenn das Antigen an einen passenden BZR bindet, erhöht die dadurch aktivierte B-Zelle ihre Expression des Chemokinrezeptors CCR7 und wandert an die Grenze zur T-Zell-Zone, in der die Liganden für CCR7 (CCL19 und CCL21) in höherer Konzentration vorliegen [51]. Aktivierte B-Zellen gehen dann einen prolongierten Zell-Zell-Kontakt mit passenden T-Zellen der gleichen Antigen-spezifität ein und proliferieren. Diese T-Zellen wurden ihrerseits zuvor von den dendritischen Zellen aktiviert [52]. Bei dieser frühen Proliferation der B-Zellen, die in den Marksträngen eines Lymphknotens oder in der roten Pulpa einer Milz stattfindet, entstehen nach wenigen Tagen Plasmazellen, jedoch mit geringer Rate an somatischer Hypermutation und somit niedriger

Antigenaffinität [53]. Ein Teil der proliferierten B-Zellen wandert in den Follikel zurück und beginnt sich im Netzwerk von den FDC zu teilen [52]. Gleichzeitig wandern Antigen-spezifische T-Zellen aus der interfollikulären Zone auch in den Follikel, indem sie den Chemokinrezeptor CXCR5 auf ihrer Oberfläche hochregulieren [54]. Etwa vier Tage nach der Antigen-Aktivierung lässt sich das proliferierende Keimzentrum histologisch nachweisen und nach sieben Tagen imponiert das Keimzentrum mit zwei histomorphologisch deutlich differenzierbaren Zonen [55]. Die der T-Zell-Zone zugewandte dunkle Zone (DZ) enthält eine homogene Gruppe mitotisch aktiver B-Zellen mit hoher Kern-Plasma-Ratio (sog. Zentroblasten). Im Gegensatz dazu besteht die der Lymphknoten-Kapsel oder der MZ der Milz zugewandte helle Zone (HZ) aus heterogenen Zellentitäten wie B-Zellen (sog. Zentrozyten), FDC und follikulären T-Helferzellen (FTH) [55]. Die HZ ist assoziiert mit einem Genexpressionsmuster für die Apoptose und Anergie, die dunkle Zone dagegen für den aktivierten Zellzyklus und die Gen-Modifizierung [56]. Das charakteristische Merkmal der DZ ist die Enzymaktivität der Aktivierung-induzierten Deaminase, die bei jeder Zellteilung in der genomischen Einzelstrang-DNA die Cytidinreste in Uridinreste hydrolysiert und somit Punktmutationen in der variablen Region des Immunglobulin-Gens einbaut [57]. Dieser somatische Hypermutationsprozess ist der Mechanismus für die Affinitätsreifung des BZR bzw. des Antikörpers. Die somatisch mutierten und klonal expandierten B-Zellen der DZ wandern in die HZ, in der sie über die Stimulation von T-Helferzellen positiv selektioniert werden. B-Zellen mit hoch-affinem BZR können mehr Antigene phagozytieren und diese auf ihren MHC-II-Molekülen präsentieren. Die T-Helferzellen polarisieren sich in Richtung der Antigen-präsentierenden Zellen mit höherer MHC-II-Dichte und gehen einen längeren Kontakt über den T-Zell-Rezeptor ein [58]. Die Interaktion zwischen Antigen-erfahrenen B- und T-Zellen wird vermittelt durch den CD40-Rezeptor auf der B-Zelle und CD40-Ligand (CD40L) auf der T-Zelle im Sinne einer positiven Rückkopplung [59]: CD40L bindet an CD40 der B-Zellen und induziert ihre Proliferation und Differenzierung in GZ oder Plasmablasten. Die Bindung von CD40 an CD40L auf T-Zellen bewirkt wiederum die T-Zell-Proliferation und eine Ausschüttung von IL-4 (Interleukin-4) und IL-21 (Interleukin-21), die ihrerseits zur B-Zell-Proliferation und Ausdifferenzierung führen [60]. Die B-Zellen in der Keimzentrumsreaktion wandern repetitiv zwischen der DZ (Ort der somatischen Hypermutation und Zellteilung) und HZ (Ort der klonalen Selektion) [61]. Da bei jeder Runde der Zirkulation zwischen den zwei Zonen antigenaffine B-Zellen positiv selektiert werden und proliferieren, dominieren sie

im späteren Verlauf der Keimzentrumsreaktion als Hauptzellpopulation. Durch die somatische Hypermutation entstehen auch funktionsuntüchtige und sogar autoreaktive B-Zellen. Solche B-Zellen können jedoch aufgrund der fehlenden T-Zell-Hilfe durch die FTH der gleichen Antigen-Spezifität nicht proliferieren. Die Beobachtung, dass die Ausschaltung von Fas-FasL-Interaktionen vermehrt nicht Antigen-spezifische und autoreaktive B-Zellen aus der Keimzentrumsreaktion hervorbringt, weist darauf hin, dass die Fas-vermittelte Apoptose einen entscheidenden Kontrollmechanismus über die Keimzentrumsreaktion ausübt [62]. Rothstein et al. postuliert, dass die Kombination vom apoptotischen Fas- und antiapoptotischen BZR- und CD40-Signal über das Schicksal der aktivierten B-Zellen in der Keimzentrumsreaktion entscheidet: Eine überschwellige BZR-Signalintensität und ein CD40L-Stimulus machen die Antigen-spezifischen B-Zellen gegen eine Fas-vermittelten Apoptose resistent, wohingegen die autoreaktiven oder nicht brauchbaren B-Zellen aufgrund des Mangels an BZR- und CD40-Signalen Fas-vermittelt zur Apoptose führen [63].

Die Keimzentrumsreaktion bringt zwei funktionelle B-Zell-Subpopulationen hervor: CD27⁺ GZ und Plasmablasten. CD24^{+/-}CD38⁺ Plasmablasten teilen sich mehrfach und differenzieren sich zu Plasmazellen, die ins Knochenmark wandern. Dort können sie über Jahre verweilen und Antikörper produzieren. Welche Faktoren während der Keimzentrumsreaktion die Differenzierungspfade für die beteiligten B-Zellen determinieren, ist noch Gegenstand der Forschung. Postuliert wird, dass die GZ variabler Antigenaffinitätsgrade früh in der Keimzentrumsreaktion entstehen und die B-Zellen mit höchster Affinität im späteren Verlauf der Keimzentrumsreaktion als Plasmablasten den Follikel verlassen und im Anschluss zu langlebigen Plasmazellen ausreifen [64].

1.4 Zielsetzung

Infektiöse Komplikationen limitieren häufig das Überleben nach einer alloHSZT. Einblicke in die zugrundeliegenden immunologischen Abläufe zu gewinnen war die Zielsetzung dieser Studie. So ist etwa der Mangel bestimmter CD27-positiver B-Zellpopulationen bekannt, die den Organismus bei wiederholtem Kontakt mit demselben Erreger durch eine schnelle Antikörperproduktion vor Infektionen schützen sollten. Die Keimzentrumsreaktion ist nach dem heutigen Stand der Wissenschaft der wesentliche

Prozess, aus dem etwa die Antigen-erfahrenen IgD^-CD27^+ Isotyp-gew. GZ und zu einem Teil auch die $IgD^+IgM^+CD27^+$ MZ-ähnlichen B-Zellen hervorgehen. Da der Ort der Keimzentrumsreaktion wie Lymphknoten oder Milz im Menschen für die Forschung *in vivo* nicht zugänglich ist, macht sich die vorliegende Arbeit zur Aufgabe, anhand der aus dem Blut gewonnenen PBMC der Patienten nach alloHSZT Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, die für eine defekte Keimzentrumsreaktion verantwortlich sein könnten. Hierzu sind drei Fragestellungen zu beantworten:

- I.) Wie verläuft die Regeneration der lymphozytären Kompartimente, der B-Zellen und der T-Zellen sowie relevanter Unterformen, nach alloHSZT quantitativ? Wie lange hält der Mangel bestimmter Zelltypen, wie etwa der Isotyp-gew. GZ, der MZ-ähnlichen B-Zellen und der T-Helferzellen, an?
- II.) Inwieweit unterscheiden sich die B-Zellen der alloHSZT-Patienten qualitativ, d. h. phänotypisch und funktional, von den B-Zellen gesunder Kontrollprobanden?
- III.) Gibt es quantitative Unterschiede im Apoptose-Verhalten von B-Zellen der alloHSZT-Patienten nach *in vitro* Stimulation (mit Nachahmung der Keimzentrumsreaktion) im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden?

2 Material

2.1 Patientenkohorte und gesunde Probanden

In diese Studie eingeschlossen wurden insgesamt 35 Patienten mit AML oder ALL, die als Therapie eine alloHSZT in der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie, Tumorimmunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin im Campus Virchow-Klinikum erhalten haben. Am Tag 180 und Tag 360 nach der jeweiligen Transplantation wurden jedem Patienten eine definierte Menge Blut (30 ml Citratblut) abgenommen. Aus diesen Proben wurden am selben Tag mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) isoliert, die entweder direkt für die durchflusszytometrische Analyse verarbeitet oder zur späteren Analyse und Zellkultivierung kryokonserviert wurden.

Die Ethikkommission der Charité bewilligte die Studie mit dem Titel „Evaluierung von Verlaufs- und Prognoseparameter der Immunrekonstruktion nach der alloHSZT. Assoziation mit Konditionierungstherapie, Infektionen und Graft-versus-Host-Erkrankung“ (EA4/128/09). Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Als gesunde Kontrollprobanden dienten zwölf Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité, alle ohne bekannte immunologische Vorerkrankungen oder Infekte zum Zeitpunkt der Studienteilnahme.

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Materialien	Hersteller
Annexin-V FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Annexin-V Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin Deutschland
CD40L	R&D System, Minneapolis, MN, USA
CpG ODNs	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Dimethylsulfoxid	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Dulbecco's PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACS tm Clean Solution	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS tm Flow Solution	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS tm Rinse Solution	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Fetales Kalbserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Flebogamma	BioTest, Dreieich, Deutschland

F(ab') ₂ -Ziege-Antihuman-IgM-Antikörper	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Propidiumiodid	Biolegend, Fell, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer

2.3 Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen

Zielantigen	Farbstoff	Klon/Spezies	Hersteller
B-Zell-Färbung			
CD3	Pacific Blue	UCHT1/Maus IgG1	BD Biosciences
CD14	Pacific Blue	HCD14/Maus IgG1	Biolegend
CD16	Pacific Blue	3G8/Maus IgG1	Biolegend
CD19	FITC	HIB19/Maus IgG1	Biolegend
CD19	V500	HIG19/Maus IgG1	BD Biosciences
CD24	PerCP-Cy5.5	ML5/Maus IgG2a	BD Biosciences
CD27	eFluor650NC	O323/Maus IgG1	eBiosciences
CD38	FITC	HB7/Maus IgG1	Biolegend
CD38	APC	HIT2/Maus IgG1	Biolegend
IgD	APC-H7	IA6-2/Maus IgG2a	BD Biosciences
T-Zell-Färbung			
CD3	eFluor650NC	OKT3/Maus IgG2a	eBiosciences
CD4	FITC	OKT/ Maus IgG2b	Biolegend
CD4	Alexa Fluor 700	SK3/ Maus IgG1	Biolegend
CD8	PE	HIT8A/ Maus IgG1	Biolegend
CXCR5	PE	51505/Maus IgG2b	R&D System
CXCR5	PE	J252D4/Maus IgG1	Biolegend
Marker			
CD86	PE-Cy7	IT2.2/Maus IgG2b	Biolegend
CD69	PE-Cy7	FN50/Maus IgG1	Biolegend
CD95 (Fas)	PE-Cy7	DX2/Maus IgG1	Biolegend
CXCR3	PE-Cy7	1C6/Maus IgG1	BD Biosciences
CXCR5	PE	51505/Maus IgG2b	R&D System
CCR7	FITC	150503/Maus IgG2a	R&D System
HLA-DR	PE	L243/Maus IgG2a	Biolegend
Isotyp-Kontrolle			
Maus IgG2b	PE-Cy7	MOPC-173	Biolegend
Maus IgG1	PE-Cy7	MOPC-21	Biolegend

Maus IgG2b	FITC	MPC-11	Biolegend
Maus IgG2b	PE	MPC-11	Biolegend

Tabelle 2: Liste der verwendeten Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörper

2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop Bx300	Will, Wetzlar, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Dometic Medical Systems, Horsingen, Luxemburg
Kühlschrank 4 °C/-20 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
LSRII Fortessa Flusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Lancing, UK
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Sterilwerkbank HERA-Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex Genie2	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad WBT12	Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellkulturinkubator	Sanyo Fisher Sales, München, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Verbrauchsmaterialien	
Citratröhrchen (10 ml) Vacutainer®	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Eppendorf Tube (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS™ Röhrchen (5 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Kryotube (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipette (3,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenplatte mit 96 Wells	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatte 6-Well-Platte Falcon®	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

3 Methoden

3.1 Isolierung von den PBMC aus dem peripheren Blut und Kryokonservierung

Um die PBMC von übrigen Blutbestandteilen zu isolieren, wurde das folgende Verfahren unter sterilen Bedingungen durchgeführt: Das Vollblut wurde im Verhältnis von 1:1 mit der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gemischt. Das Vollblut-PBS-Gemisch wurde dann vorsichtig mit einer Saugpipette in ein bereits mit 15 ml Biocoll-Lösung vorbefülltes, 50 ml fassendes Zentrifugenröhrchen (engl. *Falcon tube*) geträufelt – die beiden von Blut und Biocoll-Lösung gebildeten Flüssigkeitsschichten sollten sich dabei möglichst wenig vermischen. Das Röhrchen wurde anschließend mit 2000 Umdrehungen pro Minute (UpM) ohne Dezeleration bei Raumtemperatur (RT) für 15 Minuten (min) zentrifugiert. Aufgrund der Dichtedifferenzen ergibt sich dann eine Dreischichtung verschiedener Bestandteile: Plasma, PBMC und Erythrozyten-Biocoll-Gemisch reihen sich von oben nach unten. Die PBMC in der mittleren Etage erscheinen als ein weißer Ring (sogenannte *buffy coat*), der sich farblich gut zwischen der gelblichen Plasmaschicht und dem roten Erythrozyten-Biocoll-Gemisch hervorhebt. Dieser wurde mit einer Pasteurpipette sorgfältig abgenommen und in einen neuen 50 ml-Falcontube überführt. Den Zellen wurde bei leichtem manuellem Schütteln kontinuierlich PBS hinzugefügt, bis der Tube vollständig gefüllt war. Sodann wurde die Zellsuspension mit 1500 UpM bei RT für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das sich auf dem Boden des Gefäßes befindliche Zellpellet in 10 ml PBS-Lösung mit einer Pipette gründlich suspendiert. 5 µl der Zellsuspension wurde im Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau verdünnt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die auf diese Weise isolierten PBMC wurden entweder direkt, also *ex vivo*, nach der Immunfärbung durchflusszytometrisch analysiert oder zur späteren Analyse kryokonserviert. Zur Kryokonservierung der PBMC wurde das Zellpellet in einem 1,5 ml Einfriermedium (RPMI-1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % Dimethylsulfoxid) suspendiert und in einen Kryotube überführt. Der Kryotube wurde im Einfrierbehälter mit Isopropanol-Ummantelung (Kühlrate -1 °C/Stunde) auf -80 °C abgekühlt und danach in einem Stickstofftank gelagert.

3.2 Zellkultur

Für den Stimulationsversuch wurden die kryokonservierten PBMC im Wasserbad aufgetaut und schonend mit einer Pipette in 10 ml Kulturmedium (RPMI-1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin) suspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1500 UpM bei RT für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet wieder in 10 ml Kulturmedium suspendiert. Die Zellzahl wurde analog zum obigen Vorgehen bestimmt. Sodann wurde die Volumenmenge der 6×10^6 zellhaltigen Flüssigkeit errechnet, dieses Volumen in einen 10 ml Falcontube überführt und mit 1500 UpM bei RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der Kavität (engl. *well*) einer Mikrotiterplatte (engl. *well plate*; genutzt wurde eine 6-Well-Platte) in 2 ml RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Bei jedem Probanden/Patienten wurden damit zwei Stimulationsansätze durchgeführt:

1. 20 µg/ml F(ab')₂-Frament-Ziegen-Antihuman-IgM (α-IgM)
+ 1 µg/ml humanes rekombinantes CD40L
2. 20 µg/ml F(ab')₂-Frament-Ziegen-Antihuman-IgM (α-IgM)
+ 1 µg/ml humanes rekombinantes CD40L
+ 10 µg/ml CpG

Die jeweiligen Stimulanzen wurden direkt in die Wells pipettiert (30,4 µl α-IgM, 10 µl CD40L und 1,3 µl CpG in 2 ml Kulturmedium, sodass sich die oben genannten Endkonzentrationen ergeben). Dann erfolgte die 48-stündige Kultur im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein optokinetisches Messverfahren, in dem die Zellsuspension in Form eines dünnen Strahls fließt und dabei mit Laserlicht bestrahlt wird. Das gemessene Laserlicht wird durch die Eigenschaft der Zelle (Größe und Granularität) und die fluoreszierenden Farbstoffe, mit denen die Zellen beladen sind, unterschiedlich stark gebrochen. Vor der Messung werden die zu analysierenden

Zellen mit verschiedenen Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert, die nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung an spezifische Oberflächenproteine binden. Mittels der Durchflusszytometrie werden innerhalb kurzer Zeit die verschiedenen Zellsubpopulationen nach dem Besatz der jeweiligen Oberflächenproteine voneinander unterschieden und quantifiziert.

3.3.1 Immunfärbung der Oberflächenmarker

Nach der PBMC-Isolation aus dem Vollblut wurden *ex vivo* durchflusszytometrische Analysen zur Quantifizierung der B-Zell-/T-Zell-Subpopulationen und zur funktionellen Markerexpression durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen in einen Well einer 96-Well-Platte überführt und 15 min in 100 μ l *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Puffer (PBS + 2 % Flebogamma) im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Flebogamma ist eine humane Immunglobulinlösung und dient der Blockierung von Rezeptoren für den konstanten Teil des Immunglobulins (Fc-Rezeptoren), die auf Antigen-präsentierenden Zellen vorkommen. Somit werden unspezifische Bindungen der monoklonalen Antikörper mit ihrem Fc-Teil an die Fc-Rezeptoren verhindert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen einmal gewaschen, indem die Platte mit 1500 UpM für 2 min zentrifugiert und der Überstand durch Abkippen verworfen wurde. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 μ l Antikörperlösung (s. Tabelle 2) resuspendiert und im Dunkeln bei 4 °C 25 min inkubiert. Nach einer nochmaligen Waschung wurden die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und mit dem Durchflusszytometer Fortessa LSRII analysiert. Die Markerexpressionen (CXCR5, HLA-DR, CCR7, CD86, CXCR3 und BAFF-R) wurden mit den jeweiligen isotypischen Antikörpern und gleichen Farbstoffen negativ kontrolliert.

3.3.2 Apoptose-Färbung mit Annexin V

Zellen, die sich in der Apoptose befinden, können mit Farbstoff-konjugiertem Annexin V detektiert werden. Annexin V ist ein intrazelluläres Protein, das an Phosphatidylserine binden kann. Apoptotische Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass die ursprüngliche Asymmetrie der Zellmembran-Phospholipide verloren geht. Die im Normalzustand nur an der intrazellulären Seite der Phospholipid-Doppelmembran befindlichen

Phosphatidylserine schlagen sich auf die extrazelluläre Außenseite, an die dann Annexin V binden kann [65]. Vor und nach der *in vitro* Stimulation wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in einen Well einer 96-Well-Platte überführt und 15 min in 100 µl FACS-Puffer (PBS + 2 % Flebogamma) im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach einer Waschung wurde das Zellpellet in 100 µl Antikörpermix resuspendiert und im Dunkeln bei 4 °C für 25 min inkubiert. Nach einer weiteren Waschung wurde das Zellpellet in 95 µl Annexin-V Puffer + 5 µl Annexin-V-FITC + 0,5 µl Propidiumiodid resuspendiert und im Dunkeln bei RT für 10 min inkubiert. Sodann wurden die Zellen erneut gewaschen, in 100 µl Annexin-V-Puffer aufgenommen, in die FACS-Röhrchen überführt und umgehend im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der per Durchflusszytometrie gewonnenen Daten erfolgte unter Verwendung des Programms FlowJo Version 9.2 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

3.4 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde das Programm GraphPad Prism-v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Alle metrischen Daten wurden in Form von Scatterdotplots aufgearbeitet. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt, dabei stets vergleichend zwischen den Werten der Patientenkollektive und der gesunden Kontrollgruppe. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde für diese Untersuchung als statistisch signifikant definiert.

3.5 Erhebung klinischer Daten

Die Daten zu den klinischen Verläufen der einzelnen Patienten wurden sowohl durch Recherchen im SAP-System (elektronische Patientenakte) als auch durch Einsichtnahme in die physischen Patientenakten der Ambulanz erhoben. Von besonderer Relevanz waren dabei die Inzidenz und Art der zwischen Tag 180 und Tag 360 nach der Transplantation aufgetretenen Infektionserkrankungen sowie das Auftreten von GvHD. Zur Diagnose einer viralen Reaktivierung wurden grundsätzlich sowohl die Feststellung einer typischen klinischen Symptomatik als auch ein direkter Erregernachweis benötigt. Lediglich bei einer pathognomonischen klinischen

Symptomatik, z. B. im Falle eines Herpes zoster, wurde auf den direkten Erregernachweis verzichtet. Der histopathologische Nachweis von viruszytopathischen Veränderungen, insbesondere bei CMV-Infektionen, wurde einem laborchemischen Erregernachweis gleichgesetzt. Zur Diagnosestellung einer Sepsis wurde der in klinischer Praxis verbreiteten Definition gefolgt, wonach gleichzeitig ein Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) und ein Erregernachweis vorliegen müssen.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Charakteristika der Patientenkohorte

Charakteristika	n=35
Alter (Median: 57)	
< 50	14
≥ 50	21
Geschlecht	
weiblich	17
männlich	18
Diagnose	
AML	33
ALL	2
Spender	
Verwandter, HLA-kompatibler Spender	10
Nicht-Verwandter, HLA-kompatibler Spender	25
Chronische GvHD*	
Keine	23
Grad I bis III**	12
Konditionierungstherapie	
Myeloablative Konditionierung	8
Konditionierung mit reduzierter Intensität	27
Antithymozytenglobulin	30
Virale Reaktivierung/Infektion zwischen Tag 180 und Tag 360	
CMV	5
VZV	3
HSV	3
Pneumonie zwischen Tag 180 und Tag 360	7
Sepsis	6

Tabelle 4: Klinische Eigenschaften der Patientenkollektive

* Auftreten später als 100 Tage nach der alloHSZT

** nach National Institutes of Health-Konsens aus dem Jahr 2006 [66]

Darstellung nach Mensen et al. 2015 [67].

Insgesamt wurden 35 Patienten in diese Studie eingeschlossen, die den Tag 180 nach der alloHSZT überlebt haben. Zehn Patienten verstarben vor dem Tag 360, so dass nach einem Jahr 25 Patienten (71 %) aus der Ursprungskohorte überlebten. Das Medianalter der Patientenkohorte betrug 57 Jahre und beide Geschlechter waren mit 48,6 % (weiblich) bzw. 51,4 % (männlich) relativ gleich verteilt. 33 Patienten hatten eine AML und zwei Patienten litten an einer ALL, was die unterschiedliche Inzidenz der

beiden Erkrankungen in der Bevölkerung angesichts des hohen Medianalters der Patientenkohorte widerspiegelt. Alle Patienten unserer Kohorte wurden HLA-kompatibel transplantiert; 10 von einem verwandten und 25 von einem nicht-verwandten Spender. 12 Patienten haben eine chronische GvHD variabler Grade entwickelt. Die klinische Einteilung erfolgte nach den Kriterien gemäß dem Konsens von Martin et al. aus dem Jahr 2006 [66]. Acht Patienten erhielten eine konventionelle myeloablative Konditionierung aus Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung mit 12 Gray. Die restlichen 27 Patienten wurden mit einem Regime in reduzierter Intensität konditioniert. Ein solches Konditionierungsregime reduzierter Intensität besteht aus einer variablen Kombination aus Chemotherapeutika (wie Fludarabin, Cytosin-Arabinosid, Amsacrin und Cyclophosphamid) in reduzierter Dosierung und einer Ganzkörperbestrahlung, die ebenfalls in reduzierter Intensität durchgeführt sowie bei jedem Patienten einzeln betrachtet und ggf. angepasst wird [68]. 30 Patienten (86 %) bekamen Antithymozytenglobulin als einen Teil der Konditionierung zur Prophylaxe gegen die Transplantatabstoßung.

Zwischen Tag 180 und Tag 360 sind Infektionen mit folgender Häufigkeit aufgetreten: Virale Reaktivierungsfälle ereigneten sich insgesamt elfmal, darunter am häufigsten durch CMV (fünf Fälle), etwas seltener durch VZV und HSV (jeweils bei drei Patienten). Unter sieben aufgetretenen Pneumonie-Fällen überwogen anteilig die mykotischen Erreger: In drei Fällen wurde *Candida* spp. und in zwei Fällen *Aspergillus* spp. nachgewiesen. Jeweils einmal war das CMV und *Streptococcus pneumoniae* für Pneumonien verantwortlich. Insgesamt wurden sechs Sepsis-Fälle mit Nachweis von *Candida* spp. (2x), *Escherichia coli* (2x), *Staphylococcus aureus* (1x) bzw. *Streptococcus pneumoniae* (1x) festgestellt.

4.2 Immunrekonstitution der Lymphozyten nach der alloHSZT

Um die Dynamik der Regeneration des Lymphozyten-Kompartiments nach der alloHSZT zu untersuchen, wurden aus dem Vollblut der Patienten am Tag 180 und Tag 360 die PBMC isoliert und die jeweiligen Mengenverhältnisse per Durchflusszytometrie bestimmt. Die absolute Anzahl der jeweiligen Lymphozyten und ihrer Subpopulationen wurde mittels der Leukozytenzahl aus dem Blutbild errechnet. Die Blutbilder wurden hierzu nach den Blutentnahmen klinikintern angefertigt.

4.2.1 Immunrekonstitution des B-Zell-Kompartiments nach der alloHSZT

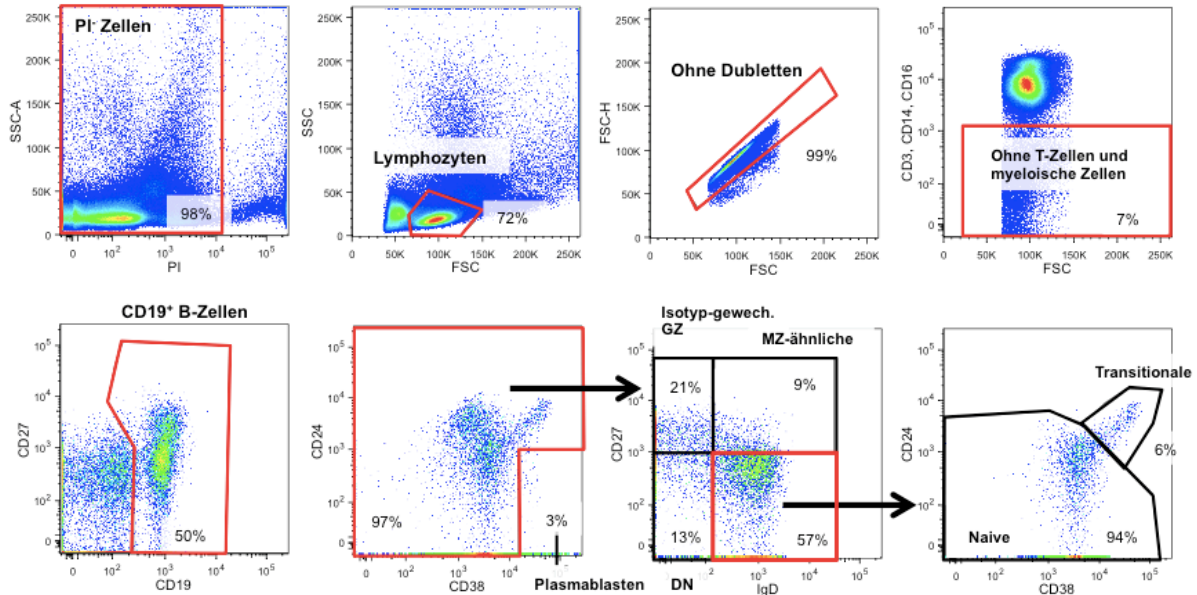


Abbildung 4.1: Erkennung der B-Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Erkennung von B-Zell-Subpopulationen und deren Quantifizierung. Die rot umrahmte Subpopulation wird jeweils im nächsten Bild weiter analysiert.

In der Abbildung 4.1 wird ein repräsentatives Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse zur Erkennung von B-Zell-Subpopulationen aufgezeigt. Zuerst wurden die Propidiumiodid(PI)-positiven Zellen herausgenommen, um nur lebende Zellen zu untersuchen. Dann wurden die Lymphozyten auf Basis ihrer Größe und Granularität ausgewählt und miteinander verklebte Zellen ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden mithilfe der Marker CD3, CD14 und CD16 die T-Zellen und die myeloischen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen herausgefiltert. Dieser Schritt war notwendig, da CD19 auch von einem kleinen Teil der myeloischen Zellen exprimiert wird. Anschließend wurden mit CD19 alle B-Zellen erfasst, die mithilfe von CD24 und CD38 in $CD24^{+/-}CD38^{++}$ Plasmablasten und übrige B-Zellen aufgeteilt wurden. Im Anschluss wurden mit IgD und CD27 $IgD^{-}CD27^{+}$ Isotyp-gew. GZ, $IgD^{+}CD27^{+}$ MZ-ähnliche B-Zellen und $IgD^{-}CD27^{-}$ DN B-Zellen quantifiziert. MZ-ähnliche B-Zellen exprimieren sowohl IgD als auch IgM auf der Oberfläche [35] – deshalb wurde diese Subpopulation in dieser Arbeit als $IgD^{+}CD27^{+}$ definiert. Die verbleibenden B-

Zellen wurden letztlich in CD24⁺⁺CD38⁺⁺ transitionale und CD24⁺CD38⁺ aufgeteilt und quantitativ erfasst.

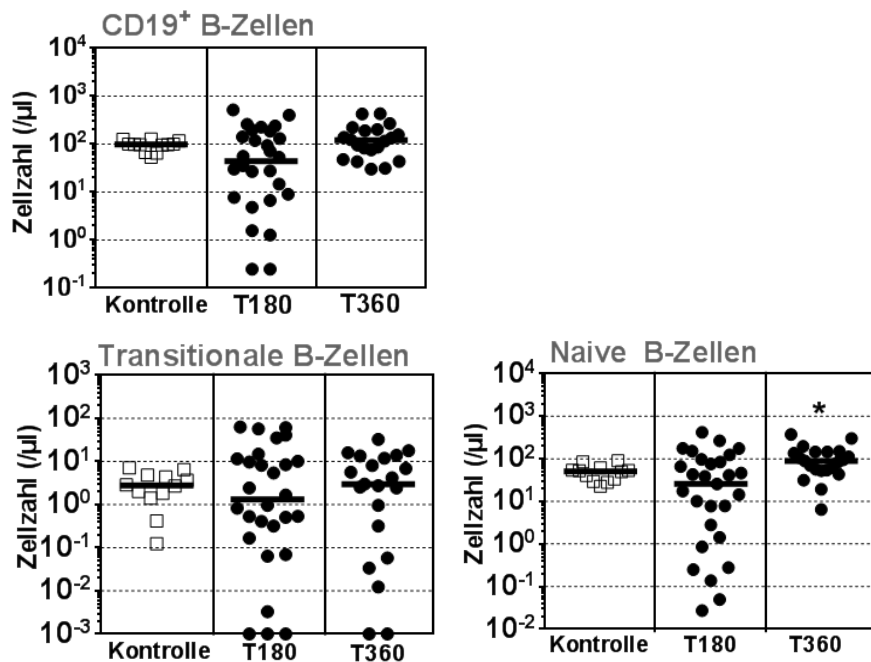


Abbildung 4.2: Anzahl der gesamten, transitionalen und naiven B-Zellen an Tag 180 und 360 nach alloHSZT

Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen pro Mikroliter Blut der gesunden Kontrollprobanden (n=12) und der Patienten am Tag 180 (n=28) und Tag 360 (n=20) nach der alloHSZT. Die Punkte geben einzelne Werte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. *p ≤ 0,05 nach Wilcoxon-Rangsummentest. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Die Zahl der CD19⁺ B-Zellen normalisierte sich ein Jahr nach der alloHSZT (Abbildung 4.2). In der Patientengruppe lagen die Mittelwerte zu beiden Zeitpunkten (Zellzahl /µl Blut ± SEM, Tag 180: 102,4 ± 25, Tag 360: 148,0 ± 26) höher als in der gesunden Kohorte (95,6 ± 6,7), jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die IgD⁺CD27⁻CD24⁺⁺CD38⁺⁺ transitionalen und IgD⁺CD27⁻CD24⁺CD38⁺ naiven B-Zellen sind in der Peripherie zirkulierende, Antigen-unerfahrene B-Zellen. Die Zahl der transitionalen B-Zellen war bei Patienten nach der alloHSZT sowohl am Tag 180 als auch am Tag 360 (Tag 180: 12,0 ± 3,8; Tag 360: 7,0 ± 1,8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (3,2 ± 2,2) statistisch nicht signifikant erhöht. Die Mittelwerte der naiven B-Zellen betragen 65,6 ± 17,9 am Tag 180 und 111,3 ± 19,8 am Tag 360. Damit lagen diese höher als bei der Kontrollgruppe mit 50,3 ± 6,2. Der Unterschied der naiven B-

Zellen am Tag 360 zwischen der Kontroll- und Patientengruppe war statistisch signifikant ($p = 0,0111$).

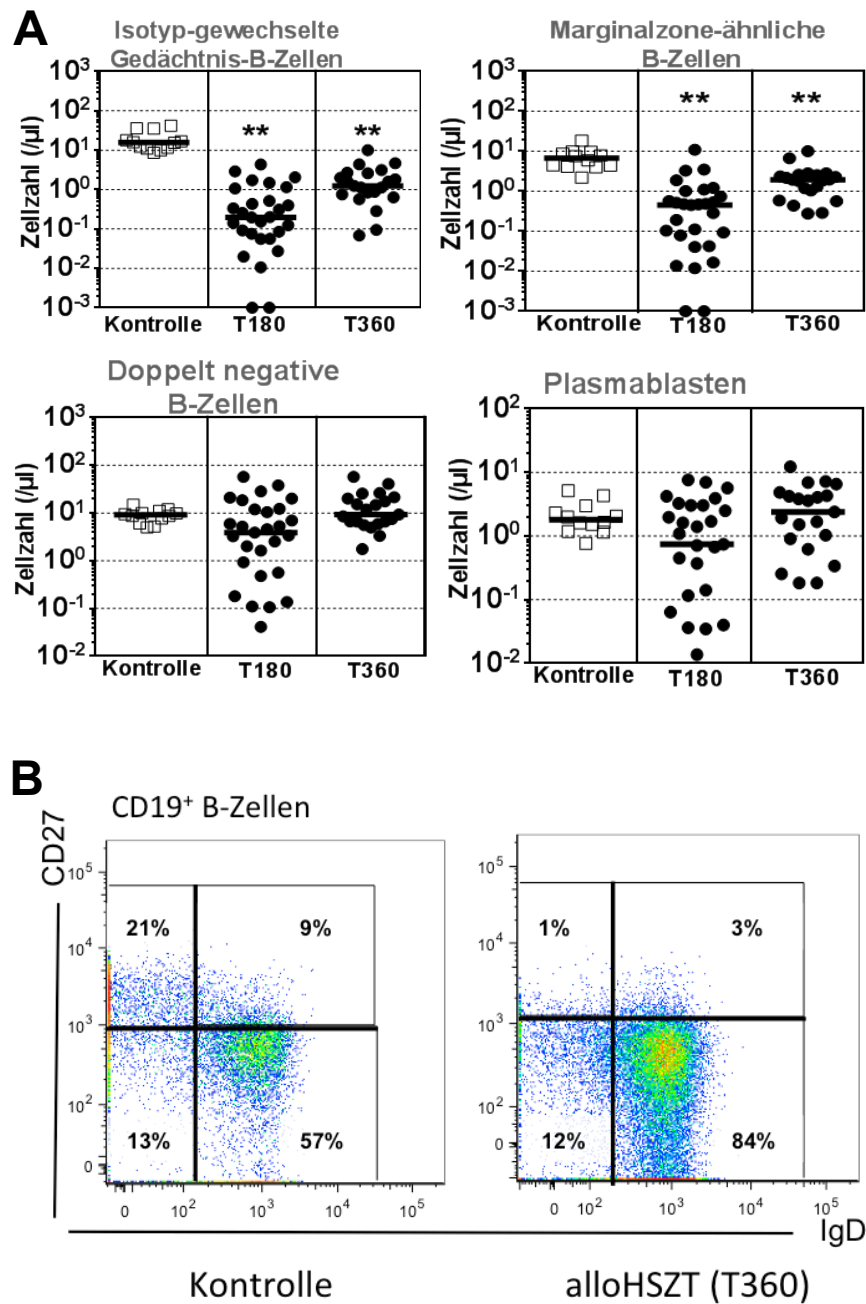


Abbildung 4.3: Anzahl der MZ-ähnlichen B-Zellen, Isotyp-gew. GZ, DN B-Zellen und Plasmablasten an Tag 180 und 360 nach alloHSZT

(A) Dargestellt sind absolute Zellzahlen der vier B-Zell-Subpopulationen der Kontrollgruppe ($n=12$) und Patientengruppe am Tag 180 ($n=28$) und Tag 360 ($n=20$). Die Punkte geben einzelne Werte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,001$ nach Wilcoxon-Rangsummentest. (B) Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Quantifizierung der B-Zell-Subpopulationen. Der Mangel an Isotyp-gew. GZ und MZ-ähnlichen B-Zellen in der Patientengruppe (die

oberen zwei Subpopulationen) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe ersichtlich. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Die Anzahl der IgD⁺CD27⁺ MZ-ähnlichen B-Zellen war zu beiden Zeitpunkten (Tag 180: $1,0 \pm 0,4$; Tag 360: $2,3 \pm 0,5$) nach der Transplantation im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($7,2 \pm 1,3$) hochsignifikant vermindert ($p < 0,0001$). Ebenso waren IgD⁻CD27⁺ Isotyp-gew. GZ zu beiden Zeitpunkten (Tag 180: $0,6 \pm 0,2$; Tag 360: $2,0 \pm 0,5$) im Vergleich zur gesunden Kohorte ($19,5 \pm 3,4$; $p < 0,0001$) in ihrer Anzahl hochsignifikant vermindert (Abbildung 4.3).

Die Anzahl der IgD⁻CD27⁻ DN B-Zellen sowie CD24⁺CD38⁺⁺ Plasmablasten waren nach einem halben Jahr nach der alloHSZT (DN: $9,1 \pm 2,5$; Plasmablasten: $1,8 \pm 0,4$) in ihren Werten vergleichbar hoch wie bei den Gesunden (DN: $9,1 \pm 0,8$; Plasmablasten: $2,2 \pm 1,3$). Am Tag 360 waren die beiden Subpopulationen im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Anzahl ohne statistisch signifikanten Unterschied leicht erhöht (DN: $15,2 \pm 3,0$; Plasmablasten $3,3 \pm 0,7$).

4.2.2 Immunrekonstitution des T-Zell-Kompartiments nach der alloHSZT

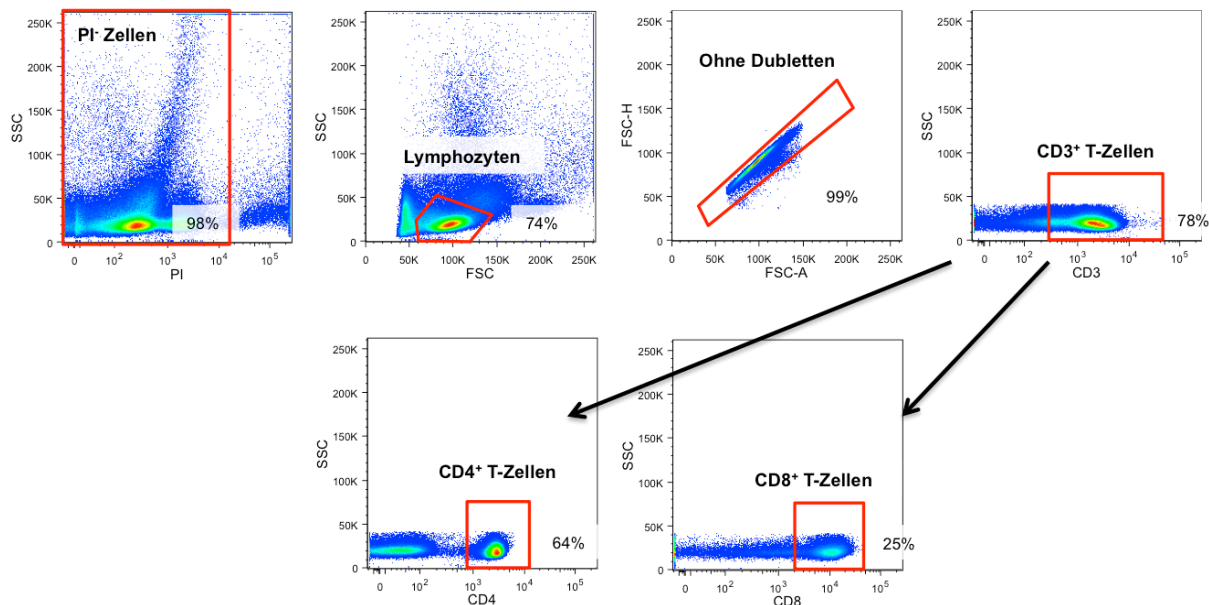


Abbildung 4.4: Erkennung der T-Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie

In dieser Abbildung wird ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Erkennung von T-Zell-Subpopulationen und deren Quantifizierung dargestellt. Die rot umrahmte Subpopulation wird jeweils im nächsten Bild weiter analysiert.

Die ersten Schritte der durchflusszytometrischen Analyse zur Erkennung von einzelnen T-Zell-Subpopulationen wurden analog zu der Analyse der B-Zell-Subpopulationen bis zum Ausschluss der verklebten Zellen durchgeführt. Anschließend wurden mit dem Marker CD3 alle T-Zellen unter PBMC erfasst und in CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen aufgeteilt (Abbildung 4.4).

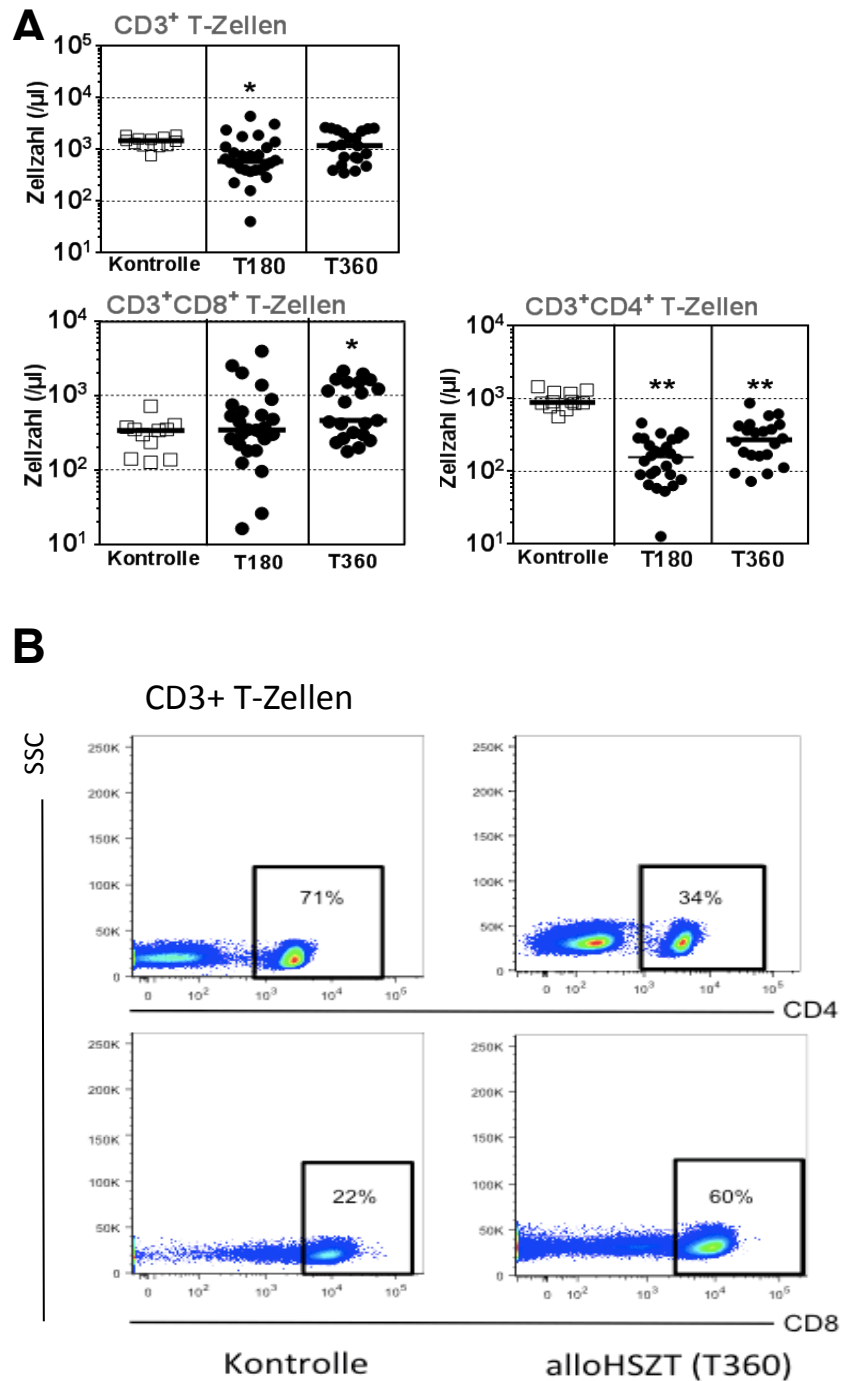


Abbildung 4.5: Anzahl der T-Zellen und ihrer Subpopulationen an Tag 180 und 360 nach alloHSZT

(A) Dargestellt sind absolute Zellzahlen pro Mikroliter Blut der gesunden Kohorte (n=12) und der Patientenkohorte am Tag 180 (n=28) und am Tag 360 (n=20) nach der alloHSZT. Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ nach Wilcoxon-Rangsummentest. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67]. (B) Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Quantifizierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen. Die Verschiebung der CD4/CD8-Ratio zu Gunsten der CD8 in der Patientengruppe ist hier ersichtlich.

Die Zahl der gesamten CD3⁺ T-Zellen war bei Patienten am Tag 180 (Zellzahl/ μ l Blut \pm SEM: $947,9 \pm 186,8$) nach der alloHSZT im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1436,0 \pm 96,3$) signifikant vermindert ($p = 0,0022$); sie erreichte jedoch am Tag 360 ($1389,0 \pm 188,0$) das Niveau der gesunden Kontrollprobanden ($p = 0,6154$) (Abbildung 4.5). Die Zahl der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen war zu beiden Zeitpunkten (Tag 180: $174,0 \pm 22,0$; Tag 360: $303,2 \pm 44,5$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($972,2 \pm 77,2$) signifikant vermindert ($p < 0,001$). Dahingegen war die Zahl der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen am Tag 180 in der Patientengruppe ($643,7 \pm 169,2$) höher als in der Kontrollgruppe ($314,3 \pm 50,0$; $p = 0,5343$) und am Tag 360 signifikant höher ($859,1 \pm 141,5$; $p = 0,0135$). Die quantitative Normalisierung der CD3⁺ T-Zellen am Tag 360 nach der alloHSZT in der Patientenkohorte ist somit beim anhaltenden Mangel an CD4⁺ Helferzellen auf die Expansion des CD8⁺-Kompartmentes zurückzuführen.

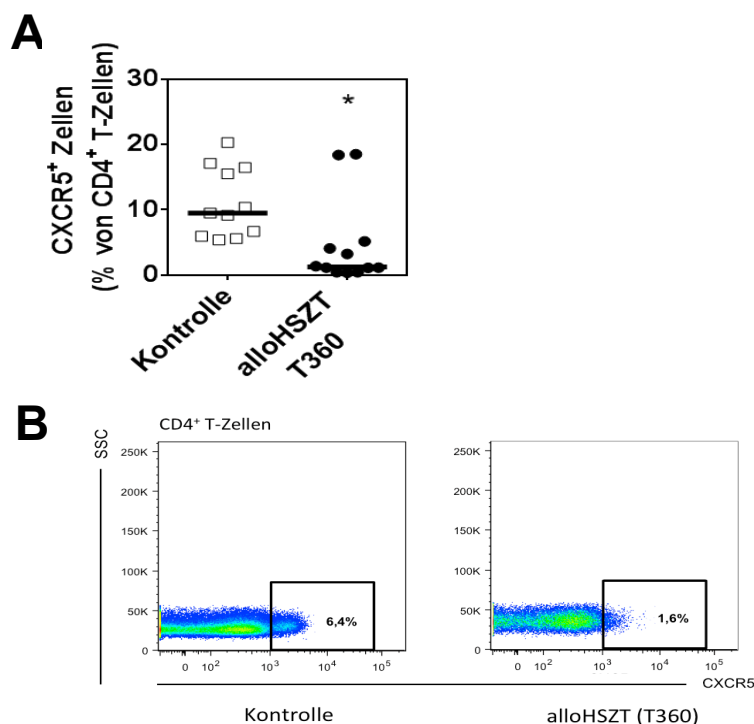


Abbildung 4.6: Verminderte Gedächtnis-FTH bei Patienten an Tag 360 nach alloHSZT

(A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD4⁺CXCR5⁺ Gedächtnis-FTH bezogen auf CD4⁺ T-Zellen im Blut für die gesunde Kontrollkohorte (n=11) und die Patientenkohorte (n=12) ein Jahr nach der alloHSZT. Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. *p ≤ 0,05 nach Wilcoxon-Rangsummentest. (B) Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Quantifizierung der CD4⁺CXCR5⁺ FTH-Zellen. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Es wird angenommen, dass die den Chemokinrezeptor CXCR5 tragenden CD4⁺ Zellen im Blut zirkulierende Gedächtnis-FTH sind [69]. Der Anteil dieser CXCR5⁺CD4⁺ T-Zellen von allen CD4⁺ T-Zellen wurde bei zuvor kryokonservierten PBMC von elf Patienten ein Jahr nach der alloHSZT untersucht (Abbildung 4.6). Sie waren in der Patientenkohorte (% ± SEM: 4,6 ± 1,9) im Vergleich zur Kontrollgruppe (11,1 ± 1,6; p = 0,0012) vermindert.

4.3 Funktionelle Phänotypisierung der B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT

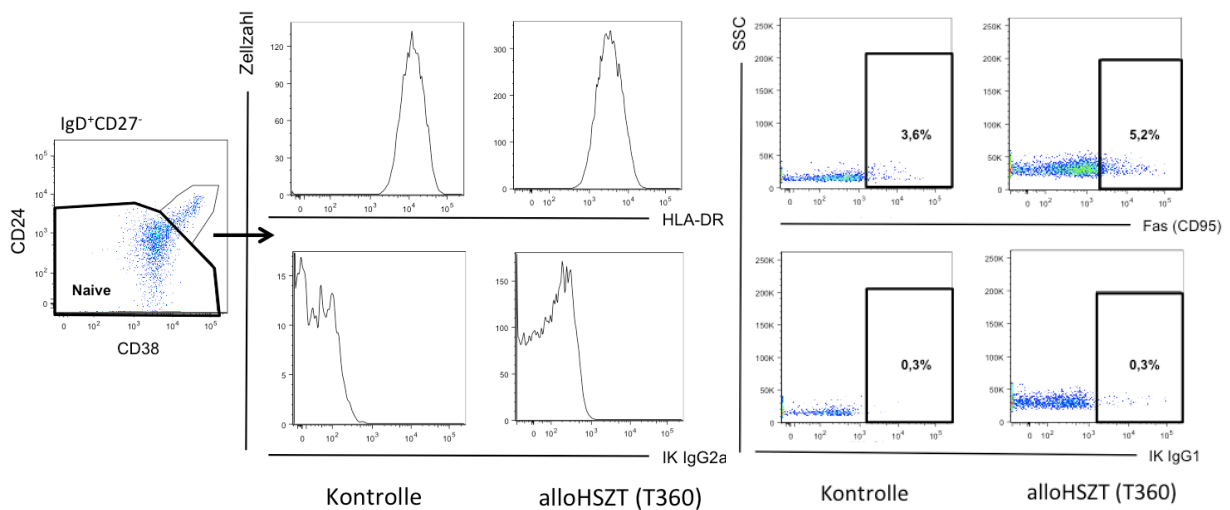


Abbildung 4.7: Durchflusszytometrische Analyse der funktionellen Oberflächenmarker auf B-Zell-Subpopulationen

Die Expression funktioneller Oberflächenproteine wurde durchflusszytometrisch quantitativ ausgewertet. Hier wird ein typisches Beispiel der Analyse von HLA-DR (Histogramm) und Fas (Zellplot) auf den naiven B-Zellen dargestellt. Die Histogramme und Dotplots der unteren Reihe zeigen die zugehörigen Isotypkontrollen.

Die Oberflächenmarker CXCR5, HLA-DR, CCR7 und BAFF-R werden von allen B-Zellen in unterschiedlicher Intensität exprimiert. Deshalb wurde bei diesen Funktionsmarkern die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) innerhalb der jeweiligen Subpopulationen bestimmt. Für die Oberflächenmarker CD86, CXCR3 und Fas wurde der Marker-positive Anteil innerhalb der Subpopulationen bestimmt.

4.3.1 CXCR5-, CCR7- und HLA-DR-Expression

Der Beginn der Keimzentrumsreaktion hängt von der Migrationsfähigkeit der naiven B-Zellen in den Lymphfollikel ab. Diese Fähigkeit wird durch den Chemokinrezeptor CXCR5 bestimmt [50]. Bei der anschließenden Migration an die Grenze zur T-Zell-Zone jedoch ist der Chemokinrezeptor CCR7 entscheidend [51].

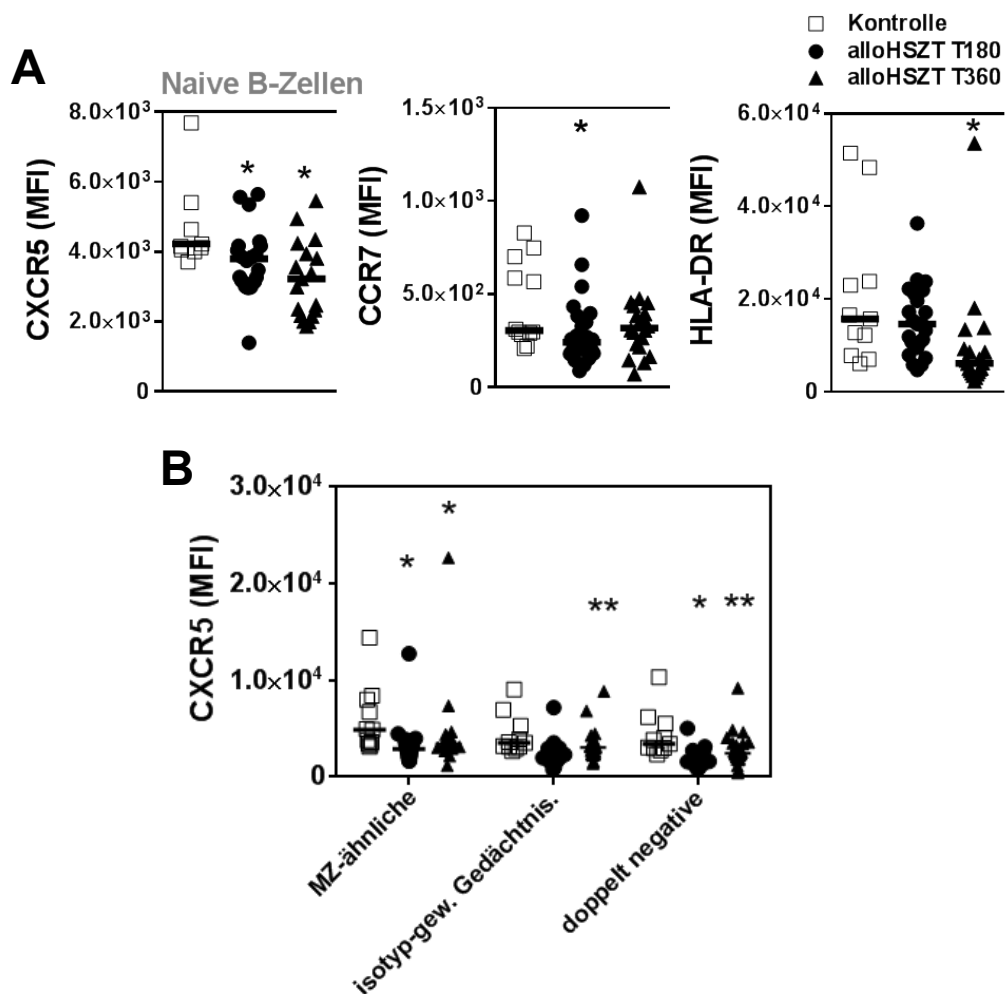


Abbildung 4.8: Verminderte CXCR5-, CCR7- und HLA-DR-Expression nach der alloHSZT

(A) Dargestellt ist die MFI der Oberflächenmarker CXCR5, CCR7 und HLA-DR auf naiven B-Zellen und (B) die MFI von CXCR5 auf drei B-Zell-Subpopulationen in der gesunden Kontrollgruppe (n=11) sowie in der Patientengruppe am Tag 180 (n=27) und am Tag 360 (n=20) nach der alloHSZT. Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. * $p \leq 0,05$ nach Wilcoxon-Rangsummentest. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Sowohl am Tag 180 (MFI \pm SEM: 4392 ± 442 ; $p = 0,0233$) als auch am Tag 360 (3675 ± 552 ; $p = 0,0039$) nach der alloHSZT zeichneten sich die naiven B-Zellen durch eine signifikant verminderte MFI von CXCR5 im Vergleich zur Kontrollgruppe (5899 ± 975) aus (Abbildung 4.8 A). Die CCR7-Expression auf naiven B-Zellen war am Tag 180 nach der alloHSZT (293 ± 36) im Vergleich zur Kontrollgruppe (445 ± 65 ; $p = 0,0147$) signifikant vermindert. Sie stieg jedoch am Tag 360 (343 ± 47 ; $p = 0,3642$) auf das Niveau der gesunden Kontrollgruppe. Die MFI von HLA-DR, ein von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiertes MHC-Klasse-II-Molekül, war in der Patientengruppe am Tag 180 (14842 ± 1513) im Vergleich zu der Kontrollgruppe nicht signifikant (20440 ± 4742 ; $p = 0,4639$) und am Tag 360 (9150 ± 2386 ; $p = 0,0027$) signifikant vermindert.

Die Antigen-erfahrenen, somatisch hypermutierten GZ zirkulieren in den sekundären lymphoiden Organen auf der Suche nach erneutem Kontakt mit dem Antigen. Ihre Migrationsfähigkeit in der Nähe der Follikel korreliert mit der Expressionsintensität von CXCR5. Deshalb wurde die CXCR5-Expression auf drei Antigen-erfahrenen B-Zell-Subpopulationen untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die Expression von CXCR5 auf allen drei Subpopulationen im Verlauf eine abnehmende Tendenz und war am Tag 360 nach der alloHSZT signifikant vermindert (Kontrollgruppe vs. Tag 360: MZ-ähnliche 5882 ± 1027 vs. 3413 ± 523 , $p = 0,0016$; Isotyp-gew. GZ 4310 ± 605 vs. 2415 ± 295 , $p < 0,0001$; DN 4326 ± 699 vs. 1990 ± 218 , $p < 0,0001$) (Abbildung 4.8 B).

4.3.2 Fas (CD95)-Expression

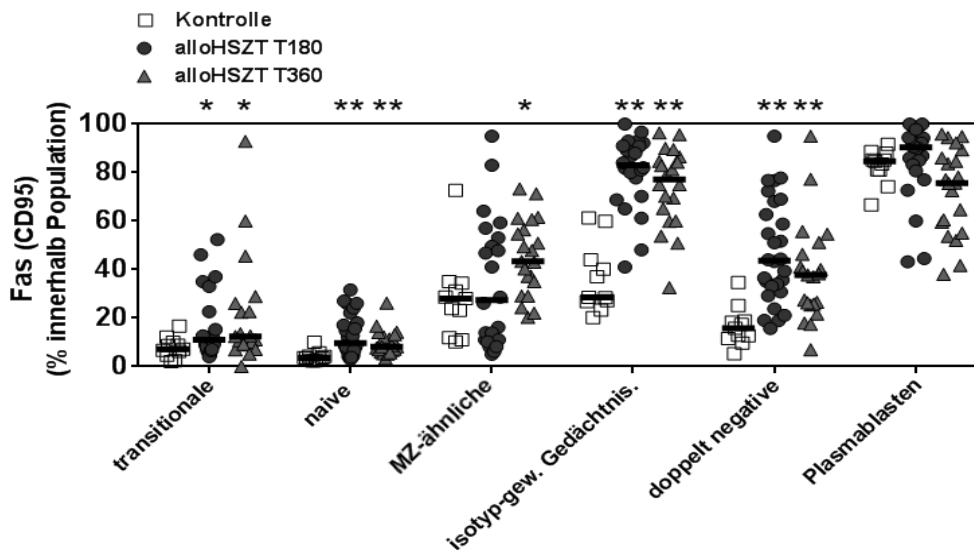


Abbildung 4.9: Fas (CD95)-Expression auf B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT

Dargestellt ist der Prozentanteil an Fas-exprimierenden Zellen innerhalb der jeweiligen B-Zell-Subpopulationen in der Kontrollgruppe (n=12) sowie der Patientenkohorte am Tag 180 (n=27) und am Tag 360 (n=20) nach der alloHSZT. Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,001 nach Wilcoxon-Rangsummentest. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Fas ist ein membranständiges Rezeptorprotein der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie. Nach der Bindung mit seinem Liganden, FasL, wird Fas endozytiert und führt die Apoptose herbei [59]. Der Anteil an Fas-exprimierenden Zellen innerhalb der B-Zell-Subpopulationen war am Tag 180, mit Ausnahme der MZ-ähnlichen B-Zellen und Plasmablasten, in allen Subpopulationen signifikant erhöht (% ± SEM, Kontrolle vs. alloHSZT Tag 180 in %: transitionale 7,8 ± 1,3 vs. 16,3 ± 2,8, p = 0,0336; naive 4,1 ± 0,7 vs. 12,9 ± 1,7, p < 0,0001; Isotyp-gew. GZ 36,1 ± 4,2 vs. 80,1 ± 3,3, p < 0,0001; DN 16,5 ± 2,4 vs. 47,1 ± 4,0, p < 0,0001). Jene Subpopulationen, die bei den alloHSZT-Patienten bereits am Tag 180 eine erhöhte Fas-Expression aufwiesen, zeigten am Tag 360 eine ähnlich erhöhte bzw. eine noch weiter gesteigerte Fas-Expression (alloHSZT Tag 360: transitionale 21,4 ± 5,2, p = 0,0112; naive 9,8 ± 1,1, p < 0,0001; Isotyp-gew. GZ 74,1 ± 3,7, p < 0,0001; DN 37,8 ± 4,5, p = 0,0001).

4.3.3 CD86- und CXCR3-Expression

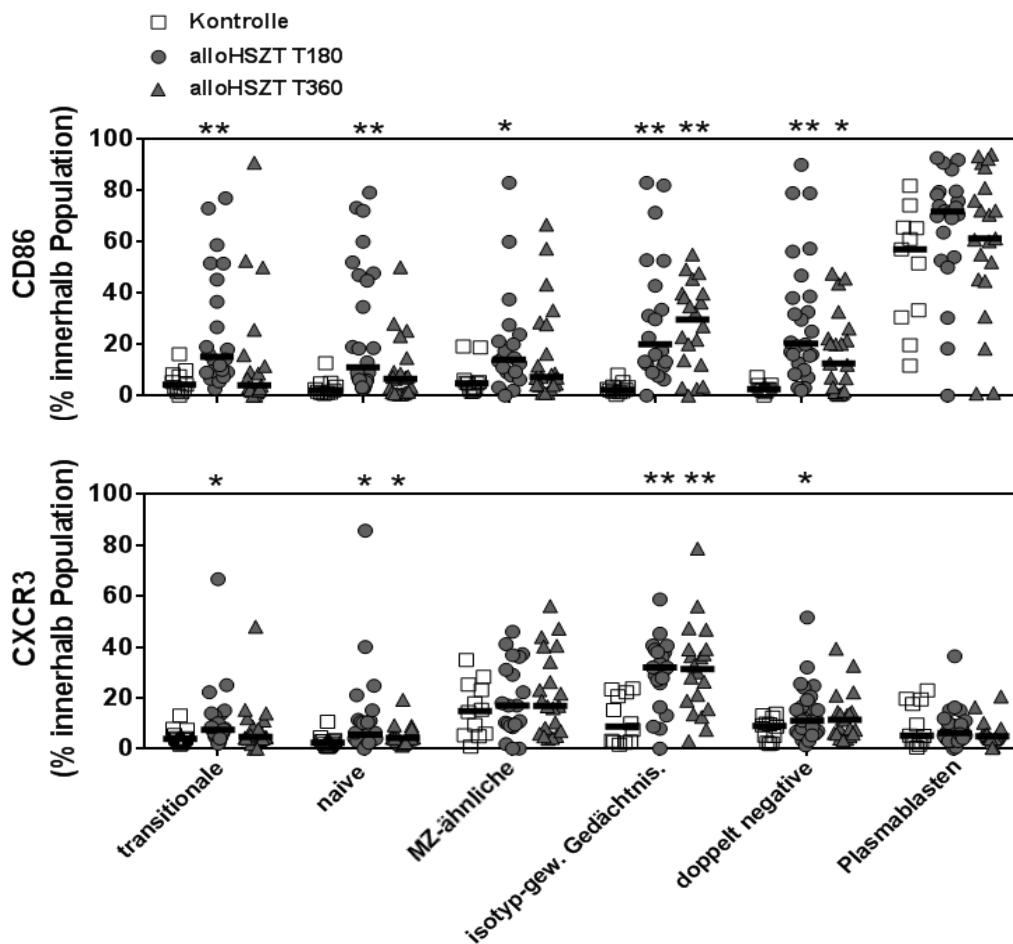


Abbildung 4.10: CD86- und CXCR3-Expression auf B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT

Dargestellt ist der Prozentanteil der CD86- oder CXCR3-exprimierenden Zellen bei den B-Zell-Subpopulationen in der Kontrollgruppe (n=12) sowie der Patientenkohorte am Tag 180 (n=27) und am Tag 360 (n=20) nach der alloHSZT. Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ nach Wilcoxon-Rangsummentest. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Der Marker CD86 gehört zur kostimulatorischen B7-Rezeptorfamilie, die auf den Antigen-präsentierenden Zellen vorkommt. Oberflächenmoleküle der B7-Rezeptorfamilie induzieren einerseits eine Aktivierung und Proliferation der T-Zellen über eine Bindung an CD28 [70]. Andererseits führen sie eine Hemmung der Aktivierung und Proliferation über die Bindung an *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) herbei [70]. Der Marker CXCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der entscheidend auf die Chemotaxis von Leukozyten zum Ort des inflammatorischen Geschehens einwirkt. Die korrespondierenden Liganden sind CXCL9, CXCL10 und CXCL11 [71].

CD86 und CXCR3 gelten als lymphozytäre Aktivierungsmarker, die bei einer Zell-Aktivierung oder Inflammation hochreguliert werden.

Am Tag 180 nach der alloHSZT war der Anteil an CD86-exprimierenden Zellen in allen B-Zell-Subpopulationen, mit Ausnahme bei den Plasmablasten, signifikant erhöht (% \pm SEM, Kontrolle vs. alloHSZT in %: transitionale $5,5 \pm 1,4$ vs. $26,1 \pm 4,9$, $p = 0,0002$; naive $3,3 \pm 1,0$ vs. $25,1 \pm 5,0$, $p < 0,0001$; MZ-ähnliche $6,7 \pm 1,9$ vs. $23,2 \pm 4,5$, $p = 0,0082$; Isotyp-gew. GZ: $3,0 \pm 0,7$ vs. $30,4 \pm 5,7$, $p < 0,0001$; DN $2,9 \pm 0,6$ vs. $29,8 \pm 4,8$, $p < 0,0001$) (Abbildung 4.10). Am Tag 360 nach der alloHSZT war der Anteil an CD86-positiven Zellen in den transitionalen, naiven und MZ-ähnlichen B-Zellen vergleichbar mit denen in der Kontrollgruppe. Isotyp-gew. GZ ($27,3 \pm 3,8$; $p < 0,0001$) und DN B-Zellen ($16,6 \pm 3,4$; $p = 0,037$) wiesen hingegen am Tag 360 immer noch einen signifikant höheren Anteil an CD86 positiven Zellen auf.

Beim Chemokinrezeptor CXCR3 zeichnete sich eine ähnliche Expressionsdynamik in der Patientenkohorte wie bei CD86 ab: Am Tag 180 war der Anteil an CXCR3-exprimierenden Zellen in den transitionalen, naiven, Isotyp-gew. GZ und DN B-Zellen im Vergleich zur gesunden Kohorte signifikant erhöht (Kontrolle vs. alloHSZT in %: transitionale $4,9 \pm 0,9$ vs. $11,4 \pm 2,8$, $p = 0,0124$; naive $2,9 \pm 0,8$ vs. $11,4 \pm 3,3$, $p = 0,0018$; Isotyp-gew. GZ $11,2 \pm 2,6$ vs. $29,5 \pm 3,0$, $p = 0,0002$; DN $7,8 \pm 1,3$ vs. $14,3 \pm 2,1$, $p = 0,0381$). Am Tag 360 nach der alloHSZT blieb der Anteil der CXCR3-positiven Zellen in den naiven B-Zellen ($5,2 \pm 0,9$; $p = 0,0163$) und Isotyp-gew. GZ ($31,3 \pm 4$; $p = 0,0005$) signifikant erhöht (Abbildung 4.10).

4.3.4 BAFF-R-Expression

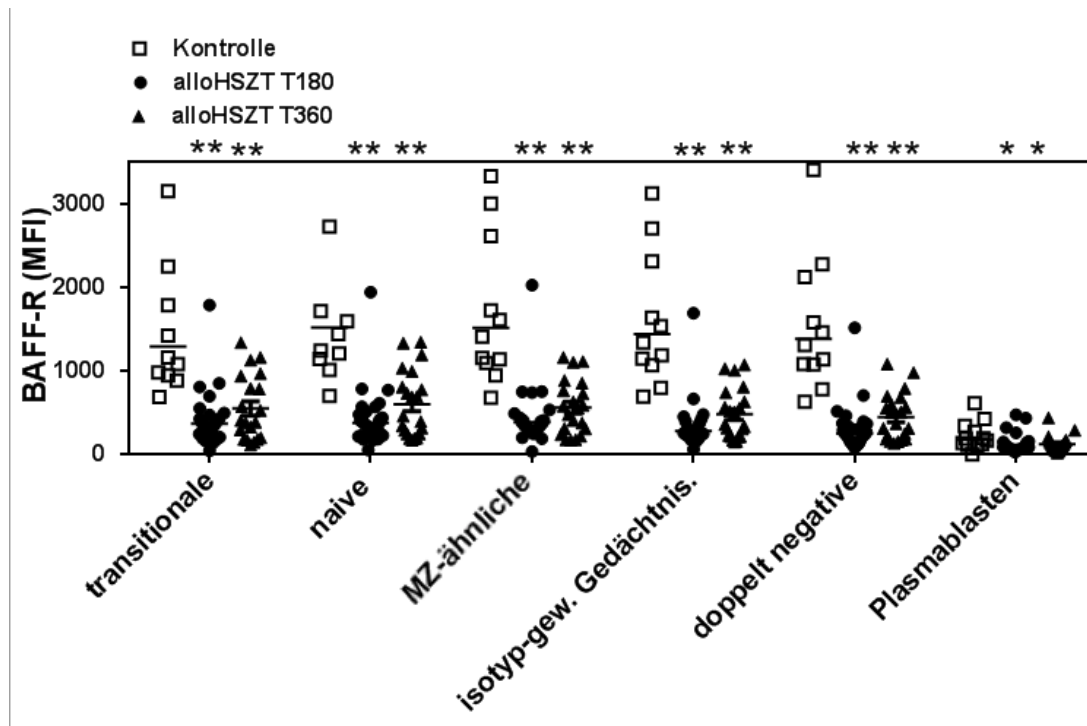


Abbildung 4.11: Verminderte BAFF-R-Expression auf B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT

Dargestellt ist die MFI der BAFF-R-Expression auf B-Zell-Subpopulationen in der gesunden Kontrollgruppe (n=11) sowie der Patientengruppe am Tag 180 (n=27) und Tag 360 (n=20) nach der alloHSZT. Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert ab. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,001 nach Wilcoxon-Rangsummentest.

Der Marker BAFF-R wird von allen B-Zellen exprimiert und seine Aktivierung liefert ein antiapoptotisches und proliferatives Signal, insbesondere für die transitionalen und naiven B-Zellen [32]. Die Expression von BAFF-R war zu beiden Zeitpunkten nach der alloHSZT in allen B-Zell-Subpopulationen signifikant erniedrigt (MFI ± SEM: Kontrollgruppe vs. alloHSZT Tag 180 vs. alloHSZT Tag 360: transitionale 1802 ± 318 vs. 425 ± 69, p < 0,0001 vs. 549 ± 87, p < 0,0001; naive 1996 ± 333 vs. 436 ± 67, p < 0,0001 vs. 601 ± 86, p < 0,0001; MZ-ähnliche 1853 ± 288 vs. 627 ± 177, p < 0,0001 vs. 562 ± 70, p < 0,0001; Isotyp-gew. GZ 1755 ± 271 vs. 361 ± 69, p < 0,0001 vs. 479 ± 66, p < 0,0001; DN 1703 ± 279 vs. 312 ± 52, p < 0,0001 vs. 446 ± 62, p < 0,0001; Plasmablasten 223 ± 48 vs. 131 ± 24, p = 0,0134 vs. 124 ± 21, p = 0,0364).

4.4 Apoptoseeignung der B-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit α -IgM, CD40L und CpG

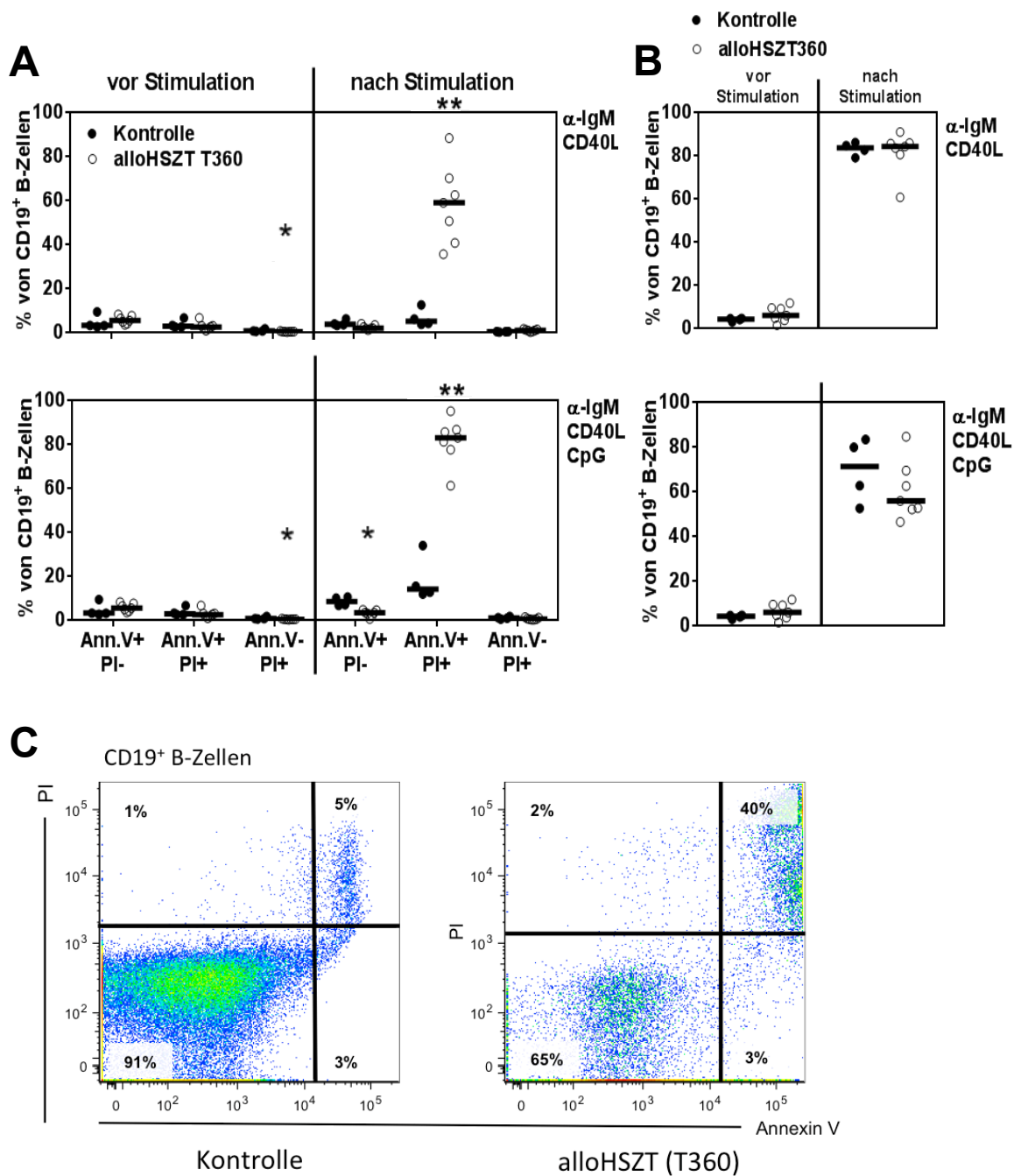


Abbildung 4.12: Gesteigerte B-Zell-Apoptoserate nach *in vitro* Stimulation bei Patienten ein Jahr nach der alloHSZT

(A) Dargestellt sind Anteile der frühapoptotischen (Ann.V+PI-), spätapoptotischen (Ann.V+PI+) und nekrotischen (Ann.V-PI+) B-Zellen in der Kontrollgruppe (n=4) und der Patientengruppe (n=7). Die Messung wurde vor der Stimulation (linke Bildhälfte) und nach einer 48-stündigen Stimulation mit α -IgM/CD40L oder mit α -IgM/CD40L/CpG (rechte Bildhälfte) durchgeführt (Ann.V = Annexin V, PI = Propidiumiodid). Die Punkte geben Einzelwerte wieder und die Balken bilden den jeweiligen Medianwert

ab. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ nach Wilcoxon-Rangsummentest. (B) Gezeigt wird der Anteil an CD69-exprimierenden B-Zellen vor und nach der Stimulation. (C) Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Quantifizierung der apoptotischen B-Zellen nach einer 48-stündigen Stimulation mit α -IgM und CD40L. Darstellung nach Mensen et al., 2015 [67].

Das Apoptoseverhalten der B-Zellen bei der T-Zell-abhängigen *in vitro* Stimulation mit agonistischem α -IgM und CD40L wurde mit zuvor kryokonservierten PBMC der gesunden Kontrollprobanden und der alloHSZT-Patienten (Abnahmezeitpunkt ein Jahr nach der Transplantation) mit Annexin V und PI-Färbung untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde CpG ins Stimulationsmedium hinzugefügt (Abbildung 4.12 A).

Vor der Stimulation wurden signifikant mehr nekrotische (Annexin V⁺PI⁺) B-Zellen in der Patientengruppe (% \pm SEM: $1,1 \pm 0,3$) als in der Kontrollgruppe ($0,6 \pm 0,1$; $p = 0,0152$) beobachtet. Der Anteil an Annexin⁺PI⁻ frühapoptotischen ($5,9 \pm 0,7$) und Annexin⁺PI⁺ spätapoptotischen ($2,9 \pm 0,7$) B-Zellen war in der Patientengruppe vergleichbar hoch wie in der Kontrollgruppe ($4,6 \pm 1,6$, $p = 0,2182$; $3,9 \pm 1,0$, $p = 0,3364$). Nach der 48-stündigen Stimulation war der Anteil der spätapoptotischen B-Zellen in der Patientengruppe ($58,3 \pm 6,8$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($6,8 \pm 2,0$; $p < 0,0006$) signifikant erhöht. Der Anteil an frühapoptotischen Zellen war in der Kontrollgruppe höher als in der Patientengruppe ($4,4 \pm 0,7$ vs. $2,5 \pm 0,4$), dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,0667$).

Der Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurde sowohl in der Früh- als auch in der Spätapoptoserate der B-Zellen nach jeweiliger Stimulation durch die Hinzugabe von CpG als Stimulanz verstärkt (Spätapoptoserate Patientengruppe vs. Kontrollgruppe: $81,7 \pm 4,0$ vs. $18,7 \pm 5,2$, $p < 0,0001$). Durch die zusätzliche Gabe von CpG fanden sich in der Patientenkohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe auch signifikant mehr B-Zellen in der Frühapoptose ($8,6 \pm 1,0$ vs. $3,2 \pm 0,6$, $p = 0,0061$).

Der Aktivierungszustand der B-Zellen nach der Zellkultur wurde mit dem Aktivierungsmarker CD69 bestätigt. Analog zu aktivierten B-Zellen im Keimzentrum *in vivo* [72] haben die B-Zellen auch in diesem *in vitro* Stimulationsmodell CD69 hochreguliert (Abbildung 4.12 C). Es bestand dabei weder vor, noch nach der Stimulation ein signifikanter Unterschied im Anteil der CD69⁺ B-Zellen zwischen der Kontrollgruppe und der Patientenkohorte.

5 Diskussion

Das Patientenüberleben nach alloHSZT wird durch infektiöse Komplikationen in den ersten Jahren nach dem Eingriff erheblich limitiert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden immunologischen Prozesse. Gedächtnis-B-Zellen, bzw. ihrem Fehlen, wird dabei eine besonders entscheidende Rolle zuteil. Eine anhaltende Dysfunktion des Keimzentrums, aus dem Antigen-erfahrene Isotyp-gew. GZ und anteilig auch MZ-ähnliche B-Zellen hervorgehen, kann naturgemäß als kritisch für eine Schwäche der Immunabwehr nach alloHSZT angesehen werden [21][47].

Um maßgebliche Faktoren und Mechanismen, die für eine defekte Keimzentrumsreaktion verantwortlich sein könnten, zu identifizieren, untersuchten wir am Tag 180 bzw. 360 nach alloHSZT entnommene PBMC im Vergleich mit den Blutzellen von Probanden einer gesunden Kontrollgruppe. Leitlinie der Untersuchungen waren die eingangs aufgezeigten drei Fragestellungen: I.) Zunächst führten wir eine quantitative Bestimmung der lymphozytären Kompartimente durch, um den Regenerationsverlauf sowohl des B-Zell-Kompartimentes als auch des T-Zell-Kompartimentes und deren relevanter Bestandteile nach der alloHSZT im Einzelnen nachzuvollziehen (Im Fokus standen dabei unter anderem die IgD^-CD27^+ Isotyp-gew. GZ, die IgD^+CD27^+ MZ-ähnlichen B-Zellen und die T-Helferzellen.). II.) Im Anschluss wurden die B-Zellen im Hinblick auf Phänotyp und Funktion näher untersucht, um mögliche qualitative Abweichungen von den Zellen des Kontrollkollektives aufzuspüren (etwa in der Ausprägung bestimmter Signalwege, die Migration, Antigenpräsentation, Proliferation und Apoptoseneigung beeinflussen). III.) Abschließend wurde das quantitative Apoptose-Verhalten von B-Zellen durch *in vitro* Stimulation (mit Nachahmung der Keimzentrumsreaktion) ein Jahr nach alloHSZT erforscht und mit der Reaktion der Zellen der gesunden Kontrollprobanden verglichen.

5.1 Diskussion der quantitativen Immunrekonstitution nach der alloHSZT (zu I.)

5.1.1 Mangel an Isotyp-gew. GZ und MZ-ähnlichen B-Zellen nach der alloHSZT

In der vorliegenden Arbeit wurde der quantitative Regenerationsverlauf der lymphozytären Kompartimente nach der alloHSZT nach einem halben und einem Jahr

(Tag 180 und Tag 360) untersucht. Aus früheren Studien ist bekannt, dass sich die Gesamtzahl der B-Zellen bereits nach halbem Jahr normalisiert [13][15][21]. Dies war auch in unserem Patientenkollektiv eindeutig nachvollziehbar (Abbildung 4.2). In Übereinstimmung mit früheren Studien setzte sich das B-Zell-Kompartiment bis zum Tag 360 nach der alloHSZT mehrheitlich aus Antigen-unerfahrenen naiven und zu einem kleineren Teil aus transitionalen B-Zellen zusammen. Die MZ-ähnlichen und Isotyp-gew. GZ, die zusammen beim gesunden Erwachsenen ca. 30 % der im Blut zirkulierenden B-Zellen ausmachen [20], waren in unserem Patientenkollektiv zu beiden Zeitpunkten hochsignifikant vermindert und machten weniger als 10 % des B-Zell-Kompartimentes aus (Abbildung 4.3). Die IgD⁺CD27⁺ MZ-ähnlichen B-Zellen werden als eine gesonderte Gruppe der GZ betrachtet, die außerhalb der Keimzentrumsreaktion oder früh innerhalb der Keimzentrumsreaktion auf Thymus-unabhängige Antigene, wie bekapselte Bakterien, erzeugt werden. Sie tragen wie die Isotyp-gew. GZ somatische Hypermutationen in sich, wenn auch in einem geringeren Maß [35][41]. Obwohl die verzögerte Regeneration und der Mangel an klassischen Isotyp-gew. GZ bis zu zwei Jahre nach der alloHSZT gut dokumentiert sind [73], ist die Regenerationsdynamik der MZ-ähnlichen B-Zellen nach der alloHSZT noch ein Desiderat der Forschung. Wie in unserer Studie haben auch D'Orsogna et al. in einer anderen Patientenkohorte ähnlicher Größe ca. ein Jahr nach der alloHSZT einen signifikanten Mangel sowohl an klassischen IgD⁻CD27⁺ Isotyp-gew. GZ als auch an IgD⁺CD27⁺ MZ-ähnlichen B-Zellen festgestellt [74]. Es ist anzunehmen, dass der Mangel an MZ-ähnlichen B-Zellen bei Patienten nach der alloHSZT im Vergleich zur Normbevölkerung für die vielfach höhere Inzidenz an Infektionen mit bekapselten Bakterien, wie Pneumokokken, noch zehn Jahre nach der alloHSZT verantwortlich ist [75]. Die Zahl der IgD⁻CD27⁻ DN B-Zellen und Plasmablasten war am Tag 180 vergleichbar zwischen der Patientenkohorte und der Kontrollgruppe (Abbildung 4.3). Da die Generierung der beiden Subpopulationen auch ohne Keimzentrumsreaktion möglich ist [42][53], scheint ihre schnellere Regeneration im Vergleich zu den CD27⁺ B-Zellen auf eine intakte extrafollikuläre Bildung von Plasmablasten und DN B-Zellen hinzuweisen.

5.1.2 Kombiniertes Mangel an Gedächtnis-B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CXCR5⁺ Gedächtnis-FTH

Analog zum Forschungsstand in der Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass der Regenerationsverlauf der T-Zell-Subpopulationen durch die schnelle Angleichung der CD8⁺ T-Zellen am Tag 180 und ihren Anstieg auf ein erhöhtes Niveau am Tag 360 charakterisiert ist (Abbildung 4.5) [13][15][21]. Diese frühzeitige Expansion der CD8⁺ T-Zellen war verantwortlich für die Normalisierung der Gesamt-T-Zellen. Die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen zeigte dahingegen einen trägen Anstieg und lag am Tag 360 bei allen Patienten noch unter 350/ μ l. Somit sind die Patienten im ersten Jahr nach der Transplantation einem gesteigerten Risiko für opportunistische Infektionen ausgesetzt. Die Normalisierung der CD4⁺ T-Zellen kann ähnlich dem CD27⁺ GZ-Kompartiment einige Jahre andauern [76]. Dabei ist die *de novo* Rekonstitution von naiven T-Zellen von dem altersabhängigen Involutionzustand des Thymus abhängig [18]. Da naive CD4⁺ T-Zellen neben den naiven B-Zellen wichtige Akteure für die Keimzentrumsreaktion sind, ist ihr anhaltender Mangel ein wichtiger Faktor, der den Mangel an GZ bedingt.

Um weitere Hinweise für die verminderte T-Zell-Hilfe in der Keimzentrumsreaktion zu finden, wurden auch die CXCR5⁺CD4⁺ Gedächtnis-FTH der alloHSZT-Patienten am Tag 360 untersucht. Obwohl ihr Ursprung noch nicht endgültig geklärt ist, gelten die CXCR5⁺CD4⁺ Zellen als Subpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen und als zirkulierendes „Gedächtnis-Pendant“ der FTH aus der Keimzentrumsreaktion [69]. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Quantität dieser T-Zell-Subpopulation eine positiv korrelierende Größe hinsichtlich der Menge an erfolgreich abgelaufenen Keimzentrumsreaktionen ist. Ihr Anteil innerhalb des CD4⁺ Kompartiments bei gesunden Menschen wird in der Literatur mit 10 bis 20 % beschrieben [77][78]. Dies konnte in unserer gesunden Kontrollgruppe bestätigt werden. Hingegen war in unserer Patientenkohorte der Anteil an Gedächtnis-FTH selbst ein Jahr nach der alloHSZT bei dem ganz überwiegenden Teil der untersuchten Patienten noch vermindert (Abbildung 4.6). Forcade et al. konnten bei ihrer Patientenkohorte neun Monate nach der alloHSZT auch einen signifikant verminderten Anteil der CXCR5⁺CD4⁺ Zellen feststellen, deren Mangel bei Vorhandensein einer chronischen GvHD noch ausgeprägter war [79].

Die Mangelkonstellation der B-Zell-Subpopulationen erinnert an eine von Warnatz et al. eingehend untersuchte kleine Gruppe von Patienten mit einem homozygoten ICOS-

Gendefekt [80]. ICOS (engl. *inducible costimulator*) gehört zur CD28-Rezeptorfamilie der kostimulatorischen Moleküle und wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Bei der Bindung an seinen Liganden ICOS-L auf B-Zellen gleicher Antigen-spezifität während der Keimzentrumsreaktion vermittelt es das entscheidende Signal zur Proliferation und zur Differenzierung in folliculäre T-Helferzellen [81]. Neben dem gleichzeitigen Mangel an MZ-ähnlichen B-Zellen und Isotyp-gew. GZ war in diesem Patientenkollektiv ein verminderter Spiegel an IgG bei normalem IgM-Spiegel zu beobachten [80]. In derselben Patientenkohorte konnte auch ein erheblich verminderter Anteil CXCR5⁺CD4⁺ Gedächtnis-FTH bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden [82]. Ob die ICOS-ICOSL-Interaktion therapiebedingt durch die alloHSZT beeinflusst wird und ob diese eine pathogenetische Rolle für den Mangel an GZ spielt, ist in weiteren Untersuchungen abzuklären.

Zusammengefasst bedeutet dies, in unserer Patientenkohorte wurde ein Jahr nach der alloHSZT ein persistierender Mangel an MZ-ähnlichen und Isotyp-gew. GZ bei quantitativer Normalisierung der übrigen B-Zell-Subpopulationen festgestellt. Mit dem Mangel an Isotyp-gew. GZ geht auch ein persistierender Mangel an CD4⁺ T-Zellen und eine verminderte Anzahl an Gedächtnis-FTH einher. Bei den extrafollikulär generierungsfähigen DN B-Zellen und Plasmablasten wurde jedoch bereits nach einem halben Jahr (Tag 180) das Niveau der gesunden Kontrollgruppe erreicht.

5.2 Diskussion des funktionellen Phänotyps der B-Zellen nach der alloHSZT (zu II.)

5.2.1 Phänotypisierung der B-Zellen ein Jahr nach der alloHSZT hinsichtlich Migration, Antigenpräsentation und Proliferation

Naive B-Zellen benötigen den Chemokinrezeptor CXCR5, um entlang des Konzentrationsgefälles seines von FDC produzierten Liganden CXCL13 in den Lymphfollikel zu wandern [83]. CXCR5-Gendefiziente Mäuse weisen histologisch abnormal strukturierte sekundäre Lymphorgane auf und bilden kein funktionsfähiges Keimzentrum aus [84]. Die Expressionsintensität von CXCR5 war auf naiven B-Zellen der Patienten an beiden Zeitpunkten nach der alloHSZT signifikant vermindert; sie wies sogar von Tag 180 auf Tag 360 eine abnehmende Tendenz auf (Abbildung 4.8). Dies

lässt vermuten, dass die Migrationsfähigkeit der naiven B-Zellen von alloHSZT-Patienten in die Follikelregionen herabgesetzt ist und dieser funktionelle Defekt nach einem Jahr keine Normalisierungstendenz zeigt. Die herabgesetzte CXCR5-Expressionsstärke war am Tag 360 nicht nur bei naiven sondern auch bei MZ-ähnlichen, Isotyp-gew. GZ und DN B-Zellen zu beobachten. Studien über murine MZ-B-Zellen in der Milz haben gezeigt, dass ungefähr ein Fünftel der MZ-B-Zell-Subpopulation pro Stunde zwischen ihrer ursprünglichen Nische und den Follikelregionen pendelt, statt dauerhaft in ihrer MZ statisch zu verbleiben [48][85]. Bei dieser ständigen Migration transportieren diese B-Zellen Antigene aus dem Blut zu den FDC im Follikel. Die Antigentransportfähigkeit der MZ-B-Zellen war bei CXCR5-Gendefizienten Mäusen erheblich gestört [84]. Die Ergebnisse dieser experimentellen Studien über MZ-B-Zellen deuten darauf hin, dass MZ-ähnliche B-Zellen neben ihrer Funktion als Antikörper-sezernierende Effektorzellen per se auch eine Helferfunktion für die Initiierung der Keimzentrumsreaktion ausüben. Für unsere Patientenkohorte, in der am Tag 360 sowohl die Anzahl der MZ-ähnlichen B-Zellen als auch deren Migrationsfähigkeit und damit die verbundene Antigentransportfunktion in die Follikelregionen der Milz erniedrigt sind, lässt sich eine erschwerte Bildung der Keimzentrumsreaktion in der Milz schlussfolgern. Für diese Interpretation ist jedoch im Sinne eines Vorbehalts zu berücksichtigen, dass murine MZ-B-Zellen sich von den menschlichen Pendanten unterscheiden [36].

Die Stärke der T-Zell-Hilfe für eine B-Zell-Aktivierung und Selektion während der Keimzentrumsreaktion hängt von der Quantität der Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle auf B-Zellen ab [58]. Die am Tag 360 verminderte HLA-DR-Expression auf naiven B-Zellen der Patientenkohorte deutet auf eine reduzierte Fähigkeit der Antigenpräsentation hin.

Die ubiquitäre Expression von BAFF-R in allen B-Zell-Subpopulationen und der Abfall der Expression auf ein Zehntel nach Differenzierung in die Plasmablasten, wie in der Literatur im Falle einer normalen B-Zell-Reifung beschrieben [86], war in unseren Kohorten sowohl in der Kontroll- als auch in der Patientengruppe zu beobachten. Auf allen B-Zell-Subpopulationen zeichnete sich die einheitlich verminderte Expressionsdichte von BAFF-R bei den alloHSZT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ab (Abbildung 4.11). B-Zellen benötigen für den Entwicklungsschritt von den transitionalen zu den naiven sowie zu den MZ-B-Zellen die Aktivierung des BAFF-R-Signalweges durch seine Ligandbindung mit BAFF [32]. Bisher wurde in zwei Fällen

beschrieben, dass ein homozygoter BAFF-R-Gendefekt schwere B-Lymphopenie und Hypogammaglobulinämie verursacht [87]. Die genetische Ablation des BAFF-R in einem Mausmodell hatte neben der Verkleinerung der naiven und MZ-B-Zell-Kompartimente eine reduzierte Anzahl und Größe der Keimzentren bei Inokulation mit einem Antigen zur Folge [88]. In der Studie konnte jedoch nicht endgültig geklärt werden, ob dies durch die anfängliche B-Lymphopenie verursacht wurde oder der fehlende BAFF-R-Signalweg einen spezifisch auf das Keimzentrum hemmenden Effekt ausübte. In einer anderen Studie führte die intraperitoneale BAFF-Injektion bei Mäusen zu einem erhöhten Antikörpertiter aller Immunglobulinklassen. Außerdem bewirkte bei *in vitro* Stimulation der naiven B-Zellen mit CD40L die Hinzunahme von BAFF als Stimulanz deren Expansion durch eine Hochregulierung von Nekrose-Faktor-kappa-B (NF- κ B) und antiapoptotischen BCL-2-Proteinen [89]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der BAFF-R-Signalweg in verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien durch seine proliferative und antiapoptotische Wirkung zum Aufbau der humoralen Immunität beiträgt.

Es lässt sich postulieren, dass der gestörte BAFF-R-Signalweg bei alloHSZT-Patienten in einem partiellen Verlust des proliferativen Potentials der B-Zellen sowohl vor als auch nach der Keimzentrumsreaktion resultiert. Die veränderte Expression des BAFF-R im Rahmen der alloHSZT wurde erstmalig in der vorliegenden Arbeit untersucht. Über welchen Mechanismus es zur Verminderung der BAFF-R-Expression kommt und ob die verminderte BAFF-R-Expression der Isotyp-gew. GZ sich negativ auf ihre Homöostase auswirkt, soll dem Gegenstand der zukünftigen Forschung vorbehalten sein.

5.2.2 Proapoptotischer und aktivierter Phänotyp der B-Zellen nach der alloHSZT

Durch die Toxizität der Konditionierungstherapie, infektiöse Komplikationen und eventuell vorhandene GvHD herrscht ein systemisch inflammatorisches Milieu nach der alloHSZT mit einem erhöhten Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ) und Interleukin-6 (IL-6) [90][91][92][93]. Das proinflammatorische Milieu kann die Homöostase der Hämatopoese im Knochenmark beeinflussen. Es ist bekannt, dass akute und chronische systemische Inflammationen dazu führen, dass im Knochenmark das quantitative Gleichgewicht zwischen Granulo- und Lymphopoese zu Gunsten der

Granulopoese verschoben wird [94]. Als ein dafür ursächlicher Mechanismus werden inflammatorischen Zytokine diskutiert, die einen direkten hemmenden Einfluss auf die B-Lymphopoese im Knochenmark ausüben. Vor diesem Hintergrund ist es nachvollziehbar, dass die Lymphopoese im Zustand nach der alloHSZT besonders im Falle von Infektionen und GvHD quantitativ kompromittiert ist. Um den Einfluss des inflammatorischen Milieus bei alloHSZT-Patienten auf die B-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von Fas, CD86 und CXCR3 auf einzelnen B-Zell-Subpopulationen analysiert. Die Hochregulation von Fas auf hämatopoetischen Progenitorzellen durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ wird in der Literatur beschrieben [95]. Die Fas-Hochregulation und ihre Apoptose vermittelnde Rolle konnten auf diversen Zellentitäten durch Bestrahlung und Chemotherapeutika beobachtet werden [96][97]. Die Persistenz des erhöhten Anteils an Fas-exprimierenden Zellen in beinahe allen B-Zell-Subpopulationen bis zum Tag 360 lässt vermuten, dass B-Zellen aller Entwicklungsstadien eine vermehrte Apoptoseneigung haben (Abbildung 4.9). Mehr Fas-exprimierende naive B-Zellen der Patientenkohorte korrelieren mit ihrer höheren Apoptoserate bei Stimulation, die im nachfolgenden Kapitel diskutiert wird. Die Konsequenzen einer erhöhten Fas-Expression der CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen wurden in einer Studie mit Leberzirrhose-Patienten untersucht, die wie unsere alloHSZT-Patienten sowohl einen Mangel an CD27⁺ Isotyp-gew. GZ als auch eine erhöhte Fas-Expressionsrate auf diesen Zellen aufwiesen [98]. Bei Stimulation mit Lipopolysaccharid (TLR-4-Agonist) gingen signifikant mehr CD27⁺ Isotyp-gew. GZ der Leberzirrhosepatienten in die Apoptose als bei den Nicht-Leberzirrhosepatienten. Die erhöhte Fas-Expression auf den MZ-ähnlichen, Isotyp-gew. GZ und DN B-Zellen am Tag 360 lässt vermuten, dass diese durch eine Reaktivierung beim zweiten Antigenkontakt einer höheren Apoptoserate ausgesetzt sind.

Obwohl der am Tag 180 erhöhte Anteil an CD86- und CXCR3-exprimierenden transitionalen und naiven B-Zellen am Tag 360 auf das Niveau der Kontrollgruppe fiel, persistierte dieser bei den Isotyp-gew. GZ (Abbildung 4.10). Die erhöhte Expression von CXCR3 auf CD27⁺ GZ wurde bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematoses beobachtet [99][100][101]. Die Hochregulation des Markers CD86 auf CD27⁺ GZ wurde ebenso bei Autoimmunerkrankungen wie der systemischen Sklerose oder der rheumatoiden Arthritis festgestellt [102][103]. Die Assoziation zwischen der alloHSZT und Autoimmunerkrankungen bezüglich des aktivierten Phänotyps der Gedächtnis-B-

Zellen kann ein Hinweis für die pathogenetische Rolle dieser Zellen für Autoimmunprozesse wie die chronische GvHD bei alloHSZT-Patienten am Tag 360 sein. Die Gruppenanalyse dieser Marker bezüglich der GvHD hat jedoch keinen signifikanten Unterschied ergeben. Dieser Befund sollte jedoch noch in einer größeren Patientenkohorte evaluiert werden.

Zusammengefasst lässt sich mithin ausführen, dass die Phänotypisierung der B-Zellen ein Jahr nach der alloHSZT auf eine anhaltend verminderte Funktionalität bezüglich der Migration, der Antigenpräsentation und der Proliferation hinweist. Das inflammatorische posttransplantative Milieu induziert zudem einen anhaltenden proapoptotischen und aktivierten Phänotyp der B-Zellen.

5.3 Diskussion der vermehrten B-Zell-Apoptose nach *in vitro* Stimulation (zu III.)

Während der Keimzentrumsreaktion gehen die Antigen-spezifischen B- und T-Zellen einen Zell-Zell-Kontakt ein. Dieser wird durch die Interaktion zwischen dem Peptid-MHC-II-Komplex und dem T-Zell-Rezeptor, die das Überleben der B-Zellen sichert und zur klonalen Selektion führt, aufrechterhalten. Zudem trägt die CD40-CD40L-Bindung, die die T-Zell-Proliferation und deren B-Zell-proliferative Zytokinausschüttung bedingt, zur Aufrechterhaltung des Zell-Zell-Kontaktes entscheidend bei [59]. In einem Stimulationsmodell mit α -IgM und CD40L wurden diese physiologischen Vorgänge in der Keimzentrumsreaktion *in vitro* nachgestellt. Obwohl die Zugabe vom α -IgM in diesem Modell nicht zur Antigen-Prozessierung und dessen Präsentation auf der Oberfläche wie in einem realen Keimzentrum führt, ist die Aktivierung des BZR-Signalweges der entscheidende Schritt für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Keimzentrumsreaktion. Nach einer zweitägigen Stimulation von PBMC befanden sich die B-Zellen der alloHSZT-Patienten im Vergleich zu denen der Kontrollkohorte in einem erheblich höheren Anteil in der Spätapoptose (Abbildung 4.12). Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche Zusammensetzung der B-Zell-Subpopulationen, die eine variable Empfänglichkeit für die Apoptose zeigen. Die transitionalen B-Zellen haben physiologischerweise eine vermehrte Apoptoseneigung als andere Subpopulationen [31]. Am Tag 360 nach der alloHSZT jedoch war die Ratio der transitionalen und naiven B-Zellen sowohl in der Patientenkohorte als auch in der

Kontrollgruppe annähernd gleich (im Durchschnitt: 16). Die absolute Anzahl der transitionalen B-Zellen war bezogen auf alle B-Zellen auch unerheblich. Hieraus lässt sich schließen, dass die vermehrte Apoptoserate bei den Patienten nicht durch die transitionalen B-Zellen verursacht sein kann.

Nach zusätzlicher Gabe des TLR-9-Agonisten CpG stieg der Anteil der spätapoptotischen B-Zellen bei den Patienten im Durchschnitt von 58,3 % auf 81,7 % an (Abbildung 4.12). Der CpG-Signalweg induziert in B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion eine vermehrte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie ICOS-L und CD40. Dies unterstützt die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen in Antikörper-sezernierende Zellen, wie in einer Stimulationsstudie mit naiven B-Zellen nachgewiesen wurde [104][105]. Die B-Zellen unserer Patientenkohorte haben auf CpG unerwartet mit einer Apoptose reagiert, anstatt mit einer Proliferation. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im Falle einer Virämie oder einer Bakteriämie mit dem Vorhandensein einer mikrobiellen DNA im Blut bzw. im lymphatischen Gewebe die B-Zellen bei alloHSZT-Patienten als Reaktion auf die Aktivierung, anstatt in Antikörper-sezernierende Zellen oder GZ auszudifferenzieren, vielmehr in Apoptose gehen.

Vorgänge in der Keimzentrumsreaktion und die Bildung von GZ sind regulatorischen Mechanismen ausgesetzt. Nach dem aktuellen Forschungsstand über die physiologischen Abläufe der Keimzentrumsreaktion wird bei der Einschaltung des BCL-6, eines für die Keimzentrumsreaktion charakteristischen Transkriptionsfaktors, eine Reihe von Proto-Onkogenen (z. B. antiapoptotische BCL-2-Proteine) herunterreguliert. Somit werden die Keimzentrums-B-Zellen in einen proapoptotischen Zustand versetzt [106]. Der regulierende Effekt von antiapoptotischen BCL-2-Proteinen auf die Keimzentrumsreaktion wurde in einem transgenen Mausmodell untersucht: In Mäusen mit konstitutiver Expression von antiapoptotischen BCL-2-Proteinen wurde eine um das Vielfache vermehrte Bildung von Isotyp-gew. GZ auf ein Antigen beobachtet [107][108]. Darüber hinaus induziert der CD40-CD40L-Signalweg vermehrt Fas-Moleküle auf der Zelloberfläche von B-Zellen des Keimzentrums [109]. Die hohe Fas-Expression auf Keimzentrums-B-Zellen ist assoziiert mit einer Fas-vermittelten Apoptose im Mausmodell [110]. Eine genetische Ablation von Fas in B-Zellen im Keimzentrum resultiert hingegen in einer hochgradig gesteigerten Menge an Isotyp-gew. GZ [111]. Wenn die B-Zellen durch FTH in der HZ aufgrund ihrer Antigenaffinität selektioniert werden, können sie ein antiapoptotisches intrazelluläres Milieu herbeiführen, indem sie regulatorische Proteine wie NF- κ B und MYC hochregulieren [47]. Anschließend

wandern sie in die DZ. Dort kommt es zur Proliferation und somatischen Hypermutation der B-Zellen [47]. Diese Forschungsergebnisse legen ein Modell nahe, in dem Keimzentrums-B-Zellen durch intrazelluläre Regulationsproteine und Überexpressionen von Fas in einen Apoptose-empfindlicheren Zustand gebracht werden. Durch eine Selektion der FTH können die Keimzentrums-B-Zellen vor ihrem apoptotischen „Schicksal“ gerettet werden.

In einem anderen Stimulationsversuch der PBMC von Patienten wurde in der alloHSZT-Patientengruppe ein Jahr nach der Transplantation im Vergleich zur Kontrollgruppe durch die Stimulation mit CD40L und CpG eine signifikant höhere Expressionsrate von FasL auf CD4⁺ T-Zellen beobachtet [67]. Dagegen wurde nach der zweitägigen Stimulation mit CD40L und CpG bei den B-Zellen sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollkohorte eine signifikant höhere Expressionsrate von Fas festgestellt. Demnach kann die isoliert gesteigerte FasL-Expression auf T-Zellen in der Patientengruppe während der Keimzentrumsreaktion ein Mechanismus sein, der für die vermehrte B-Zell-Apoptoserate bei den alloHSZT-Patienten verantwortlich ist. Dieser Befund der erhöhten FasL-Expression auf T-Zellen in der alloHSZT-Patientengruppe ist mit der Zugabe von α -IgM, sprich der Aktivierung des BZR-Signalweges, in einer zukünftigen Studie weiter zu verifizieren.

Zusammengefasst lässt sich mithin konstatieren, dass die B-Zellen bei Patienten im Zustand nach der alloHSZT in einem T-Zell-abhängigen Stimulationsmodell eine drastisch erhöhte aktivierungsinduzierte Apoptose erfahren.

Nach unserem Modell sind drei Faktoren zu nennen, die die vermehrten Apoptoseraten der alloHSZT-Patienten bedingen können: 1) Erstens haben die alloHSZT-Patienten einen quantitativen Mangel an CD4⁺ T-Helferzellen, die antigenspezifische B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion selektionieren und damit vor der Apoptose retten könnten. Infolgedessen entstehen im verminderten Maß CXCR5⁺CD4⁺ Gedächtnis-FTH, die im Blut zirkulieren. 2) Zweitens kann die Fas-Überexpression der Keimzentrums-B-Zellen in den alloHSZT Patienten eine gesteigerte Suszeptibilität für Apoptose bedeuten. Dies wiederum mündet in eine verkürzte Dauer der Keimzentrumsreaktion. 3) Drittens könnte ein therapiebedingter B-Zell-intrinsischer Defekt vorliegen. Eine immunsuppressive medikamentöse Therapie als Abstoßungsprophylaxe und gegen eine eventuell vorhandene chronische GvHD (daran

litten bei dem Stimulationsversuch drei von sieben Patienten der Kohorte) kann als ein Grund für die höhere Apoptoserate der B-Zellen angesehen werden. Glukokortikoide induzieren die Apoptose, indem sie die NF-kB- und MYC-Signalwege hemmen [112][113]. Zudem reguliert Cyclosporin A nachweislich die antiapoptotische BCL-2-Proteine herunter [114].

5.4 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative, phänotypische und funktionale Analyse der Lymphozyten bei Patienten mit akuter Leukämie im Zustand nach erfolgter alloHSZT durchgeführt. Es fanden sich wichtige Hinweise auf lymphozytäre Defekte, die defizitäre Abläufe in verschiedenen Stadien der GZ-Bildung und den Mangel bestimmter für die Immunabwehr relevanter Zelltypen bedingen können und eine anhaltend erhöhte Vulnerabilität der Betroffenen gegenüber Infektionen erklärlich machen. Zusammengefasst konnten folgende Erkenntnisse aus der durchgeführten Studie gewonnen werden:

1. Das inflammatorische Milieu nach der Transplantation bedingt phänotypische Veränderungen auf den B-Zellen, die diese in allen Entwicklungsstadien proapoptotisch stimmen.
2. Im Vergleich zwischen Patientenkohorte und gesunder Kontrollgruppe zeigte sich, dass eine herabgesetzte CXCR5-Expression der naiven B-Zellen eine verminderte Migration in den Follikel bedingen und somit die Initiierung einer Keimzentrumsreaktion erschweren kann.
3. Ein prolongierter Mangel an CD4⁺ T-Helferzellen bedeutet eine verringerte Hilfe durch FTH, die ihrerseits sowohl die Keimzentrumsreaktion initiiert als auch unterhält.
4. Eine verminderte HLA-DR-abhängige Antigenpräsentation auf B-Zellen geht mit einer Abschwächung der immunologischen Synapse zwischen B- und T-Zellen einher. Damit ist ein Verlust des proliferativen Potentials der B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion assoziiert.
5. Ein Proliferationsdefizit kann auch durch verminderte BAFF-R-Signale der naiven B-Zellen bedingt sein.

6. Die gesteigerte aktivierungsinduzierte Apoptose der B-Zellen kann für eine verringerte Anzahl der aus der Keimzentrumsreaktion hervorgehenden Gedächtnis-B-Zellen mitverantwortlich sein.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich insbesondere schlussfolgern, dass dem Immunmonitoring nach alloHSZT ein herausragender Stellenwert zukommt. In Abhängigkeit von der Immunrestitution ist bei Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation eine notwendige Infektionsprophylaxe und -therapie ggf. über ein Jahr nach der alloHSZT hinaus zu erwägen. Da der Mangel an GZ mit einem $CD4^+$ -Mangel einhergeht, ist aufgrund der Daten dieser Studie eine Thymusprotektion zur Unterstützung der $CD4^+$ Lymphopoese zu empfehlen [115]. Weiterhin sollten Patienten nach der alloHSZT nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie neuerlich grundimmunisiert werden. Perspektivisch sollten anhand prospektiver Studien die idealen Zeitpunkte für die Vakzinierungen und die jeweiligen Impfdosen je nach klinischen und immunrestitutiven Parametern der einzelnen Patienten untersucht werden. Im Angesicht des proapoptotischen Phänotyps der Gedächtnis-B-Zellen ist ein besonderes Augenmerk auch auf die Langzeitergebnisse der Vakzinierung zu legen. Überdies stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Grundlage für mechanistische Untersuchungen zur weiteren Aufdeckung von Immundefekten in der Keimzentrumsreaktion im Mausmodell dar.

Literaturverzeichnis

- [1] A. A. Kassim und B. N. Savani, „Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review“, *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, Bd. 10, Nr. 4, S. 245–251, Dez. 2017.
- [2] F. Lussana und A. Rambaldi, „Role of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia“, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, Bd. 6, Nr. 1, S. e2014065, 2014.
- [3] Jahresbericht des Zentralen Knochenmarkspenderregisters Deutschland, 2017.
- [4] K. Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 8. New York, NY, USA: Garland Science, Tylor & Francis Group, LLC, S. 652–663, 2012.
- [5] DKMS Jahresbericht, 2017.
- [6] A. R. Rezvani und R. F. Storb, „Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation“, *J. Autoimmun.*, Bd. 30, Nr. 3, S. 172–179, Mai 2008.
- [7] F. Fassrinner, J. Schetelig, A. Burchert, M. Kramer, R. Trenscher, U. Hegenbart, M. Stadler, K. Schäfer-Eckart, M. Bätzel, H. Eich, M. Stuschke, R. Engenhardt, M. Krause, P. Dreger, A. Neubauer, G. Ehninger, D. Beelen, W. E. Berdel, T. Siepmann, M. Stelljes und M. Bornhäuser, „Long-term efficacy of reduced-intensity versus myeloablative conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission: retrospective follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial“, *Lancet Haematol.*, Bd. 5, Nr. 4, S. e161–e169, Apr. 2018.
- [8] H.-H. Zhu, X.-H. Zhang, Y.-Z. Qin, D.-H. Liu, H. Jiang, H. Chen, Q. Jiang, L.-P. Xu, J. Lu, W. Han, L. Bao, Y. Wang, Y.-H. Chen, J.-Z. Wang, F.-R. Wang, Y.-Y. Chai, L.-R. Wang, Y.-R. Liu, K.-Y. Liu, B. Jiang und X.-J. Huang, „MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial“, *Blood*, Bd. 121, Nr. 20, S. 4056–4062, Mai 2013.
- [9] R. F. Schlenk, K. Döhner, S. Mack, M. Stoppel, F. Király, K. Götze, F. Hartmann, H. A. Horst, E. Koller, A. Petzer, W. Grimminger, G. Kobbe, A. Glasmacher, H. Salwender, H. Kirchen, D. Haase, S. Kremers, A. Hatzdorff, A. Benner und H. Döhner, „Prospective evaluation of allogeneic hematopoietic stem-cell

- transplantation from matched related and matched unrelated donors in younger adults with high-risk acute myeloid leukemia: German-austrian trial AMLHD98A“, *J. Clin. Oncol.*, Bd. 28, Nr. 30, S. 4642–4648, Okt. 2010.
- [10] F. Malard, P. Chevallier, T. Guillaume, J. Delaunay, F. Rialland, J.-L. Harousseau, P. Moreau, F. Mechinaud, N. Milpied und M. Mohty, „Continuous reduced nonrelapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A single-institution’s three decade experience“, *Biol. Blood Marrow Transplant.*, Bd. 20, Nr. 8, S. 1217–1223, Aug. 2014.
- [11] S. Kurosawa, K. Yakushijin, T. Yamaguchi, Y. Atsuta, T. Nagamura-Inoue, H. Akiyama, S. Taniguchi, K. Miyamura, S. Takahashi, T. Eto, H. Ogawa, M. Kurokawa, J. Tanaka, K. Kawa, K. Kato, R. Suzuki, Y. Morishima, H. Sakamaki und T. Fukuda, „Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome Registry“, *Bone Marrow Transplant.*, Bd. 48, Nr. 4, S. 529–536, Apr. 2013.
- [12] U. D. Bayraktar und J. L. Nates, „Intensive care outcomes in adult hematopoietic stem cell transplantation patients“, *World J. Clin. Oncol.*, Bd. 7, Nr. 1, S. 98–105, Feb. 2016.
- [13] R. S. Mehta und K. Rezvani, „Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection“, *Virulence*, Bd. 7, Nr. 8, S. 901–916, Nov. 2016.
- [14] U. Sahin, S. K. Toprak, P. A. Atilla, E. Atilla, und T. Demirer, „An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“, *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.*, Bd. 22, Nr. 8, S. 505–514, Aug. 2016.
- [15] M. Bosch, F. M. Khan, und J. Storek, „Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation“, *Curr. Opin. Hematol.*, Bd. 19, Nr. 4, S. 324–335, Juli 2012.
- [16] E. Corre, M. Carmagnat, M. Busson, R. P. d Latour, M. Robin, P. Ribaud, A. Toubert, C. Rabian und G. Socié, „Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections“, *Haematologica*, Bd. 95, Nr. 6, S. 1025–1029, Juni 2010.
- [17] A. Mensen, C. Ochs, A. Stroux, F. Wittenbecher, M. Szyska, L. Imberti, S. Fillatreau, L. Uharek, R. Arnold, B. Dörken, A. Thiel, C. Scheibenbogen und I.-K.

- Na, „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.*, Bd. 11, S. 188, Aug. 2013.
- [18] E. Clave, M. Busson, C. Douay, R. Peffault de Latour, J. Berrou, C. Rabian, M. Carmagnat, V. Rocha, D. Charron, G. Socié und A. Toubert, „Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“, *Blood*, Bd. 113, Nr. 25, S. 6477–6484, Juni 2009.
- [19] T. N. Small, C. A. Keever, S. Weiner-Fedus, G. Heller, R. J. O’Reilly, und N. Flomenberg, „B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny“, *Blood*, Bd. 76, Nr. 8, S. 1647–1656, Okt. 1990.
- [20] H. Morbach, E. M. Eichhorn, J. G. Liese, und H. J. Girschick, „Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood“, *Clin. Exp. Immunol.*, Bd. 162, Nr. 2, S. 271–279, Nov. 2010.
- [21] J. Storek. M. A. Dawson, B. Storer, T. Stevens-Ayers, D. G. Maloney, K.A. Marr, R. P. Witherspoon, W. Bensinger, M. E. Flowers, P. Martin, R. Storb, F. R. Appelbaum und M. Boeckh, „Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation“, *Blood*, Bd. 97, Nr. 11, S. 3380–3389, Juni 2001.
- [22] A. Marie-Cardine, F. Divay, I. Dutot, A. Green, A. Perdrix, O. Boyer, N. Contentin, H. Tilly, F. Tron, J.-P. Vannier und S. Jacquot, „Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation“, *Clin. Immunol. Orlando Fla*, Bd. 127, Nr. 1, S. 14–25, Apr. 2008.
- [23] E. Meijer und J. J. Cornelissen, „Epstein–Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: molecular monitoring and early treatment of high-risk patients“, *Curr. Opin. Hematol.*, Bd. 15, Nr. 6, S. 576, Nov. 2008.
- [24] T. Parkkali, T. Ruutu, M. Stenvik, T. Kuronen, H. Käyhty, T. Hovi, R. M. Olander, L. Volin und P. Ruutu, „Loss of protective immunity to polio, diphtheria and Haemophilus influenzae type B after allogeneic bone marrow transplantation“, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, Bd. 104, Nr. 5, S. 383–388, Mai 1996.

- [25] K. Kawamura, R. Yamazaki, Y. Akahoshi, H. Nakano, T. Ugai, H. Wada, R. Yamasaki, Y. Ishihara, K. Sakamoto, M. Ashizawa, M. Ashizawa, M. Sato, K. Terasako-Saito, S. Kimura, M. Kikuchi, H. Nakasone, J. Kanda, S. Kako, A. Tanihara, J. Nishida und Y. Kanda, „Evaluation of the immune status against measles, mumps, and rubella in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients“, *Hematol. Amst. Neth.*, Bd. 20, Nr. 2, S. 77–82, März 2015.
- [26] P. Ljungman, D. Engelhard, R. de la Cámara, H. Einsele, A. Locasciulli, R. Martino, P. Ribaud, K. Ward und C. Cordonnier, „Vaccination of stem cell transplant recipients: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT“, *Bone Marrow Transplant.*, Bd. 35, Nr. 8, S. 737–746, Apr. 2005.
- [27] K. Warnatz und M. Schlesier, „Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency“, *Cytometry B Clin. Cytom.*, Bd. 74, Nr. 5, S. 261–271, Sep. 2008.
- [28] J. G. Monroe und K. Dorshkind, „Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development“, *Adv. Immunol.*, Bd. 95, S. 1–50, 2007.
- [29] F. Melchers, A. Rolink, U. Grawunder, T. H. Winkler, H. Karasuyama, P. Ghia und J. Andersson, „Positive and negative selection events during B lymphopoiesis“, *Curr. Opin. Immunol.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 214–227, Apr. 1995.
- [30] H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, und M. C. Nussenzweig, „Predominant autoantibody production by early human B cell precursors“, *Science*, Bd. 301, Nr. 5638, S. 1374–1377, Sep. 2003.
- [31] G. P. Sims, R. Ettinger, Y. Shirota, C. H. Yarboro, G. G. Illei, und P. E. Lipsky, „Identification and characterization of circulating human transitional B cells“, *Blood*, Bd. 105, Nr. 11, S. 4390–4398, Juni 2005.
- [32] C. R. Smulski und H. Eibel, „BAFF and BAFF-Receptor in B cell selection and survival“, *Front. Immunol.*, Bd. 9, Nr. 2285, Okt. 2018.
- [33] S. Pillai und A. Cariappa, „The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 9, Nr. 11, S. 767–777, Nov. 2009.
- [34] U. Klein, K. Rajewsky, und R. Küppers, „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.*, Bd. 188, Nr. 9, S. 1679–1689, Nov. 1998.

- [35] S. Weller, M. C. Braun, B. K. Tan, A. Rosenwald, C. Cordier, M. E. Conley, A. Plebani, D. S. Kumararatne, D. Bonnet, O. Tournihac, G. Tchernia, B. Steiniger, L. M. Staudt, J.-L. Casanova, C.-A. Reynaud und J.-C. Weill, „Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire“, *Blood*, Bd. 104, Nr. 12, S. 3647–3654, Dez. 2004.
- [36] J. Hendricks, N. A. Bos, und F. G. M. Kroese, „Heterogeneity of memory marginal zone B cells“, *Crit. Rev. Immunol.*, Bd. 38, Nr. 2, S. 145–158, 2018.
- [37] R. E. Mebius und G. Kraal, „Structure and function of the spleen“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 5, Nr. 8, S. 606–616, Aug. 2005.
- [38] M. Seifert und R. Küppers, „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.*, Bd. 206, Nr. 12, S. 2659–2669, Nov. 2009.
- [39] I. Puga, M. Cols, C. M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, G. Magri, D. M. Knowles, W. Tam, A. Chiu, J. B. Bussel, S. Serrano, J. A. Lorrente, B. Bellosillo, J. Lloreta, N. Juanpere, F. Alameda, T. Baró, C. D. de Heredia, N. Torán, A. Català, M. Torrebadell, C. Fortuny, V. Cusí, C. Carreras, G. A. Diaz, J. M. Blander, C.-M. Farber, G. Silvestri, C. Cunningham-Rundles, M. Calvillo, C. Dufour, L. D. Notarangelo, V. Lougaris, A. Plebani, J.-L. Casanova, S. C. Ganal, A. Diefenbach, J. I. Arostegui, M. Juan, J. Yague, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen und A. Cerutti, „B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen“, *Nat. Immunol.*, Bd. 13, Nr. 2, S. 170–180, Dez. 2011.
- [40] L. Genestier, M. Taillardet, P. Mondiere, H. Gheit, C. Bella, und T. Defrance, „TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 178, Nr. 12, S. 7779–7786, Juni 2007.
- [41] A. Cerutti, M. Cols, und I. Puga, „Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 13, Nr. 2, S. 118–132, Feb. 2013.
- [42] C. Wie, J. Anolik, A. Cappione, B. Zheng, A. Pugh-Bernard, J. Brooks, E.-H. Lee, E. C. B. Milner und I. Sanz, „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.*, Bd. 178, Nr. 10, S. 6624–6633, Mai 2007.
- [43] R. A. Moura, C. Quaresma, A. R. Vieira, J. J. Gonçalves, J. Polido-Pereira, V. C. Romão, N. Martins, H. Canhã und J. E. Fonseca, „B-cell phenotype and IgD-CD27- memory B cells are affected by TNF-inhibitors and tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis“, *PLOS ONE*, Bd. 12, Nr. 9, S. e0182927, Sep. 2017.
- [44] M. Shapiro-Shelef und K. Calame, „Regulation of plasma-cell development“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 5, Nr. 3, S. 230–242, März 2005.
- [45] S. Constant, N. Schweitzer, J. West, P. Ranney, und K. Bottomly, „B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 155, Nr. 8, S. 3734–3741, Okt. 1995.
- [46] K. Kometani, R. Nakagawa, R. Shinnakasu, T. Kajii, A. Rybouchkin, S. Moriyama, K. Furukawa, H. Koseki, T. Takemori und T. Kurosaki, „Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation“, *Immunity*, Bd. 39, Nr. 1, S. 136–147, Juli 2013.
- [47] N. S. De Silva und U. Klein, „Dynamics of B cells in germinal centres“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 15, Nr. 3, S. 137–148, März 2015.
- [48] T. I. Arnon, R. M. Horton, I. L. Grigorova, und J. G. Cyster, „Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress“, *Nature*, Bd. 493, Nr. 7434, S. 684–688, Jan. 2013.
- [49] Y. R. Carrasco und F. D. Batista, „B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node“, *Immunity*, Bd. 27, Nr. 1, S. 160–171, Juli 2007.
- [50] J. G. Cyster, K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther und V. N. Ngo, „Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles“, *Immunol. Rev.*, Bd. 176, S. 181–193, Aug. 2000.
- [51] K. Reif, E. H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Förster und J. G. Cyster, „Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position“, *Nature*, Bd. 416, Nr. 6876, S. 94–99, März 2002.
- [52] F. Coffey, B. Alabyev, und T. Manser, „Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles“, *Immunity*, Bd. 30, Nr. 4, S. 599–609, Apr. 2009.
- [53] I. C. M. MacLennan, K.-M. Toellner, A. F. Cunningham, K. Serre, D. M.-Y. Sze, E.

- Zúñiga, M. C. Cook und C. G. Vinuesa, „Extrafollicular antibody responses“, *Immunol. Rev.*, Bd. 194, S. 8–18, Aug. 2003.
- [54] S. M. Kerfoot, G. Yaari, J. R. Patel, K. L. Johnson, D. G. Gonzalez, S. H. Kleinstein und A. M. Haberman, „Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone“, *Immunity*, Bd. 34, Nr. 6, S. 947–960, Juni 2011.
- [55] G. D. Victora und M. C. Nussenzweig, „Germinal centers“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 30, S. 429–457, 2012.
- [56] G. D. Victora, D. Dominguez-Sola, A. B. Holmes, S. Deroubaix, R. Dalla-Favera, und M. C. Nussenzweig, „Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas“, *Blood*, Bd. 120, Nr. 11, S. 2240–2248, Sep. 2012.
- [57] M. Muramatsu, K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, und T. Honjo, „Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme“, *Cell*, Bd. 102, Nr. 5, S. 553–563, Sep. 2000.
- [58] D. Depoil, R. Zaru, M. Guiraud, A. Chauveau, J. Harriague, G. Bismuth, C. Utzny, S. Müller und S. Valitutti, „Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization“, *Immunity*, Bd. 22, Nr. 2, S. 185–194, Feb. 2005.
- [59] A. Oxenius, K. A. Campbell, C. R. Maliszewski, T. Kishimoto, H. Kikutani, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel und M. F. Bachmann, „CD40-CD40 ligand interactions are critical in T-B cooperation but not for other anti-viral CD4+ T cell functions“, *J. Exp. Med.*, Bd. 183, Nr. 5, S. 2209–2218, Mai 1996.
- [60] C. G. Vinuesa, M. A. Linterman, D. Yu, und I. C. M. MacLennan, „Follicular Helper T Cells“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 34, S. 335–368, 2016.
- [61] G. D. Victora, T. A. Schwickert, D. R. Fooksman, A. O. Kamphorst, M. Meyer-Hermann, M. L. Dustin und M. C. Nussenzweig, „Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy using a photoactivatable fluorescent reporter“, *Cell*, Bd. 143, Nr. 4, S. 592–605, Nov. 2010.
- [62] D. Butt, T. D. Chan, K. Bourne, J. R. Hermes, A. Nguyen, A. Statham, L. A. O'Reilly, A. Strasser, S. Price, P. Schofield, D. Christ, A. Basten, C. S. Ma, S. G. Tangye, T. G. Phan, V. K. Rao und R. Brink, „FAS inactivation releases unconventional germinal center B Cells that escape antigen control and drive IgE

- and autoantibody production“, *Immunity*, Bd. 42, Nr. 5, S. 890–902, Mai 2015.
- [63] T. L. Rothstein, „Inducible resistance to Fas-mediated apoptosis in B cells“, *Cell Res.*, Bd. 10, Nr. 4, S. 245–266, Dez. 2000.
- [64] K. L. Good-Jacobson und M. J. Shlomchik, „Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 185, Nr. 6, S. 3117–3125, Sep. 2010.
- [65] G. Koopman, C. Reutelingsperger, G. Kuijten, R. Keehnen, S. Pals, und M. van Oers, Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, Bd. 84, Nr. 5, S. 1415–1420, 1994.
- [66] P. J. Martin, D. Weisdorf, D. Przepiorka, S. Hirschfeld, A. Farrell, J. D. Rizzo, R. Foley, G. Socie, S. Carter, D. Couriel, D. R. Schultz, M. E. D. Flowers, A. H. Filipovich, R. Saliba, G. B. Vogelsang, S. Z. Pavletic und S. J. Lee, „National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-Host Disease: VI. Design of Clinical Trials Working Group report“, *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, Bd. 12, Nr. 5, S. 491–505, Mai 2006.
- [67] A. Mensen, Y. Oh, S. C. Becker, P. G. Hemmati, C. Jehn, J. Westermann, M. Szyska, H. Göldner, B. Dörken, C. Scheibenbogen, R. Arnold und I.-K. Na, „Apoptosis susceptibility prolongs the lack of memory B cells in acute leukemic patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“, *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, Bd. 21, Nr. 11, S. 1895–1906, Nov. 2015.
- [68] S. Sengsayadeth, B. N. Savani, D. Blaise, F. Malard, A. Nagler, und M. Mohty, „Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT“, *Haematologica*, Bd. 100, Nr. 7, S. 859–869, Juli 2015.
- [69] N. Schmitt, S.-E. Bentebibel, und H. Ueno, „Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood“, *Trends Immunol.*, Bd. 35, Nr. 9, S. 436–442, Sep. 2014.
- [70] K. A. Frauwirth und C. B. Thompson, „Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 109, Nr. 3, S. 295–299, Feb. 2002.
- [71] S. Lacotte, S. Brun, S. Muller, und H. Dumortier, „CXCR3, inflammation, and

- autoimmune diseases“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 1173, S. 310–317, Sep. 2009.
- [72] W. Ise, K. Fujii, K. Shiroguchi, A. Ito, K. Kometani, K. Takeda, E. Kawakami, K. Yamashita, K. Suzuki, T. Okada und T. Kurosaki, „T follicular helper cell-germinal center B Cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling germinal center cell fate“, *Immunity*, Bd. 48, Nr. 4, S. 702-715, Apr. 2018.
- [73] M. Bosch, F. M. Khan und J. Storek, „Immune reconstitution after antithymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation“, *Cytotherapy*, Bd. 14, Nr. 10, S. 1258–1275, Nov. 2012.
- [74] L. J. D’Orsogna, M. P. Wright, R. G. Krueger, E. J. McKinnon, S I. Buffery, C. S. Witt, N. Staples, R. Loh, P. K. Cannell, F. T. Christiansen und M. A. French, „Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients Have Defects of Both Switched and IgM Memory B Cells“, *Biol. Blood Marrow Transplant.*, Bd. 15, Nr. 7, S. 795–803, Juli 2009.
- [75] D. Kumar, A. Humar, A. Plevneshi, D. Siegal, N. Franke, K. Green und A. McGeer, „Invasive pneumococcal disease in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: a decade of prospective population-based surveillance“, *Bone Marrow Transplant.*, Bd. 41, Nr. 8, S. 743–747, Apr. 2008.
- [76] S. Ringhoffer, M. Rojewski, H. Döhner, D. Bunjes, und M. Ringhoffer, „T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/ β TREC ratio and thymic naive T cells“, *Haematologica*, Bd. 98, Nr. 10, S. 1600–1608, Okt. 2013.
- [77] R. Morita, N. Schmitt, S.-E. Bentebibel, R. Ranganathan, L. Bourdery, G. Zurawski, E. Foucat, M. Dullaers, S, Oh, N. Sabzghabaei, E. M. Lavecchio, M. Punaro, V. Pascual, J. Banchereau und H. Ueno, „Human blood CXCR5(+)/CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion“, *Immunity*, Bd. 34, Nr. 1, S. 108–121, Jan. 2011.
- [78] N. Chevalier, D. Jarrossay, E. Ho, D. T. Avery, C. S. Ma, D. Yu, F. Sallusto, S. G. Tangye und C. R. Mackay, „CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 186, Nr. 10, S. 5556–5568, Mai 2011.
- [79] E. Forcade, H. T. Kim, C. Cutler, K. Wang, A. C. Alho, S. Nikiforow, V. T. Ho, J. Koreth, P. Armand, E. P. Alyea, B. R. Blazar, R. J. Soiffer, J. H. Antin und J. Ritz, „Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-

- versus-host disease“, *Blood*, Bd. 127, Nr. 20, S. 2489–2497, Mai 2016.
- [80] K. Warnatz, L. Bossaller, U. Salzer, A. Skrabl-Baumgarner, W. Schwinger, M. van der Burg, J. J. M. van Dongen, M. Orlowska-Volk, A. Durandy, R. Draeger, M. Schlesier, H. H. Peter und B. Grimbacher, „Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency“, *Blood*, Bd. 107, Nr. 8, S. 3045–3052, Apr. 2006.
- [81] D. Liu, H. Xu, C. Shih, Z. Wan, X. Ma, W. Ma, D. Luo und H. Qi, „T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction“, *Nature*, Bd. 517, Nr. 7533, S. 214–218, Jan. 2015.
- [82] L. Bossaller, J. Burger, R. Draeger, B. Grimbacher, R. Knoth, A. Plebani, A. Durandy, U. Baumann, M. Schlesier, A. A. Welcher, H. H. Peter und K. Warnatz, „ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells“, *J. Immunol.*, Bd. 177, Nr. 7, S. 4927–4932, Okt. 2006.
- [83] C. D. C. Allen und J. G. Cyster, „Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function“, *Semin. Immunol.*, Bd. 20, Nr. 1, S. 14–25, Feb. 2008.
- [84] R. Förster, A. E. Mattis, E. Kremmer, E. Wolf, G. Brem, und M. Lipp, „A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen“, *Cell*, Bd. 87, Nr. 6, S. 1037–1047, Dez. 1996.
- [85] G. Cinamon, M. A. Zachariah, O. M. Lam, F. W. Foss, und J. G. Cyster, „Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport“, *Nat. Immunol.*, Bd. 9, Nr. 1, S. 54–62, Jan. 2008.
- [86] J. R. Darce, B. K. Arendt, X. Wu, und D. F. Jelinek, „Regulated expression of BAFF-binding receptors during Human B cell differentiation“, *J. Immunol.*, Bd. 179, Nr. 11, S. 7276–7286, Dez. 2007.
- [87] K. Warnatz, U. Salzer, M. Rizzi, B. Fischer, S. Gutenberger, J. Böhm, A.-K. Kienzler, Q. Pan-Hammarström, L. Hammarström, M. Rakhmanov, M. Schlesier, B. Grimbacher, H.-H. Peter und H. Eibel, „B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 106, Nr. 33, S. 13945–13950, Aug. 2009.
- [88] Z. S. Rahman, S. P. Rao, S. L. Kalled, und T. Manser, „Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R

- signaling-deficient Mice“, *J. Exp. Med.*, Bd. 198, Nr. 8, S. 1157–1169, Okt. 2003.
- [89] R. K. G. Do, E. Hatada, H. Lee, M. R. Tourigny, D. Hilbert, und S. Chen-Kiang, „Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response“, *J. Exp. Med.*, Bd. 192, Nr. 7, S. 953–964, Okt. 2000.
- [90] G. R. Hill, J. M. Crawford, K. R. Cooke, Y. S. Brinson, L. Pan, und J. L. Ferrara, „Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines“, *Blood*, Bd. 90, Nr. 8, S. 3204–3213, Okt. 1997.
- [91] G. R. Hill, „Inflammation and bone marrow transplantation“, *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, Bd. 15, Nr. 1 Suppl, S. 139–141, Jan. 2009.
- [92] J. J. Melenhorst, X. Tian, D. Xu, N. G. Sandler, P. Scheinberg, A. Biancotto, P. Scheinberg, J. P. McCoy, N. F. Hensel, Z. McIver, D. C. Douek und A. J. Barrett, „Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuations after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“, *Haematologica*, Bd. 97, Nr. 6, S. 867–873, Juni 2012.
- [93] C. K. Min, W. Y. Lee, D. J. Min, D. G. Lee, Y. J. Kim, Y. H. Park, H. J. Kim, S. Lee, D. W. Kim, J. W. Lee, W. S. Min und C. C. Kim, „The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“, *Bone Marrow Transplant.*, Bd. 28, Nr. 10, S. 935–940, Nov. 2001.
- [94] D. Cain, M. Kondo, H. Chen, und G. Kelsoe, „Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation“, *J. Invest. Dermatol.*, Bd. 129, Nr. 2, S. 266–277, Feb. 2009.
- [95] J. Maciejewski, C. Selleri, S. Anderson, und N. S. Young, „Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro“, *Blood*, Bd. 85, Nr. 11, S. 3183–3190, Juni 1995.
- [96] J. K. Booker, E. A. Reap, und P. L. Cohen, „Expression and function of Fas on cells damaged by gamma-irradiation in B6 and B6/lpr mice“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 161, Nr. 9, S. 4536–4541, Nov. 1998.
- [97] X. Bian, T. D. Giordano, H.-J. Lin, G. Solomon, V. P. Castle, und A. W. Opipari, „Chemotherapy-induced apoptosis of S-type neuroblastoma cells requires caspase-9 and is augmented by CD95/Fas stimulation“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279,

- Nr. 6, S. 4663–4669, Feb. 2004.
- [98] L.-Y. Chang, Y. Li, und D. E. Kaplan, „Endotoxemia contributes to CD27+ memory B-cell apoptosis via enhanced sensitivity to Fas ligation in patients with Cirrhosis“, *Sci. Rep.*, Bd. 6, Nr. 36862, Nov. 2016.
- [99] A. Tahanovich und A. Kadushkin, „Chemokine receptor CXCR3 expression on naive and memory B-lymphocytes of patients with COPD“, *Eur. Respir. J.*, Bd. 50, Nr. suppl 61, S. PA2025, Sep. 2017.
- [100] M. Henneken, T. Dörner, G.-R. Burmester, und C. Berek, „Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus“, *Arthritis Res. Ther.*, Bd. 7, S. 1001–1013, Feb. 2005.
- [101] M. W. Nicholas, M. A. Dooley, S. L. Hogan, J. Anolik, J. Looney, I. Sanz und S. H. Clarke, „A novel subset of memory B cells is enriched in autoreactivity and correlates with adverse outcomes in SLE“, *Clin. Immunol. Orlando Fla*, Bd. 126, Nr. 2, S. 189–201, Feb. 2008.
- [102] S. Sato, M. Fujimoto, M. Hasegawa, und K. Takehara, „Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells“, *Arthritis Rheum.*, Bd. 50, Nr. 6, S. 1918–1927, Juni 2004.
- [103] D. Catalán, O. Aravena, F. Sabugo, P. Wurmman, L. Soto, A. M. Kalergis, M. Cuchacovich und J. C. Aguillón, „B cells from rheumatoid arthritis patients show important alterations in the expression of CD86 and FcγRIIb, which are modulated by anti-tumor necrosis factor therapy“, *Arthritis Res. Ther.*, Bd. 12, Nr. 2, S. R68, 2010.
- [104] D. C. Rookhuizen und A. L. DeFranco, „Toll-like receptor 9 signaling acts on multiple elements of the germinal center to enhance antibody responses“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 111, Nr. 31, S. E3224-3233, Aug. 2014.
- [105] W. Jiang, M. M. Lederman, C. V. Harding, B. Rodriguez, R. J. Mohner, und S. F. Sieg, „TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function“, *Eur. J. Immunol.*, Bd. 37, Nr. 8, S. 2205–2213, Aug. 2007.
- [106] Y. J. Liu, D. Y. Mason, G. D. Johnson, S. Abbot, C. D. Gregory, D. L. Hardie J. Gordon und I. C. MacLennan, „Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis“, *Eur. J. Immunol.*,

- Bd. 21, Nr. 8, S. 1905–1910, Aug. 1991.
- [107] K. G. Smith, U. Weiss, K. Rajewsky, G. J. Nossal, und D. M. Tarlinton, „Bcl-2 increases memory B cell recruitment but does not perturb selection in germinal centers“, *Immunity*, Bd. 1, Nr. 9, S. 803–813, Dez. 1994.
- [108] K. G. C. Smith, A. Light, L. A. O'Reilly, S.-M. Ang, A. Strasser, und D. Tarlinton, „bcl-2 Transgene Expression Inhibits Apoptosis in the Germinal Center and Reveals Differences in the Selection of Memory B Cells and Bone Marrow Antibody-Forming Cells“, *J. Exp. Med.*, Bd. 191, Nr. 3, S. 475–484, Feb. 2000.
- [109] E. J. Schattner, K. B. Elkon, D. H. Yoo, J. Tumang, P. H. Krammer, M. K. Crow und S. M. Friedman, „CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway“, *J. Exp. Med.*, Bd. 182, Nr. 5, S. 1557–1565, Nov. 1995.
- [110] A. Hennino, M. Bérard, P. H. Krammer, und T. Defrance, „Flice-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis“, *J. Exp. Med.*, Bd. 193, Nr. 4, S. 447–458, Feb. 2001.
- [111] Z. Hao, G. S. Duncan, J. Seagal, Y.-W. Su, C. Hong, J. Haight, N.-J. Chen, A. Elia, A. Wakeham, W. Y. Li, J. Liepa, G. A. Wood S. Casola, K. Rajewsky und T. W. Mak, „Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis“, *Immunity*, Bd. 29, Nr. 4, S. 615–627, Okt. 2008.
- [112] N. Auphan, J. A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg, und M. Karin, „Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis“, *Science*, Bd. 270, Nr. 5234, S. 286–290, Okt. 1995.
- [113] F. Zhou, R. D. Medh, und E. B. Thompson, „Glucocorticoid mediated transcriptional repression of c-myc in apoptotic human leukemic CEM cells“, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Bd. 73, Nr. 5, S. 195–202, 2000.
- [114] B. Longoni, E. Boschi, G. C. Demontis, G. M. Ratto, und F. Mosca, „Apoptosis and adaptive responses to oxidative stress in human endothelial cells exposed to cyclosporin A correlate with BCL-2 expression levels“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, Bd. 15, Nr. 3, S. 731–740, März 2001.
- [115] M. S. Chaudhry, E. Velardi, F. Malard, und M. R. M. van den Brink, „Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell Transplantation: Time to T Up the Thymus“, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, Bd. 198, Nr. 1, S. 40–46, Jan. 2017.

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1	Liste der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer
Tabelle 2	Liste der verwendeten Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörper
Tabelle 3	Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien
Tabelle 4	Klinische Eigenschaften der Patientenkollektive
Abbildung 1.1	Schematische Darstellung der verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der Vorgänge im Keimzentrum
Abbildung 4.1	Erkennung der B-Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie
Abbildung 4.2	Anzahl der gesamten, transitionalen und naiven B-Zellen an Tag 180 und 360 nach alloHSZT
Abbildung 4.3	Anzahl der MZ-ähnlichen B-Zellen, Isotyp-gew. GZ, DN B-Zellen und Plasmablasten an Tag 180 und 360 nach alloHSZT
Abbildung 4.4	Erkennung der T-Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie
Abbildung 4.5	Anzahl der T-Zellen und ihrer Subpopulationen an Tag 180 und 360 nach alloHSZT
Abbildung 4.6	Verminderte Gedächtnis-FTH bei Patienten an Tag 360 nach alloHSZT
Abbildung 4.7	Durchflusszytometrische Analyse der funktionellen Oberflächenmarker auf B-Zell-Subpopulationen
Abbildung 4.8	Verminderte CXCR5-, CCR7- und HLA-DR-Expression nach der alloHSZT
Abbildung 4.9	Fas (CD95)-Expression auf B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT
Abbildung 4.10	CD86- und CXCR3-Expression auf B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT
Abbildung 4.11	Verminderte BAFF-R-Expression auf B-Zell-Subpopulationen nach der alloHSZT
Abbildung 4.12	Gesteigerte B-Zell-Apoptoserate nach <i>in vitro</i> Stimulation bei Patienten ein Jahr nach der alloHSZT

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Youngseong Oh, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *Sekundäre Immundefekte nach allogener Stammzelltransplantation: Anhaltender Mangel an Gedächtnis-B-Zellen und Apoptoseneigung der B-Zellen bei in vitro Aktivierung* 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 (s. „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 der Publikation zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin 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 Strafgesetzbuch) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ich, Youngseong Oh, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Mensen A, Oh Y, Becker S C, Hemmati P G, Jehn C, Westermann J, Szyska M, Göldner H, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. „Apoptosis Susceptibility Prolongs the Lack of Memory B Cells in Acute Leukemic Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation“, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Bd. 21, Nr. 11, S. 1895–1906, Nov. 2015.

Beiträge im Einzelnen (konkrete Verweise auf die von mir im Wesentlichen mitgestalteten Absätze und Abbildungen sind aufgelistet):

1. Planung und Durchführung der Zellkultivierung und Durchflusszytometrie:
 - „Flow Cytometry“
 - „Apoptosis Staining“

2. Ergebnisauswertung:
 - „Sustained Low CD27+ Memory B Cell and CD4+ Memory T Follicular Helper Cell (TFH) Numbers After Allo-HSCT“, (*Figure 1*)
 - „Migration and Communication Defects Might Contribute to Defective GC-Reactions“, (*Figure 2*)
 - „High B Cell Apoptosis Rate After CD40/TLR-9 – dependent B Cell Activation“, (*Figure 3*)
 - „Stimulation-Induced B Cell Apoptosis is Paralleled by an Aberrant Up-Regulation of Fas-L on T cells and Fas on B Cells“, (*Figure 4*)
 - „High B Cell Apoptosis Rate after CD40/BCR and CD40/BCR/TLR-9 – dependent B Cell Activation“, (*Figure 5*)
 - „A Sustained Inflammatory Milieu is Present After Allo-HSCT“, (*Figure 6 A-B*)

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. med. Il-Kang Na, die dieses Projekt möglich machte und mich hervorragend in jedem Abschnitt dieser Dissertationsarbeit sowohl wissenschaftlich und methodisch unterstützte als auch menschlich begleitete. Außerdem gilt mein aufrichtiger Dank Frau Dr. rer. nat. Angela Schuhrke, die mich mit viel Geduld in die Laborarbeit einführte und mich durch die zahlreichen fachlichen Gespräche und Anmerkungen immer wieder neue Aspekte entdecken ließ. Frau Dr. rer. nat. Sonya Becker und Frau Sandra Bauer danke ich für Ihre konstruktive Unterstützung in der Laborarbeit. Ferner danke ich Frau Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen für die Bereitstellung des Laborraums sowie Herrn PD Dr. med. Philipp Hemmati, Herrn Prof. Dr. med. Olaf Penack, Herrn Dr. rer. nat. Giang Lam Vuong und Herrn Dr. med. Klaus Axel Nogai für die Vermittlung der Patientenproben. Für Ihre stetige Anteilnahme und Durchsicht der Arbeit danke ich Frau Dr. med. Helena Posch. Meinem Freund Marc Castillon danke ich aus dem ganzen Herzen für Alles.