

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

Charakterisierung der Homing-Rezeptor-Expression
nach allogener Stammzelltransplantation - neue
Biomarker für eine akute Graft-versus-Host-Disease?

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Veronika Umrath
aus Augsburg

Würzburg, Juni 2013

Referent: Prof. Dr. Hermann Einsele

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Ute Deichmann
und
Friedrich Amend

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	1
1.1.1	Formen der SZT	1
1.1.2	Prinzip und Probleme der SZT	2
1.2	Das HLA-System	2
1.3	Akute Graft-versus-Host-Disease	4
1.3.1	Pathomechanismus	4
1.3.2	Klinik und Einteilung der akuten GvHD	5
2	Fragestellung	7
3	Material und Methoden	9
3.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	9
3.2	Kultivierung und Aktivierung von PBMZs	9
3.3	Kryokonservierung und Rekultivierung von PBMZs	10
3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauer Zählkammer	11
3.5	FACS-Färbung	11
3.6	Konjugation von Antikörpern mit Fluorochromen	11
3.7	Titration der Antikörper	12
3.8	Durchflusszytometrie	13
3.8.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	14
3.8.2	Spektrale Überlappung	14
3.8.3	Kompensation	15
3.8.4	Fluoreszenz minus Eins	17
3.8.5	Problematik der Durchflußzytometrie bei geringen Zellzahlen	18
3.8.6	Gating-Strategie	19
3.8.7	Antikörper-Cocktails	20
3.8.8	Untersuchung der Koexpression von Rezeptoren	21

3.9	Studiendesign und Patientenkollektiv	23
3.10	Beteiligte Personen und jeweilige Aufgaben	27
3.11	Logistik und statistische Auswertung	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Klinische Dokumentation	30
4.2	Patientencharakteristika	32
4.3	Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allo- gener SZT	34
4.4	Expressionsmuster auf T-Zellen	40
4.4.1	Expressionstyp 1: Rezeptoren mit abnehmender, niedriger Expression	41
4.4.2	Expressionstyp 2: Rezeptoren mit konstanter, mittlerer Expression	45
4.4.3	Expressionstyp 3: Rezeptoren mit fluktuierender, hoher Expression	48
5	Diskussion	52
5.1	Patientencharakteristika	52
5.2	Leukozyten- und T-Zell-Engraftment	53
5.3	Homing-Rezeptorexpression auf T-Zellen	55
5.3.1	Expressionstyp 1	56
5.3.2	Expressionstyp 2	57
5.3.3	Expressionstyp 3	59
5.4	Limitationen	60
6	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	64
	Danksagung	73
	Lebenslauf	75

Abkürzungsverzeichnis

.....

AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATG	Antithymozytenglobulin
BLI	Biolumineszenz-Imaging
Bu	Busulfan
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
CML	Chronisch myeloische Leukämie
cMPE	chronisch myeloproliferative Erkrankung
CSA	Cyclosporin A
CST	Cytometer setup and tracking
CTX	Cyclophosphamid
DecH	Soludecortin H
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eve	Everolimus
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein
Flu	Fludarabin
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukämie
HEV	hochendotheliale Venole
HLA	Humane Leukozyten Antigene

IL	Interleukin
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KOF	Körperoberfläche
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mel	Melphalan
MHC	Major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MRD	Matched related donor
MUD	Matched unrelated donor
OMF	Osteomyelofibrose
PBS	Phosphate buffered saline
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMT	Photomultiplier tube
RIC	Reduced intensity conditioning
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sir	Sirolimus
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	Total body irradiation
Thio	Thiotepa
Treo	Treosulfan
TRM	Transplantat-assoziierte Mortalität

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT) ist heutzutage integraler Bestandteil multimodaler Therapiekonzepte für viele maligne hämatologische Neoplasien, Immundefizienzsyndrome und Lymphome. Eine Vielzahl ehemals tödlicher Erkrankungen kann mittlerweile durch eine SZT erfolgreich behandelt, oftmals sogar geheilt werden.

1.1.1 Formen der SZT

Bei der SZT unterscheidet man grundsätzlich zwischen der Transplantation körperfremder und körpereigener Zellen. Bei einer autologen Transplantation werden dem Patienten zunächst eigene Stammzellen entnommen und zu einem späteren Zeitpunkt nach einer Hochdosischemotherapie und/oder Bestrahlung reinfundiert. Eine allogene Transplantation liegt dann vor, wenn es sich bei Spender und Empfänger um verschiedene Personen handelt. Die transplantierten Stammzellen können dabei aus dem Nabelschnurblut, dem peripheren Blut (periphere Blutstammzellen, PBSZ) oder dem Knochenmark (KM) des Spenders gewonnen werden [1, 2]. Um das Risiko für Komplikationen so weit wie möglich zu minimieren, sollten Spender und Empfänger dabei auf ihren Zellen die selben Oberflächenstrukturen, die humanen Leukozytenantigenen (HLA), aufweisen. Daher kommen für eine allogene SZT primär nahe Verwandte des Patienten in Frage, vor allem HLA-identische Geschwister (MRD) oder die Eltern des Patienten (haploidentische SZT). Darüber hinaus sind bei HLA-Übereinstimmung aber auch Transplantationen zwischen nicht verwandten Personen möglich (MUD).

Die Entscheidung, welche Form der SZT bei einem Patienten zum Einsatz kommt, hängt von vielen Faktoren wie der Verfügbarkeit eines passenden Spenders, der Grunderkrankung und natürlich der sorgfältigen Abwägung von Vor- und Nachteilen der einzelnen Verfahren ab.

1.1.2 Prinzip und Probleme der SZT

Das Prinzip der SZT besteht in der Vernichtung des maligne entarteten blutbildenden Systems des Empfängers durch hämatotoxische Chemotherapeutika, der sog. Konditionierung, und dem Wiederaufbau desselben durch die Transplantation pluripotenter Stammzellen eines passenden Spenders. Diese gesunden, immunkompetenten Spenderzellen sind zugleich entscheidend am Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL-Effekt) beteiligt, da sie noch vorhandene Tumorzellen erkennen und gezielt vernichten können [3, 4, 5, 6]. Der GvL-Effekt und nicht die restlose Vernichtung des Empfänger Knochenmarks hat sich als ausschlaggebend für den Erfolg der Therapie herauskristallisiert, so dass nach verträglicheren Alternativen zur Hochdosistherapie gesucht wurde. Durch die Entwicklung dosisreduzierter Konditionierungsverfahren (RIC) konnte die bis dato erhebliche Gesamtoxizität der SZT so weit gesenkt werden, dass nun auch ältere oder komorbide Patienten für eine solche Behandlung in Frage kommen [7]. Die Anzahl jährlich durchgeführter Transplantationen hat demzufolge in den letzten Jahren stark zugenommen und wird weiter zunehmen, da durch Nabelschnur-, haploidente Transplantationen und die weltweit zunehmende Spendebereitschaft der Menschen für immer mehr Patienten ein passender Spender gefunden werden kann [8, 9, 10]

Trotzdem bleibt die SZT eine gefährliche Therapieoption, mit der eine Reihe potentiell tödlicher Komplikationen wie Transplantatversagen, Infektionen und Abstoßungsreaktionen in Kauf genommen werden müssen [11]. Vor allem letztere, akute und chronische Graft-versus-Host-Disease (GvHD), bei denen der Empfängerorganismus von immunkompetenten Spender-T-Zellen als fremd erkannt wird, sind für einen Großteil der Transplantat-assoziierten Mortalität (TRM) verantwortlich.

1.2 Das HLA-System

Entscheidend für das Verständnis von Immunreaktionen, die Regulation und Pathophysiologie der Eigen- und Fremd-Erkennung und damit für die Entwicklung der modernen Transplantationsmedizin war die Entdeckung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC). Dieser beinhaltet eine große Anzahl polymorpher Gene, die für Proteine kodieren, die im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation entscheidende Bedeutung besitzen und wurde erstmals 1948 bei Mäusen im Rahmen von experimentellen Transplantationsexperimenten beschrieben [12]. Später wurde ein solches System auch auf menschlichen

Leukozyten identifiziert. Da man zunächst annahm, dass sich diese Oberflächenmerkmale nur auf weißen Blutzellen befinden würden, wurden sie humane Leukozytenantigene (HLA) genannt [13]. Die HLAs eines Organismus spielen eine zentrale Rolle in seiner Eigen- und Fremd-Erkennung, sind sie doch gleichermaßen wie ein Fingerabdruck, mit dem er sich selbst identifizieren kann. Bezogen auf den Genort der HLAs unterscheidet man zwei Klassen, die sog. HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und die HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP).

Klasse-I-Moleküle finden sich auf fast allen kernhaltigen Zellen und präsentieren intrazellulär synthetisierte Peptide an $CD8^+$ T-Zellen. In Verbindung mit der Erkennung dieser Peptide durch den T-Zell-Rezeptor $CD8^+$ T-Zellen gemäß einem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ können sich gesunde Zellen als „selbst“ ausweisen, während körperfremde oder tumorös entartete Zellen unbekannte oder veränderte HLAs präsentieren und als „fremd“ demaskiert werden.

Klasse-II-Moleküle finden sich nur auf sog. Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie B-Lymphozyten, Makrophagen und Langerhans-Zellen. Mittels MHC-II-Proteinen werden exogen aufgenommene Proteinfragmente an $CD4^+$ T-Zellen präsentiert.

Vorraussetzung für eine erfolgreiche SZT sind eine sorgfältige Spenderauswahl und die gezielte Vorbereitung des Empfängerorganismus: bei ungenügender Schwächung durch die Konditionierungstherapie könnten sonst die Zellen des Spenders vom noch vorhandenen Immunsystem des Empfängers als körperfremd erkannt und vernichtet werden, so dass das Transplantat nicht anwächst (Transplantatversagen). Andererseits kann der Empfänger selbst von mittransplantierten, bereits immunkompetenten Spender-T-Zellen als fremd erkannt werden (Graft-versus-Host-Disease). Um die Gefahr einer Abstoßung und deren Schweregrad möglichst gering zu halten, erhält jeder Patient nach Abwägung des individuellen GvHD-Risikos eine Calcineurin-Inhibitor-basierte GvHD-Prophylaxe. Außerdem wird versucht, für jeden Patienten einen HLA-identen Spender zu finden. Derzeit liegt eine vollständige HLA-Übereinstimmung, ein sog. 10/10-Match, formal dann vor, wenn Spender und Empfänger auf vierstelligem Allelniveau an den Genorten HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DQB1 immungenetisch identisch sind [14].

Durch die komplexe und hochpolymorphe Natur der MHCs liegt einer formalen HLA-Identität außer bei Geschwistern allerdings nur selten ein identischer Genotyp zu Grunde. In diesem Zusammenhang scheinen sog. Minor-Histokompatibilitätsantigene entscheidenden Einfluß auf den Verlauf und das Ergebnis von HLA-identischen Transplantationen zu

haben [15]. Diese Minorantigene sind zwar Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen, allerdings sind sie im Moment noch nicht vollkommen entschlüsselt [16, 17]. Zudem fehlen schnelle und effiziente Nachweismethoden, um sie in der klinischen Routine miterfassen und -berücksichtigen zu können.

1.3 Akute Graft-versus-Host-Disease

1.3.1 Pathomechanismus

Durch murine Transplantationsmodelle konnte der zeitliche Verlauf der akuten GvHD von Beilhack *et al.* als ein zweistufiges Modell bestehend aus einer Initiations- und einer Effektorphase charakterisiert werden [18]. Während der Initiationsphase, die innerhalb der ersten drei Tage nach Transplantation in den sekundär lymphatischen Organen (SLO) wie den Peyer'schen Plaques, der Milz und den Lymphknoten abläuft, erfolgt die Aktivierung von T-Zellen durch Interaktion mit APZs und die massive Proliferation alloreaktiver Subtypen [19, 20]. Nach 5 Tagen beginnt die Effektorphase, in der diese die SLO verlassen, um über den Blutstrom die Zielorgane zu erreichen. Klinisch zeigen die Mäuse in MHC minor mismatch Szenarien in dieser Phase allerdings noch keine Zeichen einer Abstoßungsreaktion, obwohl Biolumineszenz-Imaging (BLI) und durchflusszytometrische Messungen im Blut der Tiere einen dramatischen Anstieg an alloreaktiven T-Zellen dokumentieren. Dieser Zeitraum könnte also als diagnostisches Fenster zur Frühdiagnose der aGvHD genutzt werden. Denn wenn die Mäuse noch während des klinisch asymptomatischen Stadiums mit Rapamycin therapiert werden, nimmt das BLI-Signal der Tiere rapide ab, die aGvHD bleibt klinisch nur gering ausgeprägt und alle Tiere überleben [21].

Mittels Multiplex-Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass sich alloreaktive T-Zellen während des Transits im Blut durch das Vorhandensein spezifischer Oberflächenstrukturen, sog. Homing- und Chemokinrezeptoren, auszeichnen und die Vermutung liegt nahe, dass sie diese zum Einwandern in die Zielorgane verwenden [18, 22]. Darüber hinaus wurden in der Literatur einige unspezifische Entzündungsrezeptoren beschrieben, die im Zusammenhang mit der Gewebeschädigung nach Konditionierung die Migration von aktivierten T-Zellen ermöglichen könnten [23, 24]

Unter Homingrezeptoren versteht man Glykoproteine an der Oberfläche von T-Zellen und anderen Leukozyten, die die Auswanderung von diesen Zellen aus dem Blutstrom

in unterschiedliche Gewebe ermöglichen [25, 26]. Voraussetzung für die Zielfindung der Zellen ist dabei sowohl die Hochregulation von Gewebe-spezifischen Homing-Rezeptoren, als auch die Expression der entsprechenden Antigene auf den zugehörigen hochendothelialen Venolen (HEV). Im Zusammenhang mit der aGvHD wichtig scheinen insbesondere Rezeptoren, die mit dem Homing in die Haut in Verbindung gebracht werden, z.B. Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) und Chemokinrezeptor 4 (CCR 4) [27, 28, 29, 30]. Darüber hinaus sind Rezeptoren wie $\beta 7$ integrin und CCR 9 von Interesse, da diese die Einwanderung von Zellen in den Darm begünstigen können [27, 31, 32, 33].

1.3.2 Klink und Einteilung der akuten GvHD

Von alloreaktiven Zellen befallen werden bei einer akuten Abstoßungsreaktion ausschließlich Leber, Haut und der Gastrointestinaltrakt. Im Vordergrund des klinischen Bildes stehen daher massive Durchfälle mit u.U. hämodynamisch relevanten Blutungen, eine Erhöhung der Leberenzyme und ein Exanthem der Haut, das mit quälendem Juckreiz verbunden ist und bis zur Epidermolyse der Haut führen kann [34]. Das Grading und damit die Risikostratifizierung der akuten GvHD erfolgt dabei gemäß Tab. 1.1 nach den Glucksberg-Seattle-Kriterien [35]. Je nach Organbeteiligung und Schwere des Befalls der einzelnen Organsysteme wird zwischen GvHD-Grad I (mild), Grad II (moderat), Grad III (schwer) und Grad VI (lebensbedrohlich) unterschieden.

Ein großes therapeutisches Problem stellt dabei jedoch die Sicherung der Diagnose „akute GvHD“ dar: Ausprägung und Art der Symptome variieren von Patient zu Patient stark und nur selten findet sich das Vollbild mit der charakteristischen Symptomtrias. Zudem gibt es gerade bei immunkompromittierten, frisch transplantierten Patienten eine Vielzahl von Differentialdiagnosen (virale, bakterielle oder Pilzinfektionen, Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie etc.) die ein völlig anderes therapeutisches Vorgehen erfordern. Momentan wird daher zunächst versucht, die Diagnose durch Hautbiopsien und histologische Färbungen zu verifizieren. Oftmals sind allerdings mehrere, für die Patienten belastende Biopsien im Zeitverlauf nötig, da das histologische Bild im Frühstadium oft uncharakteristisch ist. So ist die akute GvHD initial fast immer eine rein klinische Diagnose, die mit einer großen Unsicherheit versehen ist.

Um Diagnostik und vor allem Therapie der akuten GvHD zu verbessern, wäre die Identifikation leicht zugänglicher, sensitiver und für die GvHD spezifischer Biomarker von entscheidender Bedeutung. Bis heute wurde eine Vielzahl verschiedener Laborparameter

STADIUM	HAUT	LEBER	DARM
1	Makulopapulöses Exanthem (<25 der KOF)	Bilirubin 2-3 mg/dl	Diarrhöen 500-1000 ml/Tag
2	Makulopapulöses Exanthem (>25 der KOF)	Bilirubin 3-6 mg/dl	Diarrhöen 1000-1500 ml/Tag
3	Erythrodermie	Bilirubin 6-15 mg/dl	Diarrhöen >1500 ml/Tag
4	Blasige Umwandlung	Bilirubin > 15 mg/dl	Schmerzen oder Ileus
GRAD	HAUT	LEBER	DARM
I	St. 1-2	St. 0	St. 0
II	St. 1-3	St. 1	St. 1
III	St. 2-3	St. 2-3	St. 2-3
IV	St. 2-4	St. 2-4	St. 2-4

Tab. 1.1: Staging und Grading der akuten GvHD nach den Glucksberg-Seattle-Kriterien

mit dem späteren Auftreten einer aGvHD mehr oder weniger überzeugend korreliert, ohne dass sich durch diese ein Durchbruch bezüglich der Umsetzung in die klinische Routine abzeichnen ließ [36, 37, 38]. Ein Bluttest, der eine Infektion von einer akuten Abstoßungsreaktion diagnostisch abgrenzen oder sogar deren Auftreten vor Beginn der Symptomatik vorhersagen könnte, würde einen großen Fortschritt für die Therapie schwerst kranker Patienten bedeuten. Die schnelle Diagnosestellung könnte den übermäßigen Einsatz von Immunsuppressiva bei nicht gefährdeten Patienten verhindern und eine gezielte Therapie für betroffene Patienten ermöglichen. Möglicherweise ließe sich durch die schnell einsetzende und massive Unterdrückung der Immunantwort sogar der Eintritt in die Effektorphase der aGvHD verhindern. Das Prinzip des zu entwickelnden Tests könnte auf dem direkten Nachweis der alloreaktiven T-Zellen während der Migrationsphase im peripheren Blut beruhen, indem die alloreaktiven Zellen anhand der Hochregulation eines oder mehrerer Homing-Rezeptoren mit Multiplexdurchflusszytometrie identifiziert werden.

2 Fragestellung

Um einen Einblick in die Dynamik und Fluktuation von Homing-Rezeptoren beim Menschen zu erhalten, wurden mittels Durchflusszytometrie 24 verschiedene Aktivierungsmarker, Homing- und Chemokinrezeptoren bei 20 gesunden Probanden über einen Zeitraum von drei Wochen analysiert. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten Marker sowohl mit gleichbleibend hoher als auch gleichbleibend niedriger Expression definiert werden. Darüber hinaus gab es einige Rezeptoren, deren Expression im Zeitverlauf dynamisch fluktuierend war. Dies legt die Vermutung nahe, dass es unter den untersuchten Markern sowohl schnell reagierende Rezeptoren gab, die bei Bedarf rasch hinauf oder herabreguliert werden konnten, sowie andere, die weniger störungsanfällig waren und auf konstantem Niveau exprimiert wurden. Es scheint daher nicht ausgeschlossen, dass sich Veränderungen in der Homing-Rezeptor-Expression auch beim Menschen mit dem Auftreten von Krankheiten bzw. dem Einsetzen einer Abstoßungsreaktion in Verbindung bringen lassen könnten.

In murinen major- und minor-mismatch-Transplantationsmodellen lassen sich alloreaktive T-Zellen bereits vor Beginn der Krankheit mittels Durchflusszytometrie im Blut nachweisen [18, 21]. In Analogie dazu wurde in einer klinischen Pilotstudie untersucht, ob und welche Rezeptoren beim Menschen mit einer aGvHD in Verbindung gebracht werden können. Über einen Zeitraum von einem Jahr wurde die Expression von 19 verschiedenen Homing-, Chemokin- und Entzündungsrezeptoren auf den T-Zellen von allogenen transplantierten Patienten analysiert. Unter diesen waren einerseits Rezeptoren, die in murinen Modellen bereits einen hohen positiven Vorhersagewert gezeigt hatten. Zudem wurden Rezeptoren ausgewählt, die in der Literatur mit dem Homing in GvHD-Zielorgane in Verbindung gebracht werden konnten. Darüber hinaus wurden noch einige Entzündungsrezeptoren ins Protokoll aufgenommen, um dem Auftreten des sog. „cytokine storm“ Rechnung zu tragen. Dieser Begriff bezieht sich auf die starke Gewebeschädigung durch die Konditionierungstherapie, die ein wichtiger pathogenetischer Faktor für die Entstehung und den Schweregrad der Graft-versus-Host-Disease zu sein scheint [39]. Die

vorliegende Arbeit versuchte dabei nicht, Aussagen über signifikante Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen Patienten mit und ohne aGvHD zu treffen. Vielmehr sollte die Rezeptorexpression im Zeitverlauf charakterisiert werden, um qualitative Unterschiede in Bezug auf die Expression einzelner Rezeptoren zwischen den Patientengruppen festzustellen. Dies sollte eine Vorauswahl potentiell interessanter Rezeptoren ermöglichen, um diese in einer weiteren Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv auf ihren prädiktiven Vorhersagewert hin zu untersuchen.

Im Einzelnen lagen dieser Arbeit folgende Fragestellungen zu Grunde:

- In welchem Zeitraum nach SZT findet bei frisch transplantierten Patienten das Engraftment der Leukozyten und Lymphozyten statt? Lassen sich diesbezüglich Unterschiede zwischen den Patienten finden, die im Verlauf eine aGvHD entwickeln und denen, die nicht an einer aGvHD erkranken?
- In welchem Ausmaß werden die von uns untersuchten Rezeptoren auf zytotoxischen und T-Helfer-Zellen von frisch transplantierten Patienten exprimiert? Sind wie bei gesunden Probanden ähnliche Expressionsmuster im Zeitverlauf feststellbar (konstant hohe, niedrige oder dynamisch fluktuierende Expression)?
- Unterscheidet sich dabei die Expression einzelner Homing-, Chemokin- oder Entzündungsrezeptoren auf T-Zellen im peripheren Blut bei an GvHD erkrankten Patienten von nicht betroffenen Patienten? Wenn ja, findet sich ein Unterschied bezogen auf die absolute Anzahl der alloreaktiven T-Zellen, bezogen auf deren Anteil der Gesamtpopulation der T-Zellen oder beides?
- Welche Marker lassen eine Assoziation erkennen zwischen einer hohen (oder niedrigen) Expression und einer schweren (oder leichten) aGvHD vor dem klinischen Beginn der Abstoßung?

3 Material und Methoden

3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die peripheren monokuleären Zellen (PBMZs) der Patienten wurden durch die Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation aus Ethylendiamintetraacetat-Vollblut (EDTA) isoliert. Die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit der PBMZs erlaubt mit dieser Methode deren Separation von anderen Zellen im peripheren Blut. Mononukleäre Zellen sammeln sich nach der Zentrifugation an der Grenzschicht zwischen Ficoll-Hypaqua und Plasma als weißlicher Film, während sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen am Boden des Röhrchens anreichern.

Zuerst wurden 20 ml Ficoll-Lösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Dann wurden 7,5 ml Blut der Patienten mit 7 ml Phosphate buffered saline (PBS, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) gemischt und vorsichtig auf das Ficoll-Medium geschichtet. Um die maximale Zellausbeute zu erreichen, wurden die EDTA-Monovetten mit einigen Millilitern PBS gespült, diese Suspension wurde ebenfalls auf das Medium geschichtet. Danach wurden die Falcon-Röhrchen 20 Minuten bei 4 °C und 2000 change units/min auf niedrigster Bremsstufe zentrifugiert. Die Interphase wurde mit einer Messpipette großzügig abgenommen und in einem neuen Röhrchen mit PBS bis auf 20 ml aufgefüllt.

3.2 Kultivierung und Aktivierung von PBMZs

Zur Optimierung der Fluoreszenz-minus-Eins-Kontrolle (FMO) und um für jeden Messtag identische Zellen als Kontrolle mitführen zu können, wurden PBMZs eines gesunden Thrombozytenspenders kultiviert und expandiert. Für die Zellkultur wurde komplettes RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 50 µM 2-Mercaptoethanol verwendet. In einer kleinen Zellkulturflasche wurden 20×10^6 Zellen mit 30ng/ml Anti-CD3-Antikörper in 10 ml RPMI stimuliert. Die Interleukin-2-Konzentration im Medium wurde während der gesamten

Kulturzeit auf 50 IU/ml eingestellt. An den Tagen 1,3,4,6 wurde das Kulturmedium unter sterilen Kautelen gewechselt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und kontinuierlich in größere Kulturflaschen umgesetzt. Wie Abb. 3.1 zeigt, wurden Monozyten und Granulozyten der PBMZs schrittweise durch Zelltod herausverdünnt, so dass nach einer Woche fast ausschließlich T-Zellen in der Kultur vorhanden waren. Insgesamt konnte die Zahl der Zellen mit der beschriebenen Methode während einer Woche verzehnfacht werden.

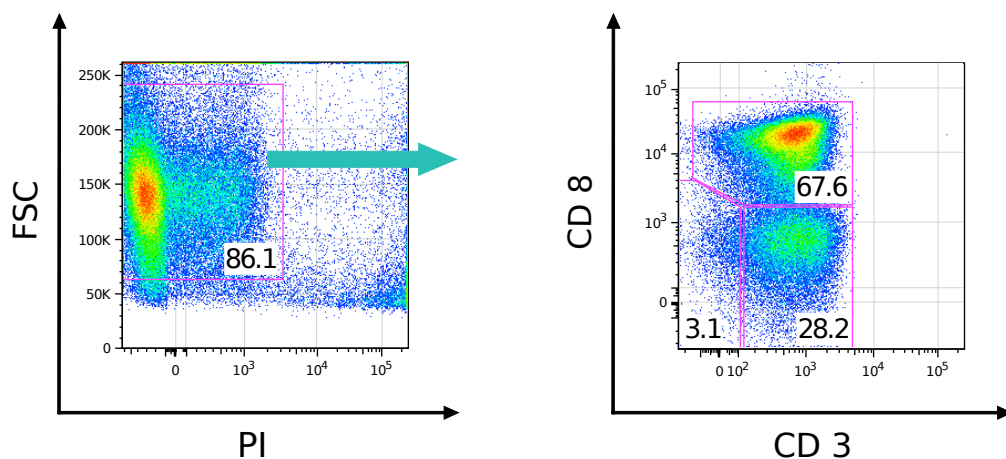


Abb. 3.1: Kulturzellen in FSC/SSC sowie nach T-Zell-Färbung

3.3 Kryokonservierung und Reaktivierung von PBMZs

Nach etwa einer Woche in Kultur kam die Teilungsaktivität der T-Zellen mehr und mehr zum Stillstand, so dass trotz weiterer Stimulation mit IL-2 keine wesentliche Zellexpansion mehr zu erwarten war. Um die Zellen über mehrere Monate hinweg verwenden zu können, wurden sie portionsweise bei -80° konserviert. Jedes Kryokonservierungsröhrchen wurde mit 25x10⁶ Zellen in 1350µl FCS und 150µl Dimethylsulfoxid (DMSO) befüllt und umgehend eingefroren. Ein kontrolliertes und schonendes Einfrieren der Zellen um 1 °C pro Stunde wurde durch die Verwendung eines Kryo-Einfriergerätes (Mr. Frosty, Rochester, New York) erreicht.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Wasserbad auf 50 °C vorgeheizt, in einem 50 ml Falconröhrchen wurden 39 ml PBS vorgelegt. Die Zellen wurden im Wasserbad unter ständigem Schwenken innerhalb von einer Minute aufgetaut und mit einer Messpipette

in das Röhrchen transferiert. Das Kryokonservierungsröhrchen wurde mit PBS gespült.

3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Für die Zellzählung wurden 10 μl der Zelllösung mit 90 μl Trypanblau gemischt, die Zählkammer wurde mit 10 μl bestückt. Danach wurden bei 40facher Vergrößerung jeweils alle vier Quadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl errechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen} \cdot \text{Volumen} \cdot 10^5$$

3.5 FACS-Färbung

Für die FACS-Färbung und -Analyse wurden die Zellen bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, dann wurde mit PBS eine Konzentration von 3×10^6 Zellen pro 100 μl eingestellt. Falls die Zellzählung weniger als 12×10^6 Zellen ergab, wurden diese in 400 μl PBS gelöst.

Auf einer 96-well-Platte (V-bottom) wurden von jedem Patienten in vier Wells 100 μl Zelllösung vorgelegt. Danach wurde die Platte bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen mit 100 μl FCS:PBS im Verhältnis 1:20 für 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Dann wurden 100 μl der Antikörpercocktails hinzu pipettiert und lichtgeschützt 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Zum Waschen wurden 50 μl PBS zugegeben, schließlich wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellpellets in 200 μl PBS gelöst. Zum Ausschluss toter Zellen wurde 10 Minuten vor der Messung mit je 2 μl Propidiumiodid (PI), einem Nukleinsäureinterkalator, inkubiert.

3.6 Konjugation von Antikörpern mit Fluorochromen

Einige Antikörper wurden unkonjugiert bezogen und nachträglich mit dem benötigten Fluorochrom konjugiert. Im Einzelnen handelte es sich dabei um CCR 8, CD103 αE , CCR 1, CCR 5 und CCR 6. Für die Konjugation wurden LYNX Rapid Conjugation Kits (Serotec, Oxford, Großbritannien) verwendet. Zunächst wurde zum zu konjugierenden Antikörper pro 10 μl Volumen 1 μl Modifier Reagens pipettiert. Diese Mischung wurde

auf den lyophilisierten LYXN-Farbstoff gegeben und vorsichtig mehrmals aspiriert. Dann wurde über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden pro 10 μ l eingesetztem Antikörper 1 μ l Quencher Reagens zugesetzt, nach weiteren 30 Minuten konnte der Antikörper verwendet werden.

3.7 Titration der Antikörper

Um die Überfärbung einer Zellprobe zu verhindern und gleichzeitig schwach positive Zellen mitzuerfassen, wurde die optimalen Verdünnungsstufe jedes Antikörpers austriert. Hierzu wurde zunächst wie in Tab. 3.1 dargestellt auf einer 96-well-Platte eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:320 angelegt.

1 (1:10)	2 (1:20)	3 (1:40)	4 (1:80)	5 (1:160)	6 (1:320)
225 μ l PBS + 25 μ l AK	125 μ l PBS + 125 μ l aus 1	125 μ l PBS + 125 μ l aus 2	125 μ l PBS + 125 μ l aus 3	125 μ l PBS + 125 μ l aus 4	125 μ l PBS + 125 μ l aus 5

Tab. 3.1: Verdünnungsreihe für die Antikörpertitration

Die selbst konjugierten Antikörper sowie die Antikörper mit Pacific Blue als Fluorochrom wurden in Titrationsstufen von 1:100 bis 1:3200 verdünnt. Anschließend erfolgte eine FACS-Färbung mit den Zellen eines gesunden Thrombozyten-Spenders. Bei der Auswahl der richtigen Titrationsstufe galten folgende Überlegungen: Die negative Zellpopulation sollte deckungsgleich mit einer ungefärbten Zellprobe erscheinen. Zudem sollten sich negative und positive Population durch einen Helligkeitsunterschied von 2 Log-Stufen von einander abtrennen. Bei Nachbestellung eines Antikörpers wurde nur auf eine erneute Titration verzichtet, wenn Klon und Chargennummer übereinstimmten.

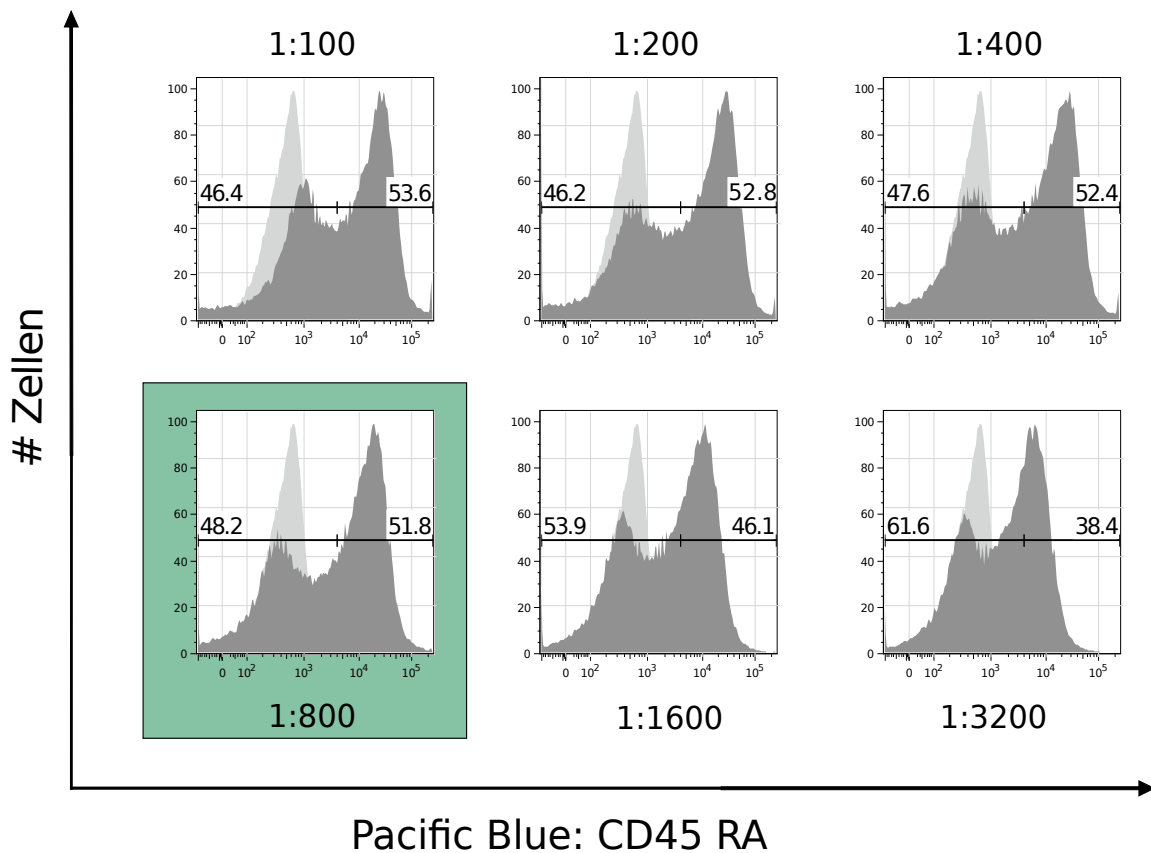


Abb. 3.2: Titration von CD45 RA in der Farbe Pacific Blue

3.8 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden ein BD FACSCanto II und ein BD LSR II (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Konfiguration der Laser und die Funktion der Photomultiplier tubes (PMTs) wurden an jedem Messtag durch einen Performance Check mit dem *Cytometer Setup and Tracking*-Modul (CST, Becton Dickinson) der FACSDiva-Software überprüft. Durch die automatische Anpassung der Spannung, mit der die Signale eines jeden Detektors verstärkt werden, konnte eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse von unterschiedlichen Messtagen erreicht werden.

3.8.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer befinden sich ein oder mehrere Laser sowie eine Messkammer, die von den zu analysierenden Zellen einzeln hintereinander passiert wird. Jede Zelle, die den Laserstrahl durchtritt, verursacht Streulicht, das in einem bestimmten Winkel zum Laserstrahl von Detektoren registriert wird. Das nach vorne abfallende Streulicht, Forward Scatter (FSC), ist ein Maß für die Größe der Zellen, das seitlich abfallende Licht, Sideward Scatter (SSC), für die Granularität der Zellen. So können auch an einer ungefärbten Zellprobe Subpopulationen wie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterschieden werden. Durch die Behandlung von Zellen mit Antikörpern, die kovalent mit Fluorochromen gekoppelt sind, können die Zellen auf das Vorhandensein von verschiedensten Oberflächenrezeptoren untersucht werden.

3.8.2 Spektrale Überlappung

Die Fluorochrome werden beim Durchtritt durch den Laserstrahl zur Emission von Licht einer definierten Wellenlänge angeregt, das mit verschiedenen Detektoren registriert wird. Vor den Detektoren befinden sich Bandpassfilter, um den Wellenlängenbereich, der erkannt wird, einzuschränken. Da sich die Emissionsspektren verschiedener Fluorochrome jedoch überlappen, wird in vielen Kanälen auch das Licht anderer Fluorochrome miterfasst und das Ergebnis so verfälscht.

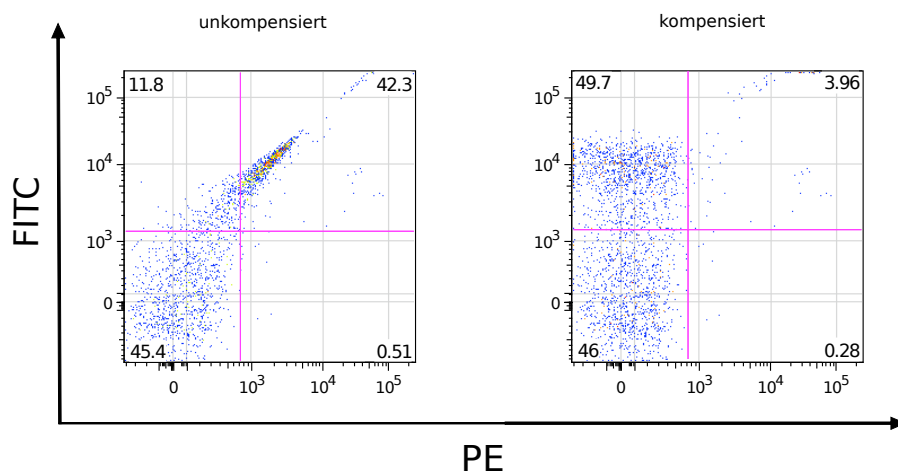


Abb. 3.3: Spektrale Überlappung von FITC im PE-Kanal, vor und nach Kompensation

Eine nur mit Fluorescein (FITC) gefärbte Probe verursacht ein erhebliches Signal auch im Phycoerythrin-Kanal (PE), so dass FITC positive Zellen fälschlicherweise auch gleichzeitig PE positiv erscheinen. Leider gibt es derzeit noch keine „perfekten“ Farbstoffe, die Licht in nur einer Wellenlänge emittieren, so dass man den Prozentsatz an Licht, der von anderen Fluorochromen in einem Kanal beigesteuert wird, durch Kompensation der Daten korrigieren muss.

3.8.3 Kompensation

Um Daten rechnerisch kompensieren zu können, wird eine Kompensationsreihe angelegt, in der in jedem Well nur mit einem Antikörper gefärbt wird. Die Strahlung, die von dieser einen Farbe in den anderen Kanälen registriert wird, muss nachträglich von der gesamten Strahlung im jeweiligen Kanal abgezogen werden. Während der gesamten Messzeit wurden die Daten unkompensiert mit dem Durchflusszytometer erhoben und nachträglich mit der Analyse-Software FlowJo Version 8 (Treestar, Ashland, Oregon) kompensiert.

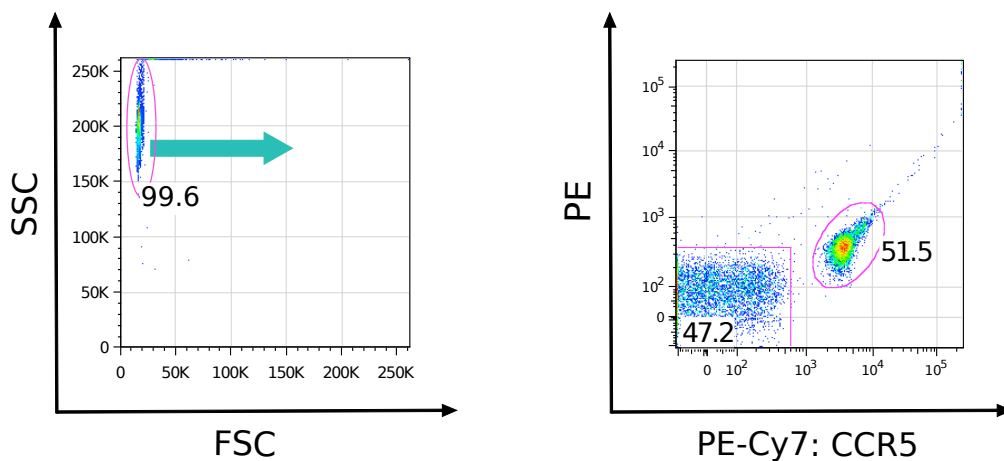


Abb. 3.4: CompBeads im FSC/SSC sowie gefärbt mit PE-Cy7

Für die Kompensation wurden BD CompBeads (Becton Dickinson) verwendet. Compensation Beads sind polysterene Mikropartikel zur Optimierung der Kompensation bei Mehr-Farben-FACS-Analysen. Sie binden an die κ -Ketten jedes Antikörpers, der von

einer bestimmten Spezies gebildet wurde und sind erhältlich für Antikörper aus Hamster, Ratte und Maus. Durch die Negative Control-Beads, die nicht an κ -Ketten binden können, ergibt sich für alle Antikörper eine perfekte Trennung zwischen positiven und negativen Populationen, was insbesondere bei der Kompensation von Homing-Rezeptoren mit Tandemfarbstoffen essentiell sein kann. Diese sollten nämlich immer mit dem im jeweiligen Cocktail verwendeten Antikörper kompensiert werden [40].

Tandemfarbstoffe wie z.B. PE-Cy7 bestehen aus zwei Farbstoffen (PE und Cy7). Nachdem PE durch den Laser angeregt wurde, überträgt es seine Energie auf Cy7, das seinerseits durch die von PE emittierte Wellenlänge, nicht aber durch die des Lasers, erregt werden kann. Cy7 emittiert schließlich Licht einer bestimmten Wellenlänge, die anders ist als die von PE, so dass mit einem Laser unterschiedliche Farbstoffe zur Emission von Licht angeregt werden können.

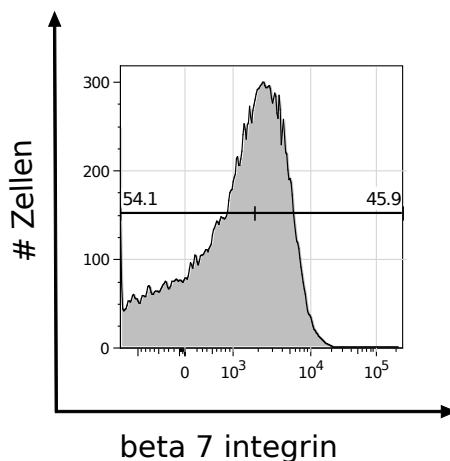


Abb. 3.5: Expressionsmuster von beta 7 integrin

Bei der Färbung von Homing-Rezeptoren mit Tandemfarbstoffen entsteht darüber hinaus oft das Problem, dass sich für diese keine definierte Trennung zwischen positiven und negativen Zellen ergibt, sondern ein Kontinuum, wie für $\beta 7$ integrin dargestellt. So entstehen massive Probleme bei der Kompensation der Daten, die man durch die Verwendung von CompBeads vermeiden kann.

Da CompBeads nicht mit Propidiumiodid gefärbt werden können, wurde jeden Tag eine Mischung aus alten und frischen Zellen mit $2 \mu\text{l}$ PI inkubiert und gemessen.

Die Kompensationsreihe für die Fluorochrome bestand aus 11 wells, in denen die Beads mit je nur einer Farbe markiert wurden. Kombinationsfarbstoffe wie PE-Cy7 und APC-Cy7 sollten dabei immer mit dem exakt gleichen Antikörper, der auch im Cocktail verwendet wird, kompensiert werden. Da in jedem Cocktail ein anderer mit PE-Cy7 gekoppelter Antikörper verwendet wurde (CD103 α E, CD 62L, CCR 5 und CCR 6),

mussten in der Kompensationsreihe diese vier Antikörper gefärbt werden. Kompensiert wurden die Fluorescence-minus-one-Kontrollen und die Antikörpercocktails mit der jeweils zugehörigen Kompensationsmatrix.

In einer Eppendorf-Küvette wurden 1000 μl FCS 1:20 vorgelegt. Die CompBeads wurden gevortext, dann wurden je 3 Tropfen CompBeads Negative Control und 3 Tropfen Anti-Mouse Ig κ in die Küvette gegeben und erneut gevortext. Pro Well wurden 100 μl eingesetzt und 5 Minuten inkubiert. Schließlich wurden 100 μl der Antikörperverdünnung hinzupipettiert und mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 50 μl PBS wurde bei 200g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Pellets in 200 μl PBS resuspendiert.

3.8.4 Fluoreszenz minus Eins

Oberflächenrezeptoren, die auf Zellen nur sehr schwach exprimiert werden oder bei denen keine definierte Trennung zwischen positiven und negativen Zellen zu erwarten ist, erfordern zur Unterscheidung von schwach gefärbten und negativen Zellen die Mitfärbung von FMO-Kontrollen [40, 41]. Dazu wurden FMO-Cocktails angefertigt, in denen jeweils eine Farbe des Gesamtcocktails fehlte. Bei der Auswertung der Kontrollen wurde anschließend im Kanal der fehlenden Farbe die maximal zu erwartende Helligkeit ohne diese Farbe bestimmt. Es wurden dabei immer 0,5 Prozent falsch-positive Zellen akzeptiert, dann wurde die so ermittelte Grenze auf die Testproben übertragen.

Da CD 8 und CD 3 Marker darstellen, für die ein Alles-Oder-Nichts-Prinzip gilt, die also entweder von einer Zelle stark exprimiert werden oder überhaupt nicht, wurde auf eine FMO für diese Marker verzichtet. CD3⁺CD8⁺ und CD3⁺CD8⁻ Zellen trennten sich immer so gut voneinander und von den CD3⁻ Zellen ab, dass die Festlegung der Gates optisch sehr genau möglich war.

Allerdings wurden während der Auswertung der Daten auch die Grenzen und Problematiken einer für alle Patienten einheitlichen FMO-Kontrolle mit in Kultur genommenen PBMZs eines gesunden Spenders offensichtlich. Um die in der FMO ermittelten Gates auf eine Patientenprobe anwenden zu können, sollten beide - abgesehen von einer Farbe - identisch sein bezüglich der verwendeten Antikörper und der enthaltenen Zellen. Dies bedeutet, dass die Zellen in der FMO-Kontrolle eigentlich die gleichen sein sollten wie diejenigen, die man analysieren möchte. Dies ist jedoch aus verschiedenen Gründen unrealistisch: Unmittelbar nach einer Transplantation verfügen die Patienten nur über

sehr wenige Zellen, so dass für jeden Messtag große Mengen an Blut notwendig gewesen wären, um zusätzliche FMOs anfertigen zu können. Darüber hinaus hätte man für jeden Cocktail mit fünf Homing-Rezeptoren jeweils 5 FMO-Kontrollen (pro Patient!) benötigt. Dies wäre finanziell kaum mehr realisierbar gewesen, hätte den zeitlichen Rahmen für Durchführung der FACS-Färbungen und -Messungen gesprengt und den Aufwand für die Datenauswertung vervielfacht. Um die Lage der FMO-Grenzen zu verbessern, wurden diese immer in den Patientenproben überprüft und bei Bedarf korrigiert.

3.8.5 Problematik der Durchflußzytometrie bei geringen Zellzahlen

Bauart und Funktionsweise eines Durchflußzytometers bieten neben einigen Vorteilen auch schwerwiegende Nachteile, die im Folgenden erläutert werden sollen: Als äußerst problematisch erwies sich paradoxerweise die extreme Genauigkeit der FACS-Analyse. Denn es werden vom Gerät nicht nur Zellen, sondern auch Zelltrümmer und Verunreinigungen der Zellproben jeder Art als Events mitanalysiert. Gerade feine Staubkörner oder Zelltrümmer fluoreszieren dabei in praktisch allen Farben und finden sich in geringer Zahl in jeder Probe. Auch durch sorgfältiges Spülen der Zytometervorrichtung und akkurates Gating lässt sich dies niemals gänzlich vermeiden. Im Regelfall ergibt sich dadurch aber nur eine sehr geringe Verfälschung der Messergebnisse, da die zu analysierenden Zellen in aller Regel deutlich in der Überzahl sind und zudem diese Form der Verfälschung bei allen Proben gleichermaßen auftritt. Gemäß dem Gesetz der großen Zahlen nähert sich der gemessene Wert bei steigender Anzahl der Events immer mehr dem tatsächlichen Wert an. Wenn allerdings -wie im vorliegenden Fall- die Anzahl der zu analysierenden Zellen (in unserem Fall T-Zell-Subpopulationen) nur sehr klein oder bei Aplasie überhaupt nicht vorhanden ist, können solche Verunreinigungen die Messergebnisse entscheidend verfälschen. So erklären sich auch die scheinbar hohen Werte in der Gruppe ohne akute GvHD in der relativen Expression bei vielen Rezeptoren. In dieser Gruppe befanden sich nämlich 5 Patienten, die im gesamten Messzeitraum überhaupt kein T-Zell-Engraftment zeigten (Anteil der T-Zellen an den gesamten Leukozyten unter 2 Prozent). Diese Form der Verfälschung wird besonders deutlich bei solchen Rezeptoren, die in Wirklichkeit nur wenig oder gar nicht auf den untersuchten Zellen exprimiert werden. Bei diesen ergeben sich nämlich in Gruppen mit normalen Zellzahlen niedrige (reale) Werte, während in Analyseproben mit geringen Zellzahlen überraschend hohe Werte gemessen werden. Zur

Überprüfung dieser nur scheinbar hohen Werte sollte neben dem Anteil der positiven Zellen immer auch die absolute Anzahl der positiven Zellen pro μl Blut berechnet werden.

3.8.6 Gating-Strategie

Die Messwerte aus der Durchflusszytometrie wurden mit der Analyse-Software FlowJo ausgewertet. Das Vorgehen erfolgte immer nach dem selben Prinzip und wird in Abb. 3.6 und Abb. 3.7 veranschaulicht.

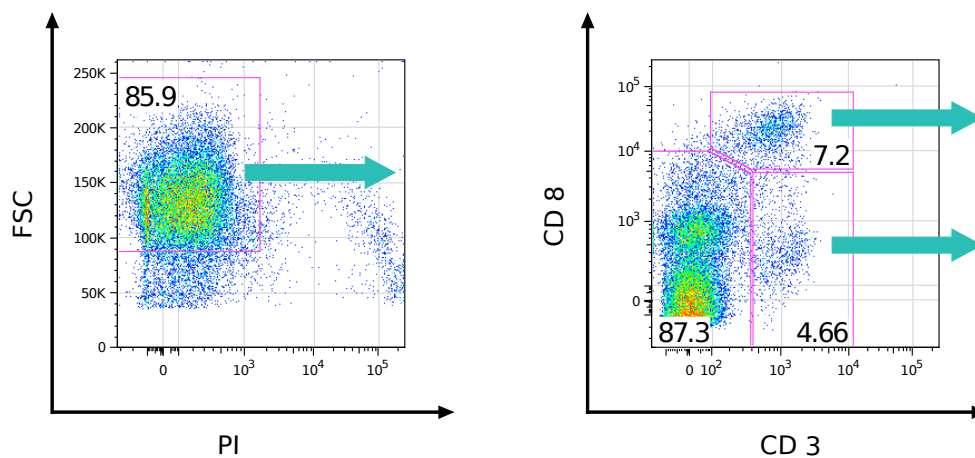


Abb. 3.6: Ausschluss von toten und zu kleinen Zellen, Identifikation von T-Zell-Subpopulationen

Die Daten wurden zunächst kompensiert, tote Zellen wurden durch Färbung mit PI identifiziert und exkludiert. Außerdem wurden zu kleine Zellen und Zelltrümmer auf Grund ihrer Darstellung im FSC-Kanal ausgeschlossen. Anschließend wurden die Abgrenzung der zytotoxischen T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+$) und der Helfer T-Zellen ($\text{CD3}^+\text{CD8}^-$) von den Nicht-T-Zellen (CD3^-) vorgenommen.

Dann wurde für jeden Rezeptor die Grenze zwischen positiven und negativen Populationen mit Hilfe der FMO-Kontrollen ermittelt. Diese Grenzen wurden in die Patientenproben übernommen und anhand dieser kontrolliert. Die Expression der untersuchten Homing-Rezeptoren wurde für die genannten T-Zell-Subpopulationen getrennt dargestellt.

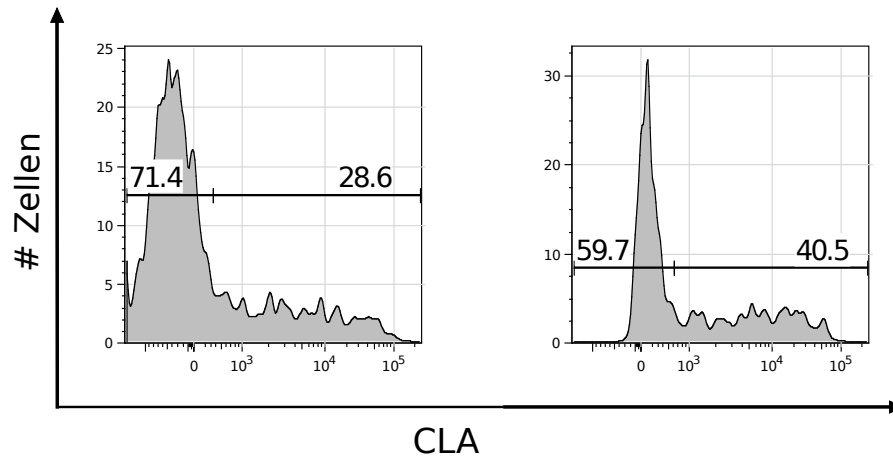


Abb. 3.7: Expression von CLA auf zytotoxischen T-Zellen (links) und Helfer-T-Zellen (rechts)

Abb. 3.8 zeigt zwei Patientenproben am selben Messtag. Die Grenzen zwischen $CD3^+$ und $CD3^-$ Zellen und damit die CD 3-Dichte unterscheidet sich bei beiden Patienten sichtbar. Für Patient 25 liegt sie bei 5×10^2 , bei Patient 31 dagegen bei 7×10^2 . Die Lage dieser Grenze ist deshalb von besonderer Wichtigkeit, da Myelozyten ($CD3^-$ Zellen) bei den meisten Homing-Rezeptoren eine höhere Expression zeigen als T-Zellen. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, also eine falsch hohe Expression von einzelnen Homing-Rezeptoren durch Miterfassung von Myelozyten zu erhalten, wurde die Lage der Gates an jedem Messtag für jeden Patienten kontrolliert und korrigiert.

3.8.7 Antikörper-Cocktails

Die PBMZs der Patienten wurden mit Antikörpern gegen 19 Homing-, Entzündungs- und Chemokinrezeptoren gefärbt. Diese verteilten sich auf vier Antikörper-Cocktails, die immer einige Tage vor Messbeginn vorbereitet und über einen Zeitraum von maximal zehn Wochen lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Zusätzlich wurden in jedem Cocktail zur Identifikation der T-Zell-Subpopulationen CD 3- und CD 8-Oberflächenantigene gefärbt. Die Zugabe von PI erfolgte zehn Minuten vor Messbeginn. So wurden pro Cocktail maximal acht verschiedene Fluorochrome gefärbt. Die Antikörper-Cocktails wurden mit 0,15% PBS-Natriumazid angesetzt, um einer Kontamination der

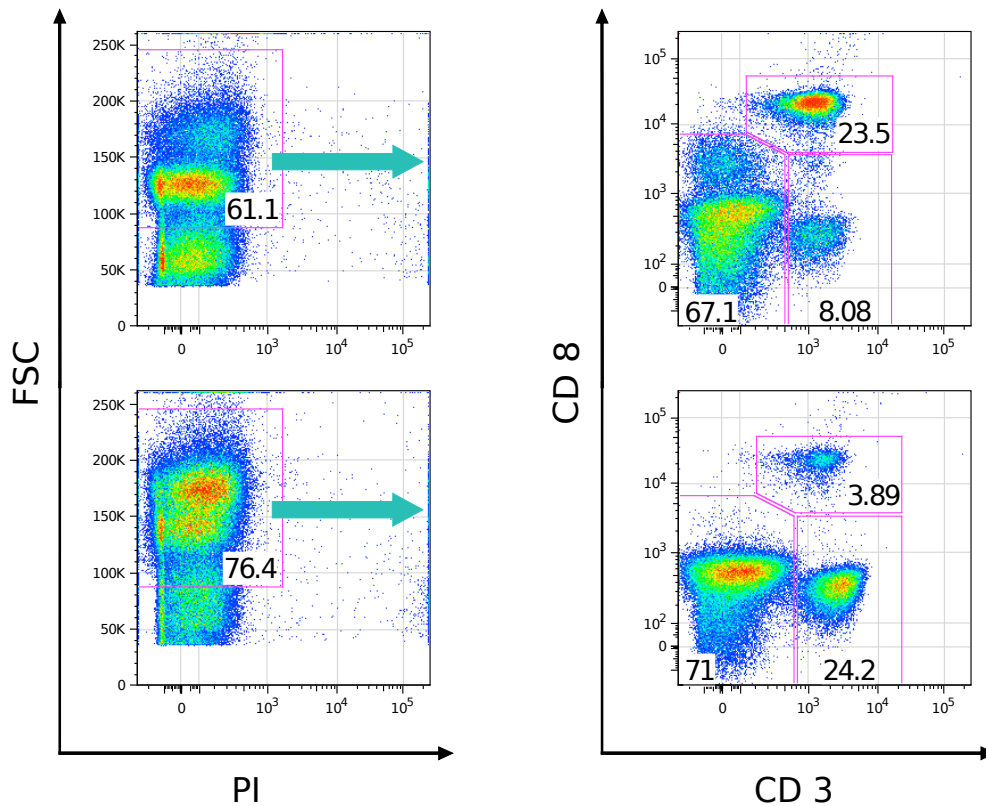


Abb. 3.8: CD3-Dichte von Patient 25 (oben) und Patient 31 (unten)

Cocktails vorzubeugen.

Cocktail 1 enthält mit CCR9 und $\beta 7$ integrin Rezeptoren, die in der Literatur mit dem Homing in Darmgewebe assoziiert werden [32]. CCR 8, CLA und CCR 4 im Cocktail 2 sollen als Haut-spezifische Rezeptoren die Einwanderung der Zellen in die Haut ermöglichen [42]. Die Kombination der restlichen Marker in den übrigen Cocktails und das jeweilige Fluorochrom ergaben sich darüber hinaus zwangsläufig aus der nur begrenzten Verfügbarkeit einzelner Antikörper.

3.8.8 Untersuchung der Koexpression von Rezeptoren

Durch die Mehrfachfärbung der Zellen mit Hilfe der Antikörper-Cocktails konnten diese nicht nur auf das Vorhandensein einzelner Marker, sondern auch auf eine Koexpression

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma	Land
CCR9	PE	112509	R&D Systems	Minnesota
$\beta 7$ integrin	FITC	FIB504	Biologend	Niederlande
CD49d alpha4	APC	9F10	Biologend	Niederlande
CD103 alpha E	PE-Cy7	LF61	AbD Serotec	Großbritannien
CD25	Pacific Blue	BC96	Biologend	Niederlande
CD3	APC-Cy7	HIT3a	Biologend	Niederlande
CD8	AmCyan	SK1	Becton Dickinson	Deutschland
CCR8	PE	191704	R&D Systems	Minnesota
CLA	FITC	HECA-452	Biologend	Niederlande
CCR4	APC	205410	R&D Systems	Minnesota
CD62L	PE-Cy7	DREG-56	Biologend	Niederlande
CD45RA	Pacific Blue	HI100	Biologend	Niederlande
CD3	APC-Cy7	HIT3a	Biologend	Niederlande
CD8	AmCyan	SK1	Becton Dickinson	Deutschland

Tab. 3.2: Antikörper-Kombinationen in Cocktail 1 und 2

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma	Land
CXCR3	PE	49801	R&D Systems	Minnesota
Leukotrien B4R1	FITC	203/14F11	Biologend	Niederlande
CXCR2	APC	5E8/CXCR2	Biologend	Niederlande
CCR5	PE-Cy7	45523	R&D Systems	Minnesota
CD69	Pacific Blue	B115508	Biologend	Niederlande
CD3	APC-Cy7	HIT3a	Biologend	Niederlande
CD8	AmCyan	SK1	Becton Dickinson	Deutschland
CCR2	PE	48607	R&D Systems	Minnesota
CCR1	FITC	53504	R&D Systems	Minnesota
CXCR1	APC	8F1/CXCR1	Biologend	Niederlande
CCR6	PE-Cy7	53103	R&D Systems	Minnesota
CD3	APC-Cy7	HIT3a	Biologend	Niederlande
CD8	AmCyan	SK1	Becton Dickinson	Deutschland

Tab. 3.3: Antikörper-Kombinationen in Cocktail 3 und 4

von Rezeptoren hin untersucht werden. Da die Analyse sämtlicher Rezeptorkombinationen den Arbeitsaufwand für den Export der Daten und natürlich auch für die statistischen Analysen vervielfacht hätte, musste eine Auswahl getroffen werden.

Um festzustellen, wie sich die Rezeptorexpression bei gesunden und an aGvHD erkrankten Patienten unterscheiden könnte, wurden zunächst FACS-Plots mit FlowJo analysiert. Anhand von zwei ausgewählten Patienten, einem mit schwerster aGvHD und einem anderen nicht erkrankten Patienten, wurde gezielt nach Rezeptorkombinationen gesucht, die bei diesen Patienten vorkamen. Für viele Kombinationen, insbesondere natürlich bei Rezeptoren, die ohnehin nur sehr schwach exprimiert wurden, konnten keine doppelt positiven Zellpopulation bei einem oder beiden Patienten gefunden werden. Für fünf Kombinationen konnten allerdings gut abgegrenzte T-Zell-Subpopulationen ausgemacht werden. Auf den zytotoxischen T-Zellen traf dies auf die Koexpression von $\beta 7$ integrin und CD 49d α 4, CCR 8 und CLA, sowie CD 62L und CLA zu, auf den Helfer-T-Zellen wurden CCR 4 und CLA sowie $\beta 7$ integrin und CD 49d α 4 von einem erheblichen Anteil an Zellen gemeinsam exprimiert. Diese Kombinationen wurden in die statistischen Analysen aufgenommen.

Dafür wurde auf die Auswertung von einigen weniger interessanten Rezeptoren verzichtet. Dies betrifft u.a. CD 49d α 4, da dieser Marker von praktisch 100% aller Zellen exprimiert wurde. CCR 4 wird nur auf Helfer-T-Zellen, CCR 8 nur auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert, so dass jeweils nur die relevante Expression Eingang in die statistischen Betrachtungen fand. Insgesamt ergaben sich 36 verschiedene Parameter, die im Zeitverlauf analysiert wurden. Mit dem Zytometer direkt gemessen wurden die relativen Expressionswerte (prozentualer Anteil der T-Zellen, die einen Marker exprimieren). Ausgehend davon wurde errechnet, wie viele T-Zellen mit dem entsprechenden Rezeptor am jeweiligen Messtag pro μ l Blut zu finden waren.

$$\text{Anzahl } CD3^+CD8^-CLA^+ \text{ Zellen}/\mu\text{l} = \\ WBC/\mu\text{l} \cdot \text{Anteil } CD3^+CD8^- \text{ Zellen} \cdot \text{Anteil } CD3^+CD8^-CLA^+ \text{ Zellen}$$

3.9 Studiendesign und Patientenkollektiv

Mit den beschriebenen Methoden wurde Blut von insgesamt 66 Patienten der Medizinischen Klinik II und der Kinderklinik der Universität Würzburg untersucht, die zwischen Mai 2009 und Mai 2010 einer allogenen oder autologen SZT bzw. einer Nabelschnur-

bluttransplantation unterzogen wurden. Das Ziel war dabei zunächst, in kurzer Zeit die größtmögliche Anzahl an unterschiedlichen Proben von allogenen oder autolog transplantierten Patienten zu gewinnen, nicht nur für diese Arbeit sondern auch für spätere Untersuchungen mit anderem Schwerpunkt oder Einzelfallbeobachtungen. So wurden auch einige Patienten mit chronischer GvHD zunächst inkludiert, deren allogene SZT bereits mehr als ein Jahr zurück lag oder Patienten, bei denen SZT und/oder GvHD-Beginn bekanntermaßen nicht im Beobachtungszeitraums statt fanden.

Die Blutentnahmen erfolgten über ein Jahr hinweg jeden Montag, Mittwoch und Freitag. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden noch am selben Tag durchgeführt, um zu verhindern, dass die vitalen T-Zellen Homing-Rezeptoren außerhalb des Körpers herab regulieren. Von den stationären Patienten wurden so in der Regel drei Messungen pro Woche durchgeführt. Nach Entlassung der frisch transplantierten Patienten konnten die Analysen nur fortgeführt werden, wenn ein Termin in der Knochenmarktransplantations-Ambulanz (KMT-Ambulanz) auf einen der Messtage fiel.

Die Studie erfolgte mit Einwilligung der Ethikkommission (Aktenzeichen 173/08) der Universität Würzburg. Gemäß Ethikvotum konnte von den teilnehmenden Patienten insgesamt 320 ml Blut entnommen werden. Dies ergäbe bei Verwendung von 10ml Monovetten eine maximale Anzahl von 32 Messtagen, die als Obergrenze festgelegt wurde. Diese Grenze wurde bei Patient 27 auf Grund einer auffälligen Rezeptorkonstellation um 3 Messtage überschritten. Tatsächlich wurden allerdings bei den erwachsenen Patienten 7,5ml Monovetten, bei den Patienten aus der Kinderklinik 2,7ml Monovetten verwendet, so dass die Vorgaben der Ethikkommission in allen Fällen weit unterschritten wurden. Als Beobachtungszeitraum waren zunächst die ersten 100 Tage nach Transplantation geplant, doch wurden bei Unterschreitung der 32 Messtage und Verfügbarkeit der Patienten auch regelmäßig Messungen nach Tag 100 vorgenommen.

Eine Besonderheit ergibt sich bei den Patienten 29 und 47, die bei gleicher Grunderkrankung mehrmals allogenen transplantiert wurden. Da die erste SZT von Patient 47 vor Beginn der Messungen statt fand, liegen für diesen Patienten nur experimentelle Daten zur zweiten SZT vor, so dass auch nur die zweite Transplantation betrachtet werden konnte. Von Patient 29 wurde im Verlauf aller drei Transplantationen Blut analysiert. Allerdings erlitt dieser Patient bei seiner ersten SZT ein Transplantatversagen, so dass keine Regeneration der Spender-Zellen erfolgte. Daher erfolgte nach vier Wochen eine erneute allogene Transplantation, die zur erwünschten Regeneration der Hämatopoese führte. Leider erlitt der selbe Patient nach mehreren Monaten einen Rückfall der Grund-

erkrankung, so dass eine dritte allogene SZT eingeleitet wurde. Da bei den beiden späteren Transplantationen jeweils eine Rekonstitution der Hämatopoese erfolgte, wurden beide Transplantationen in die statistischen Untersuchungen aufgenommen, obwohl diese nicht im stochastischen Sinne unabhängig voneinander sind.

Nach Gewinnung der Proben erfolgte die Auswahl von geeigneten Patienten für die statistischen Analysen dieser Arbeit. Akteneinsicht wurde im Detail nur bei Patienten vorgenommen, die die folgenden Kriterien erfüllten:

- allogene SZT im Beobachtungszeitraum
- Mindestanzahl von 6 Messtagen nach Transplantation
- kontinuierliche Messungen über mehrere Wochen, um den Verlauf der Homing-Rezeptor-Expression darstellen zu können.

Elf Patienten aus der Medizinischen Klinik II wurden wegen einer zu geringen Anzahl an Messungen ausgeschlossen, oder da die SZT bereits weit vor Beginn der Messungen statt fand. Fünf Patienten aus der Universitätskinderklinik erhielten eine autologe Transplantation und kamen nicht für die statistische Auswertung in Frage. Drei weitere wurden mehrere Monate vor Messbeginn transplantiert und daher ausgeschlossen. So verblieben zunächst 47 Patienten (48 Fälle) von denen die Auswertung der Patientenakten vorgenommen wurde. Tab. 3.4 fasst allgemeine Informationen zu diesen zusammen.

Patient	Diagnose	Spender	Konditionierung	aGvHD
1	B-NHL	B-MM	ATG, CTX, Flu, TBI	0
2	B-NHL	CW-MM	ATG, Bu, Flu, Treo	0
3	ALL	A-MM	ATG, Eto, TBI	1
7	ALL	CW-MM	ATG, CTX, TBI	1
8	OMF	MRD	ATG, CTX, Flu, TBI, Uro	0
9	cMPE	MUD	ATG, Bu, Flu	1
12	Neuroblastom	haploident	Flu, Mel, OKT3, Thio	3
15	biphänotyp. AL	MRD	TBI, VP-16, Hodenaufsä	1
16	B-NHL	haploident	ATG, Flu, Mel, TBI, Thio	0
17	B-NHL	DRB1-MM	ATG, CTX, Flu	1
21	B-NHL	MRD	Flu, Treo	2
23	AML	DRB1-MM	ATG, Flu, Mel	4

24	ALL	MUD	ATG, Bu, Flu	0
25	B-NHL	MUD	ATG, Bu, Flu	1
26	ALL	MRD	TBI, VP-16	3
27	MDS	MUD	ATG, Flu, Mel, TT	0
29/2.Tx	AML	MRD	keine	0
29/3.Tx	AML	MRD	ATG, Flu, Mel, Thio	0
30	B-NHL	haploident	ATG, Flu, Ifo, Mel, Thio	0
31	AML	MRD	Flu, Treo	0
32	ALL	MUD	ATG, CTX, TBI	1
33	AML	DQB1-MM	ATG, Flu, Treo	0
34	OMF	DRB-MM	ATG, Bu, Flu	3
35	ALL	MUD	ATG, Bu, CTX, Mel	1
36	AML	MUR	ATG, Flu, Treo	1
37	ALL	DQB1-MM	ATG, TBI, VP-16	1
38	OMF	A-MM	ATG, Bu, Flu	4
39	B-NHL	MRD	Bu, Flu	3
40	AML	MUD	ATG, Flu, Treo	4
41	AA	B-MM	ATG, CTX, TBI	2
42	AML	MUR	ATG, Flu, Treo	1
43	biphänotyp. AL	MRD	Flu, Treo	4
45	B-NHL	MUD	ATG, CTX, TBI	0
47	T-NHL	MUD	ATG, Bu, Flu	4
48	M. Hodgkin St. III	MUD	ATG, Flu, Treo	3
49	AML	haploident	ATG, Flu, Mel, Thio	0
50	OMF	CW-MM	ATG, Bu, Flu	2
51	AML	MUD	ATG, Flu, Treo	0
52	AML	MUD	ATG, Flu, Mel	0
53	AML	aA-MM	ATG, Flu, Treo	1
54	cMPE	CW-MM	ATG, Flu, Mel	1
55	MDS	MRD	Flu, Mel, Thio	1
56	B-NHL	MUD	ATG, Bu, Flu	1
57	AML	MUD	ATG, Flu, Treo	1
58	B-NHL	CW-MM	ATG, Flu, Mel	0
59	Oligosekr. Myelom	MUD	ATG, Flu, Treo	1

60	ALL	MRD	Eto, TBI	2
61	MDS	MUD	ATG, Flu, Mel, Thio	0

Tab. 3.4: Patientencharakteristika

3.10 Beteiligte Personen und jeweilige Aufgaben

Die Aufklärung der Patienten über Umfang und Ziel der Studie wurde von den behandelnden Ärzten der Transplantationsstation und von den Ärzten der KMT-Ambulanz vorgenommen. Das Einverständnis der Patienten zur Teilnahme wurde schriftlich dokumentiert. Die Blutentnahmen erfolgten durch die Stationsschwester im Rahmen des morgendlichen Routinelabors. Die Blutproben wurden innerhalb von 60 Minuten nach Abnahme abgeholt und im Kühlschrank gelagert oder der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zugeführt. Die klinische Dokumentation der GvHD-Ausprägung auf der Station erfolgte anhand eines umfassenden GvHD-Befundbogens, der vom behandelnden Arzt täglich auszufüllen war. Der klinische Befund an Haut und Darm wurde umschrieben, darüber hinaus erfolgte eine GvHD-Stadieneinteilung sowie eine vergleichende Einschätzung des aktuellen Befunds mit Vorbefunden.

Bei ambulanten Patienten wurde dann Blut für die Analysen gewonnen, wenn die Vorstellung in der KMT-Ambulanz an einem Messtag, also an einem Montag, Mittwoch oder Freitag erfolgte. Die Verantwortung für die regelmäßige Blutabnahme teilten sich die behandelnden Ärzte und die medizinischen Fachangestellten der KMT-Ambulanz. Das Blut aus der Ambulanz wurde unmittelbar nach Abnahme an das Zentrallabor weitergeleitet und dort im Kühlschrank gelagert. Die Abholung erfolgte, sobald alle für diesen Tag vorgesehenen Patienten erschienen waren, spätestens aber um 14 Uhr. Die GvHD-Dokumentation durch die Ambulanzärzte erfolgte tabellarisch durch Beurteilung der einzelnen Organsysteme anhand der Glucksberg-Kriterien.

Die Eltern der Patienten aus der Universitätskinderklinik wurden von den behandelnden Pädiatern über Inhalt und Umfang der Studie aufgeklärt. Jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag erfolgten die Blutentnahmen durch das Team der Kinderklinik von allen autolog oder allogenen transplantierten Kindern.

3.11 Logistik und statistische Auswertung

An der Universitätsklinik Würzburg werden pro Woche etwa drei Patienten einer allogenen Transplantation zugeführt. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird nur in Ausnahmefällen mehr als eine Transplantation pro Tag durchgeführt. In der Regel werden die Transplantationen für Dienstag, Mittwoch oder Donnerstag geplant. Dies bedingte, dass es keine fixen Tage nach Transplantation gab, an denen von jedem Patient Zellen analysiert werden konnten, da das Zeitraster der Patienten in Bezug auf die festen Messtage verschoben war. Die Vergleichbarkeit der Datensätze war daher zunächst nicht möglich. Als Kompromiss wurden Messzeiträume gebildet und die Werte aus diesen Zeiträumen, ggf. nach Mittelwertbildung über einen Zeitraum, miteinander verglichen. Da die Patienten die ersten Wochen nach SZT in stationärer Betreuung verbringen müssen, konnten v.a. in den ersten vier Wochen nach SZT mehr oder weniger lückenlose Datensätze erhoben werden. Nach dieser Zeit nahm die Anzahl der Messtage deutlich ab, so dass ein monatsweises Mitteln sinnvoller erschien, um nicht eine unnötig große Zahl an fehlenden Werten zu erzeugen. Da nur von etwa der Hälfte der Patienten (insbesondere von den kränkeren!) auch nach Monat 3 (Tag 83) noch regelmäßig Messungen vorgenommen werden konnten, erschien die Analyse der Messdaten nach Monat 3 nicht mehr aussagekräftig. Insgesamt ergaben sich so sich sechs Messzeiträume, die miteinander verglichen werden konnten:

- Messzeitraum 1 = Mittelwert Woche 1 (Tag 0-6)
- Messzeitraum 2 = Mittelwert Woche 2 (Tag 7-13)
- Messzeitraum 3 = Mittelwert Woche 3 (Tag 14-20)
- Messzeitraum 4 = Mittelwert Woche 4 (Tag 21-27)
- Messzeitraum 5 = Mittelwert Monat 2 (Tag 28-55)
- Messzeitraum 6 = Mittelwert Monat 3 (Tag 56-83)

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Gruppen in Bezug auf die Expression der verschiedenen Rezeptoren zu beurteilen, wurde zum einen die Expression aller Rezeptoren im Zeitverlauf untersucht. Besondere Beachtung wurde dabei der Rezeptorexpression in Woche 4 geschenkt: in der Regel wird der Leukozyten-Nadir in der 2. Woche nach SZT durchschritten wird, so dass in Woche 4 das Engraftment weitestgehend erfolgt

ist. Bei einigen Patienten können zudem die ersten Spender-T-Zellen in der Zirkulation detektiert werden, deren Expressionsmuster Hinweise auf eine sich entwickelnde aGvHD geben könnte.

Nach der Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs wurde anschließend die Rezeptorexpression vor der ersten klinischen Manifestation der aGvHD untersucht. Zu diesem Zweck wurden Patienten ausgewählt, bei denen innerhalb von 14 Tagen vor GvHD-Beginn mindestens eine Messung vorgenommen wurde. Falls innerhalb dieser Frist mehrere Werte zur Auswahl standen, wurde jeweils der unmittelbar nächste in Bezug auf den Krankheitsausbruch gewählt. Der mediane Expressionslevel von Patienten mit aGvHD Grad 1 (n=12) wurde anschließend mit Patienten mit aGvHD 2-4 (n=10) verglichen.

Die Umformung der Daten sowie die Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 20 Premium (IBM, Armonk, New York). Für die deskriptive Statistik wurde der Gruppenmedian als robusteres Maß den Gruppenmittelwerten vorgezogen, außerdem wurden der 1. und der 3. Quartilswert der Gruppen ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Dokumentation

Nach der Erhebung der experimentellen Daten erfolgte im September 2010 die Auswertung der Patientenakten von besagten 47 Patienten. Alle Patienten befanden sich somit schon im mindestens 4. Monat nach SZT, so dass die ersten 100 Tage bei allen Patienten bereits verstrichen waren. Eine erneute Akteneinsicht mit Vervollständigung und Aktualisierung der klinischen Daten wurde im Januar 2012 vorgenommen.

Bei der Aktenanalyse fiel eine erhebliche Heterogenität in der klinischen Dokumentation auf, die sich insbesondere durch die derzeit noch nicht standardisierte Diagnostik bei beginnender aGvHD erklären lässt. Trotzdem wurde versucht, mit den vorhandenen klinischen und laborchemischen Daten eine möglichst genaue Einteilung der Patienten in Gruppen gemäß der Glucksberg-Seattle-Kriterien vorzunehmen. Für Grenzfälle galten folgende Überlegungen:

- Die einmalige Angabe einer aGvHD Grad 0,5 ohne therapeutische Konsequenz (systemische Steroidgabe oder andere Erhöhung der Immunsuppression) und ohne klinisches Korrelat wurde nicht als akute GvHD vermerkt. Insbesondere das Symptom „geringe Hautrötung“ war nicht ausreichend, um den Start der aGvHD zu markieren.
- Eine klinisch dokumentierte GvHD Grad 0,5 wurde als aGvHD gewertet, wenn eine typische Klinik (Hautrötung, -schuppung) beschrieben war und/oder eine Erweiterung der Therapie erfolgte.
- Es erfolgte eine kritische Betrachtung von widersprüchlichen Aktenvermerken, z.B. wurde die Angabe „GvHD der Leber Grad 1“ bei normalem Labor ignoriert. Bei Diarrhö und Nachweis eines Durchfallerreger wie z.B. Clostridium difficile wurde die weniger wahrscheinliche Differentialdiagnose „GvHD des Darms“ verworfen.

- Fälle von GvHD nach Tag 100 wurden bei entsprechender Klinik als akute GvHD gewertet.

Anhand des maximal erreichten GvHD-Scores, der sich aus der klinischen Beobachtung, Laborergebnissen und der histologischen Beurteilung von Biospien aus Haut und/oder Darm und/oder Leber ergab, wurden die insgesamt 47 Patienten (48 Fälle) in drei Gruppen eingeteilt.

- GvHD 0° (n=17/16)
- GvHD 1° (n=17)
- GvHD 2°-4° (n=14)

Dieser Einteilung lagen mehrere Überlegungen zu Grunde:

Patienten, die im gesamten Beobachtungszeitraum, also bis zur Erhebung der klinischen Parameter aus den Patientenakten, keinerlei Zeichen einer akuten GvHD entwickelten, dienten als Negativkontrolle. Bei Patienten mit mindestens zweitgradiger GvHD wurde eine Diagnosesicherung bioptisch angestrebt und eine gezielte Therapie eingeleitet. Diese Patienten stellen die Positivkontrolle dar. Da eine erstgradige GvHD im klinischen Alltag meist nicht behandelt wurde und verschiedenste Differentialdiagnosen in Frage kamen, blieb oft unklar, ob es sich bei einem flüchtigen Exanthem der Haut auch wirklich um eine Abstoßungsreaktion gehandelt hat. Insofern war bei der Intermediärgruppe nicht klar, ob das Rezeptorprofil eher der Negativgruppe oder der Positivgruppe ähneln würde. Um eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Gruppen nicht zu verwischen, wurden Patienten mit aGvHD Grad 1 als eigenständige Gruppe betrachtet.

Nach Auswertung der Patientenakten wurden weitere drei Patienten von den Analysen ausgeschlossen. Dabei handelte es sich um die Patienten Nr. 12, 15, und 23. Zwar waren von allen Patienten mehr als 6 Messungen vorgenommen worden, doch lag keine davon im ersten Monat nach SZT. Dies bedingte, dass die aGvHD bei diesen Patienten schon weit vor Beginn der Messungen, nämlich 38, 86 und 51 Tage zuvor, auftrat. Es erschien daher aus mehreren Gründen nicht sinnvoll, diese Patienten in die Untersuchung einzubeziehen: Da der Verlauf der Rezeptorexpression dargestellt werden sollte, besaßen die punktuellen Daten im 2. und 3. Monat nach SZT nur eine sehr geringe Aussagekraft. Zudem war völlig offen, ob und wie sich die anbehandelte oder eventuell schon ausgeheilte GvHD dieser Patienten auf die Rezeptorkonstellation auswirken könnte. Es wurde daher entschieden,

nur Patienten zu inkludieren, bei denen Messwerte zum GvHD-Beginn und damit auch vor Therapiebeginn vorlagen.

4.2 Patientencharakteristika

16 Patienten (17 Fälle) entwickelten keine klinisch oder histologisch nachweisbaren Zeichen einer Abstoßungsreaktion. Allerdings wurden Haut-, Leber- oder Darmbiopsien nur bei klinisch begründetem Verdacht entnommen, so dass in der Regel der GvHD Grad 0 nur bei wenigen Patienten auch histologisch verifiziert wurde.

16 Patienten entwickelten während des Mess- und Beobachtungszeitraums ein aGvHD, deren Ausprägung nicht schwerer als Grad 1 bewertet wurde. Definitionsgemäß beschränkte sich dabei die aGvHD auf die Haut der Patienten ohne die Einbeziehung anderer Organsysteme. Die Diagnose „aGvHD Grad 1“ ist dadurch in hohem Maße untersucherabhängig, da keine laborchemisch fassbaren Parameter für das Grading eingesetzt werden können. Innerhalb der Patientengruppe mit moderater, schwerer und lebensbedrohlicher GvHD fanden sich 12 Patienten. Von diesen zeigten 10 Patienten (83%) ein Exanthem der Haut, genauso viele litten unter einem Befall des Gastrointestinaltrakts, während nur bei 7 Patienten (58,3%) die Leber mitbetroffen war.

Patienten, die keine aGvHD entwickelten, erlitten in unserem Patientenkollektiv öfter Rückfälle oder eine Progression ihrer Grunderkrankung (29,4%). Bei Patienten mit aGvHD im Verlauf waren die Rückfallraten niedriger (Grad 1: 12,5%, Grad 2-4: 8,3%). Trotz des geringeren Rückfallrisikos war bei Patienten mit aGvHD Grad 2-4 aber das Gesamtüberleben schlechter als in den Vergleichsgruppen. Nur 4 Patienten (33,3%) waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch lebendig, während bei Grad 1 14 Patienten (87,5%) und ohne aGvHD 13 Patienten (76,5%) überlebten. Dies belegt den negativen Einfluss einer schweren aGvHD auf die Transplantat-assoziierte Mortalität betroffener Patienten.

Bemerkenswert groß war der Anteil von Patienten ohne aGvHD, die Stammzellen eines gegengeschlechtlichen Spenders erhielten (76,5%). Demgegenüber fand sich bei aGvHD Grad 1 nur bei 6 Patienten (37,5%) ein Geschlechts-Mismatch, bei Grad 2-4 war dies bei 5 Patienten (41,7%) der Fall.

Einen Überblick über weitere wichtige Patientencharakteristika im Gruppenvergleich gibt Tab. 4.1.

	Grad 0 (n=17)	Grad 1 (n=16)	Grad 2-4 (n=12)
Alter			
Spannbreite	9-72 Jahre	9-70 Jahre	10-64 Jahre
Durchschnitt	52,8 Jahre	42,8 Jahre	48,3 Jahre
Geschlecht			
Männlich	9 (52,9%)	6 (37,5%)	8 (66,7%)
Weiblich	8 (47,1%)	10 (62,5%)	4 (33,3%)
Diagnose			
NHL	6 (35,3%)	3 (18,8%)	3 (25%)
AML	7 (41,2%)	4 (25%)	1 (8,3%)
ALL	1 (5,9%)	5 (31,3%)	2 (16,7%)
MDS	2 (11,8%)	1 (6,3%)	0
cMPE	1 (5,9%)	2 (12,5%)	3 (25%)
Andere	0	1 (6,3%)	3 (25%)
Konditionierung			
Myeloablative	14 (82,4%)	15 (93,8%)	11 (91,7%)
Reduzierte Intensität	3 (17,6%)	1 (6,3%)	1 (8,3%)
Mismatch			
HLA	7 (41,2%)	6 (37,5%)	4 (33,3%)
Geschlecht	13 (76,5%)	6 (37,5%)	5 (41,7%)
aGvHD-Prophylaxe			
CSA, MMF	5 (29,4%)	7 (43,8%)	6 (50%)
CSA, MTX	4 (23,5%)	3 (18,8%)	2 (16,7%)
Andere	8 (47,1%)	6 (37,5%)	4 (33,3%)
Organbeteiligung aGvHD			

4.3 Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allogener SZT

Haut		16 (100%)	10 (83,3%)
Darm		0	10 (83,3%)
Leber		0	7 (58,3%)
Status der Grunderkrankung			
Klinische Remission	12 (71,6%)	13 (81,3%)	3 (25%)
Rückfall oder Progression	5 (29,4%)	2 (12,5%)	1 (8,3%)
Überleben bis zum Stichtag			
Lebendig	13 (76,5%)	14 (87,5%)	4 (33,3%)
Tot	4 (23,5%)	2 (12,5%)	8 (66,7%)
aGvHD-Start an Tag			
Median		28	26
Spannbreite		10-110	7-147

Tab. 4.1: Wichtige Patientencharakteristika im Gruppenvergleich

4.3 Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allogener SZT

Das Leukozyten-Engraftment wurde von den behandelnden Ärzten der Station durch tägliche Routineblutabnahmen in den ersten Wochen nach Transplantation überwacht. Da die Anfertigung eines kleinen Blutbilds die zusätzliche Messung in einem anderen Labor erfordert hätte, wurde der White Blood Count (WBC) der Kliniker verwendet: die Leukozytenzahlen des jeweiligen Messtages wurden aus dem Klinik-Laborsystem Lauris exportiert. Anschließend wurden diese Daten geplottet, darüber hinaus wurden sie aber auch verwendet zur Berechnung der absoluten T-Zell-Zahlen und der jeweiligen Anzahl rezeptorpositiver T-Zell-Subpopulationen.

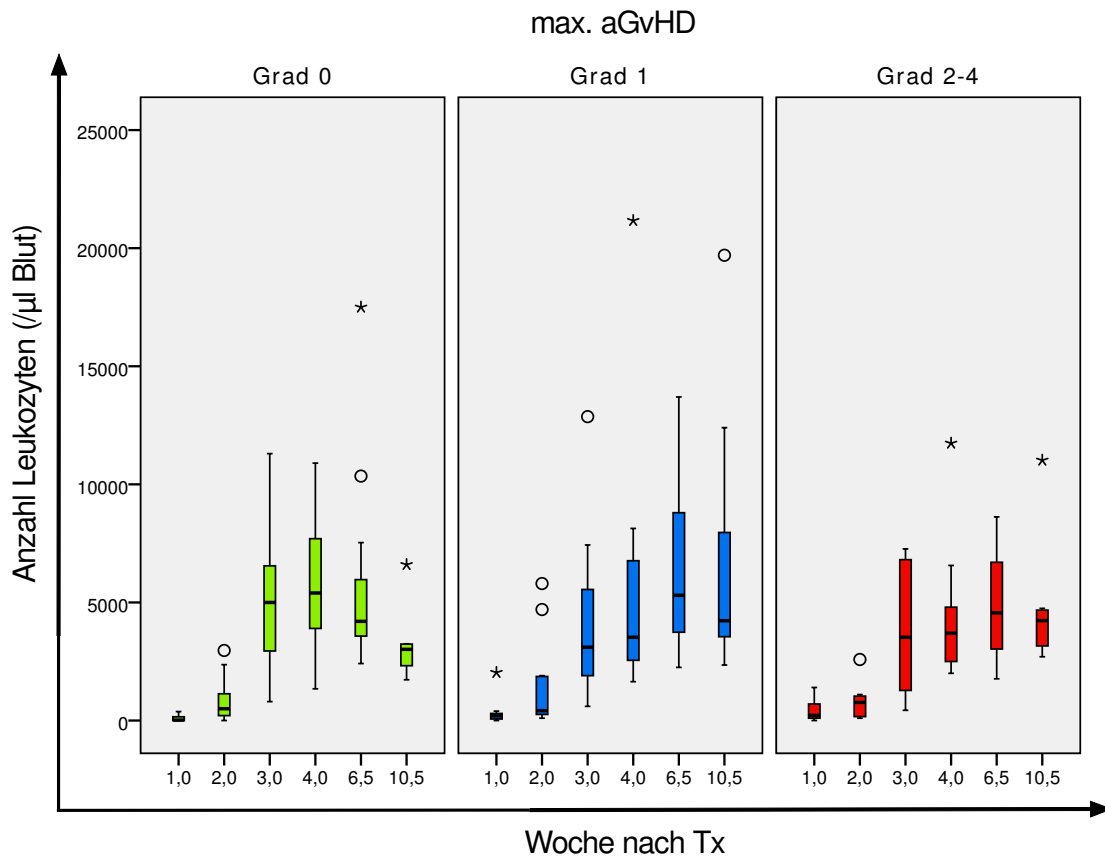


Abb. 4.1: Leukozyten-Engraftment im Gruppenvergleich

Abb. 4.1 zeigt die Zunahme an weißen Blutkörperchen aufgeschlüsselt nach maximal erreichtem aGvHD-Score im Verlauf der ersten 3 Monate nach allogener Transplantation: Ausgehend von einer Aplasie in Woche 1 erholte sich die Leukozytopoese in der Woche 2 zunächst langsam, um in der 3. Woche bei sehr vielen Patienten sprunghaft anzusteigen. Zum Ende des ersten Monats nach allogener SZT nimmt die Streuung der Messwerte in allen Gruppen zu.

Beim genauen Betrachten fiel darüber hinaus auf, dass bei einigen Patienten, die später eine aGvHD entwickelten, bereits in der ersten Woche nach SZT Leukozyten in nennenswerter Anzahl detektierbar waren (Grad 1: $200/\mu\text{l}$, Grad 2-4: $220/\mu\text{l}$). Dies war bei Patienten ohne aGvHD weniger der Fall (Median: $20/\mu\text{l}$, 1.Quartilswert: $0/\mu\text{l}$, 3.Quartilswert: $163/\mu\text{l}$).

4.3 Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allogener SZT

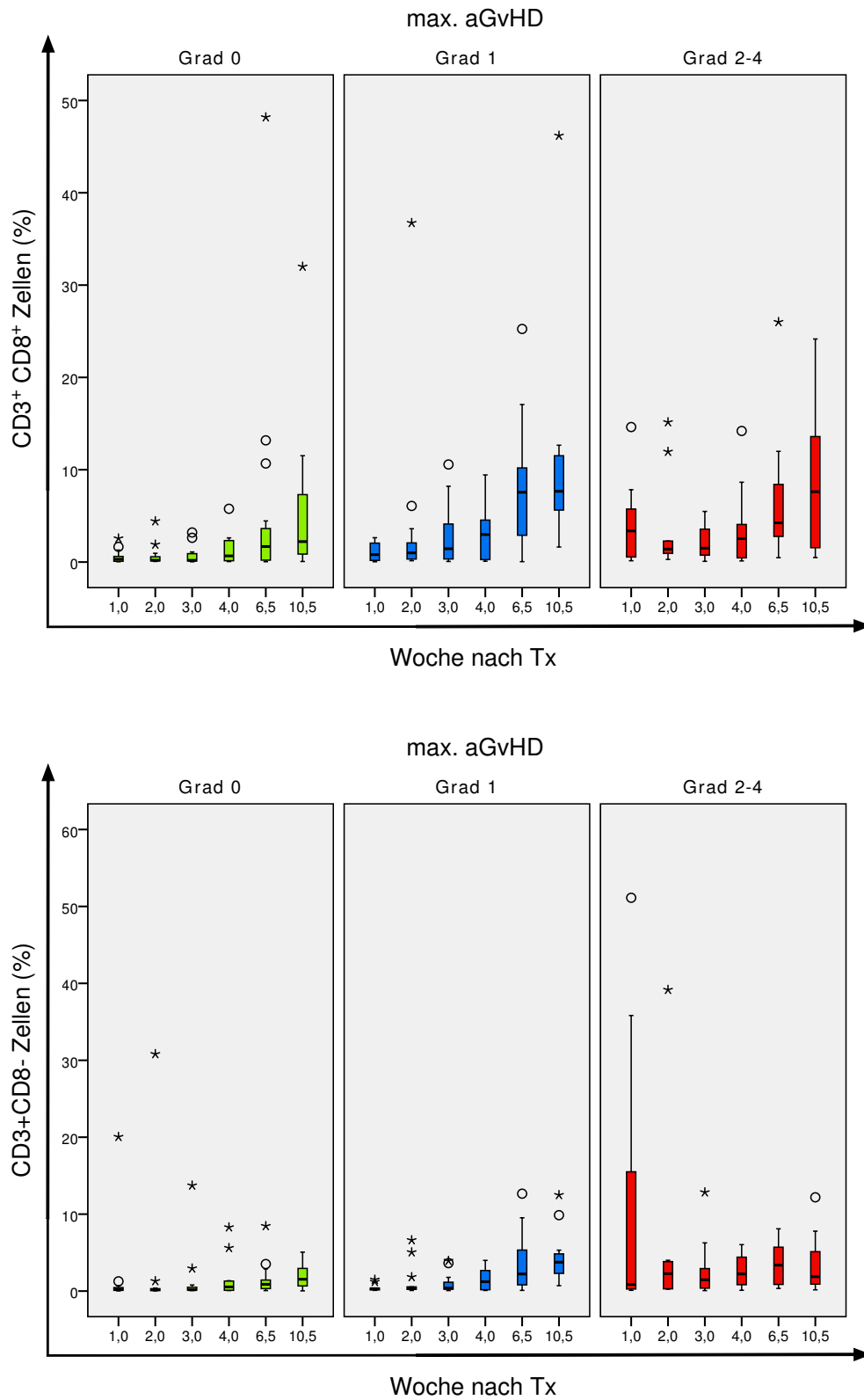


Abb. 4.2: Anteil der Zytotoxischen T-Zellen (oben) und der Helfer-T-Zellen (unten) am WBC

4.3 Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allogener SZT

T-Zell-Subpopulationen waren in den GvHD-Gruppen schon von Woche 1 an vorhanden, während in der Vergleichsgruppe ohne GvHD die Lymphopoiese nur zögerlich einsetzte:

Medianer Anteil **zytotoxischer T-Zellen** in Woche 1:

Grad 0:	0,30% (1.Quartilswert: 0,08% / 3. Quartilswert: 0,67%)
Grad 1:	0,80% (1.Quartilswert: 0,16% / 3. Quartilswert: 2,08%)
Grad 2-4:	3,38% (1.Quartilswert: 0,37% / 3. Quartilswert: 6,79%)

Medianer Anteil an **T-Helfer-Zellen** in Woche 1:

Grad 0:	0,22% (1.Quartilswert: 0,09% / 3. Quartilswert: 0,49%)
Grad 1:	0,32% (1.Quartilswert: 0,14% / 3. Quartilswert: 0,58%)
Grad 2-4:	0,86% (1.Quartilswert: 0,18% / 3. Quartilswert: 25,7%)

Ein Viertel der Patienten mit leichter GvHD hatte somit weniger als 0,16% CD3⁺CD8⁺ Zellen und weniger als 0,14% CD3⁺CD8⁻ Zellen in der 1. Woche nach SZT. Für Patienten mit aGvHD ab Grad 2 ergaben sich für ein Viertel der Patienten weniger als 0,37% CD3⁺CD8⁺ Zellen und weniger als 0,18% CD3⁺CD8⁻ Zellen in Woche 1. Auffällig waren in der Gruppe ohne aGvHD 5 Patienten (Nr. 24, 29/3.SZT, 30, 49, 61), die während des gesamten Beobachtungszeitraums (mindestens bis Tag 35) kein T-Zell-Engraftment aufwiesen. Das T-Zell-Engraftment wurde dabei definiert als das Auftreten von klar abgrenzbaren Populationen CD3⁺CD8⁺ Zellen und/oder CD3⁺CD8⁻ Zellen in der FACS-Analyse, die einen Anteil von mindestens 2% der PBMZs ausmachen. Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, da so in der Gruppe ohne aGvHD fast ein Drittel der Patienten nicht oder nicht in relevantem Ausmaß über die Zellen verfügte, die als Effektorzellen der GvHD angenommen werden und in der Studie untersucht werden sollten.

Der höhere Anteil an T-Zellen in Verbindung mit dem oft etwas früher einsetzenden Leukozyten-Engraftment schlägt sich auch in der absoluten Zahl der T-Zell-Subpopulationen pro μl Blut nieder, die bei den Patienten mit aGvHD ermittelt werden konnten. So ergaben sich in Woche 1 nach SZT für die zytotoxischen T-Zellen wie auch für die T-Helfer-Zellen höhere Medianwerte in den GvHD-Gruppen:

Anzahl **zytotoxischer T-Zellen** in Woche 1:

Grad 0:	0,03 Zellen/ μl (1.Quartilswert: 0 / 3. Quartilswert: 0,38)
Grad 1:	0,54 Zellen/ μl (1.Quartilswert: 0,01 / 3. Quartilswert: 3,29)

4.3 Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allogener SZT

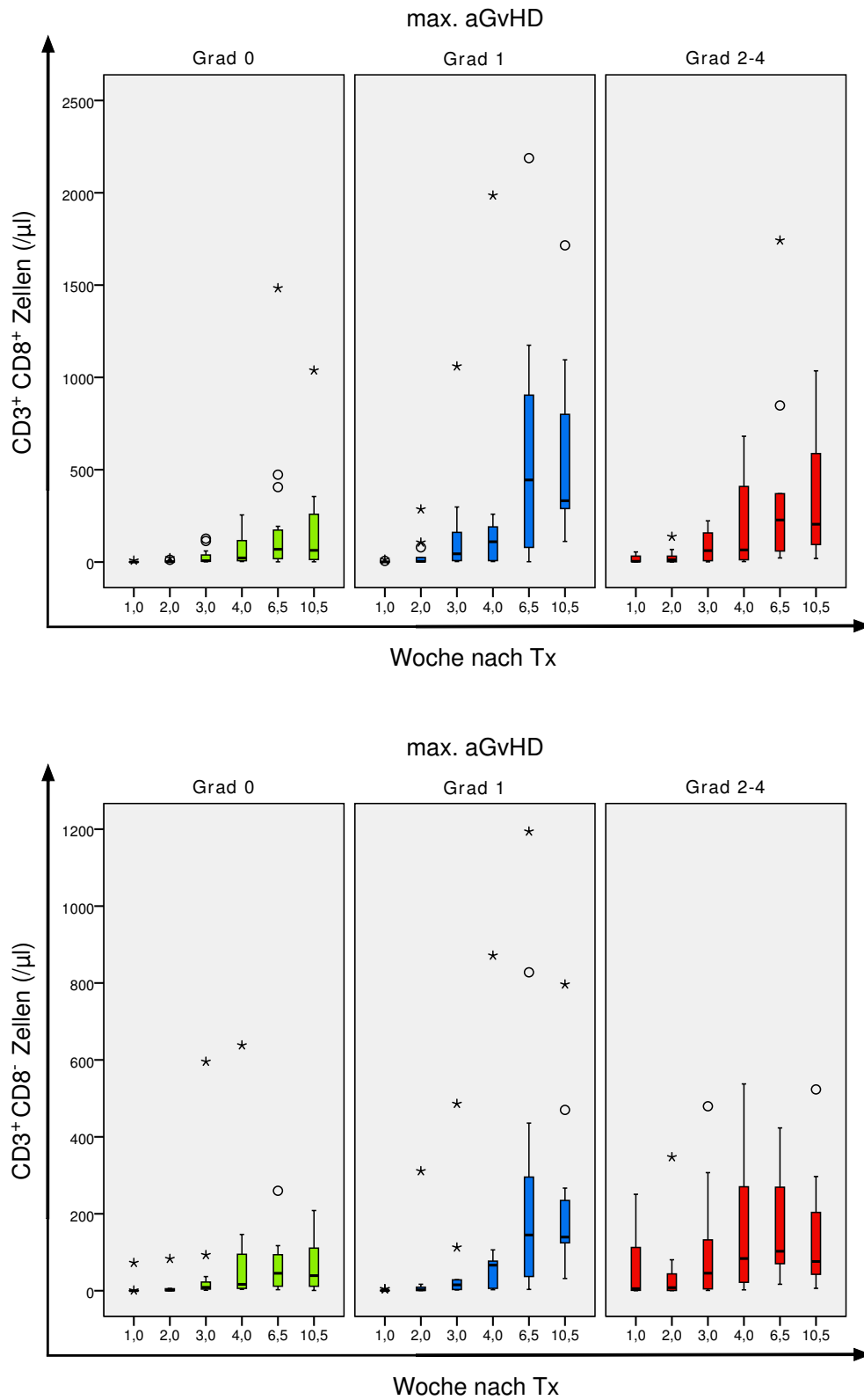


Abb. 4.3: Anzahl an zytotoxischen T-Zellen (oben) und Helfer-T-Zellen (unten) pro μl Blut

4.3 Engraftment der Leukozyten und der T-Zell-Subpopulationen nach allogener SZT

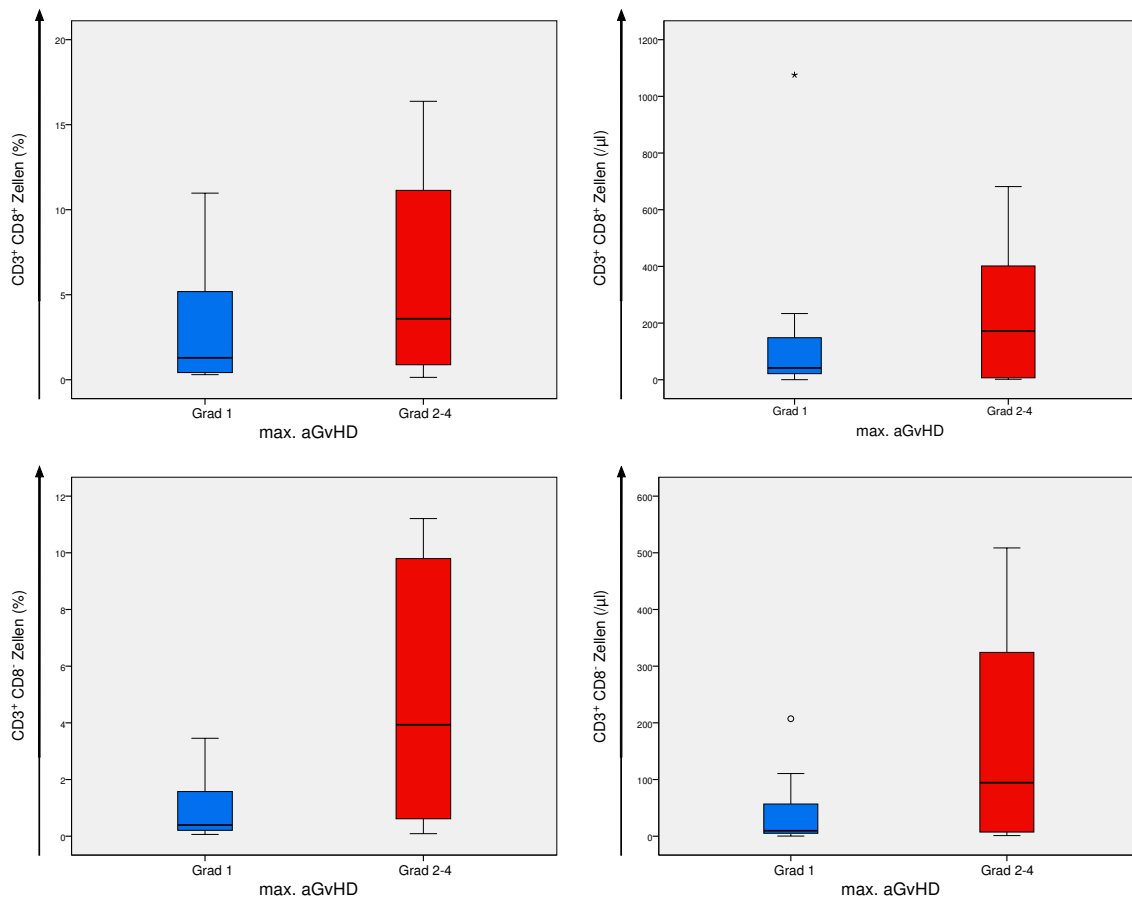


Abb. 4.4: Anteil und Anzahl von zytotoxischen T-Zellen (oben) und T-Helfer-Zellen (unten) vor Beginn der aGvHD

Grad 2-4: 3,83 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 1,22 / 3. Quartilswert: 40,03)

Anzahl an **T-Helfer-Zellen** in Woche 1:

Grad 0: 0,02 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 0 / 3. Quartilswert: 0,21)

Grad 1: 0,28 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 0,06 / 3. Quartilswert: 1,42)

Grad 2-4: 5,36 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 0,50 / 3. Quartilswert: 133,3)

Die Gesamtzahl an Leukozyten vor aGvHD-Beginn unterschied sich in beiden Gruppen nicht (Grad 1: 3300/ μ l, Grad 2-4: 3305/ μ l). Dabei betrug der Anteil von zytotoxischen T-Zellen im Median bei Grad 1 1,3%, bei Grad 2-4 3,6%. Umgerechnet in zytotoxische T-Zellen pro μ l Blut waren das 41,7 bei Grad 1 und 171,8 bei Grad 2-4. Dies entspricht

einer etwa 4fach höheren Anzahl zytotoxischer T-Zellen bei aGvHD ab Grad 2. Der Anteil der T-Helfer-Zellen lag bei Grad 1 im Median bei 0,4%, bei Grad 2-4 bei 3,9%. Für die T-Helfer-Zellen ergaben sich bei aGvHD Grad 1 9,6 Zellen/ μ l, bei Grad 2-4 94,4 Zellen/ μ l. Damit war die Gesamtzahl an T-Helfer-Zellen um ein 10faches höher, wenn die Patienten innerhalb der folgenden zwei Wochen eine mindestens 2. gradige aGvHD entwickelten.

4.4 Expressionsmuster auf T-Zellen

Die dynamische Entwicklung in der Expression von 36 verschiedenen Homing-Rezeptoren bzw. Rezeptorkombinationen konnte anhand der relativ anteiligen Expression und der absoluten Anzahl positiver T-Zell-Subpopulationen in 3 verschiedene Expressionsmuster kategorisiert werden. Oft fand sich dabei für einen Rezeptor der gleiche Expressionstyp auf den zytotoxischen T-Zellen und den Helfer-T-Zellen.

Die meisten der untersuchten Rezeptoren entsprachen dem Expressionstyp 1. Bei diesem zeigte sich ein geringer werdender Anteil an rezeptorpositiven Zellen im Zeitverlauf, meist abnehmend bis auf insgesamt niedrige Werte (etwa 5-10% bezogen auf die untersuchte Subpopulation). Andere Rezeptoren zeigten eine eher konstante Expression im Zeitverlauf auf unterschiedlich hohem Niveau (Expressionstyp 2). Als Expressionstyp 3 wurde die dynamisch fluktuierende Expression mit größeren interindividuellen Unterschieden definiert. Die absolute Anzahl rezeptorpositiver Zellen nahm bei allen Expressionstypen zu, doch wurden bei Typ 2 und 3 deutlich höhere Werte erreicht als bei Typ 1.

Auf Grund der großen Anzahl an untersuchten Rezeptoren bzw. Rezeptorkombinationen können aus Platzgründen nicht alle Median- und Quartilswerte sowie sämtliche Verlaufsgrafiken gezeigt werden. Die ausgewählten Beispielrezeptoren in Kap. 4.4.1, Kap. 4.4.2 und Kap. 4.4.3 sind jedoch repräsentativ für alle übrigen Rezeptoren mit dem gleichen Expressionstyp.

Die große Anzahl der untersuchten Rezeptoren stand im krassen Gegensatz zum sehr überschaubaren Patientenkollektiv. Im Messzeitraum von Juni 2009 bis Mai 2010 konnten nicht mehr als 45 verwertbare Datensätze gesammelt werden. Anhand dieser 45 Datensätze wurden insgesamt 36 unterschiedliche Parameter auf Helfer-T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen im Zeitverlauf analysiert. Außerdem wurde die Expression dieser Rezeptoren vor GvHD-Beginn zwischen 12 Patienten mit GvHD Grad 1 und 10 Patienten mit aGvHD Grad 2-4 beurteilt. Das Verhältnis *Patientenzahl:Anzahl untersuchte*

Parameter ist damit aber äußerst ungünstig. Aus Sicht der Autorin würde sich bei einer Varianzanalyse mit großer Wahrscheinlichkeit eines oder mehrere (zufällig) signifikante Ergebnisse ergeben. Daher wurde auf eine ANOVA bewusst verzichtet.

4.4.1 Expressionstyp 1: Rezeptoren mit abnehmender, niedriger Expression

Der Verlauf und die Veränderung der Rezeptorexpression vom Typ 1 wird anhand des Markers CXCR 2 auf zytotoxischen T-Zellen beispielhaft erläutert. Ein ähnlicher Verlauf ließ sich auf den zytotoxischen T-Zellen für die Rezeptoren CCR 9, CD 103 α E, CD 25, Leukotrien B4R1, CCR 5, CD 69, CCR 2, CCR 1, CCR 6, CLA und auch bei der Koexpression von CLA und CCR 8 sowie der Koexpression von CLA und CD 62 L zeigen. Auf den T-Helfer-Zellen fand sich diese Entwicklung bei den Rezeptoren CCR 9, CD 103 α E, CD 25, Leukotrien B4R1, CXCR 2, CCR 5, CD 69, CCR 2, CCR 1 und CCR 6.

In allen drei Gruppen nahm der Anteil CXCR2⁺ zytotoxischer T-Zellen im Zeitverlauf ab. Dies zeigte sich sowohl an den sinkenden Medianwerten im Verlauf der ersten drei Monate nach SZT, als auch an einer geringer werdenden Streuung der Messergebnisse. Dabei war der Abfall in der Gruppe ohne aGvHD stärker (Median in Woche 1: 63,5%, in Monat 3: 13,6%) als in der Gruppe bis Grad 1 (Median in Woche 1: 42,6%, in Monat 3: 13,1%). Letztere zeigte wiederum einen stärkeren Abfall als die Gruppe mit Grad 2-4 (Median in Woche 1: 22,6%, in Monat 3: 9,2%). Patienten ohne aGvHD blieben allerdings im gesamten Messzeitraum ein eher inhomogenes Kollektiv (1.Quartilswert: 7,3%, 3.Quartilswert: 49,6% im Monat 3).

Einhergehend mit einer Stabilisierung der Lymphopoiese stieg die absolute Anzahl an CD3⁺CD8⁺CXCR2⁺ Zellen im peripheren Blut bei allen Patienten langsam an. In der Gruppe ohne aGvHD war dabei die Zahl CD3⁺CD8⁺CXCR2⁺ Zellen eher niedriger als in den GvHD-Gruppen. Im 3. Monat war die Anzahl CD3⁺CD8⁺CXCR2⁺ Zellen am größten bei aGvHD Grad 1 (40,4/ μ l), gefolgt von Grad 2-4 (12,8/ μ l). Bei Patienten ohne aGvHD ergaben sich 7,9/ μ l.

Anschließend wurde die CXCR 2-Expression unmittelbar vor GvHD-Beginn zwischen Patienten mit erstgradiger aGvHD und Patienten ab aGvHD Grad 2 verglichen. Für den Anteil CD3⁺CD8⁺CXCR2⁺ Zellen ergab sich bei aGvHD Grad 1 ein Median von 15,2%,

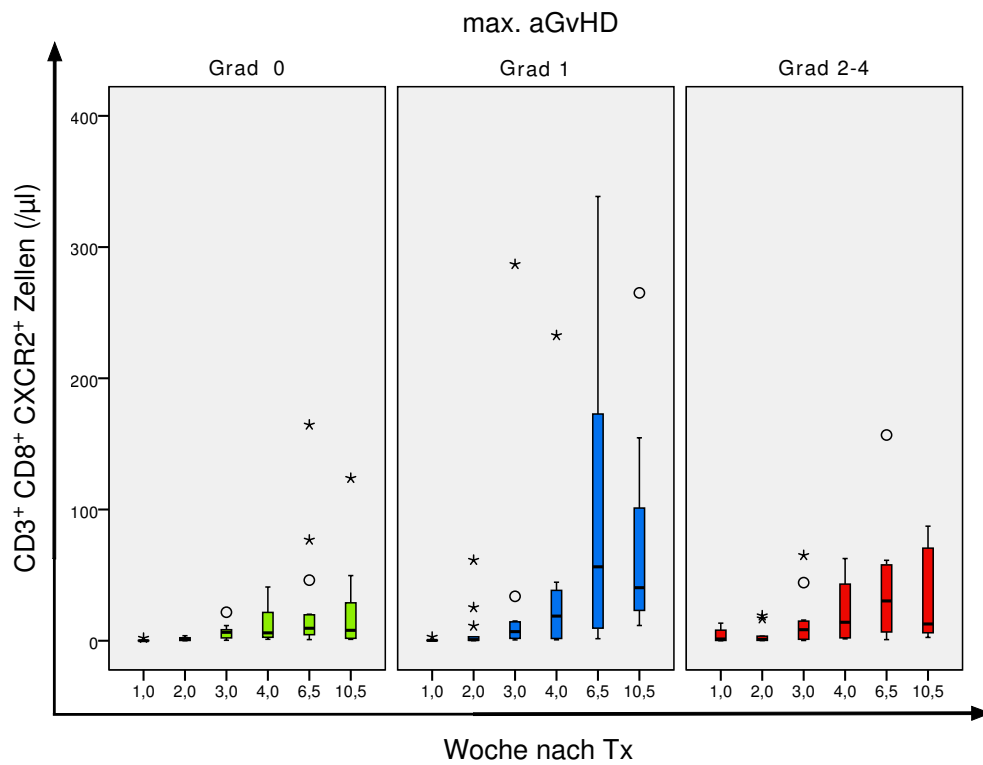
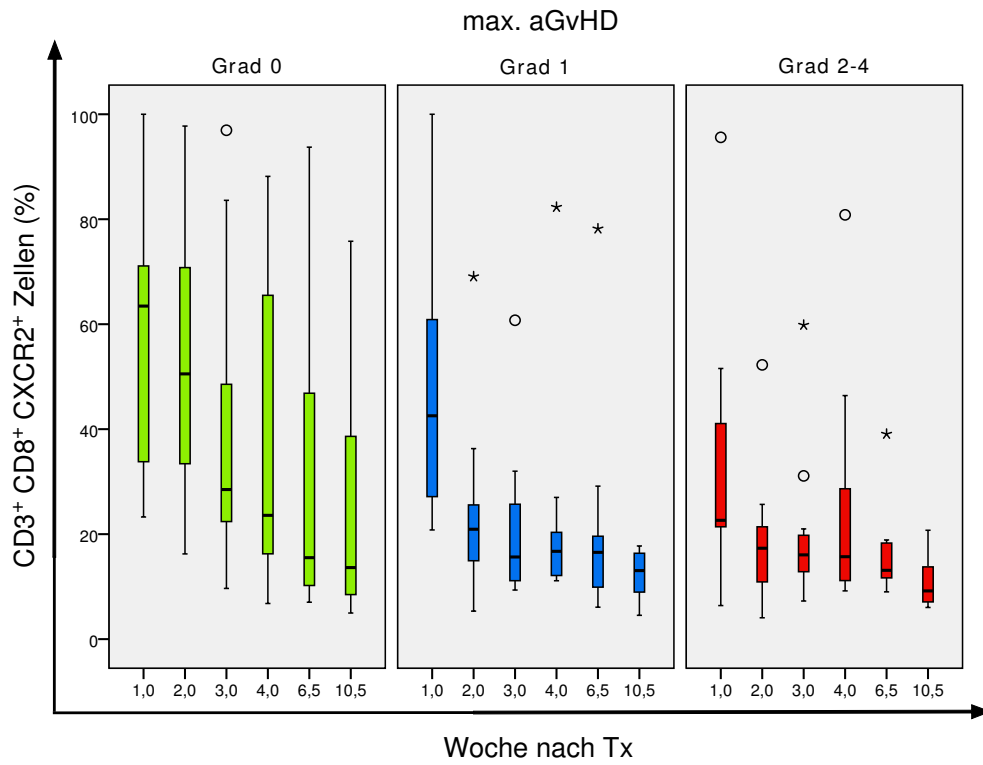


Abb. 4.5: Expression von CXCR 2 auf zytotoxischen T-Zellen

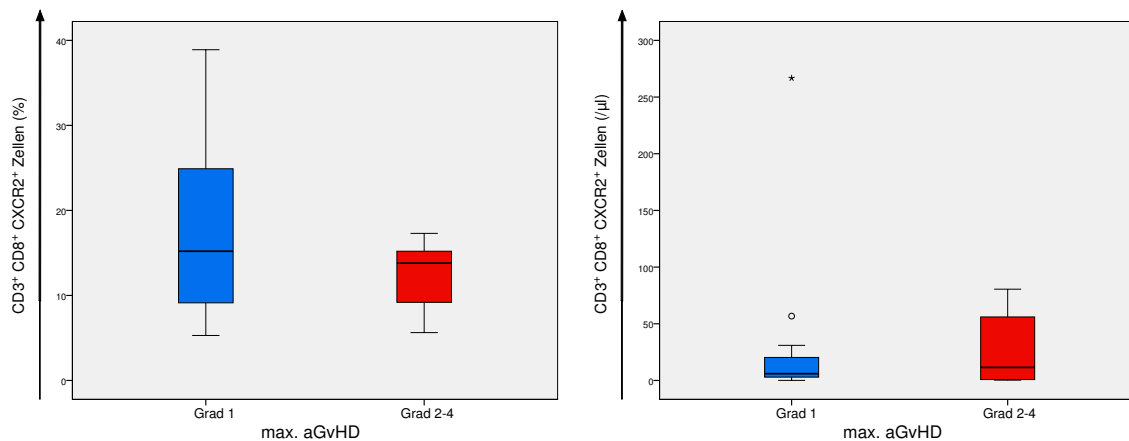


Abb. 4.6: Expression von CXCR 2 auf zytotoxischen T-Zellen vor Beginn der aGvHD

bei Grad 2-4 von 13,8%. Die absolute Anzahl CD3⁺CD8⁺CXCR2⁺ Zellen war im Median bei aGvHD Grad 1 6,0/ μ l, während Patienten mit Grad 2-4 11,5 CD3⁺CD8⁺CXCR2⁺ Zellen/ μ l Blut aufwiesen.

Tab. 4.2 stellt die medianen Expressionslevel aller Rezeptoren vom Expressionstyp 1 bei Patienten mit aGvHD Grad 1 und Grad 2-4 gegenüber.

		Grad 1	Grad 2-4	Verhältnis	$\frac{\text{Grad 2-4}}{\text{Grad 1}}$
CD3⁺CD8⁺ . . . Zellen					
CCR 9⁺	%	9,12	9,96		1,1
	/ μ l	5,30	6,31		1,2
CD 103 αE⁺	%	2,79	4,55		1,6
	/ μ l	2,93	6,34		2,2
CD 25⁺	%	1,23	,91		0,7
	/ μ l	,84	1,41		1,7
Leukotrien B4R1⁺	%	1,92	,59		0,3
	/ μ l	,79	1,56		2,0
CXCR 2⁺	%	15,20	13,80		0,9
	/ μ l	6,00	11,54		1,9
CCR 5⁺	%	3,23	3,73		1,2
	/ μ l	1,10	3,48		3,2

4.4 Expressionsmuster auf T-Zellen

CD 69⁺	%	4,63	2,04	0,4
	/μl	1,36	,90	0,7
CCR 2⁺	%	7,04	10,70	1,5
	/μl	2,80	16,43	5,9
CCR 1⁺	%	2,08	2,07	1,0
	/μl	,97	3,33	3,4
CCR 6⁺	%	2,54	4,64	1,8
	/μl	1,61	8,82	5,5
CCR 8⁺ CLA⁺	%	5,77	6,06	1,1
	/μl	2,30	9,91	4,3
CLA⁺	%	15,56	12,84	0,8
	/μl	5,00	20,41	4,1
CLA⁺ CD 62L⁺	%	10,00	11,75	1,2
	/μl	4,40	16,63	3,8
CD3⁺CD8⁻ . . . Zellen				
CCR 9⁺	%	10,55	10,62	1,0
	/μl	2,19	7,22	3,3
CD 103 αE⁺	%	8,90	5,51	0,6
	/μl	1,36	6,15	4,5
CD 25⁺	%	10,00	13,25	1,3
	/μl	1,90	7,34	3,9
Leukotrien B4R1⁺	%	10,42	1,13	0,1
	/μl	,97	1,04	1,1
CXCR 2⁺	%	18,60	7,04	0,4
	/μl	2,58	11,34	4,4
CCR 5⁺	%	8,31	5,52	0,7
	/μl	1,25	4,96	4,0
CD 69⁺	%	11,82	3,32	0,3
	/μl	1,68	2,35	1,4
CCR 2⁺	%	17,35	12,14	0,7
	/μl	3,08	14,96	4,9
CCR 1⁺	%	11,32	4,94	0,4
	/μl	1,38	2,54	1,8

CCR 6⁺	%	14,45	9,98	0,7
	/ μ l	2,80	10,47	3,7

Tab. 4.2: Vergleich der medianen Rezeptorexpression vor Beginn der aGvHD

4.4.2 Expressionstyp 2: Rezeptoren mit konstanter, mittlerer Expression

Auf den Helfer-T-Zellen konnten drei Rezeptoren identifiziert werden, deren relative Expression im Zeitverlauf fast konstant war. Leichte Schwankungen kamen dabei vor, ohne jedoch eine klare Tendenz nach unten oder oben aufzuweisen. Dies betraf die Marker CLA, CCR 4, CD 45RA sowie die Koexpression von CLA und CCR 4. Zur Veranschaulichung des Expressionstyps 2 wurde der Rezeptor CCR 4 ausgewählt.

Der Anteil CCR 4 positiver T-Helfer-Zellen zeigte in Gruppe 0 eine abnehmende Tendenz im Zeitverlauf, die Streuung der einzelnen Messwerte war im gesamten Messzeitraum groß. In Woche 1 ergab sich ein Gruppenmedian von 35,6% (1. Quartilswert: 30%, 3. Quartilswert: 62,5%). Nach leichtem Auf und Ab lag der Median im Monat 3 bei 24,3% (1. Quartilswert: 16,3%, 3. Quartilswert: 60,6%). In Gruppe 1 fiel ebenfalls eine große Streubreite der Messwerte auf, allerdings pendelte sich der Median der Gruppe bereits zum Ende des 1. Monats auf einem mittleren Niveau ein und blieb konstant bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (Woche 4: 40,6%, Monat 2: 40,7%, Monat 3: 41,2%). In der Gruppe aGvHD ab Grad 2 waren die Medianwerte im Zeitverlauf annähernd konstant und die Streubreite der Messwerte nur gering. Am niedrigsten lag der Median mit 38,1% in Woche 2, der höchste Median wurde mit 45,3% CD3⁺CD8⁻CCR4⁺ Zellen in Monat 3 erreicht.

Die absolute Anzahl CD3⁺CD8⁻CCR4⁺ Zellen pro μ l Blut war bei Patienten mit schwerer aGvHD höher als in den Vergleichsgruppen, insbesondere im ersten Monat nach SZT.

Anzahl CD3⁺CD8⁻CCR4⁺ Zellen pro μ l Blut in Woche 1:

Grad 0:	0,01 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 0 / 3. Quartilswert: 0,12)
Grad 1:	0,09 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 0 / 3. Quartilswert: 0,81)
Grad 2-4:	2,26 Zellen/ μ l (1.Quartilswert: 0,20 / 3. Quartilswert: 50,5)

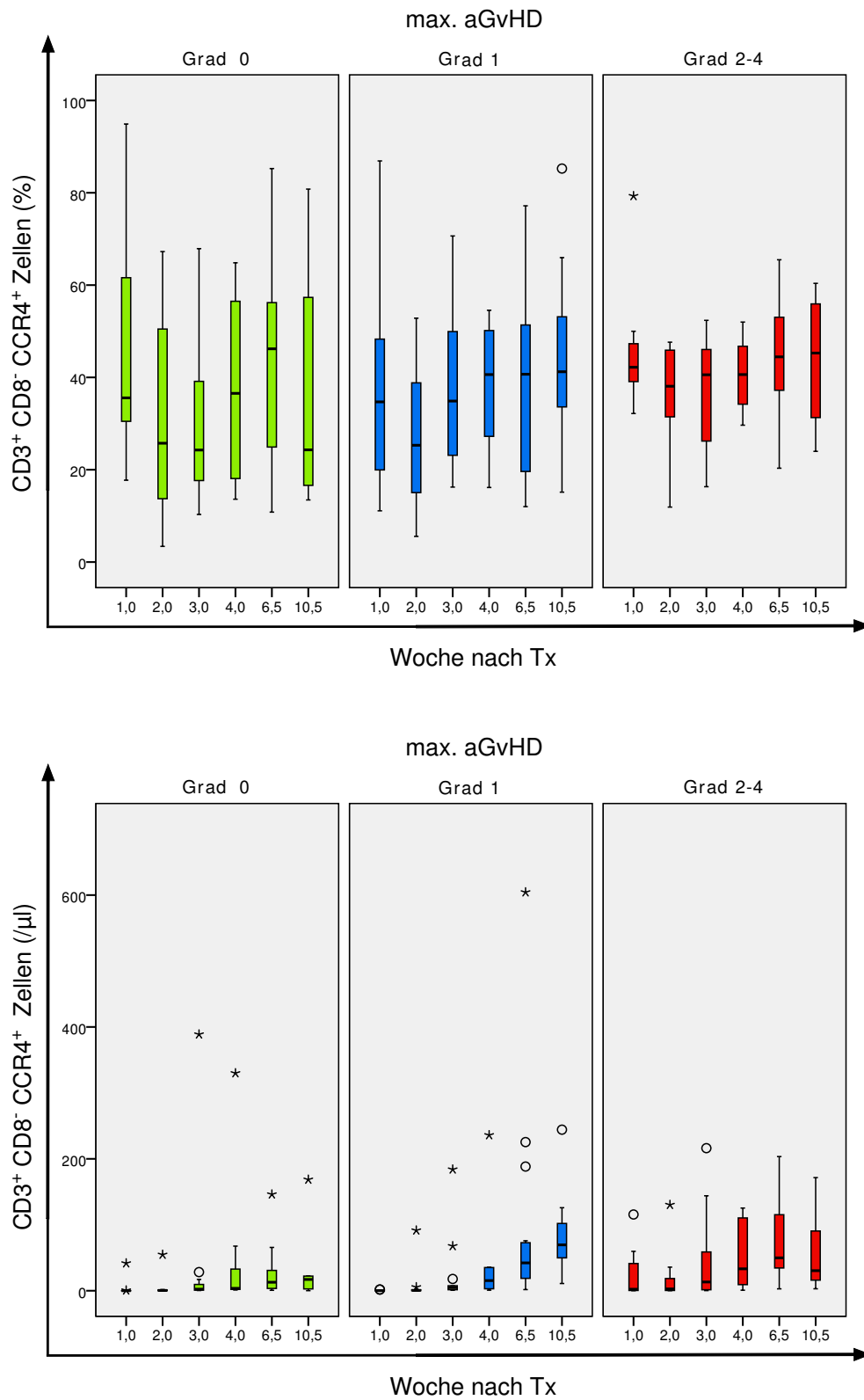


Abb. 4.7: Expression von CCR 4 auf Helfer-T-Zellen im Zeitverlauf

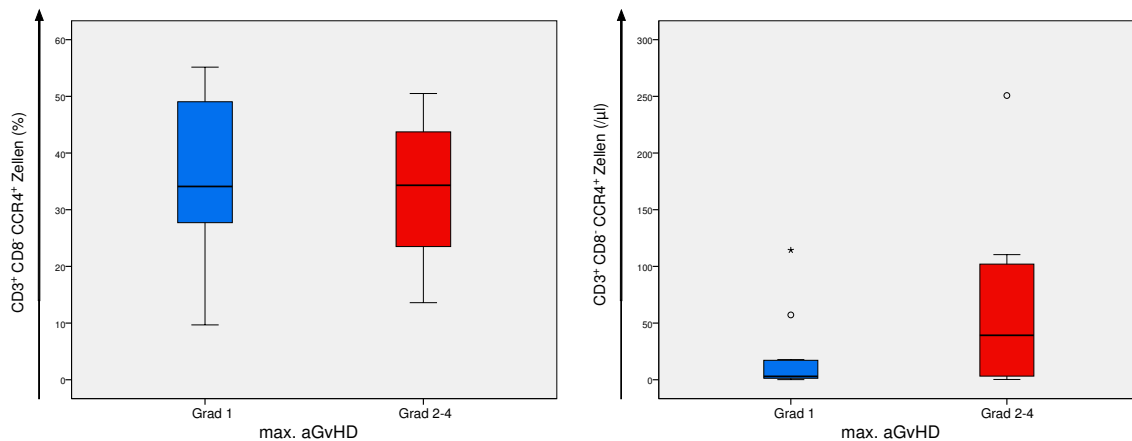


Abb. 4.8: Expression von CCR 4 auf Helfer-T-Zellen vor Beginn der aGvHD

Anzahl **CD3⁺CD8⁻CCR4⁺ Zellen** pro μl Blut in Woche 4:

Grad 0:	3,6/ μl (1. Quartilswert 1,8/ μl , 3. Quartilswert 38,4/ μl)
Grad 1:	15,4/ μl (1. Quartilswert 2,6/ μl , 3. Quartilswert 35,3/ μl)
Grad 2-4:	33,2/ μl (1. Quartilswert 7,3/ μl , 3. Quartilswert 111,9/ μl)

Beim Vergleich der Mediane in Bezug auf den Anteil CCR4⁺ Helfer-T-Zellen zum Zeitpunkt der letzten Messung vor Auftritt der aGvHD war kein Unterschied feststellbar zwischen Patienten mit aGvHD Grad 1 (34,1%) und Patienten mit aGvHD Grad 2-4 (34,3%). Mit im Median 39,2 CCR4⁺ Helfer-T-Zellen/ μl war die absolute Anzahl in der Gruppe mit GvHD ab Grad 2 allerdings 13fach höher als in der Gruppe mit aGvHD Grad 1 (3,0 CCR4⁺ Helfer-T-Zellen/ μl). Tabelle 4.3 zeigt die mediane relative und absolute Expression der konstant exprimierten Rezeptoren vor Beginn der Abstoßung.

		Grad 1	Grad 2-4	Verhältnis	$\frac{\text{Grad 2-4}}{\text{Grad 1}}$
CD3⁺CD8⁻ . . . Zellen					
CLA⁺ CCR4⁺	(%)	11,35	10,40		0,9
	(/ μ l)	1,62	4,90		3,0
CCR 4⁺	(%)	34,10	34,31		1,0
	(/ μ l)	2,98	39,21		13,2
CLA⁺	(%)	14,72	21,20		1,4
	(/ μ l)	3,62	17,32		4,8
CD45 RA⁺	(%)	14,38	20,25		1,4
	(/ μ l)	1,80	11,99		6,7

Tab. 4.3: Vergleich der medianen Rezeptorexpression vor Beginn der aGvHD

4.4.3 Expressionstyp 3: Rezeptoren mit fluktuierender, hoher Expression

4 Rezeptoren (Rezeptorkombinationen) ließen sich auf beiden T-Zell-Subpopulationen dem 3. Expressionsmuster zuordnen: CXCR 3, CXCR 1, $\beta 7$ integrin, sowie die Koexpression von $\beta 7$ integrin und CD49d $\alpha 4$. Nur auf den zytotoxischen T-Zellen fand sich bei CD45 RA dieses Expressionsmuster. Expressionstyp 3, der sich durch eine fluktuierende, hohe Expression auszeichnet, wird anhand des Rezeptors $\beta 7$ auf zytotoxischen T-Zellen dargestellt.

Der Homing-Rezeptor $\beta 7$ integrin wurde auf etwa einem Drittel aller zytotoxischen T-Zellen bei Patienten nach allogener SZT exprimiert. Dabei fielen - genau wie bei niedrig exprimierten Rezeptoren - unmittelbar nach SZT eine breite Streuung der Messwerte und höhere Medianwerte auf.

Medianer Anteil **CD3⁺CD8⁺ $\beta 7$ ⁺** Zellen in Woche 1:

Grad 0:	60,8% (1.Quartilswert: 45,3% / 3. Quartilswert: 79,8%)
Grad 1:	52,6% (1.Quartilswert: 29,7% / 3. Quartilswert: 59,4%)
Grad 2-4:	41,3% (1.Quartilswert: 29,7% / 3. Quartilswert: 56,4%)

Die Medianwerte in Bezug auf den Anteil **CD3⁺CD8⁺ $\beta 7$ ⁺** Zellen nahmen in allen Gruppen leicht ab, am deutlichsten bei Patienten ohne aGvHD (Woche 1: 60,8%, Monat

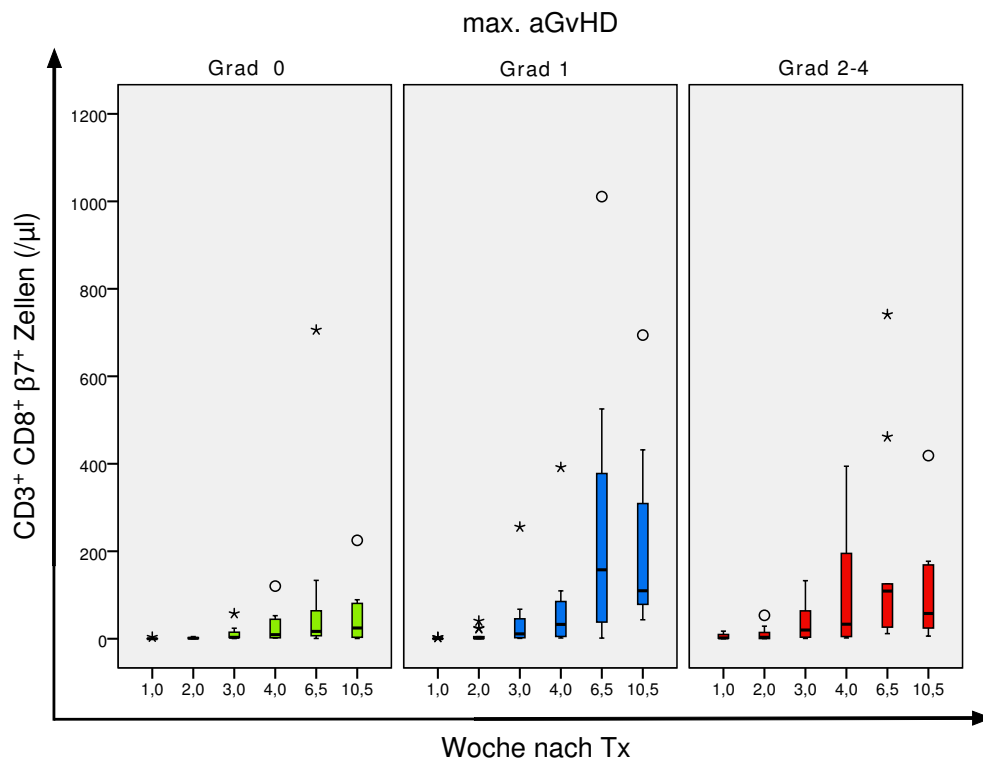
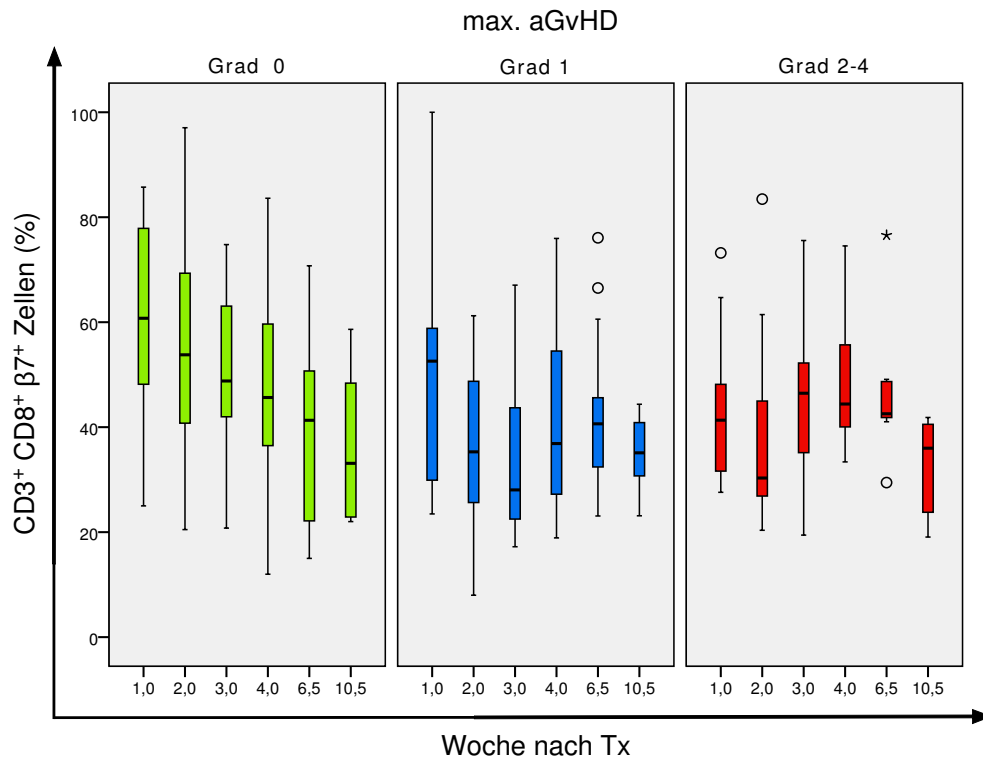


Abb. 4.9: Expression von $\beta 7$ integrin auf zytotoxischen T-Zellen

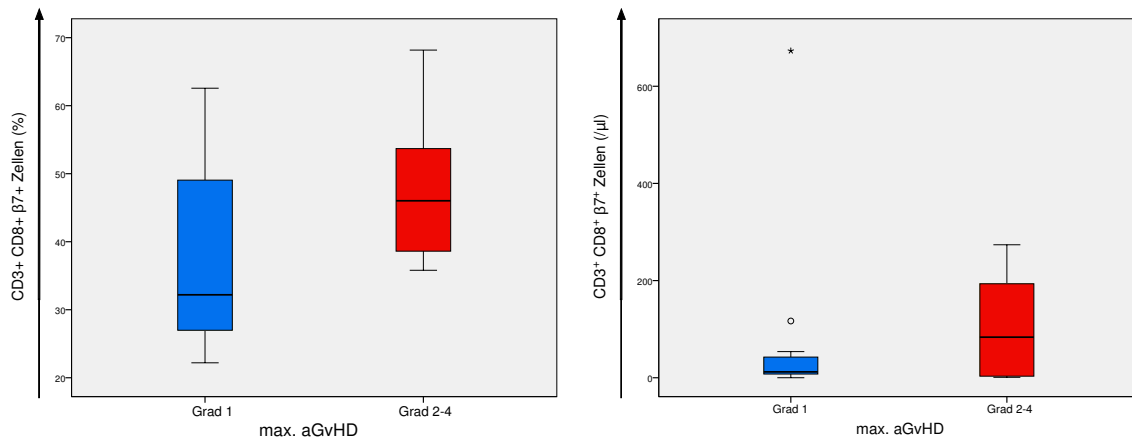


Abb. 4.10: Expression von $\beta 7$ integrin auf zytotoxischen T-Zellen vor Beginn der aGvHD

3: 33,11%). Bei Grad 1 und Grad 2-4 war die Expression im Zeitverlauf schwankend, während sich bei Grad 0 ein konstanter Abwärtstrend feststellen ließ.

Wie aus Abb. 4.9 hervorgeht, nahm die absolute Anzahl an $CD3^+CD8^+\beta 7^+$ Zellen pro μl im Verlauf der Messungen bei allen Patienten zu. Patienten mit aGvHD erreichten dabei höhere Werte als Patienten ohne aGvHD.

Der mediane Expressionslevel von $\beta 7$ integrin auf zytotoxischen T-Zellen war vor Ausbruch der aGvHD bei Grad 1 32,2%, bei Grad 2-4 46,02%. Die absolute Anzahl $CD3^+CD8^+\beta 7^+$ Zellen pro μl Blut war bei Grad 2-4 6,9fach höher als in der Vergleichsgruppe mit aGvHD Grad 1 (12,08 vs. 83,56).

Tab. 4.4 fasst die relative und absolute Expression von allen hoch exprimierten Rezeptoren im Gruppenvergleich zusammen.

		Grad 1	Grad 2-4	Verhältnis $\frac{\text{Grad 2-4}}{\text{Grad 1}}$
CD3⁺CD8⁺ . . . Zellen				
$\beta 7^+$ CD 49d $\alpha 4^+$	%	31,75	45,10	1,4
	/ μl	10,15	83,29	8,2
$\beta 7^+$	%	32,20	46,02	1,4
	/ μl	12,08	83,56	6,9
CD 45RA ⁺	%	40,90	30,80	0,8
	/ μl	14,76	27,48	1,9
CXCR 3 ⁺	%	52,75	31,35	0,6

	/μl	29,86	38,30	1,3
CXCR 1⁺	%	13,90	16,55	1,2
	/μl	4,97	15,20	3,1
CD3⁺CD8⁻ . . . Zellen				
<i>β7⁺</i> CD 49dα4⁺	%	38,45	42,55	1,1
	/μl	3,26	30,68	9,4
<i>β7⁺</i>	%	45,20	46,63	1,0
	/μl	4,29	33,62	7,8
CXCR 3⁺	%	48,25	39,15	0,8
	/μl	4,93	36,06	7,3
CXCR 1⁺	%	31,15	14,28	0,5
	/μl	3,91	17,94	4,6

Tab. 4.4: Vergleich der medianen Rezeptorexpression vor Beginn der aGvHD

5 Diskussion

5.1 Patientencharakteristika

Bei der Auswahl der Patienten konnte auf Grund des ohnehin kleinen zur Verfügung stehenden Kollektivs keine Selektion mehr statt finden. Im Gegensatz zu beispielsweise Tsuchiyama *et al.* wurden auch Patienten miteinbezogen, die Steroide zur GvHD-Prophylaxe erhielten [43]. Einzige Grundvoraussetzung zum Einschluss in die Studie war eine allogene SZT im Beobachtungszeitraum. Zwischen den nach Grad der aGvHD gebildeten Gruppen waren keine Unterschiede in Bezug auf Alter, Geschlecht oder GvHD-Prophylaxe feststellbar, doch muss die Heterogenität des Kollektivs in Bezug auf Grunderkrankungen, Konditionierungsregimes etc. insgesamt als groß eingeschätzt werden.

Die Einteilung der Patienten in Gruppen erfolgte nach dem maximal erreichten Grad der aGvHD. Eine Subgruppierung nach dem jeweiligem Organstadium konnte nicht erfolgen. Diese wäre aber sinnvoll und wünschenswert gewesen, da davon ausgegangen wird, dass die T-Zellen durch die Expression einzelner Rezeptoren eine Organspezifität entwickeln [22]. Insofern wäre bei einer GvHD des Darms u.U. ein anderes Rezeptorprofil zu erwarten als bei einer GvHD der Haut oder der Leber. Davon besonders betroffen waren die untersuchten Hautrezeptoren, da bei fast allen Patienten mit aGvHD die Haut mitbetroffen war und keine Patientengruppe mit aGvHD aber ohne Hautbefall als Vergleichsgruppe verfügbar war.

Ob das Geschlechts-Mismatch zwischen Spender und Empfänger ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer aGvHD ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [44, 45, 46]. Im von uns untersuchten Patientenkollektiv waren in der Gruppe ohne aGvHD deutlich mehr Patienten mit Geschlechtsunterschied vorzufinden als in den GvHD-Gruppen. Ein Sex-Mismatch zwischen Spender und Empfänger schien sich in unseren Untersuchungen nicht negativ auf die Schwere der aGvHD auszuwirken.

Patienten ohne aGvHD erlitten häufiger Rückfälle oder eine Progression der Grunderkrankung als Patienten, die eine aGvHD entwickelten. Dies lässt sich durch den Graft-versus-Leukämie-Effekt erklären. Er wird zwar vor allem im Gefolge einer chroni-

schen GvHD beobachtet, doch kann auch eine akute GvHD auf eine hohe Aktivität der transplantierten Spenderzellen gegenüber maligne entarteten Zellen hinweisen [4, 6]. Zwei Drittel der Patienten mit mindestens zweitgradiger aGvHD überlebten nicht bis zum Stichtag. Dies belegt den negativen Einfluss einer schweren aGvHD auf die Transplantat-assoziierte Mortalität [9]. Patienten mit höchstens erstgradiger aGvHD zeigten demgegenüber trotz eines erhöhten Rückfallrisikos ein insgesamt besseres Gesamtüberleben. Vermutlich profitierten Patienten ohne aGvHD dabei auch von einer geringeren Infektanfälligkeit, da die hoch dosierte aGvHD-Therapie der betroffenen Patienten auch zu einer Schwächung der Infektabwehr geführt haben dürfte.

5.2 Leukozyten- und T-Zell-Engraftment

Das Leukozyten-Engraftment fand gruppenübergreifend im Verlauf der 2. oder 3. Woche nach allogener SZT statt. Es entsprach damit den Erfahrungen der Klinik und den Veröffentlichungen in der Literatur [47, 48, 49, 50]. Zwischen Patienten mit und ohne aGvHD im Verlauf waren keine wesentlichen zeitlichen Unterschiede im Engraftment feststellbar.

Allerdings fand sich bei einzelnen Patienten, die eine mindestens 2. gradige aGvHD entwickelten, bereits in der ersten Woche nach SZT eine messbare Anzahl an mononukleären Zellen im peripheren Blut, während im Blut von Patienten ohne aGvHD eine vollständige Aplasie vorlag. Einige Patienten, die später eine aGvHD entwickelten, fielen durch eine bereits wenige Tage nach SZT einsetzende Lymphopoiese auf. Diese äußerte sich sowohl in einem früheren Anstieg der absoluten Lymphozytenzahlen, als auch in einem höheren relativen Anteil der T-Zell-Subpopulationen am Pool aller mononukleären Zellen. Dies könnte hinweisend sein auf die frühe Aktivierung alloreaktiver Spender-T-Zellen bei Patienten mit aGvHD ab Grad 2. Möglicherweise ist manchmal schon der erste Kontakt zwischen Empfängerorganismus und Spenderzellen für die Aktivierung von inflammatorischen Kaskaden und die Proliferation alloreaktiver Zellen verantwortlich, insbesondere da sich der Organismus der Patienten in einer extrem vulnerablen Phase unmittelbar nach der Konditionierung befindet [51]. Demgegenüber fanden sich in der Gruppe ohne aGvHD fünf Patienten, bei denen im Lauf der ersten fünf Wochen nach SZT überhaupt keine Anzeichen einer beginnenden Lymphopoiese nachweisbar waren. Dies kann als Zeichen einer geringeren oder verzögert einsetzenden Reaktivität der transplantierten

T-Zellen gegenüber dem Empfängermechanismus gewertet werden, bei der die Gefahr einer aGvHD deutlich reduziert zu sein scheint. Allerdings scheint auch die Kinetik der Lymphozytenrekonstitution und deren homöostatisches Gleichgewicht einen wichtigen Faktor für die Ausbildung der aGvHD darzustellen. So legen einige Untersuchungen nahe, dass ein Mangel an regulatorischen T-Zellen in direktem Zusammenhang mit einer Verschlechterung der aGvHD stehen könnte [52]. Darüber hinaus scheinen regulatorische T-Zellen bei Patienten mit aGvHD nicht nur in geringerer Anzahl vorhanden zu sein, sondern können möglicherweise sogar verwendet werden, um prospektive Aussagen über die Wirksamkeit einer GvHD-Therapie zu machen [53].

Früh im Verlauf nach SZT zirkulierende T-Zellen können somit auf die Entwicklung einer aGvHD hinweisen, jedoch scheinen sie keine zwingende Voraussetzung für diese zu sein [54]. Die Abwesenheit von T-Zellen innerhalb der ersten Wochen signalisierte in unseren Untersuchungen demgegenüber ein niedrigeres Risiko für eine aGvHD im späteren Verlauf.

Beim Vergleich von WBC und Anteil bzw. Anzahl der T-Zell-Subpopulationen vor dem klinischen GvHD-Beginn zeigte sich eine nahezu identische Gesamtzahl an Leukozyten zwischen den beiden GvHD-Gruppen. Allerdings scheinen sich deutlich Unterschiede abzuzeichnen bezüglich der zu erwartenden T-Zell-Subpopulationen [54]. Bei aGvHD ab Grad 2 waren sowohl der Anteil der zytotoxischen T-Zellen als auch der Anteil der Helfer-T-Zellen deutlich höher als bei aGvHD Grad 1. Dies bedingte eine 4fach höhere Anzahl an zytotoxischen T-Zellen und eine 10fach höhere Anzahl an T-Helfer-Zellen pro μl Blut unmittelbar vor Ausbruch der aGvHD. Bei der Beurteilung der jeweiligen Rezeptorexpression sollte dies stets bedacht werden, denn es wurde ja nach einem receptorspezifischen Effekt wie in den murinen Modellen gesucht [21]. Von einem solchen kann man insbesondere dann ausgehen, wenn sich sowohl Anteil wie auch absolute Anzahl rezeptorpositiver Zellen in gleicher Weise unterscheiden. Ob der Anteil oder die absolute Anzahl alloreaktiver Zellen dabei pathogenetisch ausschlaggebend für den Schweregrad der aGvHD ist, ist aus Sicht der Autorin derzeit schwer abschätzbar. Die Vermutung liegt allerdings nahe, dass allein schon das unmittelbar nach SZT vorhandene *Mehr* an alloreaktiven Zellen im Sinne einer direkten Dosis-Wirkungs-Beziehung eine entscheidende Verschlechterung der aGvHD nach sich zieht. Unsere Untersuchungen zeigten, dass bei den Patienten, die eine aGvHD ab Grad 2 entwickelten, früher als bei Vergleichspatienten erste T-Zellen im Blutstrom zirkulierten. Die höhere Last an früh auswandernden alloreaktiven T-Zellen könnte sowohl durch die größere Anzahl vorhandener Effektoren wie

auch durch die massivere Ausschüttung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren zu einer stärkeren Ausprägung der aGvHD führen. Zugleich entsteht bei einem hohen Anteil an alloreaktiven und einem niedrigen Anteil von gegenregulatorisch wirksamen, nicht-alloreaktiv agierenden T-Zellen ein Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antiinflammation [55]. Möglicherweise nimmt auch diese Dysbalance entscheidend Einfluss auf die Entwicklung einer aGvHD. So wäre beispielsweise denkbar, dass ein unverhältnismäßig hoher Anteil an alloreaktiven T-Zellen zum Versagen von immunregulatorischen Mechanismen beiträgt und sich nach einer gewissen Zeit verselbstständigt, vergleichbar etwa mit einer anaphylaktischen Reaktion bei allergischer Disposition. Einige Untersuchungen weisen in diesem Zusammenhang auf die entscheidende Rolle regulatorischer T-Zellen hin, die sich sowohl bei akuter wie chronischer GvHD positiv auf das Krankheitsgeschehen auswirken können [53, 56, 55]. Möglicherweise tragen regulatorische T-Zellen in diesem Zusammenhang auch entscheidend zur Entwicklung einer Langzeittoleranz zwischen Patient und transplantierten Zellen bei [57]. Diese Langzeittoleranz scheint nicht mit einem verminderten Antitumoreffekt einherzugehen [58, 59, 60, 61].

5.3 Homing-Rezeptorexpression auf T-Zellen

Für viele Rezeptoren ergaben sich gruppenübergreifend eine große Anzahl an Ausreißern und Extremwerten. Dafür gibt es aus Sicht der Autorin mehrere Ursachen: zum einen war die Gruppengröße sicher nicht ausreichend, um die komplexe Entwicklung der Rezeptorexpression nach allogener SZT zuverlässig abzubilden. Darüber hinaus leidet die Genauigkeit der FACS-Analyse bei geringen Zellzahlen, wie sie unmittelbar nach SZT regelhaft auftreten. Ein weiterer Grund ist in der Natur der Homing- und Chemokin-Rezeptoren gelegen. Denn es handelt sich bei vielen von diesen nicht um konstitutiv exprimierte, sondern um induzierbare Oberflächenmerkmale, deren Vorhandensein auf Zellen über verschiedene noch nicht bekannte Signalwege gesteuert wird und von vielen Faktoren beeinflusst werden könnte [32]. Untersuchungen an gesunden Probanden konnten zwar eine weitgehend konstante Expression für viele Rezeptoren zeigen. Dies könnte sich aber nach einem tiefgreifenden Eingriff in die Homöostase eines Organismus - wovon bei einer SZT zweifellos ausgegangen werden muss - vollkommen anders darstellen. Die Grunderkrankung allein, aber auch Konditionierungstherapie und anschließende SZT führen zu einer Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten zwischen T-Zellen und APZs wie

beispielsweise dendritischen Zellen, die eine GvHD induzieren oder verhindern können, aber auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Langzeittoleranz zu spielen scheinen [62, 63, 57]. Insofern sind Messungen der Homing-Rezeptor-Expression in erster Linie Momentaufnahmen von Situationen, die sich innerhalb kurzer Zeit radikal verändern können.

5.3.1 Expressionstyp 1

Die meisten Rezeptoren zeigten bei allogenen transplantierten Patienten eine typische Expressionsänderung im Verlauf der ersten drei Monate. Der Anteil rezeptorpositiver T-Zell-Subpopulationen sank im Zeitverlauf stetig ab, während die absolute Anzahl pro μl Blut langsam anstieg.

Beim direkten Vergleich von Grad 1 mit Grad 2-4 vor dem Beginn der aGvHD war der Anteil rezeptorpositiver Zellen in beiden Gruppen meist zwischen 5 und 15% gelegen. Dies ergab je nach Rezeptor maximal 20 positive Zellen pro μl Blut. Patienten mit aGvHD Grad 2-4 besaßen je nach Rezeptor die 0,7 bis 5,9fache Anzahl an rezeptorpositiven Zellen pro μl Blut verglichen mit Grad 1.

Als Grund für diese Dynamik lassen sich zumindest zwei mögliche Mechanismen nennen. Der Abfall in Bezug auf die relative Expression könnte einerseits an der Messmethode liegen, da die FACS-Analyse bei niedrigen Zellzahlen und niedrig exprimierten Rezeptoren zur Fehleranfälligkeit neigt: beim Gaten auf eine kleine Anzahl an T-Zellen, wirken sich kleinste Verunreinigungen der Proben stark auf die Ergebnisse der Messungen aus. Somit könnten sich für viele der untersuchten Rezeptoren falsch hohe Expressionswerte mit einer großen Streubreite ergeben haben, vor allem in den ersten Wochen nach Transplantation. In den Gruppen mit milder und schwerer GvHD war dieser Effekt zunehmend weniger deutlich, da bei diesen Patienten bereits früher im Verlauf nach SZT erste T-Zell-Subpopulationen auftraten und kleine Verunreinigungen nicht mehr ins Gewicht fielen. Die Medianwerte stabilisierten sich zügig und die Streuung der Messwerte nahm ab. In der Gruppe ohne GvHD zeigte sich auch eine Abnahme der Mediane. Jedoch blieb die Streuung der Messwerte vor allem im Bereich einer hohen Expression der jeweiligen Rezeptoren im Zeitverlauf groß. Dies könnte durch die o.g. fünf Patienten mitverursacht worden sein, bei denen im Analysezeitraum keine Spender-T-Zellen im Blut detektierbar waren.

Darüber hinaus wäre allerdings auch denkbar, dass nicht alloreaktiv agierende T-Zellen

eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren im Zuge eines homöostatischen Entwicklungsprozesses exprimieren. Der hohe Aktivierungsgrad der wenigen gemessenen T-Zellen wäre damit Ausdruck einer deutlich langsamer ablaufenden, physiologischen Expansion des anwachsenden Immunsystems. Die hier beobachtete Diskrepanz - hohe Expression einer Vielzahl von Rezeptoren gemessen auf einer nur sehr kleinen Anzahl von Zellen - ist zumindest kritisch zu hinterfragen. Ob dieses Phänomen Ausdruck des durchaus erwünschten Anpassungsprozesses der transplantierten T-Zellen oder ein Artefakt der Messmethode ist, muss derzeit noch offen gelassen werden. Aus Sicht der Autorin handelt es sich bei Rezeptoren vom Typ 1 jedoch um Marker, die im Verlauf nach SZT auf alloreaktiven T-Zellen nicht in relevantem Ausmaß exprimiert werden.

Zur frühen Diagnose oder sogar zur Vorhersage einer aGvHD eignen sich diese Rezeptoren daher nicht. Zwar konnten Unterschiede zwischen Patienten mit und Patienten ohne aGvHD im Verlauf nach SZT gefunden werden (hohe relative Expression in den ersten Wochen nach SZT bei Patienten ohne aGvHD, niedrige Expression bei Patienten mit aGvHD). Aus biologischer Sicht wirken diese Unterschiede allerdings nicht überzeugend. Denn dies würde ja bedeuten, dass sich ein hoher Anteil an aktivierten T-Zellen mit einer Vielzahl von Entzündungsrezeptoren und Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche protektiv auf den Krankheitsverlauf der aGvHD auswirkt und dem Konzept des „cytokine storm“ widersprechen [9, 39]. Patienten, die einen geringeren Anteil an stark aktivierten T-Zellen im Blut aufweisen, hätten demgegenüber ein erhöhtes Risiko für eine aGvHD. Eine geringe Anzahl an hochaktivierten T-Zellen nach SZT scheint vielmehr keinen Krankheitswert in Bezug auf die aGvHD zu besitzen, sofern diese überhaupt tatsächlich existent ist und nicht der Messmethodik geschuldet ist. Die Verwendung dieser Rezeptoren als Biomarker einer aGvHD erscheint vor diesem Hintergrund weder sinnvoll noch zielführend.

5.3.2 Expressionstyp 2

Der Expressionslevel der hautspezifischen Homing-Rezeptoren CCR 4 und CLA sowie der des Rezeptors CD 45RA auf T-Helfer-Zellen war bei Patienten mit aGvHD Grad 2-4 sehr homogen und im Zeitverlauf konstant. Bei Patienten ohne aGvHD deutete sich verglichen mit Grad 2-4 eine niedrigere relative Expression an, wobei diese im Verlauf variabler war. Der Grund dafür könnte einerseits in der messtechnischen Unschärfe der FACS-Analyse bei niedrigen Zellzahlen oder aber an einem tatsächlich vorliegenden schwankenden

Expressionsniveau bei Patienten ohne aGvHD liegen. Aus den Daten bezüglich der Koexpression von CLA und CCR 4 ergab sich kein zusätzlicher gruppenspezifischer Effekt. Bei der Expression von CCR 4 und bei der Koexpression von CLA und CCR 4 ergab sich kein Unterschied bezüglich des Anteils positiver Zellen vor GvHD-Beginn zwischen Grad 1 und Grad 2-4. Bezogen auf den Anteil CLA und CD 45RA positiver Zellen war dieser bei Patienten mit aGvHD Grad 2-4 1,4fach höher als bei Grad 1. Die absolute Anzahl positiver Zellen schien für alle Rezeptoren bzw. Rezeptorkombinationen positiv mit der Schwere der aGvHD zu korreliert zu sein.

Für den Vergleich der Rezeptorexpression dieser Haut-spezifischen Homing-Rezeptoren gilt es allerdings zu bedenken, dass bei allen 12 Patienten mit aGvHD Grad 1 die Haut Zielorgan der aGvHD war, bei Grad 2-4 war die Haut bei 9 von 10 Patienten mitbetroffen. Alle Patienten mit Gesamtgrad 1 wiesen maximal Stadium 2 bezüglich des Hautbefalls auf. Ein Teil der Patienten mit Gesamtgrad 2-4 litt dabei zwar unter einem höheren Stadium der Haut-GvHD. Dies war aber nicht zwingend der Fall, da sich der höhere Gesamtgrad der aGvHD bei 9 von 10 Patienten durch den Befall mehrerer Organsysteme ergab. Nur bei einem Patient mit aGvHD Grad 2-4 war ausschließlich die Haut im Stadium III Zielorgan der aGvHD. Insofern ist ein ähnliches Expressionsniveau beim Vergleich der Gruppen nicht überraschend, da sich das Ausmaß der Haut-GvHD zwischen den Gruppen nicht wesentlich unterschied. Interessanterweise scheint die Expression von CLA aber auch auf regulatorischen T-Zellen von großer Wichtigkeit zu sein, um Entzündungsvorgänge in der Haut zu unterdrücken [64, 65]. Essentiell in Bezug auf die Auswirkung der jeweiligen Rezeptorexpression scheint vor diesem Hintergrund der Subtyp der jeweiligen T-Zelle zu sein [66].

Um die Expressionslevel von CLA und CCR 4 vor Beginn der GvHD je nach Schweregrad der Haut-GvHD beurteilen zu können, wäre eine Gruppeneinteilung der Patienten auf Basis des jeweiligen Organstadiums notwendig. Diese war mit den vorliegenden Daten allerdings nicht sinnvoll möglich, da insgesamt zu wenige Datensätze vorlagen. Ein Vergleichskollektiv mit aGvHD aber ohne Hautbefall wäre aus diesem Grund von großem Interesse für eine weitere Beurteilung von CLA und CCR 4. Dabei wäre insbesondere auch auf eine tägliche, akribische klinische Dokumentation des jeweiligen Hautbefundes zu achten.

Für CCR 4 konnte keine erhöhte relative Expression bei aGvHD Grad 2-4 im Vergleich zu Grad 1 festgestellt werden, während die relative Expression von CLA mit einer schwereren Ausprägung der aGvHD zu korrelieren schien. Zu einem ähnlichen Ergebnis

kamen Tsuchiyama *et al.*, die bei 9 Patienten mit aGvHD Grad 2-4 eine höhere Expression von CLA auf CD3⁺-Zellen im Vergleich zu 24 Patienten mit aGvHD Grad 0-1 fanden [43]. Der Anteil und die Anzahl CD45 RA⁺ T-Helfer-Zellen war bei aGvHD Grad 2-4 etwas höher als in den Vergleichsgruppen, sowohl im Zeitverlauf wie auch unmittelbar vor Beginn der aGvHD. Die RA-Isoform des CD45-Antigens wird von naiven T-Zellen exprimiert, während der Memory-Subtyp die RO-Isoform ausbildet [67, 68]. Dies ist aus Sicht der Autorin überraschend, da bei zunehmendem Schweregrad der aGvHD eher mehr Effektor-T-Zellen denn naive T-Zellen zu erwarten wären. Weiteren Aufschluß geben könnte in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Rezeptorexpression von CD 45RA, evtl. unter Einbeziehung CD 45RO.

5.3.3 Expressionstyp 3

Die Expression von CXCR 3, CXCR 1, $\beta 7$ integrin, sowie die Koexpression von $\beta 7$ integrin und CD49d $\alpha 4$ war auf den untersuchten T-Zell-Subpopulationen wechselnd, aber insgesamt eher stark ausgeprägt. Auf den zytotoxischen T-Zellen war das auch für den Rezeptor CD 45RA der Fall.

Eine klare Tendenz im Sinne einer höheren Expression bei aGvHD Grad 2-4 fand sich dabei sowohl für $\beta 7$ integrin, als auch für dessen Koexpression zusammen mit CD 49d $\alpha 4$ sowohl auf zytotoxischen wie auch auf T-Helfer Zellen. Vor Beginn der Abstoßungsreaktion war $\beta 7$ integrin auf zytotoxischen T-Zellen bei Grad 2-4 stark exprimiert (46,02%). Patienten mit nur erstgradiger aGvHD zeigten demgegenüber eine niedrigere Expression von $\beta 7$ integrin auf den zytotoxischen T-Zellen (32,2%). Die absolute Anzahl CD3⁺CD8⁺ $\beta 7$ ⁺ Zellen war fast 7fach höher, wenn die Patienten im Verlauf von einer mindestens 2. gradigen aGvHD betroffen waren. Interessant dabei ist, dass die Mehrzahl der Patienten mit aGvHD Grad 2-4 (8 von 10) in der Folge auch eine aGvHD des Darms entwickelte, während bei aGvHD Grad 1 der Gastrointestinaltrakt definitionsgemäß nicht mitbetroffen war. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den hier untersuchten T-Zellen um die alloreaktiven Effektoren der intestinalen aGvHD handeln könnte und stimmt mit Beobachtungen aus murinen Transplantationsmodellen überein, in denen die Hochregulation von $\alpha 4\beta 7$ auf T-Zellen vor dem klinischen Beginn der aGvHD gezeigt werden konnte [18, 21, 69]. $\alpha 4\beta 7$ bei der Maus kann dabei als Homolog des hier verwendeten humanen $\beta 7$ integrin in Kombination mit CD 49d $\alpha 4$ verstanden werden. Hinweise auf eine erhöhte Expression von $\alpha 4\beta 7$ auf naiven und Memory-T-Zellen bei Patienten mit aGvHD des

Darms wurden zudem bereits von Chen *et al.* beschrieben [70]. Ähnliche Werte ergaben sich auch auf den T-Helfer-Zellen sowie für die Koexpression von $\beta 7$ integrin und CD 49d $\alpha 4$ auf den untersuchten T-Zell-Subpopulationen, so dass eine weitergehende Untersuchung dieser Rezeptoren auf ihren positiven Vorhersagewert sinnvoll erscheint.

Für den Rezeptor CXCR 3 konnte eine solche Assoziation bei aGvHD nicht festgestellt werden. Dies steht allerdings nur auf den ersten Blick im Widerspruch mit anderen Veröffentlichungen [71, 72]. Denn möglicherweise spielt die Expression dieses Rezeptors und seines Liganden CXCL 9 insbesondere bei der cGvHD eine entscheidende Rolle [73, 74].

5.4 Limitationen

Im Gegensatz zum Mausmodell, das unter sehr kontrollierten Bedingungen statt finden kann, unterlagen die Untersuchungen mit menschlichen Blutproben einer Vielzahl von verschiedenen Einfluss- und Störfaktoren, die die Dateninterpretation erheblich erschwerten. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind sie sogar noch deutlich zahlreicher, als bekannt, so dass die Auflistung hier nicht vollständig sein kann. Trotzdem konnten an einem kleinen Patientenkollektiv Unterschiede bezüglich der Expression von Homing-Rezeptoren zwischen den Patientengruppen angedeutet werden.

Immunsuppression

Im Unterschied zu murinen Modellen erhalten alle Patienten zur Unterdrückung der Immunantwort Medikamente zur GvHD-Prophylaxe. Diese greifen direkt oder indirekt in die Signaltransduktion von T-Zellen ein, drosseln auf diese Weise die Ausschüttung von immunstimulierenden Signalen und bremsen die Proliferation der Zellen. Dies könnte sich in doppelter Weise negativ auf diese Untersuchungen ausgewirkt haben:

Durch die Manipulation der Immunsuppressiva am Stoffwechsel der T-Zellen könnten jene auch eine Veränderung in der Expression von Homing- und Chemokinrezeptoren auf T-Zellen bewirkt haben. Falls darüber hinaus auch noch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bestünde, wären die Veränderung bei Patienten mit schwerer GvHD durch den längeren und höher dosierten Einsatz der Immunsuppressiva gravierender. Gruppenunterschiede

in Bezug auf die Expression von Chemokinrezeptoren könnten so verwischt worden sein. Darüber hinaus verringert sich beispielsweise durch Steroide auch die absolute Anzahl der zirkulierenden T-Zellen. Dies könnte die Genauigkeit der durchflusszytometrischen Messungen möglicherweise entscheidend verschlechtert haben. Davon abgesehen erhielten die Patienten unterschiedliche Kombinationen und Dosierungen der Immunsuppressiva, so dass auch Wechselwirkungen der Medikamente untereinander nicht ausgeschlossen werden können.

Genetische Einflussfaktoren

Insbesondere die unterschiedliche genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger in Bezug auf Major- und Minor-Antigene könnte die Expression der Rezeptoren beeinflusst haben. Denkbar wären beispielsweise unterschiedliche Expressionsmuster bei nicht verwandten im Gegensatz zu verwandten Spendern oder Auffälligkeiten bei unterschiedlichen HLA-Mismatch-Konstellationen. Demgegenüber war die Mismatch-Situation im Mausmodell eindeutig vorgegeben und vor allem auch einheitlich innerhalb der jeweiligen Gruppe.

Logistik

Aus organisatorischen Gründen war es leider nicht möglich, die Messungen der Patienten am jeweils gleichen Tag nach SZT vorzunehmen. Dies erschwerte die Vergleichbarkeit der Datensätze erheblich. Durch das unvermeidliche Mitteln der Daten könnte der zeitliche Verlauf der Rezeptorexpression allerdings entscheidend verändert worden sein. Anstiege oder Abfälle in der Expression einzelner Rezeptoren, die während einer Messwoche stattgefunden haben könnten, waren so nicht mehr nachvollziehbar.

6 Zusammenfassung

Homing- und Chemokin-Rezeptoren können wichtige Informationen liefern über Aktivierungsstand und Organspezifität der einzelnen Zelle, aber auch über Homöostase und Gleichgewicht von T-Zellen untereinander. Mittels FACS-Analyse konnte in murinen Transplantationsmodellen durch die Hochregulation einzelner Homing-Rezeptoren auf T-Zellen die Entwicklung einer aGvHD vorhergesagt werden. Ob sich ein solches diagnostisches Fenster auch beim Menschen darstellen könnte, sollte in einer klinischen Pilotstudie untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Expressionsverlauf von 19 verschiedenen Aktivierungsmarkern, Chemokin- und Homingrezeptoren auf T-Zell-Subpopulationen bei allogenen transplantierten Patienten charakterisiert. Anschließend wurde versucht, eine Assoziation zwischen der Höhe der jeweiligen Rezeptorexpression und der späteren Entwicklung einer akuten Graft-versus-Host-Disease herzustellen.

Die Expression der meisten untersuchten Rezeptoren nahm im Zeitverlauf ab und war insgesamt nur schwach ausgeprägt. Dabei zeigte sich insbesondere im frühen Verlauf nach SZT eine hohe relative Expression dieser Marker bei Patienten ohne aGvHD verglichen mit Patienten mit aGvHD im Verlauf. Insofern scheint eine hohe relative Expression dieser Rezeptoren kein Hinweis auf eine gesteigerte Alloreaktivität der jeweiligen T-Zellen zu sein. Gleichzeitig schien die absolute Anzahl an rezeptorpositiven Zellen eher positiv mit einer aGvHD korreliert zu sein. Die erhöhte Anzahl rezeptorpositiver Zellen errechnete sich allerdings aus der höheren absoluten Anzahl aller T-Zellen bei Patienten mit aGvHD. Damit war diese nicht rezeptorspezifisch, so dass sich Rezeptoren vom Expressionstyp 1 nicht eignen, um in der klinischen eine aGvHD vorherzusagen.

Einige Rezeptoren waren auf T-Helfer-Zellen auf mittlerem Niveau konstant exprimiert. Für manche von diesen zeigten sich unterschiedlich hohe relative Expressionsniveaus vor GvHD-Beginn bei Grad 2-4 verglichen mit Grad 1. Die absolute Anzahl rezeptorpositiver Zellen war bei allen Rezeptoren bei aGvHD Grad 2-4 höher als bei Grad 1.

Die Expression einiger Marker war auf T-Zellen ausgeprägt, aber im Zeitverlauf fluktuierend. Für die Expression von $\beta 7$ integrin allein und auch für dessen Koexpression

zusammen mit CD 49d α 4 deuteten sich bei Patienten mit aGvHD Grad 2-4 höhere relative und absolute Werte an als für Patienten mit aGvHD Grad 1. Die Expression der übrigen hoch exprimierten Rezeptoren schien nicht vom Ausmaß der später einsetzenden aGvHD beeinflusst zu werden.

Ob durch FACS-Analyse der Rezeptoren CLA, CCR 4, CD 45RA und/oder α 4 β 7 allein oder in Kombination tatsächlich die alloreaktiven T-Zellen der aGvHD charakterisiert und quantifiziert werden können, muss an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden. Da zum jetzigen Zeitpunkt der prädiktive Wert dieser Marker weder postuliert noch ausgeschlossen werden kann, erscheint eine weitergehende Untersuchung sinnvoll.

Literaturverzeichnis

- [1] N. K. Ramsay, S. Davies, J. Wagner, E. McGough, and P. B. McGlave. Bone marrow transplantation. New strategies for treating malignant disease. *Minn Med*, 79:23–28, Apr 1996.
- [2] J. E. Wagner, N. A. Kernan, M. Steinbuch, H. E. Broxmeyer, and E. Gluckman. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*, 346:214–219, Jul 1995.
- [3] F. R. Appelbaum. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, 411:385–389, May 2001.
- [4] P. L. Weiden, N. Flournoy, E. D. Thomas, R. Prentice, A. Fefer, C. D. Buckner, and R. Storb. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.*, 300:1068–1073, May 1979.
- [5] O. Ringden, H. Karlsson, R. Olsson, B. Omazic, and M. Uhlin. The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br. J. Haematol.*, 147:614–633, Dec 2009.
- [6] D. Weisdorf, M. J. Zhang, M. Arora, M. M. Horowitz, J. D. Rizzo, and M. Eapen. Graft-versus-Host Disease Induced Graft-versus-Leukemia Effect: Greater Impact on Relapse and Disease-Free Survival after Reduced Intensity Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*, Jul 2012.
- [7] P. A. McSweeney, D. Niederwieser, J. A. Shizuru, B. M. Sandmaier, A. J. Molina, D. G. Maloney, T. R. Chauncey, T. A. Gooley, U. Hegenbart, R. A. Nash, J. Radich, J. L. Wagner, S. Minor, F. R. Appelbaum, W. I. Bensinger, E. Bryant, M. E. Flowers, G. E. Georges, F. C. Grumet, H. P. Kiem, B. Torok-Storb, C. Yu, K. G. Blume, and R. F. Storb. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*, 97:3390–3400, Jun 2001.

-
- [8] I. Bojanić and B. Golubić Cepulić. [Umbilical cord blood as a source of stem cells]. *Acta Med Croatica*, 60:215–225, Jun 2006.
- [9] J. L. Ferrara, J. E. Levine, P. Reddy, and E. Holler. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373:1550–1561, May 2009.
- [10] H. Ottinger, C. Müller, D.W. Beelen, G. Ehninger, N. Schmitz, A. Zander, and H Schrezenmeier. Developments and Quality Assurance in Stem Cell Transplantation – Data from a German National Registry. *Dtsch Arztebl*, 37:2381–2386, Sep 2006.
- [11] L. A. Welniak, B. R. Blazar, and W. J. Murphy. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*, 25:139–170, 2007.
- [12] G. D. SNELL. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.*, 49:87–108, Oct 1948.
- [13] J. DAUSSET. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol.*, 20:156–166, 1958.
- [14] Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark-und Blutstammzelltransplantation. Dritter Deutscher Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation. Aug 2005.
- [15] E. Spierings, J. Drabbels, M. Hendriks, J. Pool, M. Spruyt-Gerritse, F. Claas, and E. Goulmy. A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS ONE*, 1:e42, 2006.
- [16] M. E. Larsen, B. Kornblit, M. V. Larsen, T. N. Masmus, M. Nielsen, M. Thiim, P. Garred, A. Stryhn, O. Lund, S. Buus, and L. Vindelov. The Degree of Predicted Minor Histocompatibility Antigen Mismatch Correlates with Poorer Clinical Outcome of Non-myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, Mar 2010.
- [17] E. H. Warren, X. C. Zhang, S. Li, W. Fan, B. E. Storer, J. W. Chien, M. J. Boeckh, L. P. Zhao, P. J. Martin, and J. A. Hansen. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood*, Aug 2012.

-
- [18] A. Beilhack, S. Schulz, J. Baker, G. F. Beilhack, C. B. Wieland, E. I. Herman, E. M. Baker, Y. A. Cao, C. H. Contag, and R. S. Negrin. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*, 106:1113–1122, Aug 2005.
- [19] A. Beilhack, S. Schulz, J. Baker, G. F. Beilhack, R. Nishimura, E. M. Baker, G. Landan, E. I. Herman, E. C. Butcher, C. H. Contag, and R. S. Negrin. Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood*, 111:2919–2928, Mar 2008.
- [20] M. Murai, H. Yoneyama, T. Ezaki, M. Suematsu, Y. Terashima, A. Harada, H. Hamada, H. Asakura, H. Ishikawa, and K. Matsushima. Peyer’s patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat. Immunol.*, 4:154–160, Feb 2003.
- [21] C. A. Bauerlein, S. S. Riedel, J. Baker, C. Brede, A. L. Garrote, M. Chopra, M. Ritz, G. F. Beilhack, S. Schulz, R. Zeiser, P. G. Schlegel, H. Einsele, R. S. Negrin, and A. Beilhack. A diagnostic window for the treatment of acute graft-versus-host disease prior to visible clinical symptoms in a murine model. *BMC Med*, 11:134, 2013.
- [22] C. A. Wysocki, A. Panoskaltsis-Mortari, B. R. Blazar, and J. S. Serody. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 105:4191–4199, Jun 2005.
- [23] C. A. Wysocki, S. B. Burkett, A. Panoskaltsis-Mortari, S. L. Kirby, A. D. Luster, K. McKinnon, B. R. Blazar, and J. S. Serody. Differential roles for CCR5 expression on donor T cells during graft-versus-host disease based on pretransplant conditioning. *J. Immunol.*, 173:845–854, Jul 2004.
- [24] U. Duffner, B. Lu, G. C. Hildebrandt, T. Teshima, D. L. Williams, P. Reddy, R. Ordemann, S. G. Clouthier, K. Lowler, C. Liu, C. Gerard, K. R. Cooke, and J. L. Ferrara. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp. Hematol.*, 31:897–902, Oct 2003.
- [25] E. J. Kunkel and E. C. Butcher. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, 16(1):1–4, Jan 2002.
- [26] E. C. Butcher and L. J. Picker. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272(5258):60–66, Apr 1996.

-
- [27] D. J. Campbell and E. C. Butcher. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.*, 195(1):135–141, Jan 2002.
- [28] K. Ohmori, F. Fukui, M. Kiso, T. Imai, O. Yoshie, H. Hasegawa, K. Matsushima, and R. Kannagi. Identification of cutaneous lymphocyte-associated antigen as sialyl 6-sulfo Lewis X, a selectin ligand expressed on a subset of skin-homing helper memory T cells. *Blood*, 107(8):3197–3204, Apr 2006.
- [29] A. Iellem, L. Colantonio, and D. D’Ambrosio. Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells. *Eur. J. Immunol.*, 33(6):1488–1496, Jun 2003.
- [30] Y. Reiss, A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J. Exp. Med.*, 194:1541–1547, Nov 2001.
- [31] E. J. Kunkel, D. J. Campbell, and E. C. Butcher. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation*, 10(3-4):313–323, Jun 2003.
- [32] A. Beilhack and S. G. Rockson. Immune traffic: a functional overview. *Lymphat Res Biol*, 1:219–234, 2003.
- [33] F. Edele, R. Molenaar, D. Gutle, J. C. Dudda, T. Jakob, B. Homey, R. Mebius, M. Hornef, and S. F. Martin. Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J. Immunol.*, 181(6):3745–3749, Sep 2008.
- [34] G. B. Vogelsang, L. Lee, and D. M. Bensen-Kennedy. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu. Rev. Med.*, 54:29–52, 2003.
- [35] R. Martino, P. Romero, M. Subira, M. Bellido, A. Altes, A. Sureda, S. Brunet, I. Badell, J. Cubells, and J. Sierra. Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant.*, 24:283–287, Aug 1999.

-
- [36] A. Rank, R. Nieuwland, B. Toth, V. Pihusch, R. Delker, E. Hiller, H. J. Kolb, and R. Pihusch. Microparticles for diagnosis of graft-versus-host disease after allogeneic stem transplantation. *Transplantation*, 92(2):244–250, Jul 2011.
- [37] J. E. Levine, S. Paczesny, and S. Sarantopoulos. Clinical applications for biomarkers of acute and chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 18(1 Suppl):S116–124, Jan 2012.
- [38] S. Paczesny, J. E. Levine, T. M. Braun, and J. L. Ferrara. Plasma biomarkers in graft-versus-host disease: a new era? *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 15(1 Suppl):33–38, Jan 2009.
- [39] J. L. Ferrara, S. Abhyankar, and D. G. Gilliland. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant. Proc.*, 25:1216–1217, Feb 1993.
- [40] J. W. Tung, D. R. Parks, W. A. Moore, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin. Immunol.*, 110(3):277–283, Mar 2004.
- [41] J. W. Tung, K. Heydari, R. Tirouvanziam, B. Sahaf, D. R. Parks, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin. Lab. Med.*, 27:453–468, Sep 2007.
- [42] E. L. Berg, T. Yoshino, L. S. Rott, M. K. Robinson, R. A. Warnock, T. K. Kishimoto, L. J. Picker, and E. C. Butcher. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.*, 174(6):1461–1466, Dec 1991.
- [43] J. Tsuchiyama, T. Yoshino, T. Saito, T. Furukawa, K. Ito, I. Fuse, and Y. Aizawa. Cutaneous lymphocyte antigen-positive T cells may predict the development of acute GVHD: alterations and differences of CLA+ T- and NK-cell fractions. *Bone Marrow Transplant.*, 43:863–873, Jun 2009.
- [44] J. R. Westin, R. M. Saliba, M. De Lima, A. Alousi, C. Hosing, M. H. Qazilbash, I. F. Khouri, E. J. Shpall, P. Anderlini, G. Rondon, B. S. Andersson, R. Champlin, and D. R. Couriel. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol*, 2011:601953, 2011.

-
- [45] Y. Chen, D. P. Lu, K. Y. Liu, L. J. Dong, H. Y. Ren, X. J. Huang, H. Chen, D. H. Liu, Q. Jiang, Y. H. Chen, L. P. Xu, Y. C. Zhang, J. Lu, and Z. Y. Gao. [Analysis of risk factors for the development of acute graft-versus-host disease in 151 cases of allo-hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 26(2):74–77, Feb 2005.
- [46] Y. Nannya, K. Kataoka, A. Hangaishi, Y. Imai, T. Takahashi, and M. Kurokawa. The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on disease risk. *Transpl. Int.*, 24(5):469–476, May 2011.
- [47] P. Sobrevilla-Calvo, S. Rivas-Vera, A. Cervera-Ubierna, M. P. Lopez-P, A. Acosta-Barreda, M. T. Salles, and A. Marche-Cova. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Safety, hematologic recovery, kinetics, and complications. *Arch. Med. Res.*, 33(2):136–143, 2002.
- [48] R. Miniero, A. Busca, A. Pession, R. Rondelli, C. Uderzo, M. Ripaldi, and F. Locatelli. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in children with hematologic malignancies. AIEOP-BMT Group (Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology-Bone Marrow Transplant Group). *Haematologica*, 84(7):657–660, Jul 1999.
- [49] Z. S. Pavletic, M. R. Bishop, S. R. Tarantolo, S. Martin-Algarra, P. J. Bierman, J. M. Vose, E. C. Reed, T. G. Gross, J. Kollath, K. Nasrati, J. D. Jackson, J. O. Armitage, and A. Kessinger. Hematopoietic recovery after allogeneic blood stem-cell transplantation compared with bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.*, 15(4):1608–1616, Apr 1997.
- [50] H. D. Ottinger, D. W. Beelen, B. Scheulen, U. W. Schaefer, and H. Grosse-Wilde. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*, 88(7):2775–2779, Oct 1996.
- [51] K. L. Lin, L. M. Fulton, M. Berginski, M. L. West, N. A. Taylor, T. P. Moran, J. M. Coghill, B. R. Blazar, J. E. Bear, and J. S. Serody. Intravital imaging of donor allogeneic effector and regulatory T cells with host dendritic cells during GvHD. *Blood*, Jan 2014.

-
- [52] S. Zinocker, L. Sviland, R. Dressel, and B. Rolstad. Kinetics of lymphocyte reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation: markers of graft-versus-host disease. *J. Leukoc. Biol.*, 90(1):177–187, Jul 2011.
- [53] J. M. Magenau, X. Qin, I. Tawara, C. E. Rogers, C. Kitko, M. Schlough, D. Bickley, T. M. Braun, P. S. Jang, K. P. Lowler, D. M. Jones, S. W. Choi, P. Reddy, S. Mineishi, J. E. Levine, J. L. Ferrara, and S. Paczesny. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 16(7):907–914, Jul 2010.
- [54] P. J. Podgorny, Y. Liu, P. Dharmani-Khan, L. M. Pratt, K. Jamani, J. Luider, I. Auer-Grzesiak, A. Mansoor, T. S. Williamson, A. Ugarte-Torres, M. Hoegh-Petersen, D. A. Stewart, A. Daly, F. M. Khan, J. A. Russell, and J. Storek. Immune Cell Subset Counts Associated with Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, Jan 2014.
- [55] P. Zhang, S. K. Tey, M. Koyama, R. D. Kuns, S. D. Olver, K. E. Lineburg, M. Lor, B. E. Teal, N. C. Raffelt, J. Raju, L. Leveque, K. A. Markey, A. Varelias, A. D. Clouston, S. W. Lane, K. P. MacDonald, and G. R. Hill. Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 in vivo. *J. Immunol.*, 191(10):5291–5303, Nov 2013.
- [56] J. Koreth, K. Matsuoka, H. T. Kim, S. M. McDonough, B. Bindra, E. P. Alyea, P. Armand, C. Cutler, V. T. Ho, N. S. Treister, D. C. Bienfang, S. Prasad, D. Tzachanis, R. M. Joyce, D. E. Avigan, J. H. Antin, J. Ritz, and R. J. Soiffer. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*, 365(22):2055–2066, Dec 2011.
- [57] M. Ezzelarab and A. W. Thomson. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin. Immunol.*, 23(4):252–263, Aug 2011.
- [58] M. Di Ianni, F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, F. Castellino, E. Bonifacio, B. Del Papa, T. Zei, R. I. Ostini, D. Cecchini, T. Aloisi, K. Perruccio, L. Ruggeri, C. Balucani, A. Pierini, P. Sportoletti, C. Aristei, B. Falini, Y. Reisner, A. Velardi, F. Aversa, and M. F. Martelli. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, 117(14):3921–3928, Apr 2011.

-
- [59] A. Trenado, F. Charlotte, S. Fisson, M. Yagello, D. Klatzmann, B. L. Salomon, and J. L. Cohen. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J. Clin. Invest.*, 112(11):1688–1696, Dec 2003.
- [60] M. Edinger, P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober, and R. S. Negrin. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.*, 9(9):1144–1150, Sep 2003.
- [61] T. Guichelaar, M. E. Emmelot, H. Rozemuller, B. Martini, R. W. Groen, G. Storm, H. M. Lokhorst, A. C. Martens, and T. Mutis. Human regulatory T cells do not suppress the antitumor immunity in the bone marrow: a role for bone marrow stromal cells in neutralizing regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.*, 19(6):1467–1475, Mar 2013.
- [62] Y. Maeda. Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. *Int. J. Hematol.*, 98(3):293–299, Sep 2013.
- [63] J. Yang, R. Li, Y. Ren, Y. Yang, R. Xie, and H. Fan. Third-party tolerogenic dendritic cells reduce allo-reactivity in vitro and ameliorate the severity of acute graft-versus-host disease in allo-bone marrow transplantation. *Scand. J. Immunol.*, 78(6):486–496, Dec 2013.
- [64] F. Issa, J. Hester, K. Milward, and K. J. Wood. Homing of regulatory T cells to human skin is important for the prevention of alloimmune-mediated pathology in an in vivo cellular therapy model. *PLoS ONE*, 7(12):e53331, 2012.
- [65] B. G. Engelhardt, M. Jagasia, B. N. Savani, N. L. Bratcher, J. P. Greer, A. Jiang, A. A. Kassim, P. Lu, F. Schuening, S. M. Yoder, M. T. Rock, and J. E. Crowe. Regulatory T cell expression of CLA or $\hat{I}\pm(4)\hat{I}^2(7)$ and skin or gut acute GVHD outcomes. *Bone Marrow Transplant.*, 46(3):436–442, Mar 2011.
- [66] B. G. Engelhardt, S. M. Sengsayadeth, M. Jagasia, B. N. Savani, A. A. Kassim, P. Lu, Y. Shyr, S. M. Yoder, M. T. Rock, and J. E. Crowe. Tissue-specific regulatory T cells: biomarker for acute graft-vs-host disease and survival. *Exp. Hematol.*, 40(12):974–982, Dec 2012.

-
- [67] M. L. Hermiston, Z. Xu, and A. Weiss. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 21:107–137, 2003.
- [68] D. R. Alexander. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin. Immunol.*, 12(4):349–359, Aug 2000.
- [69] A. Petrovic, O. Alpdogan, L. M. Willis, J. M. Eng, A. S. Greenberg, B. J. Kappel, C. Liu, G. J. Murphy, G. Heller, and M. R. van den Brink. LPAM (alpha 4 beta 7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease. *Blood*, 103(4):1542–1547, Feb 2004.
- [70] Y. B. Chen, H. T. Kim, S. McDonough, R. D. Odze, X. Yao, S. Lazo-Kallanian, T. R. Spitzer, R. Soiffer, J. H. Antin, and J. Ritz. Up-Regulation of alpha4beta7 integrin on peripheral T cell subsets correlates with the development of acute intestinal graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 15:1066–1076, Sep 2009.
- [71] V. A. Villarroel, N. Okiyama, G. Tsuji, J. T. Linton, and S. I. Katz. CXCR3-Mediated Skin Homing of Autoreactive CD8 T Cells Is a Key Determinant in Murine Graft-Versus-Host Disease. *J. Invest. Dermatol.*, Jan 2014.
- [72] W. Liu, H. Y. Ren, Y. J. Dong, L. H. Wang, Y. Yin, Y. Li, Z. X. Qiu, X. N. Cen, and Y. J. Shi. Bortezomib regulates the chemotactic characteristics of T cells through downregulation of CXCR3/CXCL9 expression and induction of apoptosis. *Int. J. Hematol.*, 96(6):764–772, Dec 2012.
- [73] C. L. Kitko, J. E. Levine, B. E. Storer, X. Chai, D. A. Fox, T. M. Braun, D. R. Couriel, P. J. Martin, M. E. Flowers, J. A. Hansen, L. Chang, M. Conlon, B. J. Fiema, R. Morgan, P. Pongtornpipat, K. Lamiman, J. L. Ferrara, S. J. Lee, and S. Paczesny. Plasma CXCL9 elevations correlate with chronic GVHD diagnosis. *Blood*, 123(5):786–793, Jan 2014.
- [74] J. E. Croudace, C. F. Inman, B. E. Abbotts, S. Nagra, J. Nunnick, P. Mahendra, C. Craddock, R. Malladi, and P. A. Moss. Chemokine-mediated tissue recruitment of CXCR3+ CD4+ T cells plays a major role in the pathogenesis of chronic GVHD. *Blood*, 120(20):4246–4255, Nov 2012.

Danksagung

Vielen Dank an **Dr. Andreas Beilhack** für die Vergabe dieses hochinteressanten Themas, für die große fachliche und methodische Hilfe und auch für seine uneingeschränkte Unterstützung zur Schaffung der notwendigen finanziellen Rahmenbedingungen.

Bedanken möchte ich mich auch für die herzliche Aufnahme in der AG Beilhack und eine anstrengende, aber unvergessliche Zeit im Labor. Besonderer Dank gilt **Carina Bäuerlein** für die kompetente Einführung in Methodik und Dateninterpretation und **Miriam Ritz** für ihren großen Arbeitseinsatz und ihre zuverlässige und präzise Mitarbeit bei der Datenerhebung.

Für die großzügige finanzielle Förderung durch ein Promotionsstipendium der **Medizinischen Fakultät** und durch die Studienstiftung von **Dr. Friedrich Amend** möchte ich mich herzlich bedanken. Darüber hinaus wurde diese Studie durch die Wilhelm-Sander-Stiftung gefördert (Projekt 2007.081.1)

Ein Dankeschön auch an **Dr. Uwe Malzahn** für die viele Geduld und die fachkundige und freundliche Hilfe bei der Datenauswertung mit SPSS.

Dank gilt auch den beteiligten Mitarbeitern der Medizinischen Klinik II und der Kinderklinik der Universität Würzburg, vor allem aber allen **Patienten**, die sich bereit erklärten, an dieser Studie teilzunehmen.

Besonderer Dank gilt meinem Bruder **Stefan**, der mir den Zugang zu LaTeX verschafft hat und mir mit seinen scheinbar unerschöpflichen EDV-Kenntnissen stets hilfreich und geduldig zur Seite stand.

Für den emotionalen und finanziellen Rückhalt, den ihr mir immer geboten habt, danke ich meiner **Familie**, vor allem meinen Eltern. Ihr habt mich bei allem, was ich getan habe, respektiert und unterstützt. Dafür danke ich Euch von Herzen.