

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer, FRCPE

Interaktion von B-Zellen und Dendritischen Zellen am Beispiel der chronischen Graft-
versus-Host Disease

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Julian Zipfel
aus Santiago de Chile

Würzburg, Februar 2017



Referent: Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Tilmann Schweitzer

Dekan: Prof. Dr. med. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2018

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie

« J'ai compris alors qu'un homme qui n'aurait vécu qu'un seul jour pourrait sans peine vivre cent ans dans une prison. Il aurait assez de souvenirs pour ne pas s'ennuyer. »

Albert Camus dans *L'Étranger*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation	1
1.1.1. Allgemein	1
1.1.2. B-Zell-Subpopulationen und Rekonstitution nach HSCT	2
1.1.2.1. B-Zell-Subpopulationen	2
1.1.2.1. Rekonstitution nach HSCT	5
1.2. cGvHD	7
1.2.1. Therapie der cGvHD	9
1.2.2. B-Zellen	10
1.2.2.1. Autoantikörper	11
1.2.2.2. BAFF	12
1.2.2.3. Zielgerichtete Therapien mit dem Fokus auf B-Zellen	13
1.2.3. Dendritische Zellen	13
1.2.3.1. DC-Subpopulationen und cGvHD	14
1.2.3.2. CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs und DC	15
1.2.3.3. IFN, IL-15 und cGvHD	16
1.2.3.4. Zielgerichtete Therapien mit dem Fokus auf DC	17
1.3. Interaktion von DC und B-Zellen	17
1.4. Fragestellung	18
2. Patienten	20
3. Material	22
3.1. Geräte	22
3.2. Laborbedarf	22
3.3. Zellkulturmedien und Zusätze	23
3.4. Antikörper	23
3.5. Stimulanzen	25
3.6. Molekularbiologische und immunologische Kits	25
3.7. Chemikalien und sonstige Reagenzien	26
4. Methoden	27
4.1. Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	27
4.1.1. Prinzip	27
4.1.2. Protokoll	27
4.2. MACS	27
4.2.1. Prinzip	27
4.2.2. Protokoll	28

4.3.	Zellkultur.....	29
4.3.1.	Kultivierung.....	29
4.3.1.1.	B-Zellen.....	29
4.3.1.2.	DC.....	29
4.3.2.	Kokulturen.....	30
4.3.3.	Zusätze.....	31
4.4.	Durchflusszytometrie.....	33
4.4.1.	Grundlagen.....	33
4.4.2.	Pipettierschema.....	36
4.4.3.	Extrazelluläre Färbung.....	36
4.4.3.1.	Grundlagen.....	36
4.4.3.2.	Färbeprotokoll.....	36
4.4.4.	Intrazelluläre Färbung.....	37
4.4.4.1.	Grundlagen.....	37
4.4.4.2.	Färbeprotokoll.....	37
4.4.5.	Apoptose-Färbung.....	37
4.5.	ELISA.....	38
4.5.1.	Prinzip.....	38
4.5.2.	Protokoll.....	38
4.6.	Statistik.....	39
5.	Ergebnisse.....	40
5.1.	Charakterisierung der Zellpopulationen.....	40
5.1.1.	B-Zellen.....	40
5.1.1.1.	B1-Tube.....	40
5.1.1.2.	B2-Tube.....	42
5.1.2.	DC.....	42
5.1.2.1.	D1-Tube.....	42
5.1.2.2.	D2-Tube.....	43
5.1.3.	Apoptose-Tube.....	43
5.2.	Verlauf der Zellzahlen.....	45
5.2.1.	Vergleich zwischen Patienten (P) und Kontrollen (K).....	45
5.2.1.1.	Leukozyten und Lymphozyten.....	45
5.2.1.2.	B-Zellen.....	46
5.2.1.3.	DC.....	51
5.2.1.4.	DC/B-Zell-Ratio.....	52
5.2.2.	Vergleich mit Kokulturen.....	52
5.2.2.1.	Leukozyten und Lymphozyten.....	53

5.2.2.2.	B-Zellen.....	53
5.2.2.3.	DC.....	57
5.2.2.4.	DC-B-Zell-Ratio.....	58
5.2.2.5.	B-Zellen.....	59
5.2.2.6.	DC.....	60
5.2.3.	Detektion von Apoptose.....	61
5.2.3.1.	Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen	61
5.2.3.2.	Kokulturen.....	63
5.2.3.3.	Zusätze	64
5.3.	BAFF-Konzentrationen im Kulturüberstand	65
5.3.1.	Charakterisierung.....	65
5.3.2.	Zusätze	66
6.	Diskussion	67
6.1.	B-Zellen.....	67
6.2.	DC.....	70
6.3.	Apoptose.....	72
6.4.	BAFF.....	72
7.	Zusammenfassung	74
8.	Anhang.....	76
8.1.	Tabellen Zellzahlen	76
8.1.1.	Vergleich Patienten mit Kontrollen	76
8.1.2.	Kokulturen.....	78
8.1.3.	Zusätze	80
8.1.4.	Apoptose.....	83
8.2.	Tabellen BAFF-Konzentrationen	88
8.2.1.	Charakterisierung.....	88
8.2.2.	Zusätze	88
9.	Literaturverzeichnis	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIE	Autoimmuneropathie
AKT	Protein Kinase B
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANA	anti nuclear antibody
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APRIL	a proliferation-inducing ligand
ATG	anti-thymocyte-antigen
BAFF	B cell activating factor
BCMA	B cell maturation
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bim	Bcl-like protein 11
BLIMP 1	PR domain zinc finger protein 1
BR3	BAFF-receptor
c-Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CD	cluster of differentiation
(c)GvHD	(chronic) graft versus host disease
CR	complete remission
CSA	Ciclosporin A
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CXCL	C-X-C motif ligand
(p)DC	(Plasmazytoide) Dendritische Zelle
(ds)DNA	(double-strand) deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GvL	graft versus leukemia
HGF	hematopoetic growth factor
HLA	human leukocyte antigen
HRP	Meerrettichperoxidase
HSCT	Hämatopoietische Stammzelltransplantation
IDO	Indolamine-2,3-Dioxygenase

ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KREC	K-deleting recombination excision circle
LCH	Langerhans-Zell-Histiozytose
LFA	lymphocyte function-associated antigen
MACS	magnetic-activated cell sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolat-mofetil
MTX	Methotrexat
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PBS	phosphate buffered saline
PBSCT	peripheral blood stem cell transplantation
PD	progressive disease
PDGF(R)	platelet-derived growth factor (receptor)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PR	partial remission
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	stable disease
σ	Standardabweichung
SSC	side scatter
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
snRNP	small nuclear ribonucleic particles
TAC1	transmembrane activator, calcium-modulator and cytophilin ligand interactor
TBI	total body irradiation
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TGF	transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TLR	toll-like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	tumor necrosis factor
Treg	regulatory T cell

1. Einleitung

1.1. Allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation

1.1.1. Allgemein

Die allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation (HSCT) ist eine etablierte kurative Therapie für maligne Neoplasien wie Hochrisiko-Leukämien und -Lymphome, aber auch für eine Reihe nicht maligner Erkrankungen, wie beispielsweise aus dem Bereich der hereditären Stoffwechsel- oder hypoplastischen Knochenmarkerkrankungen. Einerseits besteht das Prinzip einer allogenen HSCT darin, dass nach meist kombinierter systemischer Chemotherapie und Bestrahlung des Patienten möglichst alle entarteten Zellen abgetötet werden. Andererseits wird aber auch das Empfänger-eigene hämatopoietische System so stark und irreversibel geschädigt, dass eine Transplantation von hämatopoietischen Stammzellen eines geeigneten Spenders nötig, aber auch überhaupt erst möglich wird. Diese fremden Zellen können sich in vakanten Knochenmarknischen einnisten und dort proliferieren und somit ein neues, Spender-identisches blutbildendes System etablieren. Daran beteiligt ist unter anderem die weiße Zellreihe, deren Vertreter residuale maligne Zellen als Spender-fremd erkennen und eliminieren können. Dies stellt eine essentielle Säule im kurativen Potential der HSCT dar. In Deutschland alleine werden jährlich knapp 2.000 allogene HSCTs durchgeführt (Beelen und Mytilineos 2014), davon etwa 350-400 bei pädiatrischen Patienten (Sykora 2013). Die zugrundeliegenden Erkrankungen sind laut einer globalen Erhebung adulter und pädiatrischer Zentren von 2006 zu 54% lymphoproliferative Erkrankungen, 34% Leukämien, 6% solide Tumoren, und 5% nicht maligne Erkrankungen wie zum Beispiel Hämoglobinopathien, Immundefizienzen, Stoffwechselerkrankungen und aplastische Knochenmarkerkrankungen (Niethammer et al. 2013; Gratwohl 2010).

Die GvHD (Graft-versus-Host Disease) ist eine schwerwiegende Komplikation der HSCT, kommt jedoch auch in besonderen Fällen transfusions-assoziiert vor. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten von Immunantworten der Spender-Immunzellen gegen Antigene des Empfängers, was zu einer immunologischen Abstoßungsreaktion gegen verschiedenste Gewebe des Empfängers führt. Der Begriff Graft-versus-leukemia (GvL)-Effekt wiederum beschreibt die Reaktion von Spender-Immunzellen gegen die malignen Zellen des Empfängers (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2009). Dieser Vorgang wird als die wichtigste Komponente des kurativen Potentials der HSCT erachtet.

1.1.2. B-Zell-Subpopulationen und Rekonstitution nach HSCT

1.1.2.1. B-Zell-Subpopulationen

Heutzutage ist die Durchflusszytometrie das wichtigste Werkzeug, um hämatopoietische Zellpopulationen zu differenzieren. Etablierte Kombinationen von Oberflächenmarkern erlauben es uns, verschiedene Zellsubpopulationen eindeutig zu identifizieren.

B-Zellen sind physiologisch sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut zu finden. Die B-Zell-Populationen des Knochenmarks beinhalten Stammzellen, Vorläuferzellen und Plasmablasten, sowie Plasmazellen (Leandro 2013). Hämatopoietische Stammzellen exprimieren CD34 (cluster of differentiation) und TdT (Terminal desoxynucleotidyl transferase) und ihr Antigen-Profil beinhaltet typischerweise CD10^{high}, CD22^{low} und CD38^{high}. Pro- und Prä-B-Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu ihren Vorgängern durch ein Fehlen von CD34 und TdT aus, zeigen dafür aber eine progressive Hochregulation von CD20. Reifen B-Zellen wiederum fehlt CD10 (McKenna et al. 2004; McKenna 2001). Transitionale B-Zellen, die ersten Repräsentanten, die im peripheren Blut gefunden werden können, sind charakterisiert durch die Oberflächenmarker CD10, CD38, CD24 und Ig(Immunglobulin)M, wohingegen CD27 nicht exprimiert wird (Morbach et al. 2010). Ihre Untergruppen beinhalten T1-Zellen, welche wiederum in CD21^{low}- und CD21⁺-Zellen unterteilt werden, T2- und T3-Zellen. T1-Zellen stellen eine unreife Vorstufe zu T2-Zellen dar und können aus dem Knochenmark ins periphere Blut emigrieren. T3-Zellen sind eine distinkte Subpopulation, ihre Differenzierung erfolgt mittels CD45RB^{MEM55} (Palanichamy et al. 2009). Naive B-Zellen sind charakteristischerweise IgM^{low}, IgD^{high}, CD27⁻ und ABCB-1⁺. Bei Memory B-Zellen wiederum kann unterschieden werden zwischen IgM^{class-switched} post-germinal und IgM^{high} Lymphozyten (Bemark et al. 2012) sowie einer Population ohne CD27-Expression. Dieser Subtyp ist assoziiert mit der Krankheitsaktivität bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) (Sanz et al. 2008). Zellen, die nicht IgM exprimieren, tragen IgA, IgE oder IgG an ihrer Oberfläche (Bemark et al. 2013). Sowohl CD27⁺- als auch CD27⁻ IgG⁺ Memory-Zellen durchlaufen eine gemeinsame Keimzentrums-abhängige Entwicklung, wohingegen CD27⁻ IgA⁺- und natürliche Effektor-Zellen keiner Keimzentrumsreaktion bedürfen (Berkowska et al. 2011). Es wurde postuliert, dass die Häufigkeit zirkulierender Plasmablasten (CD24⁻ CD38⁺⁺) als Marker für die Erkennung von Autoimmunerkrankungen dienen könnte (Morbach et al. 2010). Sie exprimieren hohe Konzentrationen von CD27 und CD38, CD20 dagegen nicht (Bemark et al. 2012).

Einleitung

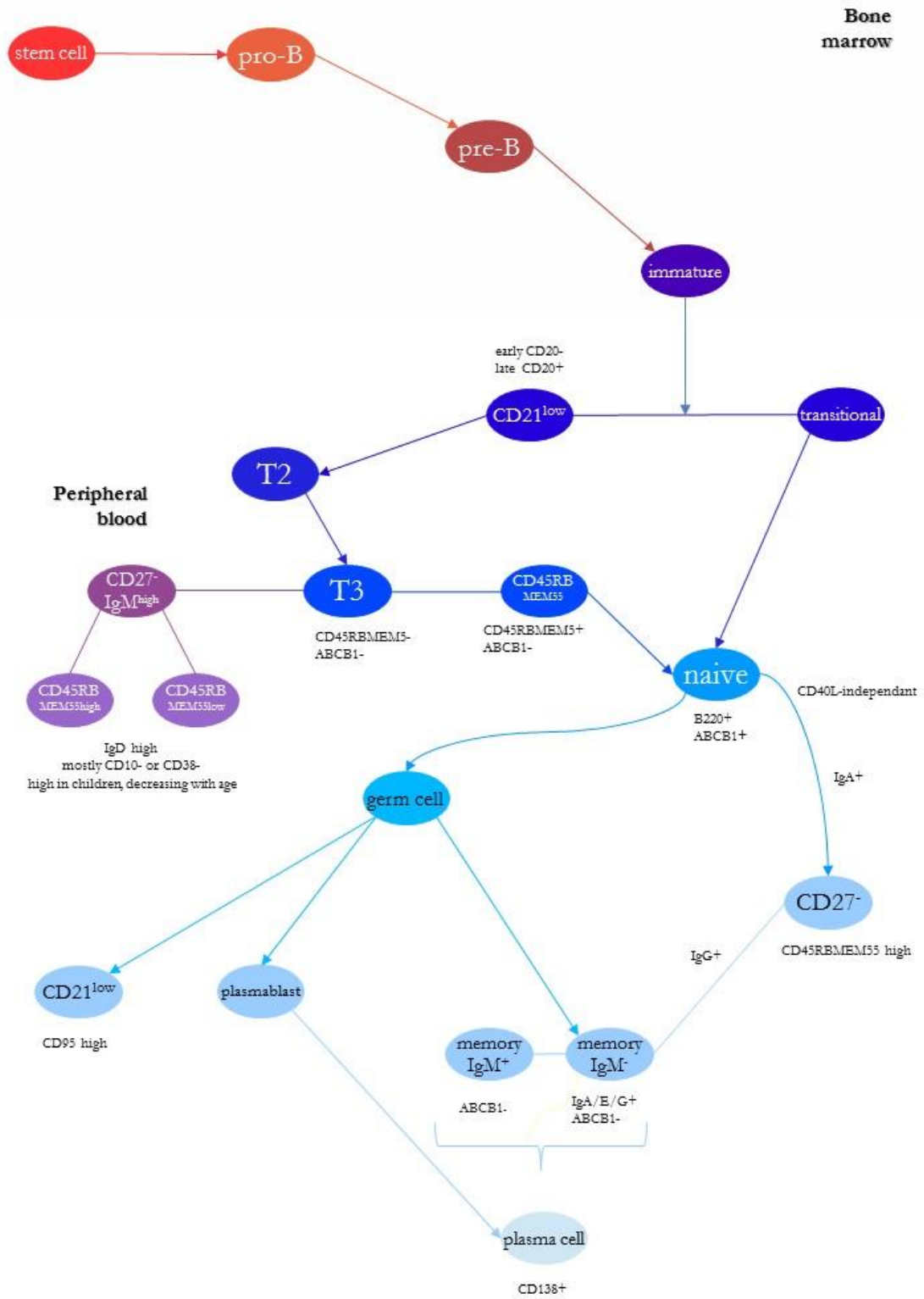


Abbildung 1-1 schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung (nach Bewark et al. 2012)

Einleitung

	IgD	IgM	CD10	CD19	CD20	CD21	CD22	CD24	CD27	CD34	CD38	CD45RB	MEM55	ABCB1
stem cell			high	+			low			+	+			
pro-B			+	+	-/+		low				high			
pre-B			+	+	+		low				high			
immature		high	high	+	+									
CD21 low	low		+	+	high	-/low		high	-		high			
transitional	int	high	+	+	high	+		high	-		high			
T2	high	high	low	+	+	+		int	-		int			
CD27 - IgM high	high	high		+					-				+/-	
T3	high	low		+	+	+		low	-		low		-	-
CD45RB MEM55	high	low		+	+	+		low	-		low		+	-
naive	high	low		+	+	+		low	-		low			+
germ cell	-			+							++			
CD21 low		+		+		low					low			
memory IgM +	high	low		+	+	+		int	+		-			-
memory IgM -	-	-		+	+	+		int	+		-			-
CD27 -	-	-		+				low			low		high	
plasmablast				+	-				high		high			
plasma cell				+	-			-	high		high			

Abbildung 1-2 Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen anhand spezifischer Oberflächenmarker (nach Bemerk et al. 2012)

1.1.2.1. Rekonstitution nach HSCT

Interessanterweise zeigt die Rekonstitution der B-Zell-Subpopulation nach HSCT Ähnlichkeiten zur physiologischen Ontogenese (Bosch et al. 2012). Die Wiederherstellung des B-Zell-Pools scheint einer spezifischen Ordnung zu folgen, und das resultierende B-Zell-Kompartiment nach HSCT ebenso wie das von Kindern unterscheidet sich von dem gesunder Erwachsener (Bemark et al. 2013). Im Vergleich zu anderen Immunzellen vollzieht sich die Rekonstitution von B-Zellen am langsamsten, immerhin zeigen sich bei bis zu 31% der pädiatrischen Patienten sogar 12 Monate nach HSCT supprimierte B-Zell-Zahlen (Bae et al. 2012). In der Regel normalisieren sich die Zahlen von sowohl B- wie auch T-Lymphozyten erst zwischen 3 und 6 Monaten nach HSCT. Die erste ansteigende Subpopulation stellen Memory-Zellen dar, gefolgt von Transitional- und naiven B-Zellen (Mensen et al. 2013; Federmann et al. 2010).

Bei Kindern zeigt sich eine signifikant schnellere Erholung der B-Lymphozyten-Zahlen nach Transplantation von Nabelschnurblut nicht verwandter Spender als nach der Verwendung von Knochenmark nicht verwandter Spender als Stammzellquelle. Jedoch hat dieser Unterschied keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Rénard et al. 2011). Nach Stammzelltransplantation aus dem peripheren Blut (PBSCT) finden sich höhere B-Zell-Zahlen im Patientenblut kurz nach Engraftment als nach Knochenmarktransplantation, wohingegen zu späteren Zeitpunkten kein Unterschied diesbezüglich beschrieben wurde (Storek 2001). Auch ähnelt die Rekonstitution des B-Zell-Pools nach Gabe von Rituximab der Situation nach HSCT dahingehend, dass die neu in Erscheinung tretenden B-Lymphozyten phänotypisch unreif sind (Anolik et al. 2007). Erst ab einem Jahr nach HSCT erreichen die B-Zell-Zahlen normale Werte und haben alle einen gemeinsamen Ursprung aus dem Spender-Zellrepertoire (Bemark et al. 2012; Bosch et al. 2012). Es werden also alle B-Lymphozyten des Empfängers ersetzt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Vertretern der B-Zell-Reihe überleben Plasmazellen häufig die initiale Konditionierung, gehen aber alsbald nach Transplantation zugrunde (Bemark et al. 2012). Dies erklärt unter anderem die Beobachtung, dass direkt nach HSCT relativ unveränderte Ig-Spiegel nachgewiesen werden können.

GvHD spielt eine wichtige Rolle in der verzögerten Rekonstitution des Lymphozyten-Pools und speziell der B-Zell-Reihe nach HSCT (Bae et al. 2012; Storek et al. 2008; Olkinuora et al. 2011). Aus Untersuchungen erwachsener transplantierte Patienten ist bekannt, dass die Entwicklung einer chronischen GvHD (cGvHD) mit einer im Vergleich verspäteten

Einleitung

Erholung der B-Zell-Zahlen korreliert (Bae et al. 2012). Damit geht einher, dass anteilig hohe Zahlen an Vorläufer B-Zellen mit einer signifikant niedrigeren Inzidenz an cGvHD in Korrelation stehen. Dies weist womöglich auf eine ungestörte B-Zell-Lymphopoese hin (Fedoriw et al. 2012). Erhöhte Konzentrationen von Transitional- (Bemark et al. 2012) und naiven B-Zellen (Avanzini et al. 2005) sind nach HSCT zu beobachten. Direkt nach Transplantation weisen B-Zellen ein eingeschränktes CDR3-Repertoire auf, nach 12 Monaten post-HSCT zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zu gesunden Kontrollen in der Variabilität des Antigen-Rezeptor-Verteilungsmusters auf naiven B-Zellen. Bei Memory B-Zellen hingegen besteht auch zum späteren Zeitpunkt ein eingeschränktes Repertoire (Omazic et al. 2003). Diese Beobachtung geht einher mit der Beobachtung, dass Disparitäten im IgH CD3-Repertoire zwischen Memory- und naiven B-Lymphozyten sich bis zu 6 Monate nach HSCT nachweisen lassen und somit eine gestörte Erholung von CD27⁺ Memory B-Zellen anzeigen (Bemark et al. 2012; Avanzini et al. 2005; Masson et al. 2015).

Bei pädiatrischen Patienten machen CD27⁻ IgM^{high}-Zellen die größte Population innerhalb der B-Lymphozyten in den ersten 12 Monaten nach HSCT aus. Diese Subgruppe wurde weiter in Transitional- und Non-Transitional-Zellen unterteilt, wobei letztere wiederum mittels CD45RB^{MEM55} differenziert werden (Bemark et al. 2013). In den ersten zwei Jahren nach Transplantation ist der Anteil der an Memory B-Zellen sehr gering, wohingegen naive B-Zellen die prädominante Subgruppe darstellen (Storek et al. 2008). Weiter steigen die Zahlen an CD27⁺ IgM⁺ Memory B-Zellen anteilig mit der Zeit an. Bei CD27⁺ IgM^{high} ist diese Beobachtung jedoch nicht gemacht worden, sondern im Vergleich zu gesunden Kontrollen bleiben die Werte sogar geringer (Bemark et al. 2013).

Es wurde postuliert, dass das Erscheinen neuer B-Zellen nach HSCT als prädiktive Determinante für die spätere Menge an B-Zellen im peripheren Blut dienen könnte (Serana et al. 2010). Auch K-deleting recombination excision circles (KRECs) könnten als Marker für den Knochenmark-Output für B-Zellen nach HSCT dienen, da sie mit den Zahlen von sowohl Transitional- als auch naiven B-Lymphozyten korrelieren. Ab Tag 60 nach HSCT steigen ihre Werte an und sind assoziiert mit der Rekonstitution dieser beiden B-Zell-Untergruppen. Die Korrelation mit der Entwicklung der Memory B-Zell-Reihe hingegen ist wesentlich weniger eindeutig ausgeprägt (Mensen et al. 2013).

In humanisierten Mausmodellen für HSCT wurde eine Abhängigkeit der B-Zell-Reifung von T-Zellen beobachtet (Lang et al. 2013). Weiter gibt es Hinweise darauf, dass mittels PUVA (Psoralen plus UV-A) behandelte T-Zellen dazu fähig sein können, das Risiko für die

Entwicklung einer akuten GvHD zu verringern, ohne dabei die Rekonstitution der einzelnen Lymphozyten-Reihen zu gefährden (Xiao et al. 2012).

1.2. cGvHD

In der Literatur werden zwei Formen der GvHD unterschieden: akut und chronisch. Initial wurde die akute GvHD definiert durch ein Auftreten innerhalb von 100 Tagen nach allogener HSCT. Die nach diesem Zeitraum auftretende Erkrankung dagegen wurde als cGvHD benannt. Aufgrund tiefgreifender Erkenntnisse um die Pathogenese der Erkrankung und eines besseren Verständnisses der Unterschiede auf zellulärer und klinischer Ebene wurde die Definition ausgeweitet (Filipovich et al. 2005). Die cGvHD kann fortlaufend auf eine akute GvHD folgen, nach Ausheilung dieser -, oder de novo auftreten. Während die akute Verlaufsform vor allem Zielorgane wie die Haut, die Leber oder den Gastrointestinaltrakt betrifft, beschränkt sich die cGvHD in ihrer Manifestation in der Regel nicht auf spezifische anatomische Regionen oder Kompartimente (Baird et al. 2010).

Auch wenn die cGvHD die eigentlich erwünschten GvL-Effekte zu verstärken vermag, geht dieser Nutzen einher mit schwerwiegenden Folgen und einer erhöhten Mortalität. (Storb et al. 2013; Boyiadzis et al. 2015). Deswegen besteht das primäre Ziel der post-Transplantations-Therapie in der Prävention einer GvHD, während gleichzeitig versucht wird, die erhofften GvL-Effekte zu erhalten, Rezidive zu reduzieren und dementsprechend das Überleben zu verbessern.

Auch heute noch stellt sie GvHD, trotz mehr als 50 Jahren an Erfahrung mit HSCT und etwa 2500 Transplantationen jährlich (Zinöcker et al. 2012) – nach Krankheitsrezidiv den wichtigsten Faktor für Mortalität bei transplantierten Patienten dar (Baird et al. 2010). Bis zu 70% der erwachsenen Rezipienten können eine cGvHD entwickeln (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2009), wohingegen die Häufigkeit bei Kindern geringer ist (20-50%). Die Inzidenzen sind seit der Verwendung von Stammzellen aus dem peripheren Blut (Eapen et al. 2004) und nicht verwandten Spendern angestiegen. Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung von cGvHD schließen eine vorherige Erkrankung an akuter GvHD, die Auswahl der Stammzellen-Quelle (PBSCT oder Knochenmark, nicht verwandt oder mismatched Spender), das Alter von Empfänger und Spender, CMV-Status, Ganzkörperbestrahlung (TBI) und sex-mismatch ein (Baird et al. 2010).

Die cGvHD ist mit zahllosen Komplikationen behaftet, die aus der Erkrankung hervorgehen können. Deshalb stellt die Behandlung eine große Herausforderung dar sowohl bei Kindern

als auch bei Erwachsenen. Pädiatrische Patienten mit cGvHD zeigen eine signifikant verzögerte körperliche Entwicklung (Oberg et al. 2012) im Vergleich Stammzell-Empfängern ohne Erkrankung, sowie eine Wachstumseinschränkung und geringere Lebensqualität (Chung et al. 2013). Jedoch sind die konkreten Mechanismen der Entstehung der cGvHD immer noch nicht in allen Details bekannt. Während über die Pathogenese der akuten T-Zell-vermittelten GvHD intensiv geforscht wurde, ist der Fokus der Erforschung der cGvHD auf die Bedeutung von B-Zellen in der Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung gerückt (Miklos 2005). Dennoch beschreibt eine gängige Hypothese, dass cGvHD eine vorrangig Th2-vermittelte (T-Helferzelle) Erkrankung mit gewissen Kennzeichen einer Autoimmunerkrankung ist (Welniak et al. 2007). Demnach werden die essentiellen Schritte der Pathogenese getriggert durch eine Schädigung des Thymus im Rahmen der Konditionierung vor HSCT oder, noch wesentlich bedeutender, durch eine akute GvHD. Dadurch entsteht eine verminderte Selektion von CD4⁺ T-Zellen, was seinerseits wiederum zu einer veränderten Immunantwort mit einer erhöhten Produktion an Zytokinen wie Interleukin-4 (IL), IL-5, und IL-11 führt. Diese sind allesamt Teil des Th2-Zytokin-Repertoires. Gewebsfibroblasten werden sowohl direkt mittels durch Th2-Zellen freigesetztes IL-2, IL-10 und TGFβ1 (transforming growth factor) stimuliert als auch indirekt über Makrophagen, die PDGF (platelet-derived growth factor) und TGFβ1 produzieren. Dieser Prozess kann noch verstärkt werden durch verminderte Konzentrationen an regulatorischen T-Zellen (Treg), was zu einem weiteren Abweichen der Homöostase des Immunsystems in Richtung einer Th2- und Th17-vermittelten Antwort führt (Blazar et al. 2012). Im Gegensatz zu dieser Hypothese steht jedoch die Beobachtung, dass sowohl B-Zellen als auch DC in murinen cGvHD-Modellen als alleine suffizient antigenpräsentierend agieren können (Schultz et al. 1995; Anderson et al. 2004).

Th17-Zellen, den CD4⁺ T-Zellen angehörend und gekennzeichnet durch Expression des IL-23-Rezeptors (Dander et al. 2009) können als B-Zell-Helfer agieren. Sie stehen sowohl im Zusammenhang mit einer vermehrten Formierung von Keimzentren als auch der geförderten Proliferation und Aktivierung von B-Zellen. Dieser Effekt wird durch ihr einzigartiges und spezifisches Zytokin-Reservoir vermittelt, welches IL-17, IL-21 und IL-22 beinhaltet (Mitsdoerffer et al. 2010). Die resultierende Dysregulation der B-Zell-Homöostase kann – wie auch erhöhte Konzentrationen an BAFF (B cell activating factor), einem Vertreter der TNF-Liganden-Superfamilie (tumor necrosis factor) – zu Autoreaktivität bei B-Zellen führen (Blazar et al. 2012).

Zusammenfassend tragen all diese Einzelschritte zu systemischen Effekten bei, die auch bei Autoimmunerkrankungen zu finden. Sie betreffen verschiedenste Organe wie Haut, Nägel, Mund, Augen, Muskeln, den Gastrointestinaltrakt, Leber, Lungen, Nieren, Herz und Knochenmark (Young et al. 2012; Ferrara et al. 2009; Zhang 2006; Svegliati et al. 2007). Weiterhin wird eine Verbesserung der uns im Moment zur Verfügung stehenden Standard- Behandlungsmethoden und therapeutischen Ansätze benötigt, welche sich in der Regel auf den Gebrauch von Glukokortikoiden mit oder ohne Tacrolimus oder Ciclosporin beschränken (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2009). Sie bringen ein breit gefächertes Nebenwirkungsspektrum mit sich, was insbesondere auf pädiatrischem Gebiet ein Problem von besonderer Bedeutung ist (Baird et al. 2010). Auch heute fehlt uns ein spezifischer Therapieansatz.

Ein tiefgreifendes Verständnis bezüglich genetischer Polymorphismen bei zahlreichen Zytokinen, HLA-Matching (human leukocyte antigen), MHC-Haplotypen und -Mismatch könnten unser Verständnis der pathophysiologischen Entwicklung der cGvHD noch weiter verbessern (Armistead et al. 2011; Kohrt et al. 2013; Pidala et al. 2013).

1.2.1. Therapie der cGvHD

Bisher ist – wie bei vielen immunologischen Erkrankungen - keine kausale Behandlung der GvHD möglich, daher kann dieser Komplikation der HSCT bisher nur durch symptomatische Therapie und Vermeidung der Risikofaktoren begegnet werden. Vor allem die Prävention der Entwicklung einer akuten GvHD spielt eine wichtige Rolle. Die dabei verwendeten Ansätze beinhalten vor allem die T-Zell-Inhibition. Die Behandlung der cGvHD selbst reicht von der topischen Anwendung von Steroiden und Calcineurin-Inhibitoren über die systemische Gabe von Immunsuppressiva bis hin zur extrakorporalen Photopherese (Weitz et al. 2014; Bastien et al. 2010).

Weitere innovative Ansätze in der Therapie der GvHD beschäftigen sich unter anderem mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Zum Beispiel könnte die Fähigkeit des Medikaments Imatinib, c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) zu inhibieren, Effekte autoreaktiver B-Zellen blockieren (Olivieri et al. 2011). Ibrutinib, ein Inhibitor von Bruton's Tyrosine Kinase und der IL-2 Inducible T-cell Kinase, wurde in murinen Modellen bereits zur Prophylaxe einer cGvHD eingesetzt (Schutt et al. 2015).

Um verlässlich die Entwicklung einer cGvHD vorhersagen oder die Schwere der Erkrankung einschätzen zu können, werden validierte Biomarker benötigt. Neben einer gestörten B-Zell-

Homöostase (Levine et al. 2012; Michonneau et al. 2009) gibt es bereits weitere Variablen, die mit dem Befall spezifischer Organe assoziiert sind; lösliches CD13 und BAFF sind mit einer hepatischen, anti-dsDNA-Antikörper mit einer sklerodermatösen, okulären oder Gelenk-Beteiligung assoziiert (Fujii et al. 2008). Bei pädiatrischen Patienten fand sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen hohen Spiegeln von IL-2R α und HGF (hematopoetic growth factor) und dem Risiko, an GvHD zu erkranken, wohingegen erhöhte IL-8-Konzentrationen eine niedrigere Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung anzeigten (Berger et al. 2013).

Des Weiteren korrelieren Konzentrationen von CXCL9 (C-X-C motif ligand) über dem Median mit der Entwicklung von cGvHD in den ersten drei Monaten nach Diagnose (Kitko et al. 2014). CXCL10 und CXCL11 wurden identifiziert als vielversprechende diagnostische Marker sowohl für aGvHD als auch cGvHD (Ahmed et al. 2015). Jedoch fehlen den meisten Studien zu Biomarkern für GvHD suffiziente Patientenzahlen. Einzig die Kombination von vier Markern (anti-dsDNA, IL-2R α , CD13, BAFF) hat eine zufriedenstellende Sensitivität für die Vorhersage einer Erkrankung erreicht (Fujii et al. 2008).

Eine Vielzahl von Biomarkern für die prädiktive Identifikation von Patienten, welche ein Risiko haben, cGvHD zu entwickeln, wurde eingeführt und vorgeschlagen. Darunter sind unter anderem Tregs, B-Zellen, BAFF, IL-10 (Paczesny 2013) und auch das Auftreten von H-Y-Antikörpern (Arai et al. 2012). In der Tat vermag die Detektion allogenetischer HY-Antikörper 3 Monate nach HSCT von weiblichem Spender zu männlichem Empfänger die Inzidenz und Schwere einer cGvHD sowie die nicht Rezidiv-assoziierte Mortalität vorherzusagen (Nakasone et al. 2015).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse konnte sich in der klinischen Routine bislang kein Marker etablieren. Validierte Marker für das Risiko der Entwicklung der cGvHD können womöglich auch zu einem noch früheren Zeitpunkt hilfreich sein. Die Identifizierung von Spendern mit einer erhöhten Gefahr der Krankheitsentstehung für den Empfänger könnte eine Indikation zur präventiven Beeinflussung des Grafts oder anderer therapeutischer Ansätze darstellen.

1.2.2. B-Zellen

In Modellen für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen, unter anderem der Rheumatischen und Juvenilen Idiopathischen Arthritis, spielen autoreaktive B-Zellen, resultierend aus einem Versagen von peripheren oder zentralen Toleranz-Checkpoints, eine

wichtige Rolle (Wiegering et al. 2010; Shimabukuro-Vornhagen et al. 2009). Klinische und experimentelle Gemeinsamkeiten zwischen klassischen Autoimmunerkrankungen und cGvHD legen den Verdacht nahe, dass diesen Krankheiten zumindest in Teilen eine gemeinsame Ursache zugrunde liegt. Zum Beispiel können erhöhte Konzentrationen von TNF α und IL-6, typischerweise assoziiert mit Autoimmunerkrankungen, auch bei Patienten mit cGvHD beobachtet werden (Dander et al. 2009). Iori et al. untersuchten den Einfluss von B-Zell-Subpopulationen des Knochenmarks und der Stammzell-Quelle in Bezug auf die Entstehung der GvHD. Sie konnten zeigen, dass CD34⁻ CD20⁺ B-Zellen im Graft positiv mit der GvHD-Inzidenz assoziiert sind, wohingegen CD34⁺ CD19⁺ Vorläufer-B-Zellen invers korrelieren (Iori et al. 2008). Dies könnte erklären, warum sich geringere Inzidenzen von cGvHD nach Knochenmarkstransplantation im Vergleich zu PBSCT finden (Niethammer et al. 2013). Patienten mit cGvHD zeigen verringerte CD24^{hi} CD²⁷⁺ B-Zell-Subpopulationen und ein vermindertes Auftreten von IL-10-produzierenden CD24^{hi} CD²⁷⁺ B-Zellen (Masson et al. 2015). Nichtsdestotrotz konnte nach HSCT keine signifikante Korrelation zwischen B-Zell-Subtypen des Knochenmarks und cGvHD oder Gesamtüberleben festgestellt werden (Michonneau et al. 2009).

1.2.2.1. Autoantikörper

Angesichts der bereits angeführten pathogenetischen Merkmale der Erkrankung ist es wenig überraschend, dass bei Patienten mit GvHD häufig Autoantikörper detektiert werden können. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass tatsächlich eine Autoimmungense angenommen werden kann. Verschiedene Typen von Antikörpern lassen sich bei Patienten mit der Erkrankung detektieren, unter anderem ANA (anti nuclear antibody), anti-dsDNA (double-strand deoxyribonucleic acid), anti-smooth muscle, antimitchondriale und anti-Cardiolipin-Antikörper (Fujii et al. 2008; Moon et al. 2009). Bei Patienten mit schwerer und extensiver GvHD sind Autoantikörper, die spezifisch gegen PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) gerichtet sind und eine exzessive Produktion von Kollagen vermitteln, identifiziert worden. Ihre Spiegel korrelieren mit der Schwere der Hautbeteiligung beziehungsweise der Lungenfibrose (Svegliati et al. 2007). Außerdem ist das Auftreten von Autoantikörpern assoziiert mit einer erhöhten Inzidenz an cGvHD und einer geringeren Rezidivrate (Moon et al. 2009). Jedoch ist die beschriebene Korrelation dieser Antikörper mit der Krankheitsschwere (Kapur et al. 2008) insofern relativ zu sehen, als ihr Auftreten inkonsistent (Socie 2011) und ihre Spiegel bei Patienten mit Hypergammaglobulinämie

erhöht sind (Kuzmina et al. 2011). Die Detektion von alloreaktiven oder autoreaktiven Antikörpern könnte als Marker für die Präsenz von Antigen-spezifischen B-Zellen dienen, welche zur Autoimmunpathogenese beitragen (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2009).

1.2.2.2. BAFF

Die BAFF-Zytokin-Familie beinhaltet neben BAFF selbst als auch APRIL (a proliferation-inducing ligand) sowie die drei dazugehörigen Rezeptoren BCMA (B cell maturation), TACI (transmembrane activator, calcium-modulator and cytophilin ligand interactor) und BR3 (BAFF-receptor).

Die Interaktion zwischen BAFF und BR3 aktiviert NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)-abhängige Signalwege, die für das Überleben von B-Zellen essentiell sind. Systemisches BAFF ist involviert in die homöostatische Kontrolle von B-Zell-Pools. Es steuert das Überleben reifer B-Zellen sowie das zelluläre Gleichgewicht der prä-immun B-Zell-Nische. Abhängig vom Expressionsmuster der Rezeptoren für BAFF existieren unabhängige homöostatische Nischen für prä-immune B-Lymphozyten. Lokales BAFF ist an humoralen Immunantworten beteiligt und steuert die Selektion in lymphatischen Keimzentren. Durch somatische Hypermutation entstehen dort hochaffine B-Zell-Klone, die durch spezifische Antigenpräsentation an folliculäre Th-Zellen Zugang zu dem von ihnen produzierten BAFF erlangen (Naradikian 2015).

Wie bereits dargelegt, ist BAFF ein Kandidat dafür, als Biomarker für cGvHD eingesetzt zu werden, auch wenn es in Routine-Messungen nicht zur Verfügung steht (Vincent et al. 2013; Levine et al. 2012). Die Effekte dieses Zytokins auf B-Zellen sind mannigfaltig. Generell wirkt es insofern als aktivierender Faktor für B-Zellen, als hohe Konzentrationen von BAFF zu einer reduzierten Zellgröße und einem verminderten Metabolismus bei B-Lymphozyten führen (Allen et al. 2012). Erhöhte Konzentrationen in Patienten mit cGvHD dagegen beeinflussen die Zahlen von sowohl prä- als auch post-Keimzentrums-Plasmablasten und -Plasmablasten-like-B-Lymphozyten-Subpopulationen positiv (Sarantopoulos et al. 2009). In transgenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass eine überschießende Expression von BAFF die Apoptose autoreaktiver B-Zellen verhindern kann, zu einer Verstärkung anti-dsDNA-spezifischer B-Zell-Reifung führt, die Antikörperproduktion induzieren kann (Thorn et al. 2010) und Autoimmunphänomene hervorruft (Thien et al. 2004).

1.2.2.3. Zielgerichtete Therapien mit dem Fokus auf B-Zellen

Heutige B-Zell-gerichtete Therapien beinhalten anti-CD20, -CD22, -IL12/23, -BAFF und –BAFF-Rezeptor-3-Antikörper. Außerdem haben sowohl konventionelle Glukokortikoide, als auch Statine nachgewiesene Effekte auf B-Zellen (Shimabukuro-Vornhagen et al. 2009; Sarantopoulos et al. 2015). Valide Daten bezüglich der cGvHD bestehen nur für Rituximab, einem anti-CD20-Antikörper. Die Einsatzgebiete dieses Medikaments erstrecken sich von der Behandlung von B-Zell-Lymphomen über Leukämien und einiger Autoimmunerkrankungen bis hin zur Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation. Neben einem positiven Effekt auf die Schwere der Erkrankung hat sich Rituximab als potentes prophylaktisches Medikament erwiesen, das die Inzidenz einer cGvHD verringern kann. In einer Reihe von therapeutischen Studien zeigten sich Ansprechraten zwischen 50 und 83% (Kapur et al. 2008). Bei Patienten mit stabilem oder verbessertem Krankheitszustand nach der Behandlung mit Rituximab konnte gezeigt werden, dass die Spiegel an naiven B-, Memory B- und Transitionalzellen signifikant erhöht sind, was ein Zeichen für die Korrelation zwischen klinischem Ansprechen und B-Zell-Homöostase darstellt (Sarantopoulos et al. 2011). Andererseits wurde postuliert, dass Rituximab in Ermangelung einer adäquaten Reduktion der Konzentration von BAFF eine abnorme BAFF/B-Lymphozyten-Ratio induzieren und aktivierte B-Zellen verstärken könnte (Sarantopoulos et al. 2009). Eine prophylaktische Gabe von Rituximab wird kontrovers diskutiert (Arai et al. 2012; Sarantopoulos et al. 2011; Ratanatharathorn et al. 2009). Es bedarf weiterer Erfahrung mit dem Medikament und der Erkrankung, um optimale Umstände und Indikationen für eine B-Zell-Depletions-Therapie zu finden.

Ein weiterer zielgerichteter Ansatz beinhaltet die Blockade von TNF, was unter anderem, durch folliculäre DC vermittelt, die Expression von CD27 auf Memory-B-Zellen verringert (Sanz et al. 2008).

1.2.3. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die wichtigsten Vertreter der Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und produzieren Zytokine wie Typ I Interferon (IFN), IL-6, IL-12 und TNF α (Fagnoni et al. 2004). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese sowohl klassischer Autoimmunerkrankungen als auch der GvHD. Untergruppen der DC schließen konventionelle DC – manchmal auch als myeloide DC bezeichnet und unterteilt in residente und migratorische Subtypen – und plasmazytoide DC (pDC) – typischerweise vorhanden im

peripheren Blut und lymphatischen Organen – ein (Sabado und Bhardwaj 2010). Abhängig von ihrem Aufenthaltsort und dem jeweiligen Aktivierungsstatus haben DC verschiedene spezifische Funktionen, die von der Induktion von Antigen-spezifischen Immunantworten bis zur Entwicklung von immunologischer Toleranz reichen.

Die unterschiedlichen DC-Untergruppen lassen sich durch charakteristische Antigen-Profile differenzieren. So exprimieren konventionelle DC CD13, CD33 und TLR2/4 (toll-like receptor); zwei distinkte Subtypen sind weiterhin definiert durch einerseits CD1 und andererseits CD141. pDC sind CD11c^{int}, CD68⁺, CD303⁺, B220⁺, CD14⁻ und exprimieren TLR7/9. Zytokine wie IL-10 und TGF β können als lokale Mediatoren des Vorgangs dienen, Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen zu induzieren (tolerogenicity). Andererseits besitzen DC die Fähigkeit, mittels TLR Pathogene zu erkennen und dadurch ihre Entwicklung in einen in Richtung Immunogenität gerichteten Differenzierungsgrad und Aktivierungszustand anzustoßen (Hubo et al. 2013).

Die bereits erwähnten pDC sind sowohl in der Lage, hohe Mengen an Typ I Interferonen zu produzieren, als auch eine potente T-Zell-Stimulationen auszuüben, wenn zuvor eine Reifung via CD40 oder TLR stattgefunden hat (Koyama et al. 2009; Rönnblom und Pascual 2008). Diese Eigenschaften betonen auch die Bedeutung von Spender-DC für den Empfänger einer HSCT, da bei Menschen innerhalb von 14 Tagen nach Übertragung 80% der DC des peripheren Bluts durch Spender-Zellen ersetzt worden sind und nach 56 Tagen der Anteil sogar schon bei über 95% liegt (Auffermann-Gretzinger et al. 2002).

Im Folgenden soll auf die wichtigsten Themen der DC-abhängigen Pathogenese der cGvHD eingegangen werden und diese in jeweils einem Abschnitt abgehandelt werden. Dazu gehören: DC-Untergruppen und cGvHD, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs und DC, die Bedeutung von IFN und IL-15 für die cGvHD und spezifische Therapien mit dem Target DC.

1.2.3.1. DC-Subpopulationen und cGvHD

Die bereits früher postulierte Rolle der Empfänger-DC in der Pathogenese der GvHD (Shlomchik 1999) wurde insofern bestätigt, als MacDonald et al. 2007 einen vorübergehenden Abfall der Krankheitsintensität der GvHD nach erfolgter Depletion von CD11c^{high} Spender-DC nachweisen konnten (MacDonald et al. 2007). Experimentelle Daten zeigen, dass Empfänger-APCs die Fähigkeit besitzen, GvHD zu induzieren, während Spender-APCs die Schwere der Erkrankung noch verstärken können (Charrier et al. 2012;

Matte et al. 2004). Weiter zeigen murine HSCT-Modelle, dass ein Fehlen von konventionellen Spender-DC einen signifikanten Abfall der IFN γ -Produktion und auch der Alloantigen-Präsentation, welche T-Zell-Antworten induzieren kann, zur Folge hat (Markey et al. 2009). Darüber hinaus scheinen unterschiedliche Krankheitsmanifestationen von spezifischen Profilen der APCs abhängig zu sein; so wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Expression von CD80 und CD86 durch T-Zellen notwendig ist für die Induktion einer kutanen cGvHD, was sowohl durch Spender als auch Empfänger-APCs vermittelt werden konnte. Die Beteiligung des Gastrointestinaltraktes scheint hingegen hauptsächlich von Spender-APCs sowie Signalwege über CD80, CD86 und auch CD40 abhängig zu sein (Anderson et al. 2005).

In der Zusammenschau der gesammelten Erkenntnisse lässt sich schließen, dass eine Manipulation der unterschiedlichen Subgruppen von Spender-DC erfolgsversprechender sein könnte, als einzelne Zytokine oder Oberflächenmarker als Targets auszuwählen. Dies könnte sich als effizient darin erweisen, die Toleranz des Spender-Immunsystems gegenüber Empfänger-Antigenen gezielt zu beeinflussen. Als Konsequenz zeigt sich, dass nicht nur B-Zell-, sondern auch DC-Homöostase eine wichtige Rolle in der Pathogenese der GvHD spielen könnte (Fagnoni et al. 2004).

1.2.3.2. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs und DC

Die Rolle von CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen des Menschen wurde eingehend erforscht; es ist bekannt, dass ein Mangel an dieser Zellgruppe schwere Autoimmunität induzieren kann (Buckner 2010). Zum Beispiel konnte in murinen MHC-Mismatch-Modellen (major histocompatibility complex) für Haut- und Herztransplantation gezeigt werden, dass Alloantigen-exprimierende, Toleranz-induzierende und aus dem Knochenmark stammende DC eine gewisse T-Zell-Hyporesponsivität bedingen können und zu einer Expansion von Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro* führen. Smyth et al. beobachteten, dass eine Injektion dieser Zellen *in vivo* in rapidem Zelltod von DC resultierte, nachdem Empfänger-APCs Alloantigen präsentiert hatten. Dies führte zu einer Abstoßung des Grafts. Lediglich eine simultane Präsenz von anti-CD40L Antikörpern und das Fehlen von CD8⁺ DC vermochte in diesem Setting das Überleben des Grafts zu verlängern (Smyth et al. 2013). In der Anwesenheit von TGF β und all-trans Retinsäure können Maus-DC tatsächlich Antigen-spezifische und immunsuppressive CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs induzieren, welche in der Lage sind, mehrere Monate zu persistieren und eine GvHD abzuschwächen (Sela et al. 2011). Interessanterweise weisen bei Patienten mit cGvHD Th17-

und CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen eine inverse Proportionalität auf. Die Anzahl von Th17-Zellen in Patienten mit aktiver cGvHD ist signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen; weiter haben Patienten mit inaktiver GvHD wiederum sehr niedrige Th17-Zellzahlen im peripheren Blut, was diesen Wert zu einem guten Indikator für den Erkrankungsstatus macht (Dander et al. 2009).

1.2.3.3. IFN, IL-15 und cGvHD

Neben bestimmten Zellpopulationen sind auch Zytokin-Expressionsmuster in den Fokus der Erforschung der Pathogenese der cGvHD geraten, von denen einige erwähnenswerte in der Folge abgehandelt werden.

CD303, welches speziell durch pDC exprimiert wird, kann eine verminderte Expression von Typ I IFN-assoziierten Genen bewirken (Röck et al. 2007). Typ I INF (spezifisch: α/β) wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zugesprochen, insofern es die Differenzierung von Th2- und Th17-Zellen negativ beeinflussen kann (Charrier et al. 2012; Huber und Farrar 2011). Die Aktivierung von T- und auch B-Zellen via Typ I IFN scheint entscheidend zur Induktion antikörpervermittelter Immunantworten beizutragen (Le Bon et al. 2006). Daneben beinhalten die immunmodulatorischen Effekte von Typ I IFN sowohl eine verstärkte Reifung von DC und die Hochregulierung der Expression von MHC I und II, als auch verstärkte Expression von CD80, CD86 und erhöhte Konzentrationen von BAFF und APRIL (Rönblom und Pascual 2008). Interessanterweise scheinen bestimmte HLA-Subtypen mit der Prädisposition für die Induktion von Autoimmunerkrankungen durch INF-Subgruppen assoziiert zu sein (Fiorentino 2008), was darauf hinweist, dass Autoimmunität auch bei cGvHD im Zusammenhang mit HLA-Variationen stehen könnte. Bei Patienten nach allogener HSCT sind CD4⁺ CD123⁺ pDC-Vorläufer in der Lage, Typ I IFN zu produzieren (Fagnoni et al. 2004). In Mäusen ist gezeigt worden, dass MHC II-exprimierende pDC in der Lage sind, durch suffizientes Priming von Spender-CD4⁺ T-Zellen das Immunsystem dahingehend zu beeinflussen, dass eine GvHD ausgelöst werden kann (Koyama et al. 2009). Andererseits führt die Sekretion von IFN γ durch murine Spender-T-Zellen zu einer gesteigerten Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) durch Spender-pDC. Dadurch kann die T-Zell-Balance verändert und die GvHD limitiert werden, ohne dabei GvL-Effekte zu inhibieren (Lu et al. 2012). IDO ist der Katalysator für den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Tryptophan-Katabolismus und ist beteiligt an der Regulation von gastrointestinaler GvHD (Ratajczak et

al. 2012). Tryptophan wiederum ist notwendig für die T-Zell-Proliferation, ein Fehlen im Metabolismus kann zu Zellzyklus-Arrest oder Apoptose führen (Sabado und Bhardwaj 2010). Diese Beobachtungen lassenIDO als vielversprechenden Akteur in der Beziehung zwischen pDC und T-Zellen erscheinen.

1.2.3.4. Zielgerichtete Therapien mit dem Fokus auf DC

Es existieren verschiedene Interaktionen zwischen B-Zellen und Vertretern von DC, auf die im Verlauf der Ausführung noch weiter eingegangen wird. Unter anderem deswegen sind DC-vermitteltes Priming von B-Zellen und die Dendritische Vakzinierung als neue therapeutische Möglichkeiten in den Fokus der angewandten klinischen Forschung gerückt. Die Dendritische Vakzinierung ist ein immunologischer Ansatz, durch den direkte und gezielt auf einen Tumor gerichtete Immunantworten induziert werden, wodurch sich auch GvL-Effekte nach HSCT theoretisch verstärken ließen. Idealerweise würden diese spezifisch gegen maligne Zellen gerichteten immunologischen Reaktionen, vermittelt durch Antigen-spezifische DC, keinen Effekt auf eine cGvHD haben (Toubai et al. 2013). Im Gegenteil kann jedoch eine GvHD die erwünschten Reaktionen auf Vakzine negativ beeinflussen (Capitini et al. 2013). Nichtsdestotrotz scheint das Setting nach HSCT ideal für die Applizierung von DC zu sein, wenn – wie bereits zuvor erwähnt – Spender-DC die Zellen des Empfängers nach Transplantation komplett ersetzen (Auffermann-Gretzinger et al. 2002). Es gibt zahlreiche Ansätze zur Dendritischen Vakzinierung gegen Neoplasien, unter anderem über eine Generierung von DC ex vivo, indem Vorläufer-Zellen mittels spezifischen Zytokinen kultiviert werden und eine anschließende Infusion dieser DC in Patienten. Auch gibt es Ansätze mittels genetisch modifizierter DC, welche tumorassoziierte virale Antigene exprimieren sowie von DC abgeleitete Exosomen (Galluzzi et al. 2012). In der Tat werden DC-basierte Tumor-Vakzine bereits in einer Reihe von klinischen Studien sowohl gegen bestimmte maligne solide und hämatologische Neoplasien (Sabado und Bhardwaj 2010; Janikashvili et al. 2010), als auch in der CMV-Therapie (Micklethwaite et al. 2008) eingesetzt.

1.3. Interaktion von DC und B-Zellen

Während zahlreiche Wege bezüglich der Interaktion zwischen DC und T-Lymphozyten – nicht nur via Antigen-Präsentation - bekannt sind (Galluzzi et al. 2012), ist der Einfluss dieser Zellen auf B-Lymphozyten erst spät in den Fokus der Forschung geraten. In der Tat werden einige der genannten Mechanismen, die direkt in die Pathogenese von Autoimmunität

involviert sind, komplementiert von oder stehen in Synergie mit Effekten von DC und B-Zellen. Als Reaktion auf TLR-Stimulation oder BCR (B-Zell-Rezeptor)-Ligation können pDC die Proliferation autoreaktiver B-Zellen verstärken und die Produktion von anti-snRNP-Autoantikörpern (small nuclear ribonucleic particles) sowie das B-Zell-Überleben unterstützen (Ding et al. 2009). Darüber hinaus sind DC die wichtigsten APCs. In Mausmodellen waren anti-CD40-aktivierte B-Zellen nicht in der Lage, CD4⁺ T-Lymphozyten suffizient in vivo zu primen ohne DC, die das korrekte Restriktionselement MHC II I-E exprimieren. Das würde eine eher auxiliäre Rolle der B-Zellen in der Optimierung des CD4⁺ T-Zell-Primings implizieren. Deswegen führt wohl lediglich eine gemeinsame Antigen-Präsentation durch DC und B-Lymphozyten zu einer optimalen und effektiven CD4⁺ T-Zell-Immunität (Kleindienst und Brocker 2005). Darüber hinaus können pDC die Differenzierung CD40-aktivierter B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen mittels einer sequentiellen Sekretion von IL-6 und Typ I IFN induzieren (Jego et al. 2003; Gilliet et al. 2008). Diese Beobachtung geht einher mit der Vorstellung, dass die genannten Zytokine zusammen mit BAFF zumindest teilweise zu den Effekten von pDC auf die Aktivierung von B-Zellen abseits des direkten Zell-Zell-Kontakts beitragen können (Ding et al. 2009; Shaw et al. 2010).

Neben den bereits genannten Interaktionsmöglichkeiten wurde eine direkte Beteiligung des ICAM-1-LFA-1-Signalwegs (intercellular adhesion molecule 1, lymphocyte function-associated antigen 1) an der Kommunikation zwischen pDC und autoreaktiven B-Zellen beschrieben (Ding et al. 2009). Auch die möglichen Wirkungen von Typ I IFN beinhalten eine Hochregulierung von CD38 auf B-Zellen und eine verstärkte Sekretion von BAFF und APRIL durch B-Zellen, Monozyten und myeloischen DC, was die Bedeutung dieses Zytokins im Kontext einer cGvHD unterstreicht (Rönblom und Pascual 2008; Le Bon et al. 2006).

Darüber hinaus sind folliculäre DC in die Entwicklung von somatisch mutierten und post-Klassenwechsel-Memory-B-Zellen involviert (Storek et al. 2008) und die Aktivierung von pDC via TLR7/8-Ligand und TLR9 kann eine gesteigerte B-Zell-Proliferation sowie Differenzierung in Plasmablasten vermitteln. Dies wird durch BLIMP1 (PR domain zinc finger protein 1) und X-box binding protein 1 gesteuert (Douagi et al. 2009) und impliziert eine Beteiligung an der physiologischen B-Zell-Homöostase.

1.4. Fragestellung

In der Zusammenschau all dieser Beobachtungen und Erkenntnisse lässt sich schließen, dass

eine gestörte Rekonstitution der Immunzell-Homöostase nach HSCT als Grundlage der cGvHD-Pathogenese dienen könnte. Jedoch ist trotz der zahlreichen dargestellten Forschungsansätze der Gesamtzusammenhang noch kaum verstanden. Neue effektive und anwendbare Therapiestrategien fehlen, und es gibt kaum klinisch nutzbare therapeutische Ansätze (Pidala et al. 2013).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle der B-Lymphozyten und der DC in der Pathogenese der cGvHD zu untersuchen. Es wurden in einer pädiatrischen Kohorte von 7 Kindern und einer Vergleichs- und Kontrollgruppe von 13 gesunden Probanden Kokultursversuche durchgeführt. Die zugrundeliegende Hypothese der Untersuchung sprach den DC eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der B-Zellen – im vorliegenden Fall in Bezug auf die Pathogenese der cGvHD – zu. Diese hypothetischen Effekte sollten in verschiedenen experimentellen Settings untersucht werden, in denen B-Lymphozyten und DC aus beiden Quellen in unterschiedlichen Kombinationen kokultiviert wurden. Des Weiteren sollte der Einfluss von drei Adjuvanzen, welche distinkte immunmodulatorischen Eigenschaften ausüben, auf die untersuchten Zellen geprüft werden.

In einem ersten Schritt wurden Monozyten und B-Zellen aus peripheren Blutproben von je einem Patienten und einem Kontrollprobanden beziehungsweise zwei Kontrollprobanden mittels MACS (magnetic-activated cell sorting) parallel isoliert und separate Zellkulturen angelegt. Nach einer zweitägigen Ausreifung der Monozyten zu DC wurden Kokulturen durch Zusammenführen der beiden Zellsorten in verschiedenen Kombinationen angelegt und Adjuvanzen zur B-Zell-Aktivierung hinzugegeben. Zu mehreren Zeitpunkten erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile bestimmter Zellsubpopulationen sowie eine Messung der BAFF-Konzentration aus dem Überstand.

Die Frage, die den Ursprung dieser Experimente begründete, beschäftigte sich damit, wie sich die Subpopulationen von DC und B-Zellen zwischen Patienten mit cGvHD und gesunden Kontrollen unterscheiden, welche Einflüsse sie aufeinander ausüben und ob diese Zellen gezielt durch Zusätze beeinflusst werden können.

Patienten

2. Patienten

Die Messungen im peripheren Blut wurden an 7 Kindern mit cGvHD und 13 gesunden Probanden zur Kontrolle prospektiv zwischen Februar und September 2014 durchgeführt. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Würzburg (AZ: 228/11 vom 13.12.2011) liegt vor.

Unter den 7 männlichen Patienten waren 2 Kinder mit ALL (Akuter lymphoblastischer Leukämie) als Grunderkrankung, 2 mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML), eines mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS), eines mit Langerhans-Zell-Histiozytose (LCH) und ein weiteres mit Autoimmuneropathie (AIE). Das mittlere Alter bei Blutentnahme betrug 11.9 Jahre (zwischen 4 und 20 Jahren)

Tabelle 2-1 Patienten-Charakteristiken

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Geschlecht	m	m	m	m	m	m	m
Alter (Jahre)	12	4	7	20	7	15	8
Diagnose	MDS	AML	ALL	ALL	AIE	AML	LCH
Tage seit HSCT	332	1074	755	302	2068	484	2784
Status vor HSCT	SD	CR	CR	CR	SD	CR	PD
HLA-Status	ident	ident	ident	ident	haploident	ident	ident
Spender	sibling	fremd	fremd	sibling	parental	sibling	fremd
Art der HSCT	PBSCT	PBSCT	PBSCT	PBSCT	PBSCT	PBSCT	PBSCT
GvHD-Prophylaxe	MTX, CSA	ATG, MTX, CSA	ATG, MTX, CSA	MTX, CSA	OKT3, Cam-path, MMF	ATG, MTX, CSA	ATG, CSA
Blutgruppenmismatch	ja	nein	ja	nein	nein	ja	ja
Sex mismatch	nein	nein	ja	nein	ja	ja	ja
Engraftment (Tage)	8	32	13	15	11	28	14
Rezidiv	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
Graft-manipulation	nein	nein	nein	nein	CD3/CD19-Depletion	nein	nein
akute GvHD	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja

Patienten

Messwerte bei Blutentnahme							
Leukozyten im Vollblut (x10⁶)	64.0	11.6	22.4	32.8	44.0	45.4	33.0
Leukozyten (1/nl)	5.3	2.1	5.0	5.7	5.8	6.4	5.4
Lymphozyten (%)	28.5	19.3	48.3	33.5	7.9	6.6	34.1

SD: stable disease, CR: complete remission, PR: partial remission, PD: partial disease, MTX: Methotrexat, CSA: Ciclosporin A, ATG: anti-thymocyte-antigen, MMF: Mycophenolat-mofetil

Tabelle 2-2 Kontrollprobanden-Charakteristiken

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
♂/♀	m	f	m	f	m	m	m	m	m	m	f	f	f
Alter (Jahre)	23	5	23	21	24	23	24	23	14	26	22	23	31
Messwerte bei Blutentnahme													
Leukozyten im Vollblut (x10⁶)	47.2	37.0	37.0	37.4	34.2	29.0	35.0	35.6	25.8	41.4	55.6	42.5	33.6
Leukozyten (1/nl)	7.0	6.5	4.4	4.4	4.0	5.4	4.7	3.5	3.0	3.4	2.8	5.1	4.7
Lymphozyten (%)	38.4	55.6	29.5	27.9	19.9	30.1	47.2	31.0	33.6	34.2	33.6	40.8	29.9

Material

3. Material

3.1. Geräte

Tabelle 3-1 Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Dispenser	Dispensette Organic	Brand, Wertheim
Durchflusszytometer	FACS Canto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
ELISA-Gerät		
Gefrierschränke	-20°C / -80°C Hera freeze	GFL, Burgwedel / Heraeus, Hanau
Hämatologie-System	Advia 20120i	Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn
MACS Multi Stand		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pipetten	Research /Reference .1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet	Braun, Melsungen
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau
Vortexgerät		VWR International, Darmstadt
Vortexgerät	MS1 Shaker	IKA, Stauffen im Breisgau
Zentrifugen	Rotixa 50RS / Rotanta 46RC	Hettich, Tuttlingen

3.2. Laborbedarf

Tabelle 3-2 Laborbedarf

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Einmalhandschuhe	Sensi Care Ice	Medline, Kleve
Eppendorf-Gefäße	Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss	Falcon Blue Caps 15ml, 50ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikroplatten	96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	.5-1µl, 2-200µl, 100-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips .5-1µl, 2-200µl, 100-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Stangenpipetten	5ml, 10ml, 25ml Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	50ml Cellstar/ 75cm ² Cell Culture Treated EasYFlasks	Greiner Bio-One, Frickenhausen / NUNC, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten	24 Well Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.3. Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 3-3 Zellkulturmedien und Zusätze

Reagenzien	Beschreibung	Hersteller
Dichtezentrifugationsmedium	Ficoll-Paque Premium 310 mOsm/kg	GE Healthcare, Pittsburgh, USA
Dichtezentrifugationsmedium	Biocoll 1077 g/ml	Biochrome, Berlin
DPBS (Dulbeco's phosphate buffered saline)	mit Ca, Mg	Sigma, Taufkirchen
DPBS	ohne Ca, Mg (w/o)	Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum	BSA	Biochrome, Berlin
Kulturmedium	RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 mit 2g/l NaHCO ₃	Biochrome, Berlin
Kulturmedium	CellGro Serum-free MSC Medium	CellGenix, Freiburg

3.4. Antikörper

Tabelle 3-4 Durchflusszytometrie-Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Clone	Isotyp	Konzentration/ Volumen	Hersteller
Annexin V	FITC			5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
BAFF-R (CD268)	PE	11C1	mouse IgG1, κ	5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CCR7	PE	150503	mouse IgG2a	10µl/10 ⁶ Zellen	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD11c	V450	B-ly6	mouse IgG1, κ	5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD20	APC-H7	2H7	mouse IgG2b, κ	5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD20	PerCP	L27	mouse IgG1, κ	5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD21	FITC	B-ly4	mouse IgG1, κ	5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD21	V450	B-ly4	mouse IgG1, κ	5µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD24	FITC	ML5	mouse IgG2a, κ	20µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA

Material

CD25	PE-Cy7	M-A251	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	Biolegend, San Diego, USA
CD267 (TACI)	APC	1A1-K21- M22	rat IgG2a, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD27	APC-H7	M-T271	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD27	V450	M-T271	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD274	FITC	MIH1	mouse IgG1, κ	20 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD303 (BDCA-2)	APC	AC144	mouse IgG1	10 μ l/10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Glad- bach
CD34	PerCP	8G12	mouse IgG1, κ	20 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD38	APC	HIT2	mouse IgG1	5 μ l/10 ⁶ Zellen	Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, USA
CD45	V500	HI30	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD69	PE	FN50	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	Biolegend, San Diego, USA
CD80	APC-H7	L307.4	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD83	PE-Cy7	HB15e	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD86	V450	2331 (FUN-1)	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
HLA-DR	APC-H7	L243	mouse IgG2a, κ	20 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
HLA-DR	FITC	L243	mouse IgG2a, κ	20 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
IgD	PE-Cy7	IA6-2	mouse IgG2a, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	Biolegend, San Diego, USA
IP10	PE	6D4/D6/ G2	mouse IgG2a, κ	0.5 μ g mAb/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Ki67	PE-Cy7	B56	mouse IgG1, κ	5 μ l/10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA

Material

3.5. Stimulanzen

Tabelle 3-5 Stimulanzen

Stimulanz	Beschreibung	Hersteller
anti-human IgM	AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Rabbit, stock solution 1,3mg/ml	Jackson Laboratories, Pennsylvania, USA
CpG oligonucleotide (Type B)	ODN 2006	InvivoGen, San Diego, USA
Gardiquimod	Imidazoquinoline compound	InvivoGen, San Diego, USA
GM-CSF	GMP rekombinantes humanes GM-CSF	CellGenix, Freiburg
IL-10	rekombinantes humanes IL-10	Sigma, Taufkirchen
IL-1 β	rekombinantes humanes IL-1 β	CellGenix, Freiburg
IL-4	rekombinantes humanes IL-4	CellGenix, Freiburg
IL-6	rekombinantes humanes IL-6	CellGenix, Freiburg
PGE ₂	Colony Stimulating Factor	Pharmacia Limited, Kent, UK
TNF- α	rekombinantes humanes TNF- α	CellGenix, Freiburg

3.6. Molekularbiologische und immunologische Kits

Tabelle 3-6 Molekularbiologische und immunologische Kits

Produkt	Produktangaben	Hersteller
BAFF/BLyS Capture Antibody	human	R&D Systems, Minneapolis, USA
BAFF/BLyS Detection Antibody	human	R&D Systems, Minneapolis, USA
BAFF/BLyS Standard	human	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD19 Micro Beads	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14 Micro Beads	human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Puffer	autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Säulen	MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Streptavidin-HRP		R&D Systems, Minneapolis, USA

3.7. Chemikalien und sonstige Reagenzien

Tabelle 3-7 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Produktangaben	Hersteller
Annexin V Binding Buffer	10x concentrate	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Aqua	H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
FACS-Lösungen	Lysing Solution, Flow, Rinse, Clean	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Invitrogen Fixation Medium (Medium A)	Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, USA
Saponin	Invitrogen Permeabilization Medium (Medium B)	Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, USA
Stop Solution	2 N H ₂ SO ₄	
Substrate Solution	1:1 mixture of Color Reagent A (H ₂ O ₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tween 20	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate	Sigma, Taufkirchen

4. Methoden

4.1. Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

4.1.1. Prinzip

Leukozyten und Monozyten, inklusive Vorläufern von Makrophagen und DC, stellen die mononukleären Zellen des peripheren Blutes dar. Die Zentrifugation des Blutes aufgeschichtet auf ein Medium mit einer Dichte von 1077g/ml resultiert in einer Vier-Schichtung nach dem Dichtegradienten. Die oberste Lage besteht aus Blutplasma und Thrombozyten, darunter liegen die mononukleären Zellen direkt dem Medium auf, und im Sediment finden sich Granulozyten, Zellfragmente und Erythrozyten. Im Anschluss dienen zwei Waschgänge der Entfernung von zytotoxischen Rückständen.

4.1.2. Protokoll

- Blutentnahme in 10ml Heparin-Röhrchen
- je etwa 9ml Blut in einem 50ml-Falcon Tube auffangen, ad 20ml mit PBS w/o
- je 2x 7ml Ficoll in 50ml-Röhrchen vorlegen, Blutsuspension langsam überschichten
- mit 1500rpm (rotations per minute) 35min bei 20°C (1/R1\) zentrifugieren
- Interphase isolieren und mit PBS w/o ad 40 ml auffüllen
- mit 1500rpm 15min zentrifugieren (9/R9\) und waschen
- Bestimmung der Zellzahl mittels Advia-System

Die Blutentnahmen und folgenden Schritte fanden parallel getrennt an einem Patienten und einer gesunden Kontrollperson beziehungsweise zwei Kontrollenprobanden statt.

4.2. MACS

4.2.1. Prinzip

Das MACS-Verfahren fand das erste Mal 1989 Erwähnung in der Separation von CD20⁺ Lymphozyten aus humanem Blut (Abts et al. 1989) und wird seit Anfang der 90er Jahre in großem Umfang genutzt (Miltenyi et al. 1990).

Das Verfahren der positiven Zellsortierung mittels MACS bedient sich MicroBeads, 50nm kleinen magnetischen Partikeln in kolloidaler Suspension, die mit zellspezifischen Antikörpern gegen Oberflächen-Antigene konjugiert sind. Idealerweise besitzen MicroBeads aufgrund ihrer geringen Größe nicht die Eigenschaft, Zellen zu aktivieren oder selbst als

Substrat für Rezeptoren zu dienen. Eingebettet in Säulen, die in ein Magnetfeld eingebracht werden, dient eine Matrix aus ferromagnetischen Sphären dazu, diese zu amplifizieren. Der Raum zwischen den einzelnen Sphären erlaubt es den zu sortierenden Zellen, frei und beinahe ungehindert durch die Säulen zu fließen. Magnetisch gekennzeichnete Zellen jedoch werden in der Suspension innerhalb der Säule zurückgehalten, ohne dabei Effekten wie Aggregation, Kontamination oder Stress durch exogene Reize anheim zu fallen. Somit können Zellen ohne konjugierte MicroBeads an der Oberfläche einfach aufgefangen werden und die magnetisch retinierte Zellfraktion wird erst ausgespült, wenn die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wird. Dies stellt das positive Selektionsverfahren dar. Resultierend erhält man in getrennten Auffangbehältern zuerst die Zellen, die nicht markiert wurden, und separat davon diejenige Zellfraktion, die man vorher anhand eines Antikörpers gegen ein spezifisches Oberflächenantigen gekennzeichnet hat.

4.2.2. Protokoll

- magnetisches Labeln
 - Zentrifugation der isolierten mononukleären Zellen 10min mit 1100rpm (9/R9\)
 - Resuspension mit 80µl MACS-Puffer à 10^7 Zellen
 - Hinzufügen von 20µl Antikörper-konjugierter MicroBeads à 10^7 Zellen
 - Durchmischen und 15min Inkubation bei 2-8°C
 - Hinzufügen von 2ml MACS-Puffer
 - Zentrifugation 10min mit 1100rpm (9/R9\)
 - Dekantieren des Überstandes
 - Resuspension in 500µl MACS-Puffer
- magnetische Separation
 - Auswählen der geeigneten MACS-Säule anhand der Anzahl markierter Zellen ($<10^7$ - MS, $<10^8$ - LS)
 - Einlegen der Säule in die Halterung im Magnetfeld des MACS-Separators
 - Spülen der Säule mit 500µl (MS) bzw. 3ml (LS) MACS-Puffer
 - Hinzufügen der Zellsuspension zur Säule
 - Sammeln der unmarkierten durchgelaufenen Zellen
 - Spülen der Säule mit 3x500µl (MS) bzw. 3x3ml (LS) MACS-Puffer

Methoden

- Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und sofortiges forciertes Spülen der Säule mit 1ml (MS) bzw. 5ml (LS) MACS-Puffer
- Sammeln der markierten durchgelaufenen Zellfraktion

Ziel war es hierbei, in einem ersten Durchgang mittels CD19 MicroBeads die B-Lymphozyten aus der Zellsuspension mittels positiver Selektion zu isolieren, um eine reine B-Zell-Population zu erhalten.

Nach diesem Schritt folgte der nächste Durchgang mit CD14, um Monozyten mit der Fähigkeit, die Differenzierung zu DC zu vollziehen, als auch ebendiese zu gewinnen. Diese zweite Zellfraktion wird der einfacheren Darstellung und des besseren Verständnisses halber im Folgenden unter „DC“ zusammengefasst.

4.3. Zellkultur

4.3.1. Kultivierung

Im Anschluss an die Sortierung mittels MACS folgte nach einem Waschschrift das getrennte Anlegen von Kulturen, separat jeweils für die nach CD14 und CD19 sortierten Zellfraktionen und Patienten- wie Kontrollgruppe.

4.3.1.1. B-Zellen

Die positiv nach CD19 isolierten Zellen wurden in je 1ml Kulturmedium mit 5% fetalem Kälberserum (FCS) resuspendiert und dazu wurde 10µl/ml IL-10 gegeben. Anschließend folgten das Auffüllen mit weiteren 9ml des Mediums und die liegende Lagerung im Brutschrank bei 37°C in 50ml Zellkulturflaschen. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums und eine weitere Zugabe von 1µl/ml IL-10.

Tabelle 4-1 Schema für IL-10

Zusatz	Aliquots	Konzentration in Kultur
IL-10	10µg/ml	1µl/ml

4.3.1.2. DC

Die Generierung von DC erfolgte nach einem fast-DC Schema (Guan et al. 2004). Zuerst folgte die Resuspension mit je 1ml Kulturmedium und die Zugabe von 200µl/ml GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) und 100µl/ml IL-4 mit dem

Ziel der Induktion der DC-Reifung. Anschließend wurden auch hier weitere 9ml Zellkulturmedium mit FCS hinzugefügt und die Zellen im Brutschrank in Zellkulturflaschen liegend gelagert.

Tabelle 4-2 Schema der Stimulanzen zur DC-Reifung

Zusatz	Aliquots	Konzentration in Kultur
GM-CSF	100U/ μ l	20 μ l/ml
IL-4	100U/ μ l	10 μ l/ml

Nach 24 bis 36 Stunden erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums. Im Anschluss an die Resuspension in 1ml Kulturmedium wurden den Zellen folgende Stimulanzen zur DC-Differenzierung zugegeben (Guan et al. 2004).

Tabelle 4-3 Schema der Stimulanzen zur DC-Differenzierung

Zusatz	Aliquots	Konzentration in Kultur
IL-1b	250ng/ μ l	40nl/ml
IL-6	250ng/ μ l (10 ⁷ U/mg)	40nl/ml
PGE2	1mg/ml (352g/mol)	1 μ l/ml
TNF α	250ng/ μ l	400nl/ml

Es folgte ein erneutes Auffüllen mit 9ml Kulturmedium und die Lagerung im Brutschrank für weitere 18 Stunden.

4.3.2. Kokulturen

Sinn unserer experimentellen Studie war es, mögliche Interaktionen von B-Zellen und DC bei Patienten mit cGvHD sowie gesunden Kontrollprobanden zu erforschen. Um isolierte Effekte der einzelnen Zellgruppen sowie Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten darzustellen, mussten wir alle Kombinationen dieser Zellen in unserer Kokultivierung berücksichtigen. Nur so konnten mögliche Beobachtungen auch eindeutig einer Zellpopulation oder Kohorte zugeordnet werden. Bei zwei unabhängigen Variablen (Patienten vs. Kontrollen; DC vs. B-Zellen) ergaben sich somit vier Kombinationsmöglichkeiten: B-Zellen + DC eines Patienten, B-Zellen eines Patienten + DC einer Kontrolle, B-Zellen einer Kontrolle + DC eines Patienten, B-Zellen + DC einer Kontrolle.

Am zweiten Tag nach MACS-Sortierung, Kultivierung und Ausdifferenzierung der DC folgte die Anlage der Kokultur. Nach Resuspension der CD14- und CD19-positiven Zellen

in je 1000µl Medium wurden die jeweiligen Zellzahlen am Hämatologie-System gemessen und die B-Zellen auf eine 24-Well-Kulturplatte auf jeweils 4 Reihen verschiedener Charakterisierungen à 4 Wells (insgesamt 16 Wells) verteilt. Komplementär wurden jeweils die DC nach folgendem Schema hinzugegeben, jedoch mit einer Ratio von B-Lymphozyten gegen DC von 10:1, bedingt durch deutlich geringere absolute Zellzahlen der DC (vgl. Tabellen 8-2 und 8-3).

Tabelle 4-4 Charakterisierung der verschiedenen Kokulturansätze

Charakterisierung	Kokultur
auto-auto	B-Zellen Patient + DC Patient
auto-allo	B-Zellen Patient + DC Kontrolle
allo-auto	B-Zellen Kontrolle + DC Patient
allo-allo	B-Zellen Kontrolle + DC Kontrolle

In den Versuchsansätzen mit zwei Proben aus der Kontrollgruppe wurde das Schema entsprechend angepasst.

Tabelle 4-5 Charakterisierung im Kontroll-Setting (K)

Charakterisierung	Entsprechung aus Tabelle 4-4	Kokultur
Kauto-auto	allo-allo	B-Zellen Kontrolle 1 + DC Kontrolle 1
Kauto-allo	-	B-Zellen Kontrolle 1 + DC Kontrolle 2
Kallo-auto	-	B-Zellen Kontrolle 2 + DC Kontrolle 1
Kallo-allo	allo-allo	B-Zellen Kontrolle 2 + DC Kontrolle 2

Anschließend folgte ein Auffüllen mit Zellkulturmedium auf jeweils 1000ul Volumen in jedem Well.

4.3.3. Zusätze

F(ab')₂ anti-IgM, CpG (TLR9-Agonist) und Gardiquimod (TLR7-Agonist) sind Adjuvantien, die eine verstärkte Aktivierung von B-Zellen induzieren (Romberg et al. 2013). Wir nutzten unser experimentelles Setting, um in-vitro Effekte aktivierter B-Zellen auf DC bei Patienten mit cGvHD im Vergleich zu Kontrollprobanden zu untersuchen.

Die zugehörigen 4 Wells einer jeden Charakterisierung ermöglichten uns die Zugabe dieser Stimulanzien nach folgendem Schema.

Tabelle 4-6 Stimulanzen zur B-Zell-Aktivierung

Zusatz	Aliquots	Konzentration in Kultur
nativ		
F(ab') ₂ anti-IgM	1,3mg/ml	2ug/ml
CpG	5ug/ml	0.5ug/ml
Gardiquimod	25ug/ml	2ug/ml

Nach dem Hinzufügen dieser Zusätze wurden die Zellen wiederum im Brutschrank für 48 Stunden gelagert.

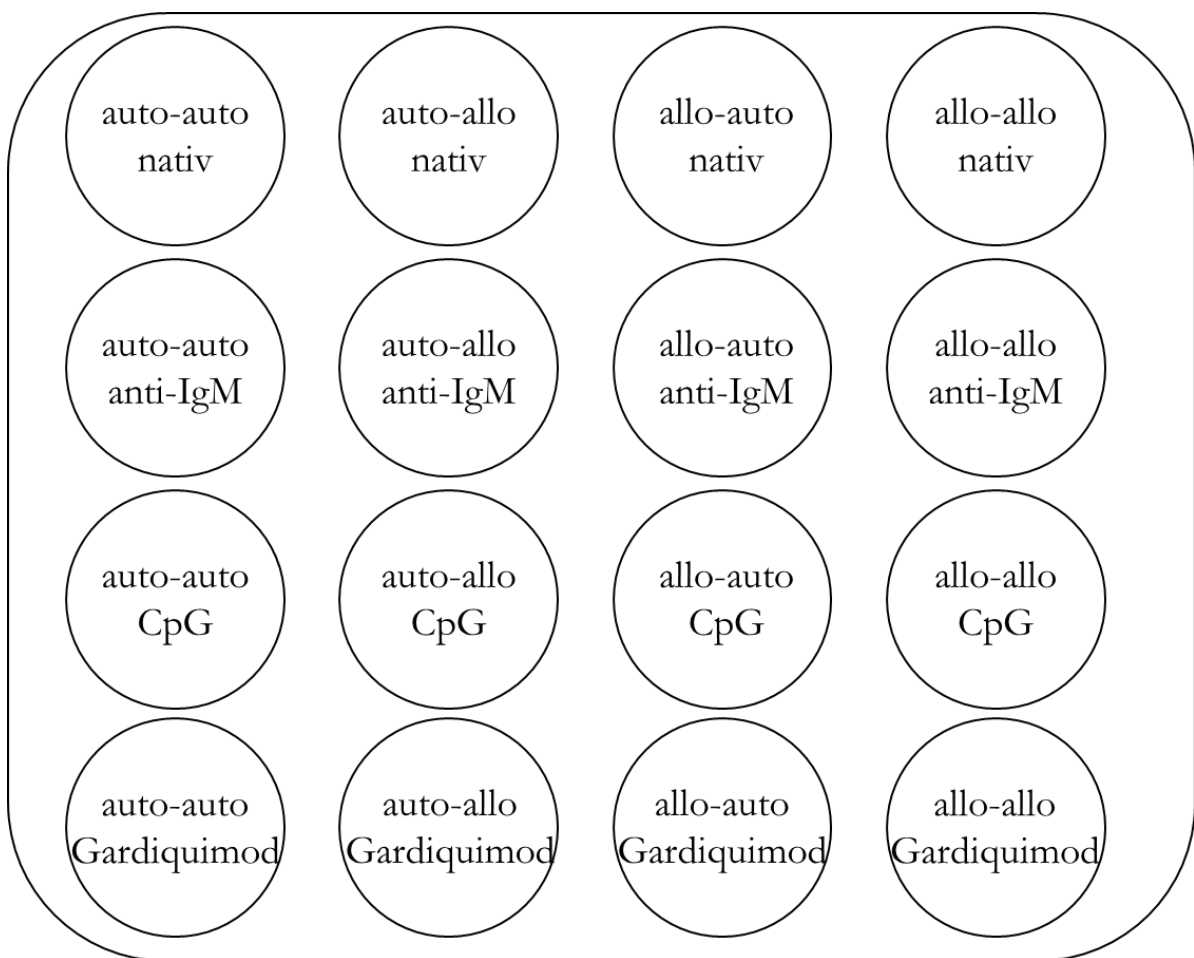


Abbildung 4-1 Anlage der Kokulturen in 16 Wells

4.4. Durchflusszytometrie

4.4.1. Grundlagen

Die Durchflusszytometrie bedient sich eines optischen Messsystems, welches Partikel - in der Regel Zellen- durch einen umgebenden Flüssigkeitsstrom gebündelt multiparametrisch mittels Laserlicht analysiert. Im Analysepunkt, der Flow-Zelle, streuen die angestrahlten Zellen das Licht abhängig von intrazellulären Bestandteilen, der Querschnittsfläche, dem Refraktionsindex und der Membranstruktur. Die Sammeloptiken des in unseren Versuchen verwendeten Gerätes, oktogonal für blaues Licht und trigonal für je rotes und violetteres Licht, leiten sowohl das Streulicht als auch die Fluoreszenzsignale durch Spektralfilter zu den Photodetektoren, fünf bei 488nm, wobei ein Detektor das side scatter-Signal (SSC) aufnimmt, und je zwei bei 633nm und 405nm, entsprechend der Wellenlängen der durch die drei Laseremitter erzeugten Lichtstrahlen.

Als Maß für das orthogonal gebrochene Streulicht hängt der SSC von der Morphologie der intrazellulären Bestandteile, insbesondere des Zellkerns, und der Granularität der Zelle ab. Der forward scatter (FSC) bildet die Beugung des Lichtes in einem flachen Winkel ab und korreliert mit dem Zellvolumen. Blockerstreifen dienen hierbei der selektiven Detektion von durch Partikel gebeugten Lichtstrahlen durch den Photomultiplier, der entlang des einstrahlenden Laserlichtes misst. Durch ihre unterschiedliche Morphologie lassen sich so Leukozyten anhand ihrer Scatter-Charakteristiken in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenzieren. Lymphozyten weisen einen geringeren SSC auf als Granulozyten (mehr Streulicht durch irregulären Kern und Granula), aber einen geringeren FSC als Monozyten (größeres Volumen) auf.

Die Fluoreszenz-Detektion geschieht ebenso im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Zur Charakterisierung der Zellen in unseren Versuchen werden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Antikörper verwendet. Die Farbstoffe sind so konzipiert, dass sie durch elektromagnetische Strahlung einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden, aber, bedingt durch die Stokes-Verschiebung, niederenergetischere Photonen abstrahlen. Nach einer Inkubation der zu analysierenden Zellen mit den Farbstoff-gekoppelten Antikörpern, welche sich sowohl gegen oberflächliche als auch intrazelluläre Antigene richten können, lässt sich so das Vorhandensein des jeweils gesuchten Markers für jede einzelne Zelle nachweisen.

In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Farbstoffe mitsamt spezifischen Absorptions- und Emissionsspektren aufgelistet:

Tabelle 4-7 Multicolor FACS-Farbstoffe

Lasers	Fluorochrom	Absorption (nm)	Abstrahlung (nm)
405nm (violett, solid state)	V450 (Cumarin-Farbstoff)	404	448
	V500 (organischer Farbstoff)	415	500
488nm (blau, solid state)	FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	494	520
	PE (R-phycoerythrin)	496	578
	PerCP (Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplex)	482	678
633nm (rot, HeNe)	Pe-Cy7 (Tandem-Fluorochrom, kombiniert PE und einen Cyanin-Farbstoff)	496	785
	APC (Allophycocyanin)	650	660
633nm (rot, HeNe)	APC-H7 (Tandem-Fluorochrom, kombiniert APC und einen Cyanin-Farbstoff)	650	785

Dem Nachweis elektromagnetischer Strahlung dient ein Photomultiplier, welcher mittels einer Photokathode sowie sequentieller exponentieller Vervielfältigung von Sekundärelektronen elektrische Impulse erzeugt. Da sich die Emissionsspektren der verschiedenen Zytochrome überlappen, müssen die Fluoreszenzsignale gegeneinander auskompensiert werden. Dabei wird der konstante Anteil eines Farbstoff-Signals, der in das Signal eines anderen Zytochroms hineinleuchtet, von diesem abgezogen.

Das Prinzip des FACS (fluorescence-activated cell sorting) beruht auf einer hydrodynamischen Fokussierung der Zellen, welche erlaubt, diese mittels elektrostatischer Deflektion anhand ihrer zuvor analysierten Fluoreszenz einzeln zu sortieren und zu zählen. Die graphische Darstellung als Histogramm beruht auf einer logarithmischen Amplifikation auftretender Fluoreszenzsignale nach ihrer Intensität und nachfolgender Einteilung in bestimmte Gruppen je nach Stärke des Signals durch einen Digital-Konverter.

Methoden

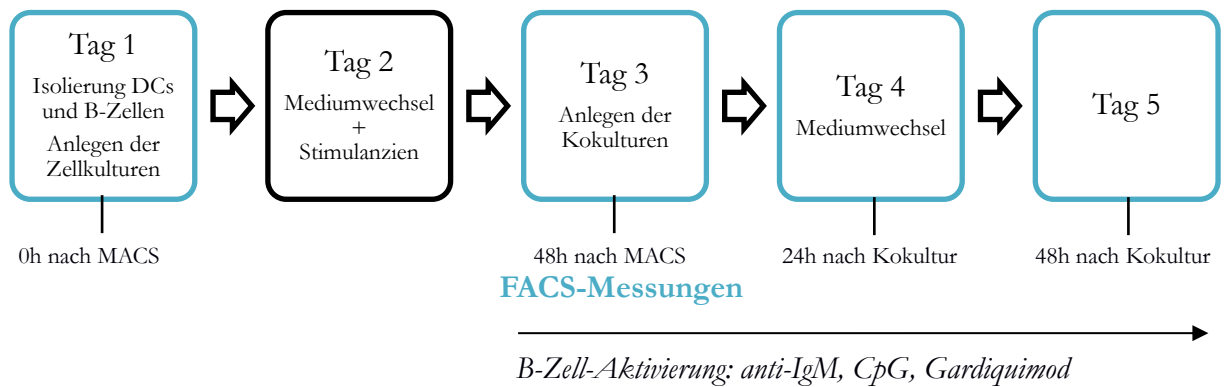


Abbildung 4-2 Zeitliche Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte des experimentellen Settings

Tabelle 4-8 absolute Zellzahlen zu den verschiedenen Messpunkten - Patienten

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
0h MACS CD14 ⁺ (x10 ⁶)	2.0	.9	2.2	1.4	1.0	3.1	2.1
0h MACS CD19 ⁺ (x10 ⁶)	.3	.1	.6	.6	.9	1.0	.9
48h MACS CD14 ⁺ (x10 ⁶)	.08	.2	.4	.5	.6	1.7	1.1
48h MACS CD19 ⁺ (x10 ⁶)	.03	.1	.4	.4	.7	.8	.9

Tabelle 4-9 absolute Zellzahlen zu den verschiedenen Messpunkten - Kontrollen

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
0h MACS CD14 ⁺ (x10 ⁶)	1.3	2	1.6	1.2	2.2	1.2	2.1	1.6	1.0	1.5	1.7	1.7	1.9
0h MACS CD19 ⁺ (x10 ⁶)	.3	2.3	.3	.6	.1	.7	.9	.7	.2	1.2	1.4	.4	.7
48h MACS CD14 ⁺ (x10 ⁶)	.06	1.1	.8	.3	1.2	.4	.4	.6	.6	.9	.3	.7	1.0
48h MACS CD19 ⁺ (x10 ⁶)	.05	.7	.1	.06	.08	.5	.3	.4	.05	.09	.2	1.0	1.1

4.4.2. Pipettierschema

Tabelle 4-8 Pipettierschema

		Fluorochrom							
		FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy7	APC-H7	V450	V500
Tube	D1	HLA-DR	IP10	CD20	CD303	CD83	CD80	CD86	CD45
	D2	CD274	CCR7	CD20	CD303	CD83	HLA-DR	CD11c	CD45
	B1	CD24	BAFF-R	CD34	CD38	Ki67	CD20	CD21	CD45
	B2	CD21	CD69	CD20	CD267	CD27	CD25	CD86	CD45
	Apoptose	AnnexinV	BAFF-R	CD20	CD303	IgD	\	CD27	CD45

4.4.3. Extrazelluläre Färbung

4.4.3.1. Grundlagen

In unserer Studie wurde ein Durchflusszytometer genutzt, welches die Möglichkeit bietet, insgesamt bis zu 8 verschiedenen Fluorochrome aufgrund der Spezifität der Wellenlängen von Absorption und Abstrahlung des jeweiligen Farbstoffes parallel zu verwenden. Antikörper mit Bindungsaffinität zu Oberflächenantigenen können - im Gegensatz zu intrazellulären Antikörpern - ohne weitere Vorbereitung der zu untersuchenden Zellen auf diese gegeben werden. Die Zeitpunkte für die Messung mittels Durchflusszytometrie waren: 0h nach MACS-Sortierung, 48h nach MACS-Sortierung, 24h nach Kokultur-Anlage, 48h nach Kokultur-Anlage

4.4.3.2. Färbeprotokoll

- Entnahme von 100µl Zellsuspension
- Hinzufügen der extrazellulären Antikörper
- vorsichtiges Vortexen
- 20min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Zugabe von 2ml PBS
- Zentrifugieren 5min mit 1500rpm (/9R9\)
- Abkippen des Überstandes (Di, D1, D2, Bi, B2 fertig)

4.4.4. Intrazelluläre Färbung

4.4.4.1. Grundlagen

Der parallele Nachweis von intrazellulären Zytokinen und Oberflächenepitopen erlaubt es, diese genau dem Phänotyp der produzierenden Zelle zuzuordnen. Initial werden die Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert und anschließend die Zellwand durch Saponin permeabilisiert. Dadurch können die Antikörper bis zu den im Golgi-Apparat gespeicherten Zytokinen penetrieren.

4.4.4.2. Färbeprotokoll

Zeitpunkte: siehe extrazelluläre Färbung

- Vortexen und Zugabe von 100µl Medium A
- Inkubation für 10min
- Zugabe von 2ml PBS
- Zentrifugieren > Überstand abkippen
- Vortexen
- Zugabe von Ki67
- Zugabe von 100µl Medium B
- Vortexen
- Inkubation für 20min bei 4°C
- Zugabe 2ml PBS
- Zentrifugieren und Abkippen des Überstandes (B1, B2 fertig)

4.4.5. Apoptose-Färbung

Der Detektion von Apoptose diene der durchflusszytometrische Nachweis von Phosphatidylserin an der Oberfläche der mit Annexin V markierten Zellen. Zeitpunkte: 48 Stunden nach MACS, 48 Stunden nach Kokultur

- Waschen der Zellen mit PBS, Resuspension in 1X Binding Buffer zu 10^6 Zellen/ml.
- Transfer von 100µl der Lösung in ein Messtube
- Hinzufügen von 5µl Annexin V
- Vortexen
- 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Hinzufügen von 400µl 1X Binding Buffer und Analyse innerhalb einer Stunde

4.5. ELISA

4.5.1. Prinzip

Mit dem ELISA-Verfahren (enzyme linked immunosorbent assay) können antikörpervermittelt Antigene, im vorliegenden Fall Zytokine, nachgewiesen werden. Im Speziellen wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Dabei wird ein Analyt-spezifischer Antikörper (capture antibody) an eine Mikroplatte gebunden. Im Folgenden wird die jeweilige Probe oder ein Standard hinzugefügt und das Analyt, im vorliegenden Fall BAFF, kann an den immobilisierten Antikörper binden. Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) dient der Bindung an den Detektions-Antikörper. Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung wird zu den Wells hinzugefügt, und es entsteht eine Blaufärbung proportional zur Konzentration des Analyts in der Probe. Die Farbentwicklung wird angehalten, was zu einer Gelbfärbung in den Wells führt. Die Extinktion bei 450nm wird gemessen. Zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Kokultur wurden bei jedem Versuch aus den einzelnen Wells jeweils 200µl entnommen, mit Kulturmedium ad 1ml aufgefüllt und bei -80°C eingefroren. Zur quantitativen Zytokin-Analyse herangezogen wurden die nativen Proben der Versuche mit Patienten zu beiden Zeitpunkten und in allen Charakterisierungen sowie zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Kokultur die Proben mit Zusätzen der Charakterisierungen auto-auto, allo-auto und allo-allo. Insgesamt ergab dies bei 7 Patienten à 4 Kokulturen à 2 Zeitpunkten, plus 7 Patienten à 3 Zusätze à 3 Kokulturen 119 Proben und durch die Doppelbestimmung 238 okkupierte Wells.

4.5.2. Protokoll

- Vorbereitung der Platten
 - Verdünnen des Capture-Antikörpers in PBS w/o und Zugabe von 100 µl der Lösung pro Well in eine 96 Well Mikrotiterplatte. Versiegeln der Mikrotiterplatten und Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
 - Dreimaliges Aspirieren der Wells und Waschen mit 400µl Waschpuffer (.05% Tween 20 in PBS)
 - Blocken der Wells mittels 300µl Reagenz-Verdünnung (1% BSA in PBS)
 - Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde
 - Nochmaliges Aspirieren und Waschen
- Immunoassay

Methoden

- Hinzufügen von je 100µl Proben oder Standards in Reagenz-Verdünnung
- Abdecken der Wells und Inkubation zwei Stunden bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Aspirieren und Waschen
- Hinzufügen von 100µl Detektions-Antikörper, gelöst in Reagenz-Verdünnung
- Abdecken der Wells und Inkubation zwei Stunden bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Aspirieren und Waschen
- Hinzufügen von 100µl der Arbeits-Verdünnung von Streptavidin-HRP
- Abdecken der Wells und Inkubation 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Dreimaliges Aspirieren und Waschen
- Hinzufügen von 100µl Substrat-Lösung
- Inkubation 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Hinzufügen von 50µl Stopp-Lösung
- Bestimmung der optischen Dichte jedes Wells bei 450nm

Tabelle 4-9 Reagenzien für BAFF-ELISA

Reagenz	Menge	Arbeitskonzentration
Capture Antibody	60µg	1µg/ml
Detection Antibody	3µg	50ng/ml
Standard	17,5ng	39,1-2500pg/ml
Streptavidin-HRP	2ml	1:40

4.6. Statistik

Die ELISA-Daten wurden doppelt bestimmt, die Mittelwerte wurden errechnet und für die statistische Analyse verwendet. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte innerhalb der vorher definierten Patientengruppen. Die Berechnung von Mittelwerten, Medianen und statistischen Signifikanzen mittels unabhängiger T-Tests und die Erstellung der Graphiken erfolgte mit Hilfe des Programms „SPSS“ (Version 20.0.0; IBM, Ehningen). Die Nullhypothese postulierte die gleiche Grundgesamtheit der beiden zu testenden Stichproben und damit eine Gleichheit der Mittelwerte. Sie wurde mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < .05$ abgelehnt oder bei $p \geq .05$ aufrechterhalten. Der jeweilige Streubereich um die angegebenen Mittelwerte wird durch die Standardabweichung (σ) angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. Charakterisierung der Zellpopulationen

Die Auswahl verschiedener, eindeutig durch Oberflächenmarker unterscheidbarer Zellpopulationen erlaubt es, diese in einem weiteren Analyseschritt weiter zu differenzieren (Gating). Nach diesem Prinzip können hierarchisch die einzelnen Untergruppen der B-Lymphozyten und DC sowie wiederum deren Untergruppen eindeutig identifiziert werden.

5.1.1. B-Zellen

5.1.1.1. B1-Tube

Zuerst werden alle gemessenen Ereignisse nach ihren Scatter-Eigenschaften dargestellt. Darauf folgt eine erste Auswahl von Zellen mit geringem SSC und FSC, den Leukozyten.

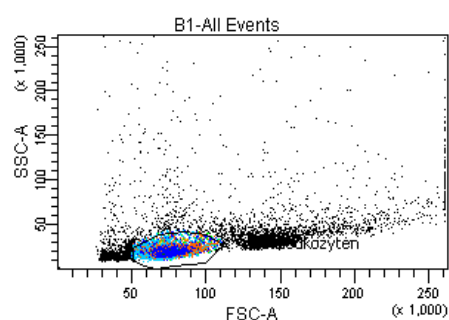


Abbildung 5-1 normale Verteilung aller Events - FSC gegen SSC

Die Zellen im Leukozyten-Gate wiederum werden erneut gegen FSC und diesmal CD45 aufgetragen, um die CD45⁺ Lymphozyten darzustellen.

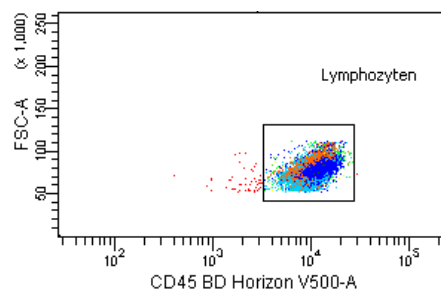


Abbildung 5-2 Leukozyten - CD45 gegen FSC

Erneut wird das Lymphozyten-Gate gegen einen weiteren Parameter, CD20 und FSC aufgetragen, um eindeutig die B-Zellen zu definieren.

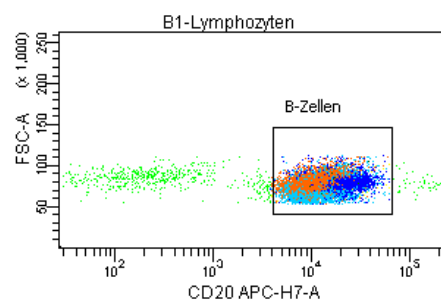


Abbildung 5-3 Lymphozyten - CD20 gegen FSC

Diese können nun nach der Expression von CD34, Ki67 und BAFF-R unterschieden werden.

Ergebnisse

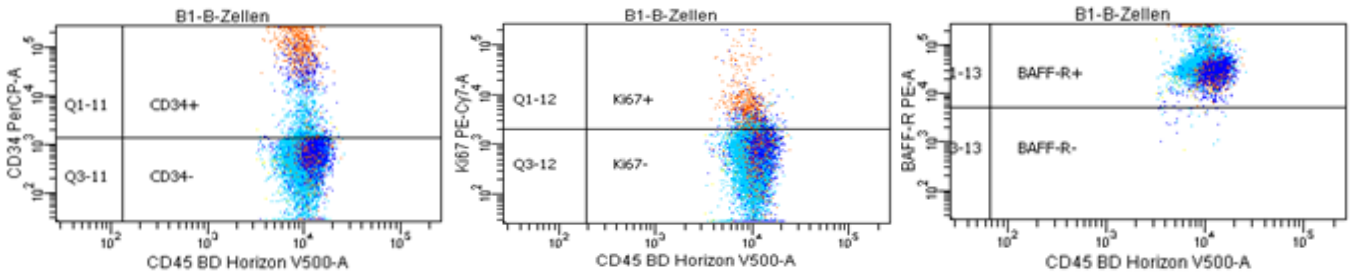


Abbildung 5-4 B-Zellen - CD45 gegen **A** CD34 **B** Ki67 **C** BAFF-R

Durch Auftragen der B-Zellen gegen CD38 und CD24 lässt sich eine Zahl unterschiedlicher Subpopulationen der B-Zellen differenzieren. Dazu gehören Memory-B-Zellen ($CD24^+$, $CD38^{low}$), Transitionalzellen ($CD24^{++}$ $CD38^{++}$), reife naive ($CD24^{low}$ $CD38^{low}$) und naive B-Zellen ($CD24^{low}$ $CD38^+$) sowie Plasmablasten ($CD24^-$ $CD38^{high}$). Die Memory B-Zellen,

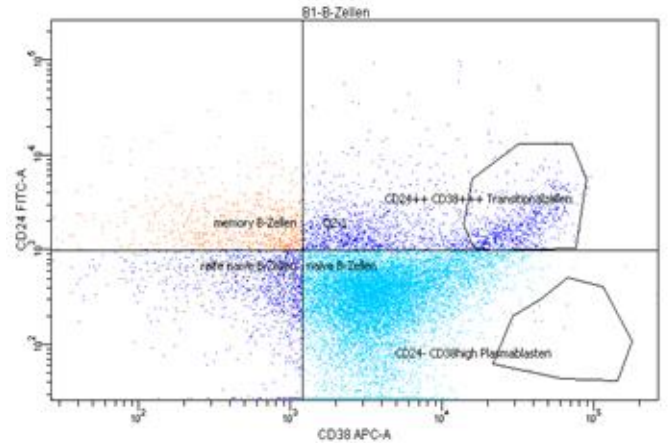


Abbildung 5-5 B-Zellen - CD38 gegen CD24

Transitionalzellen und naiven B-Zellen wiederum

werden nach den Oberflächenmarkern CD34, Ki67 und BAFF-R differenziert.

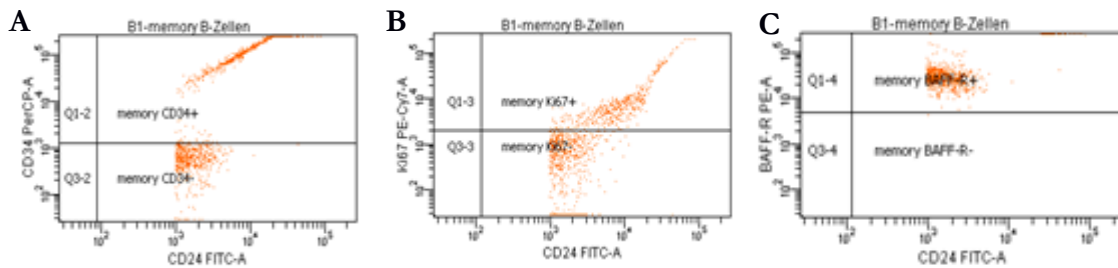


Abbildung 5-6 Memory B-Zellen - CD24 gegen **A** CD34 **B** Ki67 **C** BAFF-R

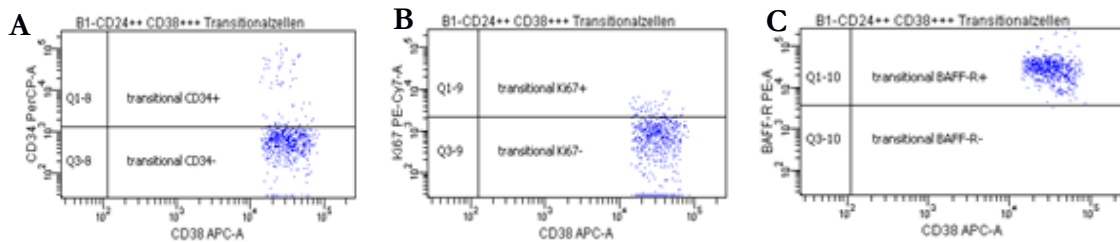


Abbildung 5-7 Transitionalzellen – CD38 gegen **A** CD34 **B** Ki67 **C** BAFF-R

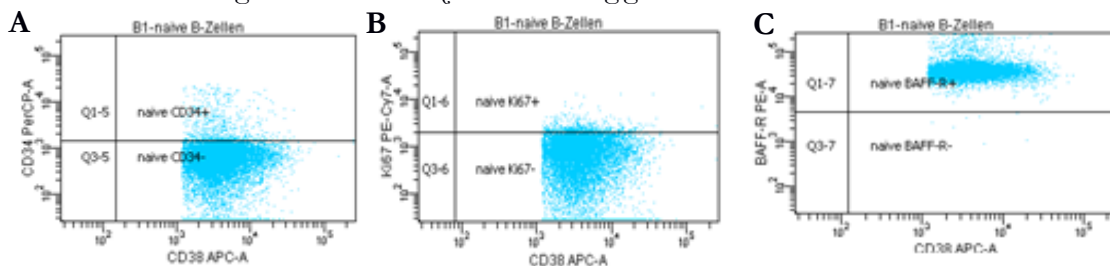


Abbildung 5-8 naive B-Zellen – CD38 gegen **A** CD34 **B** Ki67 **C** BAFF-R

5.1.1.2. B2-Tube

Im B2-Tube werden ebenso zuerst die B-Lymphozyten dargestellt, die dann im Folgenden weiter differenziert werden nach Markern für B-Zell-Aktivierung, nämlich CD21, CD69, CD27, CD267, CD25 und CD86 (Romberg et al. 2013).

5.1.2. DC

5.1.2.1. D1-Tube

Zuerst wird CD303 gegen SSC aufgetragen und es folgt die Identifizierung der DC sowohl über die Morphologie als auch die Expression des Oberflächenantigens. Wiederum wird das DC-Gate nach weiteren Markern differenziert: HLA-DR (Marker für konventionelle DC), IP10, CD83, CD80, CD86 (Marker für DC-Reifung) und CD45 (Stenger et al. 2012).

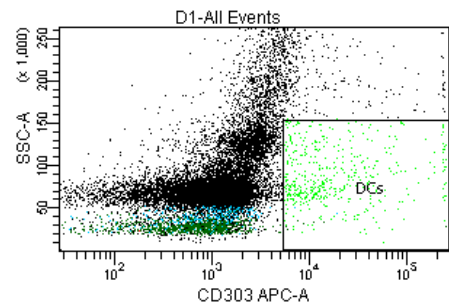


Abbildung 5-9 alle Events – CD303 gegen SSC

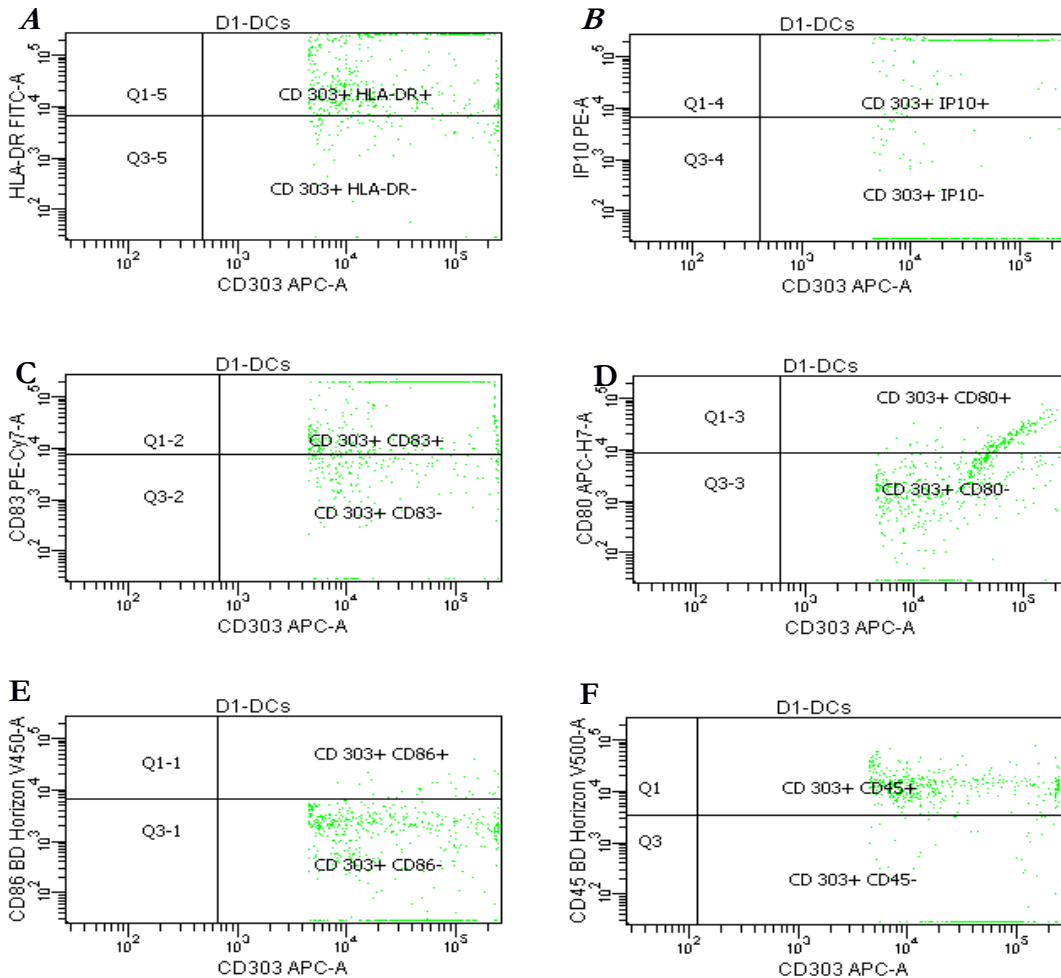


Abbildung 5-10 DC – CD303 gegen **A** HLA-DR **B** IP-10 **C** CD83 **D** CD80 **E** CD86 **F** CD45

5.1.2.2. D2-Tube

Im D2-Tube wird genauso wie im D1-Tube verfahren, lediglich andere zusätzliche Marker finden Verwendung, nämlich CD274, CCR7 (Marker für migratorische DC) und CD11c (Marker für pDC) (Stenger et al. 2012).

5.1.3. Apoptose-Tube

Die Darstellung der B-Zellen - identifiziert entsprechend dem Gating in den B-Zell-Tubes - nach CD27 und IgD erlaubt die Differenzierung von naiven, non-switched Memory (CD27⁺ IgD⁺), CD27⁻ Memory und switched Memory (CD27^{low} IgD⁺) B-Lymphozyten (Morbach et al. 2010). Diesmal folgt die Differenzierung der B-Zell-Subgruppen einem anderen Schema. Unterschieden werden die Populationen nach der Expression von BAFF-R, AnnexinV (Marker für Apoptose) und schließlich werden diese beiden Marker gegeneinander aufgetragen.

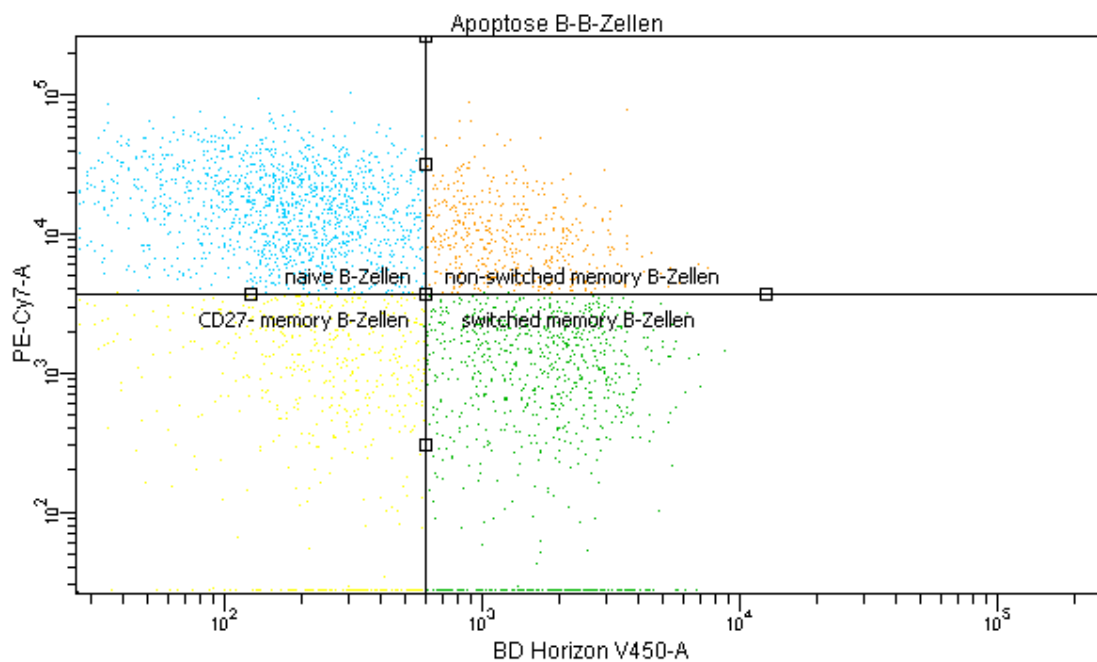


Abbildung 5-11 B-Zellen – CD27 gegen IgD

Auch im Apoptose-Tube werden DC berücksichtigt, es erfolgt eine Auftragung von CD303 gegen AnnexinV aus dem DC-Gate.

Abbildung 5-12 naive B-Zellen

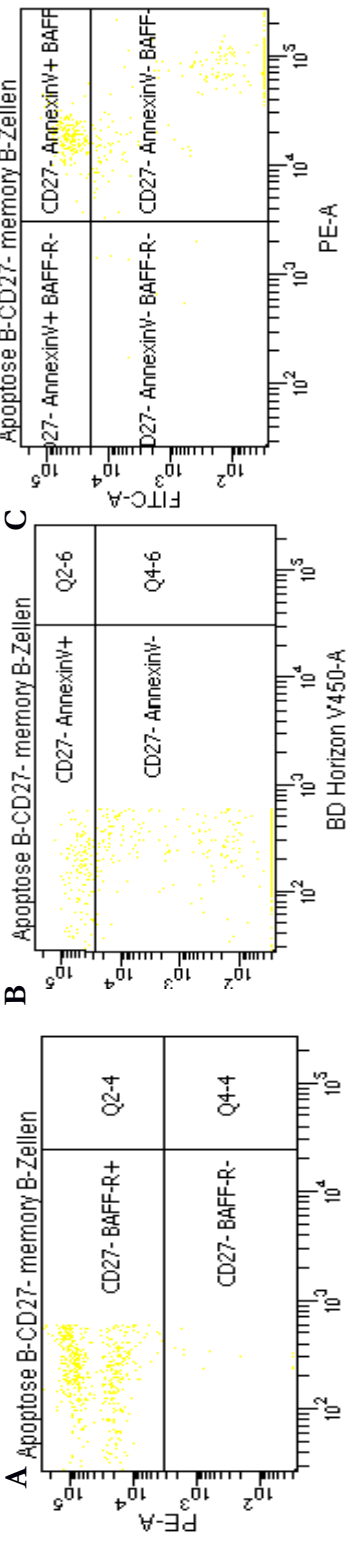


Abbildung 5-13 non-switched Memory B-Zellen

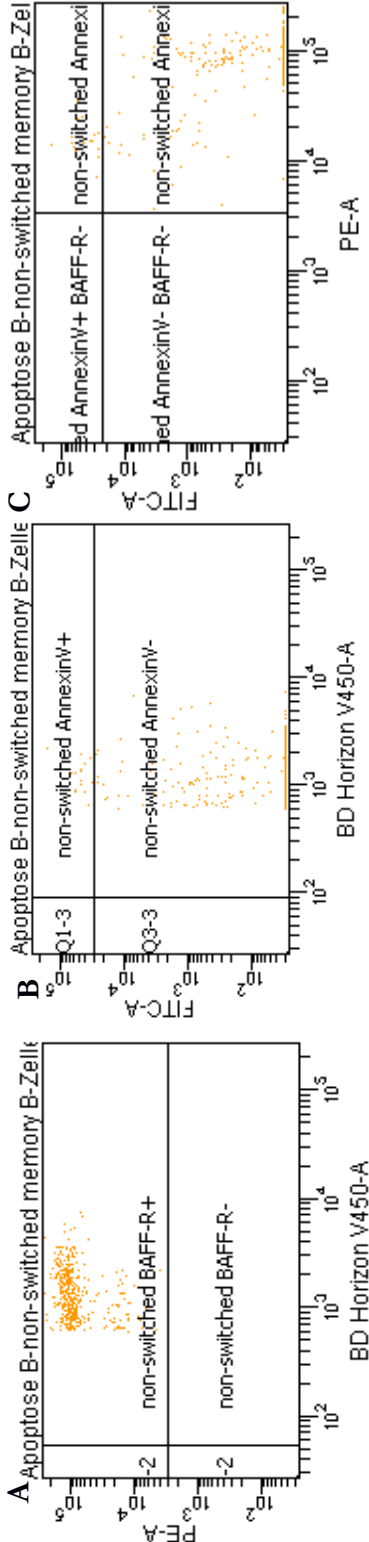


Abbildung 5-14 CD27 Memory B-Zellen

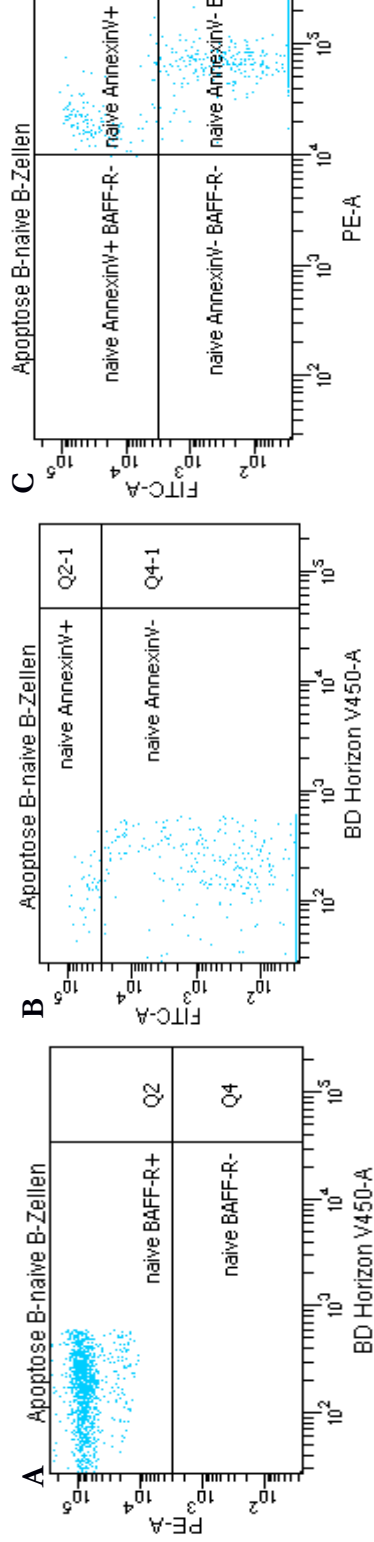


Abbildung 5-12 naive B-Zellen

Abbildung 5-13 non-switched Memory B-Zellen

Abbildung 5-14 CD27 Memory B-Zellen

5.2. Verlauf der Zellzahlen

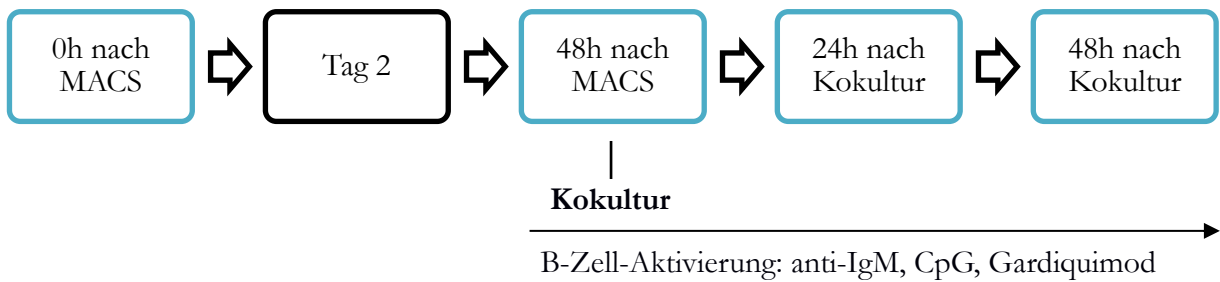


Abbildung 5-15 Zeitliche Übersicht der Messpunkte

Im zeitlichen Verlauf zeigten sich bei einigen Zellpopulationen signifikante Unterschiede der Zellzahlen, diese sind im Folgenden aufgeführt.

5.2.1. Vergleich zwischen Patienten (P) und Kontrollen (K)

Um Unterschiede in den jeweiligen Zellzahlen in Patienten- und Kontrollgruppe herauszustellen, wurden diese zu allen vier FACS-Messzeitpunkten bestimmt und das Signifikanzniveau der ermittelten Differenzen berechnet.

5.2.1.1. Leukozyten und Lymphozyten

Bei den Absolutzahlen der Leukozyten zeigten sich zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Beim Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten zeigte sich bis 48 Stunden nach MACS ein in der Patientengruppe signifikantes Abfallen der Zellzahlen. Über den gesamten Zeitverlauf sanken die Zahlen in Patienten- ($p=.037$) und Kontrollgruppe ($p=.041$) statistisch signifikant ab.

Tabelle 5-1 Lymphozyten *p-values* P vs. K

	0h MACS	48h MACS	24h Kokultur	48h Kokultur	0 vs. 48 MACS	48 vs. 24 M-Ko	24 vs. 48 Kokultur
Lymphozyten	.259	.275	.010	.000	.006 .052	.304 .557	.279 P .025 K

Ergebnisse

5.2.1.2. B-Zellen

Tabelle 5-2 B-Zell-Subpopulationen p-values P vs. K

	0h n. MACS	48h n. MACS	24h n. Ko- kultur	48h n. Ko- kultur	0 vs. 48 MAC S	48 vs. 24 M-Ko	24 vs. 48 Kokul- tur
B-Zellen	.992	.992	.026	.054	.936 .939	.038 .005	.863 P .605 K
CD34+ Memory B- Zellen	.838	.989	.196	.012	.303 .143	.441 .883	.377 P .818 K
BAFF-R- Memory B- Zellen	.029	.320	.913	.499	.147 .012	.652 .443	.619 P .185 K
reife naive B-Zellen	.881	.435	.004	.017	.043 .028	.024 .339	.375 P .811 K
Ki67+ naive B-Zellen	.845	.360	.013	.110	.993 .138	.375 .829	.484 P .929 K
BAFF-R+ naive B- Zellen	.168	.400	.146	.006	.137 .048	.571 .337	.601 P .503 K
Transitionalzellen	.707	.295	.028	.046	.103 .015	.192 .093	.949 P .553 K
Ki67- Transitionalzellen	.343	.038	.173	.744	.153 .446	.403 .012	.626 P .534 K
BAFF-R+ Transitional- zellen	.011	.260	.176	.504	.163 .053	.698 .342	.422 P .820 K
CD34+ B-Zellen	.915	.283	.061	.020	.880 .094	.146 .821	.607 P .354 K
CD69+ B-Zellen	.500	.019	.001	.019	.015 .000	.004 .000	.612 P .058 K
CD86+ B-Zellen	.931	.115	.000	.001	.941 .372	.162 .014	.574 P .047 K

Ab dem Zeitpunkt 48 Stunden nach MACS-Sortierung fiel der Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten signifikant ab. Lediglich 24 Stunden nach Kokultur waren die Zellzahlen der Kontrollgruppe signifikant erhöht, danach war lediglich die Tendenz noch erhalten. Über den gesamten Zeitverlauf sanken die Zahlen in Patienten- ($p=.005$) und Kontrollgruppe ($p=.012$) statistisch signifikant ab (Abb. 5-16).

Ergebnisse

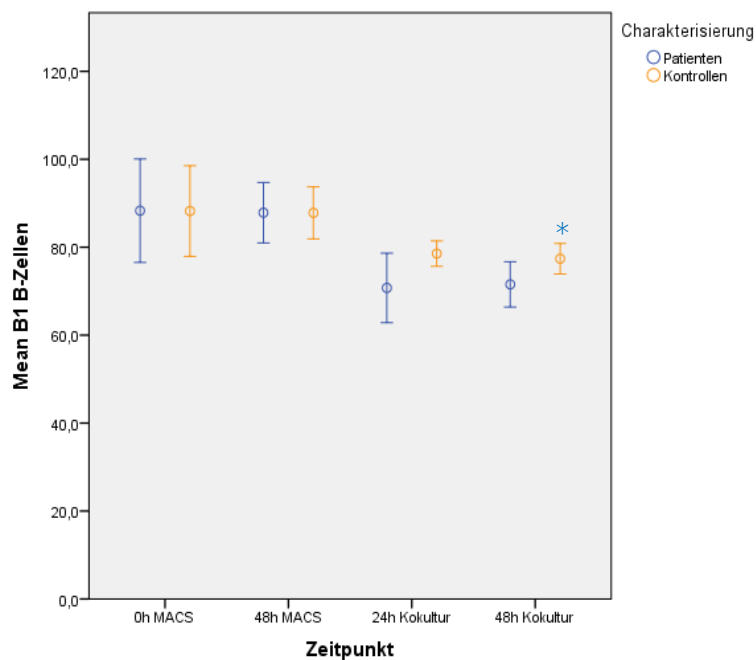


Abbildung 5-16 Anteil der B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen
* $p < .05$

Der Anteil der CD34⁺ Memory B-Zellen zeigte in beiden Populationen ab 24 Stunden nach Kokultur stagnierende Werte in der Kontrollgruppe und steigende in der Patientengruppe. Zum letzten Messzeitpunkt resultierte daraus die statistisch signifikante Differenz mit höheren Werten bei den Patienten. Über den gesamten Zeitverlauf stiegen die Zahlen in der Patientengruppe signifikant an ($p = .043$) (Abb. 5-17).

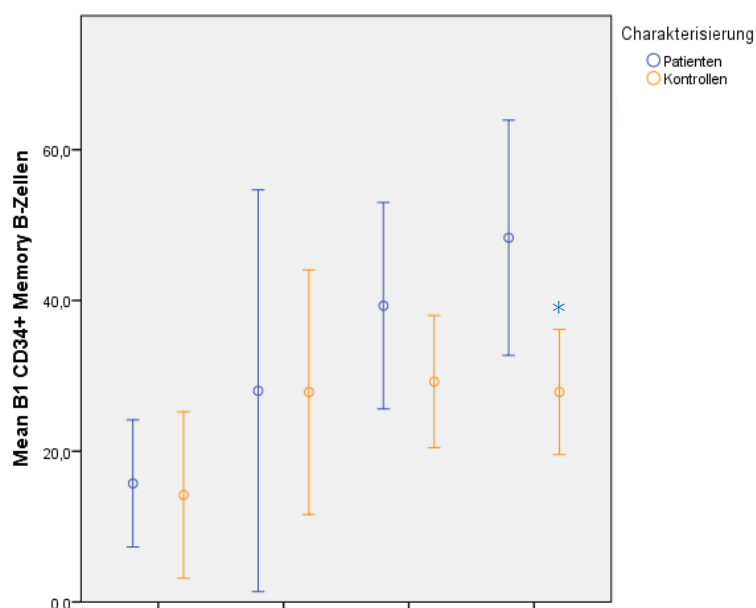


Abbildung 5-17 Anteil der CD34⁺ Memory B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$

In der Population der BAFF-R⁻ Memory B-Zellen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bereits zum ersten Messpunkt, mit höheren Werten bei den Patienten. Die Differenz glich sich jedoch durch signifikant steigende Werte in der

Ergebnisse

Kontrollgruppe zum Messpunkt 48 Stunden nach MACS wieder aus. Über den gesamten Zeitverlauf stiegen die Zahlen in der Kontrollgruppe signifikant an ($p=.007$).

Bis zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MACS-Sortierung stieg der Anteil der reifen naiven B-Zellen bei beiden Populationen signifikant an, bis 24 Stunden nach Kokultur fielen die Werte in der Patientengruppe wiederum signifikant ab. Zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden nach Kokultur zeigte sich eine signifikante Diskrepanz zwischen hohen Werten bei Kontrollen und auf Ausgangswerte fallende Anteile bei den Patienten. Über den gesamten Zeitverlauf stiegen die Zahlen in der Kontrollgruppe signifikant an ($p=.018$) (Abb. 5-18).

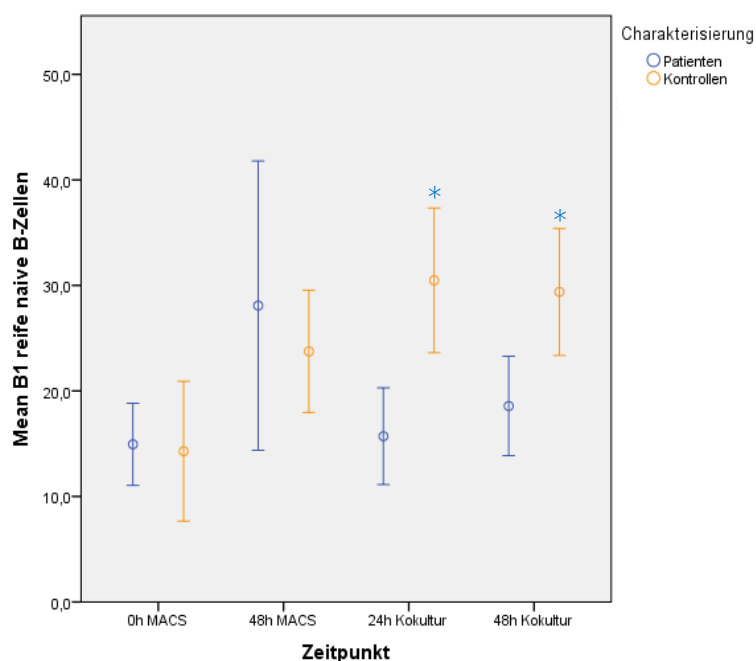


Abbildung 5-18 Anteil der reifen naiven B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p<.05$

Der Anteil der Ki67⁺ naiven B-Zellen zeigte einen diskrepananten Verlauf mit ansteigenden Werten für die Kontrollgruppe und absteigenden für die Patienten. Lediglich zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur bestand ein signifikanter Unterschied zwischen hohen Werten in der Kontroll- und niedrigen in der

Patientengruppe.

Bezüglich der Expression von BAFF-R auf naiven B-Zellen ergab sich in beiden Populationen in den ersten 48 Stunden ausgehend von vergleichbaren Ausgangswerten ein Abfall, der in der Kontrollgruppe signifikant war. Im Vergleich zu fallenden Werten nach 24 Stunden nach Kokultur bei den Patienten sieht man bei den Kontrollen zum letzten Messpunkt sogar noch einen leichten Anstieg und signifikant höhere Werte. Über den gesamten Zeitverlauf sanken die Zahlen in der Patienten- ($p=.022$) und Kontrollgruppe ($p=.020$) signifikant.

Der Verlauf des Anteils von Transitionalzellen an den B-Zellen wies initial bis 48 Stunden nach MACS-Sortierung eine abfallende Tendenz auf - bei der Kontrollgruppe war die

Veränderung signifikant ($p=0.015$). Zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Kokultur waren die Werte für die Kontrollgruppe signifikant niedriger. Über den gesamten Zeitverlauf fielen die Zahlen in der Kontrollgruppe signifikant ab ($p=0.007$) (Abb. 5-19).

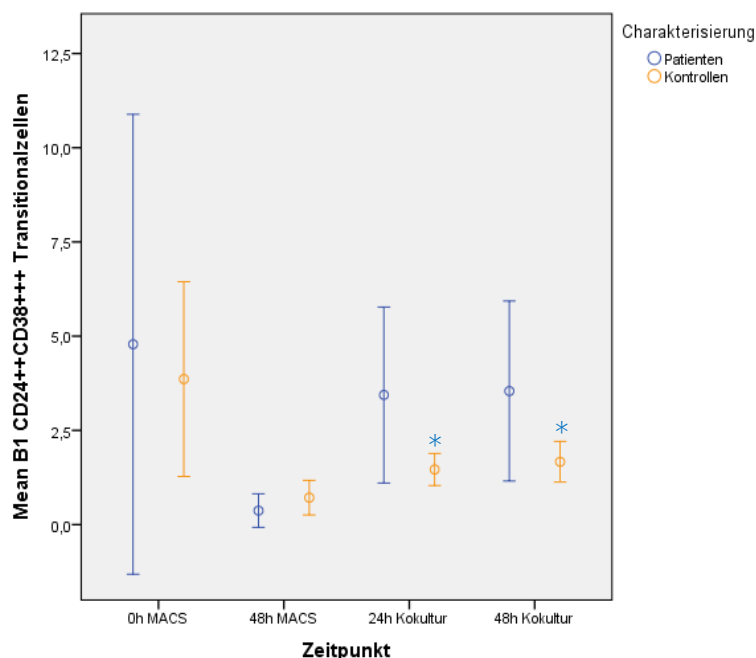


Abbildung 5-19 Anteil der Transitionalzellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$

Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MACS im Verlauf wieder der Patientengruppe annäherte. Über den gesamten Zeitverlauf fielen die Zahlen in der Patienten- ($p=0.024$) und Kontrollgruppe ($p=0.001$) signifikant ab.

In der Population der BAFF-R⁺ Transitionalzellen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen lediglich zum ersten Messpunkt, mit höheren Werten in der Kontrollgruppe. Trotz einer sinkenden Tendenz der Werte zeigte sich in den einzelnen Messungen keine statistische Signifikanz. Über den gesamten Zeitverlauf fielen die Zahlen in der Kontrollgruppe signifikant ab ($p=0.035$).

Die CD69⁺ B-Zellen zeigten im zeitlichen Verlauf zwischen den ersten drei Messzeitpunkten jeweils einen signifikanten Anstieg, zum letzten Messpunkt war die positive Tendenz nicht signifikant. Bei vergleichbaren Ausgangswerten waren die prozentualen Anteile in der Patientengruppe vom zweiten bis vierten Messpunkt signifikant höher. Über den gesamten Zeitverlauf stiegen die Zahlen in der Patienten- ($p=0.000$) und Kontrollgruppe ($p=0.000$) signifikant an (Abb. 5-20).

Bezüglich der Expression von Ki67 auf den Transitionalzellen zeigte sich, dass der Anteil an Ki67⁺ Zellen über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich geringer wurde, wobei das Abfallen der Werte bei der Patientengruppe deutlich schneller vorstättenging und sich ein signifikant höherer Anteil in der

Ergebnisse

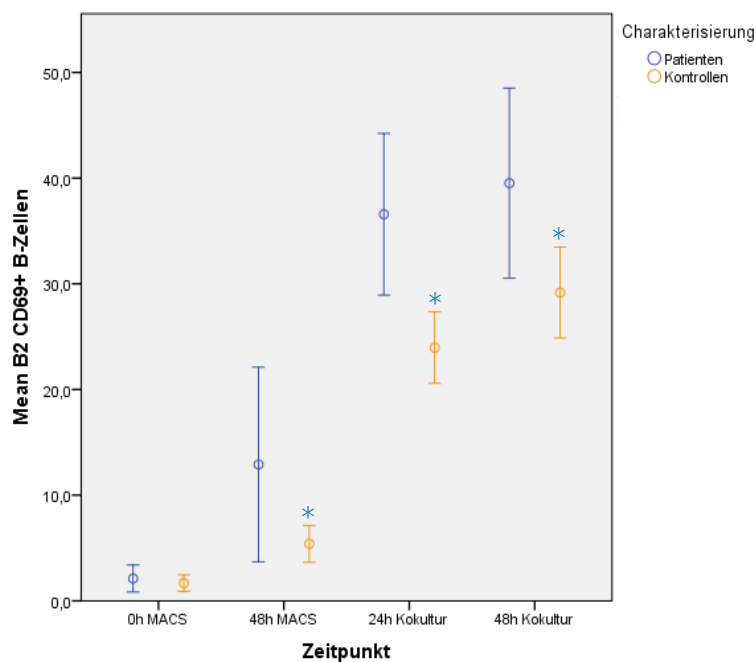


Abbildung 5-20 Anteil der CD69+ B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$

Die Expression von CD86 auf den B-Zellen blieb initial konstant, zeigte aber in der Kontrollgruppe zwischen den letzten drei Messzeitpunkten jeweils einen signifikanten Anstieg. Dementsprechend waren die Werte der Patientengruppe zu den letzten beiden Zeitpunkten auch signifikant höher als die der Kontrollgruppe (Abb. 5-21).

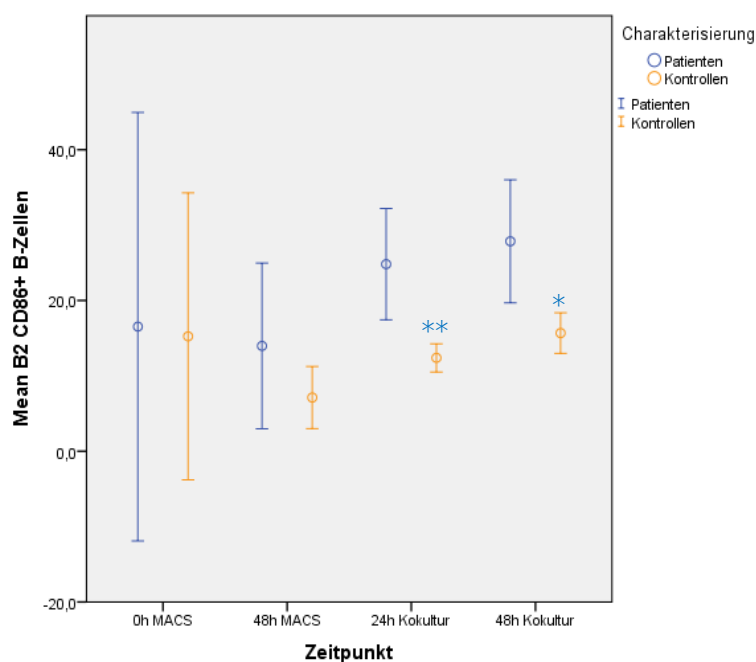


Abbildung 5-21 Anteil der CD86+ B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$ ** $p < .001$

Bei den restlichen untersuchten Subpopulationen (siehe Tabelle 8-2) bestanden zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Insgesamt zeigte sich bei den B-Lymphozyten ein Phänotyp mit einer erhöhten Anzahl an Memory- und Transitionalzellen und

erhöhter Expression von CD69 und CD86 sowie erniedrigten naiven B-Zell-Konzentrationen.

5.2.1.3. DC

Tabelle 5-3 DC-Subpopulationen p-values P vs. K

	0h n. MACS	48h n. MACS	24h n. Kokultur	48h n. Kokultur	0 vs. 48 MACS	48 vs. 24 M-Ko	24 vs. 48 Kokultur
CD83+ DC	.414	.042	.128	.344	.261 .725	.391 .086	.380 P .104 K
IP10+ DC	.184	.040	.155	.279	.326 .507	.184 .160	.780 P .783 K
CD11c- DC	.487	.732	.530	.028	.920 .961	.003 .000	.825 P .030 K

Bei den CD83⁺ DC waren zwischen den einzelnen Messpunkten keine signifikanten Veränderungen ersichtlich, lediglich zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MACS-Sortierung bestand ein signifikanter Unterschied zwischen erhöhten Werten in der Patientengruppe, die sich zur nächsten Messung aber wieder der Kontrollgruppe anpassten.

Die Expression von CD11c zeigte eine distinkte zeitliche Entwicklung. Zwischen den Zeitpunkten 48 Stunden nach MACS und 24 Stunden nach Kokultur war der Anstieg der Werte in beiden Populationen signifikant, zum letzten Zeitpunkt zeigte sich nur in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg. Während bei den ersten drei Messpunkten keine relevante Differenz zwischen den Populationen ersichtlich war, war der Anteil der CD11c negativen DC in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Kokultur signifikant höher als in der Patientengruppe. Über den gesamten Zeitverlauf stiegen die Zahlen in Patienten- (p=.029) und Kontrollgruppe (p=.000) statistisch signifikant an (Abb. 5-22).

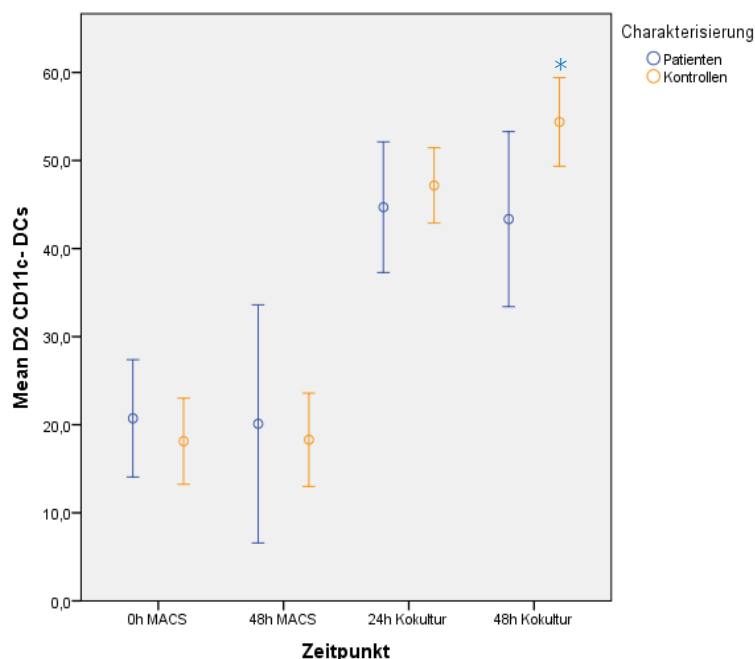


Abbildung 5-22 Anteil der CD11c⁻ DC Vergleich Patienten mit Kontrollen

* $p < .05$

Bei den restlichen untersuchten Subpopulationen (siehe Tabelle 8-3) bestanden zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Zusammenfassend wurde in der Patientengruppe eine Verteilung der DC-Subgruppen mit im Vergleich geringeren Zahlen an CD11c⁻ DC beobachtet.

5.2.1.4. DC/B-Zell-Ratio

Tabelle 5-4 DC/B-Zell-Ratio p -values P vs. K

	0h MACS	48h MACS	24h Kokultur	48h Kokultur	0 vs. 48 MACS	48 vs. 24 M-Ko	24 vs. 48 Kokultur
DC/B-Zellen	.556	.063	.520	.005	.150 .421	.000 .000	.177 P .459 K

Der Quotient zwischen den gemessenen Absolutzahlen der DC und berechneten Absolutzahlen B-Lymphozyten wies einen zeitlich distinkten Verlauf auf. Bei nicht wesentlich unterschiedlichen Werten zu den ersten drei Messpunkten zeigten sich 48 Stunden nach Kokultur signifikant höhere Werte in der Patientengruppe. Diese Beobachtung ist konkordant mit einem deutlichen Abfall des Quotienten zwischen den Zeitpunkten 48 Stunden nach MACS und 24 Stunden nach Kokultur. Im gesamten Zeitverlauf fielen die Werte in der Patienten- ($p = .022$) und Kontrollgruppe ($p = .028$) signifikant ab.

5.2.2. Vergleich mit Kokulturen

Nachdem diejenigen Zellpopulationen identifiziert worden waren, bei denen signifikante Unterschiede zwischen den Populationen bestehen, galt es im Folgenden, eine weitere Differenzierung bezüglich der unterschiedlichen Kokulturansätze anzustreben. Dabei wurde

Ergebnisse

versucht, die gefundenen Unterschiede womöglich auch hier zu reproduzieren, um den jeweiligen Einfluss von B-Lymphozyten und DC zu evaluieren.

5.2.2.1. Leukozyten und Lymphozyten

Tabelle 5-5 Leukozyten und Lymphozyten p-values

		24h n. Kokultur	48h n. Kokultur
Leukozyten	Kontrollen vs. alloauto	.879	.046
Lymphozyten	Patienten vs. autoallo	.047	.021
	Patienten vs. Kautoallo	.000	.002
	Kontrollen vs. alloauto	.126	.005

Bei den Absolutzahlen der Leukozyten bestand lediglich zum letzten Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen erhöhten Werten in der Kontrollgruppe und allo-auto.

Zu den beiden Messpunkten 24 beziehungsweise 48 Stunden nach Kokultur zeigten sich bei den Lymphozyten in den Kombinationen auto-allo und Kauto-allo jeweils signifikant höhere Anteile im Vergleich zur Patientenpopulation. Im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger waren die Werte bei allo-auto zum letzten Messpunkt.

5.2.2.2. B-Zellen

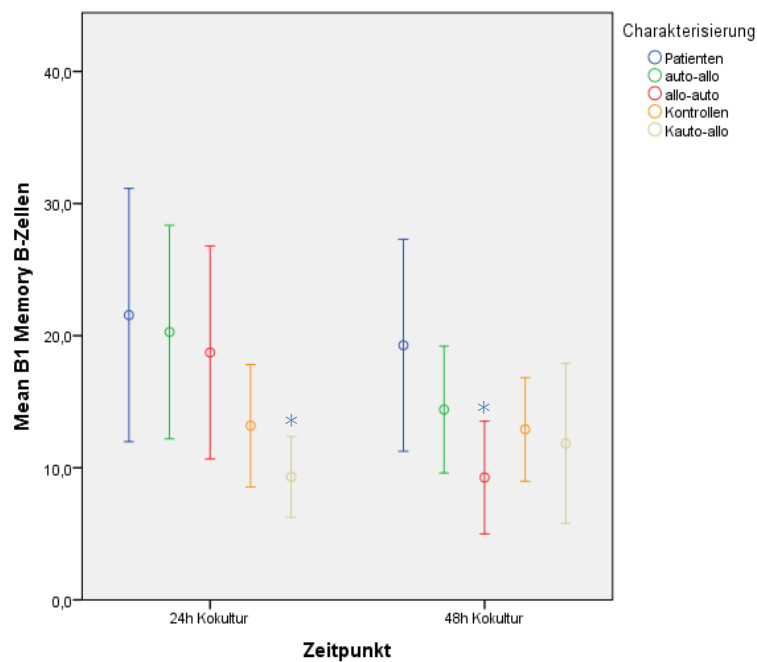
Tabelle 5-6 B-Zell-Subpopulationen p-values

		24h n. Kokultur	48h n. Kokultur
CD21lowCD38low	Kontrollen vs. alloauto	.046	.121
Memory B-Zellen	Patienten vs. alloauto	.644	.028
	Patienten vs. Kautoallo	.023	.146
CD34+ Memory B-Zellen	Patienten vs. autoallo	.000	.004
	Kontrollen vs. autoallo	.045	.000
	Kontrollen vs. alloauto	.034	.248
	Kontrollen vs. Kautoallo	.003	.016
Ki67+ Memory B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.017	.017
	Kontrollen vs. Kautoallo	.014	.070
reife naive B-Zellen	Patienten vs. alloauto	.007	.042
	Patienten vs. Kautoallo	.001	.020
	Kontrollen vs. autoallo	.008	.025
Ki67+ naive B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.009	.073
BAFF-R+ naive B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.007	.003
Transitionalzellen	Kontrollen vs. autoallo	.046	.019
CD34+ Transitionalzellen	Patienten vs. Kautoallo	.024	.009
	Kontrollen vs. Kautoallo	.115	.012
Ki67- Transitionalzellen	Patienten vs. autoallo	.014	.154
BAFF-R- Transitionalzellen	Kontrollen vs. autoallo	.010	.081
CD34+ B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.002	.003
	Kontrollen vs. autoallo	.019	.032
	Kontrollen vs. Kautoallo	.032	.049
Ki67+ B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.008	.009
	Kontrollen vs. autoallo	.012	.151
	Kontrollen vs. Kautoallo	.029	.086
BAFF-R+ B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.032	.007
CD21+ B-Zellen	Patienten vs. Kautoallo	.021	.041

Ergebnisse

CD69+ B-Zellen	Kontrollen vs. autoallo	.021	.081
	Patienten vs. alloauto	.027	.012
	Patienten vs. Kautoallo	.005	.113
CD25+ B-Zellen	Kontrollen vs. autoallo	.011	.092
	Patienten vs. Kautoallo	.002	.011
	Kontrollen vs. Kautoallo	.087	.019
CD86+ B-Zellen	Patienten vs. alloauto	.001	.009
	Patienten vs. Kautoallo	.002	.007
	Kontrollen vs. autoallo	.002	.013

In der Population der Memory B-Zellen bestanden signifikant niedrigere Werte bei Kautoallo im Vergleich zur Patientengruppe zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur und bei allo-auto 48 Stunden nach Kokultur (Abb. 5-23).



Der Anteil der CD34⁺ Memory B-Zellen war bei Kauto-allo zu beiden Zeitpunkten signifikant erniedrigt gegenüber der Patientenpopulation. Ebenso zeigten sich signifikant höhere Werte bei auto-allo und allo-auto 24 Stunden nach Kokultur und bei auto-allo auch 48 Stunden nach Kokultur (Abb. 5-24).

Abbildung 5-23 Anteil der Memory B-Zellen in den Kokulturen * $p < .05$

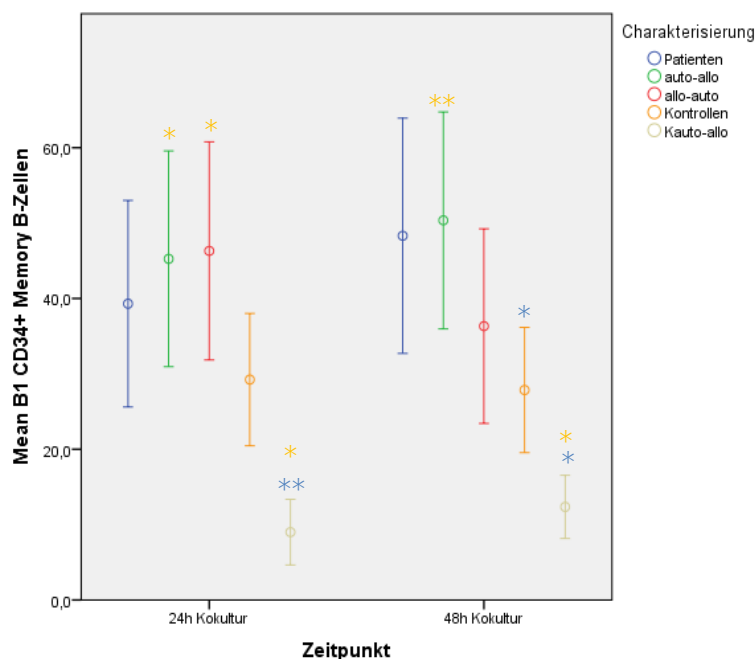


Abbildung 5-24 Anteil der CD34⁺ Memory B-Zellen in den Kokulturen * $p < .05$, ** $p < .001$

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Ki67⁺ Memory B-Zellen. Bezüglich der Unterschiede zwischen den Kokulturen bestand Signifikanz lediglich bei Kauto-allo 24 Stunden nach Kokultur gegenüber Patienten- und Kontrollgruppe sowie 48 Stunden nach Kokultur nur gegenüber der Patientengruppe im Sinne erniedrigter Werte.

Beim Anteil der reifen naiven B-Zellen bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Patientengruppe und erhöhten Werten bei allo-auto und Kauto-allo sowie zwischen der Kontrollgruppe und erniedrigten Werten bei auto-allo zu beiden Messzeitpunkten (Abb. 5-25).

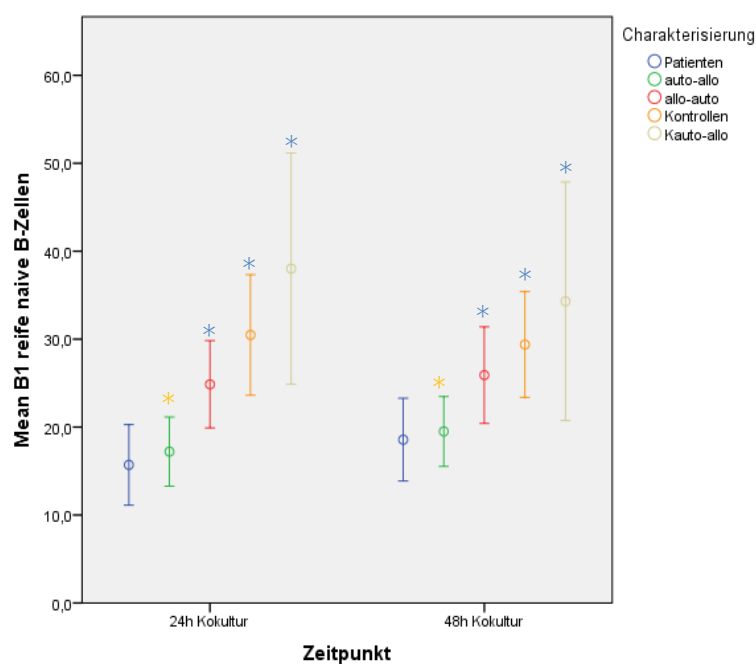
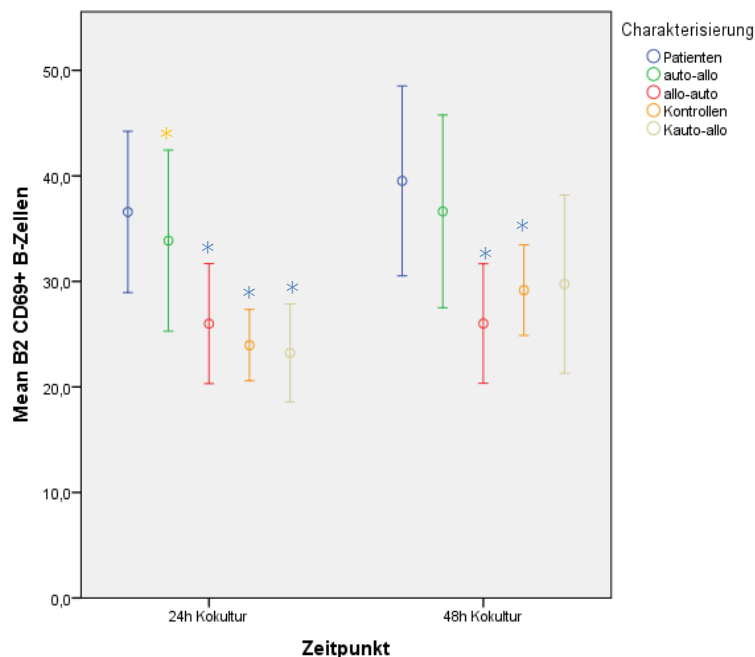


Abbildung 5-25 Anteil der reifen naiven B-Zellen in den Kokulturen * $p < .05$

Beim Anteil der BAFF-R⁺ naiven B-Zellen bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Patientengruppe und erhöhten Werten bei Kauto-allo zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden nach Kokultur. Beim Anteil der CD34⁺ Transitional-

zellen bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Patientenpopulation und erniedrigten Werten bei Kauto-allo zu beiden Zeitpunkten sowie zwischen Kauto-allo und der Kontrollgruppe zum letzten Messpunkt. Bezüglich der Expression von Ki67 auf Transitionalzellen zeigten sich zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur signifikant höhere Werte bei auto-allo im Vergleich zur Patientengruppe. Beim Anteil der CD34⁺ B-Zellen bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- sowie Patientenpopulation und erniedrigten Werten bei Kauto-allo sowie zwischen erhöhten Werten bei auto-allo im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beiden Zeitpunkten. Beim Anteil der Ki67⁺ B-Zellen bestanden signifikante Unterschiede zwischen bei der Kontrollgruppe erhöhten Werten bei auto-allo sowie niedrigen Werten bei Kauto-allo zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur. Im Vergleich zur Patientenpopulation erniedrigt zeigten sich die Werte bei Kauto-allo zu beiden Messzeitpunkten. Beim Anteil der CD21⁺ B-Zellen bestanden signifikante Unterschiede zwischen bei der Kontrollgruppe erhöhten Werten bei auto-allo zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur. Im Vergleich zur Patientenpopulation erniedrigt zeigten sich die Werte bei Kauto-allo zu beiden Messzeitpunkten.

Es bestanden signifikante Unterschiede bei den CD69⁺ B-Zellen zwischen niedrigeren Werten bei allo-auto gegenüber der Patientengruppe zu beiden Messzeitpunkten, bei Kauto-allo lediglich zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur. Bei auto-allo zeigten sich 24 Stunden nach Kokultur signifikant erniedrigte Werte gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 5-26).



Bei den CD25⁺ B-Zellen zeigten sich zu beiden Messzeitpunkten gegenüber der Patientengruppe und gegenüber der Kontrollgruppe lediglich 48 Stunden nach Kokul-

Abbildung 5-26 Anteil der CD69⁺ B-Zellen in den Kokulturen
**p*<.05

Ergebnisse

tur signifikant erniedrigte Werte bei Kauto-allo.

Gegenüber der Patientenpopulation signifikant niedriger waren die Werte bei allo-auto und Kauto-allo zu beiden Messpunkten bei den CD86⁺ B-Zellen. Die Werte bei auto-allo dagegen waren 24 und 48 Stunden nach Kokultur signifikant höher als in der Kontrollpopulation (Abb. 5-27).

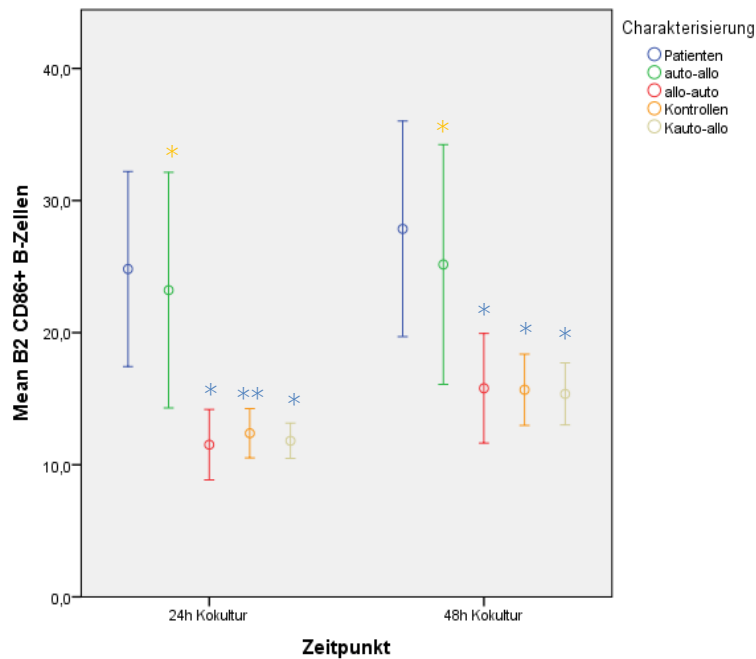


Abbildung 5-27 Anteil der CD86⁺ B-Zellen in den Kokulturen
* $p < .05$, ** $p < .001$

Bei den restlichen untersuchten Sub-populationen (siehe Tabelle 8-6) bestanden zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

5.2.2.3. DC

Tabelle 5-7 DC-Subpopulationen p -values

		24h n. Kokultur	48h n. Kokultur
DC	Kontrollen vs. autoallo	.028	.325
CD83+ DC	Patienten vs. Kautoallo	.035	.088
IP10+ DC	Patienten vs. Kautoallo	.004	.068
	Kontrollen vs. Kautoallo	.048	.258
CD45+ DC	Patienten vs. autoallo	.022	.255
	Kontrollen vs. autoallo	.003	.052
CD11c- DC	Patienten vs. Kautoallo	.013	.005
HLA-DR- DC	Patienten vs. Kautoallo	.208	.031
	Kontrollen vs. Kautoallo	.172	.033
CD274- DC	Patienten vs. Kautoallo	.264	.029
CCR7+ DC	Kontrollen vs. autoallo	.030	.492

Ergebnisse

Lediglich zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kokultur bestand bei den CD83⁺ DC zwischen der Patientengruppe und niedrigeren Werten bei Kauto-allo ein signifikanter Unterschied. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den IP10⁺ DC, wobei die Differenz zur Kontrollgruppe auch signifikant ist. Bei den CD45⁺ DC dagegen waren zum ersten Messzeitpunkt signifikant verringerte Werte bei auto-allo gegenüber sowohl der Patienten- als auch Kontrollgruppe zu beobachten. Bei den CD11c⁻ DC war zu beobachten, dass die Messwerte bei Kauto-allo zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Kokultur gegenüber der Patientenpopulation signifikant erhöht waren. Bei den HLA-DR⁻ DC zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei die signifikante Differenz zwischen Kauto-allo und sowohl der Patienten- als auch der Kontrollgruppe 48 Stunden nach Kokultur bestand. Die Ergebnisse bei den CD274⁻ DC wiederum wiesen signifikant erhöhte Werte bei Kauto-allo 48 Stunden nach Kokultur gegenüber der Patientengruppe auf. Bei den restlichen untersuchten Subpopulationen (siehe Tabelle 8-7) bestanden zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

5.2.2.4. DC-B-Zell-Ratio

Tabelle 5-8 DC-B-Zell-Ratio p-values

		24h n. Kokultur	48h n. Kokultur
DC/B-Zellen	Patienten vs. autoallo	.137	.015
	Patienten vs. Kautoallo	.152	.017

Der Quotient aus DC und B-Zellen zeigte 48 Stunden nach Kokultur signifikant niedrigere Werte bei auto-allo und Kauto-allo gegenüber der Patientenpopulation auf (Abb. 5-28).

Ergebnisse

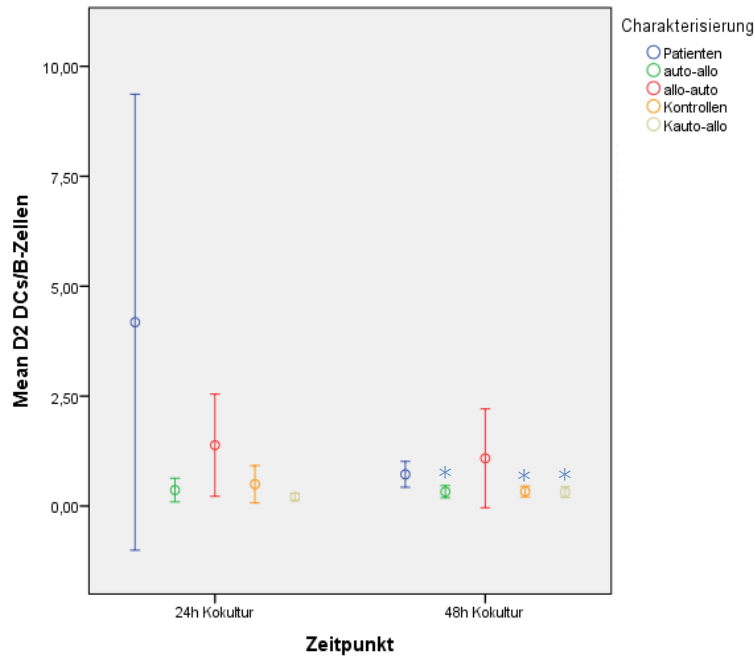


Abbildung 5-28 DC-B-Zell-Ratio in den Kokulturen * $p < .05$

In einem weiteren parallelen Schritt sollten die Effekte verschiedener Stimulanzen zur B-Zell-Differenzierung, im Speziellen anti-IgM, CpG (ODN 2006) und Gardiquimod, auf die gemessenen Zellzahlen im Vergleich zu nativen Proben gemessen werden.

5.2.2.5. B-Zellen

Tabelle 5-9 B-Zell-Subpopulationen p -values

		24h n. Kokultur		48h n. Kokultur	
		P	K	P	K
B2 CD69+ B-Zellen	nativ vs. antiIgM	.136	.020	.177	.010
	nativ vs. Gardiquimod	.797	.032	.917	.143
B2 CD86+ B-Zellen	antiIgM vs. CpG	.589	.167	.203	.037

Der Anteil der CD69⁺ B-Zellen war beim Zusatz von anti-IgM zu beiden Zeitpunkten und bei Gardiquimod 24 Stunden nach Kokultur gegenüber den nativen Zellen signifikant erhöht. Bei den anderen Zusätzen bestanden keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5-29).

Ergebnisse

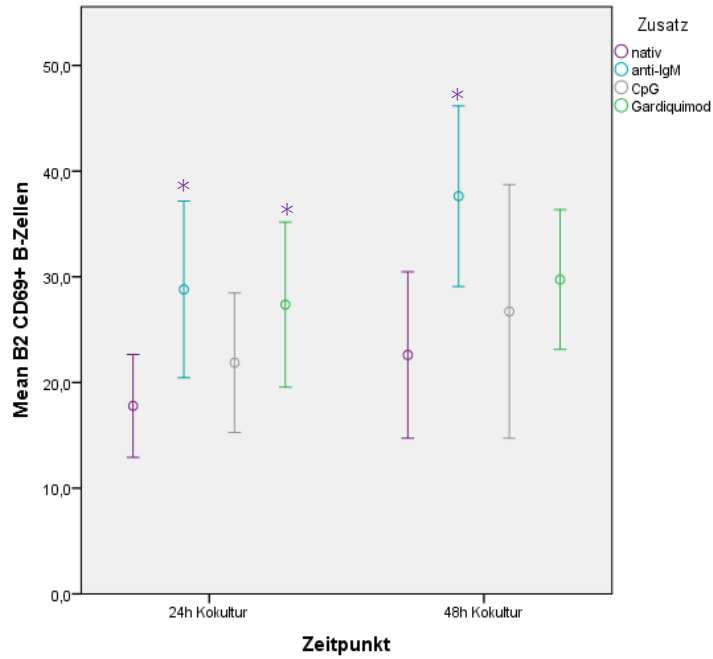


Abbildung 5-29 Anteil der CD69⁺ B-Zellen in der Kontrollgruppe nach Zusätzen * $p < .05$

5.2.2.6. DC

Tabelle 5-10 DC-Subpopulationen p -values

		24 Kokultur		48h Kokultur	
		P	K	P	K
CD45+ DC	antiIgM vs. Gardiquimod	.302	.017	.893	.197
CD83+ DC	nativ vs. Gardiquimod	.705	.041	.635	.460
CD80+ DC	antiIgM vs. CpG	.809	.433	.952	.041
	antiIgM vs. Gardiquimod	.656	.205	.908	.043

Der Anteil der CD83⁺ DC war beim Zusatz von Gardiquimod 24 Stunden nach Kokultur gegenüber den nativen Zellen signifikant erhöht (Abb. 5-30).

Ergebnisse

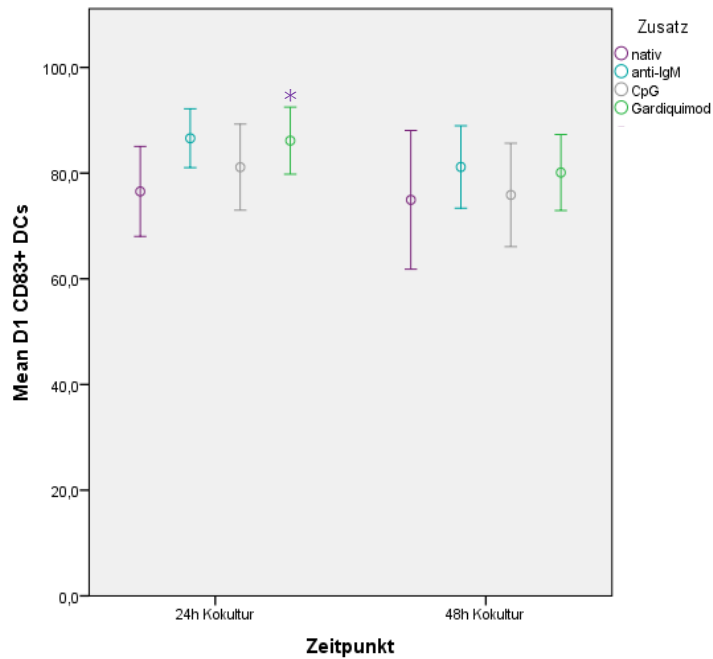


Abbildung 5-30 Anteil der CD83⁺ DC in der Kontrollgruppe nach Zusätzen * $p < .05$

5.2.3. Detektion von Apoptose

Um mögliche Unterschiede im Apoptose-Verhalten der einzelnen Zelltypen in den verglichenen Gruppen zu finden, wurde zu zwei Zeitpunkten ein Annexin V Affinitäts-Assay durchgeführt.

5.2.3.1. Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen

Tabelle 5-11 Apoptose p -values P vs. K

	48h n. MACS	48h n. Kokultur	48h n. MACS vs. 48h n. Ko.
Annexin V+ naive B-Zellen	.821	.015	.248 P .899 K
Annexin V+ non-switched Memory	.612	.018	.271 P .773 K
AnnexinV- BAFF-R- non-switched Memory	.005	.842	.143 P .005 K
AnnexinV+ DC	.979	.001	.301 P .431 K

Ergebnisse

Der Anteil der AnnexinV⁺ naiven B-Zellen war 48 Stunden nach Kokultur signifikant niedriger in der Kontrollgruppe (Abb. 5-31).

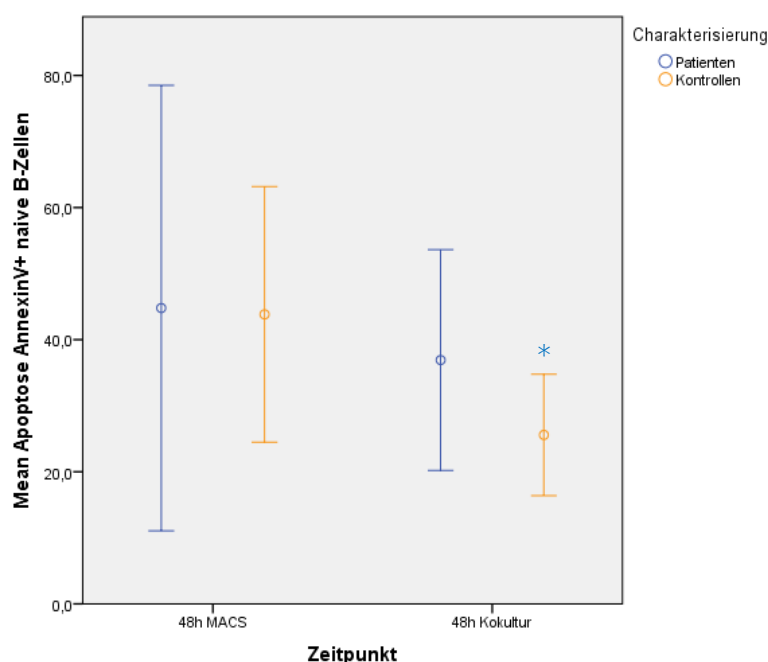


Abbildung 5-31 Anteil der AnnexinV⁺ naiven B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$

Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MACS bestand bei den BAFF-R⁺ non-switched Memory B-Zellen eine signifikante Differenz zwischen den Populationen mit höheren Werten in der Kontrollgruppe. Bei der Subpopulation der AnnexinV⁻ BAFF-R⁻ non-switched Memory B-Zellen zeigten sich zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MACS-Sortierung signifikant höhere Werte in der Patientengruppe. Der Anteil der AnnexinV⁺ non switched Memory B-Zellen war 48 Stunden nach Kokultur in der Kontrollgruppe signifikant niedriger (Abb. 5-32).

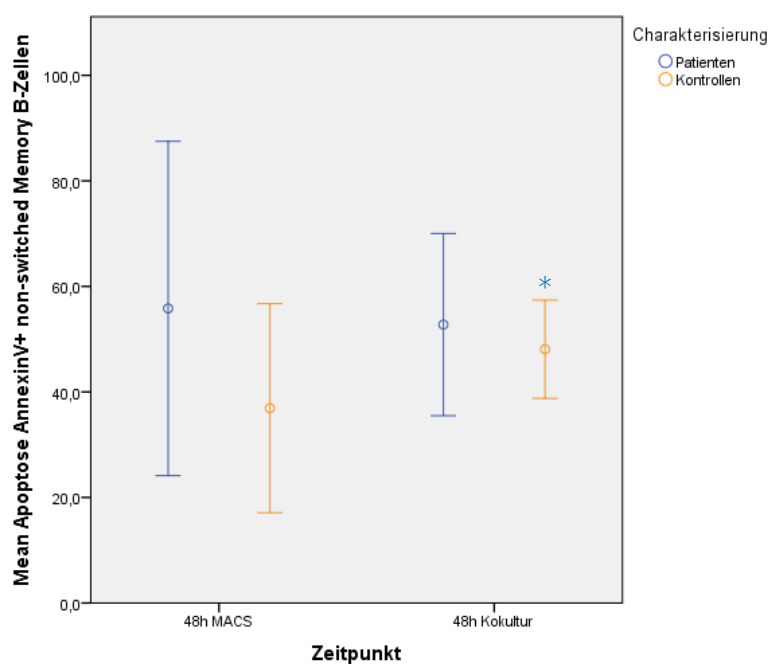


Abbildung 5-32 Anteil der AnnexinV⁺ non-switched Memory B-Zellen Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$

Die AnnexinV⁺ DC zeigten im zeitlichen Verlauf zwischen den beiden Messpunkten einen signifikanten Abfall in beiden Populationen bei vergleichbaren Ausgangswerten. Die Zahlen der Patientengruppe aber sanken wesentlich stärker ab

Ergebnisse

und waren zum zweiten Messpunkt auch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 5-33).

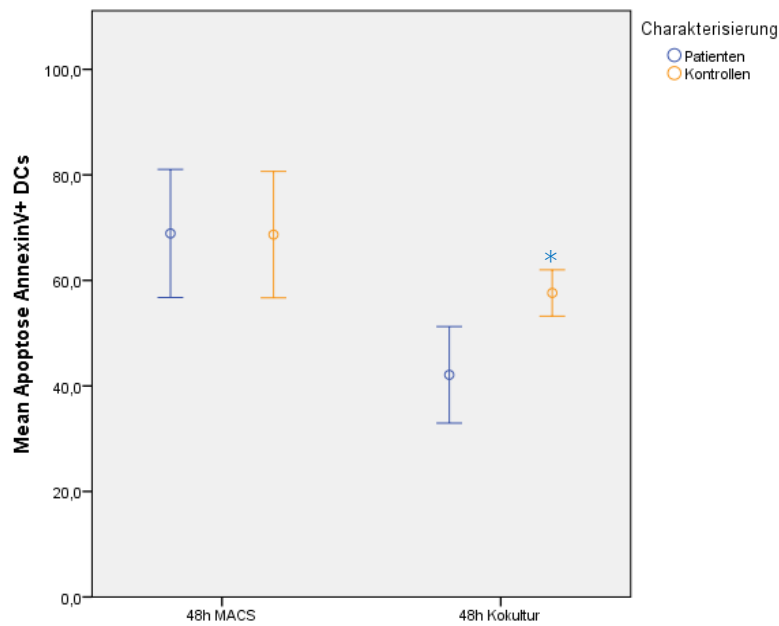


Abbildung 5-33 Anteil der Annexin⁺ DC Vergleich Patienten mit Kontrollen * $p < .05$

Bei den restlichen untersuchten Sub-populationen (siehe Tabelle 8-13) bestanden zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

5.2.3.2. Kokulturen

Tabelle 5-12 Apoptose Kokulturen p -values

		48h n. Kokultur
AnnexinV ⁻ BAFF-R ⁺ naive	Patienten vs. Kautoallo	.046
AnnexinV ⁺ switched Memory	Patienten vs. Kautoallo	.033
	Kontrollen vs. Kautoallo	.030
AnnexinV ⁺ BAFF-R ⁺ switched Memory	Patienten vs. Kautoallo	.049
	Kontrollen vs. alloauto	.000

Der Anteil der AnnexinV⁻ BAFF-R⁺ naiven B-Zellen bei Kauto-allo war gegenüber der Patientengruppe signifikant erhöht.

Der Anteil der AnnexinV⁺ switched Memory B-Zellen war bei Kauto-allo gegenüber der Patienten- und Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. (Abb. 5-34)

Ergebnisse

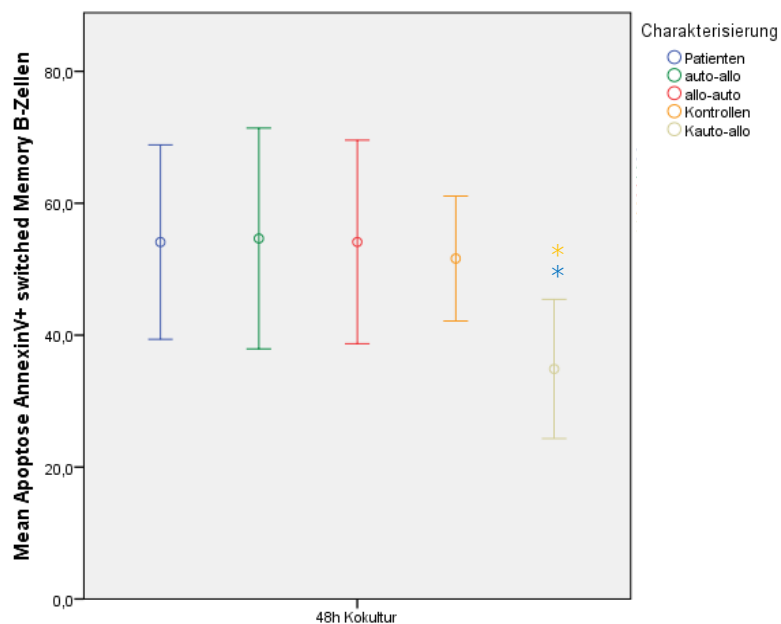


Abbildung 5-34 Anteil der AnnexinV⁺ switched Memory B-Zellen in den Kokulturen * $p < .05$

Der Anteil der AnnexinV⁺ BAFF-R⁺ switched Memory B-Zellen war bei Kauto-allo gegenüber der Patienten- und Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

Der Anteil der AnnexinV⁺ DC war in der Kontrollgruppe gegenüber allo-auto signifikant

erhöht. Bei den restlichen untersuchten Subpopulationen (siehe Tabelle 8-14) bestanden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

5.2.3.3. Zusätze

Tabelle 5-13 Apoptose Zusätze p -values

		48h n. Kokultur	
		P	K
Annexin V+ DC	nativ vs. Gardiquimod	.043	.219

Der Anteil der AnnexinV⁺ DC war beim Zusatz Gardiquimod gegenüber den nativen Zellen signifikant erniedrigt (Abb. 5-35).

Ergebnisse

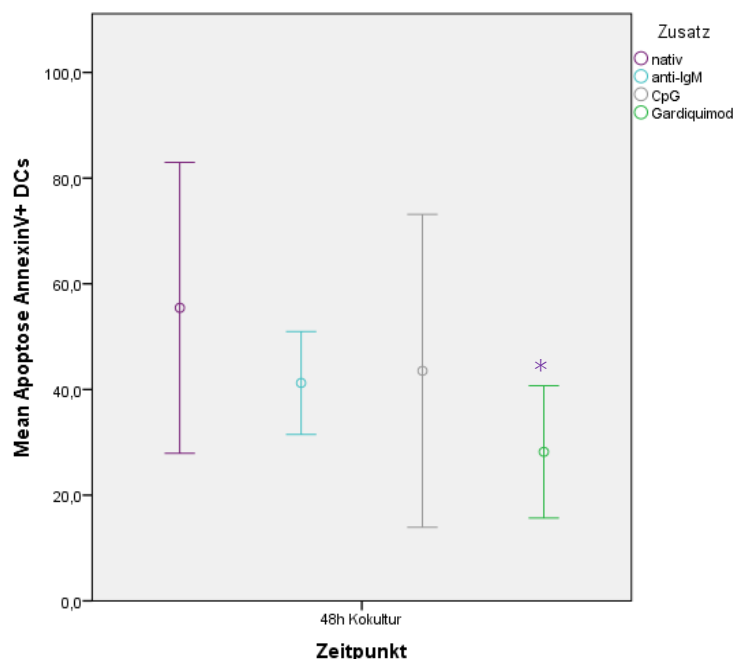


Abbildung 5-35 Anteil der AnnexinV⁺ DC in der Patientengruppe nach Zusätzen *p<.05

Bei den restlichen untersuchten Subpopulationen (siehe Tabellen 8-15 und 8-16) bestanden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Insgesamt stellte sich in der Patientengruppe ein erhöhter Transitionalzell- und CD69⁺- sowie CD86⁺-B-Zell-Phänotyp im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Dies ging einher mit einer verminderten Anzahl an reifen naiven B-Zellen. Die differenzierte Analyse der Kokultivierung bestätigt diese Ergebnisse. Relevante Differenzen in den bezüglich den Zusätzen verglichenen Populationen ließen sich nicht eruieren.

5.3. BAFF-Konzentrationen im Kulturüberstand

Aus den Überständen der Zellkulturen wurde ein ELISA-Assay zur Messung von BAFF zu den beiden Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Kokultur angelegt.

5.3.1. Charakterisierung

Tabelle 5-14 BAFF-Konzentrationen nach Charakterisierung p-values

	24h n. Kokultur nativ	48h n. Kokultur nativ	48h n. Kokultur gesamt
Patienten vs. auto-allo	.122	.486	.138
Patienten vs. allo-auto	.398	.253	.372
Patienten vs. Kontrollen	.545	.042	.430
auto-allo vs. allo-auto	.335	.704	.356
auto-allo vs. Kontrollen	.247	.160	.370
allo-auto vs. Kontrollen	.790	.196	.968

Ergebnisse

Die Konzentration von BAFF war in der nativen Messreihe 48 Stunden nach Kokultur in der Patientenpopulation signifikant höher als in der Kontrollpopulation. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 8-17 dargestellt.

5.3.2. Zusätze

Tabelle 5-15 BAFF-Konzentrationen nach Zusätzen p-values

	Patienten	allo-auto	Kontrollen
nativ vs. anti-IgM	.795	.139	.054
nativ vs. CpG	.479	.352	.291
nativ vs. Gardiquimod	.011	.089	.084
anti-IgM vs. CpG	.661	.800	.592
anti-IgM vs. Gardiquimod	.051	.522	.492
CpG vs. Gardiquimod	.254	.866	.312

Die Konzentration von BAFF war beim Zusatz Gardiquimod gegenüber der nativen Population signifikant erhöht (Abb. 5-36).

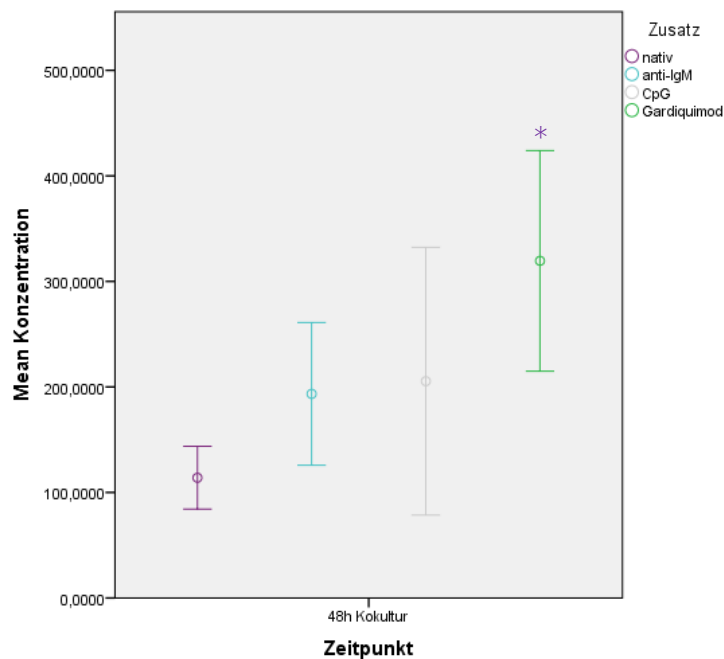


Abbildung 5-36 Konzentrationen von BAFF in pg/ml in der Patientengruppe nach Zusätzen * $p < .06$

Die gemessenen Werte sind in Tabelle 8-18 dargestellt.

6. Diskussion

In Deutschland wurden die ersten Stammzelltransplantationen bei Kindern Mitte der 70er Jahre durchgeführt, heute sind 8 Zentren bundesweit durch das Joint Accreditation Committee-ISCT & EBMT für pädiatrische Transplantationen akkreditiert (Stand: 23.01.2017). 20-25% der pädiatrischen Patienten haben einen HLA-identischen Geschwisterspender. Alternativen sind HLA-identische nicht verwandte Spender, Nabelschnurblut und mittlerweile auch haploidente Spender (Vater, Mutter) sowie nicht HLA-identische Fremdspender. Das Outcome bei HLA-identischen nicht verwandten Spendern ist gegenüber HLA-identischen Geschwisterspenden äquivalent (Niethammer et al. 2013). Mittlerweile ist auch das Outcome bei haploident transplantierten Kindern mit High-Risk Leukämien im Vergleich zu HLA-identischen Spendern vergleichbar (Leung et al. 2011).

6.1. B-Zellen

Bei der B-Zell-Rekonstitution nach HSCT im pädiatrischen Setting sind nicht nur absolute Zahlenwerte und das Verhältnis der einzelnen B-Zell-Subpopulationen untereinander von Interesse, sondern vor allem auch die zeitliche Entwicklung dieser Werte parallel zum Alter. In den ersten Lebensjahren der kindlichen Entwicklung wurden bereits spezifische Veränderungen beschrieben. Während der Anteil von switched- und non-switched Memory-Zellen ansteigt, geht diese Entwicklung einher mit einem Abfallen der Zahlen von Transitionalzellen und naiven B-Zellen. Weiter zeigt der Anteil von CD19⁺ B-Zellen in den Lymphozyten-Populationen ein altersabhängiges Absinken, wohingegen CD21^{low} CD38^{low} und CD27⁺-Zellen anteilig häufiger vorkommen in Bezug auf die gesamte B-Zell-Zahl (Morbach et al. 2010).

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass transferierte IL-10-produzierende B-Zellen die Schwere einer cGvHD vermindern können, was sich auf die Rekonstitution von regulatorischen B-Zell-Subpopulationen begründet und gleichzeitig eine suppressive Wirkung auf die Entwicklung einer sklerodermatösen Ausprägung haben (Le Huu et al. 2013). IL-10 ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (Fillatreau et al. 2008). Die immunmodulatorischen Effekte von IL-10 scheinen vor allem in der Induktion von Toleranz zu bestehen. In aktuellen Untersuchungen zeigt sich eine protektive Rolle von regulatorischen B-Zellen gegen cGvHD nach HSCT mit Nabelschnurblut (Sarvaria et al. 2016).

Auch zeigen Patienten mit cGvHD, die sich durch eine klinische Verbesserung und positive Antwort auf eine Therapie auszeichnen, eine robuste Erholung des Pools naiver B-Zellen (Kuzmina et al. 2011; Sarantopoulos et al. 2009). Dies geht mit der Beobachtung einher, dass bei gesunden Patienten nach HSCT ein Anstieg von IgD⁺ CD38^{high} CD27⁻ B-Zellen zu verzeichnen ist (Sarantopoulos et al. 2009) und suggeriert, dass eine Rückkehr der B-Zell-Homöostase entscheidend wichtig sein könnte, um eine Autoimmunpathogenese mit resultierender cGvHD zu verhindern (Levine et al. 2012).

Erstaunlicherweise scheinen die ersten Schritte der initialen Aktivierung und Erkennung von auto-Antigenen nicht von B-Zellen abhängig, sondern durch T-Zellen vermittelt zu sein (Knoechel et al. 2005). Mit dem Wissen, dass die Induktion von cGvHD von der Interaktion zwischen CD4⁺ T- und B-Zellen abhängt, überrascht es, dass ein Fehlen von B-Zellen bei Empfängern einer HSCT die Erkrankung nicht verhindern konnte, nachdem die T-Zellen schon mit B-Zellen in Kontakt getreten waren (Young et al. 2012).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle der B-Lymphozyten und der DC in der Pathogenese der cGvHD zu untersuchen. Unsere Kokultivierung diente der Überprüfung der Hypothese, dass DC eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der B-Zellen spielen. Die Kombination von B-Lymphozyten und DC von Patienten und gesunden Probanden gewährleistete eine kontrollierte Untersuchung. Zu mehreren Zeitpunkten erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile bestimmter Zellsubpopulationen.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie 72 Stunden danach bestanden keine relevanten Unterschiede zwischen den Zellpopulationen bei Patienten mit cGvHD und gesunden Kontrollen. Erst 48 Stunden nach Kokultur konnten wir signifikant unterschiedliche Zellzahlen messen. In der Patientengruppe ist ein distinkter B-Zell-Phänotyp ersichtlich mit erhöhten Konzentrationen an Transitionalzellen, Memory, CD69⁺, und CD86⁺ sowie einer niedrigeren Anzahl an reifen naiven B-Lymphozyten 24 beziehungsweise 48 Stunden nach Kokultur.

Um isolierte Effekte der einzelnen Zellgruppen sowie Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten darzustellen, mussten wir alle Kombinationen von DC und B-Zellen in unserer Kokultivierung berücksichtigen. Nur so konnten mögliche Beobachtungen auch eindeutig einer Zellpopulation oder Kohorte zugeordnet werden. In keiner der differenzierten Zellgruppen konnte ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen zwischen der Patientengruppe und auto-allo festgestellt werden, was auf einen fehlenden Einfluss des DC-

Ursprungs auf B-Zellen hinweisen könnte. In ähnlicher Weise konnten wir signifikant höhere Zellzahlen in auto-allo im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe detektieren bei CD34⁺ Memory, CD69⁺ and CD86⁺ B-Zellen und niedrigere Zellzahlen bei Transitionalzellen sowie reifen naiven B-Zellen.

Insbesondere eine vermehrte Expression von CD69 und CD86 weist auf eine verstärkte B-Zell-Aktivierung hin, aktivierte alloreaktive und autoreaktive B-Zellen wiederum sind assoziiert mit cGvHD (Socié et al. 2014). Eine verzögerte – oder unbalancierte - Rekonstitution von B-Zellen zusammen mit einer erhöhten Konzentration von Plasma-BAFF führt zu höheren Zahlen an zirkulierenden CD27⁺ B-Zell-Subgruppen im peripheren Blut (Sarantopoulos et al. 2009). Diese schließen unter anderem Antigen-erfahrene B-Zellen mit einer korrelierenden Tendenz zur Differenzierung zu Plasmablasten mit ein (Avery et al. 2005). Darüber hinaus ist diese Beobachtung assoziiert mit signifikant erhöhten Proteinkonzentrationen in B-Zellen (Allen et al. 2012).

Die drei Adjuvanzien, anti-IgM, CpG und Gardiquimod induzieren über distinkte immunmodulatorischen Eigenschaften (direkte B-Zell-Interaktion, TLR-9, TLR-7, respektive) eine B-Zell-Aktivierung (Romberg et al. 2013).

Bei der Evaluation der durch die beigefügten Zusätze differenzierten Subgruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede eruieren. Die Zugabe von Gardiquimod, CpG oder anti-IgM kann autoreaktive B-Zellen induzieren (Saadoun et al. 2013). In unserem Experiment zeigte sich jedoch kein unterschiedlicher Einfluss dieser Adjuvanzien auf die untersuchten Zellpopulationen bei nach Zugabe erhöhter Expression von CD69 und CD86.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass autoreaktive anti-snRNP Tg B-Zell-Proliferation durch die Präsenz von pDC signifikant proportional verstärkt wird. Ebenso zeigt sich eine gesteigerte Proliferation autoreaktiver B-Zellen bei Zugabe von Gardiquimod (Ding et al. 2009). Lediglich B-Zellen mit einfacher TACI-Mutation zeigen eine abgeschwächte Expression von CD86 und CD69 nach Stimulation durch anti-IgM, Gardiquimod oder CpG (Romberg et al. 2013). Diese kann bei den in unserer Untersuchung eingeschlossenen Probanden weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Insgesamt zeigt sich zwischen den einzelnen Gruppen kein Unterschied in der B-Zell Aktivierung nach Zugabe der Adjuvanzien.

6.2. DC

Die Aufnahme von Antigenen durch DC wird durch Fc-Rezeptoren, Integrine, C-Typ Lektine und Scavenger-Rezeptoren vermittelt (Sabado und Bhardwaj 2010). Der Oberflächenmarker CD83 wird auf DC stark exprimiert und wird in Zusammenhang gebracht mit bestimmten immunologischen Aktivierungswegen, die sowohl CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen stimulieren sollen, als auch eine wichtige Rolle in der B-Zell-Homöostase spielen (Ehlers et al. 2013).

Die Rekonstitution der DC beginnt etwa 2 bis 3 Wochen nach der Transplantation. Während sich die Zahlen der myeloiden DC schnell normalisieren, erreichen die Werte für pDC auch nach 12 Monaten in der Regel nicht die Ausgangshöhe (Storek et al. 2008). Dennoch wurde bisher kein Zusammenhang zwischen DC-Chimärismus und cGvHD gefunden (Pihusch et al. 2005), auch wenn es Evidenz dafür gibt, dass Empfänger-DC vom Empfänger abgeleitete Antigene den Spender T-Zellen präsentieren können und Spender-DC einen aktivierenden Effekt auf alloreaktive CD8⁺-T-Zellen haben können (Charrier et al. 2012). Nichtsdestotrotz kann eine komplette Depletion von Empfänger-DC, -pDC und -B-Zellen die Induktion einer GvHD nicht verhindern (Li et al. 2012).

Die Antigenpräsentation durch DC via MHC II ist nach aGvHD beeinträchtigt und kann zu einer gestörten Treg-Homöostase führen (Leveque-El moutie et al. 2016). Treg-vermitteltes, CTLA-4-abhängiges Herunterregulieren von CD80/86 auf DC hat inhibitorisches Potential bezüglich der Zellproliferation. Selektive Rekonstitution von Treg vor T-Zell-Transfer kann in allogenetischen HSCT-Modellen zu einer normalisierten DC-Kostimulation sowie zu einer Prävention von GvHD führen (Bolton et al. 2015). Aus murinem Knochenmark generierte δ -like ligand 4-positive DC können die GvHD-induzierenden Effekte von Spender T-Zellen vermindern (Mochizuki et al. 2016).

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit regulatorischen DC, welche sich auszeichnen durch eine geringe Expression von CD11c, CD40, CD80 und CD86, nach HSCT zu einem Anstieg Antigen-spezifischer CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen führen kann und damit erfolgreich eine kutane cGvHD vorbeugen kann, indem alloreaktive Tregs aus Spender-T-Zellen generiert werden (Fujita et al. 2007). Darüber hinaus kann experimentelle extrakorporale Photopherese die Anzahl an CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen erhöhen und die Krankheitsaktivität einer cGvHD modulieren (Capitini et al. 2011). Des Weiteren besteht keine Korrelation zwischen dem Genotyp des Spenders für einen (GT)n Polymorphismus im Promoter/Enhancer-Segment für Foxp3 und der Entstehung von

cGvHD (Noriega et al 2015).

Darüber hinaus hat sich IL-15 insofern als beachtungswürdiger Interaktionspartner im Rahmen der Erforschung der cGvHD erwiesen, als hohe Konzentrationen dieses Zytokins an Tag 7 nach HSCT mit einem signifikant geringeren Risiko für cGvHD korrelieren, wohingegen geringe Konzentrationen das Risiko für die Erkrankung erhöhen (Pratt et al. 2013). Gleichzeitig besitzt es das Potential, GvL-Effekte zu verstärken (Sauter et al. 2013). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass IL-15 aus DC als Modulator von Inflammation auftreten kann und in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen involviert ist (Ohteki et al. 2006).

DC-Untergruppen unterscheiden sich wie B-Lymphozyten durch charakteristische Antigen-Profile. Konventionelle und Vorläufer-DC sind beschrieben. Erstere exprimieren konventionelle CD13, CD33 und TLR2/4. pDC gehören den Vorläufer-DC an, sind CD11c^{int}, CD68⁺, CD303⁺, B220⁺, CD14⁻ und exprimieren TLR7/9 (Stenger et al. 2012; Hubo et al. 2013).

Die DC unserer Patientenpopulation wiesen einen distinkten Phänotyp mit einem verringerten Anteil von CD11c⁻ DC auf, was auf einen verringerten Anteil von pDC hinweisen könnte. Ein Einfluss auf oder durch B-Zellen hingegen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten in anderen DC-Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede eruiert werden.

CD11b⁻ CD11c⁺ Spender-pDC können eine Th1, CD4⁺ und Typ I CD8⁺ CTL (Zytotoxische T-Zelle)-Immupolarisation von Spender-T-Zellen verstärken und GvL-Effekte fördern, ohne dabei wiederum das Risiko einer GvHD zu erhöhen, wohingegen CD11b⁺ CD11c⁺-cDC eine Th2 und Typ II CD8⁺ CTL-Immupolarisation induzieren (Li et al. 2009). Dies komplementiert die Beobachtung, dass eine Zugabe von myeloiden oder CD11c^{high} Spender-pDC zum hämatopoietischen Graft in einer höheren Krankheitsintensität der GvHD resultiert (MacDonald et al. 2005) und eine Manipulation der Zusammensetzung der Spender-APCs in allogenetischen Maus-Modellen der HSCT einen Einfluss auf T-Zell-Immunität und GvL-, sowie GvHD-Effekte ausübt. Die experimentelle Depletion von Empfänger CD11⁺ DC kann eine GvHD nicht verhindern (Li et al. 2012). Stattdessen führt eine Transplantation von CD11b-depletierten Knochenmark-Grafts zu einer erhöhten Anzahl lienaler Spender- CD4⁺-Memory-T-Zellen, welche einen verstärkten GvL-Effekt vermitteln und zu einer erhöhten Ausschüttung von IFN γ im Empfänger führen (Li und Waller 2004).

Dennoch wurden Assoziationen zwischen erhöhten Anteilen von CD123⁺ CD4⁺ DC im Knochenmarks-Graft und einer verringerten Inzidenz von cGvHD, aber dafür einem erhöhten Auftreten von Rezidiven der Grunderkrankung, gefunden (Waller et al. 2001).

6.3. Apoptose

In den ersten 72 Stunden zeigten sich weder zwischen Patienten und Kontrollen, noch zwischen den einzelnen Zellpopulationen signifikanten Differenzen bezüglich Apoptose. Wir konnten erhöhte Apoptose bei naiven und non-switched Memory B-Zellen an Tag 5 beobachten. In den übrigen B-Zell-Subpopulationen konnten keine Unterschiede in der Apoptose festgestellt werden.

Bei den DC zeigte sich in der Patientenpopulation gegenüber den gesunden Kontrollprobanden eine geringere Rate an Apoptose.

Wir konnten keine Effekte von DC auf B-Zell-anhängige Signalwege beobachten, womöglich aufgrund der geringen Anzahl von CD11c⁻ regulatorischen DC als mögliche Mediatoren. In keiner der Subpopulationen sahen wir einen signifikanten Unterschied bezüglich der Zellzahlen zwischen der Patientengruppe und auto-allo. Dies weist auf einen fehlenden Effekt des DC-Ursprungs hin (in beiden Gruppen stammen die B-Zellen von den Patienten, die DC jeweils von Patienten bzw. Kontrollen).

6.4. BAFF

Auch heute noch ist die Rolle von BAFF in der Pathogenese der cGvHD nicht vollständig geklärt: BAFF könnte einerseits als Biomarker für B-Zell-Autoimmunität dienen, alternativ könnte BAFF auch ursächlich für die Entstehung der Autoimmunität verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen bezüglich des molekularen Verständnisses von BAFF-Konzentrationen lassen die Idee einer BAFF-vermittelten Aktivierung von AKT- und ERK-Signalwegen (Protein-Kinase B bzw. extracellular signal-regulated kinase) bei Patienten mit cGvHD als Möglichkeit in Erscheinung treten. Dies würde in einer verminderten Rate an B-Zell-Apoptose durch geringere Konzentrationen von antiapoptotischem Bim (Bcl-like protein 11) via NF- κ B-Signalweg führen (Allen et al. 2012; Doreau et al. 2009) und könnte damit einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige therapeutische Möglichkeiten darstellen.

In unserer Untersuchung stellt sich die Konzentration von BAFF in der nativen Messreihe

48 Stunden nach Kokultur in der Patientenpopulation signifikant höher als in der Kontrollpopulation dar. Lediglich bei der Zugabe von Gardiquimod zeigten sich 48 Stunden nach Kokultur signifikant erhöhte Werte im Vergleich zum nativen Setting, jedoch konnte dieser Effekt nur bei den Patienten nachgewiesen werden.

BAFF-Konzentrationen in Patienten mit klinischer Manifestation von cGvHD sind signifikant höher als in Patienten ohne Erkrankung (Kuzmina et al. 2013). Die BAFF/B-Zell-Ratio in transplantierten Patienten mit manifester cGvHD erreicht signifikant höhere Werte als in gesunden Empfängern beziehungsweise Spendern, was bedingt ist durch eine persistierende Erhöhung der BAFF-Konzentration und B-Lymphopenie, charakterisiert durch eine verzögerte Wiederherstellung der B-Zell-Homöostase und selektiven Mangel an naiven CD27⁺ B-Zellen (Sarantopoulos et al. 2009). Trotz dieser Erkenntnis kann ein Abfall der Konzentration an löslichem BAFF das klinische Ansprechen einer cGvHD vorhersagen (Fujii et al. 2008).

Eine gestörte B-Zell-Homöostase und verstärkt autoreaktive B-Zellen werden unter anderem durch Typ I IFN-produzierende DC und erhöhte Konzentrationen von BAFF vermittelt. Beides könnte beeinflusst werden durch in vitro-stimulierte pDC. Eine Manipulation des immunologischen Gleichgewichts durch gepulste oder stimulierte DC könnte einerseits nicht ohne Effekt auf eine bestehende Immun-Homöostase sein, im Gegenzug aber womöglich auch in therapeutischer Absicht zur Wiederherstellung derselben verwendet werden. Aktuell in Erprobung befindliche, spezifisch auf B-Zellen ausgerichtete Therapieansätze beinhalten anti-CD20, -CD22, -IL-12/23, -BAFF und -BAFF-receptor-3 Antikörper (Das et al. 2010), (Okamoto et al. 2015).

7. Zusammenfassung

B-Zellen und DC spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der cGvHD, einer schwerwiegenden Komplikation der HSCT. Diese Erkrankung ist charakterisiert durch eine immunologische Reaktion von Spender Immunzellen gegen Empfänger-Antigen. Die Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch zeigt die Rekonstitution von B-Zellen nach HSCT signifikante Gemeinsamkeiten mit der physiologischen Ontogenese.

Wir führten Immunphänotypisierung sowie Ko-Kultivierungs-Experimente mit B-Zellen und DC von pädiatrischen Patienten mit cGvHD sowie von gesunden Kontrollprobanden durch.

In unseren in-vitro Untersuchungen zeigte sich eine gestörte Homöostase der B-Zellen bei pädiatrischen Patienten mit cGvHD mit Zeichen einer verzögerten Rekonstitution des lymphatischen Teils des hämatopoietischen Systems und erhöhten Markern der B-Zell-Aktivierung. Bis zu 72 Stunden nach Kultivierung zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Erst zu den Messpunkten an Tag 4 und 5 konnte ein B-Zell-Phänotyp mit einer erhöhten Anzahl an Memory, Transitional, CD69⁺ und CD68⁺ bei Patienten mit cGvHD festgestellt werden. Weiterhin zeigt sich bei erhöhter Apoptose naiver B-Zellen auch ein verringerter Anteil naiver B-Zellen.

Auch bei den DC lässt sich ein verringerter CD11c⁻ Phänotyp mit verstärkter Apoptose in der Patientenpopulation beobachten.

Eine Wechselwirkung und insbesondere ein Einfluss von DC auf B-Zell-abhängige Signalwege konnte nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich der Konzentration von BAFF im Überstand zeigen sich zwischen den einzelnen Populationen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich scheint die Zugabe von Gardiquimod in der Patientengruppe zu erhöhten BAFF-Konzentrationen zu führen, was als Zeichen einer verstärkten Aktivierung gewertet werden kann.

Zusammenfassend zeigt sich eine gestörte B-Zell-Homöostase mit Zeichen einer verspäteten Rekonstitution bei pädiatrischen Patienten mit cGvHD. Des Weiteren geht dies einher mit erhöhten Markern für eine B-Zell-Aktivierung; DC-vermittelte Effekte scheinen keine Rolle zu spielen, womöglich einhergehend mit einer geringeren Zahl an regulatorischen DC (CD11c^{low}).

Kritisch zu bewerten in dieser Studie ist die geringe Anzahl an Patienten sowie eine inhomogene Kontrollgruppe mit deutlichen Altersunterschieden zur Patientenpopulation.

Eine optimale Kontrollgruppe würde ausschließlich aus Patienten nach HSCT ohne jegliche GvHD bestehen. Außerdem sind in der Patientengruppe unterschiedliche Stadien der cGvHD zu finden. Eine zeitliche Komponente der Verteilung der Zellpopulationen lässt sich mit der hier vorliegenden Querschnittsuntersuchung nicht eruieren. Darüber hinaus lässt sich mit einer Analyse von Zellpopulationen lediglich ein statisches Abbild mit eingeschränkter Aussage über funktionelle Zusammenhänge generieren. Dieser Problematik nahmen wir uns mit der Untersuchung von BAFF an, welches aber lediglich eines von unzähligen Elementen humoraler Signalwege darstellt.

In der Zukunft werden priorisiert größere klinische Studienpopulationen benötigt, um eine suffiziente und adäquate statistische Power zu erreichen. Anwendbare und validierte biologische Marker, die mit dem Ansprechen auf eine Therapie und der Prognose korrelieren, könnten die jetzige klinische Praxis positiv beeinflussen und das Ausmaß und die Bandbreite der therapeutischen Interventionsmöglichkeiten erweitern. Dafür ist es vonnöten, experimentelle Daten in ein klinisches Setting zu übersetzen, um hilfreiche Werkzeuge für das Risiko-Assessment der cGvHD und Ansprechen zu erlangen und dadurch auch neue Ansätze für Therapiestrategien zu gewinnen, was schlussendlich idealerweise zu verringerter Morbidität und verbesserter Prognose führen würde. Neueste Therapieansätze beinhalten zum Beispiel den selektiven Rho-associated kinase 2-Inhibitor KD025, welcher in multiplen Modellen über einen Stat3-abhängigen Signalweg eine cGvHD abschwächen konnte (Flynn et al. 2016). Des Weiteren kann das Monitoring der Kinetik der B-Zell-Rekonstitution nach Rituximab-Therapie beim Management von Steroid-refraktärer cGvHD helfen (DeFilipp et al. 2016). Auf B-Zell-abhängige Signalwege gerichtete Therapieansätze sollten weiterführend untersucht werden.

8. Anhang

Im Anhang werden, unabhängig von den vorausgegangenen Ausführungen, folgende zusätzlichen Abkürzungen verwendet:

abs.	absolut
Leuk.	Leukozyten
Lymph.	Lymphozyten
(n)BZ	(naive) B-Zellen
Mem	Memory
TZ	Transitionalzellen
AV	AnnexinV
sw	switched

8.1. Tabellen Zellzahlen

8.1.1. Vergleich Patienten mit Kontrollen

Tabelle 8-1 Leukozyten und Lymphozyten im Verlauf

	0h n. MACS						48h n. MACS					
	Patienten			Kontrollen			Patienten			Kontrollen		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk.(abs.)	16935.	9267.	24700.	22172.	23156.	9101.	4594.	2226.	5568.	6806.	6085.	3677.
	29	00	70	46	00	64	14	00	56	23	00	60
Lymph.(%)	98.34	98.60	1.06	98.92	99.30	1.04	93.53	92.00	3.66	95.98	97.40	5.06
	24h Kokultur						48h Kokultur					
Leuk.(abs.)	441.	152.	570.	532.	425.	448.	647.	229.	1133.	540.	522.	380.
	50	00	45	90	50	55	54	00	35	58	00	19
Lymph.(%)	89.65	91.45	9.57	94.71	97.15	7.29	92.15	95.00	7.42	97.19	98.30	2.92

Tabelle 8-2 Verlauf B-Zell-Subpopulationen

	0h n. MACS						48h n. MACS					
	Patienten			Kontrollen			Patienten			Kontrollen		
%	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
BZ	88.31	93.30	12.71	88.24	95.80	17.08	87.86	87.10	7.43	87.82	90.00	9.82
CD21lowCD38low	6.44	3.70	5.58	7.12	3.20	7.59	18.91	12.10	15.80	12.62	8.60	12.19
MemBZ	11.59	2.90	18.47	11.18	11.00	4.81	12.53	8.80	13.97	8.73	7.80	4.34
CD34+ MemBZ	15.73	14.40	9.11	14.19	8.90	18.26	28.01	20.10	28.82	27.84	17.00	26.84
Ki67+ MemBZ	13.07	11.70	7.68	11.80	7.90	13.29	21.11	20.70	17.94	15.23	7.20	16.21
BAFF-R+ MemBZ	92.30	94.50	7.27	92.81	99.90	25.39	66.57	87.50	43.27	81.38	94.00	22.26
reife nBZ	14.94	14.80	4.21	14.28	9.70	10.96	28.09	21.20	14.82	23.75	21.80	9.59
nBZ	63.50	71.50	24.19	59.31	58.50	12.24	53.73	57.70	22.48	56.68	57.10	10.66
CD34+ nBZ	5.26	1.70	9.69	3.88	2.60	5.42	3.71	2.00	4.30	9.38	6.40	8.76
Ki67+ nBZ	3.39	2.10	2.49	3.18	2.60	1.99	3.37	2.20	3.20	4.76	3.90	3.13
BAFF-R+ nBZ	98.61	99.60	2.28	99.60	99.90	0.78	75.16	98.60	38.83	86.78	98.40	22.14
TZ	4.79	1.50	6.60	3.86	2.80	4.28	.37	.20	.48	.72	.50	.76
CD34+ TZ	12.11	3.10	25.65	5.60	3.50	6.68	25.06	12.50	34.95	18.85	13.80	26.13
Ki67+ TZ	8.93	4.60	13.87	5.05	4.00	3.45	22.27	0.00	37.72	7.39	4.10	10.32
BAFF-R+ TZ	93.20	90.60	4.79	97.97	99.20	2.77	67.10	87.50	46.18	84.88	96.60	23.06
Plasmablasten	.16	.10	.14	.18	.10	.19	.01	.00	.04	.08	.00	.25
CD34+ BZ	6.39	3.70	9.30	5.95	4.10	8.35	7.16	3.50	9.40	12.37	9.40	10.36
Ki67+ BZ	4.01	2.50	3.74	4.28	3.40	3.50	4.51	4.30	4.24	5.68	4.80	4.53
BAFF-R+ BZ	96.67	97.60	3.84	99.24	99.80	1.69	72.01	96.40	43.27	84.39	96.70	21.67
CD21+ BZ	80.29	86.70	19.58	85.82	91.60	15.26	70.31	74.10	19.73	71.74	80.80	19.65
CD69+ BZ	2.11	2.10	1.38	1.68	1.30	1.31	12.90	11.00	9.96	5.40	4.40	2.88

Anhang

CD267+ BZ	4.17	4.60	2.70	4.99	3.70	4.80	3.99	2.20	4.78	3.38	2.60	2.26
CD27+ BZ	12.86	9.80	14.55	20.64	22.40	18.28	19.03	19.10	14.57	20.32	23.30	18.60
CD25+ BZ	18.13	5.10	34.65	3.57	2.20	2.89	12.00	7.90	12.87	5.27	4.40	3.16
CD86+ BZ	16.53	2.40	30.73	15.25	1.00	31.49	13.97	10.70	11.88	7.12	5.50	6.81

24h n. Kokulturr

48h n. Kokulturr

%	Patienten			Kontrollen			Patienten			Kontrollen		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
BZ	70.75	77.45	20.41	78.56	81.15	10.39	71.55	74.50	13.30	77.39	79.50	12.47
CD21lowCD38low	15.13	6.20	21.88	12.03	11.55	9.12	15.28	6.30	21.31	10.22	6.55	11.27
MemBZ	21.56	7.60	24.72	13.19	6.90	16.64	19.28	10.60	20.70	12.91	7.75	14.08
CD34+ MemBZ	39.30	26.80	35.32	29.24	18.95	31.55	48.32	40.85	40.25	27.85	16.05	29.86
Ki67+ MemBZ	29.52	19.60	31.24	26.04	19.75	24.63	33.74	19.30	33.40	25.91	20.70	25.17
BAFF-R+ MemBZ	69.84	84.60	35.89	74.24	89.65	31.33	77.51	90.20	27.39	77.49	92.90	26.73
reife nBZ	15.71	14.35	11.81	30.48	24.10	24.62	18.57	16.00	12.14	29.39	22.70	21.60
nBZ	43.68	50.65	27.50	43.04	48.35	22.37	44.24	53.45	24.89	45.17	48.65	22.50
CD34+ nBZ	6.04	1.15	18.76	2.47	.40	3.04	3.20	.95	4.22	4.79	1.60	13.90
Ki67+ nBZ	2.26	.85	2.87	5.11	4.30	5.57	2.84	1.55	3.26	5.00	2.90	6.67
BAFF-R+ nBZ	65.16	92.65	41.79	77.55	94.55	32.44	59.23	79.40	42.69	81.49	97.30	27.10
TZ	3.44	1.35	6.02	1.46	1.05	1.53	3.54	2.15	6.16	1.67	1.20	1.94
CD34+ TZ	31.66	15.50	36.78	24.20	0.00	33.68	36.58	25.40	39.65	32.18	23.35	35.69
CD34- TZ	37.27	22.90	39.68	54.64	69.50	42.32	45.57	53.55	41.70	52.43	57.25	39.89
Ki67+ TZ	20.51	0.00	33.23	17.48	0.00	29.69	29.14	9.60	35.82	28.41	2.80	36.12
Ki67- TZ	47.35	58.35	44.71	61.37	80.00	42.76	53.00	61.90	41.54	56.21	64.10	41.72
BAFF-R+ TZ	59.66	85.40	44.76	73.35	100.00	41.65	68.97	100.00	41.22	75.13	100.00	37.94
Plasmablasten	.08	.00	.23	.16	.00	.36	.09	.00	.23	.18	.00	.54
CD34+ BZ	24.77	8.95	30.65	13.74	6.40	21.04	20.89	12.65	25.22	10.46	6.55	14.26
Ki67+ BZ	16.95	6.05	22.76	9.42	5.35	11.59	15.31	7.20	18.22	9.16	6.60	11.32
BAFF-R+ BZ	69.94	88.55	32.78	76.64	91.95	28.64	73.56	87.90	27.00	81.60	93.65	22.74
CD21+ BZ	58.69	56.40	24.82	50.14	48.15	26.75	54.93	47.05	25.67	48.64	42.70	27.06
CD69+ BZ	36.58	31.20	19.71	23.96	24.35	12.15	39.52	34.85	23.21	29.17	25.95	15.45
CD267+ BZ	3.94	1.70	4.82	5.57	3.20	7.02	4.29	2.55	5.80	6.10	3.65	7.38
CD27+ BZ	24.01	22.40	16.14	25.83	22.80	17.79	20.71	18.60	16.94	24.04	22.90	14.33
CD25+ BZ	15.75	12.50	10.95	11.58	10.25	9.93	11.17	10.15	7.10	11.05	8.55	7.84
CD86+ BZ	24.82	17.20	19.03	12.38	11.00	6.70	27.85	19.00	21.04	15.68	14.30	9.70

Tabelle 8-3 Verlauf der Subpopulationen der DC

0h n. MACS

48h n. MACS

% (abs.)	Patienten			Kontrollen			Patienten			Kontrollen		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
DC (abs.)	2037.71	948.00	3242.90	1356.69	312.00	3122.43	527.29	461.00	491.56	368.00	222.00	490.81
CD86+ DC	19.49	3.80	31.59	14.28	4.80	25.52	34.99	26.90	27.81	26.92	19.80	21.40
CD45+ DC	63.84	68.70	29.39	71.05	77.20	24.12	47.41	46.00	24.25	69.07	76.10	22.26
CD83+ DC	83.57	92.60	15.18	77.55	79.50	15.43	91.11	91.10	7.44	75.19	81.60	18.25
CD80+ DC	35.71	25.40	21.87	34.45	31.70	22.01	55.57	50.90	20.52	37.88	34.50	19.65
IP10+ DC	65.73	66.70	23.94	47.36	38.70	30.34	77.83	72.40	20.09	54.53	52.90	23.47
HLA-DR+ DC	86.09	93.90	14.40	86.51	85.20	8.54	90.23	90.80	6.01	85.80	87.30	9.42
CD11c+ DC	79.27	77.40	7.21	81.87	78.80	8.09	81.19	88.30	15.90	82.48	83.80	9.47
CD11c- DC	20.73	22.60	7.21	18.13	21.20	8.09	20.10	11.70	14.61	18.29	16.20	8.77
CD274+ DC	4.87	4.00	3.99	7.70	1.90	12.72	54.33	52.10	6.11	43.70	44.50	20.22

Anhang

CCR7+ DC	15.63	10.50	17.95	20.32	7.90	22.32	35.96	31.70	26.51	36.11	27.40	23.26
	24h n. Kokultur						48h n. Kokultur					
DC (abs.)	70.43	55.50	53.40	75.56	54.50	58.99	89.57	58.50	88.78	73.50	62.50	53.20
CD86+ DC	27.38	24.90	17.93	26.28	26.10	18.07	23.26	17.60	15.61	19.04	14.50	14.49
CD45+ DC	40.70	41.95	18.72	46.68	47.70	21.65	37.07	35.30	17.15	46.08	52.00	22.80
CD83+ DC	86.15	90.50	14.54	82.60	85.95	12.36	81.95	88.75	20.42	78.03	78.45	15.89
CD80+ DC	57.39	61.70	25.46	51.50	49.10	18.85	56.88	57.55	21.89	48.38	42.80	21.16
IP10+ DC	68.08	67.05	16.23	62.53	60.45	16.61	66.62	70.30	22.10	61.58	60.40	18.29
HLA-DR+ DC	71.14	69.75	12.94	75.44	75.00	10.18	69.28	72.05	21.06	73.81	75.35	12.18
CD11c+ DC	55.31	51.45	19.14	53.02	54.40	15.26	53.08	60.30	26.32	45.62	43.00	18.07
CD11c- DC	44.69	48.55	80.86	46.98	45.60	84.74	46.92	39.70	73.68	54.38	57.00	81.93
CD274+ DC	47.45	40.45	29.66	43.25	40.95	22.09	41.69	36.95	27.14	39.13	34.80	21.24
CCR7+ DC	42.98	32.15	32.19	42.56	39.45	28.38	41.91	39.30	31.15	35.83	32.80	24.25

Tabelle 8-4 Verlauf der DC-B-Zell-Ratio

	0h n. MACS						48h n. MACS					
	Patienten			Kontrollen			Patienten			Kontrollen		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
DC/BZ	18.97	1.85	41.99	9.51	.14	30.09	75.76	49.25	88.10	20.46	6.66	37.67
	24h n. Kokultur						48h n. Kokultur					
DC/BZ	4.18	.31	13.37	.50	.19	1.52	.72	.38	.75	.33	.20	.44

8.1.2. Kokulturen

Tabelle 8-5 Verlauf der Leukozyten und Lymphozyten

	24h n. Kokultur								
	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	365.29	241.50	363.82	549.61	345.50	497.39	428.62	437.00	117.32
Lymph.(%)	94.02	96.50	6.22	91.22	96.80	12.98	97.59	97.60	0.92
	48h n. Kokultur								
	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	706.89	281.00	1109.86	845.96	553.00	961.46	396.08	385.50	171.50
Lymph.(%)	95.78	96.90	3.23	92.79	96.90	10.28	97.10	97.30	1.70

Tabelle 8-6 Verlauf der B-Zell-Subpopulationen

%	24h n. Kokultur								
	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
BZ	76.98	81.10	12.28	72.96	83.15	25.49	72.13	79.40	19.99
CD21lowCD38low	10.20	6.75	11.40	17.92	13.35	16.87	11.58	9.75	9.78
MemBZ	20.28	10.50	20.85	18.72	10.30	20.80	9.31	5.90	7.24
CD34+ MemBZ	45.26	31.20	36.91	46.31	34.65	37.31	9.00	5.05	10.31
Ki67+ MemBZ	35.41	29.20	28.42	39.41	29.60	34.96	12.58	9.80	13.01

Anhang

BAFF-R+ MemBZ	65.81	80.90	35.47	76.33	89.35	33.97	78.83	91.65	24.66
reife nBZ	17.21	18.85	10.14	24.86	27.45	12.81	38.02	20.95	31.12
nBZ	44.69	52.10	23.04	41.69	47.45	20.89	42.12	47.20	24.49
CD34+ nBZ	3.22	2.35	3.13	5.39	2.90	10.80	2.33	0.75	2.83
Ki67+ nBZ	3.21	2.40	4.30	3.53	3.30	3.72	5.25	3.60	4.95
BAFF-R+ nBZ	64.88	93.05	41.55	69.92	88.90	37.00	90.38	100.00	15.15
TZ	2.27	1.30	1.98	1.32	0.80	1.57	1.26	1.25	1.30
CD34+ TZ	35.72	30.30	37.18	23.24	5.00	29.74	12.52	.00	17.75
Ki67+ TZ	14.53	.00	24.11	11.76	.00	23.64	8.90	.00	14.65
Ki67- TZ	74.76	100.00	35.36	56.10	81.95	45.13	61.93	72.35	42.76
BAFF-R+ TZ	68.23	100.00	42.77	61.47	95.45	47.26	59.18	84.50	45.41
BAFF-R- TZ	21.05	.00	36.12	6.39	.00	19.95	11.65	.00	24.81
Plasmablasten	.15	.00	.31	.27	.00	1.17	.28	.00	.56
CD34+ BZ	28.31	9.00	33.55	21.06	8.90	28.24	4.26	2.35	4.17
Ki67+ BZ	19.18	6.80	22.23	15.87	6.80	23.17	4.08	2.95	2.48
BAFF-R+ BZ	69.53	87.10	34.08	69.51	84.05	34.08	86.21	94.60	16.57
CD21+ BZ	64.25	64.75	23.14	51.99	54.70	26.88	42.98	37.20	22.38
CD69+ BZ	33.86	26.50	22.14	26.00	23.55	14.66	23.23	21.20	10.97
CD267+ BZ	3.80	2.40	3.90	3.43	1.45	4.46	5.26	5.00	3.69
CD27+ BZ	24.32	25.15	17.85	22.96	24.05	16.40	29.60	27.30	14.15
CD25+ BZ	15.54	12.10	13.59	14.01	13.35	8.71	7.95	8.00	3.57
CD86+ BZ	23.21	15.40	22.99	11.52	11.65	6.87	11.82	11.70	3.16

48h n. Kokultur

%	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
BZ	74.82	80.60	13.61	76.73	83.90	18.31	74.75	84.15	22.51
CD21lowCD38low	10.96	7.50	11.14	14.48	11.55	12.17	14.43	5.00	18.59
MemBZ	14.40	11.50	12.37	9.26	5.35	10.98	11.85	6.95	14.36
CD34+ MemBZ	50.36	48.95	37.13	36.33	28.25	33.31	12.35	11.55	9.92
Ki67+ MemBZ	36.10	35.15	28.74	29.62	18.10	30.71	15.95	13.60	12.32
BAFF-R+ MemBZ	71.58	84.30	28.41	71.49	95.20	39.27	83.61	96.65	24.96
reife nBZ	19.51	19.25	10.25	25.91	23.80	14.15	34.30	19.20	32.13
nBZ	46.30	45.50	15.84	48.17	45.70	15.52	40.78	49.40	27.28
CD34+ nBZ	3.60	2.50	3.79	3.21	2.00	4.91	2.26	.65	2.66
Ki67+ nBZ	3.63	2.55	3.53	5.16	2.15	10.16	5.44	3.60	6.66
BAFF-R+ nBZ	67.58	93.15	38.03	72.13	93.05	35.96	89.53	100.00	21.53
TZ	2.74	2.80	1.85	2.14	1.05	3.42	1.68	1.30	1.70
CD34+ TZ	32.96	19.10	35.54	26.06	15.65	32.15	11.46	.00	24.24
Ki67+ TZ	24.79	13.05	31.50	19.00	6.70	30.25	14.03	.00	23.49
Ki67- TZ	68.07	75.00	36.24	59.57	80.40	42.62	56.80	75.00	43.05
BAFF-R+ TZ	74.38	86.60	31.57	72.44	100.00	41.22	68.17	95.00	44.98
BAFF-R- TZ	18.48	.00	24.14	6.13	.00	15.02	2.66	.00	5.42
Plasmablasten	.15	.00	0.31	.18	.00	.43	.26	.00	.48
CD34+ BZ	19.15	13.05	21.19	11.70	10.35	11.36	4.48	2.50	4.41
Ki67+ BZ	13.75	8.15	16.86	8.33	5.45	8.42	5.06	4.30	2.84
BAFF-R+ BZ	72.80	85.60	27.15	72.82	89.15	31.78	90.50	96.65	12.87
CD21+ BZ	59.52	52.50	24.53	47.53	42.00	26.25	41.21	39.85	20.78
CD69+ BZ	36.63	31.95	23.55	26.01	21.70	14.62	29.73	23.75	20.00
CD267+ BZ	4.09	2.70	3.89	4.38	2.05	5.94	6.15	4.40	5.17
CD27+ BZ	22.49	22.40	16.35	18.76	18.20	14.09	26.92	22.85	11.77
CD25+ BZ	11.30	10.95	5.53	11.47	11.05	5.55	7.08	6.60	2.94
CD86+ BZ	25.16	13.65	23.40	15.79	12.90	10.70	15.36	17.00	5.57

Tabelle 8-7 Verlauf der DC-Subpopulationen

24h n. Kokultur

% (abs.)	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
DC (abs.)	36.61	34.00	27.61	60.25	55.00	45.39	47.13	47.00	19.84
CD86+ DC	22.94	21.55	15.46	25.53	17.70	18.60	23.95	23.85	16.53

Anhang

CD45+ DC	53.66	56.50	22.06	67.28	65.45	16.89	64.74	64.55	12.75
CD83+ DC	85.31	88.70	13.23	82.79	90.25	21.60	75.80	80.30	19.74
CD80+ DC	55.10	54.85	24.31	53.38	51.00	25.09	49.21	51.45	14.07
IP10+ DC	69.03	71.35	15.59	62.19	68.15	24.39	54.17	52.55	17.41
CD11c+ DC	44.75	49.00	18.61	52.93	52.85	18.52	46.76	49.00	15.75
CD11c- DC	51.68	50.00	19.29	47.07	47.15	18.52	53.24	51.00	15.75
HLA-DR+ DC	78.74	85.30	24.81	84.70	87.05	14.67	87.52	88.35	6.35
HLA-DR- DC	17.76	14.45	19.72	15.30	12.95	14.67	12.48	11.65	6.35
CD274+ DC	36.00	27.80	25.96	41.55	38.90	21.02	39.96	43.05	14.26
CD274- DC	60.43	68.35	27.65	58.45	61.10	21.02	60.04	56.95	14.26
CCR7+ DC	28.30	23.20	25.83	42.71	38.50	26.67	45.42	45.15	22.59

48h n. Kokultur

%	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
DC (abs.)	48.07	39.00	37.87	63.57	61.50	50.07	51.75	50.50	18.31
CD86+ DC	25.23	23.95	17.70	24.08	20.05	16.18	17.48	11.55	14.37
CD45+ DC	68.84	70.20	13.46	68.24	72.00	20.11	62.28	64.80	11.42
CD83+ DC	83.62	83.30	11.36	82.88	88.70	16.34	72.78	72.95	16.98
CD80+ DC	56.50	53.05	22.51	53.59	51.25	23.32	46.95	47.25	17.12
IP10+ DC	69.15	69.05	16.37	67.30	69.70	20.64	56.73	51.55	14.71
CD11c+ DC	57.22	59.05	15.60	52.79	50.40	24.07	40.78	39.40	17.50
CD11c- DC	42.78	40.95	15.60	47.21	49.60	24.07	59.22	60.60	17.50
HLA-DR+ DC	85.67	91.35	13.86	89.04	91.35	12.55	81.44	82.50	9.72
HLA-DR- DC	14.33	8.65	13.86	10.96	8.65	12.55	18.64	17.50	9.69
CD274+ DC	45.40	40.70	20.96	44.21	38.45	22.54	30.98	23.80	14.59
CD274- DC	54.60	59.30	20.96	55.79	61.55	22.54	69.02	76.20	14.59
CCR7+ DC	39.76	40.25	24.32	46.58	44.65	29.17	36.15	43.90	20.10

8.1.3. Zusätze

Tabelle 8-8 Verlauf der Leukozyten und Lymphozyten

	24h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	579.57	184.00	753.56	429.29	212.00	562.26	381.43	121.00	583.98	375.71	158.00	455.67 P
	524.46	389.00	412.67	536.54	451.00	416.14	485.85	454.00	381.11	584.77	430.00	600.82 K
Lymph.(%)	88.77	94.40	13.73	90.93	91.10	5.28	89.14	95.20	12.30	89.74	89.90	6.45
	95.08	97.10	6.42	94.00	97.20	10.68	95.21	97.20	5.10	94.56	97.10	6.58
	48h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	516.14	259.00	805.87	521.8 6	258.00	659.12	795.43	219.00	1527. 66	756.71	138.00	1511.49 P
	597.15	612.00	372.49	480.8 5	329.00	341.27	526.69	428.00	384.6 7	557.62	517.00	450.86 K
Lymph.(%)	89.79	89.90	8.66	93.53	95.10	6.96	91.50	93.20	8.82	93.79	95.00	5.86
	97.39	98.30	2.45	96.92	98.00	3.61	96.87	98.30	3.37	97.57	98.40	2.33

Tabelle 8-9 Verlauf der B-Zell-Subpopulationen

%	24h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
BZ	64.50	78.60	31.12	75.10	76.80	14.77	72.20	78.10	16.70	71.19	75.80	18.42 P
	78.15	82.70	10.80	78.66	80.80	11.50	79.39	83.90	11.04	78.04	79.10	9.30 K
CD21lowCD38low	18.01	13.60	18.67	11.27	5.60	18.59	15.77	4.80	26.02	15.47	6.10	27.48
	10.95	10.10	7.57	10.38	9.90	7.88	13.71	13.00	10.12	13.09	11.80	11.12
MemBZ	13.77	4.00	17.49	20.99	7.60	24.58	24.86	21.00	25.98	26.61	7.60	32.43
	11.00	5.10	13.63	14.52	7.50	19.17	13.58	6.80	17.33	13.65	5.30	17.78

Anhang

CD34+ MemBZ	35.01	33.30	28.21	43.87	22.60	39.93	37.41	25.00	40.96	40.91	28.60	38.63
	20.31	.00	31.01	32.56	26.90	28.68	31.18	25.00	32.54	32.92	20.00	35.64
Ki67+ MemBZ	19.21	2.70	24.63	35.10	16.70	32.33	32.83	22.50	38.18	30.94	24.20	33.26
	22.27	18.80	21.26	24.89	19.50	22.04	27.54	22.20	27.52	29.45	20.00	29.20
BAFF-R+ MemBZ	67.76	90.90	46.45	72.96	84.60	34.10	67.53	84.20	35.25	71.13	77.80	34.77
	74.83	90.00	31.06	80.40	96.00	30.88	73.31	84.60	28.05	68.43	81.20	37.25
reife nBZ	13.04	13.60	10.19	13.63	14.00	10.69	21.56	22.00	15.67	14.60	14.10	10.48
	30.88	22.50	25.77	28.14	26.00	23.46	30.33	25.60	23.99	32.56	24.00	27.83
nBZ	51.31	51.30	25.24	41.67	50.00	25.90	39.14	31.00	31.56	42.59	52.20	31.65
	45.36	51.80	24.11	42.90	48.90	23.43	43.29	47.40	21.77	40.61	45.30	22.58
CD34+ nBZ	1.67	.00	2.20	2.70	2.30	2.91	.86	.00	1.47	18.91	3.80	36.16
	2.93	.20	3.83	2.25	.40	2.87	2.21	.40	2.95	2.49	2.00	2.73
Ki67+ nBZ	1.23	.00	1.87	4.24	5.20	4.40	1.44	.00	1.88	2.11	2.90	2.02
	5.28	3.70	5.50	7.38	5.10	7.56	3.19	3.80	2.68	4.58	5.10	5.21
BAFF-R+ nBZ	67.70	91.90	45.16	60.99	83.80	44.86	67.51	93.40	42.25	64.46	93.80	44.57
	80.38	97.40	31.05	76.84	91.70	31.01	79.05	99.50	31.52	73.95	90.40	39.06
TZ	6.91	2.00	10.35	2.44	2.00	2.33	1.64	.50	2.40	2.76	1.10	5.04
	1.69	1.40	1.23	1.19	.50	1.52	1.66	.70	2.08	1.31	1.10	1.26
CD34+ TZ	38.73	40.00	33.23	42.13	46.40	40.35	19.53	.00	36.54	26.26	7.10	40.36
	24.15	.00	34.17	30.37	14.30	41.25	19.31	.00	31.11	22.98	15.80	30.25
Ki67+ TZ	17.46	.00	37.33	26.19	21.40	27.90	18.33	.00	36.78	20.06	.00	37.29
	15.53	.00	30.70	24.70	13.30	35.80	12.04	.00	28.70	17.63	19.20	24.64
BAFF-R+ TZ	75.20	88.90	37.58	67.26	87.50	46.42	51.43	60.00	50.14	44.76	33.30	47.41
	79.28	100.00	37.65	73.51	100.00	42.76	76.92	100.00	43.85	63.70	80.00	45.29
Plasmablasten	.06	.00	.10	.14	.00	.38	.10	.00	.26	.00	.00	.00
	.09	.00	0.17	0.32	0.00	0.55	0.13	.00	.36	.12	.00	.26
CD34+ BZ	16.69	9.10	16.49	29.70	10.90	36.03	26.79	4.80	37.48	25.91	6.80	33.80
	11.42	6.40	19.70	15.89	8.20	22.57	13.34	6.20	20.37	14.30	6.40	23.63
Ki67+ BZ	7.36	3.70	8.96	22.79	11.10	25.82	21.40	5.70	29.98	16.26	4.50	22.67
	7.48	4.30	9.20	11.42	6.50	12.95	8.64	5.60	9.76	10.14	4.70	14.62
BAFF-R+ BZ	68.54	88.50	34.71	69.21	78.70	34.51	71.81	90.00	35.19	70.19	88.60	34.55
	76.65	92.30	30.72	76.17	94.30	29.60	75.22	87.90	28.55	78.53	92.60	29.08
CD21+ BZ	55.56	50.00	24.86	55.81	51.00	27.95	60.86	56.00	25.56	62.54	63.70	25.97
	51.06	49.50	28.07	49.15	45.40	26.01	51.02	51.40	26.30	49.32	46.60	29.71
CD69+ BZ	31.30	26.60	19.68	46.04	53.40	14.43	34.70	23.80	22.18	34.29	23.10	22.67
	17.78	18.40	8.05	28.81	28.60	13.83	21.87	23.30	10.94	27.37	29.90	12.92
CD267+ BZ	2.70	1.50	2.95	5.37	2.20	6.06	3.01	1.10	4.18	4.66	1.70	6.00
	4.49	3.40	3.32	6.02	2.30	8.24	4.51	2.90	4.87	7.25	3.40	10.06
CD27+ BZ	27.84	31.20	18.21	20.49	22.20	14.38	18.99	20.30	14.92	28.73	38.50	18.00
	23.65	20.80	13.91	29.63	28.20	21.40	24.61	23.30	17.02	25.45	20.70	19.55
CD25+ BZ	17.93	10.80	17.35	16.53	14.10	7.07	11.57	10.10	7.12	16.97	14.20	10.48
	10.70	11.50	4.44	15.51	10.10	17.42	9.67	9.40	4.40	10.45	9.50	7.34
CD86+ BZ	23.43	15.50	20.89	27.91	29.60	12.45	22.31	12.50	23.63	25.61	15.40	21.42
	10.58	10.40	3.92	14.57	14.60	9.01	10.54	10.10	4.81	13.84	13.40	7.53
							48h n. Kokultur					
B-Zellen	73.16	75.80	13.49	68.00	74.20	15.43	68.76	66.30	11.92	76.27	80.30	13.44
	76.45	77.80	12.94	75.81	80.80	15.09	78.67	80.80	9.98	78.65	79.50	12.62
CD21lowCD38low	16.39	8.00	22.75	16.51	7.10	24.12	14.66	5.00	24.40	13.57	4.50	18.50
	11.88	8.60	13.19	12.64	4.70	15.74	9.47	6.80	7.81	6.90	5.60	5.91
MemBZ	16.71	7.10	18.05	19.10	9.10	20.26	20.53	12.30	23.28	20.76	8.00	25.27
	11.97	6.00	15.92	14.88	8.30	18.33	14.68	11.70	13.71	10.09	7.30	6.95
CD34+ MemBZ	55.40	82.70	50.63	56.01	41.70	34.36	39.63	20.00	39.81	42.23	33.30	41.26
	27.61	12.50	31.68	29.27	22.20	30.77	26.56	14.30	31.62	27.98	18.20	28.89
Ki67+ MemBZ	42.71	41.30	41.36	44.19	40.00	35.54	21.74	14.30	26.42	26.33	8.30	29.93
	26.22	20.00	26.32	27.05	23.00	26.58	24.71	15.40	26.75	25.67	18.30	23.96
BAFF-R+ MemBZ	88.39	98.30	20.23	81.01	100.00	26.00	76.11	75.00	21.81	64.53	85.70	38.26
	74.53	93.50	33.16	77.61	94.20	29.71	79.97	96.70	23.58	77.84	89.60	21.98
reife nBZ	20.19	20.50	10.14	20.27	17.40	13.03	14.20	6.40	11.80	19.63	16.00	14.88
	32.25	23.60	22.78	25.53	22.50	18.65	29.11	20.50	21.26	30.67	20.30	25.26

Anhang

nBZ	47.13	55.60	25.81	41.94	55.40	25.92	46.90	51.50	25.36	40.99	50.90	27.76
	46.03	48.90	27.43	45.52	49.10	19.62	45.81	49.60	22.44	43.32	45.60	22.49
CD34+ nBZ	4.76	1.00	6.10	3.40	1.30	3.99	2.93	1.00	3.75	1.70	.00	2.71
	10.77	2.40	27.03	3.77	2.40	4.24	1.98	.40	2.84	2.66	.60	3.40
Ki67+ nBZ	1.87	1.50	2.84	3.59	3.50	3.35	3.44	1.80	3.82	2.44	.00	3.41
	3.22	.80	4.65	5.78	2.90	9.11	5.98	3.90	7.52	5.03	4.00	4.78
BAFF-R+ nBZ	69.14	94.80	41.38	51.33	31.30	46.43	67.77	92.70	42.41	48.67	27.80	46.17
	79.75	100.00	32.35	76.30	92.10	31.20	83.68	97.10	25.36	86.23	99.40	19.92
TZ	1.71	1.00	2.29	2.93	3.60	2.49	5.64	2.00	10.93	3.89	2.40	5.48
	1.06	.80	.98	2.08	1.00	2.82	1.18	.70	1.28	2.35	1.50	2.01
CD34+ TZ	19.76	.00	37.42	42.21	41.50	34.26	36.09	9.70	46.22	48.24	33.30	42.87
	26.80	30.80	28.00	36.75	21.70	43.05	31.86	16.70	41.64	33.33	30.80	31.42
Ki67+ TZ	16.90	.00	28.39	34.49	20.00	38.03	32.06	6.50	41.46	33.11	17.60	39.59
	18.56	.00	26.31	27.36	.00	38.69	35.34	15.40	42.52	32.38	20.00	37.06
BAFF-R+ TZ	39.04	33.30	44.79	80.00	100.00	38.30	75.30	100.00	37.57	81.54	100.00	36.63
	68.05	88.50	41.50	72.08	100.00	43.33	81.35	100.00	36.65	79.05	100.00	32.42
Plasmablasten	.21	.00	.41	.09	.00	.19	.04	.00	.11	.01	.00	.04
	.29	.00	.94	.17	.00	.36	.18	.00	.40	.08	.00	.22
CD34+ BZ	20.70	12.80	27.43	23.99	14.70	22.79	18.16	8.60	25.39	20.71	12.50	30.43
	13.13	7.20	23.70	10.98	8.40	11.02	8.06	4.40	9.41	9.65	5.90	8.80
Ki67+ BZ	14.66	3.90	22.02	16.30	13.00	15.10	14.19	7.10	18.80	16.11	8.80	20.57
	10.02	4.80	20.17	8.25	6.60	6.37	8.83	6.80	7.69	9.54	10.20	6.04
BAFF-R+ BZ	76.70	89.90	26.37	70.69	93.90	33.16	75.00	85.90	26.54	71.84	84.10	27.45
	82.40	96.90	23.25	80.20	94.00	25.73	81.13	91.20	23.57	82.66	93.30	20.87
CD21+ BZ	57.87	46.70	28.46	54.51	46.90	30.02	51.41	44.50	24.93	55.93	51.20	24.62
	47.35	41.90	27.67	51.78	47.50	27.32	49.30	42.40	29.59	46.15	40.70	26.55
CD69+ BZ	35.96	22.40	28.97	54.64	60.20	18.67	32.91	35.90	23.17	34.57	33.80	18.42
	22.60	22.40	13.04	37.63	37.40	14.14	26.72	22.90	19.85	29.74	25.70	10.93
CD267+ BZ	3.50	4.00	2.15	6.80	4.60	8.64	5.03	1.10	7.24	1.83	1.70	1.99
	3.71	2.90	3.34	6.96	4.10	8.12	5.24	3.90	3.24	8.51	2.60	11.39
CD27+ BZ	24.21	24.00	16.40	27.84	28.40	23.08	15.53	17.00	13.22	15.24	14.90	13.22
	22.61	21.90	12.08	28.72	28.90	16.51	19.28	17.10	11.66	25.57	22.70	16.29
CD25+ BZ	13.94	11.20	7.29	14.39	11.90	8.88	7.83	7.40	6.42	8.51	8.30	3.40
	10.45	8.60	7.15	13.48	11.20	11.50	8.79	8.10	4.56	11.46	8.10	6.66
CD86+ BZ	29.60	17.00	29.91	35.11	28.20	25.15	21.06	16.10	11.37	25.64	21.80	14.54
	15.42	15.10	10.43	20.96	20.00	12.99	12.19	9.80	5.95	14.13	15.60	6.35

Tabelle 8-10 Verlauf der DC-Subpopulationen

%	24h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
DC (abs.)	82.86	55.00	57.79	91.29	57.00	80.64	52.86	37.00	30.85	54.71	54.00	26.49 P
	75.31	62.00	52.47	63.69	52.00	34.48	59.77	44.00	30.73	103.46	87.00	92.93 K
CD86+ DC	28.04	25.70	18.39	28.07	18.40	18.56	25.37	14.90	22.44	28.01	28.60	15.97
	26.11	28.60	16.43	26.72	31.20	18.69	29.49	16.00	22.03	22.82	17.30	16.09
CD45+ DC	35.37	36.80	19.47	47.57	47.00	16.25	42.34	46.30	22.00	37.50	38.90	18.62
	49.67	47.60	19.37	56.35	61.50	22.79	46.04	48.50	20.31	34.68	34.60	20.41
CD83+ DC	86.53	90.30	13.91	88.31	92.20	15.26	86.57	86.50	13.33	83.17	89.50	18.20
	76.53	78.60	14.10	86.60	86.80	9.20	81.12	87.10	13.48	86.15	88.10	10.51
CD80+ DC	59.14	61.90	28.71	53.40	61.50	30.39	57.09	61.10	25.19	59.93	62.50	22.49
	53.06	48.70	21.23	45.83	40.50	20.12	51.76	48.60	17.68	55.33	58.60	16.97
IP10+ DC	68.34	71.00	17.38	69.91	67.40	17.62	66.81	66.70	16.36	67.23	64.80	17.27
	59.26	56.90	16.76	67.10	64.90	14.66	61.16	58.70	17.80	62.59	62.10	18.00
CD11c+ DC	54.36	47.00	21.07	49.57	47.40	13.49	62.19	54.80	24.54	55.11	57.00	18.03
	58.43	57.30	13.54	48.04	51.20	15.99	53.57	50.00	17.69	52.05	53.90	13.34
HLA-DR+ DC	77.54	69.60	16.46	86.11	84.20	10.40	83.37	84.60	13.66	88.27	83.50	10.39
	84.48	84.00	7.18	82.94	86.50	10.62	83.29	84.40	13.89	84.30	88.60	17.87
CD274+ DC	45.64	38.50	25.89	46.24	50.00	26.22	48.24	20.50	39.39	49.69	35.40	32.22
	48.16	51.10	22.64	35.22	34.50	16.81	45.82	40.60	27.01	43.81	42.90	21.12

Anhang

CCR7+ DC	36.11	23.90	31.88	40.04	34.00	27.42	48.79	25.90	39.42	46.96	39.50	34.90
	39.68	44.40	28.87	40.62	36.80	20.19	43.94	28.00	34.98	46.01	42.10	30.51
48h n. Kokultur												
DC (abs.)	114.43	61.00	145.65	86.43	59.00	58.61	85.70	53.00	88.45	71.71	57.00	43.32
	77.00	82.00	37.66	64.46	53.00	34.38	57.77	52.00	25.16	94.77	72.00	89.09
CD86+ DC	24.90	19.00	13.11	17.56	8.60	18.25	26.11	19.70	14.63	24.47	16.70	18.02
	21.82	19.00	13.52	14.68	13.80	14.68	18.92	11.40	15.07	20.76	14.70	15.34
CD45+ DC	33.80	30.20	17.25	37.76	40.00	21.04	37.53	34.20	15.28	39.20	39.50	18.21
	42.46	42.90	19.80	56.52	64.90	29.12	41.75	52.60	20.68	43.59	51.40	19.55
CD83+ DC	74.79	82.10	30.83	90.74	92.50	9.83	81.03	86.80	19.91	81.24	81.50	16.75
	74.95	76.70	21.73	81.17	82.80	12.88	75.87	77.20	16.20	80.12	80.50	11.88
CD80+ DC	58.87	62.50	27.74	56.89	56.20	21.31	56.16	57.70	22.98	55.59	57.40	19.95
	52.43	57.90	22.90	35.92	31.50	20.38	53.24	42.60	20.53	51.95	46.20	17.76
IP10+ DC	60.69	67.90	25.55	73.10	75.00	20.88	65.94	77.40	22.50	66.74	64.50	22.65
	61.12	62.90	20.04	65.74	61.10	17.37	60.89	61.60	19.19	58.58	54.70	17.92
CD11c+ DC	57.11	73.50	33.55	50.20	37.50	28.20	58.96	66.70	26.52	46.04	44.00	19.13
	52.45	52.40	16.82	43.47	39.50	22.89	43.24	41.80	15.84	43.32	42.90	16.22
HLA-DR+ DC	72.50	85.30	35.35	88.79	88.90	8.09	87.20	87.80	7.58	87.11	84.40	8.05
	86.42	86.40	10.47	88.68	92.00	8.25	83.78	84.00	9.81	87.24	91.00	10.34
CD274+ DC	41.56	41.20	29.30	41.53	28.70	27.33	44.17	39.00	28.86	39.50	36.40	29.38
	44.92	42.90	18.44	36.95	36.00	24.53	37.78	32.30	17.20	36.86	31.60	25.12
CCR7+ DC	37.74	44.10	34.24	41.61	35.70	31.12	48.63	46.70	33.67	39.66	40.30	31.83
	38.70	25.00	27.53	33.56	32.30	24.37	33.89	35.70	21.36	37.18	33.30	25.89

Tabelle 8-11 DC-B-Zell-Ratio

	24h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
DC/BZ	5,81	0,54	11,08	5,49	0,50	10,19	4,82	0,39	10,71	2,80	0,58	5,83
	0,96	0,27	2,35	4,85	0,28	16,26	0,56	0,21	0,95	1,28	0,41	2,51
48h Kokultur												
DC/BZ	0,80	0,57	0,58	1,08	0,66	1,27	1,29	1,55	0,97	1,69	1,85	1,63
	0,32	0,35	0,15	15,74	0,28	55,36	0,45	0,33	0,32	0,62	0,32	0,63

8.1.4. Apoptose

Tabelle 8-12 Verlauf der Populationen im Apoptose-Tube

%	48h n. MACS						48h n. Kokultur					
	Patienten			Kontrollen			Patienten			Kontrollen		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	me- dian	σ	mean	me- dian	σ
Leuk. (abs.)	6662.43	3677.00	9463.05	7057.00	7005.00	4428.90	544.63	214.00	793.09	504.54	448.50	317.49
Lymph.	95.80	97.10	3.10	97.45	99.40	5.58	90.85	95.40	12.57	96.07	97.15	3.99
BZ	83.46	91.70	18.88	84.06	87.30	13.61	78.85	81.95	17.24	73.66	75.40	17.86
nBZ	57.69	54.20	8.71	54.21	54.10	11.98	40.64	37.50	22.30	42.19	40.30	12.76
BAFF-R+ nBZ	93.91	96.90	8.54	97.73	98.60	2.22	95.98	98.20	4.55	97.10	97.95	3.56
AV+ nBZ	44.79	35.40	36.47	43.83	47.40	32.03	36.92	12.05	39.57	25.57	9.20	31.67
AV+ BAFF- R- nBZ	4.59	1.60	5.71	1.88	1.90	1.71	3.03	.25	4.88	2.50	1.05	3.22
AV+ BAFF- R+ nBZ	48.71	44.70	33.22	47.59	45.60	31.45	36.06	13.30	37.15	25.94	11.25	31.19
AV- BAFF-R- naive	3.89	2.40	5.15	1.42	.50	1.45	1.83	.55	2.62	1.06	.00	1.78
AV- BAFF- R+ naive	42.83	51.50	34.67	49.11	48.50	32.03	59.09	80.25	38.83	70.50	84.05	32.11
non-sw MemBZ	16.20	11.20	8.00	12.25	12.30	3.88	10.61	8.70	6.78	11.20	9.15	8.42

Anhang

BAFF-R+ non-sw MemBZ	92.19	92.50	6.73	97.50	99.00	3.14	94.82	100.00	9.97	90.45	99.00	16.68
AV+ non-sw MemBZ	55.83	36.50	34.26	36.92	36.30	32.80	52.76	66.70	40.90	48.10	37.25	32.06
AV+ BAFF-R- non-sw MemBZ	8.64	7.10	8.60	3.36	1.60	4.15	7.22	1.60	13.31	7.83	2.65	11.77
AV+ BAFF-R+ non-sw MemBZ	51.04	37.50	35.10	35.85	35.30	31.82	48.29	45.00	39.82	44.39	32.65	32.94
AV- BAFF-R- non-sw MemBZ	7.36	8.70	5.23	2.03	1.20	2.32	6.72	0.00	12.61	6.19	1.40	9.55
AV- BAFF-R+ non-sw MemBZ	32.93	43.30	29.14	58.78	62.70	33.40	37.77	25.00	38.94	41.59	47.40	28.68
CD27- MemBZ	17.87	17.70	3.24	22.47	23.10	9.92	24.45	22.85	11.76	27.08	28.00	10.15
BAFF-R+ CD27- MemBZ	83.64	92.60	22.43	95.52	97.60	4.26	91.93	94.95	7.80	91.84	97.15	13.29
AV+ CD27- MemBZ	58.06	55.40	31.98	62.02	66.00	29.17	49.82	36.10	35.80	52.19	43.95	30.66
AV+ BAFF-R- CD27- MemBZ	8.37	7.80	9.14	3.73	2.80	3.88	5.29	4.45	6.17	5.54	3.00	8.21
AV+ BAFF-R+ CD27- MemBZ	56.17	58.30	27.53	62.88	68.20	27.65	48.09	38.90	35.25	50.54	39.60	30.71
AV- BAFF-R- CD27- MemBZ	7.06	3.00	8.03	3.47	1.90	3.80	5.90	2.70	8.22	6.05	3.30	8.50
AV- BAFF-R+ CD27- MemBZ	28.39	27.20	24.22	29.93	21.60	26.53	40.71	41.90	32.03	37.89	40.00	26.59
sw MemBZ	8.23	6.00	5.33	11.06	8.00	7.90	24.28	21.75	15.88	19.52	17.95	7.92
BAFF-R+ sw MemBZ	75.57	89.30	21.81	90.25	96.40	11.72	80.33	81.00	15.72	80.41	84.80	20.40
AV+ sw MemBZ	45.91	28.10	35.99	26.21	18.40	29.92	54.11	44.80	34.90	51.62	42.45	32.60
AV+ BAFF-R- sw MemBZ	6.19	2.50	9.44	2.72	1.10	3.88	5.49	3.80	5.66	8.25	3.75	14.68
AV+ BAFF-R+ sw MemBZ	38.79	24.00	32.87	23.05	13.90	28.12	47.57	31.30	37.79	42.67	26.60	34.86
AV- BAFF-R- sw MemBZ	10.24	4.60	11.15	4.58	1.10	9.45	10.00	1.80	14.22	8.20	3.10	10.61
AV- BAFF-R+ sw MemBZ	44.76	58.30	36.70	69.65	74.00	29.35	36.96	38.20	29.28	40.90	46.70	29.22
DC (abs.)	338.29	160.00	287.51	646.85	283.00	1429.15	71.29	55.00	55.02	63.33	47.00	79.83
AV+ DC	68.90	68.80	13.12	68.68	71.90	19.82	42.10	37.85	21.67	57.63	57.50	15.12

Anhang

Tabelle 8-13 Apoptose Kokulturen

%	48h n. Kokultur								
	auto-allo			allo-auto			Kauto-allo		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	617.71	279.00	791.27	587.50	442.50	573.26	416.33	388.50	230.22
Lymph.	91.10	96.45	12.51	93.60	95.95	8.42	97.74	98.00	1.27
BZ	73.97	81.25	20.84	81.44	84.10	15.35	71.32	75.70	19.15
naive	43.57	46.20	21.21	41.45	37.00	21.22	44.43	46.50	11.44
BAFF-R+ nBZ	97.14	98.00	3.55	98.48	98.85	1.54	96.97	98.05	4.45
AV+ nBZ	34.76	6.05	42.26	34.35	7.65	37.37	18.34	5.95	22.65
AV+ BAFF-R- nBZ	2.67	.45	4.01	1.32	1.15	1.60	1.87	1.20	2.22
AV+ BAFF-R+ nBZ	33.82	7.10	40.42	35.75	12.30	37.13	18.43	6.10	21.62
AV- BAFF-R- nBZ	.75	.00	1.22	.88	.00	1.42	1.82	.45	4.54
AV- BAFF-R+ nBZ	63.15	88.20	42.02	62.05	84.55	37.32	77.88	87.75	22.56
non-sw MemBZ	13.71	12.35	8.69	8.62	8.75	4.17	8.53	7.70	4.84
BAFF-R+ non-sw MemBZ	93.68	98.05	11.28	97.62	100.00	3.82	90.11	94.55	13.70
AV+ non-sw MemBZ	51.03	46.45	39.80	46.63	32.45	37.74	40.42	38.00	30.64
AV+ BAFF-R- non-sw MemBZ	7.43	4.70	11.33	7.54	2.60	12.28	6.65	.65	10.72
AV+ BAFF-R+ non-sw MemBZ	47.07	31.55	39.92	43.38	30.05	37.85	36.54	25.00	31.99
AV- BAFF-R- non-sw MemBZ	4.30	.00	6.74	3.13	.00	4.76	7.91	.00	13.32
AV- BAFF-R+ non-sw MemBZ	41.18	46.45	36.68	45.95	47.95	35.15	48.90	50.35	25.46
CD27- MemBZ	17.94	15.90	8.60	27.40	28.70	11.33	29.83	30.85	8.57
BAFF-R+ CD27- MemBZ	94.02	95.65	7.03	95.75	97.55	4.47	90.04	96.65	17.56
AV+ CD27- MemBZ	48.52	31.35	37.95	54.07	42.10	37.21	51.35	43.85	28.09
AV+ BAFF-R- CD27- MemBZ	5.02	3.60	6.80	3.02	2.75	2.85	6.87	4.55	6.56
AV+ BAFF-R+ CD27- MemBZ	46.43	34.90	35.23	54.73	43.05	34.70	48.62	39.20	26.79
AV- BAFF-R- CD27- MemBZ	4.60	.60	5.19	5.65	5.50	6.20	8.18	4.15	14.97
AV- BAFF-R+ CD27- MemBZ	43.95	55.50	33.13	36.59	43.05	30.67	36.47	35.95	23.63
sw MemBZ	24.78	16.90	16.48	22.54	18.65	14.23	17.09	17.65	8.21
BAFF-R+ sw MemBZ	82.37	86.05	14.49	79.88	80.50	17.94	79.48	87.65	25.16
AV+ sw MemBZ	54.66	53.35	39.64	54.13	50.60	36.53	34.88	31.85	25.00
AV+ BAFF-R- sw MemBZ	4.44	2.55	4.74	4.80	1.65	5.98	6.08	4.25	6.62
AV+ BAFF-R+ sw MemBZ	49.79	42.40	41.26	48.17	35.75	37.39	28.38	16.35	27.18
AV- BAFF-R- sw MemBZ	19.43	7.05	51.22	12.15	3.10	17.12	8.30	4.05	17.18
AV- BAFF-R+ sw MemBZ	35.93	32.90	34.66	34.90	36.65	27.71	53.11	53.90	25.14
DC (abs.)	62.17	50.50	38.60	65.71	49.50	51.25	47.67	42.00	24.35
AV+ DC	50.78	57.25	23.97	40.84	39.60	15.55	53.83	50.95	20.05

Tabelle 8-14 Apoptose Zusätze Patienten

%	48h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	491.33	276.50	554.30	427.17	207.50	474.55	509.00	243.00	766.23	751.00	140.50	1304.30
Lymph.	94.13	95.90	5.76	92.95	92.35	5.12	83.80	96.30	23.53	92.53	94.95	5.71
BZ	77.62	81.85	21.26	76.60	81.60	20.23	79.90	84.15	18.00	81.30	81.90	12.85
NBZ	45.50	44.20	21.84	29.60	26.85	19.42	43.20	40.45	25.43	44.27	36.00	24.25
BAFF-R+ nBZ	96.70	98.20	4.80	95.83	96.60	3.90	96.72	97.90	4.33	94.68	95.75	5.91
AV+ nBZ	35.33	12.05	43.74	43.38	38.35	42.56	32.28	8.55	40.76	36.68	19.10	41.71

Anhang

AV+ BAFF-R- nBZ	3.47	0.65	6.79	2.32	0.10	3.60	2.73	0.65	4.37	3.60	1.15	5.48
AV+ BAFF-R+ nBZ	33.07	12.05	39.71	42.57	42.50	38.73	32.77	10.70	40.81	35.83	20.25	39.15
AV- BAFF-R- nBZ	1.15	0.50	1.82	2.00	1.15	3.15	1.50	0.05	2.29	2.65	1.20	3.42
AV- BAFF-R+ nBZ	62.35	87.10	43.55	53.10	53.35	40.56	63.00	84.25	42.05	57.90	74.45	39.39
non-sw MemBZ	12.52	9.50	7.31	12.53	10.05	8.41	8.17	4.80	6.38	9.23	8.90	5.33
BAFF-R+ non-sw MemBZ	94.38	99.15	11.98	99.42	100.00	1.43	96.70	100.00	5.82	88.78	95.50	14.30
AV+ non-sw MemBZ	52.70	58.35	42.61	49.23	48.10	49.80	40.35	28.20	43.46	68.77	70.85	31.64
AV+ BAFF-R- non-sw MemBZ	13.13	3.20	19.45	6.27	0.40	13.31	1.12	0.00	1.79	8.37	4.10	12.90
AV+ BAFF-R+ non-sw MemBZ	43.32	36.25	46.45	44.13	29.70	46.08	44.47	34.30	39.02	61.25	70.85	34.92
AV- BAFF-R- non-sw MemBZ	13.80	1.40	21.27	0.40	0.00	0.98	5.45	2.05	7.04	7.22	0.80	10.90
AV- BAFF-R+ non-sw MemBZ	29.77	17.85	36.24	49.18	50.70	48.10	48.97	58.55	40.88	23.17	11.05	32.20
CD27- MemBZ	20.35	19.05	11.27	28.83	27.25	13.79	26.97	26.65	11.81	21.67	20.95	10.94
BAFF-R+ CD27- MemBZ	92.70	94.95	7.00	93.80	95.65	6.04	93.42	94.85	7.47	87.80	88.95	10.52
AV+ CD27- MemBZ	44.98	25.00	37.68	51.25	42.10	39.58	55.37	51.10	36.92	47.67	40.00	38.39
AV+ BAFF-R- CD27- MemBZ	3.25	2.50	3.65	5.30	4.25	2.54	7.07	3.90	11.42	5.55	5.90	4.02
AV+ BAFF-R+ CD27- MemBZ	45.02	30.25	36.03	48.48	40.25	38.45	51.78	38.90	37.90	47.07	36.90	38.38
AV- BAFF-R- CD27- MemBZ	7.00	2.15	11.69	3.58	1.60	5.10	3.37	1.10	4.79	9.67	7.90	9.62
AV- BAFF-R+ CD27- MemBZ	44.73	50.90	36.50	42.60	47.10	34.66	37.78	42.80	33.64	37.72	41.90	31.76
sw MemBZ	21.60	21.35	15.77	29.03	26.85	17.77	21.65	20.95	15.89	24.83	22.50	17.28
BAFF-R+ sw MemBZ	81.68	81.00	15.51	79.95	81.40	17.23	78.87	79.75	17.81	80.83	81.25	16.64
AV+ sw MemBZ	56.82	52.75	36.98	53.03	38.70	36.41	54.35	50.00	37.96	52.23	43.75	38.12
AV+ BAFF-R- sw MemBZ	6.33	4.60	6.96	3.58	3.70	3.40	6.42	3.50	7.47	5.62	5.60	5.06
AV+ BAFF-R+ sw MemBZ	50.47	40.30	39.98	45.57	30.80	41.02	47.70	34.30	39.61	46.55	33.35	41.26
AV- BAFF-R- sw MemBZ	4.13	0.30	7.28	13.97	12.55	13.51	11.40	1.10	19.94	10.48	2.10	15.31

Anhang

AV- BAFF- R+ sw MemBZ	39.07	38.20	35.36	36.90	44.00	30.58	34.50	33.30	29.14	37.38	47.75	29.96
DC (abs.)	92.00	70.00	85.72	57.17	55.00	22.58	76.17	55.50	58.63	59.83	52.50	41.12
AV+ DC	55.45	48.80	26.22	41.23	37.85	9.29	43.53	37.80	28.21	28.20	25.85	11.93

Tabelle 8-15 Apoptose Zusätze Kontrollen

% Leuk. (abs.) Lymph. BZ NBZ BAFF-R+ nBZ AV+ nBZ AV+ BAFF- R- nBZ AV+ BAFF- R+ nBZ AV- BAFF- R- nBZ AV- BAFF- R+ nBZ non-sw MemBZ BAFF-R+ non-sw MemBZ AV+ non-sw MemBZ AV+ BAFF- R- non-sw MemBZ AV+ BAFF- R+ non-sw MemBZ AV- BAFF- R- non-sw MemBZ AV- BAFF- R+ non-sw MemBZ CD27- MemBZ BAFF-R+ CD27- MemBZ AV+ CD27- MemBZ AV+ BAFF- R- CD27- MemBZ AV+ BAFF- R+ CD27- MemBZ	48h n. Kokultur											
	nativ			anti-IgM			CpG			Gardiquimod		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Leuk. (abs.)	587.42	573.00	401.79	501.50	478.00	276.75	421.25	379.50	251.40	508.00	422.50	338.21
Lymph.	96.84	97.95	3.67	95.45	97.05	5.16	96.51	96.10	1.98	95.47	97.15	4.71
BZ	71.53	74.45	17.50	75.91	79.00	16.81	73.99	76.95	18.58	73.23	80.60	20.46
NBZ	43.08	40.35	13.56	33.81	33.55	12.04	46.41	44.15	10.59	45.48	47.45	12.09
BAFF-R+ nBZ	97.41	98.45	2.95	96.83	99.00	4.38	97.63	97.75	1.88	96.55	97.40	4.69
AV+ nBZ	28.36	8.30	35.50	25.38	7.15	34.07	25.94	13.40	30.74	22.61	7.30	30.00
AV+ BAFF- R- nBZ	2.13	.65	2.66	2.95	1.00	3.96	2.28	1.55	3.12	2.65	1.90	3.37
AV+ BAFF- R+ nBZ	30.47	8.15	35.17	25.38	11.60	33.22	25.38	13.30	29.93	22.56	9.80	29.73
AV- BAFF- R- nBZ	.98	.00	1.78	.98	.00	1.98	.98	.00	1.38	1.30	.30	2.12
AV- BAFF- R+ nBZ	66.43	84.65	35.36	70.69	87.00	35.77	71.38	81.75	30.59	73.50	86.40	30.18
non-sw MemBZ	11.57	9.00	8.71	13.28	9.40	11.27	9.41	7.70	8.33	10.55	9.40	4.71
BAFF-R+ non-sw MemBZ	87.27	99.80	23.32	91.44	97.55	14.95	92.09	97.55	11.55	90.99	98.25	16.48
AV+ non-sw MemBZ	52.41	48.70	32.54	41.58	29.10	36.49	49.76	34.95	34.82	48.64	36.95	26.83
AV+ BAFF- R- non-sw MemBZ	10.24	5.20	15.09	6.51	2.20	9.95	4.89	.00	10.35	9.67	4.00	11.69
AV+ BAFF- R+ non-sw MemBZ	46.86	41.55	32.64	38.90	19.25	36.67	48.30	36.40	34.50	43.48	39.80	31.27
AV- BAFF- R- non-sw MemBZ	8.65	1.75	12.11	4.25	.80	6.53	6.97	1.20	11.17	4.88	2.25	7.87
AV- BAFF- R+ non-sw MemBZ	34.25	38.10	24.63	50.34	56.00	34.23	39.83	42.30	31.80	41.96	49.05	24.05
CD27- MemBZ	25.78	27.45	10.67	30.13	29.80	9.73	26.92	30.35	10.71	25.50	26.65	10.11
BAFF-R+ CD27- MemBZ	91.20	97.85	15.83	94.15	98.30	10.65	92.10	95.80	7.90	89.93	95.50	17.84
AV+ CD27- MemBZ	52.90	37.90	33.35	51.37	47.50	32.79	47.97	38.70	30.88	56.53	58.70	28.87
AV+ BAFF- R- CD27- MemBZ	4.29	3.25	4.03	3.73	2.60	4.47	6.35	3.15	7.87	7.77	4.05	13.35
AV+ BAFF- R+ CD27- MemBZ	52.46	36.25	31.73	50.84	44.00	31.89	45.46	38.75	33.46	53.38	51.40	29.09

Anhang

AV- BAFF- R- CD27- MemBZ	7.70	1.00	12.89	4.42	2.40	7.08	7.08	6.90	6.72	5.00	2.35	6.24
AV- BAFF- R+ CD27- MemBZ	35.57	31.55	27.29	41.02	40.15	31.42	41.12	46.25	25.22	33.84	32.50	24.63
sw MemBZ	19.58	15.20	10.43	22.74	22.85	6.59	17.28	17.60	4.80	18.47	19.15	8.66
BAFF-R+ sw MemBZ	79.29	84.70	21.08	82.46	87.10	18.23	76.68	86.15	27.82	83.19	84.35	14.10
AV+ sw MemBZ	50.98	55.15	32.15	48.91	46.75	32.75	51.93	37.30	34.68	54.65	40.20	34.84
AV+ BAFF- R- sw MemBZ	7.28	3.15	11.82	6.62	3.70	10.17	12.65	4.40	24.61	6.47	5.65	6.57
AV+ BAFF- R+ sw MemBZ	42.41	28.55	34.86	41.68	28.00	34.46	38.85	24.50	36.58	47.73	30.10	37.51
AV- BAFF- R- sw MemBZ	10.31	7.85	10.41	9.00	3.65	11.95	6.82	3.25	11.56	6.68	2.20	9.29
AV- BAFF- R+ sw MemBZ	40.02	37.70	31.60	42.72	52.70	28.55	41.73	48.35	30.83	39.13	53.10	29.60
DC (abs.)	89.38	43.50	149.86	57.67	52.50	23.30	46.25	40.00	35.01	60.00	44.00	43.52
AV+ DC	62.43	65.10	15.14	55.57	56.20	17.02	57.96	56.35	13.47	54.55	51.10	15.37

8.2. Tabellen BAFF-Konzentrationen

8.2.1. Charakterisierung

Tabelle 8-16 BAFF-Konzentrationen nach Charakterisierung

Zeitpunkt pg/ml	24h n. Kokultur nativ			48h n. Kokultur nativ			48h n. Kokultur gesamt		
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ
Patienten	157,42	140,89	76,31	152,42	124,09	79,07	240,92	184,91	200,62
auto-allo	99,16	89,25	52,31	121,57	75,23	81,37	121,57	75,23	81,37
allo-auto	126,97	130,80	51,18	106,38	84,08	63,64	192,14	110,37	193,61
Kontrollen	134,91	152,12	57,55	59,98	55,89	45,70	194,38	128,97	204,36

8.2.2. Zusätze

Tabelle 8-17 BAFF-Konzentrationen nach Zusätzen in pg/ml

Patienten	Kontrollen			allo-auto							
	mean	median	σ	mean	median	σ	mean	median	σ		
nativ	152,42	124,09	79,07	nativ	59,98	55,89	45,70	nativ	106,38	84,08	63,64
anti-IgM	170,99	122,67	164,95	anti-IgM	219,03	156,53	153,48	anti-IgM	190,65	227,51	125,27
CpG	231,48	165,09	273,75	CpG	162,38	67,65	198,05	CpG	223,75	83,85	314,43
Gardiquimod	396,12	396,79	199,76	Gardiquimod	313,72	220,82	286,71	Gardiquimod	247,77	167,60	191,61

9. Literaturverzeichnis

Abts, H.; Emmerich, M.; Miltenyi, S.; Radbruch, A.; Tesch, H. (1989): CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. In: *J. Immunol. Methods* 125 (1-2). S. 19–28.

Ahmed, S. S. Wang, X. N. Norden, J. Pearce, K. El-Gezawy, E. & Atarod, S. et al. (2015): Identification and validation of biomarkers associated with acute and chronic graft versus host disease. In: *Bone marrow transplantation* 50, 1563–1571.

Allen, Jessica L.; Fore, Matthew S.; Wooten, Jenna; Roehrs, Philip A.; Bhuiya, Nazmim S.; Hoffert, Todd et al. (2012): B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. In: *Blood* 120 (12). S. 2529–2536.

Anderson, B. E. et al. (2004): Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 104, 1565–1573.

Anderson, B. E.; McNiff, Jennifer M.; Jain, Dhanpat; Blazar, Bruce R.; Shlomchik, Warren D.; Shlomchik, Mark J. (2005): Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. In: *Blood* 105 (5). S. 2227–2234.

Anolik, Jennifer H.; Friedberg, Jonathan W.; Zheng, Bo; Barnard, Jennifer; Owen, Teresa; Cushing, Emily et al. (2007): B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. In: *Clinical Immunology* 122 (2). S. 139–145.

Arai, Sally; Sahaf, Bitu; Narasimhan, Balasubramanian; Chen, George L.; Jones, Carol D.; Lowsky, Robert et al. (2012): Prophylactic rituximab after allogeneic transplantation decreases B-cell alloimmunity with low chronic GVHD incidence. In: *Blood* 119 (25). S. 6145–6154.

Armistead, Paul M.; Liang, Shoudan; Li, Hua; Lu, Sijie; van Bergen, Cornelis A. M.; Alatrash, Gheath et al. (2011): Common minor histocompatibility antigen discovery based upon patient clinical outcomes and genomic data. In: *PLoS ONE* 6 (8). S. e23217.

Auffermann-Gretzinger, Susanne; Lossos, Izidore S.; Vayntrub, Tamara A.; Leong, Wendy; Grumet, F. Carl; Blume, Karl G. et al. (2002): Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. In: *Blood* 99 (4). S. 1442–1448.

- Avanzini, Maria Antonietta; Locatelli, Franco; Dos Santos, Conceicao; Maccario, Rita; Lenta, Elisa; Oliveri, Mara et al. (2005): B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. In: *Exp. Hematol.* 33 (4). S. 480–486.
- Avery, Danielle T.; Ellyard, Julia I.; Mackay, Fabienne; Corcoran, Lynn M.; Hodgkin, Philip D.; Tangye, Stuart G. (2005): Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. In: *J. Immunol.* 174 (7). S. 4034–4042.
- Bae, Keun Wook; Kim, Bo Eun; Koh, Kyung Nam; Im, Ho Joon; Seo, Jong Jin (2012): Factors influencing lymphocyte reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children. In: *Korean J Hematol* 47 (1). S. 44.
- Baird, Kristin; Cooke, Kenneth; Schultz, Kirk R. (2010): Chronic Graft-Versus-Host Disease (GVHD) in Children. In: *Pediatric Clinics of North America* 57 (1). S. 297–322.
- Bastien, Jean-Philippe; Kros, Gorazd; Therien, Cynthia; Rashkovan, Marissa; Scotto, Christian; Cohen, Sandra et al. (2010): Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs versus CD4+ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 116 (23). S. 4859–4869.
- Beelen, Dietrich W.; Mytilineos, Joannis (2014): Jahresbericht 2013 Deutsches Register für Stammzelltransplantationen, zuletzt geprüft am 14.02.2015.
- Bemark, M.; Holmqvist, J.; Abrahamsson, J.; Mellgren, K. (2012): Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. In: *Clinical & Experimental Immunology* 167 (1). S. 15–25.
- Bemark, Mats; Friskopp, Linda; Saghafian-Hedengren, Shanie; Koethe, Susanne; Fasth, Anders; Abrahamsson, Jonas et al. (2013): A glycosylation-dependent CD45RB epitope defines previously unacknowledged CD27–IgMhigh B cell subpopulations enriched in young children and after hematopoietic stem cell transplantation. In: *Clinical Immunology* 149 (3). S. 421–431.
- Berger, M.; Signorino, E.; Muraro, M.; Quarello, P.; Biasin, E.; Nesi, F. et al. (2013): Monitoring of TNFR1, IL-2R α , HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in paediatric patients. In: *Bone Marrow Transplant.*

Berkowska, M. A.; Driessen, G. J. A.; Bikos, V.; Grosserichter-Wagener, C.; Stamatopoulos, K.; Cerutti, A. et al. (2011): Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. In: *Blood* 118 (8). S. 2150–2158.

Blazar, Bruce R.; Murphy, William J.; Abedi, Mehrdad (2012): Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. In: *Nat Rev Immunol* 12 (6). S. 443–458.

Bolton, Holly A.; Zhu, Erhua; Terry, Alexandra M.; Guy, Thomas V.; Koh, Woon-Puay; Tan, Sioh-Yang et al. (2015): Selective Treg reconstitution during lymphopenia normalizes DC costimulation and prevents graft-versus-host disease. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (9), pp. 3627–3641.

Bosch, Mark; Khan, Faisal M.; Storek, Jan (2012): Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. In: *Current Opinion in Hematology* 19 (4). S. 324–335.

Boyiadzis, M. Arora, M. Klein, J. P. Hassebroek, A. Hemmer, M. & Urbano-Ispizua, A. et al. (2015): Impact of Chronic Graft-versus-Host Disease on Late Relapse and Survival on 7,489 Patients after Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Leukemia. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 2020–2028.

Buckner, Jane Hoyt (2010): Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. In: *Nat Rev Immunol* 10 (12). S. 849–859.

Capitini, Christian M.; Davis, Jessica P.E.; Larabee, Shannon M.; Herby, Sarah; Nasholm, Nicole M.; Fry, Terry J. (2011): Extracorporeal Photopheresis Attenuates Murine Graft-versus-Host Disease via Bone Marrow–Derived Interleukin-10 and Preserves Responses to Dendritic Cell Vaccination. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17 (6). S. 790–799.

Capitini, Christian M.; Nasholm, Nicole M.; Duncan, Brynn B.; Guimond, Martin; Fry, Terry J. (2013): Graft-versus-host disease impairs vaccine responses through decreased CD4+ and CD8+ T cell proliferation and increased perforin-mediated CD8+ T cell apoptosis. In: *J. Immunol.* 190 (3). S. 1351–1359.

Charrier, Emily; Cordeiro, Paulo; Cordeau, Martine; Dardari, R'Kia; Michaud, Annie; Harnois, Michaël et al. (2012): Post-transcriptional down-regulation of Toll-like receptor signaling pathway in umbilical cord blood plasmacytoid dendritic cells. In: *Cell. Immunol.* 276 (1-2). S. 114–121.

Chung, Seung Joon; Park, Seung Wan; Kim, Min Kyoung; Kang, Min Jae; Lee, Young Ah; Lee, Seong Yong et al. (2013): Growth after hematopoietic stem cell transplantation in children with acute myeloid leukemia. In: *J. Korean Med. Sci.* 28 (1). S. 106–113.

Dander, Erica; Balduzzi, Adriana; Zappa, Greta; Lucchini, Giovanna; Perseghin, Paolo; André, Valentina et al. (2009): Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. In: *Transplantation* 88 (11). S. 1261–1272.

Das, R. Komorowski, R. Hessner, M. J. Subramanian, H. Huettner, C. S. & Cua, D. et al. (2010): Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. In: *Blood* 115, 5249–5258.

DeFilipp, Z.; Purcell, M.; Harris, W. A. C.; Chandra, D. J.; Gleason, C.; Wrammert, J. et al. (2016): Monitoring the kinetics of B-cell recovery following rituximab may guide the management of steroid-refractory chronic GvHD. In: *Bone marrow transplantation* 51 (4), pp. 607–609.

Ding, C.; Cai, Y.; Marroquin, J.; Ildstad, S. T.; Yan, J. (2009): Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate Autoreactive B Cell Activation via Soluble Factors and in a Cell-to-Cell Contact Manner. In: *The Journal of Immunology* 183 (11). S. 7140–7149.

Doreau, Agnès; Belot, Alexandre; Bastid, Jérémy; Riche, Benjamin; Trescol-Biemont, Marie-Claude; Ranchin, Bruno et al. (2009): Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. In: *Nat. Immunol.* 10 (7). S. 778–785.

Douagi, I.; Gujer, C.; Sundling, C.; Adams, W. C.; Smed-Sorensen, A.; Seder, R. A. et al. (2009): Human B Cell Responses to TLR Ligands Are Differentially Modulated by Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. In: *The Journal of Immunology* 182 (4). S. 1991–2001.

Eapen, Mary; Horowitz, Mary M.; Klein, John P.; Champlin, Richard E.; Loberiza, Fausto R.; Ringdén, Olle; Wagner, John E. (2004): Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. In: *J. Clin. Oncol.* 22 (24). S. 4872–4880.

- Ehlers, Christina; Schirmer, Susann; Kehlenbach, Ralph H.; Hauber, Joachim; Chemnitz, Jan (2013): Post-transcriptional regulation of CD83 expression by AUF1 proteins. In: *Nucleic Acids Res.* 41 (1). S. 206–219.
- Fagnoni, Francesco F.; Oliviero, Barbara; Giorgiani, Giovanna; Stefano, Piero de; Dehò, Anna; Zibera, Carlo et al. (2004): Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. In: *Blood* 104 (1). S. 281–289.
- Federmann, B.; Hägele, M.; Pfeiffer, M.; Wirths, S.; Schumm, M.; Faul, C. et al. (2010): Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. In: *Leukemia* 25 (1). S. 121–129.
- Fedoriw, Yuri; Samulski, T. Danielle; Deal, Allison M.; Dunphy, Cherie H.; Sharf, Andrew; Shea, Thomas C. et al. (2012): Bone Marrow B cell Precursor Number after Allogeneic Stem Cell Transplantation and GVHD Development. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18 (6). S. 968–973.
- Ferrara, James L. M.; Levine, John E.; Reddy, Pavan; Holler, Ernst (2009): Graft-versus-host disease. In: *The Lancet* 373 (9674). S. 1550–1561.
- Filipovich, Alexandra H.; Weisdorf, Daniel; Pavletic, Steven; Socie, Gerard; Wingard, John R.; Lee, Stephanie J. et al. (2005): National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. In: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11 (12). S. 945–956.
- Fillatreau, S. Gray, D. & Anderton, S. M. (2008): Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8, 391–397.
- Fiorentino, David F. (2008): Type I Interferon in the Induction or Exacerbation of Dermatomyositis: What This Observation Tells Us About the Naturally Occurring Disease. In: *Arch Dermatol* 144 (10). S. 1379.
- Flynn, Ryan; Paz, Katelyn; Du, Jing; Reichenbach, Dawn K.; Taylor, Patricia A.; Panoskaltis-Mortari, Angela et al. (2016): Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. In: *Blood* 127 (17), pp. 2144–2154.

- Fujii, Hisaki; Cuvelier, Geoff; She, Kevin; Aslanian, Soudabeh; Shimizu, Hiromi; Kariminia, Amina et al. (2008): Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children's Oncology Group. In: *Blood* 111 (6). S. 3276–3285.
- Fujita, Shigeharu; Sato, Yumiko; Sato, Kaori; Eizumi, Kawori; Fukaya, Tomohiro; Kubo, Masato et al. (2007): Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. In: *Blood* 110 (10). S. 3793–3803.
- Galluzzi, Lorenzo; Senovilla, Laura; Vacchelli, Erika; Eggermont, Alexander; Fridman, Wolf Hervé; Galon, Jerome et al. (2012): Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. In: *Oncoimmunology* 1 (7). S. 1111–1134.
- Gilliet, Michel; Cao, Wei; Liu, Yong-Jun (2008): Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. In: *Nat Rev Immunol* 8 (8). S. 594–606.
- Gratwohl, Alois (2010): Hematopoietic Stem Cell Transplantation A Global Perspective. In: *JAMA* 303 (16), S. 1617.
- Guan, Xin; Peng, Ji-Run; Yuan, Lan; Wang, Hui; Wei, Yu-Hua; Leng, Xi-Sheng (2004): A novel, rapid strategy to form dendritomas from human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells using mature dendritic cells derived from human peripheral blood CD14+ monocytes within 48 hours of in vitro culture. In: *World journal of gastroenterology : WJG* 10 (24), S. 3564–3568.
- Huber, Jonathan P.; Farrar, J. David (2011): Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. In: *Immunology* 132 (4). S. 466–474.
- Hubo, Mario; Trinschek, Bettina; Kryczanowsky, Fanny; Tuettenberg, Andrea; Steinbrink, Kerstin; Jonuleit, Helmut (2013): Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. In: *Front Immunol* 4. S. 82.
- Iori, Anna P.; Torelli, Giovanni F.; Propriis, Maria S. de; Milano, Filippo; Pupella, Simonetta; Gozzer, Maria et al. (2008): B-cell concentration in the apheretic product predicts acute graft-versus-host disease and treatment-related mortality of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. In: *Transplantation* 85 (3). S. 386–390.
- Janikashvili, Nona; Larmonier, Nicolas; Katsanis, Emmanuel (2010): Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. In: *Immunotherapy* 2 (1). S. 57–68.

Jego, Gaetan; Palucka, A. Karolina; Blanck, Jean-Philippe; Chalouni, Cecile; Pascual, Virginia; Banchereau, Jacques (2003): Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. In: *Immunity* 19 (2). S. 225–234.

Kapur, Rick; Ebeling, Saskia; Hagenbeek, Anton (2008): B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. In: *Haematologica* 93 (11). S. 1702–1711.

Kitko, C. L.; Levine, J. E.; Storer, B. E.; Chai, X.; Fox, D. A.; Braun, T. M. et al. (2014): Plasma CXCL9 elevations correlate with chronic GVHD diagnosis. In: *Blood* 123 (5). S. 786–793.

Kleindienst, Petra; Brocker, Thomas (2005): Concerted antigen presentation by dendritic cells and B cells is necessary for optimal CD4 T-cell immunity in vivo. In: *Immunology* 115 (4). S. 556–564.

Knoechel, Birgit; Lohr, Jens; Kahn, Estelle; Abbas, Abul K. (2005): The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. In: *J. Immunol.* 175 (1). S. 21–26.

Kohrt, Holbrook E.; Tian, Lu; Li, Li; Alizadeh, Ash A.; Hsieh, Sue; Tibshirani, Robert J. et al. (2013): Identification of gene microarray expression profiles in patients with chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Clin. Immunol.* 148 (1). S. 124–135.

Koyama, Motoko; Hashimoto, Daigo; Aoyama, Kazutoshi; Matsuoka, Ken-Ichi; Karube, Kennosuke; Niïro, Hiroaki et al. (2009): Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. In: *Blood* 113 (9). S. 2088–2095.

Kuzmina, Zoya; Greinix, Hildegard T.; Weigl, Roman; Körmöczi, Ulrike; Rottal, Arno; Frantal, Sophie et al. (2011): Significant differences in B-cell subpopulations characterize patients with chronic graft-versus-host disease-associated dysgammaglobulinemia. In: *Blood* 117 (7). S. 2265–2274.

Kuzmina, Zoya; Krenn, Katharina; Petkov, Ventzislav; Körmöczi, Ulrike; Weigl, Roman; Rottal, Arno et al. (2013): CD19(+)CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. In: *Blood* 121 (10). S. 1886–1895.

- Lang, J.; Kelly, M.; Freed, B. M.; McCarter, M. D.; Kedl, R. M.; Torres, R. M.; Pelanda, R. (2013): Studies of Lymphocyte Reconstitution in a Humanized Mouse Model Reveal a Requirement of T Cells for Human B Cell Maturation. In: *The Journal of Immunology* 190 (5). S. 2090–2101.
- Le Bon, Agnes; Thompson, Clare; Kamphuis, Elisabeth; Durand, Vanessa; Rossmann, Cornelia; Kalinke, Ulrich; Tough, David F. (2006): Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. In: *J. Immunol.* 176 (4). S. 2074–2078.
- Le Huu, Doanh; Matsushita, Takashi; Jin, Guihua; Hamaguchi, Yasuhito; Hasegawa, Minoru; Takehara, Kazuhiko et al. (2013): Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. In: *Blood*.
- Leandro, Maria J. (2013): B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. In: *Arthritis Res Ther* 15 (Suppl 1). S. S3.
- Leung, W.; Campana, D.; Yang, J.; Pei, D.; Coustan-Smith, E.; Gan, K. et al. (2011): High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. In: *Blood* 118 (2), S. 223–230.
- Leveque-El Mouttie, Lucie; Koyama, Motoko; Le Texier, Laetitia; Markey, Kate A.; Cheong, Melody; Kuns, Rachel D. et al. (2016): Corruption of dendritic cell antigen presentation during acute GVHD leads to regulatory T-cell failure and chronic GVHD. In: *Blood* 128 (6), pp. 794–804.
- Levine, John E.; Paczesny, Sophie; Sarantopoulos, Stefanie (2012): Clinical applications for biomarkers of acute and chronic graft-versus-host disease. In: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18 (1 Suppl). S. S116-24.
- Li, H.; Demetris, A. J.; McNiff, J.; Matte-Martone, C.; Tan, H. S.; Rothstein, D. M. et al. (2012): Profound Depletion of Host Conventional Dendritic Cells, Plasmacytoid Dendritic Cells, and B Cells Does Not Prevent Graft-versus-Host Disease Induction. In: *The Journal of Immunology* 188 (8). S. 3804–3811.
- Li, Jian-Ming; Southerland, Lauren T.; Lu, Ying; Darlak, Kataryna A.; Giver, Cynthia R.; McMillin, Douglas W. et al. (2009): Activation, immune polarization, and graft-versus-leu-

- kemia activity of donor T cells are regulated by specific subsets of donor bone marrow antigen-presenting cells in allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. In: *J. Immunol.* 183 (12). S. 7799–7809.
- Li, Jian-Ming; Waller, Edmund K. (2004): Donor antigen-presenting cells regulate T-cell expansion and antitumor activity after allogeneic bone marrow transplantation. In: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 10 (8). S. 540–551.
- Lu, Ying; Giver, Cynthia R.; Sharma, Akshay; Li, Jian Ming; Darlak, Katarzyna A.; Owens, Lauren M. et al. (2012): IFN- γ and indoleamine 2.3-dioxygenase signaling between donor dendritic cells and T cells regulates graft versus host and graft versus leukemia activity. In: *Blood* 119 (4). S. 1075–1085.
- MacDonald, Kelli P. A.; Kuns, Rachel D.; Rowe, Vanessa; Morris, Edward S.; Banovic, Tatjana; Bofinger, Helen et al. (2007): Effector and regulatory T-cell function is differentially regulated by RelB within antigen-presenting cells during GVHD. In: *Blood* 109 (11). S. 5049–5057.
- MacDonald, Kelli P. A.; Rowe, Vanessa; Clouston, Andrew D.; Welply, Joseph K.; Kuns, Rachel D.; Ferrara, James L. M. et al. (2005): Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. In: *J. Immunol.* 174 (4). S. 1841–1850.
- Markey, Kate A.; Banovic, Tatjana; Kuns, Rachel D.; Olver, Stuart D.; Don, Alistair L. J.; Raffelt, Neil C. et al. (2009): Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. In: *Blood* 113 (22). S. 5644–5649.
- Masson, A. de, Bouaziz, J.-D. Le Buanec, H. Robin, M. O'Meara, A. & Parquet, N. et al. (2015): CD24(hi)CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 125, 1830–1839.
- Matte, Catherine C.; Liu, Jinli; Cormier, James; Anderson, Britt E.; Athanasiadis, Ioanna; Jain, Dhanpat et al. (2004): Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. In: *Nat Med* 10 (9). S. 987–992.
- McKenna, R. W. (2001): Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. In: *Blood* 98 (8). S. 2498–2507.

- McKenna, Robert W.; Asplund, Sheryl L.; Kroft, Steven H. (2004): Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. In: *Leuk. Lymphoma* 45 (2). S. 277–285.
- Mensen, Angela; Ochs, Christoph; Stroux, Andrea; Wittenbecher, Friedrich; Szyska, Martin; Imberti, Luisa et al. (2013): Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *J Transl Med* 11 (1). S. 188.
- Michonneau, David; Peffault de Latour, Régis; Porcher, Raphaël; Robin, Marie; Benbunan, Marc; Rocha, Vanderson et al. (2009): Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. In: *Br. J. Haematol.* 145 (1). S. 107–114.
- Micklethwaite, Kenneth P.; Clancy, Leighton; Sandher, Upinder; Hansen, Anna M.; Blyth, Emily; Antonenas, Vicki et al. (2008): Prophylactic infusion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes stimulated with Ad5f35pp65 gene-modified dendritic cells after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. In: *Blood* 112 (10). S. 3974–3981.
- Miklos, D. B. (2005): Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. In: *Blood* 105 (7). S. 2973–2978.
- Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (2). S. 231–238.
- Mitsdoerffer, Meike; Lee, Youjin; Jäger, Anneli; Kim, Hye-Jung; Korn, Thomas; Kolls, Jay K. et al. (2010): Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (32). S. 14292–14297.
- Mochizuki, Kazuhiro; Meng, Lijun; Mochizuki, Izumi; Tong, Qing; He, Shan; Liu, Yongnian et al. (2016): Programming of donor T cells using allogeneic delta-like ligand 4-positive dendritic cells to reduce GVHD in mice. In: *Blood* 127 (25), pp. 3270–3280.
- Moon, Joon-Ho; Lee, Soo-Jung; Kim, Jong-Gwang; Chae, Yee-Soo; Kim, Shi-Nae; Kang, Byung-Woog et al. (2009): Clinical significance of autoantibody expression in allogeneic stem-cell recipients. In: *Transplantation* 88 (2). S. 242–250.

- Morbach, H.; Eichhorn, E. M.; Liese, J. G.; Girschick, H. J. (2010): Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. In: *Clin. Exp. Immunol.* 162 (2). S. 271–279.
- Nakasone, Hideki; Tian, Lu; Sahaf, Bitan; Kawase, Takakazu; Schoenrock, Kelsi; Perloff, Spencer et al. (2015): Allogeneic HY antibodies detected 3 months after female-to-male HCT predict chronic GVHD and nonrelapse mortality in humans. In *Blood* 125 (20), pp. 3193–3201.
- Naradikian, Martin S.; Peratem Alison R.; Cancro, Michael P. (2015): BAFF receptors and ligands create independent homeostatic niches for B cell subsets. In: *Current Opinion in Immunology* 34, S.126-129
- Niethammer, D.; Bader, P.; Handgretinger, R.; Klingebiel, T. (2013): Stem Cell Transplantation. In: *Klin Padiatr* 225 (S 01), S. 94–96.
- Noriega, V. Martínez-Laperche, C. Buces, E. Pion, M. Sánchez-Hernández, N. & Martín-Antonio, B. et al. (2015): The Genotype of the Donor for the (GT)_n Polymorphism in the Promoter/Enhancer of FOXP3 Is Associated with the Development of Severe Acute GVHD but Does Not Affect the GVL Effect after Myeloablative HLA-Identical Allogeneic Stem Cell Transplantation. In: *PloS one* 10, e0140454.
- Oberg, J. A.; Bender, J. G.; Morris, E.; Harrison, L.; Basch, C. E.; Garvin, J. H. et al. (2012): Pediatric allo-SCT for malignant and non-malignant diseases: impact on health-related quality of life outcomes. In: *Bone Marrow Transplant.*
- Ohteki, Toshiaki; Tada, Hiroyuki; Ishida, Kazuto; Sato, Taku; Maki, Chikako; Yamada, Taketo et al. (2006): Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. In: *J. Exp. Med.* 203 (10). S. 2329–2338.
- Okamoto, S. Fujiwara, H. Nishimori, H. Matsuoka, K.-I. Fujii, N. & Kondo, E. et al. (2015): Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft-versus-host disease via suppression of IFN- γ /IL-17-producing cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.:1950) 194, 1357–1363.
- Olivieri, Jacopo; Coluzzi, Sabrina; Attolico, Imma; Olivieri, Attilio (2011): Tyrosin kinase inhibitors in chronic graft versus host disease: from bench to bedside. In: *Scientific World Journal* 11. S. 1908–1931.

Olkinuora, H.; Willebrand, E. von; Kantele, J. M.; Vainio, O.; Talvensaaari, K.; Saarinen-Pihkala, U. et al. (2011): The Impact of Early Viral Infections and Graft-Versus-Host Disease on Immune Reconstitution Following Paediatric Stem Cell Transplantation. In: *Scandinavian Journal of Immunology* 73 (6). S. 586–593.

Omazic, B.; Lundkvist, I.; Mattsson, J.; Permert, J.; Nasman-Bjork, I. (2003): Memory B lymphocytes determine repertoire oligoclonality early after haematopoietic stem cell transplantation. In: *Clin Exp Immunol* 134 (1). S. 159–166.

Paczesny, Sophie (2013): Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. In: *Blood* 121 (4). S. 585–594.

Palanichamy, A.; Barnard, J.; Zheng, B.; Owen, T.; Quach, T.; Wei, C. et al. (2009): Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy. In: *The Journal of Immunology* 182 (10). S. 5982–5993.

Pidala, J.; Sarwal, M.; Roedder, S.; Lee, S. J. (2013): Biologic markers of chronic GVHD. In: *Bone Marrow Transplant.*

Pihusch, Markus; Boeck, Stefan; Hamann, Moritz; Pihusch, Verena; Heller, Tatjana; Diem, Heinz et al. (2005): Peripheral dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. In: *Transplantation* 80 (6). S. 843–849.

Pratt, L. M.; Liu, Y.; Ugarte-Torres, A.; Hoegh-Petersen, M.; Podgorny, P. J.; Lyon, A. W. et al. (2013): IL15 levels on day 7 after hematopoietic cell transplantation predict chronic GVHD. In: *Bone Marrow Transplant.* 48 (5). S. 722–728.

Ratajczak, Philippe; Janin, Anne; Peffault de Larour, Régis; Koch, Lisa; Roche, Brigitte; Munn, David et al. (2012): IDO in human gut graft-versus-host disease. In: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18 (1). S. 150–155.

Ratanatharathorn, Voravit; Logan, Brent; Wang, Dan; Horowitz, Mary; Uberti, Joseph P.; Ringden, Olle et al. (2009): Prior rituximab correlates with less acute graft-versus-host disease and better survival in B-cell lymphoma patients who received allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. In: *Br. J. Haematol.* 145 (6). S. 816–824.

Rénard, Cécile; Barlogis, Vincent; Mialou, Valérie; Galambrun, Claire; Bernoux, Delphine; Goutagny, Marie Pierre et al. (2011): Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord

blood or bone marrow transplantation in children. In: *British Journal of Haematology* 152 (3). S. 322–330.

Röck, Jürgen; Schneider, Erik; Grün, Joachim R.; Grützkau, Andreas; Küppers, Ralf; Schmitz, Jürgen; Winkels, Gregor (2007): CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLC γ 2. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (12). S. 3564–3575.

Romberg, Neil; Chamberlain, Nicolas; Saadoun, David; Gentile, Maurizio; Kinnunen, Tuure; Shinh Ng, Yen et al. (2013): CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. In: *J Clin Invest* 123(10): S. 4283–4293.

Rönblom, L.; Pascual, V. (2008): The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. In: *Lupus* 17 (5). S. 394–399.

Saadoun, D.; Terrier, B.; Bannock, J.; Vazquez, T.; Massad, C.; Kand, I. et al (2013): Expansion of Autoreactive Unresponsive CD21-/low B Cells in Sjogren's Syndrome–Associated Lymphoproliferation. In: *Arthritis & Rheumatism.* 65 (4). S. 1085-1096.

Sabado, Rachel Lubong; Bhardwaj, Nina (2010): Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. In: *Immunotherapy* 2 (1). S. 37–56.

Sanz, Iñaki; Wie, Chungwen; Lee, F. Eun-Hyung; Anolik, Jennifer (2008): Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. In: *Seminars in Immunology* 20 (1). S. 67–82.

Sarantopoulos, Stefanie; Stevenson, Kristen E.; Kim, Haesook T.; Cutler, Corey S.; Bhuiya, Nazmim S.; Schowalter, Michael et al. (2009): Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 113 (16). S. 3865–3874.

Sarantopoulos, Stefanie; Stevenson, Kristen E.; Kim, Haesook T.; Washel, Whitney S.; Bhuiya, Nazmim S.; Cutler, Corey S. et al. (2011): Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 117 (7). S. 2275–2283.

Sarantopoulos, S. Blazar, B. R. Cutler, C. & Ritz, J. (2015): B cells in chronic graft-versus-host disease. Biology of blood and marrow transplantation. In: *Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21, 16–23.

Sarvaria, Anushruti; Basar, Rafet; Mehta, Rohtesh S.; Shaim, Hila; Muftuoglu, Muharrem; Khoder, Ahmad et al. (2016): IL-10+ regulatory B cells are enriched in cord blood and may

- play a role in protection against GVHD after cord blood transplantation. In: *Blood*. DOI: 10.1182/blood-2016-01-695122.
- Sauter, C. T.; Bailey, C. P.; Panis, M. M.; Biswas, C. S.; Budak-Alpdogan, T.; Durham, A. et al. (2013): Interleukin-15 administration increases graft-versus-tumor activity in recipients of haploidentical hematopoietic SCT. In: *Bone Marrow Transplant*.
- Schultz, K. R., Paquet, J., Bader, S. & HayGlass, K. T. (1995): Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. In: *Bone marrow transplantation* 16, 289–295.
- Schutt, S. D. Fu, J. Nguyen, H. Bastian, D. Heinrichs, J. & Wu, Y. et al. (2012): Inhibition of BTK and ITK with Ibrutinib Is Effective in the Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease in Mice. *PloS one* 10, e0137641 (2015). In: *Current Opinion in Hematology* 19, 324–335.
- Sela, Uri; Olds, Peter; Park, Andrew; Schlesinger, Sarah J.; Steinman, Ralph M. (2011): Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. In: *J. Exp. Med.* 208 (12). S. 2489–2496.
- Serana, F.; Sottini, A.; Chiarini, M.; Zanotti, C.; Ghidini, C.; Lanfranchi, A. et al. (2010): The Different Extent of B and T cell Immune Reconstitution after Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Enzyme Replacement Therapies in SCID Patients with Adenosine Deaminase Deficiency. In: *The Journal of Immunology* 185 (12). S. 7713–7722.
- Shaw, Joanne; Wang, Yui-Hsi; Ito, Tomoki; Arima, Kazuhiko; Liu, Yong-Jun (2010): Plasmacytoid dendritic cells regulate B-cell growth and differentiation via CD70. In: *Blood* 115 (15). S. 3051–3057.
- Shimabukuro-Vornhagen, A.; Hallek, M. J.; Storb, R. F.; Bergwelt-Baildon, M. S. von (2009): The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. In: *Blood* 114 (24). S. 4919–4927.
- Shlomchik, W. D. (1999): Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells. In: *Science* 285 (5426). S. 412–415.
- Smyth, Lesley A.; Ratnasothy, Kulachelvy; Moreau, Aurelie; Alcock, Sally; Sagoo, Pervinder; Meader, Lucy et al. (2013): Tolerogenic Donor-Derived Dendritic Cells Risk Sensitization In Vivo owing to Processing and Presentation by Recipient APCs. In: *J. Immunol.*

- Socié, G. (2011): Chronic GVHD: B cells come of age. In: *Blood* 117 (7). S. 2086–2087.
- Stenger, E.; Tumquist, H.; Mapara, M.; Thomson, A. (2012): Dendritic cells and regulation of graft-versus-leukemia activity. In: *Blood* 119 (22). S. 5088–5103.
- Storb, R.; Gyurkocza, B.; Storer, B. E.; Sorrow, M. L.; Blume, K.; Niederwieser, D. et al. (2013): Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Tumor Effects After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Journal of Clinical Oncology*.
- Socié, G. & Ritz, J. (2014): Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 124, 374–384.
- Storek, J. (2001): Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. In: *Blood* 97 (11). S. 3380–3389.
- Storek, Jan; Geddes, Michelle; Khan, Faisal; Huard, Bertrand; Helg, Claudine; Chalandon, Yves et al. (2008): Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. In: *Semin Immunopathol* 30 (4). S. 425–437.
- Svegliati, Silvia; Olivieri, Attilio; Campelli, Nadia; Luchetti, Michele; Poloni, Antonella; Trappolini, Silvia et al. (2007): Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 110 (1). S. 237–241.
- Sykora, K.-W. (2013): PRST Registerprotokoll vom 16.09.2013
- Thien, Marilyn; Phan, Tri Giang; Gardam, Sandra; Amesbury, Michelle; Basten, Antony; Mackay, Fabienne; Brink, Robert (2004): Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. In: *Immunity* 20 (6). S. 785–798.
- Thorn, Mitchell; Lewis, Rita H.; Mumbey-Wafula, Alice; Kantrowitz, Stefan; Spatz, Linda A. (2010): BAFF overexpression promotes anti-dsDNA B-cell maturation and antibody secretion. In: *Cell. Immunol.* 261 (1). S. 9–22.
- Toubai, Tomomi; Sun, Yaping; Luker, Gary; Liu, Jun; Luker, Kathryn E.; Tawara, Isao et al. (2013): Host derived CD8+ dendritic cells are required for induction of optimal graft-versus-tumor responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. In: *Blood*.
- Vincent, Fabien B.; Saulep-Easton, Damien; Figgett, William A.; Fairfax, Kirsten A.; Mackay, Fabienne (2013): The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 24 (3). S. 203–215.

- Waller, E. K.; Rosenthal, H.; Jones, T. W.; Peel, J.; Lonial, S.; Langston, A. et al. (2001): Larger numbers of CD4 (bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. In: *Blood* 97 (10). S. 2948–2956.
- Weitz, Marcus; Strahm, Brigitte; Meerpohl, Joerg J.; Bassler, Dirk (2014): Extracorporeal photopheresis versus alternative treatment for chronic graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in paediatric patients. In: *Cochrane Database Syst Rev* 2, S. CD009898.
- Welniak, Lisbeth A.; Blazar, Bruce R.; Murphy, William J. (2007): Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Annu. Rev. Immunol.* 25. S. 139–170.
- Wiegering, V.; Girschick, H. J.; Morbach, H. (2010): B-cell pathology in juvenile idiopathic arthritis. In: *Arthritis* 201. S. 759868.
- Xiao, Tony Z.; Singh, Kanal; Dunn, Elizabeth; Ramachandran, Rageshree; Cowan, Morton J. (2012): T cell and B Cell Immunity can be reconstituted with Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation without Alkylator Therapy in Artemis-Deficient Mice Using Anti-Natural Killer Cell Antibody and Photochemically Treated Sensitized Donor T Cells. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18 (2). S. 200–209.
- Young, James S.; Wu, Tao; Chen, Yuhong; Zhao, Dongchang; Liu, Hongjun; Yi, Tangsheng et al. (2012): Donor B cells in transplants augment clonal expansion and survival of pathogenic CD4⁺ T cells that mediate autoimmune-like chronic graft-versus-host disease. In: *J. Immunol.* 189 (1). S. 222–233.
- Zhang, C. (2006): Donor CD4⁺ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. In: *Blood* 107 (7). S. 2993–3001.
- Zinöcker, Severin; Dressel, Ralf; Wang, Xiao-Nong; Dickinson, Anne M.; Rolstad, Bent (2012): Immune reconstitution and graft-versus-host reactions in rat models of allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Front Immunol* 3. S. 355.

Danksagung

Für die bedingungslose und verständnisvolle Betreuung und Unterstützung durch Priv.-Doz. Dr. Verena Wiegering möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Trotz fordernder Belastung im Klinikalltag konnte ich immer auf konstruktive Kritik und konkrete Hilfe zählen - vielen Dank.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Schlegel danke ich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie für die kritische und hilfreiche Diskussion dieser Arbeit.

Für die experimentelle Forschung stand mir die Ausstattung und Unterstützung des gemeinsamen Stammzelllabors der Universitätskinderklinik Würzburg und Innere Medizin II unter der Leitung von Prof. Dr. Eyrich zur Verfügung. Für die Möglichkeit, in einem exzellenten Labor mit einem sowohl fachlich hervorragenden, als auch persönlich sehr lebenswerten Team arbeiten zu können, bin ich sehr dankbar. Dass neben der täglichen Routine auch Platz und Zeit für die Forschung von Studenten zur Verfügung gestellt wird, ist nicht selbstverständlich und verdient vollste Anerkennung.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich in jedem Lebensbereich unterstützen, Verständnis zeigen und mir mit ihrer Zuversicht immer Mut zusprechen. Intellektuelle Entwicklung ist nur möglich durch eine Auseinandersetzung mit Inhalten und Fragestellungen. Den Rahmen dafür bietet unter anderem die kritische Diskussion, die das eigene Denken durch positive Resonanz, aber auch Dissonanz zu bereichern vermag.

Für das hilfreiche Korrekturlesen der Arbeit bin ich Daniel Schuster zu tiefstem Dank verpflichtet.

Gleiches gilt für meine Ehefrau Dorothea Hegele, der ich für den unbedingten Beistand, die Rücksicht und die Liebe, aus der ich Kraft schöpfen kann, danke.

Jeden einzelnen Menschen zu bedenken, der mir, ob im Studium, bei meiner Doktorarbeit, oder schlicht im Leben beigestanden hat und mit dazu beigetragen hat, dass ich sowohl akademisch, als auch persönlich dorthin gekommen bin, wo ich jetzt stehe, ist schlicht unmöglich. Deswegen möchte ich meine Dankbarkeit an jeden richten, der auch nur den geringsten Anteil an meinem Weg hatte.