

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Antithymozyten-Globulin auf die Rekonstitution verschiedener
Subpopulationen von T-Lymphozyten nach allogener hämatopoetischer
Stammzelltransplantation bei erwachsenen Patienten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friedrich Wittenbecher

aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Kurzdarstellung.....	1
1.1.1 Deutsche Kurzdarstellung	1
1.1.2 Englische Kurzdarstellung	3
1.2 Einführung.....	4
1.3 Methodik	5
1.3.1 Patienten	5
1.3.2 Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie	6
1.3.3 Zellkulturen	6
1.3.4 Untersuchung der Komplement-vermittelten Zytotoxizität	7
1.3.5 Kryokonservierung.....	7
1.3.6 Statistik.....	7
1.4 Ergebnisse	7
1.4.1 Rekonstitution der CD4 ⁺ T-Lymphozyten	8
1.4.2 Effekte von Antithymozyten-Globulin auf humane Thymozyten.....	9
1.4.3 Rekonstitution und Proliferation der CD8 ⁺ T-Lymphozyten	10
1.5 Diskussion	11
1.6 Literaturverzeichnis.....	17
2 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung.....	21
3 Druckexemplare der ausgewählten Originalpublikationen.....	24
3.1 Originalpublikation 1.....	25
3.2 Originalpublikation 2.....	34
3.3 Originalpublikation 3.....	39
3.4 Originalpublikation 4.....	49
4 Lebenslauf.....	60
5 Vollständige Publikationsliste.....	61
6 Danksagung	64

1 Zusammenfassung

Vorbemerkung: Diese Dissertation fasst meine Arbeiten zum Thema “*Einfluss von Antithymozyten-Globulin auf die Rekonstitution verschiedener Subpopulationen von T-Lymphozyten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei erwachsenen Patienten*” kumulativ als Publikationspromotion zusammen. Der Text der vorliegenden Zusammenfassung basiert zu großen Anteilen auf Übersetzungen von Teilen der ausgewählten Originalpublikationen 1 und 2 (siehe Abschnitt 3 *Druckexemplare der ausgewählten Originalpublikationen*), für die ich den Erstentwurf des Manuskripts sowie die Endversion erstellt habe.

1.1 Kurzdarstellung

1.1.1 Deutsche Kurzdarstellung

Einleitung: Die zeitgerechte Rekonstitution eines effektiven Immunsystems gehört zu den entscheidenden Faktoren für einen positiven klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT). Die wirksame Prophylaxe der Transplantat-gegen-Empfänger-Erkrankung (*englisch:* Graft-versus-Host-Disease, GvHD) ist ebenfalls wichtig für das Gesamtüberleben nach alloHSZT. Aus Kaninchen gewonnenes Antithymozyten-Globulin-Genzyme® (ATG-G [Thymoglobuline®]) wird häufig zur GvHD-Prophylaxe verwendet. Durch seine Lymphozyten-depletierende Wirkung trägt ATG-G jedoch zur Lymphopenie nach Transplantation bei. Die vorliegende Arbeit soll zum besseren Verständnis der Wirkung von ATG-G auf die Rekonstitution verschiedener T-Lymphozyten-Subpopulationen und die thymische Funktion beitragen.

Methodik: Vielfarben-Durchflusszytometrie wurde für phänotypische Analysen genutzt, um die Rekonstitution verschiedener T-Lymphozyten-Subpopulationen nach alloHSZT in 20 erwachsenen Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, die mit (n=12) und ohne (n=8) ATG-G behandelt wurden, zu bestimmen. Hierfür wurden Blutproben vor und bis zu 6 Monate nach Transplantation gesammelt. Apoptose und Nekrose von humanen Thymozyten und peripheren mononukleären Blutzellen wurden nach Behandlung mit verschiedenen ATG-Präparaten *in vitro* analysiert. Außerdem wurden Blutproben kryokonserviert für eine spätere

Analyse des Gehalts an T-Zell-Rezeptor-Exzisions-Kreisen (*englisch*: T cell receptor excision circle, TREC) sowie kappa-deletierenden Rekombinations-Exzisions-Kreisen (*englisch*: kappa-deleting recombination excision circle, KREC).

Ergebnisse: Patienten, die im Rahmen einer alloHSZT mit ATG-G behandelt wurden, zeigten nachhaltig erniedrigte Werte naiver konventioneller (*englisch*: conventional T cells, Tcon) sowie regulatorischer (*englisch*: regulatory T cells, Treg) CD4⁺ T-Lymphozyten. Die thymische Produktion dieser Zellen – gemessen anhand des Oberflächenmoleküls CD31 auf naiven (CD45RA⁺) Tcon und Treg – war für 6 Monate nach Transplantation signifikant niedriger in ATG-G-behandelten als in nicht mit ATG-G behandelten Patienten. Im Gedächtniskompartiment (CD45RA⁻) wurde sowohl für CD4⁺ als auch für CD8⁺ T-Lymphozyten eine Verschiebung hin zu einem Effektor-Gedächtnis-Phänotyp beobachtet, ohne dass dies mit erhöhten GvHD-Raten einherging. Weiterhin hatte ATG-G zytotoxische Effekte auf humane Thymozyten *in vitro*. Die simultane Messung des TREC- und KREC-Gehalts in den gesammelten Blutproben (durchgeführt durch andere Gruppenmitglieder) zeigte sich geeignet zur Verlaufskontrolle der T- und B-Zellrekonstitution nach alloHSZT.

Schlussfolgerung: Eine ATG-G-Behandlung im Rahmen der alloHSZT beeinträchtigt die thymische Regeneration von Tcon und Treg nach alloHSZT, und ATG-G hat vergleichsweise starke zytotoxische Effekte auf Thymozyten *in vitro*. Dies lässt vermuten, dass insbesondere ATG-G-behandelte Patienten von Thymus-protectiven Strategien bei alloHSZT profitieren könnten. Verschiedene ATG-Präparate sollten in kontrollierten Studien verglichen werden. Eine potenziell durch ATG-G verursachte Verschiebung hin zu einem Effektor-Gedächtnis-Phänotyp in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten geht nicht mit stark erhöhten GvHD-Raten einher.

1.1.2 Englische Kurzdarstellung

Introduction: Timely and effective immune reconstitution is one of the essential factors for a positive outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). Equally important is the potent prophylaxis of graft-versus-host disease (GvHD). Rabbit antithymocyte globulin-Genzyme® (ATG-G [Thymoglobuline®]) is commonly used to prevent GvHD. As a lymphocyte-depleting agent it adds, however, to lymphopenia post transplantation. The aim of this study was to contribute to the understanding of the effect of ATG-G on the reconstitution of different T-lymphocyte subsets and on thymic function in particular.

Methods: Multicolor flow cytometry was used for phenotypic analysis of T-lymphocyte subset reconstitution after alloHSCT in 20 adult patients with hematologic malignancies treated (n=12) or not treated (n=8) with ATG-G. Blood samples were taken before and up to 6 months after transplantation. Apoptosis and necrosis of human thymocytes and peripheral mononuclear blood cells (PBMC) after treatment with different ATG-preparations was analyzed *in vitro*. Additionally, blood samples were frozen for later simultaneous evaluation of T cell receptor excision circle (TREC) and kappa-deleting recombination excision circle (KREC) content.

Results: Patients undergoing alloHSCT and treated with ATG-G showed sustained low levels of naive conventional (Tcon) as well as regulatory (Treg) CD4⁺ T-lymphocytes. Thymic output of CD4⁺ T-lymphocytes in this group measured as CD31⁺ naive (CD45RA⁺) Tcon and Treg remained significantly lower for 6 months after transplantation than in patients not treated with ATG-G. In the memory (CD45RA⁻) compartment for both, CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes, characteristic shifts towards an effector memory phenotype could be observed in ATG-G treated patients without increased levels of GvHD. Furthermore, ATG-G had cytotoxic effects on human thymocytes *in vitro*. Simultaneous measurement of TREC and KREC content in the collected blood samples (conducted by other group members) proved suitable for immune monitoring of T-cell (TREC) and B-cell (KREC) reconstitution after alloHSCT.

Conclusion: ATG-G treatment in combination with the conditioning regimen impairs thymic production of Tcon and Treg in alloHSCT patients, and ATG-G has comparatively strong cytotoxic effects on human thymocytes *in vitro*. These results indicate, that especially patients treated with ATG-G could benefit from thymus-protective strategies and that controlled trials comparing different ATG-G-preparations are required. A shift towards an effector memory phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes potentially induced by ATG-G does not accelerate GvHD.

1.2 Einführung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT) ist eine potenziell kurative Therapieoption für unterschiedliche maligne hämatologische Erkrankungen. Zu den Gefahren nach Transplantation gehören unter anderem Rezidive, Zweitmalignome, die Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (*englisch*: Graft-versus-Host-Disease, GvHD), bei der sich transplantierte Immunzellen gegen Gewebe des Empfängers richten, sowie eine verzögerte oder defiziente Immunrekonstitution mit dem Risiko lebensbedrohlicher Infektionen [1, 2].

Für die Regeneration einer effektiven T-Zell-Immunität und die Rekonstitution eines breiten T-Zell-Rezeptor-Repertoires nach alloHSZT bedarf es der *de novo* Genese von T-Lymphozyten über den Thymus [3-5]. Somit ist aktives Thymusgewebe notwendig. Sowohl die Konditionierungstherapie, bei der es sich um die Chemotherapie beziehungsweise kombinierte Chemo- und Strahlentherapie direkt vor Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen handelt, als auch die thymische GvHD können neben anderen Faktoren schädigend auf den Thymus wirken [2, 5, 6]. Eine Möglichkeit zur Prophylaxe akuter GvHD ist die Gabe von Antithymozyten-Globulin (ATG), das vor allem zu einer T-Zell-Depletion *in vivo* führt, im Rahmen der Konditionierungstherapie [7, 8].

Im Rahmen der alloHSZT wird häufig aus Kaninchen gewonnenes ATG verwendet [7] und in der vorliegenden Arbeit wurden nur aus Kaninchen gewonnene (und nicht aus Pferden gewonnene) ATG-Präparate untersucht. Zur Herstellung dieser Präparate werden Kaninchen entweder mit humanen Thymozyten (ATG-Genzyme® [Thymoglobuline®], im Folgenden ATG-G) oder mit einer Jurkat-Zelllinie (ATG-Fresenius®, im Folgenden ATG-F) – also reifen humanen T-Zellen – immunisiert. Anschließend wird ein Antikörper-Gemisch mit unterschiedlichen Spezifitäten aus dem Kaninchen-Serum isoliert. Es handelt sich aufgrund der unterschiedlichen Herstellungsmethoden also um pharmakologisch unterschiedliche Produkte [8]. Die Wirkmechanismen dieser komplexen Gemische sind nur zum Teil verstanden und über die Effekte speziell auf die thymische Funktion nach alloHSZT ist nur wenig bekannt. Insbesondere die thymische Produktion regulatorischer T-Lymphozyten (*englisch*: regulatory T-cells, Treg) nach ATG-Behandlung wurde bisher nicht untersucht. Die Patienten in der vorliegenden Studie wurden mit ATG-G behandelt, die *in vitro* Versuche wurden auch mit ATG-F durchgeführt.

Zur Evaluierung der thymischen Produktion von naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten kann das Oberflächenmolekül CD31 (PECAM-1) genutzt werden. Die Expression von CD31 auf naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten korreliert mit einem hohen Gehalt an T-Zell-Rezeptor-Exzisions-Kreisen (*englisch*: T-cell receptor excision circles, TREC) [9]. TREC entstehen während der thymischen T-Zell-Genese (im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-Neuordnung, *englisch*: T-cell receptor rearrangement) und werden bei Zellteilungen nicht repliziert. Ein hoher Gehalt an TREC spricht also dafür, dass die T-Zelle den Thymus erst kürzlich verlassen hat und noch keine oder wenige Zellteilungen durchlaufen hat. Wegen der hohen Korrelation des TREC-Gehalts mit der CD31-Expression ist CD31 auf naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten also kennzeichnend für kürzlich thymisch generierte naive $CD4^+$ T-Lymphozyten (*englisch*: recent thymic emigrants, RTE) [9, 10]. Für die Identifikation von $CD8^+$ RTE ist bisher kein geeigneter Oberflächenmarker identifiziert worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von ATG-G zu untersuchen auf 1) die Rekonstitution der $CD4^+$ T-Lymphozyten – im Speziellen die thymische Produktion von konventionellen $CD4^+$ T-Lymphozyten (*englisch*: conventional T cells, Tcon) und Treg; 2) humane Thymozyten *in vitro* im Vergleich zu ATG-F; und 3) die Rekonstitution und Proliferation der $CD8^+$ T-Lymphozyten. Es sollte außerdem Patientenmaterial asserviert werden, um die Etablierung der Messungen von TREC und kappa-deletierenden Rekombinations-Exzisions-Kreisen (*englisch*: kappa-deleting recombination excision circles, KREC) mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*englisch*: real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) als Biomarker für thymische T-Zell-Neogenese (TREC) und B-Zell-Neogenese im Knochenmark (KREC) im Rahmen anderer Arbeiten der Arbeitsgruppe zu ermöglichen.

1.3 Methodik

1.3.1 Patienten

20 Patienten, die im Zeitraum von September 2009 bis Juli 2010 eine Humanes-Leukozytenantigen- (HLA-) passende alloHSZT in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin erhielten, wurden in die prospektive Studie eingeschlossen. Indikation für die alloHSZT waren maligne hämatologische Erkrankungen. In allen Fällen wurde das Transplantat durch Apherese von gesunden Spendern gewonnen. 12 Patienten, die Transplantate von nicht-verwandten Spendern erhielten, wurden zur GvHD-Prophylaxe mit ATG-G (ATG-Genzyme®

[Thymoglobuline®], Sanofi-Aventis® Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland, bei Erstellung der Originalpublikationen noch Genzyme®) behandelt (2 mg pro kg Körpergewicht an den Tagen -3, -2 und -1 vor Transplantation nach standardisierten Behandlungsprotokollen). Blutproben wurden vor Transplantation und an den Tagen 15, 30, 60, 90 und 180 nach Transplantation entnommen. Humane Thymozyten wurden während kardiochirurgischer Interventionen von pädiatrischen Patienten ohne maligne Erkrankungen gewonnen. Die Studien wurden von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Ethikvota Nr. EA4/128/0 und Nr. EA1/233/09) und alle Patienten haben ihr Einverständnis gegeben. Für Details zu Patienten und Konditionierungsschemata siehe Originalpublikation 1, Tabelle 1, Seite 27 und Originalpublikation 2, Tabelle 1, Seite 36.

1.3.2 Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Evaluation der Immunrekonstitutionskinetik wurden periphere mononukleäre Blutzellen (*englisch*: peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus frischen, heparinisierten Blutproben mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die isolierten PBMC wurden anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Details zu den Färbeprotokollen und den verwendeten Antikörpern für CD4⁺ T-Lymphozyten-Subpopulationen sind in Originalpublikation 1, Methodenteil, Seite 27 beschrieben, für CD8⁺ T-Lymphozyten-Subpopulationen in Originalpublikation 2, Methodenteil, Seite 36 und für B-Lymphozyten-Subpopulationen in Originalpublikation 3, Methodenteil, Seite 41. Nach Resuspension der Zellen wurde die phänotypische Analyse mit einem BD LSRII™ Durchflusszytometer durchgeführt, für die Analyse der Zellkulturen wurde ein BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer verwendet (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA). In beiden Fällen wurde die Software FlowJo® 9.3 (TreeStar, Ashland, OR, USA) zur Auswertung genutzt.

1.3.3 Zellkulturen

Humane Thymozyten wurden schrittweise dissoziiert und dann über Mikrosiebe in eine Einzelzell-Suspension überführt. PBMC aus frischen, heparinisierten Blutproben von gesunden Spendern wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Thymozyten und PBMC wurden dann entweder mit ATG-G oder ATG-F (ATG-Fresenius®, Neovii® Biotech GmbH, Gräfelfing, Deutschland, bei Erstellung der Originalpublikationen noch Fresenius-Biotech®) mit Konzentrationen von 2,5 µg/mL, 25 µg/mL oder 100 µg/mL für 20 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen mit Propidium Iodid und Annexin V

gefärbt und der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt, um Apoptose und Nekrose zu beurteilen. Details hierzu finden sich in Originalpublikation 1, Methodenteil, *Seite 27*.

1.3.4 Untersuchung der Komplement-vermittelten Zytotoxizität

Um Komplement-vermittelte Zytotoxizität zu untersuchen, wurden humane Thymozyten und PBMC mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/mL unter Zusatz von 2,5 µg/mL, 25 µg/mL oder 100 µg/mL ATG-G oder ATG-F in Kulturmedium resuspendiert und für 60 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL frisch präpariertem humanem Serum je Ansatz wurden die Zellen für 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidium Iodid gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Details hierzu finden sich in Originalpublikation 1, Methodenteil, *Seite 28*.

1.3.5 Kryokonservierung

Zu jedem Entnahmepunkt wurden PBMC der Spender kryokonserviert. Diese Proben wurden von anderen Gruppenmitgliedern verwendet, um die Immunrekonstitution mittels quantitativer real-time PCR zu evaluieren. Details hierzu finden sich in Originalpublikation 3, Methodenteil, *Seite 42*.

1.3.6 Statistik

Die grafische und statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism® v5.0 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Bei der Darstellung wurden Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Für Gruppenvergleiche wurde der Mann-Whitney U Test verwendet. p-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

1.4 Ergebnisse

Um den Verlauf der Immunrekonstitution nach alloHSZT beurteilen zu können, wurde nach den genannten Kriterien Patientenmaterial durchflusszytometrisch evaluiert. Entsprechend der Fragestellung lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf dem Einfluss von ATG-G auf die Immunrekonstitution, daher wurde eine Gruppe ATG-G-behandelter Patienten (n=12, im Folgenden ATG-G-Gruppe) mit einer Gruppe Patienten verglichen, die kein ATG-G erhielten (n=8, im Folgenden nicht-ATG-G-Gruppe).

1.4.1 Rekonstitution der CD4⁺ T-Lymphozyten

ATG-G-behandelte Patienten zeigen bis Tag+180 nach Transplantation signifikant erniedrigte Zellzahlen für Tcon und Treg

Im CD4⁺ T-Zell-Kompartiment wurde die Rekonstitution von Tcon und Treg analysiert (siehe Originalpublikation 1, Abbildung 1, Seite 29). Im Vergleich zur nicht-ATG-G-Gruppe zeigte sich in der ATG-G-Gruppe eine verzögerte Rekonstitution von Tcon- und Treg-Zellzahlen. Die Zellzahlen waren für Tcon und Treg in der ATG-G-Gruppe insgesamt signifikant niedriger als in der nicht-ATG-G-Gruppe (Ausnahme Tag+60 für Treg). Sowohl Tcon- als auch Treg-Zellzahlen sind in der ATG-G-Gruppe zu Tag+15 um mehr als 95% gefallen. Bis Tag+180 wurden in der ATG-G-Gruppe Zellzahlen von 250/ μ L Vollblut für Tcon und 15/ μ L Vollblut für Treg nicht überschritten. Somit wurden in beiden Zellpopulationen nicht die Ausgangswerte erreicht.

Die Rekonstitution von CD4⁺ T-Lymphozyten unterscheidet sich in ATG-G-behandelten Patienten in naiven und Gedächtnis-Subpopulationen

Um Erkenntnis über mögliche Unterschiede in der Rekonstitution verschiedener CD4⁺ T-Lymphozyten-Subpopulation zu erlangen, wurden naive (CD45RO⁻CD45RA⁺) und Gedächtnis- (CD45RO⁺CD45RA⁻) Tcon und Treg betrachtet (siehe Originalpublikation 1, Abbildung 2A-D, Seite 29). Insbesondere die Rekonstitution der naiven Tcon und Treg war beeinträchtigt in der ATG-G-Gruppe, und es zeigten sich zu allen Zeitpunkten nach Transplantation signifikant niedrigere Zellzahlen als in der nicht-ATG-G-Gruppe. An Tag+180 waren die Zellzahlen für naive Tcon und naive Treg in der ATG-G-Gruppe weiterhin signifikant niedriger als in der nicht-ATG-G-Gruppe ($p < 0,05$ für beide Subpopulationen).

Auch die Gedächtnis-Tcon- und -Treg-Zellzahlen stiegen in der ATG-G-Gruppe verzögert an im Vergleich zur nicht-ATG-G-Gruppe. Allerdings stiegen die Gedächtnis-Zellzahlen ab Tag+30 nach Transplantation in der ATG-G-Gruppe schneller an als die naiven Zellzahlen.

Für Gesamt-CD4⁺ T-Lymphozyten wurde das Gedächtniskompartiment weiter unterteilt in zentrale Gedächtniszellen (*englisch*: central memory, CM; CD45RO⁺CD62L⁺CCR7⁺) und Effektorgedächtniszellen (effector memory, EM; CD45RO⁺CD62L⁻CCR7⁻; siehe Originalpublikation 1, Abbildung 2E-F, Seite 29). Die mittleren CD4⁺ CM T-Lymphozyten-Zahlen zeigten in der ATG-G-Gruppe einen fast vollständigen Abfall an Tag+15 nach Transplantation und waren zu allen Zeitpunkten außer an Tag+60 signifikant niedriger als in der nicht-ATG-G-Gruppe. Auch die CD4⁺ EM T-Lymphozyten-Zahlen fielen in der ATG-G-Gruppe deutlich ab an Tag+15 und waren signifikant niedriger an Tag+15 als in der nicht-ATG-G-Gruppe

($p < 0,01$). Die $CD4^+$ EM T-Lymphozyten-Zahlen stiegen schneller wieder an und waren zu den übrigen Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur nicht-ATG-G-Gruppe.

Die thymische Regeneration von Tcon und Treg ist verzögert bei ATG-G-behandelten Patienten

Um die Rolle des Thymus in der Regeneration von Tcon und Treg beurteilen zu können, wurden $CD31^+$ Tcon RTE und Treg RTE analysiert (siehe Originalpublikation 1, Abbildung 3, Seite 30). In der ATG-G-Gruppe kam es zu einem nahezu kompletten Verlust der Tcon RTE und Treg RTE nach Transplantation. Sowohl Tcon RTE- als auch Treg RTE-Zellzahlen in der ATG-G-Gruppe waren zu allen Zeitpunkten nach Transplantation signifikant niedriger als in der nicht-ATG-G-Gruppe. Erst an Tag+180 stiegen die Tcon RTE der ATG-G-Gruppe wieder leicht an, die Mittelwerte der Treg RTE der ATG-G-Gruppe blieben zu allen Zeitpunkten nach Transplantation unter 0,2 Zellen/ μ L Vollblut.

1.4.2 Effekte von Antithymozyten-Globulin auf humane Thymozyten

Zytotoxische Effekte auf Thymozyten in vitro durch ATG-G und ATG-F

Unter der Hypothese, dass ATG-G auch einen direkten Effekt auf Thymozyten hat, wurde die Lebensfähigkeit von Thymozyten *in vitro* unter ATG-G Exposition getestet. Darüber hinaus wurde der Effekt von ATG-G mit dem Effekt von ATG-F verglichen (siehe Originalpublikation 1, Abbildung 4, Seite 31).

Bei Analyse der Thymozyten fiel auf, dass es nach Behandlung mit 25 μ g/mL oder höheren Konzentrationen ATG-G zu signifikant mehr apoptotischen ($PI^-/AnnexinV^+$, $p < 0,01$) sowie nekrotischen ($PI^+/AnnexinV^-$, $p < 0,01$) Thymozyten im Vergleich zu den unbehandelten Thymozyten kam. ATG-F führte erst ab einer Konzentration von 100 μ g/ml zu einem vergleichbaren Effekt. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigten sich nach Behandlung mit 25 μ g/mL ATG-G sowie ATG-F signifikant höhere Zellzahlen spät-apoptotischer und nekrotischer ($PI^+/AnnexinV^+$) Thymozyten. Zusätzlich war die Zahl spät-apoptotischer und nekrotischer Thymozyten signifikant höher nach Behandlung mit ATG-G als nach Behandlung mit ATG-F ($p < 0,05$). Hinsichtlich apoptotischer ($PI^-/AnnexinV^+$) und nekrotischer ($PI^+/AnnexinV^-$) Thymozyten gab es bei keiner Konzentration signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen ATG-Präparaten.

Komplement-vermittelte Zelllyse durch ATG

Die Komplement-vermittelte Zelllyse wurde als ein weiterer wichtiger Mechanismus für Zelltod untersucht. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Lyse sowohl von Thymozyten als auch von PBMC durch beide ATG-Präparate. ATG-G verursachte mehr komplementvermittelte Lyse von Thymozyten und PBMC als ATG-F, bei Konzentrationen von 25 µg/mL und 100 µg/mL beider Präparate (siehe Originalpublikation 1, Abbildung 5, Seite 31).

1.4.3 Rekonstitution und Proliferation der CD8⁺ T-Lymphozyten

Proliferative Aktivität von CD8⁺ T-Lymphozyten

Um die proliferative Aktivität der CD8⁺ T-Lymphozyten abzuschätzen, wurde der Anteil Ki67⁺ Zellen gemessen (siehe Originalpublikation 2, Abbildung 1, Seite 37). An Tag+15 war der Anteil proliferierender CD8⁺ T-Lymphozyten in der ATG-G-Gruppe signifikant höher als in der nicht-ATG-G-Gruppe. Bei einem Vergleich der Proliferation von CD45RA⁺ und CD45RA⁻ CD8⁺ T-Lymphozyten innerhalb der ATG-G-Gruppe zeigten sich höhere Anteile proliferierender CD45RA⁻ CD8⁺ T-Lymphozyten zu allen Zeitpunkten nach Transplantation. Die Unterschiede im Vergleich zu CD45RA⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten waren signifikant an den Tagen +60, +90 und +180. An Tag+15 war auch der Anteil Ki67⁺ CD45RA⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten auffallend hoch, dieser Anteil fiel aber zu Tag+30.

Die Rekonstitution von CD8⁺ T-Lymphozyten unterscheidet sich in ATG-G-behandelten Patienten in naiven und Gedächtnis-Subpopulationen

Bei Betrachtung verschiedener CD8⁺ T-Lymphozyten-Subpopulationen fiel auf, dass der prozentuale Anteil der Effektorgedächtniszellen (*englisch*: effector memory, EM; CD45RA⁻CCR7⁻) in der ATG-G-Gruppe zu allen Zeitpunkten außer Tag+180 signifikant höher war als in der nicht-ATG-G-Gruppe (siehe Originalpublikation 2, Abbildung 2, Seite 38). Der prozentuale Anteil naiver CD8⁺ T-Lymphozyten (CD45RA⁺CCR7⁺) hingegen war zu allen Zeitpunkten nach Transplantation signifikant niedriger in der ATG-G-Gruppe. Die prozentualen Anteile der zentralen Gedächtniszellen (*englisch*: central memory, CM; CD45RA⁻CCR7⁺) und der Effektorzellen (CD45RA⁺CCR7⁻) waren in beiden Patientengruppen ähnlich.

1.5 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung der Immunrestitution fiel initial ein verzögerter Wiederanstieg der Gesamt-CD4⁺ T-Lymphozyten-Zahlen in ATG-G-behandelten Patienten im Vergleich zu nicht-ATG-G-behandelten Patienten auf, während der Wiederanstieg der Gesamt-CD8⁺ T-Lymphozyten-Zahlen nicht signifikant unterschiedlich war.

In verschiedenen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass Einflussfaktoren wie beispielsweise höheres Alter und die Toxizität der Konditionierungstherapie die Reconstitution von CD4⁺ T-Lymphozyten beeinträchtigen können [1, 2, 11]. Ebenfalls beschrieben wurde, dass ein funktionsfähiger Thymus maßgeblich für die Regeneration von CD4⁺ T-Lymphozyten ist [5, 12]. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass ATG-G ein weiterer Faktor ist, der mit einer dauerhaft verzögerten CD4⁺ T-Lymphozyten-Reconstitution und einer prolongierten thymischen Dysfunktion assoziiert ist. Ein besonders auffälliges Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die dauerhaft beeinträchtigte Regenerierung naiver Tcon und Treg und im Speziellen thymisch generierter Tcon RTE und Treg RTE im peripheren Blut.

Die vorliegenden Daten zum Verlauf der Tcon RTE-Zellzahlen stützen die Ergebnisse von Sairafi *et al.* [13], die in einer retrospektiven Studie von reduzierten TREC-Spiegeln im peripheren Blut ATG-G-behandelter Patienten nach alloHSZT berichten. Zusätzlich kann in der vorliegenden Arbeit auch eine Beeinträchtigung der thymischen Produktion von Treg RTE gezeigt werden. Matsuoka *et al.* [14] konnten eine veränderte Treg-Homöostase in nicht-ATG-behandelten Patienten nach alloHSZT nachweisen, die einherging mit reduzierter thymischer Produktion von Treg und gestörtem Proliferations- sowie Apoptoseverhalten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass ATG-G die thymische Produktion von Treg zusätzlich beeinträchtigt und die gestörte Treg-Homöostase weiter verstärkt. Eine normale Homöostase ist allerdings insbesondere nach alloHSZT möglicherweise von Bedeutung, da Treg die Immunantwort auf Alloantigene regulieren und daher wichtig für die Kontrolle von GvHD sein könnten [15, 16].

Mausexperimente haben gezeigt, dass Ganzkörperbestrahlung als Teil der Konditionierungstherapie zusätzlich die Lebensfähigkeit von Thymozyten beeinträchtigt [6]. Eine mögliche Potenzierung der Effekte von Bestrahlung und ATG-G kann nicht ausgeschlossen werden und hat möglicherweise die Reconstitution der RTE (Tcon sowie Treg RTE) in der vorliegenden Arbeit beeinflusst (siehe Originalpublikation 1, Tabelle 1, Seite 27 und Originalpublikation 2, Tabelle 1, Seite 36). Eine Folgestudie mit größerer Patientenzahl sollte mit multivariaten Analysen durchgeführt werden.

Die Angaben in der Literatur zur Elimination von ATG-G aus dem Organismus sind uneinheitlich [8]. Pharmakologisch relevante Wirkspiegel weit über 30 Tage nach Applikation hinaus erscheinen jedoch nach aktuellem Kenntnisstand unwahrscheinlich. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse zu einer verzögerten Rekonstitution von Tcon RTE und Treg RTE auch nach Tag +30 nach Transplantation kann hier also die Hypothese formuliert werden, dass die Behandlung mit ATG-G – zusätzlich zu Schäden durch die Konditionierungstherapie – den Thymus beeinträchtigen und somit zu langfristigeren Konsequenzen für die thymische T-Zell-Produktion führen könnte.

Um die Möglichkeit eines Effekts von ATG-G auf den Thymus weiter zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt Experimente mit humanen Thymozyten *in vitro* durchgeführt. Da ATG-G durch Immunisierung von Kaninchen mit humanen Thymozyten und anschließende Aufreinigungsprozesse der Kaninchenserum gewonnen wird [8], ist davon auszugehen, dass ATG-G potenziell Antikörperspezifitäten gegen alle im Thymus vorkommenden Zelltypen enthält. Die komplexe Architektur des menschlichen Thymus kann im Rahmen eines experimentellen Versuchsaufbaus nur ungenügend wiedergegeben werden. Es ist daher nicht möglich, *in vitro* Konzentrationen von ATG-G zu bestimmen, die realitätsnah diejenigen Konzentrationen widerspiegeln, die *in vivo* in der klinischen Situation der alloHSZT im Thymus zur Wirkung kommen. Hinzu kommt, dass humanes Thymusgewebe schwierig zu gewinnen ist, da es kaum biotisch zugänglich ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung verschiedener Konzentrationen von ATG-G auf frische, kultivierte humane Thymozyten *in vitro* untersucht.

Die Induktion von Apoptose durch ATG-G in PBMC wurde bereits beschrieben [17], nun kann in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein pro-apoptotischer Effekt auch auf humane Thymozyten gezeigt werden. Des Weiteren scheinen Thymozyten anfälliger für eine von ATG-G ausgehende pro-apoptotische Wirkung zu sein als PBMC.

ATG-F wird im Gegensatz zu ATG-G durch Immunisierung von Kaninchen mit einer Jurkat-Zelllinie – also reifen humanen T-Zellen – statt mit humanen Thymozyten gewonnen [8]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von ATG-G mit der Wirkung von ATG-F auf kultivierte humane Thymozyten verglichen, da diese sich aufgrund der unterschiedlichen Herstellungsprozesse (und der damit zusammenhängenden unterschiedlichen Antikörperspezifitäten) potenziell stark unterscheiden könnten. Hierbei zeigte sich ein signifikant stärkerer pro-apoptotischer Effekt (späte Apoptose und Nekrose) von ATG-G als von ATG-F auf Thymozyten bei einer Konzentration von 25 µg/ml. Popow *et al.* [18] haben gezeigt, dass komplementvermittelte Zellyse ein wichtiger Mechanismus für die ATG-G vermittelte Toxizität

auf PBMC ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass komplementvermittelte Zellyse ebenfalls ein wichtiger Mechanismus für die Toxizität von ATG-G auf Thymozyten ist. Die *in vitro* Ergebnisse erscheinen insgesamt plausibel in Anbetracht der unterschiedlichen Herstellungsmethoden von ATG-G und ATG-F und unterstützen die Vermutung, dass ATG-G eine direkte Wirkung auf den Thymus hat. In dieser Hinsicht wäre es interessant, vergleichende kontrollierte klinische Studien zum Gebrauch von ATG-G und ATG-F durchzuführen. Derzeit sind nur wenige klinische Studien verfügbar, die die unterschiedlichen Ansätze der *in vivo* T-Zell-Depletion im Rahmen der alloHSZT untersucht haben. Beispiele für retrospektive Studien sind Soiffer *et al.* [19], die ATG-enthaltende und Alemtuzumab-enthaltende Behandlungsprotokolle miteinander verglichen haben oder Basara *et al.* [20], die die Behandlung mit ATG-G und ATG-F in Hinblick auf GvHD und Leukämie-Rückfälle analysiert haben.

Neben naiven CD4⁺ T-Lymphozyten-Subpopulationen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Rekonstitution verschiedener CD4⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten in ATG-G- und nicht-ATG-G-behandelten Patienten analysiert. Bei Betrachtung des CD4⁺ Gedächtniskompartiments fiel auf, dass die Zellzahlen der CD4⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten – im Gegensatz zu den naiven Subpopulation – auch bei ATG-G-behandelten Patienten kontinuierlich anstiegen, allerdings verzögert im Vergleich zu nicht-ATG-G-behandelten Patienten. Innerhalb des CD4⁺ Gedächtniskompartiments stiegen vor allem die CD4⁺ EM T-Lymphozyten-Zahlen an. Die vorliegenden Ergebnisse legen also die Interpretation nahe, dass ATG-G den Wiederanstieg von CD4⁺ CM T-Lymphozyten-Zahlen stärker verzögert als den Wiederanstieg von CD4⁺ EM T-Lymphozyten-Zahlen nach alloHSZT. Dies wurde auch schon gezeigt in Studien zu solider Organtransplantation [21, 22]. Ähnliche Verschiebungen zugunsten der EM T-Lymphozyten wurden in der vorliegenden Arbeit auch im CD8⁺ Gedächtniskompartiment beobachtet (*siehe unten*).

Im Gegensatz zu den Gesamt-CD4⁺ T-Lymphozyten zeigten sich bei den Gesamt-CD8⁺ T-Lymphozyten-Zahlen keine signifikanten Unterschiede zwischen ATG-G- und nicht-ATG-G-behandelten Patienten an den gewählten Beobachtungszeitpunkten. Ein schnellerer Wiederanstieg peripherer CD8⁺ T-Lymphozyten-Zahlen nach alloHSZT [1, 2, 23] und ATG-G Behandlung [8] wurde bereits beschrieben. Es wurden auch Thymus-unabhängige Regenerationswege für CD8⁺ T-Lymphozyten postuliert [24]. Der schnellere Wiederanstieg der CD8⁺ T-Lymphozyten-Zahlen könnte also teils auf eine beschleunigte (Thymus-unabhängige) Regeneration naiver CD8⁺ T-Lymphozyten, teils auf eine erhöhte Proliferation peripherer CD8⁺ T-Lymphozyten

zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die prozentuale Verteilung verschiedener CD8⁺ T-Lymphozyten-Subpopulationen analysiert. Hierbei fiel auf, dass der Anteil naiver CD8⁺ T-Lymphozyten bei ATG-G-behandelten Patienten signifikant geringer war als bei nicht-ATG-G-behandelten Patienten während der Anteil von CD8⁺ EM T-Lymphozyten signifikant erhöht war.

Diese Veränderungen waren bis zu Tag+180 nach Transplantation zu beobachten, sodass ein indirekter Langzeiteffekt von ATG-G angenommen werden kann. Der Langzeiteffekt auf naive CD8⁺ T-Lymphozyten könnte (analog zu naiven CD4⁺ T-Lymphozyten) mit der vermuteten ATG-G Wirkung auf den Thymus in Zusammenhang stehen. CD31 ist nicht zur Identifikation von CD8⁺ RTE geeignet und bisher (bis zur Anfertigung der ausgewählten Originalpublikationen) wurde kein anderes entsprechendes Oberflächenmolekül beschrieben, sodass in der vorliegenden phänotypischen Studie keine genauere Aussage über den Anteil der RTE an den naiven CD8⁺ T-Lymphozyten gemacht werden kann. Neben einer verzögerten thymischen Regeneration naiver CD8⁺ T-Lymphozyten könnte ein schneller Übergang in das Gedächtniskompartiment zu dem beschriebenen niedrigen Anteil naiver CD8⁺ T-Lymphozyten führen.

Der Verschiebung zugunsten der CD8⁺ EM T-Lymphozyten-Subpopulation scheinen insbesondere homöostatische Mechanismen zugrunde zu liegen. Nur in der ATG-G-Gruppe wurde eine signifikant erhöhte Proliferation der CD8⁺ T-Lymphozyten an Tag+15 nachgewiesen, und innerhalb der ATG-G-Gruppe war der Anteil proliferierender CD45RA⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten durchgehend höher als der Anteil proliferierender CD45RA⁻ CD8⁺ T-Lymphozyten. Neben der Zytokin-induzierten, homöostatischen Proliferation sind sowohl die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation als auch die Zytokin-induzierte Umwandlung anderer Phänotypen hin zu einem CD8⁺ EM T-Lymphozyten-Phänotyp mögliche Mechanismen, die die Expansion der CD8⁺ EM T-Lymphozyten unterstützen [25]. Insgesamt lassen die Daten vermuten, dass der schnellere Anstieg der CD8⁺ T-Lymphozyten-Zahlen insbesondere auf die Proliferation der CD8⁺ EM T-Lymphozyten zurückzuführen sein könnte.

Wie oben beschrieben wurde auch im CD4⁺ Gedächtniskompartiment ein besonders deutlicher Anstieg der CD4⁺ EM T-Lymphozyten-Zahlen gesehen. In Bezug auf die unterschiedliche Verteilung von Subpopulationen nach ATG-G-Behandlung sowohl im CD4⁺ als auch im CD8⁺ T-Zell-Kompartiment ist die Beobachtung wichtig, dass es im untersuchten Patientenkollektiv in der ATG-G-Gruppe nicht zu vermehrtem Auftreten akuter GvHD kam, obwohl das Risiko für akute GvHD in dieser Patientengruppe erhöht war, da die Indikation für die Behandlung mit ATG-

G die Verwendung eines Transplantats von einem nicht-verwandten Spender war. Dies zeigt zum einen, dass mit der ATG-G-Behandlung erwartungsgemäß der gewünschte Effekt erzielt werden konnte, zum anderen lässt dies aber auch die Hypothese zu, dass die beschriebenen Verschiebungen der Subpopulationen nicht unbedingt mit höheren Raten an akuter GvHD einhergehen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Gedächtnis T-Lymphozyten weniger GvHD auslösen als naive T-Lymphozyten [26, 27], wobei in diesem Zusammenhang EM T-Lymphozyten in Mausmodellen vorteilhaft gegenüber CM T-Lymphozyten zu sein scheinen [28].

Das für die vorliegende Arbeit gesammelte Patientenmaterial und die phänotypischen Analysen von B- und T-Lymphozyten-Subpopulationen wurden von anderen Arbeitsgruppenmitgliedern genutzt, um die gleichzeitige Messung von TREC und KREC zu etablieren (Originalpublikation 3). Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass mit der verwendeten quantitativen real-time PCR sowohl die thymische Produktion von T-Lymphozyten als auch die Produktion von B-Lymphozyten im Knochenmark adäquat erfasst werden können, da die Anzahl an TREC mit der Anzahl an $CD4^+$ RTE (also $CD31^+$ naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten) und die Anzahl an KREC mit der Anzahl an transitionalen B-Zellen hoch korrelierte.

Transitionale B-Zellen stellen die ersten B-Zellen dar, die das Knochenmark verlassen [29] und sind somit ein Maß für die B-Zell-Neogenese im Knochenmark, ähnlich wie RTE für die thymische T-Zell-Neogenese. KREC-Messungen mittels quantitativer real-time PCR und phänotypische Analysen von B-Zell-Subpopulationen wurden anschließend an einem weiteren Patientenkollektiv und neuen Blutproben im Rahmen einer weiteren Arbeit durchgeführt (Originalpublikation 4). Auch hier konnten die KREC-Messungen als adäquate Methode zur Evaluierung der B-Zell-Produktivität des Knochenmarks bestätigt werden. In der Arbeit von Mensen *et al.* (Originalpublikation 4) konnte ferner gezeigt werden, dass die Knochenmarksinfiltration durch Spender-T-Lymphozyten nach alloHSZT mit einer gestörten B-Zell-Immunität korreliert.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass ATG-G Thymuszellen direkt beeinflussen und in einem funktionellen Defizit des Thymus resultieren könnte. Außerdem konnten spezifische Verschiebungen im Gedächtniskompartiment von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten zugunsten der EM Subpopulationen ohne höhere Raten akuter GvHD gezeigt werden. Die vorliegenden Daten deuten auch darauf hin, dass die schnellere Rekonstitution des $CD8^+$ T-Zell-Kompartiments vor allem auf die Expansion der EM

Subpopulation zurückzuführen ist. Aufgrund der relativ kleinen Patientenkohorte sollten diese Daten in größeren Studien bestätigt werden.

Insbesondere vergleichende kontrollierte Studien von unterschiedlichen Therapieansätzen zur T-Lymphozyten-Depletion erscheinen hier notwendig. Eine weitere mögliche Konsequenz aus dieser Arbeit ist, dass Thymus-protective und/oder -supportive Therapien wie beispielsweise Keratinozyten-Wachstumsfaktor oder Wachstumshormon, die zur Limitierung von Thymusschäden durch die Konditionierungstherapie diskutiert werden [1], insbesondere für diejenigen Patienten in Betracht gezogen werden sollten, die mit ATG-G behandelt werden. Interessant wären weiterhin funktionelle Untersuchungen der T-Lymphozyten nach ATG-G-Behandlung, um eventuelle protrahierte qualitative sekundäre Immundefekte beurteilen zu können.

1.6 Literaturverzeichnis

1. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2012;19:324-335
2. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, Passweg J, Roosnek E. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* 2008;30:425-437
3. Dumont-Girard F, Roux E, van Lier RA, Hale G, Helg C, Chapuis B, Starobinski M, Roosnek E. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 1998;92:4464-4471
4. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000;355:1875-1881
5. Krenger W, Blazar BR, Hollander GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011;117:6768-6776
6. Na IK, Lu SX, Yim NL, Goldberg GL, Tsai J, Rao U, Smith OM, King CG, Suh D, Hirschhorn-Cymerman D, Palomba L, Penack O, Holland AM, Jenq RR, Ghosh A, Tran H, Merghoub T, Liu C, Sempowski GD, Ventevogel M, Beauchemin N, van den Brink MR. The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2010;120:343-356
7. Theurich S, Fischmann H, Shimabukuro-Vornhagen A, Chemnitz JM, Holtick U, Scheid C, Skoetz N, von Bergwelt-Baildon M. Polyclonal anti-thymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;9:CD009159
8. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007;21:1387-1394

-
9. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A, Thiel A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002;195:789-794
 10. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* 2009;113:769-774
 11. Mackall CL. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Stem Cells* 2000;18:10-18
 12. Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D, Niederwieser D, Fink FM. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997;90:850-857
 13. Sairafi D, Mattsson J, Uhlin M, Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cell transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival. *Clin Immunol* 2012;142:343-350
 14. Matsuoka K, Kim HT, McDonough S, Bascug G, Warshauer B, Koreth J, Cutler C, Ho VT, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2010;120:1479-1493
 15. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-2911
 16. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144-1150

-
17. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998;91:2360-2368
 18. Popow I, Leitner J, Majdic O, Kovarik JJ, Saemann MD, Zlabinger GJ, Steinberger P. Assessment of batch to batch variation in polyclonal antithymocyte globulin preparations. *Transplantation* 2012;93:32-40
 19. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE, Devine S, Isola L, Lazarus HM, Marks DI, Porter DL, Waller EK, Horowitz MM, Eapen M. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 2011;117:6963-6970
 20. Basara N, Baurmann H, Kolbe K, Yaman A, Labopin M, Burchardt A, Huber C, Fauser AA, Schwerdtfeger R. Antithymocyte globulin for the prevention of graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: results from the multicenter German cooperative study group. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:1011-1018
 21. Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, Swanson SJ, Mannon RB, Roederer M, Kirk AD. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 2005;5:465-474
 22. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, Ames S, Lerner S, Ebcioğlu Z, Nair V, Dinavahi R, Sehgal V, Heeger P, Schroppel B, Murphy B. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 2010;10:2132-2141
 23. Shenoy S, Mohanakumar T, Todd G, Westhoff W, Dunnigan K, Adkins DR, Brown RA, DiPersio JF. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:335-346

-
24. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997;89:3700-3707
 25. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003;101:4260-4266
 26. Dutt S, Baker J, Kohrt HE, Kambham N, Sanyal M, Negrin RS, Strober S. CD8+CD44(hi) but not CD4+CD44(hi) memory T cells mediate potent graft antilymphoma activity without GVHD. *Blood* 2011;117:3230-3239
 27. Anderson BE, McNiff J, Yan J, Doyle H, Mamula M, Shlomchik MJ, Shlomchik WD. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2003;112:101-108
 28. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Liu C, Chao NJ. Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood* 2004;103:1534-1541
 29. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, Contentin N, Tilly H, Tron F, Vannier JP, Jacquot S. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 2008;127:14-25

2 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Friedrich Wittenbecher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Einfluss von Antithymozyten-Globulin auf die Rekonstitution verschiedener Subpopulationen von T-Lymphozyten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei erwachsenen Patienten*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Originalpublikationen

Friedrich Wittenbecher hatte folgenden Anteil an den folgenden Originalpublikationen:

Originalpublikationen 1 und 2:

1: Na IK*, **Wittenbecher F***, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Kunkel D, Blau O, Blau I, Thiel E, Uharek L, Scheibenbogen C, Rieger K, Thiel A. *Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. Haematologica, 2013; 98(1):23-30.*

***Geteilte Erstautorenschaft**

Impact factor 2013: 5.868

2: **Wittenbecher F**, Rieger K, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Blau IW, Uharek L, Dörken B, Thiel A, Na IK. *Rabbit antithymocyte globulin induces rapid expansion of effector memory CD8 T cells without accelerating acute graft versus host disease. Leuk Res Rep, 2013; 2(2):82-5. Impact factor 2013: Nicht verfügbar, da es sich um ein neues Journal handelt.*

Beitrag zu den Originalpublikationen 1 und 2 im Einzelnen:

Die Ausführungen sind für beide Originalpublikationen gültig, da die gleiche Datengrundlage verwendet wurde. Friedrich Wittenbecher hat rund 70% der für die Durchflusszytometrie verwendeten Proben eigenständig experimentell bearbeitet. Sofern sich im Folgenden Angaben auf die Beschaffung und experimentelle Bearbeitung der Patientenblutproben beziehen, so gilt dies nur für den genannten Anteil. Die Auswertung wurde von Friedrich Wittenbecher für alle Proben (100%) vorgenommen.

Konzept:

- Beteiligung an der konzeptionellen Planung

Patienten:

- Planung der Blutentnahmen und des Transports, vorübergehend Beteiligung an Probenentnahme
- Sammlung und Zusammenfassung der Patientendaten aller Patienten aus der klinischen Dokumentation

Experimente:

- *Durchflusszytometrie*: Bearbeitung der Frischblutproben und durchflusszytometrische Analyse (mit etablierten Panels)
- *In vitro Experimente mit humanen Thymozyten und PBMC*: Konzeption der Versuche

Auswertung, statistische Bearbeitung, grafische Darstellung:

- Auswertung sämtlicher verwendeter experimenteller Rohdaten
- Ausführung der statistischen Auswertungen
- Erstentwurf und Erstellung der Endversion der grafischen Darstellungen

Text:

- Struktur und Erstentwurf der Manuskripte
- Fertigstellung der Endversion beider Manuskripte
- Bearbeitung und Fertigstellung der Revisionen

Originalpublikation 3:

Mensen A, Ochs C, Stroux A, **Wittenbecher F**, Szyska M, Imberti L, Fillatreau S, Uharek L, Arnold R, Dörken B, Thiel A, Scheibenbogen C, Na IK. *Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* **J Transl Med, 2013;11:188.**

Impact factor 2013: 3.991

Beitrag zu Originalpublikation 3 im Einzelnen:*Konzept:*

- Beteiligung an Diskussionen zur konzeptionellen Planung

Patienten:

- Planung der Blutentnahmen und des Transports, vorübergehend Beteiligung an Probenentnahme (rund 70% der Proben, siehe einleitende Ausführungen zum Beitrag zu Originalpublikationen 1 und 2)
- Sammlung und Zusammenfassung der Patientendaten aller Patienten aus der klinischen Dokumentation

Experimente:

- *Durchflusszytometrie*: Bearbeitung der Frischblutproben und durchflusszytometrische Analyse (mit etablierten Panels; rund 70% der Proben, siehe einleitende Ausführungen zum Beitrag zu Originalpublikationen 1 und 2)
- Sammlung und Kryokonservierung des Materials für die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion-Versuche (rund 70% der Proben, siehe einleitende Ausführungen zum Beitrag zu Originalpublikationen 1 und 2)

Auswertung:

- Beteiligung an der Auswertung der durchflusszytometrischen Rohdaten

Text:

- Beteiligung an der Fertigstellung des Manuskripts sowie an der Revision des Manuskripts

Originalpublikation 4:

Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, **Wittenbecher F**, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT.* **Blood**, 2014;124(6):963-72.

Impact factor 2013: 9.775

Beitrag zu Originalpublikation 4 im Einzelnen:

Patienten:

- Unterstützung bei der Sammlung und Zusammenfassung von Teilen der Patientendaten

Auswertung:

- Beteiligung an der Auswertung der durchflusszytometrischen Rohdaten

Text:

- Unterstützung bei der Fertigstellung des Manuskripts sowie an der Revision des Manuskripts

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

3 Druckexemplare der ausgewählten Originalpublikationen

Originalpublikation 1. Na IK*, **Wittenbecher F***, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Kunkel D, Blau O, Blau I, Thiel E, Uharek L, Scheibenbogen C, Rieger K, Thiel A. *Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients.* **Haematologica**, 2013;98(1):23-30. *Geteilte Erstautorenschaft

Impact factor 2013: 5.868

Originalpublikation 2. **Wittenbecher F**, Rieger K, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Blau IW, Uharek L, Dörken B, Thiel A, Na IK. *Rabbit antithymocyte globulin induces rapid expansion of effector memory CD8 T cells without accelerating acute graft versus host disease.* **Leuk Res Rep** 2013;2(2):82-5.

Impact factor 2013: Nicht verfügbar, da es sich um ein neues Journal handelt.

Originalpublikation 3. Mensen A, Ochs C, Stroux A, **Wittenbecher F**, Szyska M, Imberti L, Fillatreau S, Uharek L, Arnold R, Dörken B, Thiel A, Scheibenbogen C, Na IK. *Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* **J Transl Med**, 2013;11:188.

Impact factor 2013: 3.991

Originalpublikation 4. Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, **Wittenbecher F**, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT.* **Blood**, 2014; 124(6):963-72.

Impact factor 2013: 9.775

3.1 Originalpublikation 1

Originalpublikation 1. Na IK*, **Wittenbecher F***, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Kunkel D, Blau O, Blau I, Thiel E, Uharek L, Scheibenbogen C, Rieger K, Thiel A. *Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients.* **Haematologica**, **2013**;98(1):23-30. *Geteilte Erstautorenschaft
<http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.067611>

3.2 Originalpublikation 2

Originalpublikation 2. Wittenbecher F, Rieger K, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Blau IW, Uharek L, Dörken B, Thiel A, Na IK. *Rabbit antithymocyte globulin induces rapid expansion of effector memory CD8 T cells without accelerating acute graft versus host disease.* **Leuk Res Rep** 2013;2(2):82-5.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lrr.2013.09.001>

3.3 Originalpublikation 3

Originalpublikation 3. Mensen A, Ochs C, Stroux A, **Wittenbecher F**, Szyska M, Imberti L, Fillatreau S, Uharek L, Arnold R, Dörken B, Thiel A, Scheibenbogen C, Na IK. *Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* **J Transl Med, 2013;11:188.**
<http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-188>

3.4 Originalpublikation 4

Originalpublikation 4. Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, **Wittenbecher F**, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT.* **Blood, 2014;** 124(6):963-72.

<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-11-539031>

4 Lebenslauf

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

5 Vollständige Publikationsliste

- Publikationen mit Gutachtersystem in chronologischer Reihenfolge -

Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, Hemmati P, Westermann J, Blau O, **Wittenbecher F**, Movassaghi K, Szyska M, Thomas S, Dörken B, Scheibenbogen C, Arnold R, Na IK. *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT.* **Blood**, 2014;124(6):963-72.

Impact factor 2013: 9.775

Wittenbecher F, Rieger K, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Blau IW, Uharek L, Dörken B, Thiel A, Na IK. *Rabbit antithymocyte globulin induces rapid expansion of effector memory CD8 T cells without accelerating acute graft versus host disease.* **Leuk Res Rep**, 2013;2(2):82-5.

Impact factor 2013: Nicht verfügbar, da es sich um ein neues Journal handelt.

Mathauer I, **Wittenbecher F**. Hospital payment systems based on diagnosis-related groups: experiences in low- and middle-income countries. **Bull World Health Organ**, 2013;91(10):746-756A.

Impact factor 2013: 5.112

Mensen A, Ochs C, Stroux A, **Wittenbecher F**, Szyska M, Imberti L, Fillatreau S, Uharek L, Arnold R, Dörken B, Thiel A, Scheibenbogen C, Na IK. *Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* **J Transl Med**, 2013;11:188.

Impact factor 2013: 3.991

Wittenbecher F, Scheller-Kreinsen D, Röttger J, Busse R. *Comparison of hospital costs and length of stay associated with open-mesh, totally extraperitoneal inguinal hernia repair, and transabdominal preperitoneal inguinal hernia repair: an analysis of observational data using propensity score matching.* **Surg Endosc**, 2013;27(4):1326-33.

Impact factor 2013: 3.313

Na IK*, **Wittenbecher F***, Dziubianau M, Herholz A, Mensen A, Kunkel D, Blau O, Blau I, Thiel E, Uharek L, Scheibenbogen C, Rieger K, Thiel A. *Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. **Haematologica, 2013;98(1):23-30. *Geteilte Erstautorenschaft***
Impact factor 2013: 5.868

- Publikation ohne Gutachtersystem –

Mathauer, I. and **Wittenbecher, F.** DRG-based payment systems in low- and middle-income countries: Implementation experiences and challenges. **2012.** Geneva, Switzerland: **World Health Organization.**

6 Danksagung

Mein größter Dank gilt Il-Kang Na, für ihre inspirierende Anleitung und kontinuierliche Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt auch Angela Mensen, Mikalai Dziubianau, Anne Herholz und Kathrin Rieger ohne deren Hilfe und Beteiligung die vorliegende Arbeit nicht hätte entstehen können. Sehr herzlich möchte ich mich weiterhin bei Andreas Thiel und seiner Arbeitsgruppe bedanken, für die großzügige und freundliche Aufnahme in das Labor der AG Thiel. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der hämatologischen Transplantations-Ambulanz des Campus Benjamin Franklin der Charité – insbesondere bei Igor-Wolfgang Blau – für die wohlwollende Unterstützung. Nicht zuletzt gilt mein Dank den Patienten, die durch ihre Studienteilnahme den vorliegenden wissenschaftlichen Beitrag überhaupt erst ermöglichten, sowie allen weiteren Beteiligten, die die Entstehung dieser Arbeit begleitet haben. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben.