

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

DISSERTATION

Quantitative und funktionale Analyse des B-Zell-  
Kompartiments bei Patienten mit Multiplem Myelom

Quantitative and functional analysis of the B cell compartment  
in patients with multiple myeloma

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clarissa Katharina Heck

aus Düsseldorf

Datum der Promotion:  
03. März 2023

## Vorwort

Die hier vorliegende Arbeit analysiert sekundäre B-Zell Immundefekte bei Patienten mit Multiplem Myelom. Teilergebnisse, insbesondere zu B-Zelldefekten nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation, wurden veröffentlicht in:

1. **Heck C**, Steiner S, Frentsch M, Wittenbecher F, Scheibenbogen C, Nogai A, le Coutre P, Bullinger L, Blau IW, Na I. *In vitro stimulation with CD40L/IL21 can retrieve B-cell dysfunction in multiple myeloma patients suffering from secondary immunodeficiency*. Posterpräsentation (A349) im Rahmen der 46. Jahrestagung der “European Society for Blood and Marrow Transplantation” (EBMT 2020) 30. August – 2. September 2020, Madrid, Spanien
2. **Heck C**, Steiner S, Frentsch M, Wittenbecher F, Scheibenbogen C, Nogai A, Le Coutre P, Blau IW, Bullinger L, Na I. *CD4 T-Zell-abhängige Wiederherstellung der B-Zellzahlen und -funktion nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation*. Freier Vortrag (V477) auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO 2021), 1.-4. Oktober 2021, Berlin, Deutschland
3. **Heck C**, Steiner S, Kaebisch E, Frentsch M, Wittenbecher F, Scheibenbogen C, Hanitsch L, Nogai A, le Coutre P, Bullinger L, Blau IW, Na I. *CD4+ T Cell Dependent B Cell Recovery and Function After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Frontiers in Immunology*. 2021 Sep 29; 12 (3973)

Zusätzlich zu den bereits veröffentlichten Daten erweitert diese Arbeit, anhand einer unabhängigen Patientenkohorte, die Analyse auf neudiagnostizierte Multiple Myelom Patienten. Sie liefert damit eine Übersicht der B-Zelldefekte zu verschiedenen Zeitpunkten während einer Multiplen Myelom Erkrankung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 B-Zellen im peripheren Blut .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 B-Zellaktivierung.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 T-Zell abhängig .....	3
1.2.2 T-Zell unabhängig .....	6
<b>1.3 Multiples Myelom .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Infektionen bei MM.....	10
1.3.2 Sekundäre Immundefekte bei Multiplem Myelom .....	10
1.3.2.1 SID aufgrund der MM Erkrankung .....	11
1.3.2.2 SID durch MM Therapien .....	12
1.3.3 Rekonstitution der humoralen und zellulären Immunität nach HSZT .....	14
<b>1.4 In vitro Funktionsprüfung von B-Zellen .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Humanes Blut .....	18
2.1.2 Gesunde Spender .....	19
2.1.3 Onkologische Patienten .....	19
2.1.4 Reagenzien und Chemikalien.....	19
2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	21
2.1.6 Antikörper für den ELISpot .....	21
2.1.7 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.8 Geräte.....	23
2.1.9 Software.....	24
2.1.10 Puffer und Medien .....	24
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>25</b>

2.2.1	PBMC Isolation .....	25
2.2.2	Zellkultur und Stimulation .....	26
2.2.3	B-Zell-Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie .....	26
2.2.4	ELISpot .....	27
2.2.5	Immunfixation.....	28
2.2.6	Leukozyten-Charakterisierung in Vollblut .....	29
2.2.7	Erhebung klinischer Daten und Datenmangement .....	30
2.2.8	Statistik .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1	<b>Klinische Charakteristika der Patienten .....</b>	<b>33</b>
3.2	<b>B-Zell Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie.....</b>	<b>38</b>
3.3	<b>Quantitative Charakterisierung des B-Zell-Kompartiments bei MM Patienten ex vivo.....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Veränderungen der absoluten Zahlen an B-Zellen und deren Subpopulationen.....	41
3.3.2	Veränderungen in der Verteilung der B-Zell-Subpopulationen.....	44
3.4	<b>Funktionale Charakterisierung der B-Zell-Kompartimente von MM Patienten 47</b>	
3.4.1	Funktionsmessung mittels Durchflusszytometrie .....	48
3.4.1.1	Proliferation der CD19+ B-Zellen .....	48
3.4.1.2	Die Umverteilung der B-Zell-Subpopulationen.....	49
3.4.1.3	PB Zahlen pro PBMCs .....	55
3.4.2	Funktionsmessung mittels B-Zell ELISpot .....	58
3.4.3	Immunfixation.....	62
3.4.4	Funktionsbeeinflussende Parameter post-HSZT .....	63
3.4.4.1	Funktionsbeeinflussung durch CD4+ T-Zellen.....	65
3.4.4.2	Multivarianzanalyse.....	67
3.4.5	Vergleich der Funktion pre- und post-HSZT .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1	<b>Quantitative Analyse des B-Zell-Kompartiments bei MM Patienten.....</b>	<b>70</b>
4.1.1	Vergleich zwischen Gesunden und ND Patienten .....	70
4.1.2	Veränderungen vor HSZT .....	71
4.1.3	Veränderungen nach HSZT .....	73
4.2	<b>Funktionale Analyse .....</b>	<b>75</b>
4.2.1	B-Zellfunktion bei unbehandelten und pre-HSZT Patienten.....	77
4.2.2	B-Zellfunktion nach auto-HSZT .....	81

4.2.3 CD19+, CD4+ und MZ-ähnliche B-Zellen als Prädiktoren für die B-Zellfunktion post-HSZT .....	85
<b>4.3 Schlussfolgerung.....</b>	<b>90</b>
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....</b>	<b>108</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>109</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>111</b>
<b>Bescheinigung Statistik.....</b>	<b>112</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die B-Zell Entwicklung.....	3
Abbildung 2: Die Keimzentrumsreaktion.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studienaufbaus.....	32
Abbildung 4: Gating-Strategie für die B-Zell-Phänotypisierung.....	40
Abbildung 5: Rückgang der CD19+ Zellen bei MM Patienten und im Laufe der Therapie .....	42
Abbildung 6: Quantitative Veränderungen der Gesamtzahlen der B-Zell-Subpopulationen .....	43
Abbildung 7: Phänotypische Zusammensetzung der B-Zell-Kompartimente bei Gesunden und Patienten.....	46
Abbildung 8: Proliferative Immunantwort der CD19+ Zellen auf C/I/C und S/P/C Stimulation.....	49
Abbildung 9: PB Anteile nach Stimulation verglichen zwischen Gesunden und Patientengruppen .....	52
Abbildung 10: Verschiebungen der B-Zell-Subpopulationen durch die C/I/C und S/P/C Stimulationen .....	55
Abbildung 11: Zunahme der PB durch die Stimulationen bei Patienten im Vergleich zu Gesunden .....	57
Abbildung 12: Vergleich der ISC Generierung durch die Stimulation mit C/I/C oder S/P/C.....	58
Abbildung 13: Vergleich der ISC Generierung zwischen Gesunden und Patientengruppen .....	59
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung von ELISpot Wells nach den unterschiedlichen Stimulationsprotokollen.....	62
Abbildung 15: Einfluss der CD4+ Zellzahl <i>ex vivo</i> auf die Funktion der B-Zellen nach C/I/C Stimulation.....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: S Stadieneinteilung des Multiplem Myeloms nach der International Myeloma Working Group [51] (Tabelle nach [54]) .....	9
Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien .....	19
Tabelle 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	21
Tabelle 4: Antikörper für den ELISpot.....	21
Tabelle 5: Eigenschaften der zur Färbung des B-Zell-Panels verwendeten Antikörper (siehe auch [140]).....	27
Tabelle 6: Eigenschaften der im Leukozyten Panel verwendeten Antikörper (siehe auch [140]) .....	30
Tabelle 7: Übersicht der in der Studie eingeschlossenen Spender und Patientengruppen.....	33
Tabelle 8: Klinische Hintergründe der ND MM Patienten.....	34
Tabelle 9: Klinische Hintergründe der Patientengruppe Pre-/Post-HSZT (siehe auch [140]) .....	36
Tabelle 10: Zuordnung der B-Zell-Subpopulationen zum <i>Cluster of Differentiation</i> innerhalb der CD3- Lymphozyten Population .....	39
Tabelle 11 Mediane Induktionen der Zellpopulationen durch die C/I/C und S/P/C Stimulation.....	50
Tabelle 12: Korrelationen zwischen Zellpopulationen <i>ex vivo</i> und Funktionsparametern.....	64
Tabelle 13: Korrelation der Funktionsparameter pre- und post-HSZT .....	69

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Anthrazyklin/Dexamethason
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AF700	Alexa Flour ® 700
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
APC	Allophycocyanin
Auto-HSZT	Autologe Hämatopoetische Stammzelltransplantation
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin engl. <i>bovine serum albumin</i>
BV	Brilliant Violet
C/I/C	CD40L/IL-21/CpG
CD	Unterscheidungsgruppen, engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Oligonukleotide mit Cytosin Guanin Motiven
CVID	Variables Immundefektsyndrom, engl. <i>Common Variable Immunodeficiency</i>
Cyclomob.	Cyclophosphamid Stammzell-Mobilisierungstherapie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
Dest. Wasser	Destilliertes Wasser
DM	Diabetes Mellitus
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negative B-Zellen
ELISpot	Engl. Enzyme-linked immuno spot assay
EUROclass	Engl. <i>European consensus classification</i>
FCS	Fetales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FSC-A	FSC-Fläche, engl. <i>forward side scatter-area</i>

FSC-H	FSC-Höhe, engl. <i>forward side scatter-height</i>
FITC	Floureszein Isothiocyanat
GB	Gedächtnis B-Zellen
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, engl. <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
Hdx	Hochdosis-Chemotherapie
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Herpes-simplex-Viren
HWK	Halswirbelkörper
ICOS	Engl. inducible co-stimulator
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMiD	Immunomodulatorisches Medikament, engl. <i>immunomodulatory drug</i>
IQA	Interquartilsabstand
ISC	Immunglobulin-sezernierende Zelle, engl. <i>Immunoglobulin-secreting cell</i>
KW	Klassengewechselt
LWK	Lendenwirbelkörper
MM	Multiples Myelom
MZ	Marginal Zone der Milz
MZ-ähnliche	Marginal Zonen ähnliche B-Zellen
ND	Neudiagnostizierte Myelompatienten
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
PB	Plasmablasten
PB	Pacific Blue
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin
PerCP-C5,5	Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin 5,5

PI	Proteasom-Inhibitor
Pre-HSZT	Myelompatienten vor HSZT
Post-HSZT	Myelompatienten nach HSZT
PWM	Pokeweed mitogen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
S/P/C	SAC/PWM/CpG
SAC	Staphylococcus aureus Cowan
SHM	Somatische Hypermutation
SID	Sekundäre Immundefekte
SSC-A	SSC-Fläche, engl. <i>sideward side scatter-area</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
VCD	Bortezomib/Cyclophosphamid/Dexamethason
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZVK	Zentraler Venenkatheter
β-ME	β-Mercaptoethanol

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Sekundäre Immundefekte (SID) aufgrund von malignen Erkrankungen und ihrer Therapie erhöhen die Infektanfälligkeit. Beim Multiplem Myelom (MM) stellen Infekte, neben der Erkrankung selbst, die Haupttodesursache dar. Immer intensivere Therapieverfahren führen zwar zu einer besseren Ansprechrate, erhöhen aber durch kumulative Immunsuppression die Infektanfälligkeit. Dabei hat den stärksten Effekt auf das Immunsystem die autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation (auto-HSZT). In der Literatur sind sowohl Einschränkungen der zellulären wie auch humoralen Immunantwort beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es die zugrundeliegenden B-Zell-Defekte bei MM Patienten an verschiedenen Behandlungszeitpunkten phänotypisch und funktional genauer zu charakterisieren.

**Methoden:** In dieser Intention wurde peripheres Blut von neudiagnostizierten MM Patienten (ND) sowie von Patienten die eine auto-HSZT durchliefen (vor und nach HSZT) untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurden die B-Zellen sowie die Verteilung der Subpopulationen *ex vivo* gemessen. Zusätzlich wurde die B-Zellfunktion auf T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Stimulationen überprüft. Dafür wurde anhand durchflusszytometrischer Messungen und B-Zell ELISpots die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen analysiert.

**Ergebnisse:** Bei MM Patienten konnte eine Reduktion der B-Zellen und ihrer Subpopulationen festgestellt werden, die sich durch Therapie verschlechterten und nach HSZT am stärksten ausfielen. Funktional fiel bei ND und vor HSZT eine eingeschränkte T-Zell-abhängige B-Zellantwort auf. Nach HSZT lag eine gestörte B-Zellantwort sowohl auf T-Zell-abhängige als auch T-Zell-unabhängige Stimulantien vor. In allen Patientengruppen konnte die T-Zell-abhängige Antwort mittels extrinsischer Stimulantien wiederhergestellt werden. Das quantitative Defizit *ex vivo* nach HSZT konnte durch die Stimulationen nicht ausgeglichen werden. Nach HSZT wurde ein Zusammenhang festgestellt, zwischen der Anzahl der CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowie Gedächtnis B-Zellen und der gesamten B-Zellfunktion, den Marginalzonen-ähnlichen B-Zellen und der T-Zell-unabhängigen sowie zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der T-Zell-abhängige B-Zellfunktion *in vitro*.

**Schlussfolgerung:** Therapie-naive, wie auch therapierte MM Patienten wiesen eine eingeschränkte B-Zell-Immunität auf, die nach HSZT am stärksten ausgeprägt war.

Dominiert haben dabei quantitative Defizite, die insbesondere nach HSZT zu einer eingeschränkten B-Zellfunktion geführt haben. Die Wiederherstellung der Funktion durch T-Zell abhängige Stimulantien und die Korrelation mit CD4+ T-Zellen sprechen für extrinsische Ursachen der B-Zelldefekte. Zudem weisen Korrelationen nach auto-HSZT der CD19+, CD4+, Gedächtnis B-Zellen und Marginalzonen-ähnlichen B-Zellen mit der B-Zellfunktion darauf hin, dass diese in prospektiven Studien als potentielle Biomarker für sekundäre Immundefekte und somit eine mögliche Immunglobulintherapie nach auto-HSZT untersucht werden sollten.

## **Abstract**

**Introduction:** Secondary immunodeficiency (SID) due to malignancy and cancer treatment increases the susceptibility for infections. In multiple myeloma patients infections are a major cause for morbidity and mortality. More aggressive therapies lead to a better response rate however simultaneously increase immunosuppression, in particular the standard high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT). Previous studies reported a hampered humoral and cellular immunity. This study delineates in depth the quantitative and functional B cell defects at different treatment time points and investigates underlying extrinsic or intrinsic drivers.

**Methods:** Peripheral blood of newly diagnosed MM patients and patients receiving auto-HSCT (tested before high-dose chemotherapy and in early reconstitution after HSCT) was studied. Absolute numbers and distribution of B cell subsets were analyzed *ex vivo* using flow cytometry. Additionally B cell function was assessed with T-dependent and T-independent stimulation assays, analyzing proliferation and differentiation of B cells by flow cytometry and numbers of immunoglobulin secreting cells in ELISpots.

**Results:** Untreated and treated patients presented with a diminished frequency of total CD19+ B cells and B cell subpopulations, while the deficiency was worst after HSCT. Furthermore, an altered B cell subset distribution with high plasmablast frequencies due to inflammation was noticed. Functionally, newly diagnosed patients and those before HSCT showed a reduced T-dependent B cell response. Patients after HSCT presented with both a hampered T-dependent and T-independent B cell function. In all groups T-dependent function could be restored with extrinsic

stimulation *in vitro*. However, the quantitative deficit measured *ex vivo* after HSCT could not be compensated. A correlation was observed between marginal zone like B cells and the T-independent response, CD4+ T-cells and the T-dependent B cell function as well as counts of CD19+ as well as memory B cells and both B cell responses *in vitro*.

**Conclusion:** Newly diagnosed, as well as treated MM patients were affected by quantitative deficits and functional impairment most aggravated after HSCT. Functional recovery upon T-dependent *in vitro* stimulation and correlation with CD4+ T-cell numbers suggest extrinsic drivers for the B cell defects. Our data therefore provides a foundation for therapeutic strategies to address B cell immunodeficiency in MM patients. Observed correlations after HSCT of CD4+, CD19+, memory B and marginal zone like B cell numbers with the B cell function suggest that these markers should be tested in prospective studies as potential biomarkers for SID and hence immunoglobulin substitution after auto-HSCT.

# 1 Einleitung

## 1.1 B-Zellen im peripheren Blut

Die Idee von Antikörpern in der Immunabwehr gegen Pathogene wurde erstmals von Paul-Ehrlich im Jahr 1900 beschrieben [1]. Heutzutage ist bekannt, dass B-Zellen diese Antikörper sezernieren und die Vermittler der humoralen Immunantwort sind. Gemeinsam mit T-Zellen, die eine zelluläre Reaktion auslösen, machen sie das adaptive Immunsystem aus. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, das eine direkte aber unspezifische Reaktion auf Erreger initiiert, kann das adaptive Immunsystem durch spezialisierte Antigenrezeptoren langfristig eine Infektion wirksamer bekämpfen.

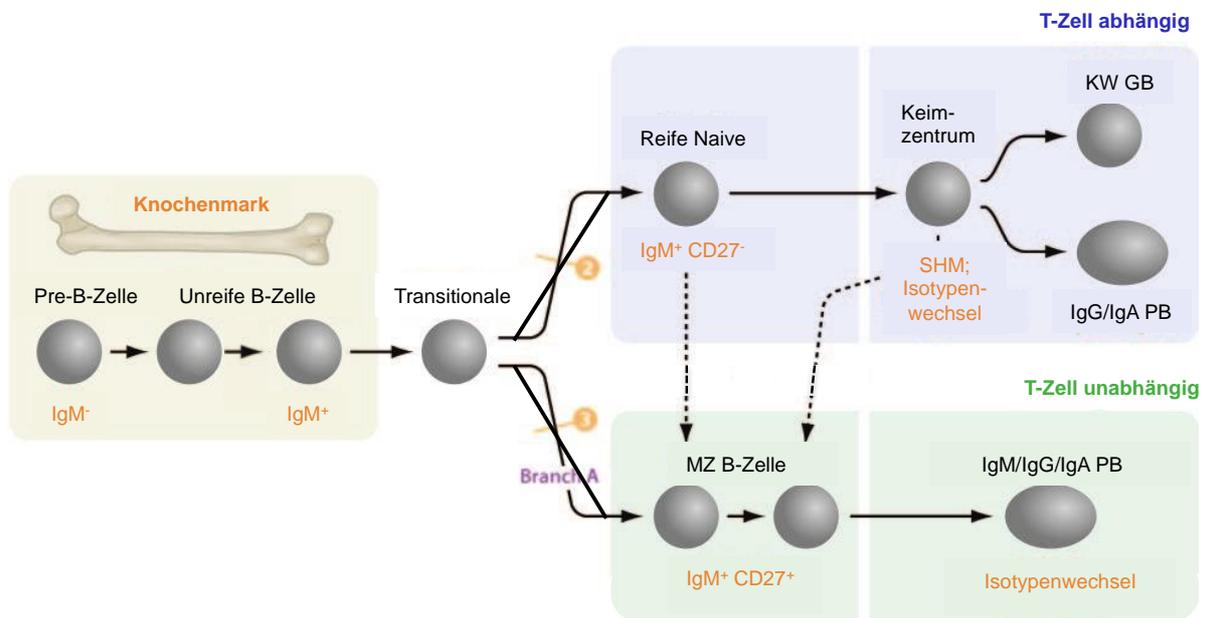
Die spezifischen Antikörper der B-Zellen schützen vor allem vor extrazellulären bakteriellen Infektionen. Antikörper können Pathogene über verschiedene Mechanismen eliminieren. Dazu gehört die Neutralisierung, Komplementaktivierung und Opsonierung. Durch ihre Interaktion mit T-Zellen tragen sie außerdem zur Unterstützung der zellulären Immunität gegen intrazelluläre Erreger wie Viren bei [2]. Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark aus lymphoiden Stammzellen, Nachfolger der hämatopoetischen Stammzellen [3, 4]. Die T-Zellen reifen im Thymus weiter heran (weswegen sie T-Zellen heißen). Die Entwicklung der B-Zelle ist in Abbildung 1 zu sehen. Die frühe Entwicklung der B-Zellen bis hin zu den unreifen B-Zellen beschränkt sich auf das Knochenmark, wodurch sie ihren Namen B-Zellen erhalten (von engl. *bone marrow*) [5]. Durch somatische Rekombination der Keimbahngenelemente werden einzigartige spezifische B-Zell-Rezeptoren (BCR) bzw. Immunglobuline produziert [4, 6]. Sobald eine B-Zelle einen funktionalen BCR des IgM Isotypen auf ihrer Oberfläche exprimiert, durchläuft sie einen Selektionsprozess, um autoreaktive B-Zellen zu eliminieren. Im Anschluss wird sie aus dem Knochenmark ausgeschwemmt und migriert in sekundäre lymphatische Organe [7].

Zu den sekundären lymphatischen Organen gehören die Lymphknoten, die Milz und die mukosalen Lymphgewebe, in deren Follikeln die finale Ausreifung stattfindet [7]. Als sogenannte **transitionale B-Zellen** differenzieren die Zellen dort abhängig von ihrer BCR Affinität in **naive folliculäre** oder zu geringerem Anteil in Marginalzonen (MZ) B-Zellen [8, 9]. MZ B-Zellen migrieren in die marginale Zone der Lymphfollikel

der Milz, während folliculäre B-Zellen durch das Blut und Lymphsystem zirkulieren [10]. Allerdings gibt es auch im peripheren Blut zirkulierende MZ Zellen, von hier an **MZ-ähnliche B-Zellen** genannt. Diese sind genetisch [11] und funktional [12] den MZ Zellen zugehörig. Allerdings werden sie aufgrund somatischer Mutationen in ihrem BCR in der Literatur meist den Gedächtnis-B-Zellen zugeordnet [13]. Ihr Ursprung ist noch nicht abschließend geklärt [14]. In der Milz und den Lymphknoten kommen die B-Zellen in den Follikeln immer wieder mit Antigenen in Kontakt, die ihnen über dendritische Zellen (DC) oder Makrophagen präsentiert werden. In die Lymphknoten gelangen die Pathogene über afferente Lymphe und in die Milz über das zirkulierende Blut. Bindet ein BCR erfolgreich ein Pathogen kommt es je nach Antigen und kostimulatorischem Signal, Lokalisation und B-Zelltyp entweder zu einer T-Zell-abhängigen oder T-Zell-unabhängigen B-Zellaktivierung. Bei einem Großteil der Antigene ist für die B-Zellaktivierung eine T-Zellinteraktion nötig, allerdings gibt es einige mikrobielle Antigene, welche B-Zellen direkt und unabhängig von T-Zellen aktivieren. Diese Aktivierung führt zu einer schnellen und IgM lastigen Immunantwort. Zur Generierung hochspezifischer Antikörper mit Immunglobulinklassenwechsel sowie eines immunologischen Gedächtnisses ist die T-Zellinteraktion essentiell [15]. Nach Antigenstimulation proliferieren und differenzieren die B-Zellen zu Effektor-B-Zellen. Diese sind Antikörper-exprimierende **Plasmablasten (PB)**, bzw. Antikörper-sezernierende kurz- und langlebige **Plasmazellen** und **Gedächtnis-B-Zellen (GB)** [4].

Ungefähr 70-90% der mononukleären Zellen im peripheren Blut (PBMCs engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sind Lymphozyten. Innerhalb der Lymphozyten liegt der Anteil der B-Zellen bei ca. 5-10% [16]. Etwas mehr als die Hälfte davon sind naive B-Zellen und 30-40% sind GB [17]. Diese setzen sich aus Isotyp gewechselten (50% der GB), IgM only (ca. 1% der GB), IgM+IgD+/MZ-ähnlichen (50% der GB) sowie doppelt negativen (DN) (CD27- IgD-) zusammen [11, 12]. PB machen ca. 1% aus [18]. Letztere nehmen vor allem während einer Entzündung, beispielsweise im Rahmen einer Infektion stark zu und stellen die unmittelbaren Vorläufer der Plasmazellen dar. Transitionale B-Zellen migrieren durchs Blut und machen bei Erwachsenen in der Peripherie ca. 5% aus. Allerdings ist ihr Anteil in Nabelschnurblut sowie nach Stammzelltransplantation und bei Immundefekten wie dem variablen Immundefektsyndrom (CVID, engl. *Common Variable*

*Immunodeficiency*) erhöht [19]. MZ B-Zellen migrieren in die Milz, Keimzentrum-B-Zellen in den Lymphknoten und reife langlebige Plasmazellen ins Knochenmark, weswegen diese Subpopulationen im peripheren Blut meist nicht gefunden werden [20].



**Abbildung 1: Die B-Zell Entwicklung**

Bis zur vollständigen Expression eines BCRs mit dem IgM Isotypen reifen die B-Zellen im Knochenmark. Von dort aus zirkulieren sie als transitionale B-Zellen in die sekundären Lymphorgane und reifen zu naiven folliculären B-Zellen oder MZ/MZ-ähnlichen B-Zellen heran. Naive folliculäre B-Zellen werden insbesondere durch T-Zell-abhängige Antigene aktiviert und durchlaufen meist eine Keimzentrumsreaktion, um schließlich in Plasmazellen und GB zu differenzieren. MZ/MZ-ähnliche B-Zellen durchlaufen einen weiteren Reifungsschritt der zu somatischen Mutationen in ihrem BCR führt, bevor sie durch T-Zell-unabhängige Antigene zu Immunglobulin sezernierenden Zellen differenzieren. Alternativ wird für ihren Ursprung und ihre Rezeptormutation eine Differenzierung aus reifen Naiven oder frühen Keimzentrum-B-Zellen diskutiert (gestrichelte Linien). Verändert aus [13] (mit freundlicher Genehmigung von *Annual Reviews*).

## 1.2 B-Zellaktivierung

### 1.2.1 T-Zell abhängig

Die T-Zell-abhängige Aktivierung von naiven folliculären B-Zellen wird durch Proteinantigene ausgelöst. Weil T-Zellen für diesen Prozess unabdinglich sind, werden diese Antigene als thymusabhängige Antigene bezeichnet. Für die T-Zell-abhängige Aktivierung ist ein doppeltes Signal nötig. Erstens muss eine naive B-

Zelle mit einem passenden BCR das Antigen binden, zweitens muss eine T-Zelle, der zuvor das gleiche Antigen präsentiert wurde mit der B-Zelle in Kontakt treten, um die Aktivierung abzuschließen.

Wird nun ein Antigen vom angeborenen Immunsystem erkannt, wird es über Antigenpräsentierende Zellen, wie folliculäre dendritische Zellen (FDC) und Makrophagen in den Lymphfollikeln den B-Zellen präsentiert. Bei Bindung des Antigens an einen passenden BCR einer naiven B-Zelle kommt es zur Internalisierung des Erregers und zur Präsentation von Antigenpeptiden auf der Oberfläche der B-Zellen über MHC-II [21]. Die B-Zelle migriert nach erstem Antigenkontakt an die Grenze zwischen B-Zell-Follikel und T-Zell-Zone des Lymphknotens. Gleiches tun CD4+ T-Zellen, die durch dendritische Zellen in der T-Zell-Zone aktiviert wurden [22]. In einem Prozess, der sich gekoppelte Erkennung nennt, bindet die CD4+ T-Zelle, die mit dem gleichen Pathogen in Kontakt war mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) an den MHC-II Rezeptor der B-Zelle. Dadurch wird die T-Zelle aktiviert und vermittelt der B-Zelle im Gegenzug über CD40L und andere Zytokine Überlebens- und Differenzierungssignale. Abschließend differenziert die CD4+ T-Zelle in eine folliculäre T-Helfer Zelle (Tfh) [23]. Antigen aktivierte B-Zellen, die nicht mit T-Zellen in Kontakt treten sterben innerhalb von 24h.

Nach der ersten T-Zellinteraktion migrieren einige B-Zellen in die interfollikulären Regionen und subkapsulären Sinus der Lymphknoten und differenzieren dort in einem sogenannten primären Fokus in IgM produzierende Plasmablasten, die für eine Immunabwehr innerhalb weniger Tage sorgen. Diese weniger spezifischen Plasmablasten werden auch als kurzlebige Plasmazellen bezeichnet und führen meist nur in geringem Ausmaß zur Gedächtnis-B-Zell-Entwicklung [22, 24].

Andere B-Zellen wandern zusammen mit ihren assoziierten Tfh-Zellen in die Lymphfollikel wo sie klonal expandieren und ein **Keimzentrum** formen [10]. Dieses teilt sich in eine helle Zone, in der die Zellinteraktionen stattfinden und eine dunkle Zone, in der die Proliferation stattfindet. Zwischen diesen zirkulieren die B-Zellen [25]. Die B-Zellen in den Keimzentren exprimieren aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID). Diese bewirkt über Punktmutationen die somatische Hypermutation (SHM) der variablen Antikörperregion und führt so zur Affinitätsreifung des BCRs [26, 27]. Dabei können die Mutationen entweder zu einer stärkeren oder schwächeren Antigenbindung führen. Bei stärkerer und damit häufigerer

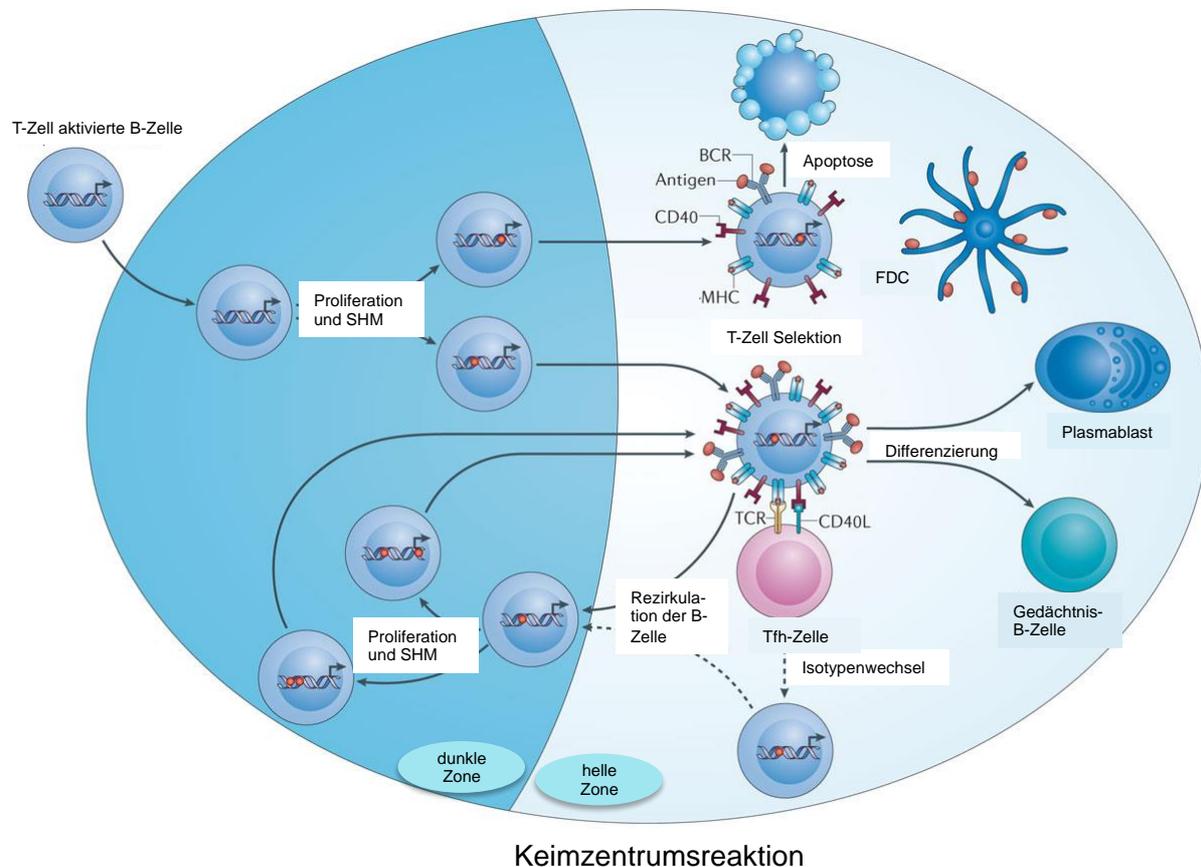
Antigenbindung internalisiert und exprimiert die B-Zelle mehr des Antigens über MHC-II Rezeptoren. Nach der somatischen Hypermutation kommt es zum wiederholten Kontakt zwischen B- und Tfh-Zellen. Bei verminderter Antigenexpression erhält die B-Zelle weniger Überlebenssignale und geht in Apoptose. Durch vermehrte und stabilere T-Zellkontakte erhält die B-Zelle Proliferations- und Differenzierungssignale [25, 28]. Es ergibt sich ein abwechselnder Zyklus aus Proliferation und T-B-Zellinteraktion. Essentiell ist dabei CD40 auf B-Zellen, das CD40L auf den T-Zellen bindet. Durch die Bindung werden in der B-Zelle überlebens-, proliferations- und differenzierungs Signalwege aktiviert. Gleichzeitig wird die T-Zelle stimuliert Zytokine wie IL-21 auszuschütten. IL-21 im Gegenzug setzt bei der B-Zelle weitere Differenzierungssignale in Gang. Die CD40/CD40L Interaktion ist außerdem essentiell zum Erhalt der Keimzentren [29, 30].

Ein Ergebnis dieses Zirkulierens der B-Zellen ist neben der Affinitätsreifung der sogenannte Isotypen- oder Klassenwechsel der Immunglobuline. Durch die AID kommt es zur DNA-Rekombination der konstanten Regionen der schweren Ketten. Dies führt zu einer Transformation des Isotypen ohne eine Änderung der Antigenpezifität. Ob der Wechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE stattfindet, hängt von den Zytokinen der Tfh-Zelle ab. IL-21 induziert einen IgG und IgA Klassenwechsel [31, 32].

Nachdem sie das Keimzentrum verlassen haben, differenzieren die B-Zellen abhängig von ihrer BCR Affinität entweder in PB oder GB [33]. PB zirkulieren in die Peripherie an Effektororte und sezernieren dort antigenspezifische und klassengewechselte Antikörper mit hoher Affinität, die das Pathogen neutralisieren. Einige von ihnen differenzieren weiter in langlebige Plasmazellen, die ins Knochenmark migrieren, wo sie auch über die Infektion hinaus hochaffine Antikörper sezernieren [34].

Die GB überleben ebenfalls lange nach der Infektion wobei sie im peripheren Blut zirkulieren und sich in Lymphknoten oder der Milz aufhalten [22, 35]. Durch GB zusammen mit Gedächtnis-T-Zellen mit der gleichen Antigenpezifität kommt es bei Reexposition mit dem gleichen Erreger im Rahmen einer sekundären Immunantwort zu einer rapiden Differenzierung von GB in PB bzw. Antikörper sezernierende Zellen mit hoch spezifischen Antikörpern [24, 36]. Dadurch kann in vielen Fällen eine erneute Erkrankung verhindert werden. Durch vermehrte Expression von MHC-II und

Kostimulatoren auf GB kommt es zu einer schnelleren Interaktion von T- und B-Zellen. So kommt es zu einer 30-fach höheren Immunglobulin Sekretion bei der Aktivierung von GB als von Naiven B-Zellen [37].



**Abbildung 2: Die Keimzentrumsreaktion**

Nach Antigenbindung und erstem T-B-Zell-Kontakt bilden aktivierte B-Zellen und T-Zellen ein Keimzentrum aus. Dieses Keimzentrum teilt sich in eine dunkle Zone, in der die B-Zell-Proliferation und somatische Hypermutation (SHM) stattfindet und eine helle Zone, in der die B-Zelle mit FDC und Tfh-Zellen interagiert. Führt die SHM zu einer stärkeren Antigenbindung des BCRs, exprimieren sie mehr Antigen über MHC-II und werden durch die Tfh-Zellen positiv selektioniert. Sie erhalten über CD40L und andere Kostimulatoren Überlebenssignale, durchlaufen einen Isotypenwechsel und rezirkulieren in die dunkle Zone zur weiteren Proliferation und SHM. Kommt es zu einer schwächeren Antigen- und T-Zellbindung, geht die Zelle stattdessen in Apoptose. Nach Entwicklung eines hoch spezifischen BCRs differenzieren sie in Plasmablasten und Gedächtnis B-Zellen. Abbildung angepasst nach [30] (mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).

### 1.2.2 T-Zell unabhängig

Die T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung erfolgt über polymere Antigene wie Polysaccharide aus Bakterienkapseln (T-2 Antigene) oder B-Zell Mitogene (T-1

Antigene) wie LPS und bakterielle DNA. B-Zell Mitogene können über Toll-like Rezeptor (TLR) Bindungen in hohen Dosen zu einer polyklonalen antigenunspezifischen B-Zellproliferation führen [5]. Polysaccharide aus Bakterienkapseln, wie sie bei *Streptokokkus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und auch dem *in vitro* genutzten Stimulans *Staphylococcus Aureus* Cowan I (SAC) vorhanden sind, aktivieren vor allem MZ B-Zellen der Milz bzw. MZ-ähnliche B-Zellen und B-1 B-Zellen, die vor allem in den Pleuren vorkommen [11, 38]. Die Aktivierung erfolgt über repetitive Strukturen der Antigene, die zu Quervernetzungen der BCRs führen [5]. Ohne T-Zell „Hilfe“ wird eine Differenzierung in IgM sezernierende Zellen initiiert. Über kostimulatorische Signale von dendritischen Zellen und Makrophagen der Bauchhöhle, wird die Immunantwort verstärkt und zudem einen Klassenwechsel ausgelöst [39]. Im Vergleich zur T-Zell-abhängigen Stimulation kommt es aber nur in geringem Maße zum Klassenwechsel und zur Differenzierung in GB [40].

Die T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung nimmt einen wichtigen Stellenwert bei der Abwehr gegen verkapselte Bakterien ein. Aufgrund ihrer Polysaccharidkapsel können diese nicht von Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden, so dass eine T-Zell Aktivierung ausbleibt. Die schnelle Produktion von IgM Antikörpern gegen die Polysaccharide ermöglicht es Pathogene, die sonst lange vor T-Zellen verdeckt blieben, schon in frühen Stadien T-Zell-unabhängig zu eliminieren [38].

### **1.3 Multiples Myelom**

Das Multiple Myelom (MM) beschreibt eine maligne lymphoproliferative Erkrankung ausgehend von einer monoklonalen Expansion von Plasmazellen im Knochenmark. Es kommt zu einem Überschuss an monoklonalen Antikörpern sowie einer Verdrängung des Knochenmarks und osteolytischen Knochenläsionen [41, 42]. Zu unterscheiden ist das MM, welches disseminierte Herde im Knochenmark aufweist vom Plasmozytom, bei dem es sich um einen solitären Herd handelt.

Die Inzidenz liegt bei etwa 3,9-6,4/100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland. Betroffen sind vor allem ältere Menschen, Männer etwas häufiger als Frauen. Das Durchschnittsalter bei Erkrankung liegt bei 73 Jahren [43].

Der genaue Pathomechanismus des MMs ist noch nicht geklärt. Ein Großteil entwickelt sich aus der Präkanzerose der Monoklonalen Gammopathie unklarer

Signifikanz (MGUS) [44]. Man geht davon aus, dass die initialen Myelomzellen aus Fehlern der Rekombination beim Isotypenwechsel im Keimzentrum entstehen [45]. Typische Symptome sind eine Anämie häufig mit Fatigue durch die Verdrängung des Knochenmarks, eine erhöhte Infektanfälligkeit, Knochenschmerzen durch pathologische Frakturen, Nierenversagen durch Leichtketten-Nephropathie und Hyperkalzämie sowie Gewichtsverlust [46, 47]. Knochenschmerzen sind meist das erste Symptom, das zur Vorstellung der Patienten führt [42]. Im Verlauf sind insbesondere Infektionen eine wichtige und häufig letale Komplikation. Immundefunktionen machen MM Patienten anfälliger für Pathogene [48].

Zu den diagnostischen Kriterien gehören der Nachweis von M-Protein im Serum und Urin, der Nachweis klonaler Plasmazellen im Knochenmark sowie typische Endorganschäden. Das M-Protein (auch Paraprotein) ist ein monoklonales Immunglobulin, das von den beim MM klonal expandierten Plasmazellen produziert wird. Es wird im Serum sowie im Urin mittels Immunfixation nachgewiesen und dient der Einteilung des MMs anhand der schweren Ketten IgG, IgA, IgM und der Leichtketten Kappa und Lambda [49]. Der häufigste MM Subtyp betrifft Immunglobuline der Klasse G mit 52% oder A mit 21%. Es treten auch reine Leichtketten Myelome auf, diese machen ca. 20% aus [42]. Weitere essentielle diagnostische Mittel sind die zytologische, histologische und zytogenetische Knochenmarksuntersuchung. Zytogenetische Alterationen sind bei ca. 1/3 der Patienten zu finden und ermöglichen die Identifizierung von Hochrisikopatienten [50].

Endorganschäden, die anhand der CRAB-Kriterien beurteilt werden, unterscheiden das MM vom schwellenden Myelom. Zu diesen gehören Hyperkalzämie (engl. *hyperCalcemia*), Niereninsuffizienz (engl. *Renal insufficiency*), normochrome normozytäre Anämie (engl. *Anemia*) und Knochenläsionen (engl. *Bone lesions*)[51]. Entsprechend erfolgt diagnostisch zudem ein Ganzkörper „low-dose“ CT, zur Beurteilung des Knochenbefalls und laborchemische Untersuchungen. Die Stadieneinteilung erfolgt heutzutage nach dem *Revised International Staging System* (ISS), welches zur besseren Abschätzung der Prognose dient. Zur Einteilung in drei Stadien werden das beta 2-Mikroglobulin, das Albumin, der LDH Wert und die Zytogenetik herangezogen. Die genaue Einteilung ist in Tabelle 1 zu sehen [52]. Die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon wird heute nicht mehr verwendet [53].

**Tabelle 1: S Stadieneinteilung des Multiplem Myeloms nach der International Myeloma Working Group [51] (Tabelle nach [54])**

	<b>Revised ISS</b>
<b>Stadium I</b>	beta 2-Mikroglobulin $\leq 3,5$ mg/l <u>und</u> Albumin $\geq 3,5$ g/dl <u>und</u> LDH $\leq$ oberer Normwert <u>und</u> Zytogenetik Standardrisiko
<b>Stadium II</b>	weder Stadium I noch Stadium III
<b>Stadium III</b>	beta 2-Mikroglobulin $\geq 5,5$ mg/l <u>und</u> LDH $>$ oberer Normwert <u>oder</u> Zytogenetik Hochrisiko

Derzeit gilt das MM nicht als heilbar. Ziel der Behandlungen ist es eine möglichst langanhaltende Remission zu bewirken [55]. Die Therapie des MMs richtet sich nach Alter und Allgemeinzustand der Patienten und wird bei einem Rezidiv erneut angepasst.

Initial wird evaluiert, ob Patienten für eine Hochdosis-Chemotherapie (Hdx) mit anschließender autologer Stammzelltransplantation (auto-HSZT) geeignet sind. Patienten über 65-75 Jahren mit Komorbiditäten wird von einer Hdx abgeraten und stattdessen die Behandlung auf eine Induktionschemotherapie mit anschließender Erhaltungstherapie begrenzt [56]. Für die Entscheidung ist das biologische Alter relevant.

Bei stabilem Allgemeinzustand und ohne signifikante Komorbiditäten ist die Standardbehandlung eine Induktionstherapie gefolgt von Hdx mit auto-HSZT. Diese verbessert sowohl das progressionsfreie Überleben, wie auch das Gesamtüberleben [57-59]. Für die Induktionschemotherapie gibt es verschiedene Protokolle. Diese sollen vor Absammlung der Stammzellen eine Remission induzieren. Meist angewandt in dieser Studie war eine Standardkombination aus Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason (VCD) [60]. Nach 4-6 Zyklen wird eine Stammzellmobilisierung mit Cyclophosphamid und G-CSF (Granulozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor, engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) eingeleitet [61]. Wenn ausreichend CD34+ Zellen ins periphere Blut ausgeschwemmt sind, werden 3-6  $\times 10^6$  CD34+ Zellen/kg abgesammelt. Auf eine erfolgreiche Stammzellapharese

folgt die Hdx mit Melphalan zur möglichst vollständigen Elimination der MM Zellen [57, 58]. Die anschließende Transplantation der autologen Stammzellen bildet die Grundlage für die Rekonstitution der lymphoiden und myeloiden Zellreihen. Dieser Prozess dauert Monate bis Jahre [62]. In den ersten 6-12 Monaten nach auto-HSZT sind die Patienten daher besonders anfällig für Infekte [63].

Um eine längeranhaltende Remission zu induzieren hat es sich insbesondere bei Hochrisikopatienten etabliert, eine sogenannte Tandemtransplantation durchzuführen. Zwei Hdx und auto-HSZT im Abstand von unter sechs Monaten [64]. Eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid im Anschluss kann zudem zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit führen [59, 65].

Ein weiteres wichtiges Element bei der Behandlung von MM Patienten ist die supportive Therapie. Diese umfasst die Schmerztherapie und Versorgung von skelettalen Läsionen sowie die Behandlung von Infektionen, peripherer Neuropathie, Hyperkalzämie und thrombembolischen Ereignissen [50].

### **1.3.1 Infektionen bei MM**

Infektionen haben einen signifikanten Einfluss auf die Morbidität und mit Ausnahme der Erkrankung selbst, sind sie die Haupttodesursache bei Patienten mit MM [46]. Ca. 60% der Patienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung mindestens eine Infektion [66]. Besonders häufig sind Pneumonien, Bakteriämien und Septitiden, Harnwegsinfektionen, sowie Infektionen des zentralen Venenkatheters [46, 66, 67]. Diese sind zu 87% bakteriell bedingt [68]. Zu den häufigsten Erregern gehören Koagulase-negative Staphylokokken 43%, Escherichia coli 18%, Enterokokken 11% und Staphylokokkus aureus (5%) [66]. Zusätzlich nehmen durch neue und intensivere Therapien die Reaktivierungen von Varizella-Zoster-Virus (VZV) und anderen Viren und Pilzinfektionen zu [66, 69, 70].

### **1.3.2 Sekundäre Immundefekte bei Multiplem Myelom**

Blimark et al. beschreiben ein 7-fach höheres Risiko für bakterielle Infektionen und ein 10-fach höheres für virale Infektionen [68]. Zugrunde liegt ein Zusammenspiel von krankheitsbedingten Faktoren, therapieassoziierten Faktoren und dem häufig

schon fortgeschrittenen Alter der Patienten, wodurch es zu sekundären Immundefekten (SID) kommt [48, 66, 71].

Im Folgenden werden die immunsupprimierenden Effekte durch die Erkrankung und die verschiedenen Therapieregime gesondert dargestellt. Allerdings ist zu beachten, dass es in der Realität zu einer Überlappung der Faktoren und Einflüsse kommt. Während die Therapien zwar durch die Reduktion der Tumorlast zu einer Besserung der MM induzierten Immunschwäche führen, bewirken sie gleichzeitig eine stärkere Immunschwäche durch die Zytoreduktion [47, 72].

### **1.3.2.1 SID aufgrund der MM Erkrankung**

Ein erheblicher Teil der Infektanfälligkeit ist durch die Erkrankung am MM bedingt. Ein Großteil der Infektionen tritt in den ersten Monaten nach Diagnose auf [73]. Zu Beginn der Erkrankung sind vor allem Infektionen mit *Streptokokkus pneumoniae* und *Haemophilus influenza* beschrieben, während *Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus* und gramnegative Bakterien im Verlauf zunehmen [74, 75]. Brioli et al. konnten in einer Studie mit 479 Patienten zeigen, dass vor allem eine hohe Krankheitslast mit Knochenmarksinfiltration und Anämie sowie ein Rückfall der Erkrankung, Risikofaktoren für eine höhere Infektionsrate sind [66]. Zugrunde liegen mehrere Faktoren:

Die Knochenmarksinfiltration mit monoklonalen Plasmazellen führt zur Verdrängung der physiologischen Hämatopoese, wodurch sich eine Lymphopenie, Granulozytopenie und Anämie ergibt [41]. Die für MM Patienten typische Hypogammaglobulinämie der nicht Myelom Igs, die bei 92% der Patienten vorkommt [69] entsteht zum einen durch die Lymphopenie, zum anderen durch eine Verdrängung der polyklonalen Immunglobuline durch die monoklonal expandierten Antikörper [74]. Zusätzlich wird eine gestörte B-Zelldifferenzierung vermutet [76]. Neben den B-Zelldefiziten kommt es zu quantitativen und funktionalen Dysfunktionen der T-Zellen (insbesondere CD4+), dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) sowie einer durch die Knochenmarksinfiltration bedingten Neutropenie [47, 70]. Neben der Verdrängung der Zellreihen, sind diese Defizite auch auf die immunsupprimierende Wirkung des Tumors zurückzuführen. Um sich vor dem Immunsystem zu schützen, kommt es zur Sekretion von Zytokinen wie IL-6, IL-10, IL-15 und TGF-Beta [47]. Neben der Immundefizienz, die durch das MM direkt

hervorgerufen wird, resultiert das MM (und deren Therapien) in anderen Komorbiditäten, wie Nierenversagen, Amyloidose und Hyperkalzämie sowie Atemeinschränkung durch Wirbelfrakturen. Diese bewirken zusätzlich eine erhöhte Infektanfälligkeit [46, 70].

### **1.3.2.2 SID durch MM Therapien**

Die MM Therapie hat sich in den letzten Jahren stark verändert und neue Schemata und Therapeutika haben dazu geführt, dass sich insbesondere das Überleben der älteren Patienten verbessert hat [77]. Blimark et al. weisen darauf hin, dass die intensiveren und moderneren Immuntherapien bei MM Patienten zwar einen Überlebensvorteil bringen, aber parallel eine Zunahme der Anfälligkeit für Infektionen bewirken [68]. In Verlaufsuntersuchungen zeigte sich, dass vor allem die kumulative Dosis der Therapien einen signifikanten Einfluss auf das Immunsystem hat [70, 78]. Unter Therapie dominieren weiterhin bakterielle Infektionen, zusätzlich nehmen vor allem Viren und invasive Pilzinfektionen wie die Aspergillus-Pneumonie mit der Anzahl der Therapielinien zu [79, 80]. Das größte Risiko eine Infektion zu erleiden haben Patienten die eine Hdx mit auto-HSZT durchlaufen [66].

Die Therapien bewirken eine Schädigung und Reduktion der Immunzellen selbst und erhöhen das Risiko einer Infektion durch Begleiterscheinungen wie Schleimhautschäden, Hyperglykämien und Eisenüberladungen durch Transfusionen [48].

### **Induktionstherapie**

Die Rate der Infektionen in der Induktionsphase ist relativ gering und liegt unabhängig der Therapie bei etwa 24%. Meist liegt diese Infektion am Anfang der Therapie, weshalb ein Großteil vermutlich auf die Erkrankung selbst zurückzuführen ist [66, 73]. Die nach der aktuellen Leitlinie empfohlenen Triple-Kombinationen in der Induktionstherapie sind: Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason (VCD); Bortezomib, Lenalidomid, Dexamethason; Bortezomib, Thalidomid, Dexamethason [54]. Hinzu kommt immer häufiger ein Anti-CD38 Antikörper, da CD38 unter anderem auf Myelomzellen hoch exprimiert ist [81].

Dexamethason wird über alle Therapiephasen hinweg gegeben und führt zu einer Unterdrückung vornehmlich der Immunantwort von T- und B-Zellen, aber auch Makrophagen, dendritischen Zellen, Monozyten und Neutrophilen. Zudem hemmt es die Sekretion von Interleukinen und Zytokinen [82]. Vor allem in kumulativen Dosen birgt es ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit Soor und Viren wie Herpes simplex viren (HSV) oder VZV [72].

Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib gehören zu den Proteasominhibitoren (PI) und haben einen immunsupprimierenden Effekt auf T-Zellen durch die Depletion von CD4+ T-Zellen und die Unterdrückung der Zytotoxizität der CD8+ T-Zellen. Zusätzlich hemmen sie die Antikörperantwort und dendritische Zellen sowie Chemo- und Zytokine [83]. Mehrfach konnte eine Zunahme der HSV Infektionen und VZV Reaktivierungen gezeigt werden [84-86].

Das immunmodulierende Medikament (IMiD, engl. *immunomodulatory drug*) Lenalidomid hat einen stimulierenden Effekt auf T-Zellen, allerdings führt es zu einer verstärkten Neutropenie und damit vermehrt Grad 3-4 Infektionen [87]. Thalidomid wirkt immunmodulierend und -supprimierend auf die T-Zellen [88].

Laut Brioli et al. zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit von Infektionen (Bakteriämie, Sepsis, Pneumonie) zwischen Patienten die mit oder weitestgehend ohne IMiDs und PIs behandelt wurden. In beiden Gruppen litten die meisten Patienten an Infektionen der Atemwege (obere und Pneumonie), sowie Bakteriämie [66].

Cyclophosphamid, das sowohl zur Induktion als auch zur Stammzellmobilisierung verwendet wird, bewirkt eine Reduktion von B- und T-Zellen [89, 90] und konnte als unabhängiger Risikofaktor für Infektionen ausgemacht werden [72]. Anti-CD38 Antikörper wie Daratumumab oder Isatuximab führen zu Neutropenie und Lymphozytopenie und gehen mit einer erhöhten Inzidenz von Pneumonien und viralen Reaktivierungen einher sowie oberen Atemwegsinfekten [81, 91]. Elotuzumab, ein Antikörper gegen den SLAMF7 Rezeptor führt zu einer Lymphozytopenie.

Für die bei den Patienten der vorliegenden Arbeit am häufigsten verwendete Kombinationstherapie aus VCD ist eine Leukopenie bei 53% der Patienten beschrieben. Weitere Infektbezogene Nebenwirkungen waren Fieber, Pneumonien,

Sepsis und Neutropenie. 8% der Patienten litten an einer Herpes Zoster Infektion [60].

### **Hochdosis-Chemotherapie und auto-HSZT**

Die stärkste Immundefizienz liegt bei MM Patienten nach auto-HSZT vor. In einer Studie litten 79% der Patienten an einer Infektion [66]. Grund dafür ist die Ablation des abnormalen, aber auch gesunden Immunsystems mittels Hdx in Vorbereitung auf die auto-HSZT. In der Zeit bis die transplantierten Zellen wieder zu einem vollständig rekonstituierten Immunsystem herangereift sind, sind Patienten besonders Infektanfällig [63]. Vor allem die Hdx mit Melphalan korreliert mit einer Zunahme der Infektionen [72]. Die Immunsuppression nach HSZT bei MM Patienten unterscheidet sich nicht wesentlich von der Immunsuppression wie sie nach auto-HSZT bei Patienten mit anderen Erkrankungen vorkommen [92].

Durch die Hdx dominiert innerhalb der ersten zwei Wochen die Neutropenie und Mukositis, die mit einem hohen Risiko für bakterielle Infektionen und Mykosen einhergehen [48]. 92% der Infektionen sind bakteriell bedingt. Die Dauer der Neutropenie stellt in dieser Zeit den Hauptrisikofaktor für Infektionen dar. Es kommt vor allem zu Bakteriämien, Pneumonien und ZVK-Infektionen [66]. Nach der Rekonstitution des angeborenen Immunsystems sorgen insbesondere die verzögerte Regeneration von zellulärer- und humoraler Immunität zu SIDs [93]. Dadurch kommt es in der Rekonstitutionsphase vor allem zu viralen Infekten wie VZV- und CMV-Reaktivierungen, Clostridium difficile Infektionen und Pneumocystis jirovecii Pneumonien, häufig mit schwereren Verläufen [94, 95]. Langfristig stellen zudem Infektionen mit verkapselten Bakterien wie Pneumokokken ein Risiko für diese Patienten dar [93, 96].

### **1.3.3 Rekonstitution der humoralen und zellulären Immunität nach HSZT**

Das Immunsystem nach HSZT rekonstituiert aus zwei Quellen. Zum einen aus reifen Immunzellen, die mit dem Transplantat reinfundiert werden. Zum anderen per *de novo* Synthese aus transplantierten Vorläuferzellen [97].

In der frühen Phase basiert die Immunfunktion und Regeneration vor allem auf den reifen transplantierten Immunzellen. Bei dem humoralen Immunsystem kommt hinzu,

dass trotz depletierter B-Zellen, Antikörper auch nach der Hdx und HSZT eine gewisse Zeit erhalten bleiben. Dies basiert auf der langen Halbwertszeit der Antikörper [98] sowie einem Überleben der Hdx von langlebigen Plasmazellen [97]. Nach ca. 4-8 Monaten nach auto-HSZT erreichen die gesamt-B-Zellen wieder Normwerte [99]. Dabei durchlaufen sie die gleiche Entwicklung wie in der Ontogenese [100]. Entsprechend finden sich nach ca. 6 Monaten zunächst wieder Immunglobuline des IgM Typs im Serum und im Verlauf nach ca. 12-18 Monaten wieder isotypgewechselte Immunglobuline wie IgG und IgA [101]. Das ist darauf zurückzuführen, dass gewisse Subpopulationen wie isotypgewechselte GB und MZ-ähnliche Zellen erst später rekonstituieren [102].

Zur Differenzierung in KW GB sind CD4+ T-Zellen essentiell [103]. Diese regenerieren jedoch als letztes nach auto-HSZT [104]. Zunächst expandieren die CD8+ T-Zellen aus den transplantierten reifen Zellen, wodurch es zu einem umgekehrten CD4+/CD8+ Verhältnis kommt [99, 105]. Diese CD8+ T-Zellen sind zum Großteil Gedächtnis-Zellen [106]. Sie weisen ein geringeres Repertoire sowie ein verändertes Expressionsprofil auf [107, 108]. Erst nach ca. 6-12 Monaten entwickeln sich schließlich wieder neue CD4+ und CD8+ T-Zellen aus den transplantierten hämatopoetischen Stammzellen über die Thymopoese [109, 110]. Die *de novo* Synthese korreliert mit der Zunahme von naiven T-Zellen sowie der T-Zell-Rezeptor-Varianz [109, 111, 112]. Die Geschwindigkeit der Rekonstitution von CD4+ T-Zellen, ist daher stark abhängig vom Patientenalter und der Thymusgröße und kann je nach Alter sogar bis zu fünf Jahre dauern [105, 111, 113].

Beim MM wurde gezeigt, dass die Rekonstitution beeinflusst ist vom Remissionsstatus des Myeloms, der Konditionierungstherapie, sowie der folgenden Erhaltungstherapie [57]. Frühe Lymphozytenregeneration mit hohen absoluten Lymphozytenzahlen nach auto-HSZT bei MM Patienten gehen einher mit einem verbesserten progressionsfreien Überleben und gesamt Überleben [114, 115]. Die Immunrekonstitution der Lymphozyten nach HSZT ist somit ein wichtiges Element um MM Patienten vor Infektionen sowie einem Tumorrückfall zu schützen und dadurch die Morbidität und Mortalität der Patienten zu reduzieren [116].

#### 1.4 *In vitro* Funktionsprüfung von B-Zellen

Mit Hilfe von *in vitro* Stimulationen kann die B-Zellfunktion untersucht werden. Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) und pokeweed mitogen (PWM) sind häufig verwendete Stimulantien zur Prüfung der B-Zellfunktionalität bei Immundefizienzen [17, 117]. SAC ist ein mitogenes B-Zell-Stimulans. Es aktiviert B-Zellen über Protein A, ein typisches Protein in der Zellwand von Bakterien. Die Bindung an den BCR löst eine Proliferation der aktivierten B-Zelle aus [118]. Falkoff et al. zeigten, dass für eine Differenzierung in Immunglobulin-sezernierende-Zellen (ISC, engl. *immunoglobulin-secreting cell*) ein zweites Signal notwendig ist [118]. Dieses kann zum einen über eine TLR Stimulation erfolgen. Bekeredjian-Ding et al. wiesen nach, dass es bei zusätzlicher TLR9 Aktivierung zu einer polyklonalen IgM Sekretion kommt [119]. Für eine Differenzierung in ISCs mit Klassenwechsel ist hingegen T-Zell-Hilfe obligat. PWM ist ein mitogenes Lectin, das ein T-Zell-abhängiges Stimulans darstellt. Es führt zu einer Proliferation und Differenzierung der B-Zellen in ISCs unter der Präsenz von T-Zellen [120, 121]. SAC und PWM wirken synergistisch, wodurch es zu einer 10-fach stärkeren Aktivierung kommt und geringere T-Zell-Zahlen benötigt werden, als bei einer Stimulation mit SAC alleine [118].

Crotty et al. haben diese beiden Stimulantien zusätzlich mit den TLR9 Liganden Oligonukleotide mit Cytosin Guanin Motiven (CpG) kombiniert. Dieses gilt als hoch effektiver Stimulationsansatz zur Generierung von ISCs [17]. CpG ist ein polyklonales Stimulans, das wie oben beschrieben zusammen mit einer BCR Stimulation über TLR9 eine T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung initiiert. Zusätzlich kann CpG direkt GBs stimulieren, da diese TLR9 dauerhaft exprimieren, wodurch es bei Kontakt mit CpG zu einer Proliferation und Differenzierung in ISCs kommt [122].

Eine Kombination aus CD40L, CpG und IL-21 wird als effektivstes Stimulans für B-Zellen beschrieben. Es induziert sowohl eine B-Zell-Proliferation, sowie eine Differenzierung in ISCs und Plasmazellen. Dabei kommt es zu einer gleichstarken Produktion von IgG, IgM und IgA Antikörpern [123, 124]. Während CpG, wie oben beschrieben, ein T-Zell-unabhängiges Stimulans darstellt, provozieren CD40L und IL-21 eine T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung.

CD40L führt über eine Bindung an CD40 auf der Oberfläche der B-Zellen zur Proliferation und Aktivierung von naiven und GB [37, 125]. *In vivo* wird es primär auf

aktivierten T-Zellen exprimiert, aber kann auf verschiedenen Immunzellen und nicht Immunzellen gefunden werden und liegt außerdem in einer löslichen Form vor. Insbesondere bei Entzündungen wird es auch auf Monozyten, NK-Zellen, Mastzellen und Basophilen exprimiert [126, 127]. Der CD40 Signalweg unterstützt die Keimzentrumsformation, das Überleben der Keimzentrum-B-Zellen, den Ig-Klassenwechsel, die somatische Hypermutation und somit letztendlich die Formation von langlebigen Plasmazellen und GB [128]. *In vitro* bewirkt es vor allem eine interzelluläre Adhäsion, Proliferation und Expansion, Differenzierung in ISCs und den Ig-Klassenwechsel [129, 130].

IL-21 ist als das potenteste B-Zell-Stimulans beschrieben [131, 132], indem es die B-Zell-Proliferation und -Differenzierung von naiven B-Zellen und GB in ISCs fördert [123, 133, 134]. Es steuert den Erhalt des Keimzentrums und spielt somit ebenfalls eine kritische Rolle für den Ig-Klassenwechsel sowie die Differenzierung in Plasmazellen und GB [135]. *In vivo* findet es sich auf aktivierten CD4+ T-Zellen und NKT-Zellen [131]. In Anwesenheit von CpG und ohne CD40L führt IL-21 zur B-Zell-Apoptose [136]. Eine Kostimulation mit CD40L hingegen verstärkt die durch IL-21 induzierte Ig-Produktion [137]. Ähnlich konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Stimulation mit CD40L die Differenzierung in Plasmazellen durch CpG inhibiert [138] wobei der Ansatz kombiniert mit IL-21 die Differenzierung fördert [123, 124].

## **1.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es bei Patienten mit MM die phänotypischen Veränderungen der B-Zellen und ihre Funktionen genauer zu untersuchen. Hintergrund sind eine zunehmend hohe Morbidität und Mortalität, die von Infektionen bei Patienten mit MM ausgehen. Neben der Erkrankung selbst, sind Infektionen die Haupttodesursache. Zugrunde liegen sekundäre Immundefekte durch das MM selbst sowie bedingt durch die Therapien. Immer effektivere Therapieverfahren und Mehrlinientherapien führen zwar zu einer besseren Ansprechrate und haben das MM zu einer chronischen Erkrankung gemacht, gleichzeitig bewirken sie eine zusätzliche Immunsuppression, insbesondere die Hdx mit auto-HSZT. Überwiegend bakterielle Infektionen erlauben den Rückschluss auf eine Defizienz der humoralen Immunantwort. Beschrieben werden unter anderem eine Hypogammaglobulinämie und eine verminderte Zahl an

B-Zellen. Untersuchungen der B-Zell-Immunität bei Patienten mit MM beschränkten sich bisher vor allem auf quantitative Gesamt-B-Zellveränderungen. B-Zell-Subpopulationen und deren Veränderungen im Verlauf der Therapie wurden bisher kaum untersucht. Eine eingeschränkte B-Zellfunktion *in vitro* wurde sowohl bei der MM Erkrankung als auch nach auto-HSZT festgestellt. Die eindeutige Ursache der Funktionseinschränkung sowie erfolgreiche Stimulationen zur Wiederherstellung der B-Zellfunktion bei diesen Patienten sind noch nicht bekannt. Diese Arbeit soll ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden B-Zelldefekte und ihrer Ursachen schaffen und damit eine Grundlage für gezielte präventive und therapeutische Strategien darstellen.

In dieser Intention wurden die B-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit MM mittels Durchflusszytometrie, *in vitro* Stimulation und B-Zell ELISpot untersucht.

Analysiert wurden die Veränderungen des B-Zell-Kompartiments und seinen Subpopulationen durch die MM Erkrankung selbst, die Induktionstherapie und die Hdx mit nachfolgender auto-HSZT.

Dabei lag der Fokus auf

- 1) den quantitativen Veränderungen der B-Zellen und ihrer Subpopulationen durch die MM Erkrankung und MM Therapien.
- 2) den funktionalen Unterschieden zwischen Patienten und Gesunden in Bezug auf ihre Immunantwort auf *in vitro* Stimulationen mit T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Stimulantien
- 3) die Relevanz der quantitativen Veränderungen von B- und T-Zellen für die *in vitro* Funktion bei Patienten nach Hdx mit auto-HSZT.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Humanes Blut**

Für diese Arbeit wurden Blutproben von gesunden Spendern (Gesunde) und onkologischen Patienten in CPT- (*engl. Cell Preparation Tube*) oder Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler gelagert und innerhalb von 5h bearbeitet. Die Akquirierung und

Untersuchung der Blutproben war durch die Ethik Kommission der Charité Universitätsmedizin Berlin im Rahmen der 1964 Deklaration von Helsinki und ihren späteren Anhängen genehmigt (Nr. EA1/252/14).

### 2.1.2 Gesunde Spender

Gesunde Kontrollen (n=11) definierten wir als Spender ohne bekannte immunologische Erkrankung. Nach Aufklärung und Einverständnis wurde den Probanden 18-20ml Vollblut abgenommen.

### 2.1.3 Onkologische Patienten

Die Patientenkohorte setzte sich aus insgesamt 19 MM Patienten der Stationen oder Ambulanzen des Charité Campus Virchow Klinikum, Campus Benjamin Franklin und Campus Mitte zusammen. Dies wurde freundlicherweise von Dr. Friedrich Wittenbecher, Prof. Il-Kang Na, Dr. Axel Nogai, Prof. Philipp le Coutre, Prof. Igor Wolfgang Blau und Prof. Lars Bullinger unterstützt. Fünf der Patienten waren kürzlich neudiagnostiziert und therapienaiv. Bei diesen wurde einmalig 18-20 ml Vollblut abgenommen. 14 Patienten durchliefen eine auto-HSZT und wurden zweimalig, sowohl vor der Hdx Melphalan und bis zu einen Monat nach HSZT untersucht. Bei diesen Patienten wurde zwischen 18-40 ml Vollblut abgenommen, je nach zu erwartender PBMC Zahl. Alle Patienten waren volljährig und gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

### 2.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Vertrieb</b>
<b>Gibco DPBS (1x)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Tween ® 20</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>BSA Albumin Fraktion V</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Buffer EL Erythrocyte lysis buffer</b>	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>Biocoll Separating Solution</b>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

<b>Trypan Blau Lösung 0,4%</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>RPMI 1640 Medium</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>FCS</b>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<b>(CpG) ODN M362 (Typ C) Endotoxin-frei</b>	Innaxon Biosciences, Tewkesbury, Großbritannien
<b>Lectin der Phytolacca americana (Pokeweed)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Rekombiniertes Humanes Interleukin-21</b>	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
<b>Rekombiniertes Humanes CD40L</b>	Biologend, San Diego, USA
<b>Streptavidin-HRP</b>	Biologend, San Diego, USA
<b>3-Amino-9-ethylcarbazole Tablette</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Essigsäure 100%</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumacetat Trihydrat</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Wasserstoffperoxid 30%</b>	VWR, Dresden, Deutschland
<b>N,N-Dimethylformamid</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Beriglobin ® FSP</b>	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
<b>Dapi (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)</b>	Biologend, San Diego, USA
<b>FlowClean Reinigungslösung</b>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>Aqua</b>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Cytoflex Sheath Fluid</b>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

## 2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Flouorchrom	Spezies	Produzent
Anti-Human CD3	Pacific Blue <sup>TM</sup>	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human CD19	PE/Cy7	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human CD27	FITC	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human CD38	Alexa Fluor <sup>®</sup> 700	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human CD24	PerCP/Cy5.5	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human IgD	APC/Cy7	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human IgM	APC	Maus	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Human IgG	PE	Maus	Biolegend, San Diego, USA

## 2.1.6 Antikörper für den ELISpot

Tabelle 4: Antikörper für den ELISpot

Antikörper	Konjugat	Spezies	Produzent
Anti-Human IgA, $\alpha$ Ketten spezifisch Primärantikörper		Ziege	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Human IgG, Fc $\gamma$ Fragment spezifisch Primärantikörper		Ziege	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Human IgM,		Ziege	Dianova GmbH,

<b>Fc5<math>\mu</math> Fragment</b> <b>spezifisch</b> <b>Primärantikörper</b>				Hamburg, Deutschland
<b>Anti-Human IgA</b> <b>Sekundärantikörper</b>	Biotin		Ziege	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Anti-Human IgG</b> <b>(H+L), F(ab')<sub>2</sub></b> <b>Fragment</b> <b>Sekundärantikörper</b>	Biotin		Ziege	BD Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
<b>Anti-Human IgM</b> <b>(H+L), F(ab')<sub>2</sub></b> <b>Fragment</b> <b>Sekundärantikörper</b>	Biotin		Ziege	BD Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Vertrieb</b>
<b>MultiScreenHTS-IP Filter Platte</b>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<b>Whatman Purdisc Spitzenvorsatzfilter mit Zellulose azetat Membran, 0,2<math>\mu</math>g, steril</b>	VWR, Dresden, Deutschland
<b>Falcon® 6-Well Zellkulturplatte</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
<b>Falcon® Round Bottom Tube Zellkulturröhrchen</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
<b>5 ml Spritze</b>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>10 ml Spritze</b>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Sterican® Kanüle Gr.0.80 X 50</b>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Flacon® Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)</b>	Corning, Corning, NJ, USA

<b>Vacutainer CPT mit Na-Heparin</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
<b>Citratröhrchen Vacutainer (5ml, 10ml)</b>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
<b>Nalgene Kryoröhrchen (2ml) steril</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Frischhaltefolie</b>	Hildebrandt & Bartsch GmbH, Blankenfelde-Mahlow, Deutschland

### 2.1.8 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Vertrieb</b>
<b>Brutschrank HERAcell 240i</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Kühlschrank -4°C/-20°C</b>	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
<b>Gefrierschrank -80°C 4F755G</b>	Dometic medical systems, Hosingen, Luxemburg
<b>Sterilwerkbank HERA-Safe 2020</b>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Wasserbad</b>	Lauda-GFL, Königshofen, Deutschland
<b>Schüttler Mini shaker</b>	VWR, Dresden, Deutschland
<b>Präzisionswaage XR 2055M-DR</b>	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
<b>Zentrifuge Allegra® X-I5R</b>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>Tischzentrifuge HERAEUS Megafuge 40R</b>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Durchflusszytometer Cytoflex S</b>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>Durchflusszytometer Cytoflex LX</b>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>ELISpot Reader AID iSpot</b>	AID Diagnostika GmbH, Straßberg, Deutschland
<b>Zellzähl- und Analysesystem CASY Modell TTC</b>	Innovatis GmbH, Bremerhaven, Deutschland
<b>Neubauer Zählkammer Improved Optik Labor</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<b>Lichtmikroskop Primo Vert</b>	Carl Zeiss AG, Deutschland

<b>Mikropipetten (0,1 µl-1000 µl)</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Multipette E3x</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>8 Kanal Pipette Xplorer</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Pipetboy 2</b>	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
<b>Vortex-Genie 2</b>	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
<b>Einfrier Kontainer CoolCell LX</b>	Pelo Biotech GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland

### 2.1.9 Software

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Produzent</b>
<b>CytExpert</b>	2.3.0.84	Beckman Coulter, Inc.
<b>FlowJo™</b>	10.6.2	BD Biosciences
<b>AID ELISpot Reader Version</b>	7.0.0.0	AID GmbH
<b>GraphPad Prism Version</b>	9.0.1	GraphPad Software, LLC.

### 2.1.10 Puffer und Medien

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Genutzt für</b>
<b>Waschpuffer</b>	PBS + 0,05% Tween + 1% BSA	ELISpot
<b>Acetatpuffer 0,1M</b>	148 ml 0,2 M Essigsäure (2,3 ml glacial Essigsäure + 200 ml dest. Wasser 352 ml 0,3 M Natriumacetat Lösung (27,2 g Natriumacetat + 1000 ml dest. Wasser) auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen auf pH von 5,5 anpassen	ELISpot Entwicklung
<b>AEC-DMF Lösung</b>	1 Tablette 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) + 2 ml	ELISpot Entwicklung

	Dimethylformamid (DMF)	
<b>Entwicklungslösung</b>	Azetatpuffer + 3% AEC-DMF Lösung	ELISpot Entwicklung
<b>Kulturmedium</b>	RPMI + 10% FCS + 1% P/S	Zellkultur
<b>Einfriermedium</b>	RPMI + 1% P/S + 20% FCS + 10% DMSO	Einfrieren PBMCs

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 PBMC Isolation

Patienten und Gesunden wurde in BD Vacutainer Heparin Röhrrchen oder im BD Vacutainer CPT System mit Heparin, Blut entnommen und mittels Dichte Gradienten Zentrifugation Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) isoliert.

Heparin Blut wurde 1:1 mit PBS in einem 50 ml Falcon Röhrrchen auf 35 ml verdünnt. In einem zweiten 50 ml Falcon wurde diese Verdünnung über 15 ml Biocoll Trennflüssigkeit geschichtet und bei 850 g für 20 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennt sich das Blut in drei Schichten. Erythrozyten und Granulozyten wandern durch die Biocoll Schicht und sammeln sich am Boden des Röhrrchens. Oberhalb des Bicolls liegt ein weißer Ring an PBMCs und darüber in PBS verdünntes Plasma. Die PBMC-Schicht wurde mittels serologischer Pipette abgenommen und in ein neues Falcon übertragen, um sie mit PBS in einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt (300 g bei RT) zu waschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und mit dem CASY Zellzählssystem gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton Flüssigkeit verdünnt. CASY aspiriert die Zellen durch eine Messpore, misst dabei Einzelzellen und differenziert anhand der Zellkerngröße zwischen lebenden und toten Zellen.  $1,5 \times 10^6$  lebende PBMCs wurden der Zellsuspension schließlich für die durchflusszytometrische B-Zell-Analyse *ex vivo* entnommen. Für die Zellkultur wurden  $4 \times 10^6$  Zellen pro Well entnommen. Unverwendete Zellen wurden erneut in PBS + BSA gewaschen, 5 min bei 300 g zentrifugiert und in Einfriermedium in einem CoolCell Einfrierkontainer bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Röhrcchen des BD Vacutainer CPT Systems enthalten 1 ml Heparin und eine fixierte Biocoll Trennschicht. Nach der Blutabnahme wurden die Röhrcchen mehrmals invertiert und anschließend bei 1800 g für 25 min bei RT mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entsteht die gleiche Auftrennung des Blutes in drei Schichten, wie sie oben beschrieben ist. Die folgenden Schritte wurden entsprechend gleich durchgeführt.

### **2.2.2 Zellkultur und Stimulation**

Das folgende Protokoll zur Kultivierung und Stimulation von PBMCs wurde von Rösel et al. [139] bzw. Steiner et al. [unveröffentlicht] adaptiert. Die aus Heparinblut isolierten PBMCs wurden in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen in 3 ml Kulturmedium pro Well in einer 6-Well-Platte kultiviert. Die Zellen wurden polyklonal über 7 Tage bei 5% CO und 37°C stimuliert. Dafür wurde entweder SAC (1:10.000), 100 ng/ml PWM, 6µg/ml CpG und 50 µM/ml β-Mercaptoethanol (β-ME) oder 270 ng/ml CD40L, 30 ng/ml IL-21 und 6 µg/ml CpG verwendet. Um eine Verdunstung zu vermeiden wurden die 6-Well-Platten in Frischhaltefolie gewickelt inkubiert.

### **2.2.3 B-Zell-Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein zellbiologisches Messverfahren, welches zur Charakterisierung von Zellpopulationen verwendet wird. Flouorchrom-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächen- oder intrazelluläre Epitope der Zellen, werden im Durchflusszytometer mit Lasern detektiert. Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit unter anderem angewandt, um innerhalb der PBMCs die B-Zellen *ex vivo* und nach siebentägiger Stimulation *in vitro* zu phänotypisieren und quantifizieren. *Ex vivo* wurden nach der PBMC Isolation (s.o.)  $1,5 \times 10^6$  lebende PBMCs der Zellsuspension entnommen und an Tag 7 aus den jeweiligen stimulierten Zellkulturen. Diese wurden erst mit 1 ml PBS + BSA und ein zweites Mal in 1 ml reinem PBS gewaschen indem sie bei 300g 5 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und in der Restflüssigkeit (ca. 100 µl) die Zellfärbung mit flouorchrom-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Eine vollständige Übersicht der Antikörper mit ihrem Bindungsepitop, ihrem gekoppelten Flouorchrom und der verwendeten Verdünnung ist in Tabelle 5 aufgeführt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Färbung mit 1

ml PBS + BSA gestoppt und abermals bei 300g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pallet mit 200 µl PBS resuspendiert und kurz vor der Messung Dapi zur lebend-tod Differenzierung hinzugegeben. Gemessen wurde am Durchflusszytometer Cytoflex S oder Cytoflex LX von Beckman Coulter. Die dafür verwendete Software war Cytexpert Version 2.3.0.84. Zur Auswertung des B-Zell-Panels wurde die Software FlowJo Version 10.6.2 genutzt.

**Tabelle 5: Eigenschaften der zur Färbung des B-Zell-Panels verwendeten Antikörper (siehe auch [140])**

<b>Zielepitop</b>	<b>Flouorchrom-Konjugat</b>	<b>Verdünnungsfaktor x:100</b>
<b>CD19</b>	PE-Cy7	0,5
<b>IgD</b>	APC-H7	0,5
<b>CD3</b>	PB	1
<b>IgG</b>	PE	1
<b>CD27</b>	FITC	1,5
<b>CD38</b>	AF700	1,5
<b>IgM</b>	APC	2
<b>CD24</b>	PerCP-C5,5	2
<b>Lebend/Tod</b>	Dapi	1

#### **2.2.4 ELISpot**

Der B-Zell ELISpot ist eine Methode zur Quantifizierung der B-Zellfunktion, indem ISCs über *Spots* sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde sie genutzt um nach siebentägiger Stimulation mit C/I/C oder S/P/C die ISCs zu bestimmen.

An Tag 6 wurde eine standardisierte 96-Well Multiscreen Filter Platte mit 1,2 µg/ml Ziege anti-Human IgG, 10 µg/ml Ziege anti-Human IgM oder 15 µg/ml Ziege anti-Human IgA in PBS beschichtet. Die Kontrollfelder wurden mit sterilem PBS bedeckt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte drei Mal mit 200 µl/Well sterilem PBS gewaschen und bei 37°C mit 200 µl/Well Kulturmedium für 1h geblockt. Die stimulierten Zellen wurden an Tag 7 geerntet, zwei Mal mit 3 ml Kulturmedium gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden die Zellen in einer 1:5 Verdünnung mit 0,4% Trypan Blau Lösung gefärbt und in einer Neubaur

Zählkammer gezählt. Die Zellkulturüberstände wurden entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von  $5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $1,25 \times 10^4$ ,  $6,25 \times 10^3$ ,  $3,125 \times 10^3$  und  $1,56 \times 10^3$  Zellen pro  $100 \mu\text{l}$  Kulturmedium pro Well auf die Platte aufgetragen und 4h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die unterschiedlichen Verdünnungen dienten der Bestimmung der *Spots* bei optimaler Verdünnung und variierten zwischen Gesunden und Patienten sowie den Ig-Isotypen. Nach der Inkubation wurden die Platten sechs Mal mit  $200 \mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Zellen und Antikörper wieder zu entfernen. Biotin-gekoppelte Antikörper wurden verdünnt (IgG/IgM 1:5.000; IgA 1:500) und in steril filtriertem Waschpuffer auf die Platte aufgetragen. Es folgte eine Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  über mind. eine Nacht, bis zu einer Woche. Im Anschluss wurden die Platten ein weiteres Mal mit  $200 \mu\text{l}$  Waschpuffer pro Well gewaschen und mit Biotin bindendem Streptavidin-HRP mit einer Konzentration von  $2,5 \mu\text{g/ml}$  für 1h im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschgängen mit  $200 \mu\text{l}$  PBS pro Well wurde die Entwicklungslösung auf die Platte gegeben. Diese bestand aus 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) in Dimethylformamid (DMF) 1:30 verdünnt in Azetatpuffer und steril filtriert.  $3\% \text{H}_2\text{O}_2$  wurde in einer 1:100 Verdünnung hinzugegeben und dann  $100 \mu\text{l}$  der Entwicklungslösung pro Well verteilt. Nach 3 Minuten Entwicklung im Dunkeln wurde diese durch 5-faches Spülen der Platte unter fließendem Wasser gestoppt. Nach vollständigem Trocknen auf der Lüftung der Sterilbank wurden die Platten im AID ELISpot Reader 7.0.0.0 analysiert. Die AID ELISpot Software wurde genutzt um die Platten im Anschluss auszuwerten. Dabei wurden die *Spot*-Zählungen anhand von immunglobulinspezifischen Masken durchgeführt und alle Platten manuell verifiziert. Die geeignetste Verdünnung wurde durch die Division der Zählungen aufeinanderfolgender Verdünnungen identifiziert und schließlich die *Spots* auf 10.000 Zellen pro Well normiert.

### **2.2.5 Immunfixation**

Die Immunfixation ist eine Methode zur Analyse von monoklonalen Proteinen in Körperflüssigkeiten und dient somit bei der Diagnostik des MMs der Identifizierung von M-Protein in Serum und Urin. Hier wurde diese Methode angewandt, um monoklonale Proteine in Zellkulturüberständen aufzudecken. Ziel war es, festzustellen, ob die Stimulationen eine monoklonale Proliferation fördern. Dafür

wurde nach siebentägiger Zellstimulation der Zellkulturüberstand eingefroren und anschließend für die Immunfixation wieder aufgetaut. Analog zu Urin, wurden die Zellkulturüberstände anhand einer Gel Elektrophorese aufgetrennt, um monoklonale Proteine sichtbar zu machen. In der ersten Reihe des Gels wurden mittels Fixierungslösung alle Proteine sichtbar gemacht und somit die Verteilung von Alpha-, Beta- und Gammaglobulinen beurteilt. Zusätzlich wurde im Bereich der Gammaglobuline der Antikörperklon näher bestimmt. Dafür wurden Antikörper gegen IgG, IgM, IgA und in der Leichtketten Bestimmung Antikörpern gegen kappa oder lambda Leichtketten eingesetzt. Durch die Bindung der Antikörper an Proteine kommt es zu einer Ausfällung der betroffenen Proteine, die durch das Auswaschen der nicht gebundenen Proteine im Gel sichtbar werden. M-Protein ist im Urin ab einer Menge von  $\geq 0,04$  g/L nachweisbar [51]. Die Immunfixation der Zellüberstände wurde vom Labor Berlin durchgeführt.

#### **2.2.6 Leukozyten-Charakterisierung in Vollblut**

Aus dem heparinisierten Blut der Patienten wurden vor der PBMC Isolation 100  $\mu$ l abgenommen, um eine exakte Zählung der Leukozyten Populationen im Vollblut mittels Durchflusszytometrie durchzuführen. Extrahiert aus dieser Untersuchung wurden die CD4+ Zellzahlen bei post-HSZT Patienten. Aufgrund der Überschneidung von Emissionsspektren der Flouorchrom-gekoppelten Antikörper, werden in Tabelle 6 alle im Panel verwendeten Antikörper samt Flouorchrom und Verdünnung aufgelistet. Diese wurden in die 100  $\mu$ l Blut gegeben und die Zellen für 15 Minuten im Dunkeln bei RT gefärbt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden außerdem 2  $\mu$ l Beriglobin hinzugegeben. Durch Zugabe von 1 ml Quiagen Erythrozyten Lyse Puffer wurde die Färbung gestoppt und gleichzeitig eine Erythrozyten Lyse initiiert. Dafür wurden die Zellen 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und zwischenzeitig gevortext. Im Anschluss wurden 900  $\mu$ l zweifach konzentriertes PBS + 0,4% BSA hinzugegeben und innerhalb von 15 min am Cytoflex LX gemessen. 500  $\mu$ l der Probe wurden gemessen bei einer Rate von 50  $\mu$ l/min.

Tabelle 6: Eigenschaften der im Leukozyten Panel verwendeten Antikörper (siehe auch [140])

Zielepitop	Flouorchrom-Konjugat	Verdünnungsfaktor x:100
CD25	APC	2
CD3	A700	0,5
CD16	APC-750	2
CD127	PE	1
CD56	PE Dazzle	0,5
CD123	PE-Cy7	0,5
IgD	FITC	0,5
HLA-DR	PerCP-C5,5	1
CD27	BV421	0,5
CD4	BV510	2
CD19	BV605	0,5
CD14	BV650	0,5
CD8	BV785	0,5
CD45	BUV395	1

### 2.2.7 Erhebung klinischer Daten und Datenmangement

Zur Erhebung der klinischen Daten wurde die elektronische Patientenakte des SAP-Systems der Charité Universitätsmedizin Berlin genutzt. Der Fokus lag auf der Inzidenz von Infektionen insbesondere post-HSZT. Der Erreger Typ (bakteriell/viral/mykotisch) sowie der genaue Erreger wurden, wo bekannt, angegeben. Bei den ND hatten zusätzlich die MM Typen eine große Relevanz, da diese zur Auswertung der Immunfixation herangezogen wurden. Außerdem die im Serum gemessenen Ig-Spiegel für den Vergleich der Funktion *in vivo* und *in vitro* verglichen. Komorbiditäten wurden bei möglichem Einfluss auf die Immunfunktion extrahiert.

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten und Spender wurden mittels Kennziffern pseudonymisiert und in einer elektronischen Datenbank abgespeichert. Die Verarbeitung der Proben und Daten wurde nur auf Grundlage der pseudonymisierten Patientendatenbank vorgenommen. Zugang zu den

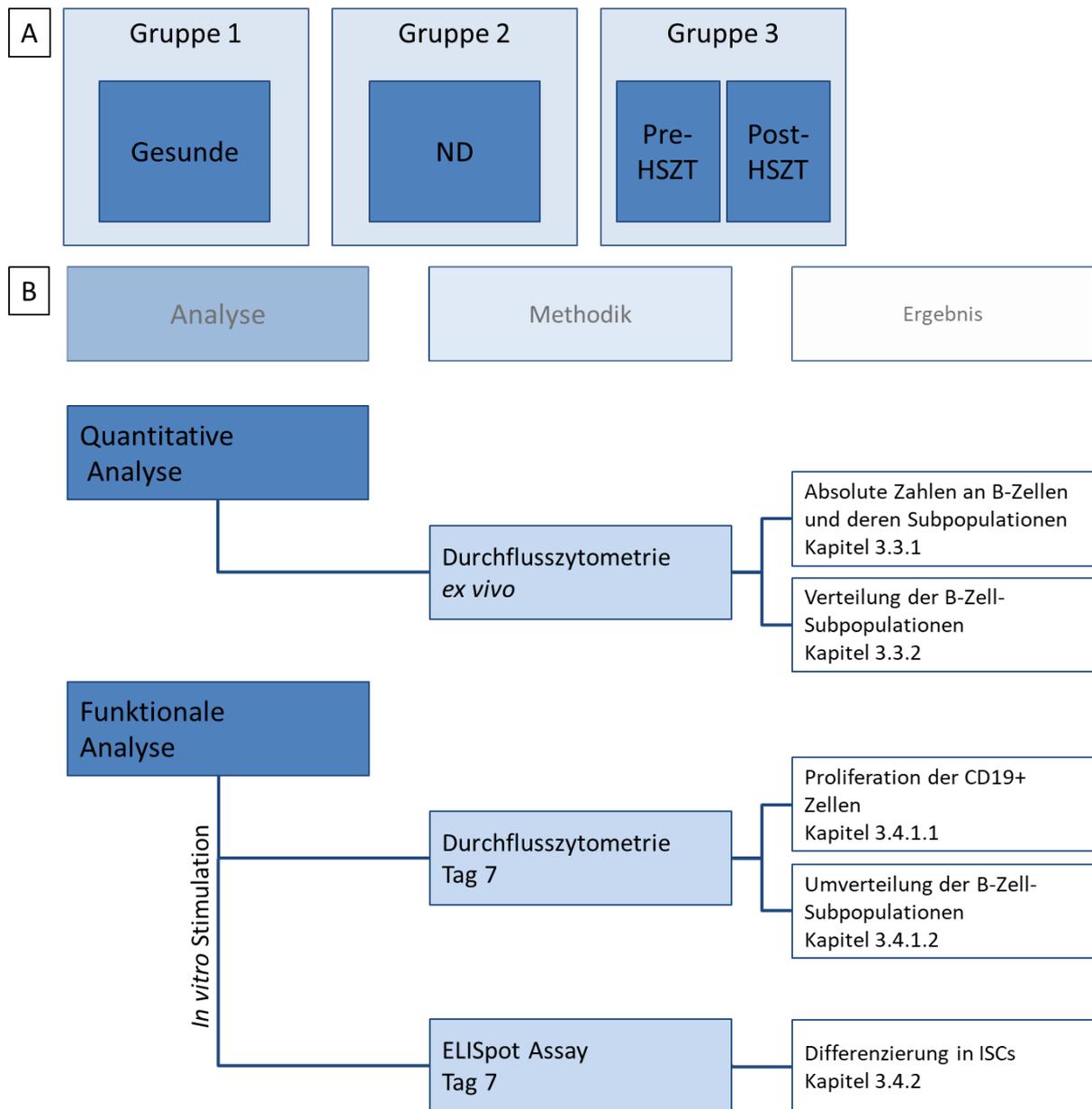
personenbezogenen Daten anhand einer Identifikationsliste war nur der Projektleitung möglich.

### **2.2.8 Statistik**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 9.0.1 durchgeführt. Auf Grund der kleinen Kohorten und weil eine Normalverteilung der Daten nicht vorausgesetzt werden konnte (überprüft mittels Shapiro-Wilk-Test) wurden nicht parametrische Testverfahren zum Vergleich der Daten genutzt. Somit erfolgte die Darstellung der Ergebnisse im Median mit Angabe des Interquartilsabstandes (IQA). Zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede intervallskalierter Zahlen bei zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet, bei gepaarten Proben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Gesunde verglichen mit ND, pre-HSZT und post-HSZT und ND verglichen mit pre-HSZT stellten dabei unabhängige Stichproben dar. Vergleiche der gleichen Patienten pre- und post-HSZT und die Ergebnisse der Stimulationen mit CD40L/IL-21/CpG und SAC/PWM/CpG der jeweils gleichen Patienten stellten abhängige Stichproben dar. Ein Patient wurde zu allen drei Zeitpunkten (ND, pre-HSZT, post-HSZT) untersucht, was bei dem Vergleich zwischen ansonsten unabhängigen Stichproben bei ND und pre-HSZT nicht beachtet werden konnte. Bei dem Vergleich von drei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Zur Berechnung von Zusammenhängen von nicht normalverteilten, intervallskalierten Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman angewandt. Anhand von diesem wurden die Korrelationen in schwach ( $0,3 < r < 0,5$ ), moderat ( $0,5 < r < 0,7$ ) und stark ( $r > 0,7$ ) eingeteilt. Um weitere Einflussfaktoren auf die B-Zellfunktion post-HSZT zu evaluieren wurde eine multiple Regression mit jeweils maximal drei Variablen (aufgrund der geringen Patientenzahl) berechnet.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine explorative Datenanalyse. Für das Signifikanzniveau wurde die exakte-2-seitige Signifikanz errechnet. Dabei wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  (Irrtumswahrscheinlichkeit) als statistisch signifikant gewertet. Diese p-Werte wurden nicht für multiples Testen adjustiert und sind als explorativ zu bewerten.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studienaufbaus**

**A** zeigt in hellblau die drei untersuchten Probandengruppen: Gesunde Spender, neudiagnostizierte Patienten (ND) und Patienten die eine auto-HSZT durchliefen. In den dunkelblauen Kästen sind die vier Probenentnahmen aufgeschlüsselt, wobei bei den Patienten, die eine auto-HSZT durchliefen eine Entnahme vor Hdx (pre-HSZT) und eine nach HSZT (post-HSZT) erfolgte. **B** ist eine Veranschaulichung des analytischen Vorgehens in dieser Arbeit mit Differenzierung der verwendeten Methoden und den Parametern, die zur Ergebnisbeurteilung herangezogen wurden. Verweise geben an, in welchem Kapitel die Ergebnisse jeweils zu finden sind.

### 3.1 Klinische Charakteristika der Patienten

Insgesamt wurden 19 MM Patienten und 11 gesunde Spender in diese Studie eingeschlossen. Bei den Patienten waren fünf neudiagnostiziert und 14 wurden im Rahmen ihrer auto-HSZT (pre- und post-HSZT) untersucht. Dabei ist ein Patient von Neudiagnose bis nach HSZT verfolgt worden und somit in beiden Patientengruppen. Innerhalb der drei untersuchten Probandengruppen ergaben sich somit zur Interpretation der Ergebnisse vier verschiedene Gruppen, da die auto-HSZT Patienten zu zwei Zeitpunkten untersucht wurden (Abbildung 3 A):

- 1) Gesunde Vergleichsgruppe.
- 2) Neudiagnostizierte Patienten (ND), ohne vorherige Therapie.
- 3) Therapierte Patienten, die alle Induktionstherapie, eine Mobilisierung mit Cyclophosphamid (Cyclomob.) und eine G-CSF-Gabe zur Stammzellmobilisierung vor der Hdx erhalten haben (pre-HSZT). In einigen Fällen wurden weitere Therapien verabreicht (Tabelle 9).
- 4) Patienten in der frühen Rekonstitutionsphase (innerhalb eines Monats) nach auto-HSZT (post-HSZT).

Tabelle 7: Übersicht der in der Studie eingeschlossenen Spender und Patientengruppen

	Anzahl	Alter Ø	Geschlecht (%)	MM (%)	Subtyp	Revised ISS (%)	Pat. mit Infektionen
<b>Gesunde</b>	11	42 J.	m: 45 w: 55	N.A.		N.A.	0/11
<b>ND</b>	5	69 J.	m: 40 w: 60	IgG: 80 IgG und Leichtketten: 20		I: 20 II: 60 III: 20	1/5
<b>Pre-/Post HSZT</b>	14	60 J.	m: 64 w: 36	IgG: 64,3 IgA: 14,3 Leichtketten: 21,4		I: 14 II: 36 III: 21 N.A.: 29	Pre: 1/14 Post: 10/14

Abkürzungen: m: männlich; w: weiblich

Unter den ND war die Geschlechterverteilung 60% weiblich zu 40% männlich und das Durchschnittsalter betrug 69 Jahre (Tabelle 7). Drei Patienten litten an einem MM des IgG Typen, einer an einem Leichtketten Myelom und in einem Fall blieb es

ungeklärt. Mit der Ausnahme eines Patienten, der die Differentialdiagnose eines Plasmozytoms hatte, zeigten sich bei allen ND erniedrigte Serum Spiegel der nicht MM Igs (Tabelle 8, erniedrigte Werte blau markiert). Eine vor kurzem stattgefundenene Infektion war bei einem Patienten festgestellt worden. Komorbiditäten durch das MM oder mit möglichem Einfluss auf den Immunstatus sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die häufigsten Beschwerden waren myelombedingte Osteolysen.

**Tabelle 8: Klinische Hintergründe der ND MM Patienten**

ND	MM Subtyp	Staging	Immunglobuline im Serum	Komorbiditäten	Infektionen
<b>P002</b>	IgG Kappa	ISS II	Gamma-glob.: 17,5% IgG: 15,95g/l IgA: 1,24g/l IgM: 0,31 g/l LambdaLK: 7mg/l Kappa LK: 26,04 mg/l	Osteolysen HWK/ Os Sacrum	
<b>P008</b>	LK Kappa	ISS III	Gamma-glob.: 22,8% IgG: 13,12 g/l IgA: 0,25 g/l IgM: 0,08 g/l LambdaLK: 8,77 mg/l KappaLK: 21600 mg/l	Osteolysen ges. Skelett, Nierenversagen dialysepflichtig	E. coli Sepsis
<b>P009</b>	LK Lambda; DD Plasmozytom	ISS I	Gamma-glob.: 16,4% IgG: 11,5 g/l IgA: 1,88 g/l IgM: 1,15 g/l Lambda LK: 65,66 mg/l Kappa LK: 26,87 mg/l	Osteoporose	
<b>P014</b>	IgG Lambda	ISS II	Gamma-glob.: 44,7 % IgG: 48,41 g/l IgA: 0,66 g/l IgM: 0,18 g/l Lambda LK: 1347mg/l Kappa LK: 34,21 mg/l	Z.n. transplantation, sek.HP, DM Typ 2, Nikotinabusus	Nieren-
<b>P015</b>	IgG Kappa	ISS II	Gamma-glob.: 46,8 %	Oteolyse	mit

IgG:	55,6	g/l	pathologischen
IgA:	0,18	g/l	Frakturen
IgM:	0,07	g/l	LWK4/5
Lambda LK:	N.A.		
Kappa LK:	1255	mg/l	

Abkürzungen: Gamma-globuline: Gamma-glob.; Leichtketten: LK; sekundärer Hyperparathyroidismus: sek. HP; Diabetes Mellitus: DM; Halswirbelkörper: HWK; Lendenwirbelkörper: LWK; Escherichia coli: E.coli  
Referenzwerte: Gamma-glob.: 11,1-18,8 %; IgG: 7-16 g/l; IgA: 0,7-4 g/l; IgM: 0,4-2,3 g/l; Lambda LK: 5,7-26,3 mg/l; Kappa LK: 3,3-19,4 mg/l

Die pre/post-HSZT Gruppe umfasste 14 Patienten. Bei ihnen wurde zu zwei Zeitpunkten peripheres Blut untersucht, einmal vor Hdx und einmal nach HSZT. Unter den Erkrankten waren 65% männlich und 35% weiblich. Da für gewöhnlich vermehrt jüngere Patienten mit auto-HSZT behandelt werden, lag das Durchschnittsalter bei 60 Jahren und somit unter dem der ND und dem durchschnittlichen Erkrankungsalter in Deutschland (73 Jahre) [43]. Neun Patienten litten an einem MM Typ IgG, zwei Typ IgA und drei an einem Leichtketten Myelom.

Vortherapiert wurden die meisten Patienten mit dem Induktionschema Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason (VCD) (n=12). Drei hatten zusätzlich vorausgegangene HSZT bzw. eine Therapie mit Rituximab und Adriamycin/Dexamethason (AD) (n=1). Ein weiterer Patient erhielt Bortezomib, Revlimid und Dexamethason und der letzte eine Kombination aus Anti-CD38, Carfilzomib, Lenalidomid und Dexamethason. Alle erhielten eine Cyclophosphamid Mobilisierung und G-CSF-Gabe vor der Stammzellapharese. Der Remissionsstatus vor Einleitung der Hdx variierte von minimaler Remission (n=2) bis hin zu Vollremission (n=3). Bei 5 Patienten konnte eine Teilremission nachgewiesen werden und 4 Patienten wiesen zu diesem Zeitpunkt noch eine minimale residuelle Tumorlast auf. Wie bei den ND waren die häufigste behandlungsbedürftige Komorbidität MM bedingte Osteolysen. Eine behandlungsbedürftige Infektion trat pre-HSZT bei einem Patienten auf. Post-HSZT traten bei 79% (11/14) der Patienten Infektionszeichen auf, dabei traten teils mehrere Infekte bei einem Patienten auf. 13 Infekte wurden antibiotisch und einer mit Ganciclovir behandelt. Bei sechs Infektionen konnte der bakterielle Erreger nachgewiesen werden, zwei Patienten litten unter viralen Infekten (Herpes genitalis, RSV-Pneumonie). Eine genaue Übersicht findet sich in Tabelle 9.

Tabelle 9: Klinische Hintergründe der Patientengruppe Pre-/Post-HSZT (siehe auch [140])

Pre-/Post-HSZT	Infektionen	Relevante Komorbiditäten	Vorausgegangene Therapien	Remissionsstatus	Tage nach HSZT
<b>P001</b>	Pre-HSZT: Pilzpneumonie  Post-HSZT: C. diff. Kolitis E. coli Sepsis	PNS - zytostatisch therapiert, ossär  metastasiertes Prostata-Ca	Dexamethason 7x Plamapherese 2x MTX,  Dexamethason intrathekal 4x VCD 3x Rituximab 3x RD Cyclomob.	PR	20
<b>P002</b>	Post-HSZT: Katheter-Sepsis mit Staph. epidermidis	Osteolysen HWK/Os Sacrum	Bestrahlung HWK 4x VCD Cyclomob.	MR	18
<b>P005</b>	Post-HSZT: Neutropenes Fieber	Multiple Osteolysen	4x VCD Cyclomob. 1. Hdx Melphalan +HSZT	VGPR	14
<b>P007</b>	Post-HSZT: Sepsis mit Staph. epidermidis	Osteolyse Femur, CAST Nephropathie	4x Bortezomib/Revlimid / Dexamethason Cyclomob.	CR	17
<b>P016</b>	Post-HSZT: Durchfälle in Neutropenie	Osteolyse HWK, CAST Nephropathie	3x VCD Cyclomob.	VGPR	20
<b>P017</b>	Post-HSZT: Herpes genitalis		4x AD Cyclomob. 1. Hdx Melphalan +HSZT 1x VCD 2. Hdx Melphalan +HSZT 2x VCD	CR	17

			Cyclomob.		
<b>P018</b>		Sarkoidose	6x IKRD (Anti-CD38, Carfilzomib, Lenalidomid, Dexamethason) Cyclomob.	CR	21
<b>P019</b>	Post-HSZT: RSV- Pneumonie	Multiple Osteolysen mit pathologischer LWK2 Fraktur	Bestrahlung LWK 4x VCD Cyclomob.	PR	22
<b>P020</b>			4x VCD Cyclomob.	MR	21
<b>P021</b>	Post-HSZT: Abszess nach Venenverweil- katheter	Multiple Osteolysen, DM Typ2	Radiatio Hüfte 6x VCD Cyclomob.	PR	17
<b>P022</b>			4x VCD Cyclomob. 1. Hdx Melphalan +HSZT	PR	14
<b>P023</b>	Post-HSZT: Fieber in Neutropenie	DM, Nikotinabusus	3x VCD Cyclomob.	PR	19
<b>P024</b>	Post-HSZT: Fieber in Neutropenie C. diff. Kolitis	Osteolyse LWK3 mit pathologischer Fraktur	3x VCD Cyclomob.	VGPR	29
<b>P025</b>	Post-HSZT: Influenza- Pneumonie Sepsis	Hyperkalziämie, Osteolysen mit pathologischer LWK1 Fraktur	4x VCD Cyclomob.	VGPR	31

Abkürzungen: Paraneoplastisches Syndrom: PNS; Staphylokokkus: Staph.; Clostridium difficile: C. diff; Escherichia coli: E. coli; Karzinom: Ca; RD: Lenalidomid, Dexamethason; PR: Teilremission (engl. partial remission); MR: Minimale Remission (engl. minimal response); VGPR: Minimale residuelle Tumorzeichen (engl. very good partial remission); CR: Vollremission (engl. complete remission)

### 3.2 B-Zell Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

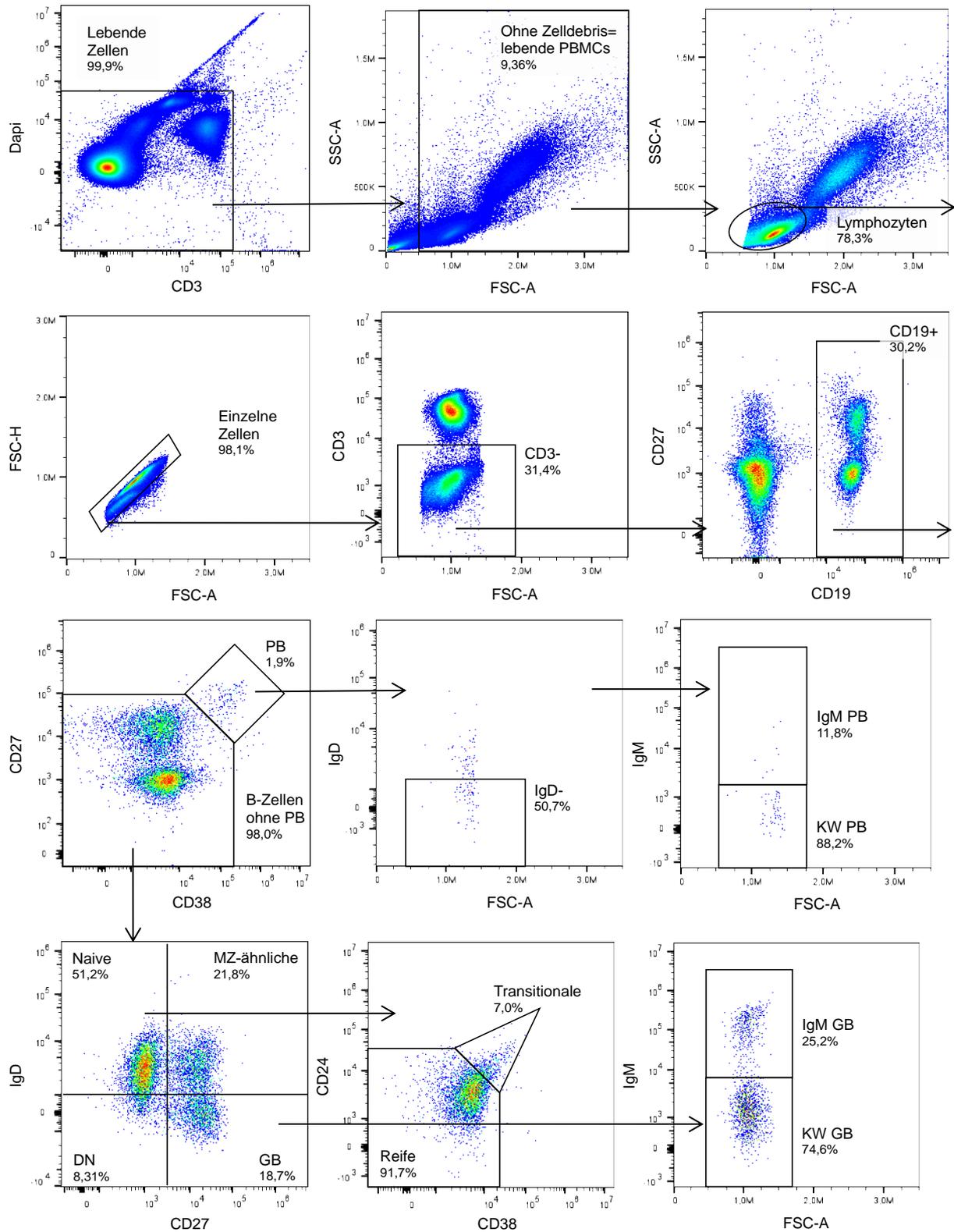
Um die B-Zell-Subpopulationen bei Patienten mit SID im Vergleich zu Gesunden zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der PBMCs durchgeführt. Eine Gating-Strategie wurde auf der Grundlage des EUROclass Panels für Patienten mit CVID erstellt. CVID ist ein primärer Immundefekt der B-Zellen und das EUROclass Panel gibt einen Überblick über relevante B-Zell-Phänotypen [141, 142]. Das *Cluster of Differentiation* (CD, in deutsch „Unterscheidungsgruppen“) erlaubt eine Einteilung der verschiedenen Zellpopulationen anhand von immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen. Dieses wurde hier genutzt um die peripheren B-Zell-Populationen zu charakterisieren (Tabelle 10). Abbildung 4 zeigt ein repräsentatives Beispiel der Gating-Strategie anhand von PBMCs eines gesunden Spenders.

Es erfolgte zunächst eine Diskriminierung von lebenden und toten Zellen über Dapi. In der Gegenüberstellung von Größe (FSC-A aus engl. *forward scatter-area*) und Granularität (SSC-A aus engl. *side scatter-area*) wurde anschließend Zelldebris ausgeschlossen und die Lymphozytenpopulation eingegrenzt. Zusätzlich wurden aneinanderklebende doppelte Zellen und CD3+ Lymphozyten (größtenteils T-Zellen) herausgefiltert. Die B-Zell-Population wurde als CD19+ definiert. Innerhalb dieser wurden PB als CD38<sup>++</sup>CD27<sup>++</sup> ausgemacht. Zur genaueren Einteilung wurden die IgD- PB nach ihrer IgM Expression in IgM+ und IgM- = klassengewechselte PB eingeteilt. Die restlichen B-Zellen wurden weiter in Naive (CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>), MZ-ähnliche (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>), DN (CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) und GB (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) unterteilt. Von den gesamt-naiven B-Zellen wurden die Transitionalen (CD38<sup>++</sup> CD24<sup>++</sup>) abgegrenzt. Die IgD- GB wurden ebenfalls weiter unterteilt in IgM exprimierende und IgM negative bzw. klassengewechselte GB.

Das gleiche Panel wurde genutzt, um nach siebentägiger Stimulation die Veränderungen des B-Zell-Kompartiments zu untersuchen.

Tabelle 10: Zuordnung der B-Zell-Subpopulationen zum *Cluster of Differentiation* innerhalb der CD3-Lymphozyten Population

<b>B-Zell-Subpopulation</b>	<b>Oberflächenproteine</b>
<b>B-Zellen</b>	CD19 <sup>+</sup>
<b>PB</b>	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup> CD27 <sup>++</sup> IgD <sup>-</sup>
<b>IgM PB</b>	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup> CD27 <sup>++</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup>
<b>KW PB</b>	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup> CD27 <sup>++</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>-</sup>
<b>Naive</b>	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>
<b>Transitionale</b>	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup> CD24 <sup>++</sup>
<b>MZ-ähnliche</b>	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>
<b>GB</b>	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>
<b>IgM GB</b>	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>+</sup>
<b>KW GB</b>	CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>-</sup>



**Abbildung 4: Gating-Strategie für die B-Zell-Phänotypisierung**

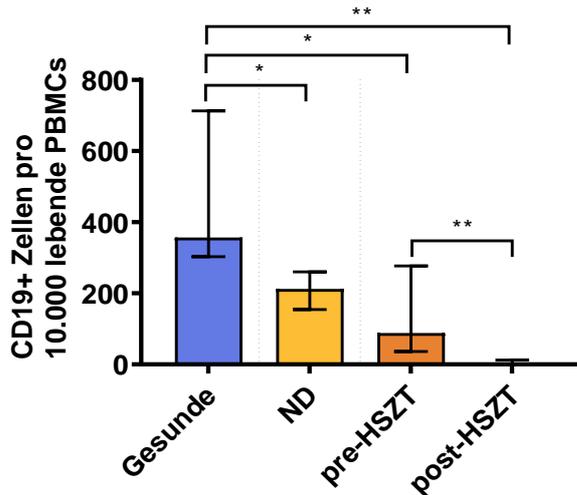
Dargestellt ist die durchflusszytometrische Erkennung von typischen B-Zell-Phänotypen basierend auf dem EUROclass Panel für COVID [142]. Hier wird beispielhaft das Gating bei einem gesunden Spender gezeigt (entsprechend [140]).

### **3.3 Quantitative Charakterisierung des B-Zell-Kompartiments bei MM Patienten *ex vivo***

#### **3.3.1 Veränderungen der absoluten Zahlen an B-Zellen und deren Subpopulationen**

Bei unbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom sowie nach Standardchemotherapie und nach Hdx ist eine Reduzierung der Gesamt-B-Zellen beschrieben [78]. Quantitative Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen wurden bisher nicht untersucht. In der Absicht diese genauer zu charakterisieren, wurde mittels durchflusszytometrischer Phänotypisierung eine quantitative Analyse der B-Zellen und ihrer Subpopulationen im peripheren Blut *ex vivo* durchgeführt. Dazu dienten PBMCs unterschiedlicher Therapieabschnitte, die mit Daten von gesunden Spendern verglichen wurden, um die Einflüsse der Erkrankung und der Therapien darzustellen. Untersucht wurden die Gesamtzahl der CD19+ B-Zellen, gesamt-naiven B-Zellen, Plasmablasten, Gedächtnis-B-Zellen, transitionalen B-Zellen und MZ-ähnlichen B-Zellen. Gesunde Spender, wie auch Patienten zeigten dabei eine starke interindividuelle Varianz.

Wie zuvor von Schütt et al. beschrieben, zeigte sich auch in dieser Arbeit eine signifikante Reduktion der Gesamtzahlen der CD19+ B-Zellen bei Patienten mit ND MM [78] (Abbildung 5). Diese war verstärkt nach Therapie und am stärksten ausgeprägt nach Hdx und auto-HSZT. Während der Median bei gesunden Probanden bei 357 [303-713] CD19+ Zellen/10.000 Zellen (Median [IQA]) lag, war dieser bei Erstdiagnose eines MMs im Median um 41% reduziert und lag bei 212 [155-260] CD19+ Zellen/10.000 (p=0,003). Durch die Chemotherapie pre-HSZT waren diese Zellen um 75% reduziert auf 88,5 [36-277] CD19+ Zellen/10.000 Zellen (p=0,007). In der frühen Rekonstitutionsphase nach Stammzelltransplantation waren die B-Zellen im Vergleich zu Gesunden im Median um 99% zurückgegangen (Median 4,1 [1,6-12,3] CD19+ Zellen/10.000 Zellen; p<0,001).

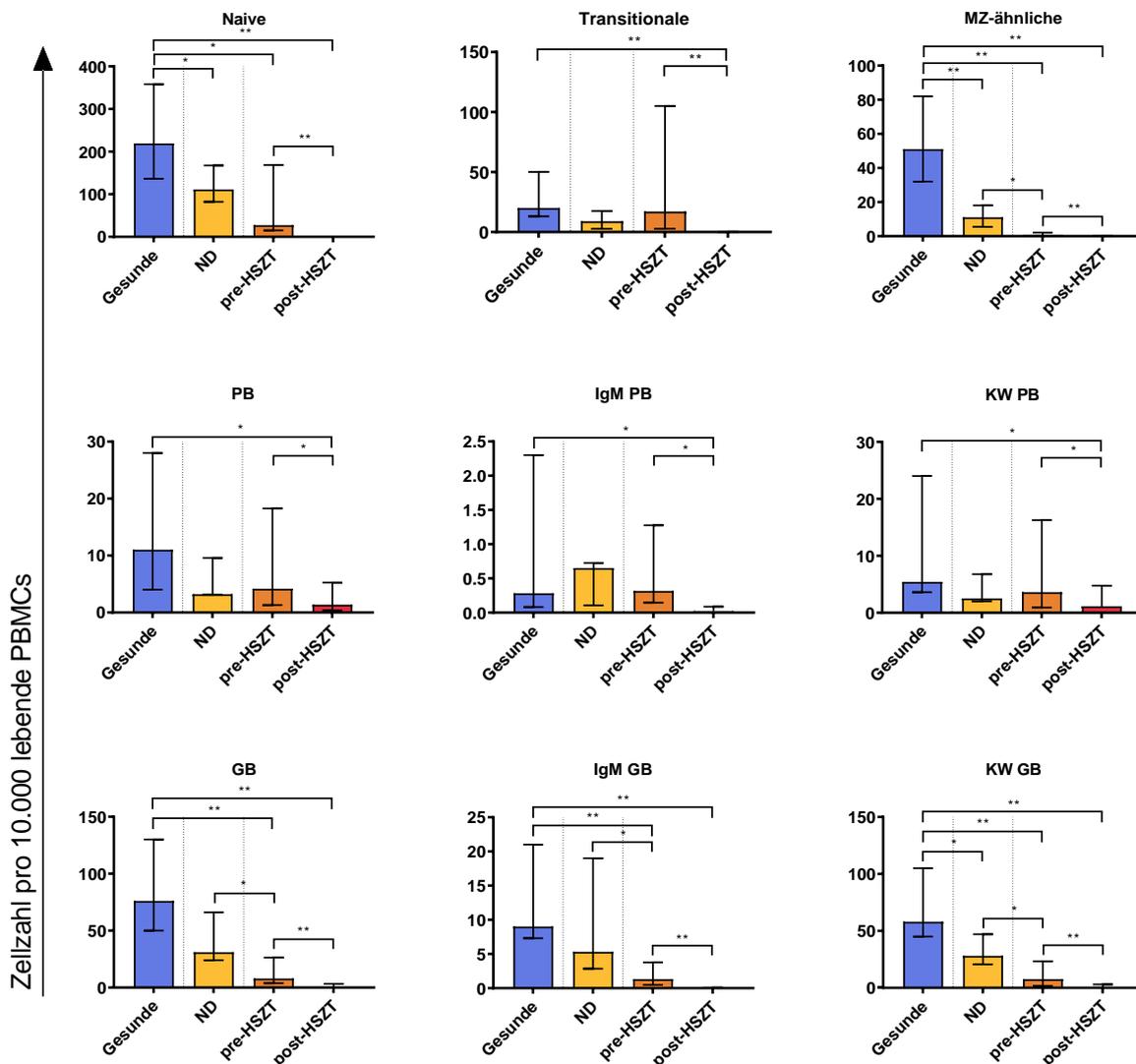


**Abbildung 5: Rückgang der CD19+ Zellen bei MM Patienten und im Laufe der Therapie**

Darstellung der Mediane mit den IQAs der CD19+ B-Zellzahlen in 10.000 gemessenen lebenden PBMCs von Gesunden und den Patientengruppen (ND, pre/post-HSZT). Es zeigte sich eine zunehmende Reduktion der CD19+ B-Zellzahlen im Verlauf der Erkrankung und durch die Behandlung. Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-U und Wilcoxon Tests zwischen Gesunden und den Patienten Gruppen sowie zwischen der vorausgegangenen Therapiestufe (also ND-pre-HSZT und pre-HSZT-post-HSZT) errechnet. Signifikanzen wurden mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  angegeben. Vergleiche [140].

Kongruent mit der Abnahme der Gesamt-B-Zellen war die Reduktion der gesamt-naiven B-Zellen sowie MZ-ähnlichen B-Zellen durch die Erkrankung und die Therapie. Bei Erstdiagnose zeigte sich ein signifikanter Rückgang um 49% bei Naiven und 78% bei MZ-ähnlichen im Vergleich zu Gesunden (naive:  $p = 0,038$ , MZ-ähnliche:  $p < 0,001$ ) (Abbildung 6). Ein größeres Defizit entwickelte sich nach Chemotherapien (naive:  $p = 0,011$ ; MZ-ähnliche:  $p < 0,001$ ). Post-HSZT waren diese Zelltypen fast vollständig depletiert. Die gesamt-Naiven betrug noch 0,16% und die MZ-ähnlichen noch 0,01% der Gesunden und noch 1,3% bzw. 0,8% der Zellzahlen pre-HSZT. Die MZ-ähnlichen Zellen stellten die einzige Subpopulation dar, die mit jedem Abschnitt signifikant abnahm. Bei den transitionalen B-Zellen ( $p < 0,001$ ) und PB ( $p = 0,003$ ) war nur nach auto-HSZT ein signifikanter Verlust gegenüber Gesunden zu verzeichnen. Das gleiche Bild zeigte sich bei den PB. Allerdings zeichnete sich bei den gesamt PB und KW PB auch bei Erstdiagnose und vor Hdx eine Reduktion gegenüber gesunden Werten ab, wobei diese aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant war. GB waren ebenfalls durch die MM Erkrankung leicht reduziert, insbesondere KW GB sanken signifikant ( $p = 0,049$ ). Einen schädigenden Effekt auf

die GB schienen allerdings vor allem die Chemotherapien zu haben. Der Einsatz von Chemotherapeutika führte in der Gesamtzahl der GB zu einer Reduktion um 90% gegenüber Gesunden ( $p < 0,001$ ) und um 74% gegenüber ND Patienten ( $p = 0,010$ ). Hdx reduzierte die GB sogar um 99% ( $p < 0,001$ ) gegenüber Gesunden und 94% gegenüber pre-HSZT ( $p < 0,001$ ). KW GB und IgM GB verhielten sich entsprechend. Insgesamt war die stärkste Beeinträchtigung durch die Hdx und HSZT zu beobachten. In dieser Gruppe war jede Subpopulation gegenüber Gesunden und gegenüber pre-HSZT signifikant reduziert (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Quantitative Veränderungen der Gesamtzahlen der B-Zell-Subpopulationen**

Darstellung der Mediane der absoluten Zellzahlen von neun B-Zell-Subpopulationen normiert auf 10.000 lebende PBMCs bei Gesunden und Patientengruppen. Die Varianz ist mit dem IQA angegeben. Die Zellreduktionen zwischen den Gesunden und Patientengruppen sowie zwischen ND und pre-HSZT bzw. pre- und post-HSZT wurden mittels Mann-Whitney-U und Wilcoxon Tests auf Signifikanz geprüft: \* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,001$ . Vergleiche [140].

### 3.3.2 Veränderungen in der Verteilung der B-Zell-Subpopulationen

Veränderungen in der Verteilung der Subpopulation innerhalb der CD19+ B-Zellen machten weitere Einflüsse der Erkrankung und der Therapie des MMs deutlich. Zur Veranschaulichung der Verschiebungen zu denen es innerhalb des B-Zell-Kompartiments kam, wurde die Verteilung der Subpopulationen in (Abbildung 7 ) dargestellt. Entsprechend der Verteilung von B-Zell-Subpopulationen, wie sie in der Literatur beschrieben ist [16, 18], lag bei Gesunden die mediane Häufigkeit der B-Zellen pro Lymphozyten bei ca. 5 [3,8-9,1] %. Von diesen waren etwa 56 [41,4-68,5] % gesamt-Naive und 6 [3,5-7,5] % Transitionale, MZ-ähnliche machten fast 15 [7,3-21,4] % aus, gesamt PB lagen bei ca. 2 [1,0-7,9] % und gesamt GB bei 21 [11,4-24,9] %.

Der Anteil der gesamt-naiven B-Zellen, sowie PB veränderte sich durch die Erkrankung und die Induktionschemotherapie kaum. Durch die Hdx sank die mediane Häufigkeit der gesamt-naiven B-Zellen jedoch von 56% bei Gesunden auf 11 [3,4-20,1] % ( $p < 0,001$ ). Im Gegenzug machten die PB statt 2% bei Gesunden 37 [27,7-41,6] % post-HSZT aus ( $p < 0,001$ ). Dieser Anstieg ließ sich größtenteils auf die KW PB zurückführen. Transitionale B-Zellen nahmen bei Patienten pre-HSZT, also nach Induktionstherapie und Cyclomob. einen vergleichsweise großen Anteil der B-Zellen von 28 [7,5-62,6] % ein (Gesunde – pre-HSZT:  $p = 0,013$ ). Der Anteil der GB war vorwiegend bei pre-HSZT Patienten reduziert (Gesunde – pre-HSZT:  $p = 0,037$ ). Zurückzuführen war dies vor allem auf die Reduktion der KW GB (Gesunde – pre-HSZT:  $p = 0,032$ ). IgM GB zeigten bei post-HSZT Patienten die stärkste Anteilsreduktion im Vergleich zu Gesunden (Gesunde – post-HSZT:  $p = 0,083$ ). Die MZ-ähnlichen B-Zellen gingen durch die MM Erkrankung in ihrem Anteil auf ca. 5 [2,4-9,7] % zurück (Gesunde – ND:  $p = 0,028$ ). Chemotherapien führten zu einem weiteren Rückgang auf 1 [0,4-1,9] % der CD19+ Zellen, was in etwa auch dem Anteil nach HSZT entsprach (Gesunde – pre-HSZT/post-HSZT:  $p < 0,001$ )(Abbildung 7).

Um den Effekt der Erkrankung und Therapien differenzierter zu betrachten, wurden jeweils zwei Kompartimente miteinander verglichen.

1) Gesunde – ND: Der Vergleich der B-Zell-Subpopulationsverteilung zwischen Gesunden und Patienten nach der Erstdiagnose MM, vor Erhalt einer Therapie gibt Aufschluss darüber, wie die B-Zell-Populationen durch das MM beeinflusst werden 2)

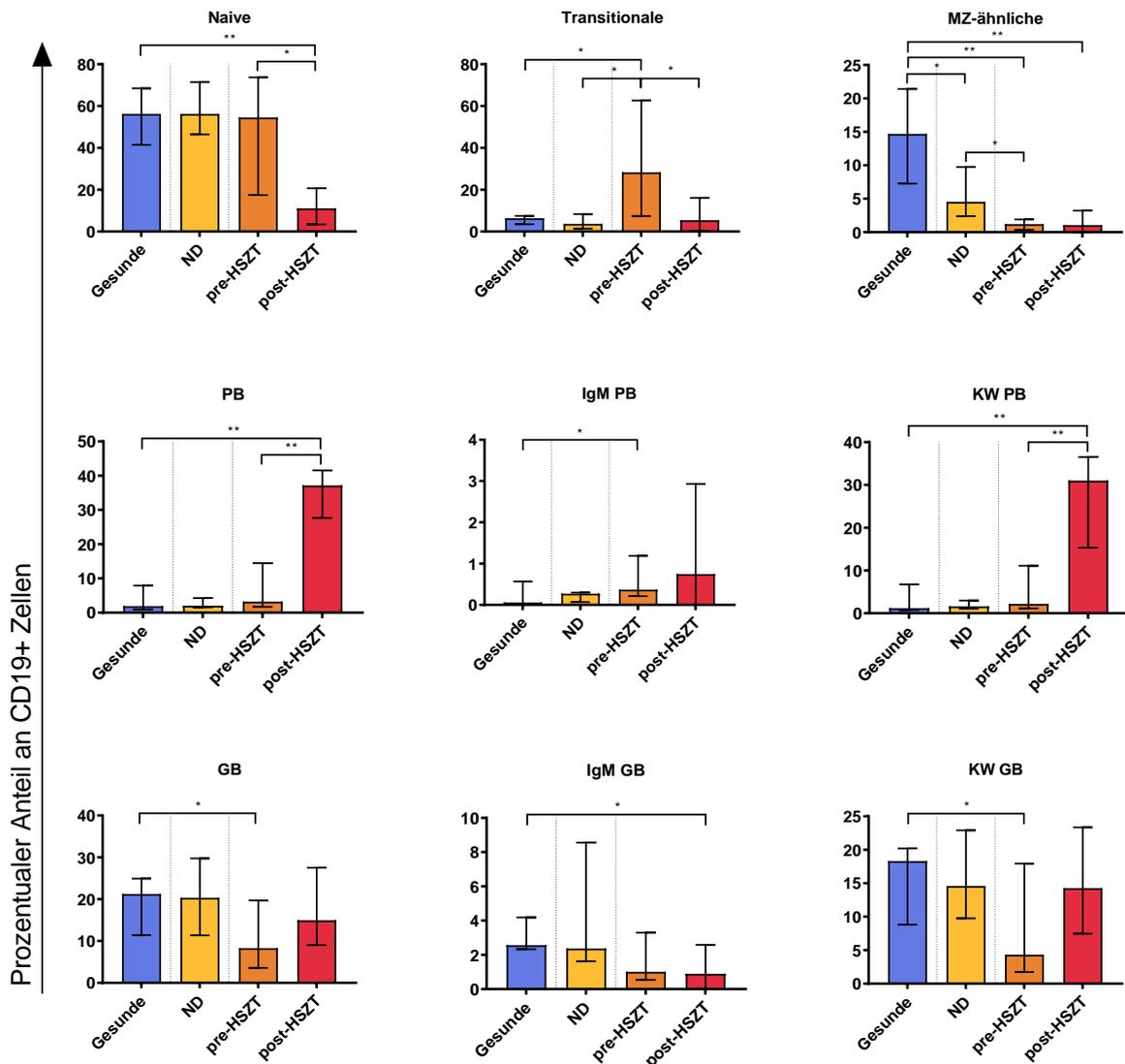
ND – pre-HSZT: Um den Effekt der Standardtherapien zu beurteilen, wurden Patienten nach Erhalt der Induktionstherapie, pre-HSZT mit unbehandelten ND Patienten verglichen 3) pre-HSZT – post-HSZT: Für den Einfluss der Hdx sowie auto-HSZT wurden die Unterschiede von pre-HSZT mit post-HSZT analysiert.

Zu 1): Im direkten Vergleich unterschied sich der Phänotyp zwischen MM Patienten und Gesunden im Anteil der IgM PB. Dieser lag im Median um das 4,5-fache höher als bei Gesunden. Aufgrund ihres generell kleinen Anteils von 0,06 [0,02-0,57] % der B-Zellen bei Gesunden, wirkte sich dieser Anstieg allerdings kaum auf die Gesamtverteilung der Subpopulationen aus. Der Anteil der gesamten PB war im Median 0,5% größer als bei Gesunden, was sich insbesondere auf den Anstieg von KW PB um 0,45% zurückführen ließ. Während eine leichte Reduktion der KW GB (im Median von 18,3 [8,8-20,2] % auf 14,6 [9,8-22,9] %) auffiel, war der deutlichste Unterschied im Anteil der MZ-ähnlichen mit einem Rückgang um zwei Drittel (Median 14,7 [7,3-21,4] % auf 4,5 [2,4-9,7] %,  $p=0,028$ ) zu beobachten. Der Anteil der gesamt-naiven B-Zellen blieb durch die Erkrankung unbeeinflusst, wobei der mediane Anteil der transitionalen B-Zellen um 2,5% (6,3 [3,5-7,5] % bei Gesunden zu 3,7 [1,4-8,3] % bei MM) zurückging.

Zu 2): Der Effekt der Standardchemotherapien auf die Verteilung der B-Zell-Populationen bezog sich vor allem auf eine Reduktion der GB, um mehr als die Hälfte und der MZ-ähnlichen Zellen auf 1,2 [0,4-1,9] %, was einem Viertel des Anteils bei ND entsprach ( $p=0,005$ ). Ein gleichzeitiger Anstieg der anteiligen PB, IgM und KW, glich dieses Defizit aus. Auffällig war außerdem ein 7,6-facher Anstieg des Anteils der transitionalen B-Zellen von 3,71 [1,4-8,3] % auf 28,3 [7,5-62,6] % ( $p=0,044$ ).

Zu 3): Während die Gesamtzahl aller B-Zell-Populationen zwischen pre-HSZT und post-HSZT durch die myeloablative Hdx abnahm (Abbildung 6) zeigte sich im Verhältnis zur CD19+ Zellzahl, dass die Subpopulationen unterschiedlich stark betroffen waren. Somit lag in der frühen Rekonstitution post-HSZT ein anderes B-Zell-Kompartiment vor als vor Transplantation. Eine Zunahme zeigte sich zum einen bei den PB ( $p<0,001$ ), insbesondere KW PB mit einem Anstieg um das 14-fache (von 2,2 [1,1-11,1] % der CD19+ auf 31,0 [15,4-36,5] %,  $p<0,001$ ). Zum anderen nahm der Anteil der GB, insbesondere der KW GB von 8,3 [3,6-19,7] % auf 15 [9,0-27,5] % bzw. 4,3 [1,7-18,0] % auf 14,3 [7,5-23,3] % zu. Stark reduziert gegenüber pre-HSZT

waren die gesamt-naiven- ( $p=0,001$ ) und transitionalen B-Zellen ( $p=0,035$ ). Die Transitionalen hielten damit ein weiterhin leicht erhöhtes Niveau gegenüber Gesunden (Abbildung 7). Im direkten Vergleich nahm der Anteil der MZ-ähnlichen Zellen um 0,15%, etwa ein Zehntel gegenüber pre-HSZT ab.



**Abbildung 7: Phänotypische Zusammensetzung der B-Zell-Kompartimente bei Gesunden und Patienten**

Verglichen wird die Zusammensetzung der B-Zell Kompartimente von Gesunden, ND, pre-HSZT und post-HSZT Patienten. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der Naiven, GB, MZ-ähnlichen, Transitionalen und PB innerhalb der CD19+ Population bestimmt. Mediane  $\pm$  IQA sind markiert. Verglichen wurden die Populationen zwischen Gesunden und Patienten mittels Mann-Whitney-U Test und zwischen pre- und post-HSZT mittels Wilcoxon Test. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die gesamt-B-Zellen und die untersuchten Subpopulationen im Verlauf der Erkrankung und Therapien immer weiter abnahmen und post-HSZT am stärksten beeinträchtigt waren. Besonders betroffen waren MZ-ähnliche B-Zellen und von den Chemotherapien am meisten beeinflusst die GB (Abbildung 5, Abbildung 6). Neben dem quantitativen Verlust wurde jedoch auch deutlich, dass die Subpopulationen unterschiedlich stark beeinträchtigt waren und es zu Umverteilungen innerhalb des B-Zell-Kompartiments kam (Abbildung 7). Wichtige Erkenntnisse waren, dass PB im Verlauf prozentual zunahm und MZ-ähnliche Zellen kontinuierlich abnahmen.

Durch die MM Erkrankung kam es vor allem zu einer Reduktion des Anteils der MZ-ähnlichen und Transitionalen, während IgM PB überproportional zunahm.

Durch Chemotherapie kam es insbesondere zu einer Abnahme des GB Anteils und einem Anstieg der Transitionalen.

Die Hdx und auto-HSZT bewirkten den stärksten Anstieg des PB Anteils bei gleichzeitiger Reduktion des Anteils an gesamt-Naiven.

### **3.4 Funktionale Charakterisierung der B-Zell-Kompartimente von MM Patienten**

In verschiedenen *in vitro* B-Zell Stimulationsversuchen bei MM Patienten konnte eine eingeschränkte Immunreaktion nachgewiesen werden [143-145]. Die Ursache ist bislang nicht vollständig geklärt. Da bisher noch keine Stimulation ausfindig gemacht wurde, die die B-Zellfunktion wieder herstellt, wurde unter anderem ein intrinsischer B-Zelldefekt diskutiert [144, 146]. Um diese Defizienzen genauer zu definieren, wurden in dieser Arbeit Stimulationsansätze getestet, die auch bei CVID eine effektive B-Zellaktivierung bewirken konnten.

Folglich wurden die PBMCs sieben Tage zum einen mit einem von Crotty et al. vorgestellten Assay aus SAC, PWM und CpG (S/P/C) [17] und zum anderen mit einem Ansatz aus CD40L, IL-21 und CpG (C/I/C) stimuliert [123].

Zur Beurteilung der Funktion wurden drei Parameter herangezogen:

- 1) die Proliferation der CD19+ B-Zellen, gemessen in der Durchflusszytometrie.
- 2) die Proliferation bzw. Differenzierung der CD19+ B-Zell-Subpopulationen und die daraus resultierende Umverteilung der Subpopulationen, durchflusszytometrisch gemessen.

3) die Anzahl an ISCs nach Stimulation, gemessen im ELISpot.

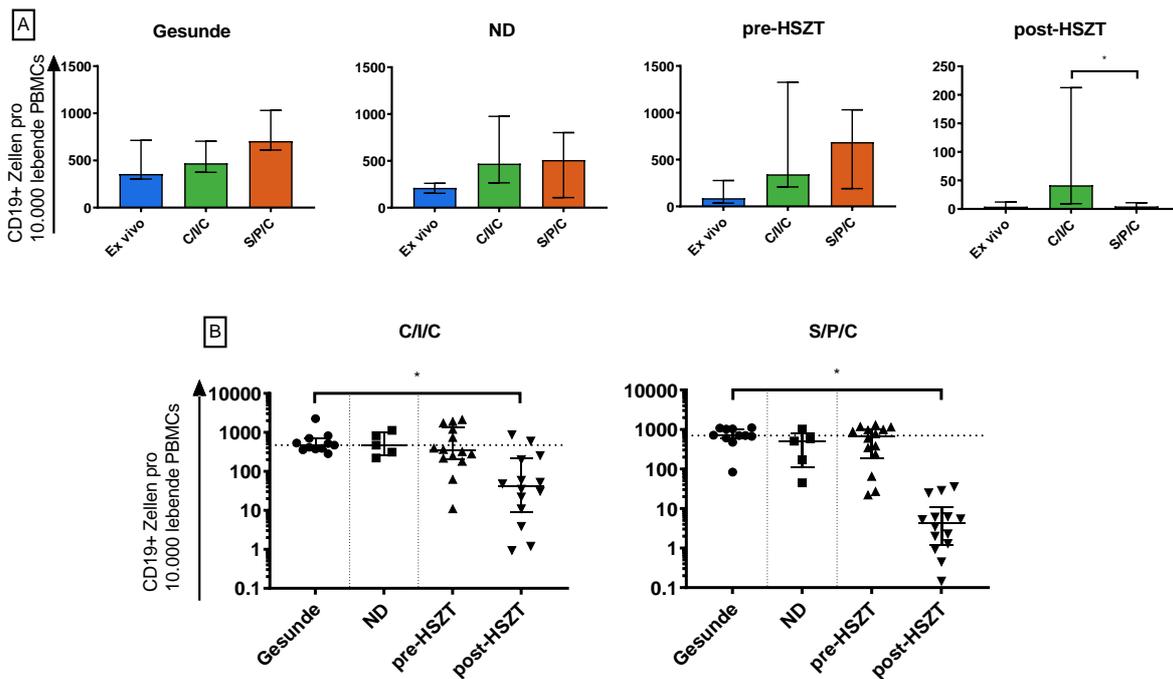
### 3.4.1 Funktionsmessung mittels Durchflusszytometrie

Zur Beurteilung der B-Zellfunktion in der Durchflusszytometrie wurde eine B-Zell-Phänotypisierung *ex vivo* sowie nach siebentägiger *in vitro* Stimulation durchgeführt und im Anschluss die Veränderungen berechnet.

#### 3.4.1.1 Proliferation der CD19+ B-Zellen

Zur Beurteilung der proliferativen Immunantwort wurde die Zunahme der CD19+ B-Zellen herangezogen. Der Median der berechneten Induktionen ist in Tabelle 11 zu sehen. Die Veränderungen der absoluten Zellzahlen in Abbildung 8 A. Bei Gesunden wurde durch beide Stimulationen eine Zunahme der B-Zellen induziert, wobei diese durch S/P/C größer ausfiel (Induktion C/I/C x1,2; S/P/C x1,5) und im Median zu höheren CD19+ Zahlen führte (C/I/C: 471 [374-704] vs. S/P/C: 706 [610-1030]). Bei Neudiagnosen und pre-HSZT war die Zunahme der CD19+ Zahlen bei C/I/C etwas stärker als bei S/P/C, während die Mediane der Zellzahlen bei S/P/C höher lagen. Bei allen drei Gruppen (Gesunde, ND, pre-HSZT) ergab sich kein signifikanter Unterschied im Ansprechen auf die Stimulationen. Post-HSZT blieb die proliferative Antwort auf S/P/C aus (Induktion=0,9). Durch die C/I/C Stimulation hingegen kam es post-HSZT zu der stärksten Proliferation (Induktion=9,6). Entsprechend unterschieden sich auch die Mediane der CD19+ Zahlen nach Stimulation signifikant (C/I/C: 41,5 [9,2-212,5] vs. S/P/C: 4,4 [1,2-10,9];  $p < 0,001$ ).

Im Vergleich der absoluten Zellzahlen nach Stimulation zwischen den Patientengruppen und Gesunden zeigte sich, dass die initial verminderten CD19+ Zahlen bei ND und pre-HSZT Patienten nach beiden Stimulationsansätzen im Median annähernd wieder dem gesunden Niveau entsprachen (Abbildung 8 B). Post-HSZT lag eine große Varianz der Reaktion zwischen den Patienten vor (Spannweite: C/I/C=0,9-874; S/P/C=0,1-36). Obwohl durch die C/I/C Stimulation die stärkste Induktion für CD19+ Zellen vorlag, zeigten nur zwei Patienten zu Gesunden vergleichbare CD19+ Zellen nach Stimulation. Die mediane Gesamtzahl der B-Zellen war nach beiden Stimulationsansätzen signifikant gegenüber Gesunden vermindert (C/I/C:  $p < 0,001$ ; S/P/C:  $p < 0,001$ ). Allerdings lag der Median nach C/I/C fast 10-mal höher als nach S/P/C Stimulation (Abbildung 8 A post-HSZT) ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 8: Proliferative Immunantwort der CD19+ Zellen auf C/I/C und S/P/C Stimulation**

Diese Abbildung zeigt das unterschiedliche Ansprechen der CD19+ Zellen pro 10.000 lebende PBMCs auf die beiden Stimulationen bei Gesunden, ND, pre-HSZT und post-HSZT. **A** stellt den Vergleich zwischen absoluten Zahlen *ex vivo* zu post C/I/C und S/P/C Stimulation dar. Vergleich zwischen C/I/C und S/P/C mittels Wilcoxon Test. **B** ist Log 10 skaliert und zeigt den Vergleich der Zellzahlen nach Stimulationen zwischen Gesunden und den Patientengruppen berechnet mittels Mann-Whitney-U Test. Jedes Symbol stellt dabei einen Patienten dar. Alle signifikanten Unterschiede sind mittels \* $p < 0,05$  angegeben. Abbildung Teil B vergleiche [140].

Zusammenfassend ließ sich folgern, dass beide *in vitro* Stimulationsansätze dazu in der Lage waren, eine erfolgreiche Proliferation bei ND und pre-HSZT zu induzieren, die zu einem Ausgleich der quantitativen Defizite führte. Post-HSZT konnte trotz stärkster Proliferation unter C/I/C das quantitative Defizit nicht ausgeglichen werden. Allerdings lag in Bezug auf die proliferative Immunantwort ein signifikant besseres Ansprechen auf die C/I/C als auf die S/P/C Stimulation vor.

### 3.4.1.2 Die Umverteilung der B-Zell-Subpopulationen

Als weiterer Parameter für die effektive Immunantwort wurde die durch die Aktivierung induzierte Differenzierung der B-Zellen herangezogen. Diese wurde zum einen anhand der Umverteilung der Subpopulationen innerhalb des CD19+ Kompartiments gemessen. GB, Transitionale, Naive und MZ-ähnliche B-Zellen

differenzieren in einer akuten Immunantwort in PB bzw. ISCs und ein Teil geht in Apoptose [13, 147, 148]. Somit kommt es bei einer erfolgreichen Immunreaktion zu einer Zunahme des PB Anteils bei gleichzeitiger Abnahme der GB, Naiven, Transitionalen und MZ-ähnlichen. Ein Anstieg primär der IgM PB zeigt sich bei einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung bzw. Erstaktivierung naiver B-Zellen. Ein Anstieg der KW PB lässt sich auf eine Reaktivierung von GB-Zellen sowie eine Keimzentrumsreaktion bei einer T-Zell-abhängigen Aktivierung zurückführen [37]. Abbildung 10 zeigt die absoluten Veränderungen der Subpopulationen innerhalb 10.000 CD19+ Zellen als Immunantwort auf die C/I/C und S/P/C Stimulationen. Die Mediane der Induktionen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11 Mediane Induktionen der Zellpopulationen durch die C/I/C und S/P/C Stimulation**

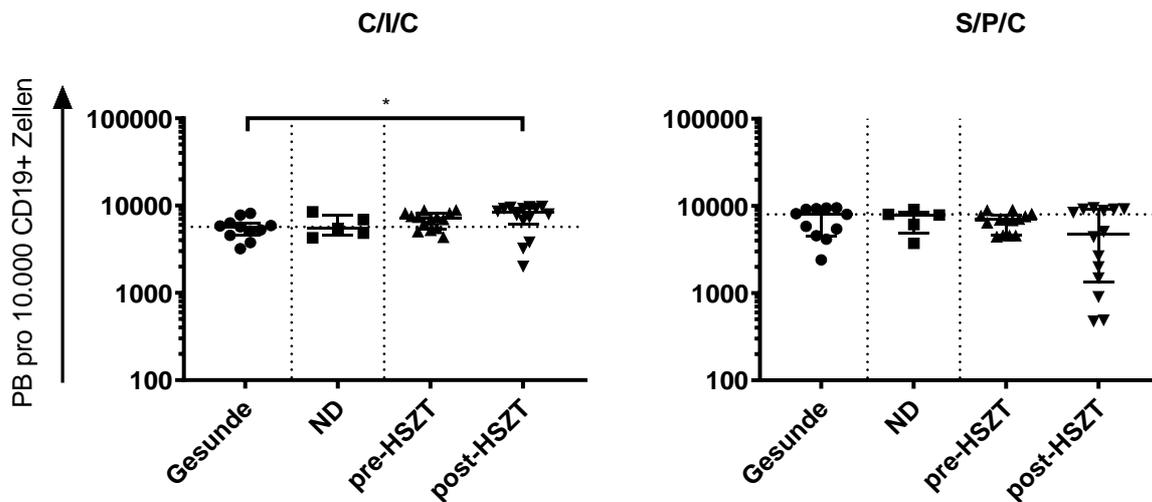
Aufgelistet sind die Mediane der Induktionen der CD19+ B-Zellen pro lebende PBMCs bzw. B-Zell-Subpopulationen pro CD19+ B-Zellen. Diese sind berechnet aus der Veränderung der *ex vivo* gemessenen Werten zu den Werten nach den Stimulationen. Werte >1 geben dabei eine Expansion der Zellpopulation an (grün), Werte <1 eine Reduktion (rot).

Notiz: Zur Berechnung der Induktion konnten nur Proben verwendet werden, bei denen *ex vivo* eine Zellzahl >0 vorlag oder diese auch nach Stimulation weiter 0 Betrag, da eine Expansion von 0 nicht möglich ist. Ausgeschlossen wurden daher einzelne Proben in den folgenden Gruppen: Gesunde - IgM PB; post-HSZT - IgM PB, IgM GB, Naive, Transitionale, MZ-ähnliche. Erklärung: Betroffen waren vor allem die Proben post-HSZT, da diese durch die Zelldepletierende Hdx nur sehr wenige Zellen aufwiesen. Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurde nur eine sehr kleine Probe genutzt, in der in diesen Fällen keine der untersuchten Zellpopulationen vorkamen. Teilweise wurden diese aber nach Stimulation in der Zellkultur messbar. Vergleiche [140].

	Gesunde		ND		Pre-HSZT		Post-HSZT	
	C/I/C	S/P/C	C/I/C	S/P/C	C/I/C	S/P/C	C/I/C	S/P/C
<b>CD19+</b>	1,18	1,51	3,06	2,40	5,51	4,56	9,56	0,86
<b>PB</b>	28,47	42,93	33,87	20,47	21,57	16,50	2,10	1,77
<b>IgM PB</b>	16,11	22,89	22,89	151,85	7,59	87,08	1,25	0,87
<b>KW PB</b>	15,59	14,32	30,18	9,09	12,23	3,55	1,61	0,86
<b>GB</b>	0,24	0,03	0,12	0,05	0,27	0,08	0,07	0,35
<b>IgM GB</b>	0,53	0,04	0,14	0,13	0,24	0,23	0,05	0,07
<b>KW GB</b>	0,21	0,04	0,03	0,03	0,21	0,06	0,07	0,39
<b>Naive</b>	0,23	0,12	0,35	0,15	0,38	0,14	0,34	0,31
<b>Transitionale</b>	0,04	0,02	0,07	0,12	0,01	0,01	0,23	0,03
<b>MZ-ähnlich</b>	0,16	0,01	0,64	0,24	1,44	0,36	0,22	1,96

Die Umverteilung der B-Zell-Subpopulationen zeigte sich zum einen im Anstieg der PB. Diese stiegen bei Gesunden von im Median 190 [95-789] /10.000 CD19+ auf 5690 [4550-6320] nach C/I/C und 8020 [4560-9330] nach S/P/C an (Induktion C/I/C x28,5 und S/P/C x42,9). Bei Gesunden und ND war der PB Anteil durch die S/P/C Stimulation höher als durch C/I/C, bei pre-HSZT durch beide Stimulationen etwa gleich und post-HSZT war dieser im Median durch C/I/C signifikant höher (C/I/C: 8310 [6068-9423] und S/P/C: 4760 [1345-9213]; p=0,01) (Abbildung 10). Dies wies auf ein reduziertes Ansprechen von S/P/C post-HSZT hin. Zu beobachten war allerdings, dass insbesondere bei S/P/C eine große Varianz vorlag (Spannweite: 476-9530) und ein Teil der Patienten (n=6) auch hier eine Reaktion mit >8.000 PB/10.000 CD19+ B-Zellen erreichte (Abbildung 9).

Insgesamt zeigten sich ein zunehmender PB Anteil auf C/I/C im Verlauf der Therapie und ein abnehmendes Ansprechen auf die S/P/C Stimulation (Abbildung 9). Im Widerspruch dazu stand die PB Induktion, die bei beiden Stimulationen im Verlauf abnahm und insbesondere nach HSZT signifikant reduziert war (Tabelle 11). Die PB erreichten post-HSZT durch die C/I/C Stimulation Werte von bis zu 9.810 PB/10.000 CD19+ Zellen und machten somit fast die gesamte B-Zell-Population aus. Die geringe Induktion post-HSZT war somit auf den höheren Ausgangswert der PB *ex vivo* (Abbildung 10) zurückzuführen.



**Abbildung 9: PB Anteile nach Stimulation verglichen zwischen Gesunden und Patientengruppen**

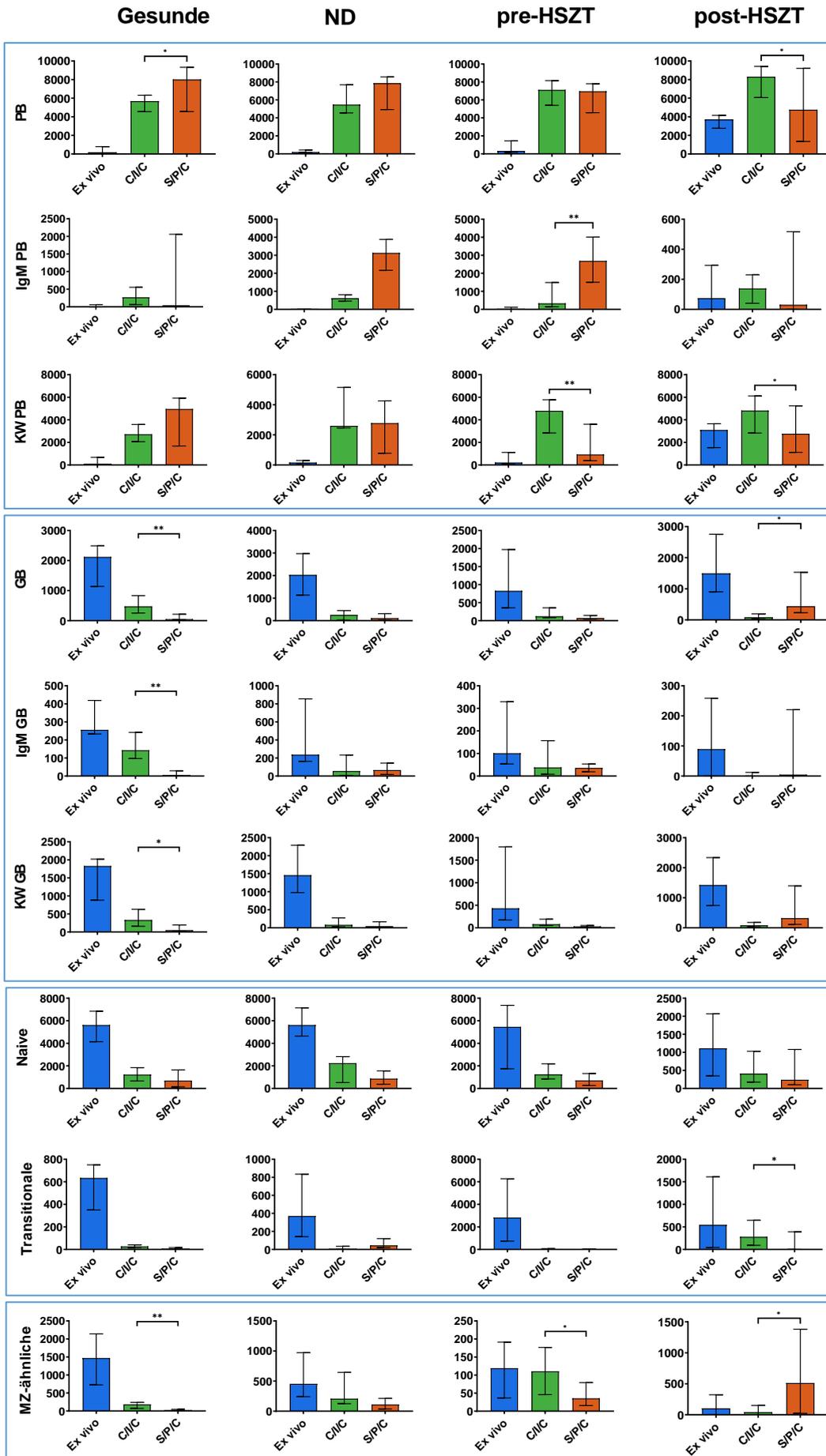
Dargestellt sind die PB Zahlen pro 10.000 CD19+ Zellen verglichen mittels Mann-Whitney-U Test zwischen den verschiedenen Gruppen jeweils nach C/I/C und S/P/C Stimulation. Die Werte sind auf einer Log 10 Skala dargestellt. Zusätzlich zu den Einzelwerten der Proben sind der Median sowie der IQA angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit  $*p < 0,05$  angegeben. Vergleiche [140].

Die IgM PB Antwort war besonders ausgeprägt nach S/P/C Stimulation bei Erstdiagnose des MMs und pre-HSZT (Median Gesunde: 45 [22-2060] vs. ND: 3130 [2170-3880] vs. pre-HSZT: 2690 [1505-4010]) und unterschied sich zudem pre-HSZT signifikant von der Reaktion auf C/I/C (ND:  $p = 0,06$  ns; pre-HSZT:  $p < 0,001$ ). Bei Gesunden und post-HSZT war die Reaktion auf C/I/C ausgeprägter, wobei Einzelfälle auch hier auf S/P/C stärker reagierten (starke Varianz durch IQA in Abbildung 10 gekennzeichnet). ND und pre-HSZT Patienten schienen demnach insbesondere mit einer IgM lastigen PB Expansion auf S/P/C zu reagieren. KW PB hingegen lagen bei Gesunden vermehrt nach S/P/C Stimulation vor (C/I/C: 2720 [2060-3590] vs. S/P/C: 4960 [1680-5920];  $p = \text{ns}$ ), bei ND Patienten war der Effekt durch beide Stimulationen in etwa gleich. Nach Induktionschemotherapie sowie Hdx, konnten signifikant höhere KW PB Anteile nach C/I/C als nach S/P/C beobachtet werden (pre-HSZT: C/I/C: 4800 [2835-5775] vs. S/P/C: 931 [378-3613];  $p < 0,001$ ; post-HSZT: C/I/C: 4820 [2828-6118] vs. S/P/C: 2770 [1120-5235];  $p = 0,050$ ). Dies spricht für eine funktionale T-Zell-abhängige Antwort bei diesen Patienten unter C/I/C Stimulation.

Im Gegenzug kam es durch die Differenzierung der GB in ISCs durch beide Stimulationen zu einer Abnahme der GB Anteile (Induktion: C/I/C x0,24; S/P/C x0,03). Diese waren bei Gesunden stärker nach S/P/C Stimulation reduziert (von 2120 [1140-2490] GB/10.000 CD19+ auf 477 [257-833] nach C/I/C bzw. 51 [36-217] nach S/P/C;  $p < 0,001$ ), post-HSZT im Gegensatz dazu stärker durch C/I/C (C/I/C: 87 [31-194] vs. S/P/C: 441 [232-1530];  $p = 0,030$ ). Bei Gesunden sprachen demnach die GB besser auf S/P/C an und post-HSZT auf C/I/C. Zudem war die Reduktion der GB durch S/P/C Stimulation post-HSZT geringer als bei Gesunden (Induktion bei Gesunden: x0,03 vs. post-HSZT: x0,35;  $p < 0,001$ ). Es zeigte sich also eine verminderte Differenzierung der GB auf S/P/C post-HSZT, was sich auch in den PB Anteilen nach Stimulation widerspiegelte. Sowohl IgM als auch KW PB zeigten kongruente Reaktionen zu den gesamt GB auf die beiden Stimulationsansätze.

Naive, Transitionale und MZ-ähnliche B-Zellen spiegelten ebenfalls ihre Differenzierung in PB bzw. ISCs durch eine anteilige Abnahme wider. Bei den gesamt-Naiven zeigte sich durchgehend eine stärkere Reduktion auf die S/P/C Stimulation. Die Transitionalen wiesen durchgängig ein starkes Ansprechen auf die Stimulationen auf (Induktion Gesund: C/I/C x0,04; S/P/C x0,02). Post-HSZT war eine stärkere Reaktion auf S/P/C zu beobachten (C/I/C x0,23; S/P/C x0,03), wodurch signifikant weniger Transitionale als nach C/I/C vorlagen (C/I/C: 281 [93-647] vs S/P/C: 7,5 [0,1-391];  $p = 0,020$ ). Die MZ-ähnlichen B-Zellen waren bei Gesunden, ND und pre-HSZT durch S/P/C stärker reduziert (Gesunde:  $p < 0,001$ ; ND:  $p = 0,12$  ns; pre-HSZT:  $p = 0,05$ ). Pre-HSZT scheint die Reaktion auf C/I/C auszufallen (Induktion x1,4). Post-HSZT hingegen ist die Reaktion der MZ-ähnlichen Zellen auf C/I/C gegeben und stattdessen fehlt ein Ansprechen auf die S/P/C Stimulation (C/I/C: 44 [1-151] vs. S/P/C: 513 [25-1382];  $p = 0,01$ ). Es kommt sogar zu einer Verdopplung des MZ-ähnlichen Anteils an den gesamt B-Zellen (S/P/C x1,96).

Zellzahl pro 10.000 CD19+ Zellen



#### **Abbildung 10: Verschiebungen der B-Zell-Subpopulationen durch die C/I/C und S/P/C Stimulationen**

Gezeigt wird das Ansprechen der jeweiligen Subpopulationen auf die C/I/C Stimulation im Vergleich zu S/P/C anhand der absoluten Zellzahlen *ex vivo* und post-Stimulation pro 10.000 CD19+ Zellen bei Gesunden und Patienten. Gezeigt sind die medianen Werte mit dem IQA. Unterschiede der Zellzahlen nach den Stimulation wurden mittels Wilcoxon Test auf Signifikanz untersucht (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend zeigte die Expansion der PB-Populationen und eine Abnahme der GB, Naiven, Transitionalen und MZ-ähnlichen B-Zellen eine erfolgreiche Immunantwort auf den S/P/C und C/I/C Stimulus bei Gesunden. Im Gesamtbild führten beide Stimulationen auch bei ND zu einer vergleichbar effektiven Umverteilung der Subpopulationen. Bei S/P/C war diese durch einen IgM lastigen PB Anstieg gekennzeichnet. Pre-HSZT verstärkte sich das Bild der IgM lastigen Antwort auf S/P/C mit zusätzlicher Reduktion der KW PB Antwort. Sowohl bei ND als auch pre-HSZT bewirkte die C/I/C Stimulation einen vermehrten Anstieg der KW PB.

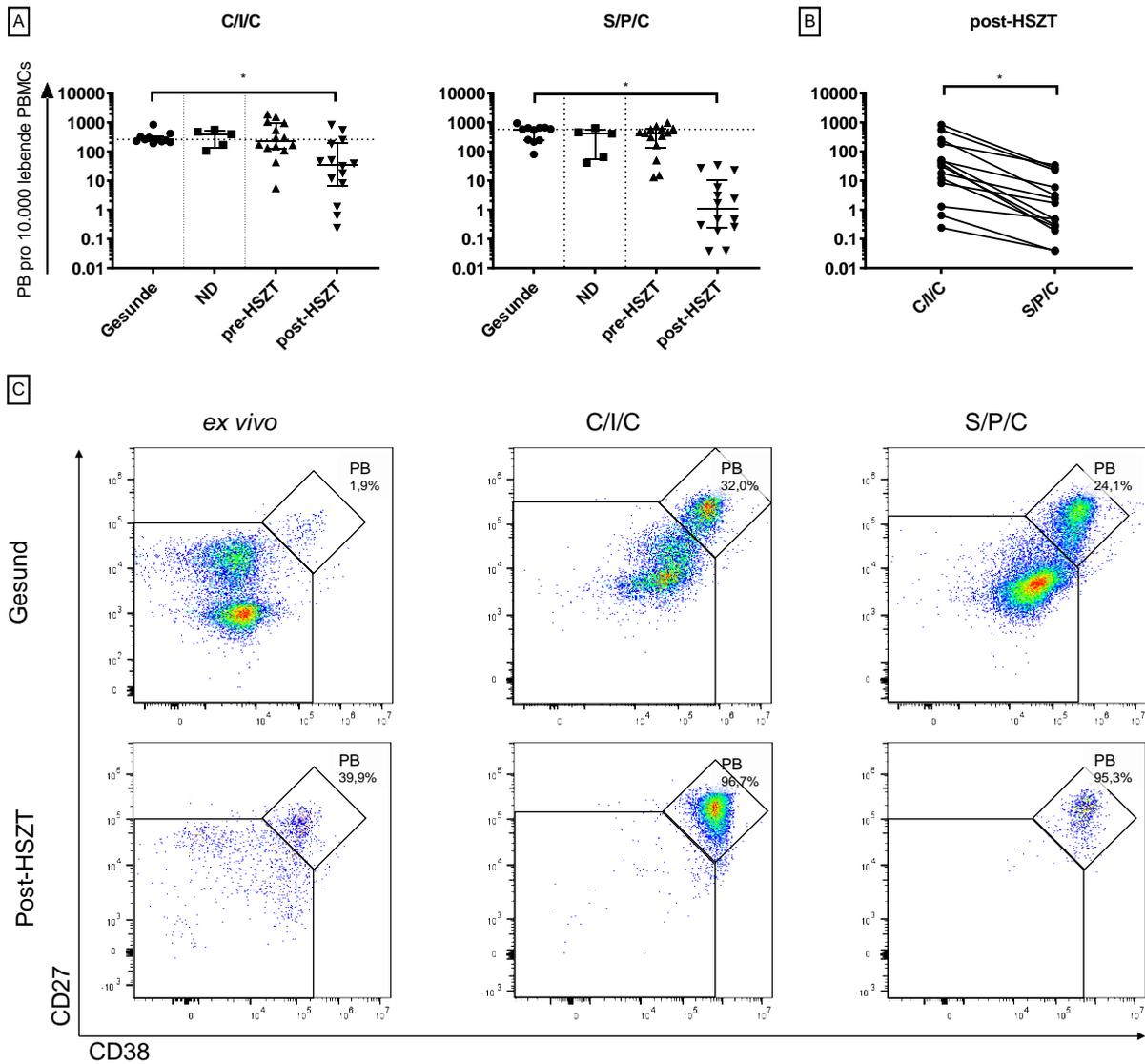
Post-HSZT war, wie bei der CD19+ Proliferation der stärkste Effekt der C/I/C Stimulation zu beobachten, insbesondere in Bezug auf die PB und GB. Wie in der proliferativen Immunantwort deuteten auch die PB, GB und MZ-ähnlichen Zellen auf eine gestörte Differenzierung auf die S/P/C Stimulation hin. Des Weiteren lag post-HSZT eine große Varianz der Funktion besonders auf S/P/C vor und bei einigen Patienten schien eine effektive PB Expansion stattzufinden (Abbildung 9).

Es zeigte sich insgesamt ein Rückgang des Stimulationseffektes von S/P/C im Verlauf der Erkrankung und Therapie, während bei C/I/C eine Zunahme des stimulativen Effektes zu beobachten war.

#### **3.4.1.3 PB Zahlen pro PBMCs**

Die PB wurden aufgrund ihrer Rolle als Vorläufer der Plasmazellen und ihres Mitwirkens in der Pathogenbekämpfung gesondert in ihrer Gesamtzahl innerhalb der PBMCs ausgewertet. Dafür wurde wie bei den CD19+ B-Zellen, die Anzahl der gesamt-PB mit dem Niveau von Gesunden verglichen (Abbildung 11 A). Es wurde festgestellt, dass wie bei CD19+ B-Zellen die Zahl der PB / 10.000 lebende PBMCs durch Stimulation bei ND und pre-HSZT Patienten das Niveau von Gesunden erreichte und das quantitative Defizit *ex vivo* ausglich. Post-HSZT konnte dieses Defizit nicht ausgeglichen werden. Obwohl die PB / 10.000 CD19+ Zellen nach C/I/C

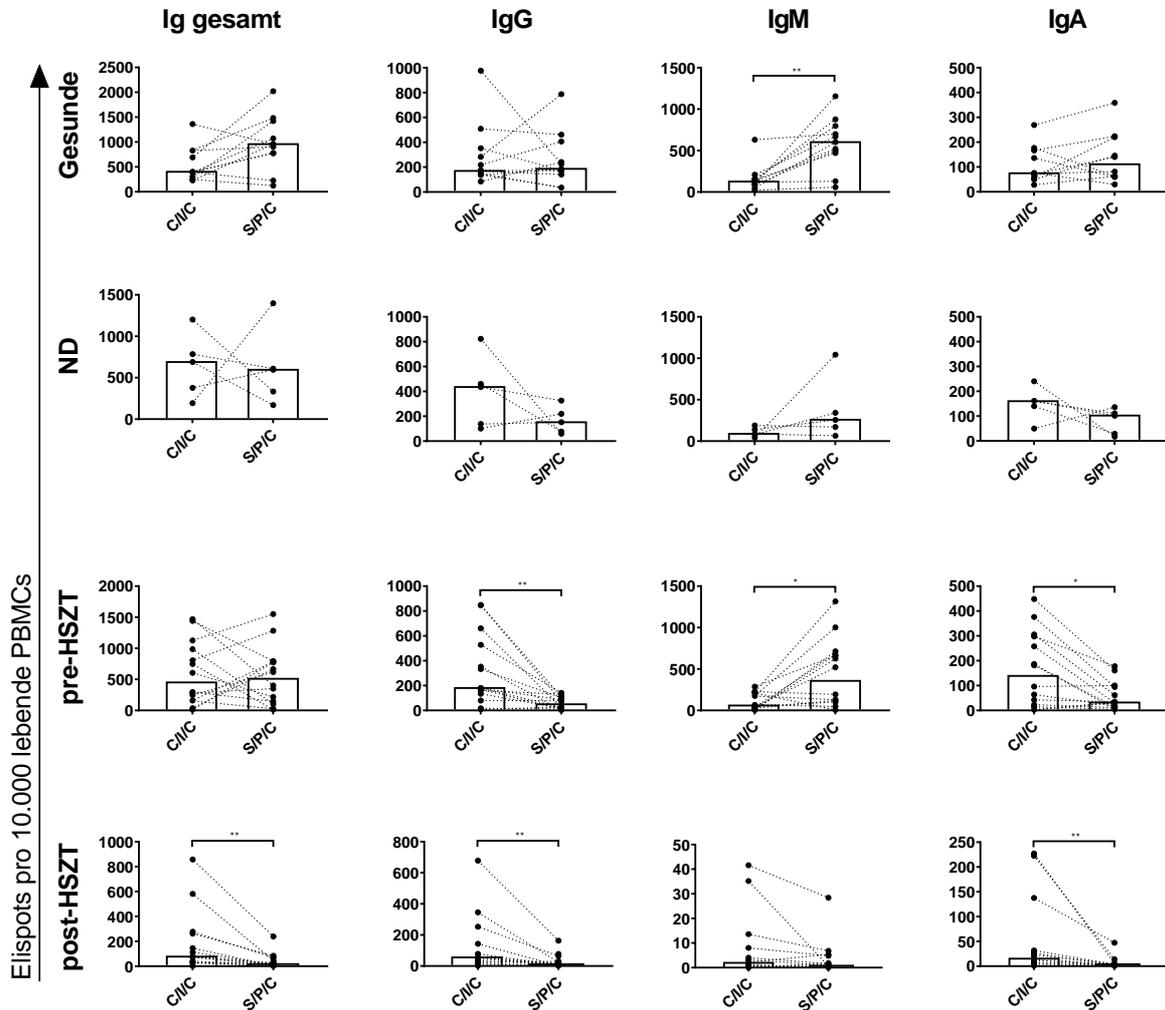
den größten Anteil von allen Gruppen einnahmen (Abbildung 9) lagen nach beiden Stimulationen die Gesamtzahlen der PB innerhalb der PBMCs im Median signifikant unter dem gesunden Niveau (C/I/C: Gesunde: 262 [222-320] vs. post-HSZT: 36 [7-202];  $p=0,003$ ; S/P/C: Gesunde: 576 [245-659] vs. post-HSZT: 1,1 [0,2-10,2];  $p<0,001$ ) (Abbildung 11 A). Hervorzuheben ist auch hier die große Varianz im Funktionsansprechen. Somit bewirkte die C/I/C Stimulation trotz erniedrigtem Median bei vier Patienten PB Niveaus von Gesunden, S/P/C bei keinem (Abbildung 11 A). Obwohl die PB Anteile innerhalb der CD19+ Population nach S/P/C teilweise eine normale Response zeigten (Abbildung 9), blieben sie in der Gesamtzahl stark reduziert. Entsprechend lagen die PB Werte pro 10.000 PBMCs post-HSZT nach C/I/C Stimulation signifikant über denen nach S/P/C Stimulation, wobei jeder Patient ein besseres Ansprechen auf C/I/C zeigte als auf S/P/C (Abbildung 11 B). Dieser Unterschied ließ sich auch in durchflusszytometrischen Daten visuell erkennen (Abbildung 11 C).



**Abbildung 11: Zunahme der PB durch die Stimulationen bei Patienten im Vergleich zu Gesunden**

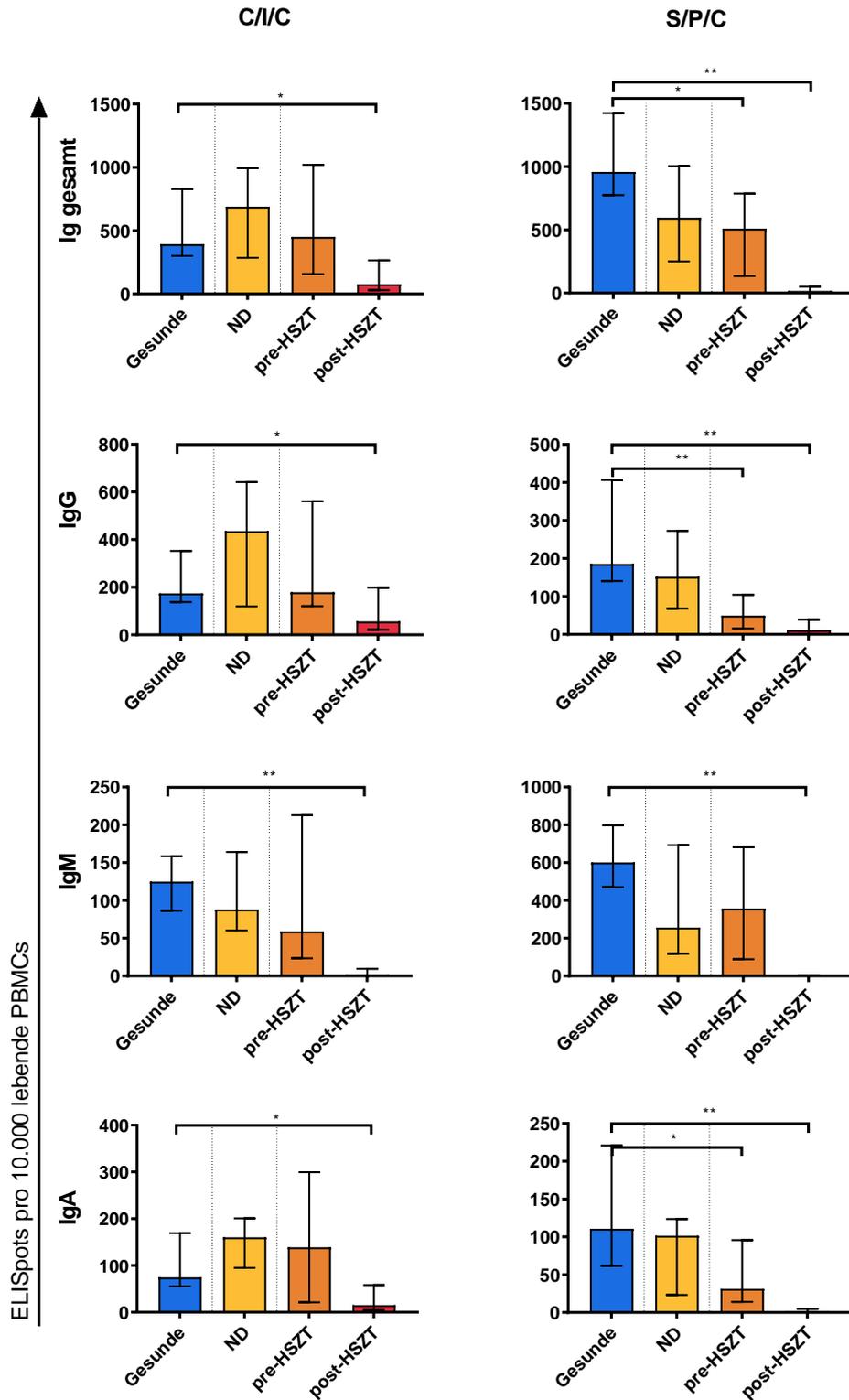
In **A** und **B** sind die PB Zahlen pro 10.000 PBMCs auf einer Log10 Skala dargestellt. **A** vergleicht die Gesunden mit den Patientengruppen jeweils nach C/I/C oder S/P/C Stimulation. Zusätzlich zu den Einzelwerten der Proben sind der Median sowie der IQA angegeben. **B** zeigt den Vergleich der einzelnen Proben post-HSZT zwischen S/P/C und C/I/C. Je zwei verbundene Punkte stellen einen Patienten dar. Unterschiede wurden mittels Wilcoxon Test berechnet, signifikante Unterschiede mit  $*p < 0,05$  angegeben. In **C** ist exemplarisch die durchflusszytometrische Messung der PB vor und nach Stimulation bei einem gesunden Spender und einem post-HSZT Patienten dargestellt.

### 3.4.2 Funktionsmessung mittels B-Zell ELISpot



**Abbildung 12: Vergleich der ISC Generierung durch die Stimulation mit C/I/C oder S/P/C**

Darstellung der im Elispot gemessenen gesamten ISCs sowie aufgeteilt nach IgG, IgM und IgA pro 10.000 applizierte PBMCs bei Gesunden, ND, pre-HSZT und post-HSZT. Jeder Punkt stellt die ISCs eines Patienten dar. Da eine große interindividuelle Varianz vorliegt ist jeweils der gleiche Patient bei C/I/C und S/P/C mit einer Linie verbunden. Die Mediane sind mittels Balken gekennzeichnet. Unterschiede zwischen den Medianen der C/I/C und S/P/C Stimulation wurden mittels Wilcoxon Test ermittelt und Signifikanzniveaus angegeben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ). Vergleiche [140].



**Abbildung 13: Vergleich der ISC Generierung zwischen Gesunden und Patientengruppen**

Darstellung der gesamten Igs, IgG, IgM und IgA sezernierenden Zellen pro 10.000 applizierte PBMCs gemessen im ELISpot. Gezeigt sind die Mediane mit den IQAs. Die linke Spalte zeigt die ISCs nach C/I/C Stimulation, die rechte nach S/P/C Stimulation. Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-U Test berechnet im Vergleich zu Gesunden (\* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,001$ ).

Die Hypogammaglobulinämie gehört bei Patienten mit MM zu den wichtigsten Ursachen für die Infektanfälligkeit [69, 149] und weist auf eine Störung der Generierung von ISCs hin. Entsprechend wurde die Differenzierung von B-Zellen in ISCs als weiterer Funktionsparameter herangezogen. Dafür wurden die ISCs nach siebentägiger Stimulation im ELISpot gemessen. Differenziert wurde zwischen IgG, IgM und IgA. Als Ig gesamt wurde hier die Summe aus IgG, IgM und IgA bezeichnet.

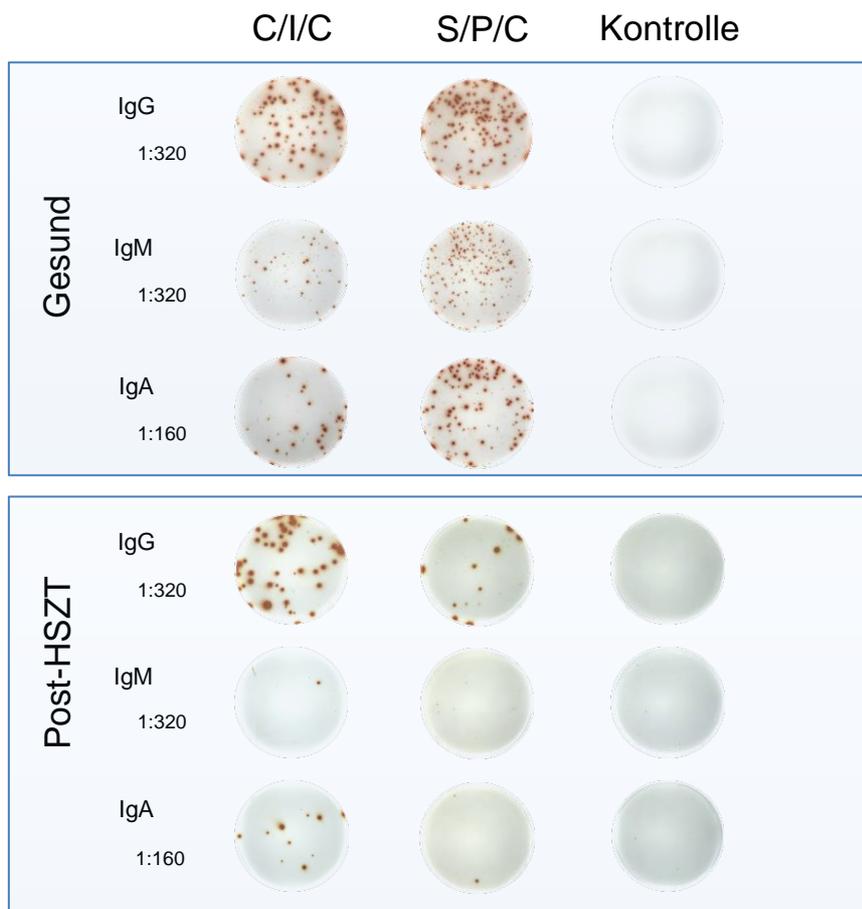
Bei gesunden Spendern bewirkten die Stimulationen eine mediane ISC Generierung von 394 [300-828] /10.000 PBMCs auf C/I/C und 958 [775-1423] /10.000 PBMCs auf S/P/C ( $p=0,054$  ns). Die höhere Anzahl bei S/P/C war primär auf IgM sezernierende Zellen zurückzuführen, die signifikant mehr waren als bei C/I/C (C/I/C: 125 [86-158]; S/P/C: 602 [470-797];  $p=0,001$ ) während die KW ISCs in etwa übereinstimmten (Abbildung 12).

Bei ND glich sich die mediane gesamt ISC Zahl an (C/I/C: 689 [286-993]; S/P/C: 596 [251-1004]), was auf eine stärkere IgG und IgA Sekretion nach C/I/C und eine abnehmende IgM Sekretion nach S/P/C gegenüber Gesunden zurückzuführen war (Abbildung 13). Wobei die Anzahl an IgM sezernierenden Zellen nach S/P/C die von C/I/C im Median weiter übertraf (C/I/C: 88 [60-164] vs. S/P/C: 256 [118-693]) (Abbildung 12). Ähnlich, kam es pre-HSZT insgesamt zu etwa gleich vielen ISCs (C/I/C: 451 [157-1021]; S/P/C: 509 [135-786]). Im Unterschied zu Gesunden und ND waren die IgA und IgG ISCs signifikant weniger nach S/P/C als nach C/I/C Stimulation (IgG  $p<0,001$ ; IgA  $p=0,009$ ) (Abbildung 12) und nach S/P/C auch signifikant gegenüber Gesunden reduziert (IgG  $p<0,001$ , IgA  $p=0,02$ ) (Abbildung 13). Die IgM Sekretion hingegen blieb signifikant stärker durch S/P/C (C/I/C: 59 [23-213]; S/P/C: 357 [89-681];  $p=0,02$ ). Post-HSZT kam es zu einer Umkehr der Beobachtungen, die bei Gesunden gemacht wurden. Es zeigte sich eine 4,5-9,5-fach höhere Anzahl an gesamt ISCs, IgA und IgG nach C/I/C als nach S/P/C (Ig gesamt, IgG und IgA:  $p<0,001$ ). Die IgM Sekretion fiel nach beiden Stimulationen sehr gering aus, lag nach C/I/C dennoch höher als nach S/P/C (C/I/C: 1,7 [0,2-9,4]; S/P/C: 0,7 [0,3-5,0];  $p=0,05$  ns) (Abbildung 12). Zu beachten ist dabei, dass die Anzahl aller ISC Isotypen post-HSZT nach beiden Stimulationen signifikant gegenüber Gesunden reduziert waren (Abbildung 13). Bei Betrachtung der ISCs pro vorhandene B-Zellen

zeigte sich post-HSZT eine stärkere IgA und IgG Synthese als bei Gesunden auf beide Stimulationen hin. IgM war jedoch nach S/P/C auch pro B-Zellen reduziert und entsprach bei C/I/C etwa dem Niveau von Gesunden (Daten nicht gezeigt). In Zusammenschau ließ sich daraus schließen, dass auch die verminderte ISC Anzahl post-HSZT auf die stark reduzierte B-Zell-Anzahl dieser Patienten zurückzuführen war. Das signifikant bessere Ansprechen auf C/I/C deutete aber dennoch auf eine funktionale Störung der B-Zellen hin, die sich *in vitro* durch die C/I/C aber nicht durch die S/P/C Stimulation ausgleichen ließ.

Ein Beispiel wie sich der Unterschied der ISC Generierung durch die Stimulationen bei Gesunden und post-HSZT im ELISpot darstellte ist in Abbildung 14 zu sehen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass ND und pre-HSZT Patienten in Bezug auf ISCs eine suffiziente Immunreaktion auf die *in vitro* Stimulationen ausbildeten (Abbildung 13). Bei der C/I/C Stimulation nahm diese durch die Erkrankung zu und war vor allem auf die KW ISCs zurückzuführen. Bei S/P/C hingegen war diese mehr auf IgM ISCs zurückzuführen und nahm im Vergleich zu Gesunden ab. Post-HSZT bildeten sich nach beiden Stimulationen signifikant weniger ISCs als bei Gesunden, wobei sich dies auf die verminderte B-Zellzahl zurückführen ließ. Dabei ist zu beachten, dass nach C/I/C die gesamten, IgG und IgA ISCs signifikant höher waren als nach S/P/C (Abbildung 12).



**Abbildung 14: Exemplarische Darstellung von ELISpot Wells nach den unterschiedlichen Stimulationsprotokollen**

Beispiel für die Detektion von IgG, IgM, IgA sezernierenden Zellen nach C/I/C oder S/P/C Stimulation im ELISpot. Dabei stellt ein Punkt eine ISC dar. Gezeigt werden ein gesunder Spender und ein Patient post-HSZT. Die Verdünnung bezieht sich auf die Anzahl stimulierter PBMCs pro Well. Abbildung modifiziert nach [140].

### 3.4.3 Immunfixation

Bei den ND zeigte sich ein auffälliger Anstieg der gesamten, IgA und IgG ISCs auf die C/I/C Stimulation hin (Abbildung 13). Um festzustellen, ob es sich bei diesen ISCs um monoklonal proliferierte MM Zellen handelte, wurden Immunfixationen von den Zellkulturüberständen der stimulierten Zellen von vier ND und einem pre-HSZT Patienten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den Überständen der ND Patienten entsprechend ihrer MM Erkrankung monoklonale Leichtketten und Immunglobuline nachweisbar waren. Dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Überständen der C/I/C und S/P/C Stimulationen festgestellt werden

(Daten nicht gezeigt). Bei dem pre-HSZT Patienten, dessen Serum-Immundefizienz keine Monoklonalität aufwies, zeigte sich auch durch die Stimulationen in der Zellkultur kein Nachweis von monoklonalen Banden, also keine Hyperproliferation der MM Zellen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass keine der beiden Stimulationen zu einer vermehrten Proliferation der MM Zellen führte und somit die C/I/C Stimulation bei ND polyklonal die KW ISCs induzierte.

#### **3.4.4 Funktionsbeeinflussende Parameter post-HSZT**

Insbesondere post-HSZT zeigte sich eine große Varianz im Stimulationsansprechen zwischen den verschiedenen Patienten. Durch die S/P/C Stimulation gelang es bei 6 von 14 Patienten einen suffizienten PB Anteil innerhalb der CD19+ Population hervorzurufen, bei C/I/C bei 11 von 14 Patienten. Die C/I/C Stimulation erreichte zudem bei zwei Patienten eine Anzahl von CD19+ B-Zellen und bei vier Patienten an PB innerhalb der PBMCs, die denen von Gesunden entsprachen.

In der Absicht herauszufinden, ob diese Patienten sich phänotypisch von denen mit geringerem oder fehlendem Funktionsansprechen unterschieden, wurden Korrelationsanalysen zwischen dem Funktionsansprechen und *ex vivo* Zellzahlen berechnet.

Als Parameter für das Funktionsansprechen wurden die nach Stimulation festgestellten CD19+ Zellen pro 10.000 PBMCs für die Proliferation, PB pro 10.000 CD19+ für die Differenzierung der Subpopulationen sowie PB pro 10.000 PBMCs und ISCs pro 10.000 PBMCs als Effektorzellen herangezogen. Korreliert wurden diese mit Zellpopulationen, die bekanntlich durch die genutzten *in vitro* Stimulationen aktiviert werden oder die eine essentielle Rolle in der T-Zell-abhängigen oder T-Zell-unabhängigen B-Zellaktivierung spielen. Zu diesen gehörten:

1. Gesamtzahl der CD19+ Zellen
2. Gesamtzahl der MZ-ähnlichen Zellen
3. Gesamtzahl der GB Zellen
4. Gesamtzahl der naiven B-Zellen
5. Anzahl CD4+ T-Zellen

Eine Übersicht der Korrelationskoeffizienten und dem zugehörigen Signifikanzniveau findet sich in Tabelle 12.

**Tabelle 12: Korrelationen zwischen Zellpopulationen *ex vivo* und Funktionsparametern**

Angegeben sind der jeweilige p-Wert <0,05\* und der Korrelationskoeffizient (r). Letzterer definiert einen schwachen (0,3<r<0,5), moderaten (0,5<r<0,7) und starken (r>0,7) Zusammenhang. Vergleiche [140].

Zellpopulation <i>ex vivo</i>	Funktionsparameter	C/I/C		S/P/C	
		p-Wert	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert	Korrelationskoeffizient (r)
<b>CD19+</b>	CD19+/PBMC	0,005*	0,724	<0,001*	0,887
	PB/CD19+	0,001*	0,79	0,046*	0,546
	PB/PBMC	0,002*	0,77	0,001*	0,788
	Ig gesamt	0,009*	0,682	0,039*	0,562
<b>GB</b>	CD19+/PBMC	0,027*	0,596	0,006*	0,71
	PB/CD19+	0,006*	0,706	0,192	0,371
	PB/PBMC	0,015*	0,644	0,035*	0,574
	Ig gesamt	0,087	0,477	0,096	0,464
<b>Naive</b>	CD19+/PBMC	0,492	0,2	0,030*	0,587
	PB/CD19+	0,333	0,279	0,553	0,174
	PB/PBMC	0,427	0,231	0,116	0,442
	Ig gesamt	0,627	0,143	0,545	0,176
<b>MZ ähnliche</b>	CD19+/PBMC	0,381	0,252	0,164	0,394
	PB/CD19+	0,055	0,528	0,004*	0,744
	PB/PBMC	0,237	0,336	0,008*	0,693
	Ig gesamt	0,177	0,382	0,007*	0,701
<b>CD4+</b>	CD19+/PBMC	0,016*	0,692	0,07	0,546
	PB/CD19+	0,020*	0,671	0,528	0,203
	PB/PBMC	0,012*	0,713	0,379	0,28
	Ig gesamt	0,016*	0,692	0,342	0,301

Bei beiden Stimulationsansätzen zeigte sich ein moderater bis starker Zusammenhang zwischen der Funktion und der CD19+ Zellzahl *ex vivo*. Je höher die CD19+ Zahl *ex vivo* desto höher der Anteil der CD19+ B-Zellen nach Stimulation, PB/CD19+ Zellen, gesamt PBs und ISCs.

Die Zahl der GB *ex vivo* beeinflusste die Funktion bei beiden Ansätzen signifikant in Bezug auf die Proliferation entsprechend der Gesamtzahl der CD19+ Zellen und die PB Gesamtzahl. Beim C/I/C Ansatz hingen sie außerdem mit dem PB Anteil in der CD19+ Population nach Stimulation zusammen. Die GB spielten demnach eine Rolle für die B-Zellfunktion, aber waren nur schwach mit der ISC Generierung assoziiert. Die Anzahl der vor Stimulation vorhandenen naiven B-Zellen ließ bei C/I/C keinen bzw. nur einen schwachen bis moderaten Zusammenhang bei S/P/C zur Stimulierbarkeit der B-Zellen erkennen.

Die Anzahl der MZ-ähnlichen Zellen *ex vivo* zeigte vor allem Einfluss auf die Immunantwort nach S/P/C Stimulation. Eine höhere Anzahl an MZ-ähnlichen bewirkte bei S/P/C einen signifikant positiven Effekt auf die PB Differenzierung und die Gesamtzahlen der PBs und ISCs, während die Proliferation der CD19+ B-Zellen nur schwach assoziiert war. Bei C/I/C schienen die MZ-ähnlichen Zellen hingegen keine bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Funktion zu haben.

#### **3.4.4.1 Funktionsbeeinflussung durch CD4+ T-Zellen**

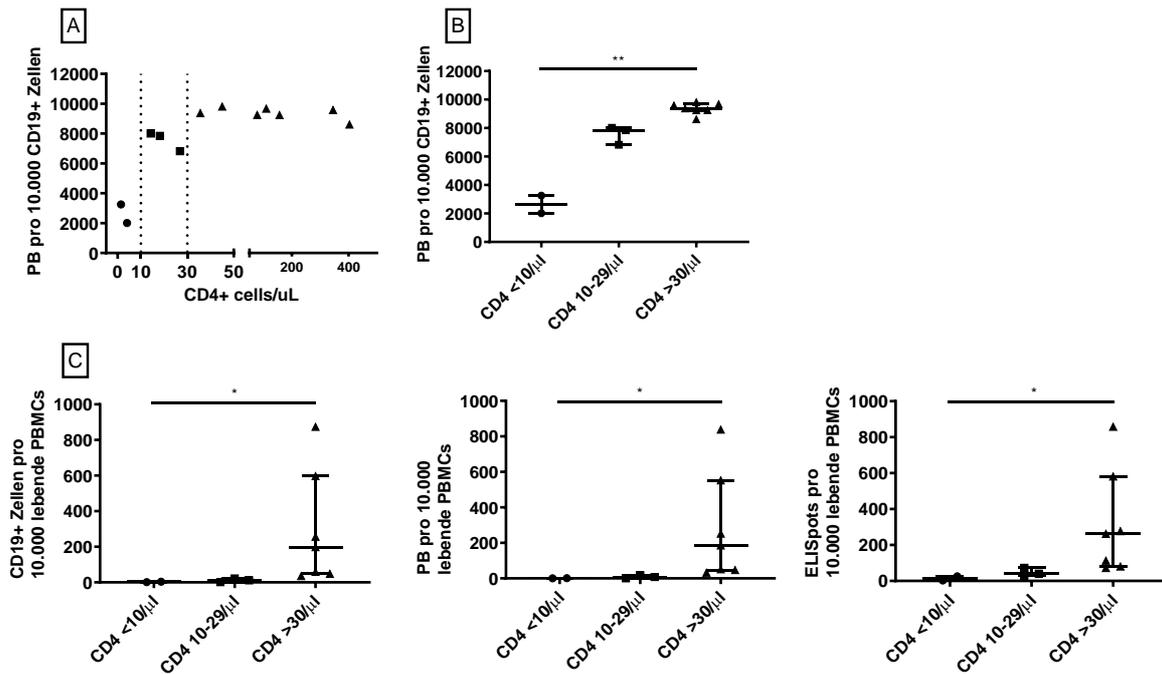
Aus dem Grund, dass die B-Zellfunktion post-HSZT durch die C/I/C Stimulation signifikant besser ausfiel als durch S/P/C wurde von einem Zusammenhang der im C/I/C Ansatz substituierten Moleküle und der eingeschränkten B-Zellfunktion post-HSZT ausgegangen. Da CD40L und IL-21 hauptsächlich von aktivierten CD4+ Zellen exprimiert werden [150], wurden die CD4+ T-Zellzahlen im Zusammenhang mit der B-Zellfunktion untersucht.

Die CD4+ T-Zellen wurden im Rahmen einer durchflusszytometrischen Vollblutuntersuchung in Zellen/ $\mu$ l ermittelt. Für die Charakterisierung der CD4+ T-Zellen in der Durchflusszytometrie wurde zunächst aus dem gesamten Zellrepertoire im Vollblut auf CD45+ Leukozyten gated. In dieser Population wurden anschließend die Lymphozyten eingegrenzt und die T-Zellen anhand des CD3 Markers identifiziert. In einer Auftrennung der T-Zellen zwischen CD4 und CD8, wurden die CD4+ T-helfer Zellen von den zytotoxischen CD8+ T-Zellen getrennt.

In der Korrelationsanalyse der Funktionsparameter mit den CD4+ Zellen zeigte sich bei der C/I/C Stimulation ein moderat bis starker Zusammenhang mit sowohl der Proliferation (CD19+ Zellen) und Differenzierung (PB/CD19+ Zellen), als auch der PB/PBMC und ISC Generierung. Ein Einfluss auf die S/P/C Stimulation blieb, mit

Ausnahme eines moderaten Zusammenhanges auf die Proliferation der CD19+ Zellen aus.

Bei genauerer Betrachtung der CD4+ T-Zellen und PB/CD19+ Zellen nach C/I/C waren diese nicht linear abhängig, sondern es wurden zwei Schwellenwerte der CD4+ T-Zellen ausgemacht (CD4 >10/ $\mu$ l und CD4 >30/ $\mu$ l), die jeweils mit einer besseren Funktion der B-Zellen einhergingen (Abbildung 15 A). Anhand dieser Schwellenwerte wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt (CD4 <10/ $\mu$ l, CD4 10-29/ $\mu$ l, CD4 >30/ $\mu$ l) und die Funktion innerhalb dieser Gruppen verglichen (Abbildung 15 B). Dabei zeigte sich, dass die Stimulation mit C/I/C bei weniger als 10 CD4+ T-Zellen pro  $\mu$ l wenig Effekt hatte, schon bei niedrigen CD4+ Werten (10-29 CD4+ Zellen/ $\mu$ l) erfolgreich PB generierte, allerdings weniger als bei >30 CD4 Zellen/ $\mu$ l. Im Vergleich dieser drei Gruppen ergab sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ). Da die Zahlen jeweils pro 10.000 Zellen angegeben sind, konnten die PB allerdings nicht über diesen Wert hinaus ansteigen, wodurch sich kein kontinuierlicher Anstieg zeigte. Bei der Zuordnung der Patienten anhand der CD4+ Zellzahl zu den anderen Funktionsparametern wurde ebenfalls die Relevanz der beiden Schwellenwerte deutlich. Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurden auch hier signifikant zunehmende Funktionsunterschiede mit höherer CD4+ Zahl innerhalb der drei Gruppen festgestellt (CD19/PBMC:  $p = 0,002$ ; PB/PBMC:  $p = 0,001$ ; Ig/PBMC:  $p = 0,004$ ) (Abbildung 15 B).



**Abbildung 15: Einfluss der CD4+ Zellzahl ex vivo auf die Funktion der B-Zellen nach C/I/C Stimulation**

**A:** Korrelationsanalyse zwischen CD4+ Zellzahl und PB / 10.000 CD19+ Zellen nach C/I/C Stimulation. Gepunktete Linien zeigen die Schwellenwerte, an denen die PB Anteile stufenweise zunehmen. **B:** Darstellung der Gruppeneinteilung der Patienten anhand ihrer CD4+ Zellzahlen im Verhältnis zu folgenden B-Zellfunktionsparametern: CD19+/PBMC, PB/CD19+, PB/PBMC, Ig Gesamt. Unterschiede der Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz geprüft (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ). Abbildung modifiziert nach [140].

Zusammenfassend zeigte die Korrelationsanalyse der Funktionsparameter mit den *ex vivo* Zellzahlen einen Einfluss der quantitativen Veränderungen auf die Stimulierbarkeit. Größte Relevanz hatten dabei die Gesamtzahl der CD19+ B-Zellen und GB für beide Stimulationen sowie die Anzahl der MZ-ähnlichen für eine erfolgreiche S/P/C Stimulation und die CD4+ Zellzahl für eine erfolgreiche C/I/C Stimulation. Für die C/I/C Stimulation ließen sich außerdem Schwellenwerte der CD4+ T-Zellen von 10 Zellen/μl und 30 Zellen/μl festlegen, die mit einer Funktionssteigerung einhergingen.

### 3.4.4.2 Multivarianzanalyse

Da sich die Funktion abhängig von quantitativen Parametern zeigte und die Zellen fortlaufend nach Transplantation rekonstituieren, wurde zusätzlich der Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach Transplantation auf den Funktionserfolg

miteinbezogen. In einer Multiplen Regression von B-Zellfunktion, *ex vivo* Zellzahl und Tagen nach Transplantation zeigte sich ein verbesserter p-Wert der Regression durch die Adjustierung auf die Anzahl der Tage nach Transplantation. Dies deutet auf einen positiven Einfluss der Tage nach Transplantation auf das Funktionsergebnis hin.

Da die Patienten und Gesunden sich sowohl in der Verteilung des Alters sowie des Geschlechts unterschieden wäre es angebracht gewesen, diese Parameter in die Multiple Regression einzubeziehen. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde stattdessen in separaten multiplen Regressionen der Zusammenhang zwischen Funktion und Zellzahl auf Alter und Geschlecht adjustiert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Einfluss dieser Parameter.

Die niedrige Patientenzahl (n=14) lässt jedoch keine verlässliche multiple Regression zu, weshalb diese Ergebnisse nur als Tendenz gewertet werden können.

#### **3.4.5 Vergleich der Funktion pre- und post-HSZT**

Mit der Fragestellung, ob die Patienten, die post-HSZT eine eingeschränkte Funktion aufwiesen auch schon vor HSZT zu identifizieren seien, wurden die Funktionsparameter (Tabelle 13) sowie *ex vivo* Zellzahlen (Daten nicht gezeigt) pre-HSZT und post-HSZT verglichen. Bei den *ex vivo* Zellzahlen zeigten sich keine oder nur schwache Korrelationen. Unter den Funktionsparametern war eine schwache Korrelation nach S/P/C bei den gesamt Igs zu sehen, diese fiel nach C/I/C moderat aus. Bei C/I/C zeigten die PB und CD19+ Zellen / PBMCs ebenfalls einen moderaten Zusammenhang pre- und post-HSZT. Auch wenn dies interessante Hinweise auf einen Zusammenhang der Funktion pre- und post-HSZT waren, ließen sich daraus keine prädiktiven Parameter ableiten, um die Funktion nach HSZT schon vor der Transplantation abzuschätzen.

Tabelle 13: Korrelation der Funktionsparameter pre- und post-HSZT

Funktionsparameter	C//C		S/P/C	
	p-Wert	Korrelationskoeffizient (R)	p-Wert	Korrelationskoeffizient (R)
<b>CD19+/PBMC</b>	0,057	0,525	0,357	-0,266
<b>PB/CD19+</b>	0,797	-0,077	0,473	0,209
<b>PB/PBMC</b>	0,067	0,508	0,704	-0,112
<b>Ig gesamt</b>	0,085	0,5	0,278	0,31

Zusammenfassend zeigten die verschiedenen Funktionsuntersuchungen, dass die *in vivo* beschriebene Hypogammaglobulinämie und die *ex vivo* reduzierten B-Zellen bei unbehandelten und vor auto-HSZT untersuchten MM Patienten, *in vitro* durch beide Stimulationsansätze wieder ausreichend hergestellt werden konnte. Während der Effekt des S/P/C Ansatzes sich vor allem pre-HSZT größtenteils auf eine Expansion der IgM PB belief, induzierte der C//C Ansatz erfolgreich die Generierung von KW PB und KW ISCs. Post-HSZT zeigte sich eine global stark eingeschränkte Funktion auf die S/P/C Stimulation. Die C//C Stimulation bewirkte eine starke Proliferation, Differenzierung und ISC Generierung entsprechend der vorhandenen B-Zellen. Im Median waren die Gesamtzahlen der CD19+ B-Zellen, PBs und ISCs nach beiden Stimulationen signifikant gegenüber Gesunden reduziert. Das sehr unterschiedliche ausgeprägte Ansprechen auf die verschiedenen Stimulationen post-HSZT korrelierte bei beiden Stimulationen mit der CD19+ und GB Anzahl, bei S/P/C zusätzlich mit den MZ-ähnlichen Zahlen und bei C//C mit der Anzahl der CD4+ T-Zellen. Bei den CD4+ T-Zellen zeigten sich zwei Schwellenwerte (10 Zellen/ $\mu$ l und 30 Zellen/ $\mu$ l) ausschlaggebend für das funktionale Ergebnis.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der MM Erkrankung und deren Therapie auf das B-Zell-Kompartiment untersucht. Dabei wurden phänotypische sowie funktionale Veränderungen analysiert. Ein besonderer Fokus lag auf den am stärksten immunsupprimierten Patienten nach Hdx mit auto-HSZT und der Identifikation funktionsbeeinflussender Parameter.

## 4.1 Quantitative Analyse des B-Zell-Kompartiments bei MM Patienten

### 4.1.1 Vergleich zwischen Gesunden und ND Patienten

Bei MM Patienten ist die Anzahl der Infektionen stark mit der Krankheitslast assoziiert [66]. Diese korreliert häufig mit der Hypogammaglobulinämie. Neben der Verdrängung der nicht-MM-IgG durch monoklonale Antikörper wird unter anderem eine Reduktion der CD19<sup>+</sup> B-Zellen für diese verantwortlich gemacht. Analog zu vorherigen Studien [76, 78] wurden in dieser Arbeit reduzierte CD19<sup>+</sup> Zellen bei unbehandelten MM Patienten (ND) nachgewiesen (Abbildung 5). Bei Betrachtung der Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments fiel zudem eine 4,3-fache Erhöhung der IgM<sup>+</sup> PB bei reduzierten IgM Spiegel im Serum auf (Abbildung 7, Tabelle 8). Dies deutete zusätzlich auf eine Differenzierungsstörung als Ursache der Hypogammaglobulinämie hin, wie sie zuvor von Pilarski et al. vermutet wurde [76]. Diese wird in Kapitel 5.2.1 weiter diskutiert. Man vermutet, dass dabei eine Störung der B-T-Zellinteraktion und Keimzentrumsformation zugrunde liegt, wodurch es zu einem Ausbleiben des Isotypenwechsels und der Differenzierung in ISCs kommt. Eine Erhöhung der PB Subpopulationen, wie sie in geringem Maße bei den untersuchten ND Patienten vorlag, lässt sich bei einer akuten oder chronischen Entzündung beobachten. Diese resultiert aus einer Differenzierung von GB, Naiven, MZ-ähnlichen und Transitionalen in PB [28]. Wie es kennzeichnend für Malignome ist, führt auch das MM zu einer Entzündungsreaktion [151]. Dabei spielen myeloide Zellen eine zentrale Rolle [152]. Durch das entzündliche Milieu werden mehr PB generiert und ein erhöhter Verbrauch von Immunzellen fällt an, wodurch sich gleichzeitig die Reduktion der KW GB und MZ-ähnlichen Zellen erklären könnte.

Zusätzlich zeigte die Verteilung der Subpopulationen, dass der Rückgang der CD19<sup>+</sup> Zellen sich insbesondere auf den Anteil der MZ-ähnlichen auswirkte (Abbildung 7). Inwiefern das MM zu einer Reduzierung der MZ-ähnlichen Zellen führt, ist bisher nicht geklärt. Neben dem erhöhten Verbrauch könnte dies durch die ebenso verminderte Anzahl an transitionalen B-Zellen bedingt sein, aus denen die MZ-Zellen differenzieren [147]. Der Mangel der Transitionalen ist ein Zeichen der gestörten Knochenmarksfunktion bei MM Patienten [69, 149].

Zu beachten ist, dass sich Gesunde und Patienten im Durchschnittsalter unterschieden. Da die Patienten im Durchschnitt älter waren als die gesunden Kontrollen, kann dies ebenfalls aufgrund der Immunseneszenz auf phänotypischer und funktionaler Ebene einen Einfluss gehabt haben. Durch hohes Alter sind ähnliche Veränderungen wie bei den hier untersuchten Patienten beschrieben. Dazu gehören eine Reduktion der B-Zellen sowie eine Verschiebung von Subpopulationen mit reduzierten naiven, Plasmazellen, GB und MZ-ähnlichen [41]. Während eine Reduktion der MZ-ähnlichen auch bei den ND Patienten vorkommt, zeigte sich allerdings der Anteil der gesamt-Naiven und GB in dieser Arbeit nicht reduziert.

#### **4.1.2 Veränderungen vor HSZT**

Die Patientengruppe pre-HSZT setzt sich aus vortherapierten Patienten zusammen, deren Blut vor Erhalt der Hdx mit Melphalan untersucht wurde. Diese Gruppe gibt Auskunft darüber, wie Induktionstherapieschemata die B-Zellen der MM Patienten gegenüber Gesunden bzw. unbehandelten ND beeinflussen. Allerdings umfasst sie Patienten, die unterschiedlich vortherapiert waren und stellt somit eine sehr heterogene Gruppe dar. Da der Zeitraum der Patientenrekrutierung für diese Arbeit begrenzt war und im Rahmen der Frischprobensammlung die Zeitabschnitte zu lange, stimmen die Patienten der pre-HSZT Gruppe mit denen der post-HSZT Gruppe überein, unterscheiden sich aber von der Kohorte der ND. Demnach sind die folgenden Aussagen unter Berücksichtigung der interindividuellen Varianz nur eingeschränkt und nicht für eine spezifische Therapie zu bewerten. Sie liefern aber interessante Einblicke in Bezug auf die Veränderungen der B-Zellen im Verlauf der MM Erkrankung und Therapie.

Durch die MM Therapie kommt es trotz Rückgang der Krankheitslast zu zunehmender Immunsuppression und Zytopenie [153]. Bei Betrachtung der CD19+ Gesamtzahlen der hier untersuchten pre-HSZT Patientengruppe waren diese, wie ebenfalls von Schütt et al. nach Standardchemotherapie beschrieben, gegenüber Gesunden und auch ND reduziert (Abbildung 5) [78]. Dieser Effekt ist bei Remission des MMs wahrscheinlich auf die verwendeten Chemotherapeutika zurückzuführen. Zwar ist in den meisten Fällen ein hauptsächlich immunsupprimierender Effekt der

zytotoxischen Therapien auf T-Zellen beschrieben, aber Dexamethason [82, 154] und Cyclophosphamid [89, 90] führen ebenfalls zu einer Reduktion der B-Zellen. Proteasominhibitoren reduzieren insbesondere die Plasmazellen [155, 156].

Der Einfluss der MM Therapien auf die verschiedenen Subpopulationen der B-Zellen wurde bisher nicht untersucht. Ein weiterer Anstieg der PB Anteile um das 1,6-fache gegenüber ND könnte sich abermals auf eine Entzündungsreaktion des Körpers im Rahmen der Zytoreduktion durch die Chemotherapien zurückführen lassen. Besonders stark zeigte sich der Rückgang bei der Anzahl der GB und abermals bei MZ-ähnlichen. Im Vergleich zu ND kam es zu einem starken Abfall der Anteile pro B-Zellen, der Anteil der GB hat sich etwa halbiert und die MZ-ähnlichen gingen sogar um 75% zurück (Abbildung 7). In der Literatur ist (aufgrund der geringen Proliferationsrate der GB) kein oder nur ein geringer Effekt von Dexamethason [154], Cyclophosphamid [157] und Proteasom Inhibitoren [155, 156] auf die Anzahl der GB im Rahmen von anderen Krankheitsbildern beschrieben. Der übermäßige Rückgang der GB inklusive der MZ-ähnlichen Zellen in dieser Arbeit ließ hingegen rückschließen, dass die vorliegende Kombination an zytotoxischen Therapien insbesondere zur Apoptose der GB und MZ-ähnlichen führt. Zu berücksichtigen ist allerdings der verzerrende Einfluss des bei unseren Patienten applizierten G-CSFs auf die B-Zellen. Bei gesunden Spendern können die reifen B-Lymphozyten um das 3-fache ansteigen. Dabei ist der Anstieg der naiven B-Zellen deutlich stärker als der, der GB [158], wodurch sich eine Verschiebung der B-Zell-Subpopulationen zum Nachteil der GB ergeben könnte.

Auffallend war zudem ein sehr hoher Anteil an transitionalen B-Zellen, der nur in dieser Patientengruppe vorlag (Abbildung 7). Als mögliche Ursache käme hier ebenfalls die G-CSF-Gabe zur Stammzellmobilisierung in Frage. Allerdings führt G-CSF vor allem zu einem peripheren Anstieg von reifen B-Lymphozyten und weniger von Transitionalen [158]. Als wahrscheinlichere Ursache für den hohen Anteil der transitionalen B-Zellen ist daher die körpereigene reflektorisch gesteigerte Synthese im Knochenmark, wie sie beispielsweise bei Immundefekten und nach HSZT [19] oder nach B-Zell depletierenden Therapien wie Rituximab [159] beschrieben ist. Da es auch durch das bei den Patienten verwendete Cyclophosphamid zur B-Zell-

Depletion kommt [89, 90] und im Anschluss zu einer überschießenden Rekonstitution [160], könnte der gesteigerte Anteil der Transitionalen auf eine beginnende Rekonstitution der B-Zellen hindeuten.

#### **4.1.3 Veränderungen nach HSZT**

Bei Patienten die eine HSZT durchlaufen kommt es zur stärksten Immunsuppression, wodurch das Gesamtüberleben der Patienten reduziert ist [66]. Innerhalb der ersten 14 Tage nach HSZT gelten die Neutropenie und Mukositis als Hauptrisikofaktoren für Infektionen [70]. Im Anschluss liegt die Ursache insbesondere in der verzögerten Rekonstitution der B- und T-Zellen [161]. Um einen Eindruck über das B-Zell-Kompartiment (und dessen Funktion) in der infektionsreichsten frühen Rekonstitutionsphase zu erhalten [93], aber nach der Neutropenie, wurden demnach Patienten zwischen 14 und 31 Tagen post-HSZT untersucht. Dabei zeigte sich eine Reduktion der B-Zellen auf 1% der Anzahl bei gesunden Spendern. Von pre-HSZT zu post-HSZT verringerte sich die CD19+ Zahl um 95% (Abbildung 5). Dieser Abfall der B-Zellen entstand durch die Hdx mit Melphalan, die eine Ablation des Immunsystems bewirkt [58]. Neben uns stellten auch andere Gruppen eine nahezu vollständige Depletion der B-Zellen durch Melphalan Hdx fest [78, 102]. Zudem wurde eine Korrelation von Hdx Melphalan mit der Zunahme von Infektionen beschrieben [72].

Neben der Reduktion der Gesamt-B-Zellen zeigte sich post-HSZT eine veränderte Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments, die eine Infektanfälligkeit begünstigen könnte (Abbildung 7). Während der Anteil der GB gegenüber den pre-HSZT Patienten wieder zunahm, lag post-HSZT vor allem eine starke Reduktion des gesamt-naiven Phänotyps vor. Dies schränkt die Kapazitäten ein, auf unbekannte Pathogene eine adäquate Immunantwort auszulösen. Dies wurde weiter begrenzt durch einen 20-fach erhöhten PB Anteil pro CD19+ Zellen gegenüber Gesunden. Die hohen PB wiesen auf eine bereits bestehende akute Entzündungsreaktion hin, induziert durch die myeloablative Therapie [20]. Eine Studie von Gernert et al. beschrieb eine ähnliche Zusammensetzung in der frühen Rekonstitutionsphase nach auto-HSZT bei Patienten mit systemischer Sklerose mit 10-fach erhöhten PB gegenüber vor HSZT, initial mehr GB und weniger Naiven [102].

Die auch in der Literatur beschriebene verhältnismäßig hohe Zahl der GB im ersten Monat nach auto-HSZT [78, 102] ist nicht auf rekonstituierte GB zurückzuführen, da diese erst spät mit CD4+ Zellen rekonstituieren [103]. Sie stammen unter anderem aus dem transplantierten peripheren B-Zell-Repertoire [20, 162]. Eine andere Überlegung ist, dass die GB ähnlich wie die Plasmazellen die Konditionierungstherapie länger überleben als Naive. Ein Überleben von Plasmazellen und auch anderen B-Zell-Populationen ist bei Konditionierungstherapien mit reduzierter Intensität beschrieben [163]. Insbesondere ein Überleben der Plasmazellen kommt aber auch bei Hdx Konditionierung vor, wobei diese im späteren Verlauf zugrunde gehen [164]. Dies verleitet dazu zu spekulieren, dass auch eine langlebige GB Population, die ins KM zirkuliert, die Konditionierung kurzzeitig überlebt [97]. Im 2. Monat kommt es zu einem Abfall der GB und durch die frühere Rekonstitution der Naiven zu einer Umkehr des Verhältnisses von Naiven und GB [102, 165].

Ein weiteres Merkmal post-HSZT ist ein fortschreitender Rückgang der MZ-ähnlichen B-Zellen, die post-HSZT nur noch 0,01% der MZ-ähnlichen von Gesunden ausmachen. Sie stellen somit die am stärksten reduzierte B-Zell-Population dar. Eine deutliche Reduktion der MZ-ähnlichen dort bezeichnet als IgM-Gedächtniszellen wurde ebenfalls nach allogener HSZT bei verschiedenen Krankheitsbildern beschrieben [103, 166-168]. Längere Beobachtungszeiträume zeigten zudem einen anhaltenden Mangel der Population über zwei bzw. fünf Jahre hinaus [167, 168]. Kruetzmann et al. stellten einen Zusammenhang zwischen dem Mangel an MZ-ähnlichen B-Zellen und Infektionen mit verkapselten Bakterien fest [12]. Auch nach HSZT liegt meist über Jahre eine erhöhte Infektanfälligkeit für verkapselte Bakterien vor [62, 96]. Eine weitere Gruppe mit erhöhter Infektanfälligkeit für verkapselte Bakterien sind Kinder unter zwei Jahren [169]. Dies entspricht dem Alter, an dem MZ-ähnliche Zellen das Niveau von Erwachsenen erreichen [12]. Das Immunsystem von Patienten nach HSZT durchläuft erneut die ontogenetische Entwicklung [100, 145], wodurch sich die auch verzögerte Regeneration der MZ-ähnlichen B-Zellen erklären ließe.

Zusammenfassend zeigte sich, wie auch in der Literatur beschrieben, dass das quantitative B-Zelldefizit aufgrund der MM Erkrankung im Laufe der Therapie zunimmt und nach HSZT am stärksten ausgeprägt ist [78, 143, 170]. Die Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen bei MM Patienten liefern weitere wertvolle Hinweise auf die Ursachen der eingeschränkten humoralen Immunität. Besonders stark reduziert waren die MZ-ähnlichen B-Zellen die konsekutiv bis auf 0,01% abfielen. Dies ist vereinbar mit der erhöhten Infektanfälligkeit von MM Patienten und Transplantierten auf verkapselte Bakterien [74, 96]. Zudem konnte ein im Verlauf zunehmend entzündliches Milieu mit vergrößertem PB Anteil festgestellt werden. Bei ND und pre-HSZT Patienten lieferten hohe IgM PB bei niedrigen MZ-ähnlichen B-Zellen einen Hinweis auf eine Differenzierungsstörung. In der pre-HSZT Gruppe schlug sich insbesondere der zytotoxische Effekt der Chemotherapeutika und die G-CSF Gabe auf die Anteile der GB und transitionalen B-Zellen nieder. In der frühen Rekonstitutionsphase nach Hdx mit auto-HSZT war das heterogene Bild aus depletiertem, transplantiertem und rekonstituierendem B-Zell-Kompartiment zu sehen.

## 4.2 Funktionale Analyse

In der Absicht, zu untersuchen, ob die vermehrten Infekte und ein vermindertes Impfansprechen bei MM Patienten [153] neben den quantitativen Störungen auch auf funktionale Einschränkungen zurückzuführen sind, wurde in dieser Arbeit die *in vitro* Funktion mittels zwei verschiedener Stimulationsansätze untersucht. Diese sind konzipiert, um eine maximale polyklonale Proliferation von B-Zellen und deren Differenzierung in ISCs zu induzieren [17, 123, 124]. Bei primären Immundefekten wie CVID, konnte teils eine erfolgreiche Stimulation anhand dieser Ansätze nachgewiesen werden [139][Steiner et al. unveröffentlicht]. Die Verwendung von polyklonalen Stimulationen diente dazu die allgemeine B-Zellantwort zu überprüfen, allerdings lassen sich die Erkenntnisse nicht zweifellos auf antigenspezifische Immunantworten übertragen.

Zur Beurteilung der B-Zellreaktion auf die siebentägigen *in vitro* Stimulationen wurden die Proliferation der gesamten CD19+ B-Zellen, die Umverteilung der CD19+ Subpopulationen, sowie die Anzahl der im ELISpot gemessenen Immunglobulin G, A

und M sezernierenden Zellen herangezogen. Die Umverteilung der CD19+ Subpopulationen stellt einen in diesem Kontext noch nicht verwendeten Parameter dar, der sensitiv Rückschlüsse auf eine Aktivierung des B-Zell-Kompartiments zulässt. Um einen *Status quo* zu erstellen wurden somit zunächst die Effekte der Stimulationsansätze bei Gesunden überprüft. Für beide Ansätze zeigte sich eine mäßige B-Zell-Proliferation und eine deutliche Umverteilung der Subpopulationen, mit einer Zunahme des PB Anteils und einer Abnahme der GB, Transitionalen, Naiven und MZ-ähnlichen (Abbildung 8, Abbildung 10). Die von Crotty et al. beschriebene Stimulation mit SAC, PWM und CpG führte dabei sowohl zu einer stärkeren Proliferation der B-Zellen und PB, die Anteilig 14-mal mehr Zunahmen als durch CD40L, IL-21 und CpG, als auch zu einer stärkeren Abnahme von GB, Naiven, Transitionalen und MZ-ähnlichen (Tabelle 11). Der vermehrte Anstieg der PB bei S/P/C war dabei auf die sehr viel stärker ausgeprägte Zunahme der IgM PB zurückzuführen, während sich die Zunahme der KW PB durch die beiden Stimulationen kaum unterschied. Bei der Generierung der ISCs zeigte sich ein ähnliches Muster (Abbildung 12). Das gesamte Ig war im Median nach S/P/C mehr als doppelt so hoch wie nach C/I/C, was sich maßgeblich auf die IgM sezernierenden Zellen zurückführen ließ (4,8-mal höher). Die Anzahl aber variierte stark zwischen den Spendern, wie es auch zuvor beschrieben ist [171].

Diese unterschiedliche Reaktion basiert auf den verwendeten Stimulantien.

Der Ansatz aus CD40L, IL-21 und CpG führt über CpG zu einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung der stark TLR9 exprimierenden GB. Dadurch wird eine Differenzierung der KW GB und der MZ-ähnlichen in ISCs initiiert und eine IgG und IgA bzw. IgM, IgG und IgA Sekretion bewirkt. Der Stimulus auf naive B-Zellen fällt ohne BCR Signal weg und somit auch die IgM lastige Immunantwort [122]. Lösliches CD40L kann das *in vivo* exprimierte CD40L ersetzen und induziert eine Proliferation [129]. Gleichzeitig führt es in Kombination mit IL-21 zu dem Bild einer T-Zell-abhängigen B-Zellantwort mit Differenzierung von sowohl Naiven, als auch GB und MZ-ähnlichen in ISCs [133]. Das Ergebnis war somit eine breite Aktivierung mit hauptsächlich Isotypgewechselten PB und ISCs. Der Ansatz aus SAC, PWM und CpG bewirkt durch SAC zusätzlich zu CpG eine T-Zell-unabhängige Aktivierung über den BCR, wodurch neben den GB auch naive B-Zellen über TLR9 aktiviert werden [118, 122].

Die doppelte T-Zell-unabhängige Stimulation amplifiziert sich gegenseitig [17, 117] und führt insbesondere zu einer IgM lastigen Immunantwort über die primäre Aktivierung von Naiven wie auch MZ-ähnlichen B-Zellen [133]. PWM induziert zusätzlich eine T-Zell-abhängige B-Zell Stimulation, die zur Differenzierung in ISCs und zum Isotypenwechsel führt [120]. Somit entstanden durch den S/P/C Ansatz Isotypgewechselte PB und ISCs durch PWM bei zusätzlich starker IgM Sekretion durch die T-Zell-unabhängige Aktivierung von Naiven und MZ-ähnlichen.

Beide Ansätze initiierten somit in gesunden Spendern eine T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung, die stärkere IgM lastige Antwort der S/P/C Stimulation ließ sich durch die doppelte T-Zell-unabhängige Stimulation durch den potenten Stimulator SAC erklären.

Ein zusätzlicher, aber nicht unerheblicher Effekt auf die *in vitro* Stimulation geht vermutlich vom FCS aus. Initiale Versuche mit humanem AB-Serum zeigten keine Ig-Synthese. Ähnliche Beobachtungen machten Small et al. und Fauci et al. die einen stimulierenden Effekt von FCS in unstimulierten Überständen bzw. bei PWM Stimulation beschrieben [120, 145].

#### **4.2.1 B-Zellfunktion bei unbehandelten und pre-HSZT Patienten**

Bei therapie-naiven, wie auch zytostatisch therapierten MM Patienten sind funktionale Einschränkungen bei *in vitro* Stimulationen festgestellt worden, die zu einer verminderten Ig-Synthese und damit einer eingeschränkten Immunfunktion beitragen [172]. Die vorliegende Untersuchung der B-Zellfunktion bei neudiagnostizierten unbehandelten (ND) und therapierten MM Patienten in Remission (pre-HSZT) mittels *in vitro* Stimulation mit S/P/C und C/I/C diente dazu diese eingeschränkte Funktion genauer zu charakterisieren und insbesondere zwischen intrinsischen und extrinsischen B-Zell-Defekten zu differenzieren.

S/P/C bewirkte eine effektive CD19+ Proliferation sowie eine Differenzierung in PB, wobei diese vermehrt IgM exprimierten (Abbildung 8, Abbildung 10). Die Differenzierung in ISCs war hingegen reduziert, belief sich aber wie bei Gesunden ebenfalls zum größten Teil auf IgM ISCs (Abbildung 13). Von den im S/P/C Ansatz

verwendeten Stimulantien wurde in vorherigen Studien das T-Zell-abhängige Stimulans PWM zur Aktivierung von PBMCs unbehandelter und therapierter MM Patienten angewandt. Dies bewirkte bei unbehandelten Patienten eine effektive Proliferation, nicht aber bei therapierten [143, 144]. Eine reduzierte Ig-Synthese lag sowohl bei unbehandelten MM Patienten vor, als auch bei therapierten Patienten, die nachweislich in Remission waren [144, 171]. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf die vorliegenden Ergebnisse ziehen. In dieser Arbeit wurde im S/P/C Ansatz, zusätzlich zu dem T-Zell-abhängigen Stimulans PWM, mit den T-Zell-unabhängigen Stimulantien SAC und CpG stimuliert. Da SAC bekanntlich eine B-Zell-Proliferation auslöst [118] und es im Unterschied zu vorherigen Studien sowohl bei ND als auch bei therapierten Patienten zur Proliferation kam, schien diese insbesondere pre-HSZT aus der T-Zell-unabhängigen Stimulation mit SAC zu resultieren. Ebenso ließ sich die Differenzierung in IgM ISCs, die signifikant stärker ausfiel als nach C/I/C, auf eine kombinierte Wirkung der T-Zell-unabhängigen Stimulantien SAC und CpG zurückführen [119]. *In vivo* deuten verminderte IgM Antikörper bei ND (Tabelle 8) und eine erhöhte Infektanfälligkeit unbehandelter und therapierter MM Patienten für verkapselte Bakterien wie *Streptokokkus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* [74, 75], auf eine gestörte T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung hin. Es ist also davon auszugehen, dass die verwendete Kombination in S/P/C zur Wiederherstellung der T-Zell-unabhängigen B-Zellfunktion führt. In Anbetracht der geringen Patientenzahl insbesondere bei ND (n=5) sind diese Aussagen als explorativ zu betrachten und sollten in größeren und standardisierten Kohorten überprüft werden.

Für den Klassenwechsel und die Differenzierung in ISCs ist eine T-Zellinteraktion notwendig [15, 118]. Die überproportional gesteigerten IgM PB bei verhältnismäßig geringer IgM ISC Zahl und die verminderten KW PB und ISCs insbesondere pre-HSZT zeugen, trotz gewissem Restansprechen von ND Patienten auf PWM, von einer Störung der T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung. Pilarski et al. beschrieben ebenfalls vermehrte IgM exprimierende Zellen und eine verminderte Ig Sekretion bei therapie-naiven MM Patienten, was sie auf einen Differenzierungsstop zwischen reifer-naiver B-Zelle und Plasmazelle zurückführten [173]. Als Ursache wurde der Mangel bzw. eine Unterdrückung der CD4+ Zellen durch die MM Zellen diskutiert [174].

Die erfolgreiche Wiederherstellung der T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung über den C/I/C Ansatz liefert dazu neue Hinweise. Bei einem Mangel der CD4+ Zellen kommt es zu einer geringeren Kostimulation mit CD40L und IL-21, wodurch, wie auch nach S/P/C Stimulation, die Differenzierung in kurzlebige Plasmazellen und die Keimzentrumsformation mit Generierung von isotypgewechselten GB und Plasmablasten und -zellen reduziert wäre. Beim MM ist beschrieben, dass die CD4+ T-Zellen im Verhältnis zu CD8+ Zellen reduziert sind [47]. Die MM Therapien bewirken ebenfalls eine Reduktion der T-Zellen, insbesondere der CD4+ T-Zellen [78]. Außerdem sind funktionale Alterationen, wie die Runterregulierung von Membran- und Signaltransduktionsproteinen in CD4+ Zellen beim MM beschrieben [175]. Unter der Stimulation mit C/I/C, kam es zu einer vollständigen Immunantwort mit erfolgtem Klassenwechsel und ISC Generierung. Die Aufhebung der funktionalen Defizienz durch CD40L und IL-21 spricht, basierend auf der *in vivo* Funktion dieser kostimulatorischen Moleküle, für eine gestörte B-T-Zellinteraktion als Ursache. Es verfestigt die Behauptung, dass es sich bei der B-Zellfunktionsstörung um eine Defizienz extrinsischer T-Zell-bezogener-Faktoren handelt.

Broder et al. wiesen jedoch eine effektive Ig-Synthese auf PWM bei Kokultivierung der MM T-Zellen und Lymphozyten von Gesunden nach [172]. Carter et al. stellten zudem keine Besserung der Ig-Synthese unter Zugabe von gesunden T-Zellen zu MM PBMCs fest und gingen somit von einem intrinsischen B-Zelldefekt aus [144]. Peest et al. machten die gleiche Beobachtung, aber führten diese nicht auf einen funktionalen B-Zell-Defekt sondern wie Broder et al. auf eine gestörte Helferaktivität bzw. einen suppressiven Effekt der Makrophagen zurück [171]. Denn durch das Herausfiltern von Makrophagen, konnte eine verbesserte Ig-Sekretion bewirkt werden [172]. Eine andere Erklärung ist somit eine gestörte Makrophagen Funktion. Makrophagen sind essentiell für eine Mitogen getriggerte T-Zell-abhängige Immunantwort [176]. Zu hohe Makrophagen Konzentrationen können suppressive Effekte haben, während zu wenige keine ausreichende Helferfunktion ausüben können [177]. Durch eine verminderte Makrophagenfunktion wird die B-Zellaktivierung demnach gehemmt oder weniger initiiert. Einige Makrophagen exprimieren CD40 auf ihrer Oberfläche, dessen Bindung führt unter anderem zu

potenterer Antigenpräsentation, Hochregulierung der MHC II Moleküle und kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 selbst [178]. Die Wiederherstellung der B-Zellfunktion durch den Stimulationsansatz mit CD40L, IL-21 und CpG könnte dementsprechend über eine Makrophagenaktivierung über CD40L-CD40 Interaktion wirken. Zusätzlich ist ein vermindertes T-Zell-Priming durch dendritische Zellen beschrieben [179]. Ratta et al. stellten bei MM Patienten eine verringerte CD40 Expression auf dendritischen Zellen des peripheren Blutes fest, induziert durch eine IL-6 Ausschüttung aufgrund des MMs [180]. Folglich, schlagen wir vor, dass die gestörte B-Zell-Differenzierung bei MM Patienten auf einer verminderten CD40 Expression auf Antigenpräsentierenden Zellen und einem daher fehlenden Priming der CD4+ und B-Zellen basiert. Zusätzlich kann eine direkte Unterdrückung der CD4+ Zellfunktion [181] bzw. ein CD4+ T-Zell-Mangel nach zytostatischen Therapien [78] eine gestörte B-T-Zellinteraktion erklären.

Basierend darauf, dass der C//C Ansatz bei unbehandelten ND Patienten zu einer vermehrten Differenzierung in KW ISCs führte, wurde eine Immunfixation der Überstände nach siebentägiger Stimulation von vier ND und einem pre-HSZT Patienten durchgeführt. Ziel war es, festzustellen, ob die Stimulationsansätze zu einer monoklonalen Proliferation der MM Zellen führen. Da CD40 auch auf MM Zellen exprimiert ist [182] und beschrieben ist, dass IL-21 das MM induziert [183] sollte insbesondere untersucht werden, ob die Stimulation mit CD40L und IL-21 einen proliferativen Effekt auf die MM Zellen hat. Dazu wurde das M-Protein nach beiden Stimulationen verglichen. In der pre-HSZT Probe, bei der auch die Immunglobuline im Serum reduziert waren, wurde nach keiner der beiden Stimulationen ein M-Protein detektiert. Bei den ND Überständen wurde nach beiden Stimulationen entsprechend der Erkrankung eine monoklonale Präzipitation festgestellt, die sich in der Ausprägung aber nicht zwischen den Stimulationen unterschied. Daraus wurde geschlossen, dass eine vermehrte Induktion der MM Plasmazellen durch den C//C Ansatz unwahrscheinlich ist. Auf Grund der Übertragung der Methodik von Urin auf Zellkulturüberstände, konnten die absoluten Zahlen nicht bewertet werden. Des Weiteren ließen sich nur eingeschränkt Rückschlüsse auf den Effekt *in vivo* ziehen, da weitere Funktionen dieser Moleküle vorkommen. Beschrieben sind beispielsweise

eine proangiogenetische Wirkung von CD40L auf das MM [184] und gleichzeitig eine antineoplastische Aktivität der CD40L-CD40 Interaktion [185].

In der Zusammenschau wurde deutlich, dass beide Stimulationsansätze zu einer stärkeren Proliferation bei Patienten führten als bei Gesunden. Der Ausgleich der *ex vivo* festgestellten Defizite der CD19+ Zellen und PB (Abbildung 8, Abbildung 11) deutete darauf hin, dass sowohl die *in vivo* Immunsuppression durch das MM sowie durch die Standardtherapie durch *in vitro* Stimulationen aufgehoben werden konnte. Die unterschiedliche Umverteilung der Subpopulationen lieferte dazu weitere Details. Der S/P/C Ansatz konnte die T-Zell-unabhängige B-Zellfunktion bei den Patienten rekonstituieren, bei einer eingeschränkten T-Zell-abhängigen Differenzierung in PBs und ISCs. Die Wiederherstellung der T-Zell-abhängigen Funktion durch die auf CD4+ Zellen exprimierte Kostimulatoren CD40L und IL-21, ließen zusammen mit früheren Studien, auf eine defekte B-Zell-Differenzierung aufgrund von fehlender extrinsischer Unterstützung von Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen schließen.

#### **4.2.2 B-Zellfunktion nach auto-HSCT**

Während das angeborene Immunsystem innerhalb von Wochen rekonstituiert, benötigt das adaptive Immunsystem Monate bis Jahre und ist damit verantwortlich für die andauernde Infektanfälligkeit nach HSCT [62, 93]. Bei der Untersuchung der B-Zellfunktion wurden in der Vergangenheit eingeschränkte Immunantworten auf *in vitro* Stimulationen nach auto-HSCT festgestellt und somit neben dem quantitativen B-Zell-Defizit auch eine gestörte intrinsische B-Zellfunktion vermutet [146]. Die in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsansätze, die bei anderen B-Zell-Dysfunktionen eine effektive Immunantwort ausgelöst haben, kamen bisher noch nicht zum Einsatz. Ziel war es, wie bei ND und pre-HSCT einzugrenzen, ob es sich bei dem funktionalen B-Zell-Defekt nach auto-HSCT um intrinsische oder extrinsische Defizienzen handelt.

Eine fehlende CD19+ Proliferation und Differenzierung in PB und ISCs aller Ig-Klassen durch den S/P/C Stimulationsansatz, wiesen auf ein Ausbleiben sowohl der T-Zell-abhängigen als auch T-Zell-unabhängigen B-Zellaktivierung im ersten Monat post HSCT hin. Die *in vitro* Funktion von B-Zellen nach autologer Knochenmarks-

bzw. hämatopoetischer Stammzelltransplantation (SZT) wurde zuvor mittels SAC Stimulus, sowie einer Kombination aus SAC und PWM getestet. Kiesel et al. schauten sich Patienten zwischen 1-34 Monate nach SZT an, Small et al. beobachteten die Unterschiede in drei Monatsabständen. Beide Gruppen wiesen ebenfalls eine eingeschränkte Proliferation der B-Zellen innerhalb der ersten drei Monate und in einzelnen Fällen auch länger nach SZT nach. Als zugrundeliegende Ursache wurden auch hier, zum einen ein T-Zell-Mangel diskutiert, zum anderen ein intrinsischer B-Zell-Defekt [145, 146].

Das fehlende Ansprechen auf SAC wie es schon mehrfach beobachtet wurde [145, 146, 186], deutete auf ein Ausbleiben der T-Zell-unabhängigen B-Zellfunktion hin. In dieser Arbeit zeigte sich dies neben der fehlenden Proliferation der CD19+ Zellen darin, dass es nicht zum Anstieg der IgM PB/ISC kam. Gleichzeitig blieb auch ein Rückgang des Anteils der MZ-ähnlichen Zellen bei der S/P/C Stimulation post-HSZT aus. Als einer der Hauptspieler in der T-Zell-unabhängigen B-Zellantwort [11, 38] könnte eine fehlende Differenzierung der MZ-ähnlichen in PB den geringen IgM PB/ISCs zugrunde liegen. Der Grund dafür könnte sein, dass repetitive Epitope, die bei der T-Zell-unabhängigen Aktivierung eine Quervernetzung der BCRs bewirken, nur reife B-Zellen aktivieren, bei unreifen führen sie zu Anergie. Dies beruht auf der negativen Selektion im Knochenmark, da dort die Quervernetzungen auf Autoreaktivität hindeuten. Entsprechend können Kleinkinder keine vollständige Immunantwort gegen Polysaccharidantigene ausbilden. Da sich die Zellen nach HSZT ontogenetisch neu entwickeln, könnte dies ebenfalls die fehlende Antwort der post-HSCT Patienten auf SAC erklären [187]. Eine alternative Erklärung liefert eine Studie von Puga et al., die zeigen konnte, dass neutrophile Granulozyten um die MZ Region der Milz, MZ B-Zellen über Zytokine aktivieren [188]. Der Mangel an neutrophilen Granulozyten nach HSZT könnte also eine verminderte Aktivierung der MZ Zellen in der frühen Phase post-HSZT erklären.

Zu den aktivierenden Zytokinen der Neutrophilen gehört unter anderem IL-21. Zudem wurde die Relevanz der CD40-CD40L Interaktion von Weill et al. auch bei der T-Zell-unabhängigen Aktivierung von MZ-ähnlichen diskutiert [13]. Eine Reduktion der MZ-ähnlichen Subpopulationen auf die C/I/C Stimulation hin ließ eine Aktivierung durch

C/I/C im Gegensatz zu S/P/C vermuten. Dafür sprach auch eine IgM PB und IgM ISC Generierung pro vorhandener B-Zellen auf C/I/C, die dem Niveau von Gesunden entsprach. Da diese Stimulation aber hauptsächlich eine T-Zell-unabhängige Aktivierung der GB bewirkt, sollte eine kombinierte Stimulation mit SAC durchgeführt werden, um die Wiederherstellung der T-Zell-unabhängigen B-Zellfunktion abschließend zu beurteilen.

Bei Patienten nach HSZT kommt es zudem zu einer erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber verkapselten Bakterien [78]. Die stark eingeschränkte Immunantwort auf T-Zell-unabhängige Antigene durch die geringe Anzahl und ein fehlendes Ansprechen der MZ-ähnlichen Zellen post-HSZT lässt sich gut mit der hohen Anfälligkeit für Infektionen mit verkapselten Bakterien vereinbaren.

Im Gegensatz zur S/P/C Stimulation bewirkte die C/I/C Stimulation post-HSZT eine sehr ausgeprägte Proliferation und Differenzierung in PB und ISCs. Die Aktivierung der vorhandenen B-Zellen, mit extrinsischen Kostimulatoren, machte einen intrinsischen B-Zell-Defekt eher unwahrscheinlich. Wie schon in Kapitel 5.2.1 diskutiert, substituiert der C/I/C Ansatz CD40L und IL-21, die *in vivo* primär auf aktivierten CD4+ T-Zellen exprimiert werden und eine wichtige Rolle in der T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung einnehmen. Durch die B-T-Zellinteraktion in der Keimzentrumsreaktion sind IL-21 und CD40L essentiell, um den Isotypenwechsel und die Differenzierung der naiven B-Zellen in GB und PB zu initiieren [150]. Die Wiederherstellung der T-Zell-abhängigen B-Zellfunktion durch diesen Ansatz würde also einen ursächlichen CD4+ T-Zell-Mangel untermauern oder auf eine veränderte Expression von kostimulatorischen Signalen hinweisen.

Nach auto-HSZT sind sowohl reduzierte CD4+ T-Zellen [107] wie auch ein Mangel an IL-21 [189] beschrieben. Verschiedene Gruppen konnten außerdem nachweisen, dass die CD4+ Zellen ein geringeres Repertoire und ein verändertes Expressionsprofil aufweisen, CD40L ist dabei nicht untersucht [107, 108]. Es ist aber bekannt, dass die CD4+ T-Zellen in Nabelschnurblut nach Aktivierung kein CD40L exprimieren [190]. Da auch die Rekonstitution nach HSZT der Ontogenese folgt, könnte eine verminderte CD40L Expression nach Aktivierung vorliegen und zu

verminderter T-Zell Hilfe führen. Dies sollte in nachfolgenden Arbeiten überprüft werden. Für eine gestörte B-T-Zellinteraktion spricht zudem, die reduzierte ISC Generierung, die die Patienten nach HSZT mit anderen Immundefizienzen mit gestörter B-Tfh-Zell-Interaktion, wie CVID oder ICOS Defizienz, verbindet. Bei diesen kommt es ebenso zu Hypogammaglobulinämie, einer verminderten Keimzentrumsformation und einer eingeschränkten serologischen Antwort [150].

Frühere Studien nach HSZT konnten zeigen, dass CD4+ T-Zellen von Patienten bei Kokultivierung mit gesunden PBMCs keine Ig-Synthese bewirken konnten. Gleichzeitig konnten allerdings auch gesunde CD4+ Zellen die Ig-Synthese von Patienten PBMCs nicht wiederherstellen, weswegen sehr wahrscheinlich neben der Störung der CD4+ T-Zellen weitere Faktoren eine Rolle in der gestörten B-Zellaktivierung spielen [191]. Ähnlich wie bei unbehandelten MM Patienten wurde eine suppressive Aktivität der Monozyten diskutiert [192]. Zwar ließen Kokultivierungen mit Monozyten keinen Rückschluss auf ihre Beteiligung in der Unterdrückung der Immunantwort zu [193], allerdings könnte wie bei unbehandelten MM Patienten vielmehr eine Zytokin vermittelte Suppression der Antigenpräsentierenden Zellen eine Rolle spielen, auf die, die Moleküle CD40L und IL-21 regulierende Effekte zeigen.

Eine weitere Erklärung leitet sich daraus ab, dass Weißenberg et al. hyporesponsive B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen durch Zugabe von CD40L (+IL-21) zu CpG reaktivieren und eine Zunahme der Proliferation beobachten konnten. Grund war ein substantiell besseres BCR-Signaling durch die Veränderung von Phosphorylierungen [194]. Dies wirft die Frage auf, ob auch bei Patienten, die eine Hdx und HSZT durchlaufen haben, eine veränderte Phosphorylierung des BCRs aufweisen, welche sich durch CD40L und/oder IL-21 regulieren lässt. Dabei ist zu bedenken, dass ein Teil der stimulierten Zellen reinfundierte reife Zellen aus dem Transplantat sind. Um den Effekt von C/I/C auf das rein rekonstituierte B-Zell-Kompartiment zu testen sollten die Versuche ca. 3 Monate nach HSZT durchgeführt werden.

Es wurde beschrieben, dass das Immunsystem in den ersten Wochen hauptsächlich aus den reifen transplantierten Zellen besteht und rekonstituiert [20, 97]. Da die

Absammlung der Stammzellen bei MM Patientin kurz vor der Hdx erfolgt und somit zu erwarten wäre, dass die Zellen denen der pre-HSZT entnommenen Proben entsprechen, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Funktion post-HSZT und der Funktion pre-HSZT erstellt. Ziel war es herauszufinden, ob die Patienten, die post-HSZT eine geminderte Immunantwort ausbildeten auch schon pre-HSZT zu identifizieren waren. Dabei ergab sich kein eindeutiger Zusammenhang. Ebenfalls unterschied sich die Verteilung der B-Zell-Phänotypen pre- und post-HSZT, so dass sich pre-HSZT keine Rückschlüsse auf die B-Zell-Immunität post-HSZT schließen ließen. Folglich scheint auch früh nach HSZT ein signifikanter Anteil der Immunzellen aus dem rekonstituierten Repertoire zu stammen bzw. die Funktion durch das Zytokinmilieu beeinflusst zu sein.

Insgesamt zeigte sich nach HSZT die stärkste Funktionseinschränkung mit eingeschränkter T-Zell-abhängiger und T-Zell-unabhängiger B-Zellaktivierung. Im Gegensatz zu ND und pre-HSZT Patienten ließ sich die T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung durch S/P/C nicht rekonstituieren. Dies ging Hand in Hand mit den post-HSZT am stärksten reduzierten MZ-ähnlichen Zellen. Die gestörte T-Zell-abhängige Funktion ließ sich auch bei diesen Patienten durch C/I/C wiederherstellen, wobei das quantitative Defizit an CD19+ Zellen und PB *ex vivo* nur in einzelnen Fällen ausgeglichen werden konnte (Abbildung 8, Abbildung 11). Daraus ergaben sich wichtige Hinweise für eine extrinsische Ursache der gestörten B-Zellfunktion. Neben dem bekannten CD4+ T-Zell-Mangel und veränderter Expression von Oberflächenmarkern nach HSZT wurden insbesondere die Suppression von Antigenpräsentierenden Zellen und durch veränderte Phosphorylierung hyporesponsive B-Zellen diskutiert.

#### **4.2.3 CD19+, CD4+ und MZ-ähnliche B-Zellen als Prädiktoren für die B-Zellfunktion post-HSZT**

Da post-HSZT die Varianz der B-Zellfunktion sehr hoch war, stellte sich die Frage, was Patienten mit einer starken Immunantwort von denen mit einer defizitären unterscheidet. Zu diesem Zweck wurden Zusammenhänge zwischen der B-Zellfunktion und der *ex vivo* gemessenen Zusammensetzung des B-Zell-Kompartimentes der einzelnen Patienten untersucht (Tabelle 12). Genauer wurde die

Funktion mit den Gesamten CD19+ Zellen, den Naiven, GB, MZ-ähnlichen und zusätzlich CD4+ T-Zellen korreliert.

Durch beide Stimulationsassays wurden GB und naive B-Zellen aktiviert und getriggert sich in PB bzw. ISCs zu differenzieren [17, 122, 123, 137]. Daraus resultierte die Annahme, dass die Anzahl der Naiven und GB in direktem Zusammenhang zur Funktion stehen. Zudem zeigte sich nur post-HSZT ein verminderter Anteil der gesamt-naiven B-Zellen (Abbildung 7), wodurch ein Zusammenhang mit dem fehlenden Ansprechen auf die S/P/C Stimulation vermutet wurde. Um dies zu prüfen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Diese konnte keine oder nur schwache Zusammenhänge der Anzahl an gesamt-naiven B-Zellen *ex vivo* mit dem Stimulationsansprechen sowohl auf S/P/C wie auch C/I/C feststellen. Die GB zeigten einen sehr heterogenen Einfluss auf die Funktion. Während sie bei der C/I/C Stimulation insbesondere einen Einfluss auf die PB Generierung hatten, war bei der S/P/C Stimulation eher ein Einfluss auf die Proliferation der CD19+ Zellen zu beobachten. Obwohl beide Stimulationsansätze zur Bestimmung von GB mittels B-Zell ELISpot entwickelt wurden [17, 123, 124], zeigte sich jedoch in beiden Fällen nur ein schwacher Zusammenhang zwischen den GB Zahlen und den ISCs. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den vielen funktionsbeeinflussenden Faktoren, die Naiven und die GB bei Patienten nach HSZT nur einen geringen bzw. keinen signifikanten Einfluss darauf hatten ob eine Stimulation eine starke oder schwache Immunreaktion anhand unserer Funktionsparameter auslöste.

Die Gesamtzahl der B-Zellen bildet die Ausgangslage für eine B-Zell-Stimulation und ist sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur beschrieben post-HSZT massiv reduziert (Abbildung 5) [78, 102]. Die Korrelationsanalyse der CD19+ Zellen mit verschiedenen Funktionsparametern zeigte für beide Stimulationsansätze (C/I/C > S/P/C) einen moderaten bis starken Zusammenhang mit einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . Im Gegensatz zu den Einzelanalysen der GB und Naiven umfasst die CD19+ Population alle Subpopulationen, die durch die Stimulation differenzieren und stellt somit eine relevante Voraussetzung für die humorale Immunantwort dar. Dies

entspricht der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen bei verminderten CD19+ Zellen, die Schütt et al. beschrieben haben [78].

MZ-ähnliche B-Zellen spielen eine essentielle Rolle in der Immunabwehr gegen T-Zell-unabhängige Antigene, wie verkapselte Bakterien und das Stimulans SAC. Sie sind nach auto-HSZT fast vollständig depletiert (Abbildung 6), wie es zuvor auch nach allogener HSZT beschrieben wurde [166, 168]. Aufgrund der gestörten Immunantwort auf verkapselte Bakterien nach HSZT und einer eingeschränkten Reaktion auf die S/P/C Stimulation, wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl der MZ-ähnlichen Zellen *ex vivo* und der Immunreaktion nach Stimulation untersucht. Dabei zeigte sich ein starker Einfluss ( $r: 0,69-0,74$ ) der MZ-ähnlichen auf die S/P/C Stimulation mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ . Bei der C/I/C Stimulation war lediglich eine schwache bis moderate Korrelation festzustellen. Somit konnte erstmalig *in vitro* gezeigt werden, dass die Funktion auf verkapselte Bakterien mit der Anzahl der MZ-ähnlichen Zellen korreliert. Allerdings ist die Kausalität nicht eindeutig, da weitere Stimulantien im S/P/C Ansatz eine Rolle spielen. Das klinisch ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Anzahl an MZ-ähnlichen Zellen und einer erhöhten Infektanfälligkeit für verkapselte Bakterien besteht wurde bereits von Kruetzmann et al. für Patienten mit Asplenie und COVID beschrieben [12]. Neben dem quantitativen MZ-ähnlichen Zell-Mangel kann eine eingeschränkte Funktion nicht ausgeschlossen werden. Dafür spricht, die diskutierte fehlende Differenzierung der MZ-ähnlichen Zellen post-HSZT.

Auf Grund des Ansprechens der C/I/C Stimulation post-HSZT zusammen mit der Diskussion von niedrigen CD4+ T-Zellen post-HSZT als mögliche Ursache für die eingeschränkte B-Zellfunktion [145], wurden zusätzlich die CD4+ Zellen im Zusammenhang zur B-Zellfunktion untersucht. Die CD4+ Zellen wurden *ex vivo* mittels Durchflusszytometrie im Vollblut in Zellen/ $\mu$ l gemessen. Im Spearman Korrelationskoeffizienten zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der S/P/C Stimulation und der Anzahl der CD4+ Zellen, aber ein moderater bis starker Zusammenhang ( $r=0,67-0,71$ ) zwischen der CD4+ Population und dem Ansprechen auf die C/I/C Stimulation. Diese Korrelation belegt die Wiederherstellung der T-Zell-abhängigen Aktivierung durch die C/I/C Stimulation.

Anstelle eines linearen Zusammenhangs, wurden insbesondere in Bezug auf die PB Differenzierung zwei Schwellenwerte (10 Zellen/ $\mu$ l und 30 Zellen/ $\mu$ l) im sehr niedrigen CD4+ Zellzahlbereich deutlich, die mit einer Funktionsverbesserung einhergingen (Abbildung 15). Cao et al. stellten fest, dass die Stimulation mit CD40L, IL-21 und CpG nicht bei isolierten B-Zellen, sondern nur in PBMCs funktionierte und somit andere Zellen im Aktivierungsprozess beteiligt sind [123]. Die Korrelation der Funktion des C/I/C Ansatzes mit der Anzahl der CD4+ Zellen, zeigte, dass diese aktiv im Aktivierungsprozess beteiligt sind und deutete auf einen synergistischen Effekt der CD4+ T-Zellen und den *in vitro* Stimulantien hin. Während der genaue Mechanismus Gegenstand der Forschung bleibt, wird durch die Korrelation der CD4+ Zahlen mit einer effektiven Immunantwort auf C/I/C deutlich, dass der T-Zellabhängige Weg post-HSZT durch diese Stimulantien wiederhergestellt werden kann.

CD19+ Zahlen und MZ-ähnliche Zellzahlen pro PBMCs sowie CD4+ Zellzahlen stellen somit unabhängige Einflussfaktoren auf die B-Zellfunktion in der frühen Rekonstitutionsphase nach HSZT *in vitro* dar. Somit können sie als prädiktive Parameter herangezogen werden, um die B-Zellfunktion *ex vivo* ohne aufwendige Funktionsanalysen abzuschätzen. CD4+ Zellen für T-Zell-abhängige Stimulationen, MZ-ähnliche für T-Zell-unabhängige Stimulationen und CD19+ Zellen für die gesamte Funktion. Eine Multiple Regression deutete zusätzlich auf einen Einfluss der Anzahl der Tage nach HSZT auf die B-Zellfunktion hin. Aufgrund der geringen Patientenzahl ließen sich aber keine eindeutigen Aussagen über weitere Einflussfaktoren treffen, weshalb eine Studie mit mehr Patienten und einem ausgeweiteten Regressionsmodell zur Überprüfung nötig ist. Ob die Parameter (CD19+, CD4+, MZ-ähnliche) auch zur Abschätzung der *in vivo* Funktion der B-Zellen heranzuziehen sind, bleibt offen. Korrelationsanalysen zwischen Infekten und der *in vitro* getesteten B-Zellfunktion zeigten keinen Zusammenhang (Daten nicht gezeigt). Eine Ursache könnte die Vielzahl weiterer Einflussfaktoren *in vivo* auf die Infektanfälligkeit in dieser frühen Phase nach HSZT sein. Zu diesen gehören die Mukositis sowie Neutropenie [48], das Alter, Komorbiditäten, die erhöhte Keimbelastung im Krankenhaus und prophylaktische Antibiotika- und Virusstatikagabe. Allerdings sind Zusammenhänge zwischen MZ-ähnlichen Zellen

und Infektionen mit verkapselten Bakterien beschrieben. Zudem konnte einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD4+ und CD19+ Zahlen und opportunistischen Infektionen insbesondere innerhalb der ersten drei Monate nach Hdx gezeigt werden [12, 78, 195]. Um einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der *in vitro* und *in vivo* Funktion und dem prädiktiven Wert der CD19+, CD4+ und MZ-ähnlichen Zellen *in vivo* abschließend zu beurteilen, sollte die Studie auf eine größere Patientenkohorte ausgeweitet werden und zu einem späteren Zeitpunkt nach HSZT untersucht werden, wenn weniger beeinflussende Faktoren vorliegen.

Die gezeigten Ergebnisse schließen funktionale intrinsische B-Zell-Defekte, wie sie in der Vergangenheit vermutet wurden [20, 145, 146, 196] nicht aus, allerdings wurde hier gezeigt, dass quantitative Veränderungen der CD19+, MZ-ähnlichen und CD4+ Zellen einen signifikanten Einfluss auf die B-Zellfunktion haben. Die CD4+ und die MZ-ähnlichen B-Zellen sind die Populationen, die nach HSZT als letztes regenerieren und somit lange Zeit stark vermindert sind [105, 168]. Bei den CD4+ T-Zellen ist dies auf die eingeschränkte Thymusfunktion bei Erwachsenen zurückzuführen, da diese im Gegensatz zu den CD8+ T-Zellen größtenteils von der *de novo* Synthese abhängig sind [197]. An verschiedenen Ansätzen zur Verbesserung der Thymusfunktion sowie T- und B-Zellrekonstitution wird derzeit geforscht [198]. Ansätze, um die MZ-ähnliche B-Zell-Rekonstitution zu beschleunigen, sind bisher nicht bekannt. Ihnen kommt aber eine hohe Relevanz zu, da diese am längsten und schwersten nach HSZT supprimiert sind [167]. Mit dem Ziel dieses Immundefizit auszugleichen, werden Patienten post-HSZT gegen z.B. Pneumokokken geimpft. Um ein besseres Impfansprechen zu bewirken, wurde das T-Zell-unabhängige Polysaccharid mit Trägerproteinen gekoppelt, so dass eine T-Zell-abhängige Immunantwort ausgelöst wird, wodurch ein erfolgreicher Schutz geboten wird [199]. Um frühzeitig und gegen weitere T-Zell-unabhängige Antigene einen Schutz zu erreichen, sollten weitere Bemühungen unternommen werden, die MZ-ähnlichen Zellen zu regenerieren oder zu ersetzen, um die Morbidität und Mortalität der transplantierten Patienten zu senken.

### 4.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde das B-Zell-Kompartiment bei MM Patienten auf quantitative und funktionale Veränderungen untersucht. Ziel war es, die zugrundeliegenden Pathomechanismen der B-Zell-Immundefizienzen bei MM Patienten, insbesondere nach HSZT zu charakterisieren, Ursachen einzugrenzen und damit eine Grundlage zu schaffen, um die Infektanfälligkeit dieser Patienten zukünftig reduzieren zu können.

Sowohl bei unbehandelten MM Patienten als auch therapierten Patienten zeigten sich reduzierte B-Zellen, mit phänotypisch veränderten B-Zell-Kompartimenten und funktionalen B-Zelldefekten. Post-HSZT waren diese Defizite am stärksten ausgeprägt und es lag eine gestörte T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige B-Zellfunktion vor. In allen Patientengruppen führte eine *in vitro* Stimulation mit CD40L, IL-21 und CpG zur Wiederherstellung der T-Zell-abhängigen Funktion, weshalb auf eine extrinsische Störung der B-Zellfunktion geschlossen wurde. Post-HSZT konnte dies zudem durch die Korrelation der T-Zell-abhängigen Funktion mit der Zahl der CD4+ T-Zellen *ex vivo* belegt werden. Die *in vivo* Funktion der T-Zell-abhängigen Stimulantien CD40L und IL-21 weisen auf eine gestörte T-B Interaktion als zugrunde liegenden Defekt bei diesen Patienten hin. Die Daten geben somit neue Einblicke in den Pathomechanismus der Immundefekte von Patienten mit MM und unterstreichen die Bedeutung der CD4+ T-Zell Rekonstitution für die B-Zellfunktion nach Hdx und auto-HSZT.

Des Weiteren konnten Korrelationen zwischen der Anzahl von B-Zellen, GB und MZ-ähnlichen B-Zellen und der B-Zellfunktion post-HSZT festgestellt werden. Diese Zellpopulationen stellen somit potentielle Biomarker für die B-Zellfunktion und eine daraus resultierende Hypogammaglobulinämie dar. Zukünftige Forschung sollte sich daher neben der Aussagekraft dieser Marker *in vivo* für eine mögliche intravenöse Immunglobulintherapie vor allem mit der schnelleren Rekonstitution dieser Zelltypen auseinandersetzen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Ehrlich, P., *Croonian lecture: on immunity with special reference to cell life*. 1900, Proc. Royal Soc. Lond. p. 424–448.
2. Bennett, J.E.D., R.; Blaser, M.J., *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th ed. 2014, Philadelphia, PA: Elsevier Inc.
3. Chao, M.P., J. Seita, and I.L. Weissman, *Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008. **73**: p. 439-49.
4. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
5. Huston, D.P., *The biology of the immune system*. JAMA, 1997. **278**(22): p. 1804-14.
6. Glanville, J., W. Zhai, J. Berka, D. Telman, G. Huerta, G.R. Mehta, I. Ni, L. Mei, P.D. Sundar, G.M. Day, D. Cox, A. Rajpal, and J. Pons, *Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20216-21.
7. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
8. Wen, L., J. Brill-Dashoff, S.A. Shinton, M. Asano, R.R. Hardy, and K. Hayakawa, *Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 297-308.
9. Loder, F., B. Mutschler, R.J. Ray, C.J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M.C. Lamers, and R. Carsetti, *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 75-89.
10. Pereira, J.P., L.M. Kelly, and J.G. Cyster, *Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses*. Int Immunol, 2010. **22**(6): p. 413-9.
11. Weller, S., M.C. Braun, B.K. Tan, A. Rosenwald, C. Cordier, M.E. Conley, A. Plebani, D.S. Kumararatne, D. Bonnet, O. Tournilhac, G. Tchernia, B. Steiniger, L.M. Staudt, J.L. Casanova, C.A. Reynaud, and J.C. Weill, *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
12. Kruetzmann, S., M.M. Rosado, H. Weber, U. Germing, O. Tournilhac, H.H. Peter, R. Berner, A. Peters, T. Boehm, A. Plebani, I. Quinti, and R. Carsetti, *Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 939-45.
13. Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud, *Human marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 267-85.
14. Bagnara, D., M. Squillario, D. Kipling, T. Mora, A.M. Walczak, L. Da Silva, S. Weller, D.K. Dunn-Walters, J.C. Weill, and C.A. Reynaud, *A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans*. J Immunol, 2015. **195**(8): p. 3716-24.
15. Janeway, C.A., *How the immune system protects the host from infection*. Microbes Infect, 2001. **3**(13): p. 1167-71.

16. Kleiveland, C., *Peripheral Blood Mononuclear Cells.*, in *The Impact of Food Bioactives on Health*, K. Verhoeckx, Editor. 2015.
17. Crotty, S., R.D. Aubert, J. Glidewell, and R. Ahmed, *Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system.* J Immunol Methods, 2004. **286**(1-2): p. 111-22.
18. Morbach, H., E.M. Eichhorn, J.G. Liese, and H.J. Girschick, *Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood.* Clin Exp Immunol, 2010. **162**(2): p. 271-9.
19. Cuss, A.K., D.T. Avery, J.L. Cannons, L.J. Yu, K.E. Nichols, P.J. Shaw, and S.G. Tangye, *Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity.* J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1506-16.
20. Bemark, M., J. Holmqvist, J. Abrahamsson, and K. Mellgren, *Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes.* Clin Exp Immunol, 2012. **167**(1): p. 15-25.
21. Schwickert, T.A., G.D. Victora, D.R. Fooksman, A.O. Kamphorst, M.R. Mugnier, A.D. Gitlin, M.L. Dustin, and M.C. Nussenzweig, *A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center.* J Exp Med, 2011. **208**(6): p. 1243-52.
22. Kaji, T., A. Ishige, M. Hikida, J. Taka, A. Hijikata, M. Kubo, T. Nagashima, Y. Takahashi, T. Kurosaki, M. Okada, O. Ohara, K. Rajewsky, and T. Takemori, *Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory.* J Exp Med, 2012. **209**(11): p. 2079-97.
23. Victora, G.D., T.A. Schwickert, D.R. Fooksman, A.O. Kamphorst, M. Meyer-Hermann, M.L. Dustin, and M.C. Nussenzweig, *Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter.* Cell, 2010. **143**(4): p. 592-605.
24. Good-Jacobson, K.L. and D.M. Tarlinton, *Multiple routes to B-cell memory.* Int Immunol, 2012. **24**(7): p. 403-8.
25. Fahlquist Hagert, C. and S.E. Degn, *T follicular regulatory cells: Guardians of the germinal centre?* Scand J Immunol, 2020. **92**(4): p. e12942.
26. Gatto, D. and R. Brink, *The germinal center reaction.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(5): p. 898-907; quiz 908-9.
27. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system.* Nature, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
28. Anderson, S.M., A. Khalil, M. Uduman, U. Hershberg, Y. Louzoun, A.M. Haberman, S.H. Kleinstein, and M.J. Shlomchik, *Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells.* J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7314-25.
29. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.
30. De Silva, N.S. and U. Klein, *Dynamics of B cells in germinal centres.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 137-48.
31. Malisan, F., F. Brière, J.M. Bridon, N. Harindranath, F.C. Mills, E.E. Max, J. Banchereau, and H. Martinez-Valdez, *Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes.* J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 937-47.

32. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
33. Thomas, M.J., U. Klein, J. Lygeros, and M. Rodríguez Martínez, *A Probabilistic Model of the Germinal Center Reaction*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 689.
34. Weisel, F. and M. Shlomchik, *Memory B Cells of Mice and Humans*. Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 255-284.
35. Blink, E.J., A. Light, A. Kallies, S.L. Nutt, P.D. Hodgkin, and D.M. Tarlinton, *Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 545-54.
36. Tangye, S.G. and D.M. Tarlinton, *Memory B cells: effectors of long-lived immune responses*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2065-75.
37. Tangye, S.G., D.T. Avery, and P.D. Hodgkin, *A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 261-9.
38. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. Immunity, 2001. **14**(5): p. 617-29.
39. Balázs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney, *Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 341-52.
40. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *B-1 B cell development in the fetus and adult*. Immunity, 2012. **36**(1): p. 13-21.
41. Tete, S.M., M. Bijl, S.S. Sahota, and N.A. Bos, *Immune defects in the risk of infection and response to vaccination in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 257.
42. Kyle, R.A., M.A. Gertz, T.E. Witzig, J.A. Lust, M.Q. Lacy, A. Dispenzieri, R. Fonseca, S.V. Rajkumar, J.R. Offord, D.R. Larson, M.E. Plevak, T.M. Therneau, and P.R. Greipp, *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Mayo Clin Proc, 2003. **78**(1): p. 21-33.
43. Koch-Institut, R. *Krebs in Deutschland*. Available from: [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html).
44. Landgren, O., R.A. Kyle, R.M. Pfeiffer, J.A. Katzmann, N.E. Caporaso, R.B. Hayes, A. Dispenzieri, S. Kumar, R.J. Clark, D. Baris, R. Hoover, and S.V. Rajkumar, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5412-7.
45. Barwick, B.G., V.A. Gupta, P.M. Vertino, and L.H. Boise, *Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1121.
46. Augustson, B.M., G. Begum, J.A. Dunn, N.J. Barth, F. Davies, G. Morgan, J. Behrens, A. Smith, J.A. Child, and M.T. Drayson, *Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002--Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party*. J Clin Oncol, 2005. **23**(36): p. 9219-26.
47. Pratt, G., O. Goodyear, and P. Moss, *Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma*. Br J Haematol, 2007. **138**(5): p. 563-79.

48. Nucci, M. and E. Anaissie, *Infections in patients with multiple myeloma*. Semin Hematol, 2009. **46**(3): p. 277-88.
49. Bird, J., J. Behrens, J. Westin, I. Turesson, M. Drayson, R. Beetham, S. D'Sa, R. Soutar, A. Waage, N. Gulbrandsen, H. Gregersen, E. Low, U.K.M.F. Haemato-oncology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology, and G. Nordic Myeloma Study, *UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)*. Br J Haematol, 2009. **147**(1): p. 22-42.
50. Gerecke, C., S. Fuhrmann, S. Striffler, M. Schmidt-Hieber, H. Einsele, and S. Knop, *The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(27-28): p. 470-6.
51. Group, I.M.W., *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. Br J Haematol, 2003. **121**(5): p. 749-57.
52. Palumbo, A., H. Avet-Loiseau, S. Oliva, H.M. Lokhorst, H. Goldschmidt, L. Rosinol, P. Richardson, S. Caltagirone, J.J. Lahuerta, T. Facon, S. Brinchen, F. Gay, M. Attal, R. Passera, A. Spencer, M. Offidani, S. Kumar, P. Musto, S. Lonial, M.T. Petrucci, R.Z. Orlowski, E. Zamagni, G. Morgan, M.A. Dimopoulos, B.G. Durie, K.C. Anderson, P. Sonneveld, J. San Miguel, M. Cavo, S.V. Rajkumar, and P. Moreau, *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group*. J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2863-9.
53. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-54.
54. Bernhard Wörmann, C.D., Hermann Einsele, Hartmut Goldschmidt, Eberhard Gunsilius, Martin Kortüm, Nicolaus Kröger, Heinz Ludwig, Lars-Olof Mügge, Ralph Naumann, Ron Pritzkeleit, Christoph Röllig, Christof Scheid, Christian Taverna, Katja Weisel, Florian Weißinger. *Multipler Myelom*. Onkopedia Leitlinie 2018.
55. Nishimura, K.K., B. Barlogie, F. van Rhee, M. Zangari, B.A. Walker, A. Rosenthal, C. Schinke, S. Thanendrarajan, F.E. Davies, A. Hoering, and G.J. Morgan, *Long-term outcomes after autologous stem cell transplantation for multiple myeloma*. Blood Adv, 2020. **4**(2): p. 422-431.
56. Lehnert, N., N. Becker, A. Benner, M. Pritsch, M. Löprrich, E.K. Mai, J. Hillengass, H. Goldschmidt, and M.S. Raab, *Analysis of long-term survival in multiple myeloma after first-line autologous stem cell transplantation: impact of clinical risk factors and sustained response*. Cancer Med, 2017. **7**(2): p. 307-316.
57. Attal, M., J.L. Harousseau, A.M. Stoppa, J.J. Sotto, J.G. Fuzibet, J.F. Rossi, P. Casassus, H. Maisonneuve, T. Facon, N. Ifrah, C. Payen, and R. Bataille, *A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma*. Intergroupe Français du Myélome. N Engl J Med, 1996. **335**(2): p. 91-7.
58. Kumar, S., D. Dingli, A. Dispenzieri, M. Lacy, S.R. Hayman, F. Buadi, S. Rajkumar, M. Litzow, and M. Gertz, *Impact of additional cytoreduction following autologous SCT in multiple myeloma*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42**(4): p. 259-64.

59. Palumbo, A., F. Cavallo, F. Gay, F. Di Raimondo, D. Ben Yehuda, M.T. Petrucci, S. Pezzatti, T. Caravita, C. Cerrato, E. Ribakovsky, M. Genuardi, A. Cafro, M. Marcatti, L. Catalano, M. Offidani, A.M. Carella, E. Zamagni, F. Patriarca, P. Musto, A. Evangelista, G. Ciccone, P. Omedé, C. Crippa, P. Corradini, A. Nagler, M. Boccadoro, and M. Cavo, *Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(10): p. 895-905.
60. Einsele, H., M. Engelhardt, C. Tapprich, J. Müller, P. Liebisch, C. Langer, M. Kropff, L.O. Mügge, W. Jung, H.H. Wolf, B. Metzner, C. Hart, M. Gramatzki, B. Hertenstein, M. Pfreundschuh, W. Rösler, T. Fischer, G. Maschmeyer, L. Kanz, G. Hess, E. Jäger, M. Bentz, H.A. Dürk, H. Salwender, H. Hebart, C. Straka, and S. Knop, *Phase II study of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone as induction therapy in multiple myeloma: DSMM XI trial*. *Br J Haematol*, 2017. **179**(4): p. 586-597.
61. Awan, F., S.T. Kochuparambil, D.E. Falconer, A. Cumpston, S. Leadmon, K. Watkins, D. Deremer, A. Jillella, M. Craig, and M. Hamadani, *Comparable efficacy and lower cost of PBSC mobilization with intermediate-dose cyclophosphamide and G-CSF compared with plerixafor and G-CSF in patients with multiple myeloma treated with novel therapies*. *Bone Marrow Transplant*, 2013. **48**(10): p. 1279-84.
62. Storek, J., M. Geddes, F. Khan, B. Huard, C. Helg, Y. Chalandon, J. Passweg, and E. Roosnek, *Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans*. *Semin Immunopathol*, 2008. **30**(4): p. 425-37.
63. Wingard, J.R., J. Hsu, and J.W. Hiemenz, *Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology*. *Infect Dis Clin North Am*, 2010. **24**(2): p. 257-72.
64. Barlogie, B., S. Jagannath, K.R. Desikan, S. Mattox, D. Vesole, D. Siegel, G. Tricot, N. Munshi, A. Fassas, S. Singhal, J. Mehta, E. Anaissie, D. Dhodapkar, S. Naucke, J. Cromer, J. Sawyer, J. Epstein, D. Spoon, D. Ayers, B. Cheson, and J. Crowley, *Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma*. *Blood*, 1999. **93**(1): p. 55-65.
65. McCarthy, P.L., S.A. Holstein, M.T. Petrucci, P.G. Richardson, C. Hulin, P. Tosi, S. Brinchen, P. Musto, K.C. Anderson, D. Caillot, F. Gay, P. Moreau, G. Marit, S.H. Jung, Z. Yu, B. Winograd, R.D. Knight, A. Palumbo, and M. Attal, *Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(29): p. 3279-3289.
66. Brioli, A., M. Klaus, H. Sayer, S. Scholl, T. Ernst, I. Hilgendorf, A. Scherag, O. Yomade, K. Schilling, A. Hochhaus, L.O. Mügge, and M. von Lilienfeld-Toal, *The risk of infections in multiple myeloma before and after the advent of novel agents: a 12-year survey*. *Ann Hematol*, 2019. **98**(3): p. 713-722.
67. Hargreaves, R.M., J.R. Lea, H. Griffiths, J.A. Faux, J.M. Holt, C. Reid, C. Bunch, M. Lee, and H.M. Chapel, *Immunological factors and risk of infection in plateau phase myeloma*. *J Clin Pathol*, 1995. **48**(3): p. 260-6.
68. Blimark, C., E. Holmberg, U.H. Mellqvist, O. Landgren, M. Björkholm, M. Hultcrantz, C. Kjellander, I. Turesson, and S.Y. Kristinsson, *Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients*. *Haematologica*, 2014. **100**(1): p. 107-13.

69. Karlsson, J., B. Andréasson, N. Kondori, E. Erman, K. Riesbeck, H. Hogevik, and C. Wennerås, *Comparative study of immune status to infectious agents in elderly patients with multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, and monoclonal gammopathy of undetermined significance*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(6): p. 969-77.
70. Nucci, M. and E. Anaissie, *Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(8): p. 1211-25.
71. Bringhen, S., M.V. Mateos, S. Zweegman, A. Larocca, A.P. Falcone, A. Oriol, D. Rossi, M. Cavalli, P. Wijermans, R. Ria, M. Offidani, J.J. Lahuerta, A.M. Liberati, R. Mina, V. Callea, M. Schaafsma, C. Cerrato, R. Marasca, L. Franceschini, A. Evangelista, A.I. Teruel, B. van der Holt, V. Montefusco, G. Ciccone, M. Boccadoro, J. San Miguel, P. Sonneveld, and A. Palumbo, *Age and organ damage correlate with poor survival in myeloma patients: meta-analysis of 1435 individual patient data from 4 randomized trials*. Haematologica, 2013. **98**(6): p. 980-7.
72. Teh, B.W., S.J. Harrison, L.J. Worth, T. Spelman, K.A. Thursky, and M.A. Slavin, *Risks, severity and timing of infections in patients with multiple myeloma: a longitudinal cohort study in the era of immunomodulatory drug therapy*. Br J Haematol, 2015. **171**(1): p. 100-8.
73. Dumontet, C., C. Hulin, M.A. Dimopoulos, A. Belch, A. Dispenzieri, H. Ludwig, P. Rodon, J. Van Droogenbroeck, L. Qiu, M. Cavo, A. Van de Velde, J.J. Lahuerta, O. Allangba, J.H. Lee, E. Boyle, A. Perrot, P. Moreau, S. Manier, M. Attal, M. Roussel, M. Mohty, J.Y. Mary, A. Civet, B. Costa, A. Tinel, Y. Gaston-Mathé, and T. Facon, *A predictive model for risk of early grade  $\geq 3$  infection in patients with multiple myeloma not eligible for transplant: analysis of the FIRST trial*. Leukemia, 2018. **32**(6): p. 1404-1413.
74. King, K., *Septicaemia in patients with haematological malignant disease*. Med J Aust, 1980. **1**(12): p. 603-6.
75. Savage, D.G., J. Lindenbaum, and T.J. Garrett, *Biphasic pattern of bacterial infection in multiple myeloma*. Ann Intern Med, 1982. **96**(1): p. 47-50.
76. Pilarski, L.M., E.J. Andrews, M.J. Mant, and B.A. Ruether, *Humoral immune deficiency in multiple myeloma patients due to compromised B-cell function*. J Clin Immunol, 1986. **6**(6): p. 491-501.
77. Kumar, S.K., A. Dispenzieri, M.Q. Lacy, M.A. Gertz, F.K. Buadi, S. Pandey, P. Kapoor, D. Dingli, S.R. Hayman, N. Leung, J. Lust, A. McCurdy, S.J. Russell, S.R. Zeldenrust, R.A. Kyle, and S.V. Rajkumar, *Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients*. Leukemia, 2013. **28**(5): p. 1122-8.
78. Schütt, P., D. Brandhorst, W. Stellberg, M. Poser, P. Ebeling, S. Müller, U. Buttkeireit, B. Opalka, M. Lindemann, H. Grosse-Wilde, S. Seeber, T. Moritz, and M.R. Nowrousian, *Immune parameters in multiple myeloma patients: influence of treatment and correlation with opportunistic infections*. Leuk Lymphoma, 2006. **47**(8): p. 1570-82.
79. Teh, B.W., L.J. Worth, S.J. Harrison, K.A. Thursky, and M.A. Slavin, *Risks and burden of viral respiratory tract infections in patients with multiple myeloma in the era of immunomodulatory drugs and bortezomib: experience at an Australian Cancer Hospital*. Support Care Cancer, 2014. **23**(7): p. 1901-6.
80. Teh, B.W., J.C. Teng, K. Urbancic, A. Grigg, S.J. Harrison, L.J. Worth, M.A. Slavin, and K.A. Thursky, *Invasive fungal infections in patients with multiple*

- myeloma: a multi-center study in the era of novel myeloma therapies.* Haematologica, 2014. **100**(1): p. e28-31.
81. Palumbo, A., A. Chanan-Khan, K. Weisel, A.K. Nooka, T. Masszi, M. Beksac, I. Spicka, V. Hungria, M. Munder, M.V. Mateos, T.M. Mark, M. Qi, J. Schecter, H. Amin, X. Qin, W. Deraedt, T. Ahmadi, A. Spencer, P. Sonneveld, and C. Investigators, *Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma.* N Engl J Med, 2016. **375**(8): p. 754-66.
  82. Zen, M., M. Canova, C. Campana, S. Bettio, L. Nalotto, M. Rampudda, R. Ramonda, L. Iaccarino, and A. Doria, *The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system.* Autoimmun Rev, 2011. **10**(6): p. 305-10.
  83. Pellom, S.T., D.F. Dudimah, M.C. Thounaojam, T.J. Sayers, and A. Shanker, *Modulatory effects of bortezomib on host immune cell functions.* Immunotherapy, 2015. **7**(9): p. 1011-22.
  84. Kim, S.J., K. Kim, B.S. Kim, H.J. Lee, H. Kim, N.R. Lee, S.H. Nam, J.H. Kwon, H.J. Kim, S.K. Sohn, J.H. Won, J.H. Lee, C. Suh, S.S. Yoon, I. Kim, Y.R. Do, W.S. Lee, Y.D. Joo, H.J. Shin, and K.M.M.W. Party, *Bortezomib and the increased incidence of herpes zoster in patients with multiple myeloma.* Clin Lymphoma Myeloma, 2008. **8**(4): p. 237-40.
  85. Uy, G.L., S.D. Goyal, N.M. Fisher, A.Y. Oza, M.H. Tomasson, K. Stockerl-Goldstein, J.F. DiPersio, and R. Vij, *Bortezomib administered pre-auto-SCT and as maintenance therapy post transplant for multiple myeloma: a single institution phase II study.* Bone Marrow Transplant, 2008. **43**(10): p. 793-800.
  86. Chanan-Khan, A., P. Sonneveld, M.W. Schuster, E.A. Stadtmauer, T. Facon, J.L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, R. Neuwirth, K.C. Anderson, and P.G. Richardson, *Analysis of herpes zoster events among bortezomib-treated patients in the phase III APEX study.* J Clin Oncol, 2008. **26**(29): p. 4784-90.
  87. Ying, L., T. YinHui, Z. Yunliang, and H. Sun, *Lenalidomide and the risk of serious infection in patients with multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis.* Oncotarget, 2017. **8**(28): p. 46593-46600.
  88. Teo, S.K., *Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy.* AAPS J, 2005. **7**(1): p. E14-9.
  89. Hurd, E.R. and V.J. Giuliano, *The effect of cyclophosphamide on B and T lymphocytes in patients with connective tissue diseases.* Arthritis Rheum, 1975. **18**(1): p. 67-75.
  90. Skerget, M., B. Skopec, D. Zontar, and P. Cernelc, *Mobilization with cyclophosphamide reduces the number of lymphocyte subpopulations in the leukapheresis product and delays their reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma.* Radiol Oncol, 2016. **50**(4): p. 402-408.
  91. Attal, M., P.G. Richardson, S.V. Rajkumar, J. San-Miguel, M. Beksac, I. Spicka, X. Leleu, F. Schjesvold, P. Moreau, M.A. Dimopoulos, J.S. Huang, J. Minarik, M. Cavo, H.M. Prince, S. Macé, K.P. Corzo, F. Campana, S. Le-Guennec, F. Dubin, K.C. Anderson, and I.-M.M.s. group, *Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study.* Lancet, 2019. **394**(10214): p. 2096-2107.
  92. Reich, G., M.Y. Mapara, P. Reichardt, B. Dörken, and G. Maschmeyer, *Infectious complications after high-dose chemotherapy and autologous stem*

- cell transplantation: comparison between patients with lymphoma or multiple myeloma and patients with solid tumors.* Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(5): p. 525-9.
93. Mackall, C., T. Fry, R. Gress, K. Peggs, J. Storek, A. Toubert, C.f.I. Blood, R. Marrow Transplant, N.M.D. Program, E. Blood, G. Marrow Transplant, A.S.o. Blood, T. Marrow, C. Blood, G. Marrow Transplant, I.D.S.o. America, S.f.H.E.o. America, A.o.M. Microbiology, C. Infectious Diseases, C.f.D. Control, and Prevention, *Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery.* Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(8): p. 457-62.
  94. Marchesi, F., F. Pimpinelli, M.L. Dessanti, S. Gumenyuk, F. Palombi, F. Pisani, A. Romano, A. Spadea, M. Maschio, F. Ensoli, and A. Mengarelli, *Evaluation of risk of symptomatic cytomegalovirus reactivation in myeloma patients treated with tandem autologous stem cell transplantation and novel agents: a single-institution study.* Transpl Infect Dis, 2014. **16**(6): p. 1032-8.
  95. Inazawa, N., T. Hori, M. Nojima, M. Saito, K. Igarashi, M. Yamamoto, N. Shimizu, Y. Yoto, and H. Tsutsumi, *Virus reactivations after autologous hematopoietic stem cell transplantation detected by multiplex PCR assay.* J Med Virol, 2016. **89**(2): p. 358-362.
  96. Engelhard, D., C. Cordonnier, P.J. Shaw, T. Parkalli, C. Guenther, R. Martino, A.W. Dekker, H.G. Prentice, A. Gustavsson, W. Nurnberger, P. Ljungman, and I.D.W.P.o.t.E.B.M. Transplantation, *Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey.* Br J Haematol, 2002. **117**(2): p. 444-50.
  97. van Tol, M.J., E.J. Gerritsen, G.G. de Lange, A.M. van Leeuwen, C.M. Jol-van der Zijde, N.J. Oudeman-Gruber, E. de Vries, J. Radl, and J.M. Vossen, *The origin of IgG production and homogeneous IgG components after allogeneic bone marrow transplantation.* Blood, 1996. **87**(2): p. 818-26.
  98. Cohen, S. and T. Freeman, *Metabolic heterogeneity of human gamma-globulin.* Biochem J, 1960. **76**: p. 475-87.
  99. Gratama, J.W., A. Naipal, P. Oljans, F.E. Zwaan, L.F. Verdonck, T. de Witte, J.M. Vossen, R.L. Bolhuis, G.C. de Gast, and J. Jansen, *T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease.* Blood, 1984. **63**(6): p. 1416-23.
  100. Gerritsen, E.J., M.J. van Tol, A.C. Lankester, C.P. van der Weijden-Ragas, C.M. Jol-van der Zijde, N.J. Oudeman-Gruber, J. Radl, and J.M. Vossen, *Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation.* Blood, 1993. **82**(11): p. 3493-502.
  101. Porrata, L.F., M.R. Litzow, and S.N. Markovic, *Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation.* Mayo Clin Proc, 2001. **76**(4): p. 407-12.
  102. Gernert, M., H.P. Tony, E.C. Schwaneck, O. Gadeholt, and M. Schmalzing, *Autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis induces long-lasting changes in B cell homeostasis toward an anti-inflammatory B cell cytokine pattern.* Arthritis Res Ther, 2019. **21**(1): p. 106.
  103. D'Orsogna, L.J., 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, and M.A. French, *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients have defects of*

- both switched and igm memory B cells.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(7): p. 795-803.
104. Rueff, J., M. Medinger, D. Heim, J. Passweg, and M. Stern, *Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma.* Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(6): p. 896-9.
  105. Hakim, F.T., S.A. Memon, R. Cepeda, E.C. Jones, C.K. Chow, C. Kasten-Sportes, J. Odom, B.A. Vance, B.L. Christensen, C.L. Mackall, and R.E. Gress, *Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults.* J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 930-9.
  106. Tsukamoto, H., K. Nagafuji, T. Horiuchi, H. Mitoma, H. Niino, Y. Arinobu, Y. Inoue, K. To, T. Miyamoto, H. Iwasaki, T. Teshima, M. Harada, and K. Akashi, *Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells.* Rheumatology (Oxford), 2010. **50**(5): p. 944-52.
  107. Rufer, N., C. Helg, B. Chapuis, and E. Roosnek, *Human memory T cells: lessons from stem cell transplantation.* Trends Immunol, 2001. **22**(3): p. 136-41.
  108. Hakim, F.T., R. Cepeda, S. Kaimei, C.L. Mackall, N. McAtee, J. Zujewski, K. Cowan, and R.E. Gress, *Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells.* Blood, 1997. **90**(9): p. 3789-98.
  109. Dumont-Girard, F., E. Roux, R.A. van Lier, G. Hale, C. Helg, B. Chapuis, M. Starobinski, and E. Roosnek, *Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants.* Blood, 1998. **92**(11): p. 4464-71.
  110. Głowala-Kosińska, M., A. Chwieduk, A. Smagur, W. Fidyk, J. Najda, I. Mitrus, and S. Giebel, *Thymic Activity and T Cell Repertoire Recovery after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Preceded by Myeloablative Radiotherapy or Chemotherapy.* Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(5): p. 834-42.
  111. Malphettes, M., G. Carcelain, P. Saint-Mezard, V. Leblond, H.K. Altes, J.P. Marolleau, P. Debré, J.C. Brouet, J.P. Fermand, and B. Autran, *Evidence for naive T-cell repopulation despite thymus irradiation after autologous transplantation in adults with multiple myeloma: role of ex vivo CD34+ selection and age.* Blood, 2002. **101**(5): p. 1891-7.
  112. Douek, D.C., R.A. Vescio, M.R. Betts, J.M. Brenchley, B.J. Hill, L. Zhang, J.R. Berenson, R.H. Collins, and R.A. Koup, *Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution.* Lancet, 2000. **355**(9218): p. 1875-81.
  113. Mackall, C.L., D. Stein, T.A. Fleisher, M.R. Brown, F.T. Hakim, C.V. Bare, S.F. Leitman, E.J. Read, C.S. Carter, L.H. Wexler, and R.E. Gress, *Prolonged CD4 depletion after sequential autologous peripheral blood progenitor cell infusions in children and young adults.* Blood, 2000. **96**(2): p. 754-62.
  114. Porrata, L.F., M.A. Gertz, D.J. Inwards, M.R. Litzow, M.Q. Lacy, A. Tefferi, D.A. Gastineau, A. Dispenzieri, S.M. Ansell, I.N. Micallef, S.M. Geyer, and S.N. Markovic, *Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma.* Blood, 2001. **98**(3): p. 579-85.

115. Porrata, L.F. and S.N. Markovic, *Timely reconstitution of immune competence affects clinical outcome following autologous stem cell transplantation*. Clin Exp Med, 2004. **4**(2): p. 78-85.
116. Jimenez-Zepeda, V.H., D.E. Reece, S. Trudel, C. Chen, N. Franke, A. Winter, R. Tiedemann, and V. Kukreti, *Absolute lymphocyte count as predictor of overall survival for patients with multiple myeloma treated with single autologous stem cell transplant*. Leuk Lymphoma, 2015. **56**(9): p. 2668-73.
117. Bekeredjian-Ding, I., S. Foermer, C.J. Kirschning, M. Parcina, and K. Heeg, *Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29806.
118. Falkoff, R.J., L.P. Zhu, and A.S. Fauci, *Separate signals for human B cell proliferation and differentiation in response to Staphylococcus aureus: evidence for a two-signal model of B cell activation*. J Immunol, 1982. **129**(1): p. 97-102.
119. Bekeredjian-Ding, I., S. Inamura, T. Giese, H. Moll, S. Endres, A. Sing, U. Zähringer, and G. Hartmann, *Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2803-12.
120. Fauci, A.S., G. Whalen, and C. Burch, *Activation of human B lymphocytes XVI. Cellular requirements, interactions, and immunoregulation of pokeweed mitogen-induced total-immunoglobulin producing plaque-forming cells in peripheral blood*. Cell Immunol, 1980. **54**(1): p. 230-40.
121. Keightley, R.G., M.D. Cooper, and A.R. Lawton, *The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen*. J Immunol, 1976. **117**(5 Pt 1): p. 1538-44.
122. Bernasconi, N.L., N. Onai, and A. Lanzavecchia, *A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4500-4.
123. Cao, Y., M. Gordic, S. Kobold, N. Lajmi, S. Meyer, K. Bartels, Y. Hildebrandt, T. Luetkens, A.S. Ihloff, N. Kröger, C. Bokemeyer, and D. Atanackovic, *An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body*. J Immunol Methods, 2010. **358**(1-2): p. 56-65.
124. Muir, L., P.F. McKay, V.N. Petrova, O.V. Klymenko, S. Kratochvil, C.L. Pinder, P. Kellam, and R.J. Shattock, *Optimisation of ex vivo memory B cell expansion/differentiation for interrogation of rare peripheral memory B cell subset responses*. Wellcome Open Res, 2017. **2**: p. 97.
125. Noelle, R.J., J.A. Ledbetter, and A. Aruffo, *CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation*. Immunol Today, 1992. **13**(11): p. 431-3.
126. Carbone, E., G. Ruggiero, G. Terrazzano, C. Palomba, C. Manzo, S. Fontana, H. Spits, K. Kärre, and S. Zappacosta, *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2053-60.
127. Mazzei, G.J., M.D. Edgerton, C. Losberger, S. Lecoanet-Henchoz, P. Graber, A. Durandy, J.F. Gauchat, A. Bernard, B. Allet, and J.Y. Bonnefoy, *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7025-8.

128. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. **53**(7): p. 1035-43.
129. Lane, P., T. Brocker, S. Hubele, E. Padovan, A. Lanzavecchia, and F. McConnell, *Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1209-13.
130. Elgueta, R., M.J. Benson, V.C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, and R.J. Noelle, *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 152-72.
131. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 57-79.
132. Schmidlin, H., S.A. Diehl, and B. Blom, *New insights into the regulation of human B-cell differentiation*. Trends Immunol, 2009. **30**(6): p. 277-85.
133. Bryant, V.L., C.S. Ma, D.T. Avery, Y. Li, K.L. Good, L.M. Corcoran, R. de Waal Malefyt, and S.G. Tangye, *Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8180-90.
134. Berglund, L.J., D.T. Avery, C.S. Ma, L. Moens, E.K. Deenick, J. Bustamante, S. Boisson-Dupuis, M. Wong, S. Adelstein, P.D. Arkwright, R. Bacchetta, L. Bezrodnik, H. Dadi, C.M. Roifman, D.A. Fulcher, J.B. Ziegler, J.M. Smart, M. Kobayashi, C. Picard, A. Durandy, M.C. Cook, J.L. Casanova, G. Uzel, and S.G. Tangye, *IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts*. Blood, 2013. **122**(24): p. 3940-50.
135. Recher, M., L.J. Berglund, D.T. Avery, M.J. Cowan, A.R. Gennery, J. Smart, J. Peake, M. Wong, S.Y. Pai, S. Baxi, J.E. Walter, U. Palendira, G.A. Tangye, M. Rice, S. Brothers, W. Al-Herz, H. Oettgen, H. Eibel, J.M. Puck, F. Cattaneo, J.B. Ziegler, S. Giliani, S.G. Tangye, and L.D. Notarangelo, *IL-21 is the primary common  $\gamma$  chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6824-35.
136. Ettinger, R., S. Kuchen, and P.E. Lipsky, *The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 60-86.
137. Ettinger, R., G.P. Sims, A.M. Fairhurst, R. Robbins, Y.S. da Silva, R. Spolski, W.J. Leonard, and P.E. Lipsky, *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
138. Marasco, E., C. Farroni, S. Cascioli, V. Marcellini, M. Scarsella, E. Giorda, E. Piano Mortari, L. Leonardi, A. Scarselli, D. Valentini, C. Cancrini, M. Duse, O. Grimsholm, and R. Carsetti, *B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subsets and identifies specific defects in immunodeficient patients*. Eur J Immunol, 2016. **47**(1): p. 131-143.
139. Rösel, A.L., C. Scheibenbogen, U. Schliesser, A. Sollwedel, B. Hoffmeister, L. Hanitsch, H. von Bernuth, R. Krüger, K. Warnatz, H.D. Volk, and S. Thomas, *Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and a memory B-cell functionality assay*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **135**(1): p. 198-208.
140. Heck, C., S. Steiner, E.M. Kaebisch, M. Frentsch, F. Wittenbecher, C. Scheibenbogen, L.G. Hanitsch, A. Nogai, P. le Coutre, L. Bullinger, I.W. Blau, and I.K. Na, *CD4+ T Cell Dependent B Cell Recovery and Function After*

- Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 736137.
141. Wehr, C., T. Kivioja, C. Schmitt, B. Ferry, T. Witte, E. Eren, M. Vlkova, M. Hernandez, D. Detkova, P.R. Bos, G. Poerksen, H. von Bernuth, U. Baumann, S. Goldacker, S. Gutenberger, M. Schlesier, F. Bergeron-van der Cruyssen, M. Le Garff, P. Debré, R. Jacobs, J. Jones, E. Bateman, J. Litzman, P.M. van Hagen, A. Plebani, R.E. Schmidt, V. Thon, I. Quinti, T. Espanol, A.D. Webster, H. Chapel, M. Vihinen, E. Oksenhendler, H.H. Peter, and K. Warnatz, *The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency*. Blood, 2007. **111**(1): p. 77-85.
  142. Warnatz, K. and M. Schlesier, *Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency*. Cytometry B Clin Cytom, 2008. **74**(5): p. 261-71.
  143. Paglieroni, T. and M.R. MacKenzie, *Studies on the pathogenesis of an immune defect in multiple myeloma*. J Clin Invest, 1977. **59**(6): p. 1120-33.
  144. Carter, A., I. Silvian, I. Tatarsky, and G. Spira, *Impaired immunoglobulin synthesis in multiple myeloma: a B-cell dysfunction*. Am J Hematol, 1986. **22**(2): p. 143-54.
  145. Small, T.N., C.A. Keever, S. Weiner-Fedus, G. Heller, R.J. O'Reilly, and N. Flomenberg, *B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny*. Blood, 1990. **76**(8): p. 1647-56.
  146. Kiesel, S., A. Pezzutto, G. Moldenhauer, R. Haas, M. Körbling, W. Hunstein, and B. Dörken, *B-cell proliferative and differentiative responses after autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation*. Blood, 1988. **72**(2): p. 672-8.
  147. Capolunghi, F., S. Cascioli, E. Giorda, M.M. Rosado, A. Plebani, C. Auriti, G. Seganti, R. Zuntini, S. Ferrari, M. Cagliuso, I. Quinti, and R. Carsetti, *CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 800-8.
  148. Karahan, G.E., M. Eikmans, J.D. Anholts, F.H. Claas, and S. Heidt, *Polyclonal B cell activation for accurate analysis of pre-existing antigen-specific memory B cells*. Clin Exp Immunol, 2014. **177**(1): p. 333-40.
  149. Park, S., C.W. Jung, J.H. Jang, S.J. Kim, W.S. Kim, and K. Kim, *Incidence of infection according to intravenous immunoglobulin use in autologous hematopoietic stem cell transplant recipients with multiple myeloma*. Transpl Infect Dis, 2015. **17**(5): p. 679-87.
  150. King, C., S.G. Tangye, and C.R. Mackay, *T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 741-66.
  151. Král, Z., Z. Adam, F. Folber, M. Moulis, M. Tomiška, L. Říhová, M. Štork, A. Buliková, L. Pour, M. Krejčí, V. Sandecká, R. Koukalová, Z. Řehák, and Z. Čermáková, *Systemic inflammatory response with high CRP values as the dominant symptom of multiple myeloma*. Vnitr Lek, 2019. **65**(1): p. 37-44.
  152. Guillerey, C., K. Nakamura, S. Vuckovic, G.R. Hill, and M.J. Smyth, *Immune responses in multiple myeloma: role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(8): p. 1569-89.
  153. Ludwig, H., M. Boccadoro, P. Moreau, J. San-Miguel, M. Cavo, C. Pawlyn, S. Zweegman, T. Facon, C. Driessen, R. Hajek, M.A. Dimopoulos, F. Gay, H. Avet-Loiseau, E. Terpos, N. Zojer, M. Mohty, M.V. Mateos, H. Einsele, M. Delforge, J. Caers, K. Weisel, G. Jackson, L. Garderet, M. Engelhardt, N. van

- de Donk, X. Leleu, H. Goldschmidt, M. Beksac, I. Nijhof, N. Abildgaard, S. Bringhen, and P. Sonneveld, *Recommendations for vaccination in multiple myeloma: a consensus of the European Myeloma Network*. Leukemia, 2020.
154. Gudbrandsdottir, S., M. Brimnes, T. Køllgaard, H.C. Hasselbalch, and C.H. Nielsen, *Effects of rituximab and dexamethasone on regulatory and proinflammatory B-cell subsets in patients with primary immune thrombocytopenia*. Eur J Haematol, 2017. **100**(1): p. 45-52.
  155. Alexander, T., Q. Cheng, J. Klotsche, L. Khodadadi, A. Waka, R. Biesen, B.F. Hoyer, G.R. Burmester, A. Radbruch, and F. Hiepe, *Proteasome inhibition with bortezomib induces a therapeutically relevant depletion of plasma cells in SLE but does not target their precursors*. Eur J Immunol, 2018. **48**(9): p. 1573-1579.
  156. Mulder, A., S. Heidt, M. Vergunst, D.L. Roelen, and F.H. Claas, *Proteasome inhibition profoundly affects activated human B cells*. Transplantation, 2013. **95**(11): p. 1331-7.
  157. Yap, D.Y.H. and T.M. Chan, *B Cell Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis-Role in Pathogenesis and Effect of Immunosuppressive Treatments*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(24).
  158. Melve, G.K., E. Ersvaer, G.E. Eide, E.K. Kristoffersen, and Ø. Bruserud, *Peripheral Blood Stem Cell Mobilization in Healthy Donors by Granulocyte Colony-Stimulating Factor Causes Preferential Mobilization of Lymphocyte Subsets*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 845.
  159. Palanichamy, A., J. Barnard, B. Zheng, T. Owen, T. Quach, C. Wei, R.J. Looney, I. Sanz, and J.H. Anolik, *Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 5982-93.
  160. Sabbele, N.R., A. Van Oudenaren, and R. Benner, *The effect of cyclophosphamide on B cells and 'background' immunoglobulin-secreting cells in mice*. Immunopharmacology, 1988. **15**(1): p. 21-30.
  161. Barilà, G., N. Compagno, A. Liço, T. Berno, L. Bonaldi, A. Teramo, S. Manni, A. Branca, A.C. Frigo, F. Cinetto, F. Piazza, G. Semenzato, and R. Zambello, *Severe infections unrelated to neutropenia impact on overall survival in multiple myeloma patients: results of a single centre cohort study*. Br J Haematol, 2019. **186**(3): p. e13-e17.
  162. Lausen, B.F., L. Hougs, L. Schejbel, C. Heilmann, and T. Barington, *Human memory B cells transferred by allogeneic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3305-18.
  163. Auffermann-Gretzinger, S., I.S. Lossos, T.A. Vayntrub, W. Leong, F.C. Grumet, K.G. Blume, K.E. Stockerl-Goldstein, R. Levy, and J.A. Shizuru, *Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1442-8.
  164. Ljungman, P., M. Wiklund-Hammarsten, V. Duraj, L. Hammarström, B. Lönnqvist, T. Paulin, O. Ringdén, M.S. Pepe, and G. Gahrton, *Response to tetanus toxoid immunization after allogeneic bone marrow transplantation*. J Infect Dis, 1990. **162**(2): p. 496-500.
  165. Corre, E., M. Carmagnat, M. Busson, R.P. de Latour, M. Robin, P. Ribaud, A. Toubert, C. Rabian, and G. Socié, *Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections*. Haematologica, 2010. **95**(6): p. 1025-9.

166. Mensen, A., K. Jöhrens, I. Anagnostopoulos, S. Demski, M. Oey, A. Stroux, P. Hemmati, J. Westermann, O. Blau, F. Wittenbecher, K. Movassaghi, M. Szyska, S. Thomas, B. Dörken, C. Scheibenbogen, R. Arnold, and I.K. Na, *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT*. *Blood*, 2014. **124**(6): p. 963-72.
167. Abdel-Azim, H., A. Elshoury, K.M. Mahadeo, R. Parkman, and N. Kapoor, *Humoral Immune Reconstitution Kinetics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children: A Maturation Block of IgM Memory B Cells May Lead to Impaired Antibody Immune Reconstitution*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017. **23**(9): p. 1437-1446.
168. Scarselli, A., S. Di Cesare, C. Capponi, S. Cascioli, M.L. Romiti, G. Di Matteo, A. Simonetti, P. Palma, A. Finocchi, B. Lucarelli, R.M. Pinto, I. Rana, G. Palumbo, M. Caniglia, P. Rossi, R. Carsetti, C. Cancrini, and A. Aiuti, *Longitudinal Evaluation of Immune Reconstitution and B-cell Function After Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Immunodeficiency*. *J Clin Immunol*, 2015. **35**(4): p. 373-83.
169. Overturf, G.D., *Pneumococcal vaccination of children*. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2002. **13**(3): p. 155-64.
170. Kay, N.E., T. Leong, N. Bone, R.A. Kyle, P.R. Greipp, B. Van Ness, and M.M. Oken, *T-helper phenotypes in the blood of myeloma patients on ECOG phase III trials E9486/E3A93*. *Br J Haematol*, 1998. **100**(3): p. 459-63.
171. Peest, D., U. Brunkhorst, I. Schedel, and H. Deicher, *In vitro immunoglobulin production by peripheral blood mononuclear cells from multiple myeloma patients and patients with benign monoclonal gammopathy. Regulation by cell subsets*. *Scand J Immunol*, 1984. **19**(2): p. 149-57.
172. Broder, S., R. Humphrey, M. Durm, M. Blackman, B. Meade, C. Goldman, W. Strober, and T. Waldmann, *Impaired synthesis of polyclonal (non-paraprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma Role of suppressor cells*. *N Engl J Med*, 1975. **293**(18): p. 887-92.
173. Pilarski, L.M., E.J. Andrews, H.M. Serra, B.A. Ruether, and M.J. Mant, *Comparative analysis of immunodeficiency in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and patients with untreated multiple myeloma*. *Scand J Immunol*, 1989. **29**(2): p. 217-28.
174. Pilarski, L.M., E.J. Andrews, H.M. Serra, J.A. Ledbetter, B.A. Ruether, and M.J. Mant, *Abnormalities in lymphocyte profile and specificity repertoire of patients with Waldenstrom's macroglobulinemia, multiple myeloma, and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *Am J Hematol*, 1989. **30**(2): p. 53-60.
175. Mozaffari, F., L. Hansson, S. Kiaii, X. Ju, E.D. Rossmann, H. Rabbani, H. Mellstedt, and A. Osterborg, *Signalling molecules and cytokine production in T cells of multiple myeloma-increased abnormalities with advancing stage*. *Br J Haematol*, 2004. **124**(3): p. 315-24.
176. de Vries, J.E., A.P. Caviles, W.S. Bont, and J. Mendelsohn, *The role of monocytes in human lymphocyte activation by mitogens*. *J Immunol*, 1979. **122**(3): p. 1099-107.
177. Gmelig-Meyling, F. and T.A. Waldmann, *Human B cell activation in vitro: augmentation and suppression by monocytes of the immunoglobulin production induced by various B cell stimulants*. *J Immunol*, 1981. **126**(2): p. 529-37.

178. Suttles, J. and R.D. Stout, *Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 257-64.
179. Brimnes, M.K., I.M. Svane, and H.E. Johnsen, *Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(1): p. 76-84.
180. Ratta, M., F. Fagnoni, A. Curti, R. Vescovini, P. Sansoni, B. Oliviero, M. Fogli, E. Ferri, G.R. Della Cuna, S. Tura, M. Baccarani, and R.M. Lemoli, *Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6*. Blood, 2002. **100**(1): p. 230-7.
181. Cook, G. and J.D. Campbell, *Immune regulation in multiple myeloma: the host-tumour conflict*. Blood Rev, 1999. **13**(3): p. 151-62.
182. Tong, A.W., B.Q. Zhang, G. Mues, M. Solano, T. Hanson, and M.J. Stone, *Anti-CD40 antibody binding modulates human multiple myeloma clonogenicity in vitro*. Blood, 1994. **84**(9): p. 3026-33.
183. Brenne, A.T., T.B. Ro, A. Waage, A. Sundan, M. Borset, and H. Hjorth-Hansen, *Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3756-62.
184. Wang, D., Y. Fløisand, C.V. Myklebust, S. Bürgler, A. Parente-Ribes, P.O. Hofgaard, B. Bogen, K. Taskén, G.E. Tjønnfjord, F. Schjesvold, J. Dalgaard, A. Tveita, and L.A. Munthe, *Autologous bone marrow Th cells can support multiple myeloma cell proliferation in vitro and in xenografted mice*. Leukemia, 2017. **31**(10): p. 2114-2121.
185. Korniluk, A., H. Kemono, and V. Dymicka-Piekarska, *Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity*. Tumour Biol, 2014. **35**(10): p. 9447-57.
186. Matsue, K., L.G. Lum, R.P. Witherspoon, and R. Storb, *Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T cell-derived factors*. Blood, 1987. **69**(1): p. 308-15.
187. Murphy, K.W., C, *Janeway's Immunobiology*. 2016, Garland Science: New York, NY.
188. Puga, I., 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. Lorente, 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. Aróstegui, M. Juan, J. Yagüe, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen, and A. Cerutti, *B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen*. Nat Immunol, 2011. **13**(2): p. 170-80.
189. Jaime-Pérez, J.C., G.A. Turrubiates-Hernández, L.J. López-Silva, R. Salazar-Riojas, and D. Gómez-Almaguer, *Early changes in IL-21, IL-22, CCL2, and CCL4 serum cytokines after outpatient autologous transplantation for multiple sclerosis: A proof of concept study*. Clin Transplant, 2020. **34**(12): p. e14114.
190. Han, P., T. McDonald, and G. Hodge, *Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway*. Immunology, 2004. **113**(1): p. 26-34.
191. Witherspoon, R.P., L.G. Lum, R. Storb, and E.D. Thomas, *In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation. II. Deficient T*

- and non-T lymphocyte function within 3-4 months of allogeneic, syngeneic, or autologous marrow grafting for hematologic malignancy. Blood, 1982. 59(4): p. 844-50.*
192. Lum, L.G., M.C. Seigneuret, R.F. Storb, R.P. Witherspoon, and E.D. Thomas, *In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after marrow transplantation. I. T-cell and B-cell deficiencies in patients with and without chronic graft-versus-host disease. Blood, 1981. 58(3): p. 431-9.*
  193. Shiobara, S., R.P. Witherspoon, L.G. Lum, and R. Storb, *Immunoglobulin synthesis after HLA-identical marrow grafting. V. The role of peripheral blood monocytes in the regulation of in vitro immunoglobulin secretion stimulated by pokeweed mitogen. J Immunol, 1984. 132(6): p. 2850-6.*
  194. Weißenberg, S.Y., F. Szelinski, E. Schrezenmeier, A.L. Stefanski, A. Wiedemann, H. Rincon-Arevalo, A. Welle, A. Jungmann, K. Nordström, J. Walter, J. Imgenberg-Kreuz, G. Nordmark, L. Rönblom, P. Bachali, M.D. Catalina, A.C. Grammer, P.E. Lipsky, A.C. Lino, and T. Dörner, *Identification and Characterization of Post-activated B Cells in Systemic Autoimmune Diseases. Front Immunol, 2019. 10: p. 2136.*
  195. Kim, D.H., S.K. Sohn, D.I. Won, N.Y. Lee, J.S. Suh, and K.B. Lee, *Rapid helper T-cell recovery above  $200 \times 10^6/l$  at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 2006. 37(12): p. 1119-28.*
  196. Glas, A.M., E.H. van Montfort, J. Storek, E.G. Green, R.P. Drissen, V.J. Bechtold, J.Z. Reilly, M.A. Dawson, and E.C. Milner, *B-cell-autonomous somatic mutation deficit following bone marrow transplant. Blood, 2000. 96(3): p. 1064-9.*
  197. van den Brink, M.R., E. Velardi, and M.A. Perales, *Immune reconstitution following stem cell transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. 2015: p. 215-9.*
  198. Velardi, E., E. Clave, L.C.M. Arruda, F. Benini, F. Locatelli, and A. Toubert, *The role of the thymus in allogeneic bone marrow transplantation and the recovery of the peripheral T-cell compartment. Semin Immunopathol, 2021.*
  199. Cordonnier, C., M. Labopin, V. Chesnel, P. Ribaud, R. De La Camara, R. Martino, A.J. Ullmann, T. Parkkali, A. Locasciulli, K. Yakouben, K. Pauksens, H. Einsele, D. Niederwieser, J. Apperley, P. Ljungman, I.D.W.P.o.t.E.G.f.B. Transplantation, and Marrow, *Randomized study of early versus late immunization with pneumococcal conjugate vaccine after allogeneic stem cell transplantation. Clin Infect Dis, 2009. 48(10): p. 1392-401.*

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Clarissa Heck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Quantitative und funktionale Analyse des B-Zell-Kompartiments bei Patienten mit Multiplem Myelom / Quantitative and functional analysis of the B cell compartment in patients with multiple myeloma“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

---

Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Clarissa Heck hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Clarissa Heck, Sophie Steiner, Eva M Kaebisch, Marco Frentsch, Friedrich Wittenbecher, Carmen Scheibenbogen, Leif G Hanitsch, Axel Nogai, Philipp le Coutre, Lars Bullinger, Igor-Wolfgang Blau, Il-Kang Na; *CD4+ T cell dependent B cell recovery and function after autologous hematopoietic stem cell transplantation*; *Frontiers in Immunology*. 2021 Sep 29; 12 (3973)

Beitrag im Einzelnen:

Clarissa Heck entwickelte die Fragestellung sowie das Studienkonzept. Die Durchführung der bekannten Methodik wurde ebenfalls ausschließlich von ihr durchgeführt. Dazu gehörten die Akquirierung der Patienten und gesunden Spender, die Isolation von PBMCs, die Stimulation und Kultivierung von PBMCs, durchflusszytometrische Untersuchung der PBMCs sowie von Vollblutproben und B-Zell Elispot zur Quantifizierung von Immunglobulinsezernierenden Zellen.

Des Weiteren übernahm Clarissa Heck sämtliche Aufbereitung, Auswertung und statistische Analyse der gewonnenen Daten sowie das Erstellen sämtlicher Abbildungen und Tabellen in der Publikation basierend auf den eingereichten Primärdaten.

Sie verfasste einen Erstentwurf des Manuskriptes samt kritischer Interpretation der gewonnenen Ergebnisse. Dieses wurde von allen Koautoren gegengelesen und mit Anmerkungen versehen, von Clarissa Heck erneut aufgearbeitet und im open access Journal "Frontiers in Immunology" publiziert.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

**Heck C**, Steiner S, Kaebisch E, Frentsch M, Wittenbecher F, Scheibenbogen C, Hanitsch L, Nogai A, le Coutre P, Bullinger L, Blau IW, Na I. *CD4+ T Cell Dependent B Cell Recovery and Function After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Frontiers in Immunology*. 2021 Sep 29; 12 (3973)

**Heck C**, Steiner S, Frentsch M, Wittenbecher F, Scheibenbogen C, Nogai A, Le Coutre P, Blau IW, Bullinger L, Na I. *CD4 T-Zell-abhängige Wiederherstellung der B-Zellzahlen und –funktion nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation*. Freier Vortrag (V477) auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO 2021), 1.-4. Oktober 2021, Berlin, Deutschland

**Heck C**, Steiner S, Frentsch M, Wittenbecher F, Scheibenbogen C, Nogai A, le Coutre P, Bullinger L, Blau IW, Na I. *In vitro stimulation with CD40L/IL21 can retrieve B-cell dysfunction in multiple myeloma patients suffering from secondary immunodeficiency*. Poster (A349) on the 46th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT 2020) 30th August - 2nd September 2020, Madrid, Spain

Kümpfel T, Gerdes LA, **Heck C**, Prüss H. *Delayed diagnosis of extraovarian teratoma in relapsing anti-NMDA receptor encephalitis*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016 Jun 16; 3(4):e250.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an Prof. Dr. med. Il-Kang Na aussprechen. Die Überlassung des Themas, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, ihr wertvoller Input und ihre Förderung haben diese Arbeit ermöglicht und maßgeblich geprägt.

Der AG Scheibenbogen, insbesondere Sophie Steiner danke ich für die Einarbeitung in die Methodik sowie die anregenden Gespräche und gemeinsamen Überlegungen, die zum besseren Verständnis der Thematik beigetragen haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Na und den Mitarbeitern des BCRTs, insbesondere des FACS Labors, die mit ihrer wissenschaftlichen Expertise diese Arbeit gefördert haben. Insbesondere Stella Lesch bin ich sehr dankbar für die persönliche Stütze im Laboralltag.

Den Kollegen der Kliniken für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Charité Campus Virchow Klinikum, Campus Mitte und Campus Benjamin Franklin danke ich für die Unterstützung in der Patientenakquirierung. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei allen Patienten und gesunden Spendern bedanken, die dieses Projekt durch ihre Blutspende ermöglicht haben.

Nicht zu Letzt gilt ein großer Dank meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund. Sie haben mich durch die Höhen und Tiefen einer solchen Arbeit begleitet, mich motiviert nach vorne zu schauen und waren die beste Stütze, die man sich wünschen kann.

# Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171  
geraldine.rauch@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



**Name, Vorname: Heck, Clarissa**  
**Emailadresse: clarissa.heck@charite.de**  
**Matrikelnummer: 218227**  
**PromotionsbetreuerIn: Prof. Il-Kang Na**  
**Promotionsinstitution / Klinik: CC14 Medizinische Klinik m.S.**  
**Hämatologie, Onkologie und Tumormimmunologie CVK**

## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Clarissa Heck innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 28.07.2020
- Termin 2: 25.08.2020
- Termin 3: 22.12.2020
- Termin 4: 16.02.2021

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Angabe von Lage- und Streuungsmaßen je nach Verteilung und Skalierung der Variable
- Korrelationskoeffizienten je nach Skalenniveau und Verteilung
- Interpretation der p-Werte als explorative p-Werte
- Regressionsanalyse

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 15.10.2021

Name des Beraters/ der Beraterin: Alice Schneider

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

