

**Aus der Klinik und Poliklinik für Pädiatrie
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Ch. P. Speer

**Untersuchung der Diversität des T-Zellrezeptor-Repertoires mittels CDR3-Längen
Spectratyping im Rahmen der Immunrestitution nach CD3/19-depletierter versus
CD34-positiv selektionierter Stammzelltransplantation bei pädiatrischen Patienten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lena Lippert

aus Bickenbach

Würzburg, Dezember 2017

Referent:

Prof. Dr. Matthias Eyrich

Koreferent:

Prof. Dr. Jürgen Löffler

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

11.07.2019

Die Promovendin ist Ärztin

*Dem Doktor meines Herzens,
meinem Vater*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Allogene Stammzelltransplantation und Transplantatmodifikationen	1
1.2. Einteilung der Zellen des spezifischen Immunsystems	2
1.3. Der T-Zell-Rezeptor	5
1.4. CDR3-Längen-Spectratyping	6
1.5. Ziel der Arbeit	8
2. Material	10
2.1. Chemikalien und Reagenzien	10
2.2. Enzyme	11
2.3. Molekularbiologische Kits	11
2.4. Geräte	12
2.5. Laborzubehör	13
2.6. Primer und Sonde für qualitative Real Time-PCR	15
2.7. Primer für Immunoscope-PCR	16
2.8. Längenstandard	18
3. Patienten und Methoden	19
3.1. Patienten	19
3.2. Computerprogramme und Datenbanken	20
3.3. CDR3-Spectratyping	20
3.3.1. RNA-Isolation	21
3.3.2. cDNA-Synthese	22
3.3.3. Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	22
3.3.4. Prinzip der „nested“ PCR	24
3.3.5. Prinzip der Real Time-PCR	25
3.3.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
3.4. Durchflußzytometrie	27

3.5. Statistik	29
4. Ergebnisse	30
4.1. Rekonstitution des Immunsystems	30
4.1.1. T-Zell-Rekonstitution: Erreichen einer CD3-T-Zellzahl von >100/ μ	30
4.1.2. T-Zell-Rekonstitution im zeitlichen Verlauf	31
4.1.3. B- und NK-Zell-Regeneration im zeitlichen Verlauf	32
4.2. T-Zell-Rezeptor-Komplexizität	33
4.2.1. Rohdaten	34
4.2.2. Bildliche Darstellung	34
4.2.3. Darstellung anhand eines Boxplots	36
5. Diskussion	37
5.1. Rekonstitution des Immunsystems	38
5.1.1. T-Zell-Rekonstitution	38
5.1.2. NK-Zell-Rekonstitution	41
5.1.3. B-Zell-Rekonstitution	43
5.2. T-Zell-Rezeptor-Komplexizität	43
6. Zusammenfassung	47
7. Literaturverzeichnis	49
8. Abbildungsverzeichnis	54

1. Einleitung

1.1. Allogene Stammzelltransplantation und Transplantatmodifikationen

Die allogene Stammzelltransplantation ist für eine Vielzahl maligner und nicht-maligner Erkrankungen im Kindesalter die einzige erfolgsversprechende Behandlungsmöglichkeit. An erster Stelle stehen hierbei die hämatologischen Erkrankungen, v.a. die Leukämien, sowie verschiedene Anämie-Formen. Auch bei schweren kombinierten Immundefekten und Stoffwechselstörungen kann die allogene Stammzelltransplantation als Therapieoption eingesetzt werden. Allerdings wurde die Anwendung dieser Form der Stammzelltransplantation in der Vergangenheit limitiert durch die Verfügbarkeit eines HLA-identischen Spenders (1). Dieser steht nur circa 30% der Patienten zur Verfügung, bei ethnischen Minderheiten ist die Wahrscheinlichkeit noch wesentlich geringer (2). Über Stammzellspende-Datenbanken ist es zwar mittlerweile häufig möglich nicht-verwandte, HLA-identische Spender zu finden, jedoch dauert dieser Prozess oft mehr als 3 Monate und die Mortalität auf der Warteliste in Deutschland wird dabei als erheblich eingeschätzt (3).

Eine Lösung für dieses Spender-Problem wurde mit der Entwicklung der haploidenten (= HLA-Typ von Empfänger und Spender stimmen nur zur Hälfte überein) allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HHCT) geschaffen, da prinzipiell jedem Kind ein haploidenter Spender in Gestalt seiner Eltern oder Geschwister zur Verfügung steht. Allerdings muss bei einer HHCT zur Vermeidung einer lethalen GvHD immer eine T-Zelldepletion durchgeführt werden, was mit der Gefahr eines Engraftment-Versagens und schweren Infektionen durch verzögerte Immunrekonstitution einhergeht, die zu nichtakzeptabler behandlungsassoziierter Morbidität und Mortalität führten (1). Als ein etabliertes Verfahren zur T-Zelldepletion stellte sich hierbei die Transplantation von positiv selektionierten CD34+ markierten Stammzellen heraus. Diese Methode wurde zum Standard vieler Zentren, da sie eine schnelle und effektive T-Zell-Depletion mit einer akzeptablen

Stammzellregeneration gewährleistet. Dabei wurde die haploidente Transplantation durch die Verwendung einer hohen Anzahl an Stammzellen (das Megadose Konzept) in Kombination mit einem intensiven Konditionierungs-Regime möglich gemacht (4,5). Als Komplikationen dieses Ansatzes stellten sich die hohe Toxizität des Konditionierungs-Regimes (Myeloablative-, Ganzkörperbestrahlungs- oder auf Busulfan basierte Konditionierungsregimes) mit hoher behandlungsassoziierter Mortalität, verzögertem Engraftment und Immunrekonstitution heraus (2).

Aus diesem Grunde zielten neue Strategien von Transplantatmanipulation auf eine Verstärkung des Engraftments und eine Verbesserung der Immunrekonstitution ab (6).

Ein vielversprechender Ansatz hierfür, basierend auf den Erkenntnissen des St. Jude's Childrens Research Hospital Memphis (7, 8), ist die Entwicklung der Transplantation von CD3/CD19 depletierten Stammzellen, bei der T- und B-Zellen mittels antiCD3 und antiCD19 beschichteter Mikrobeads aus dem Transplantat entfernt werden und die Stammzellen unverändert bleiben.

Demnach enthalten die CD3/CD19 depletierten Transplantate nicht nur CD34+ Stammzellen, sondern auch CD34- Progenitorzellen, Natürliche Killerzellen, dendritische- und graft facilitating Zellen, die eine Verstärkung des Engraftments und sogar die Ermöglichung der HHCT nach reduziertem Intensitätskonditionierungsregime (RIC) bewirken (9).

Da NK-Zellen eine große Rolle bei bakteriellen, viralen wie auch Pilzinfektionen spielen, wurden bei Transplantation von CD3/19 depletierten Stammzellen weniger infektassoziierte Komplikationen beschrieben als bei CD34+ selektionierter Stammzelltransplantation (6).

1.2. Einteilung der Zellen des spezifischen Immunsystems

Das spezifische oder adaptive Immunsystem wird durch Lymphozyten repräsentiert. Dabei unterscheidet man B- und T-Lymphozyten, die sich durch klonal verteilte Antigenrezeptoren auszeichnen, welches die molekulare

Grundlage für die außerordentliche Unterscheidungsfähigkeit des spezifischen Immunsystems anhand der CD-Nomenklatur darstellt. Dabei wird eine hoch selektive Bindung zwischen einem Differenzierungsmarker auf Immunzellen mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper, die in Clustern zusammengefasst werden, sichtbar gemacht. CD steht dabei für „cluster determinant“ und repräsentiert das Molekül, das von den Antikörpern eines bestimmten „cluster of differentiation“ gebunden wird (10).

CD 34 ist dabei einer der am häufigsten eingesetzten Marker für die Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Die CD34+ Zellen stellen eine gemischte Population aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen dar, die seit vielen Jahren für die Knochenmarks-Transplantation verwendet werden. Im Gegensatz zu den LT-HSC, den unreifsten Stammzellen, die durch die Abwesenheit von CD34 definiert werden, zählen sie zu den bereits weiterentwickelteren Stammzellen, die das gesamte Blutsystem für wenige Wochen aufrecht erhalten können (11).

CD3 ist ein Marker, der auf Thymus- und T-Zellen exprimiert wird und für Membranexpression und Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors notwendig ist.

Die CD3 + T-Zellen unterteilen sich in CD 3+/CD4+ T-Helfer-Zellen und CD3+/CD8+ zytotoxische bzw. suppressorische T-Zellen. Die T-Helferzellen fungieren als Vermittler für die B-Zell-Funktion und zytotoxische T-Zell-Aktivität und finden sich hauptsächlich im peripheren Blut sowie in Milz, Lymphknoten und Tonsillen. Die zytotoxischen T-Zellen dienen der Abwehr von Viren und intrazellulären Parasiten sowie der Tumorzellzerstörung und sind in Knochenmark sowie lymphatischem Gewebe des Gastrointestinaltraktes, der Atem- und Harnwege lokalisiert (12).

Sowohl T-Helfer-Zellen als auch zytotoxische T-Zellen gehören zur Gruppe der T-Effektorzellen mit einer relativ kurzen Lebensspanne. Dahingegen gibt es eine kleine Gruppe von T-Gedächtniszellen ($\leq 5\%$ aller T-Effektorzellen), welche im Blut verbleiben und die einzigartige Fähigkeit besitzen, selbst Jahre nach einer Primärantwort bei einer entsprechenden Antigen-Reexposition eine adäquate Immunantwort zu bilden.

Zwischen Blut und lymphatischem Gewebe zirkulieren die sogenannten naiven T-Zellen, die zuerst aktiviert werden müssen bevor sie oben beschriebene Effektorfunktionen ausführen können. Sie legen ein sogenanntes Migrationsverhalten an den Tag, bei dem sie über Expression von Zytokinen und Rezeptoren für Chemokine spezifisch Zugang zu Antigen-präsentierenden Zellen des lymphatischen Systems erhalten (12).

CD 19+ Zellen sind ausschließlich B-Zellen, deren Funktion vor allem in der spezifischen Erregerabwehr durch die Immunglobulinsynthese liegt (10).

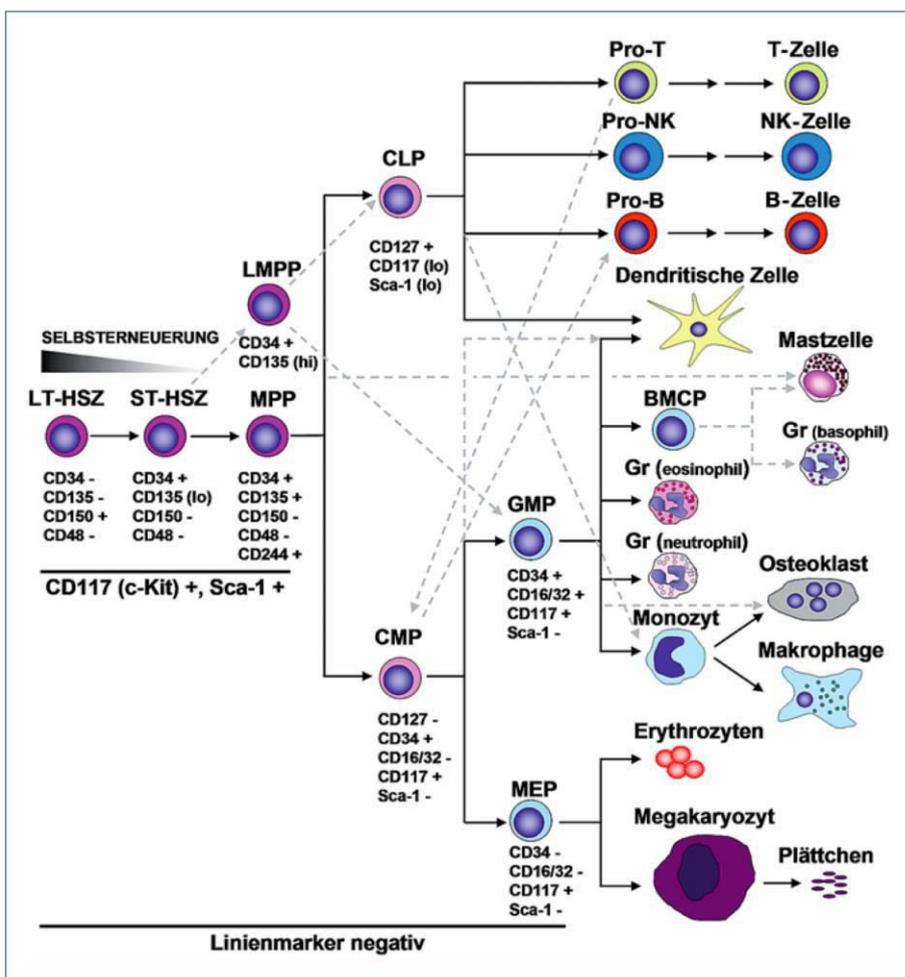


Abb. 1. Schema der adulten murinen Hämatopoese (12): LT-HSZ=unreife Blutstammzellen, ST-HSZ= reifere Stammzellen, MPP=multipotente Vorläufer, LMPP=lymphoidgeprägte multipotente Vorläufer, CLP=lymphoide Vorläufer, MEP=megakaryozytär-erythroide Vorläufer, GMP=granulozytär-monozytäre Vorläufer, BMCP=Mastzell- und basophile Granulozyten-Vorläufer, Gr=Granulozyte, Lo=niedrig, Hi=hoch

1.3. Der T-Zell-Rezeptor

Der T-Zell-Rezeptor ist die Funktionseinheit für die Antigenerkennung der T-Zellen und ermöglicht die große Variabilität dieses Zelltyps mit Entwicklung und Regulierung einer effektiven Immunantwort. Dabei gibt der T-Zell-Rezeptor nach Antigenerkennung und -Bindung ein Signal ins Zellinnere, welches dort eine Informationskaskade auslöst. Die T-Zelle kann nun unter Mitwirkung von Proteasen, Zytotoxinen und Perforin die Zielzelle lysieren (10).

Der T-Zell-Rezeptor ist ein fest in der Zytoplasmamembran der T-Zellen verankertes Heterodimer, bestehend aus zwei Polypeptidketten (in der Mehrzahl α und β -Kette; in nur 5-15% γ und δ), die jeweils einen transmembranären, einen konstanten und einen variablen Anteil besitzen. Die beiden Ketten werden durch Disulfidbrücken in ihrer Peptidsequenz zwischen dem konstanten und dem transmembranären Segment verbunden.

Der transmembranäre Abschnitt aller T-Zell-Antigenrezeptorketten weist positiv geladene Aminosäuren auf, die für die Interaktion mit den CD 3-Molekülen und damit für die Signaltransduktion von Bedeutung sind.

Die einzelne T-Zelle exprimiert circa 30.000 Antigenrezeptoren eines einzigen Typs (α/β oder γ/δ) und (in der Regel) einer einzigen Spezifität. Die Antigenspezifität des T-Zell-Rezeptors wird bestimmt durch hypervariable Molekülabschnitte der Rezeptorenketten im Bereich der V-Region. Diese Abschnitte bilden an der Moleküloberfläche exponierte Schleifen, welche als komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR= complementary-determining region) bezeichnet werden. Jede T-Zell-Antigenrezeptor-Kette besitzt insgesamt 3 CDR (CDR 1-, 2- und 3-Schleife). Die CDR-3-Schleife besitzt eine beträchtliche Variabilität in ihrer Aminosäuresequenz und ist deshalb für die Bindung an Antigenpeptide verantwortlich (13).

Wie genau kommt nun die Spezifität der einzelnen T-Zelle zustande?

Die variable Region der β -Kette zum Beispiel setzt sich aus 4 Segmenten zusammen: der V-, D-, J- und C-Region, welche gemeinsam die CDR3-Region bilden. Ein humaner T-Zell-Rezeptor (TCR) hat eine $V\beta$ -Kette bestehend aus

einem der 52 möglichen V β -Untersegmente, daran schließt sich eine der 2 D-Regionen an, die gefolgt ist von einem Segment der 13 J β -Gene. Am Ende der CDR3-Region befindet sich die C-Region die relativ konserviert ist und durch zwei unterschiedliche Gene kodiert sein kann. Durch somatische Rekombination während der Entwicklung der V β -Rezeptorkette werden die einzelnen Gene durch Umlagerung so angeordnet, dass eine vollständige Sequenz entsteht. Dieser molekulare Vorgang ist mit jenem der Immunglobulin-Umlagerung identisch. Dabei kommt es durch inkorrekte Rekombination und dem zufälligen Einfügen von P- und N-Nukleotiden an den Vereinigungsstellen der V-, D- und J-Gene zu einer weiteren Erhöhung der Variabilität. Gemeinsam führen diese Vorgänge zu einer Diversität der Antigenpezifität von ungefähr 10^{15} für die α/β -T-Zell-Antigenrezeptor-positiven Lymphozyten (14, 15). Damit ergibt sich eine große Anzahl unterschiedlicher T-Zellen, die mit einer Vielzahl von Antigenen reagieren können. Anhand der CDR3-Region kann ein einzigartiger TCR definiert werden, der, vergleichbar einem Fingerabdruck, einem einzigen T-Zell-Klon zugeordnet werden kann (16). Durch Candeias et al. 1991 definiert, beginnt die CDR3-Region am Serin der Peptidkette N-FCAS-C der Vbeta-Kette und endet am Phenylalanin im konservierten Teil der mJbeta-Region N-FGXG-C (17). Mit der Untersuchung des CDR3-Spectratyping kann somit ein TCR anhand seiner CDR3-Region identifiziert werden.

1.4. CDR3-Längen-Spectratyping

Das CDR3-Längen-Spectratyping hat sich in den letzten Jahren zu einem etablierten Verfahren zur Analyse einer Immunantwort entwickelt. Diese Untersuchung wurde 1992 von Cochet et al. (18) entwickelt und wird abhängig von den verwendeten Primern „Spectratyping“ (19) oder „Immunoscope“ (14) bezeichnet. Dieses Verfahren ermöglicht es, ein T-Zell-Repertoire auf klonaler Ebene zu untersuchen, wobei die β -Kette des T-Zell-Rezeptors als Identifikationsstruktur verwendet wird.

Dieses Verfahren nutzt die Längenheterogenität der CDR3-Region als einen Marker für die Analyse des T-Zell-Rezeptor-Repertoires. Die Komplexität des TCR-Repertoires korreliert mit dem Status der Immunfunktion eines Individuums. Dabei stellen Lücken oder Minderungen der Komplexität ein Anzeichen für z.B. eine Immundefizienz oder rezidivierende Infektionen in einem Individuum dar (19).

Da beim Menschen 24 funktionelle Genfamilien von V β -Genabschnitten existieren, muss für jede Familie ein spezifischer Primer erzeugt werden, der in der Polymerasekettenreaktion gemeinsam mit einem spezifischen Primer für die C β -Region eingesetzt werden kann. In der PCR erfolgt durch Amplifizierung aller CDR3-Sequenzen einer V β -Familie ein Pool von CDR3-Fragmenten, die in ihrer Länge differieren.

Das CDR3-Spectratype eines Gesunden weist typischerweise den Gebrauch aller V β -Familien und eine Gaußsche Normalverteilung der Fragmentlängen innerhalb einer Familie auf. Dabei sind 6-10 Banden unterschiedlicher Länge je durch einen Abstand von 3 Basen voneinander getrennt. Die an Intensität stärkste Bande befindet sich in der Mitte, die an Intensität schwächeren Banden sind ober- und unterhalb davon lokalisiert (siehe Abb. 4.2.2)

Als ein Abweichen von dieser Längenverteilung würde sich z.B. eine Expansion eines einzelnen oder einiger weniger T-Zell-Klone durch eine verstärkte Intensität einer Einzelbande zeigen, die für eine ausgeprägte Expression einer bestimmten CDR3-Region spricht (16).

Nach Erkenntnissen von Gorski et al. repräsentiert ein Spectratype des peripheren Blutes eines Empfängers direkt nach einer Knochenmarkstransplantation die Diversität der engrafteten T-Zellen des Spenders. Häufig dauert es Monate bis Jahre nach einer HHCT, bis sich das Verteilungsmuster der T-Zellrezeptordiversität (=Spectratype) wieder vollständig normalisiert hat (19).

Folglich kann dieses Verfahren gut zum Monitoring der Immunrekonstitution nach Transplantation eingesetzt werden, was wir uns auch in dieser Arbeit zu Nutzen machen. Eine breite Diversität des T-Zell-Repertoires ist ein Indikator für eine gute Immunrekonstitution, da es ein großes Spektrum an T-Zellen

liefert, die auf diverseste Umweltantigene reagieren können. Spectratypes gesunder Menschen sind sowohl komplex als auch stabil. Dahingegen findet man im Repertoire eines an rezidivierenden Infektionen leidenden Individuums Lücken und Einschränkungen, die zu einer beeinträchtigten T-Zell-Funktion führen (19). Auch können durch die TCR-Diversität Rückschlüsse auf die Thymusregeneration gezogen werden, da die T-Zell-Regeneration zwei Wege verfolgt. Der erste Weg ist die sogenannte periphere Expansion von reifen T-Zellen aus dem Spender-Präparat. Dieser charakterisiert die frühe Phase der Regeneration. Die „de novo-Reifung“ charakterisiert das spätere Stadium und stellt die Reifung von naiven T-Zellen der Knochenmarks-Emigranten im Thymus dar. Diese füllt das verzerrte Verteilungsmuster der peripheren Expansion auf und ist auf eine Thymus(rest)funktion angewiesen (9).

1.5. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Verlauf der Immunrekonstitution in einer Kohorte pädiatrischer Patienten nach CD3/CD19-depletierter haploidenter Stammzelltransplantation und zieht einen direkten Vergleich zu den Ergebnissen einer Studie bzgl. Immunrekonstitution von Kindern nach CD34+ selektionierter HHCT (9).

In unserer Studie erfolgte das Immunmonitoring

- 1.) nach phänotypischer Analyse der Lymphozyten-Unterklassen mittels FACS-Analysen und
- 2.) der Analyse des T-Zellrepertoires unter Verwendung des CDR3-Längen Spectratypings.

Dabei wurden bei der Frage nach dem Mehrwert der CD3/19-Depletion in der Gruppe der haploidenten Transplantationsmethoden im Vergleich zur CD34+-Selektion vor allem folgende Unterpunkte berücksichtigt:

- Ist das T-Zellengraftment durch die CD3/19-Depletion im Vergleich zur CD34+-Selektion beschleunigt?
- Kann die Diversität des T-Zellrezeptor-Repertoires und damit die Immunrestitution durch die CD3/19-Depletion qualitativ verbessert werden?

2. Material

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München, Deutschland
Blue Stop Solution (Ladepuffer)	New England, Bio Labs ® Inc., Ipswich, MA, USA
Desoxynucleosidtriphosphate 10mM	GENAXXON bioscience, Biberach, Deutschland
Essigsäure 10%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LI-COR DNA-Längenstandard (50-350bp) IRDye 700&800	LI-COR GmbH, Bad Homburg, Deutschland
10xPCR-Puffer S (mit 15mM Magnesiumchlorid)	GENAXXON bioscience, Biberach, Deutschland
Magnesiumchlorid 25mM	GENAXXON bioscience, Biberach, Deutschland
RNase Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, steril (DNase/RNase frei)	Sigma, München, Deutschland
TaqMan Universal PCR Master Mix für RealTime-PCR	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

OligodT-Primer (20µM) für cDNA-Synthese	Roche, Mannheim, Deutschland
10xTBE-Puffer pH 8,4 (Tris, Borat, EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sequa Gel XR (Acrylamid, N,N`- Methylene bisacrylamid , Urea)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Sequa Gel Complete (Temed-Puffer)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
3-Propylmethacrylate 98% (Stocklösung zur Herstellung der Bindesilane)	Sigma, München, Deutschland

2.2. Enzyme

Taq-Polymerase	GENAXXON bioscience, Biberach, Deutschland
----------------	---

2.3. Molekularbiologische Kits

Kit für cDNA-Umschrieb	SuperScript III Reverse Transcriptase Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kit zur RNA-Isolation	GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit, Sigma, München,

Deutschland

2.4. Geräte

Durchflußzytometer (Immunstaten im Rahmen der Routinediagnostik erhoben)	FACS Calibur BD, Heidelberg, Deutschland
DNA-Sequenziergerät	LI-COR DNA Analyzer NEN Model 4300 Bad Homburg, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Heraeus HERAsafe Thermo Scientific Kendro, Hanau, Deutschland
Real-Time PCR Gerät	7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler epgradient Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät	Retsch, Haan, Deutschland
Waage	Mettler, Gießen, Deutschland
Zentrifugen	Rotanta 460RS, Hettich, Tuttlingen,

	Deutschland Mikro 200R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland Galaxy Mini, VWR, Darmstadt, Deutschland
12 Kanal-Pipette 0,5-10µl 10-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 0,1- 2,5µl 0,5-10µl 10-100µl 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Accu-Jet Braun, Melsungen, Deutschland

2.5. Laborzubehör

Verschiedene Glaswaren (Bechergläser, Meßzylinder)	Fortuna®, Poulten&Graf, Wertheim a. Main, Deutschland
Abdeckfolie Aluminium/Transparent	Greiner, Frickenhausen Deutschland
Injektionskanülen (verschiedene Größen)	BD, Heidelberg, Deutschland
Multipipettenspitzen Combitips (0,5ml, 1ml, 2,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

PCR Reaktionsgefäße Thermo- Strips + zugehörige Cap-Strips	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PCR Reaktionsplatten	Greiner BIO-ONE Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen steril (10µl, 100µl, 1000µl)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen unsteril (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimwipes Lite®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RT-PCR Reaktionsgefäße Optical Tube-Strips + zugehörige Optical Caps	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
RT-PCR Reaktionsplatten MicroAmp Optical	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 2ml, 3,5ml	Sarstedt Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäßhalter	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
Stabpipetten 5ml, 10ml	Costar Stripette

Corning, New York, USA

Spritze 20ml

Braun, Melsungen, Deutschland

Untersuchungshandschuhe
Vinyl

Asid BONZ, Herrenberg,
Deutschland

Untersuchungshandschuhe
Latex

Cardinal Health, Dublin, OH, USA

2.6. Primer und Sonde für qualitative Real Time-PCR

Die Synthese der Primer und der Sonde erfolgte nach Vorgabe der Sequenzen unsererseits durch die Fa. Biomers, Ulm. Die Sonde war am 5'-Ende mit 6-Fam und am 3'-Ende mit Tamra markiert.

Geliefert wurden die Produkte als Lyophilisat und hier in Aqua dest gelöst (Endkonzentration Primer 20µM, Sonde 10µM).

Die Primer und die Sonde wurden bei 5°C gelagert.

Tabelle 1: Primer und Sonde für Real Time-PCR

Primer/Sonde	Sequenz
RT_BC forward	5'-GGC CAC CTT CTG GCA GAA C-3'
RT_BC reverse	5'-TCT CCG AGA GCC CGT AGA ACT-3'
RT_BC Sonde	5'-CCG CAA CCA CTT CCG CTG TCA AG-3'

2.7. Primer für Immunoscope-PCR

Die verwendeten Primer für die Immunoscope-PCR und Immunoscope Nested-PCR wurden nach Vorgabe der Sequenzen unsererseits durch die Fa. Biomers, Ulm synthetisiert. Die BC3-Primer wurden ungelabelt verwendet, während die BC4-Primer an ihrem 5'-Ende IRDye 700 bzw. -800 markiert waren.

Alle Primer wurden als Lyophilisat geliefert, in sterilem Wasser gelöst (Endkonzentration Vβ 20µM; BC3/4 10µM) und aliquotiert.

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 2: Primer Vβforward für die Identifizierung der langen Fragmentabschnitte des T-Zell-Rezeptors

Primer	Sequenz
Vbeta 18	5`-CAA AGA GGG CCC CAG CAT C-3`
Vbeta 6b1	5`-CAG GGG CCA GAG TTT CTG AC-3`
Vbeta 6b2	5`-CAG GGC TCA GAG GTT CTG AC-3`
Vbeta 4	5`-CAT CAG CCG CCC AAA CCT AA-3`
Vbeta 13a	5`-GGT ATC GAC AAG ACC CAG GCA-3`
Vbeta 11	5`-GTC AAC AGT CTC CAG AAT AAG G-3`
Vbeta 8	5`-GGT ACA GAC AGA CCA TGA TGC-3`
Vbeta 20	5`-TGC CCC AGA ATC TCT CAG CCT CCA-3`
Vbeta 2	5`-ACA TAC GAG CAA GGC GTC GA-3`
Vbeta 13b	5`-AGG CTC ATC CAT TAT TCA AAT AC-3`
Vbeta 6a1	5`-GAT CCA ATT TCA GGT CAT ACT G-3`
Vbeta 6a2	5`-GAT CCA ATT TCA GGT CAT AAT G-3`
Vbeta 14	5`-GGG CTG GGC TTA AGG CAG ATC TAC-3`
Vbeta 5	5`-GAT CAA AAC GAG AGG ACA GC-3`

Tabelle 3: Primer Vβforward für die Identifizierung der kurzen Fragmentabschnitte des T-Zell-Rezeptors

Primer	Sequenz
Vbeta 9	5`-TTC CCT GGA GCT TGG TGA CTC TGC-3`
Vbeta 23	5`-ATT CTG AAC TGA ACA TGA GCT CCT-3`
Vbeta 16	5`-GCC TGC AGA ACT GGA GGA TTC TGG-3`
Vbeta 3	5`-GTC TCT AGA GAG AAG AAG GAG CGC T-3`
Vbeta 22	5`-GAT CCG GTC CAC AAA GCT GG-3`
Vbeta 21	5`-GGA GTA GAC TCC ACT CTC AAG-3`
Vbeta 24	5`-GAC ATC CGC TCA CCA GGC CTG-3`
Vbeta 15	5`-CAG GCA CAG GCT AAA TTC TCC CTG-3`
Vbeta 17	5`-TGT GAC ATC GGC CCA AAA GAA-3`
Vbeta 7	5`-CAA GTC GCT TCT CAC CTG AAT GC-3`
Vbeta 12A	5`-TCC CCC TCA CTC TGG AGT C-3`
Vbeta 12B	5`-TCC TCC TCA CTC TGG AGT C-3`
Vbeta 1	5`-CCG CAC AAC AGT TCC CTG ACT TGC-3`

Tabelle 4: Reverse Primer

Primer	Sequenz
BC3	5`-CCT TTT GGG TGT GGG AGA TCT C-3`
BC4	5`-CTC TGC TTC TGA TGG CTC AAA CAC-3`

2.8 Längenstandard

50-350 BP concentrated sizing standard IRDye 700&800,
LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA

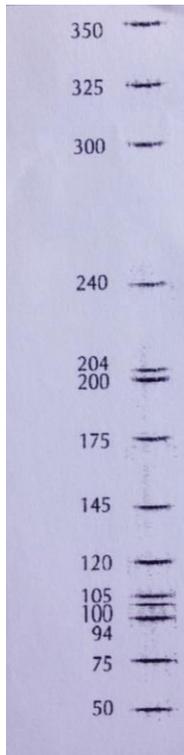


Abbildung 2: verwendeter Längenstandard

3. Patienten und Methoden

3.1. Patienten

A) Durchflusszytometrie

Hierbei untersuchten wir 10 Patienten aus unserer Klinik, die zwischen 11/2005 und 06/2010 eine Transplantation mit CD3/19-depletierten Stammzellen erhielten.

Direkt nach Transplantation folgten für die ersten 3 Monate engmaschige durchflusszytometrische Untersuchungen ca. 1x/ Woche und im weiteren Verlauf in der Regel monatliche Untersuchungen.

B) Spectratyping

Das Patientenkollektiv unserer Studie umfasste 43 Patienten mit einem mittleren Alter von $16,1 \pm 8,6$ Jahren bei Transplantation [Schwankungsbreite 2 Monaten-26 Jahren], die zwischen 04/2009 und 03/2012 eine haploidente Stammzelltransplantation mit CD3/19-depletierten Stammzellen erhielten. Davon waren 10 Patienten weiblich und 33 männlich . 6 Patienten wurden am St. Anna Kinderspital Wien transplantiert, 31 Patienten an der Universitätskinderklinik Frankfurt am Main und 6 Patienten an unserer Klinik. Klinische Daten zum Transplantat waren nur vom Würzburger Kollektiv verfügbar, die mittlere (\pm Standardabweichung) übertragene Stammzellzahl in dieser Teilkohorte betrug $10,7 \pm 3,1 \times 10^6$ CD34⁺/kg Empfängergewicht, die mittlere T-Zelldosis $57,4 \pm 27,7 \times 10^3$ CD3⁺/kg. Die Patienten in diesem Kollektiv hatten folgende Diagnosen: ALL (n=2), AML (n=1), Rhabdomyosarkom (n=2) und infantiles Fibrosarkom (n=1).

3.2. Computerprogramme und Datenbanken

Geschrieben wurde diese Arbeit mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word 2010.

Als Software für die DNA Analyse wurden die Programme e-Seq V3.0 von LICOR und Gel-Pro Analyzer von Media Cybernetics verwendet.

3.3. CDR3-Spectratyping

Das Prinzip und das Untersuchungsziel des Spectratyping wurde bereits im Kapitel „Einführung“ (siehe 1.4.) beschrieben. Das Spectratype benutzt die Möglichkeit der PCR-Untersuchung um cDNA-Vorlagen zu amplifizieren und mit spezifischen C β -Primern sowie jeweils einem der 24 V β -Primern zusammenzubringen. Durch diese Amplifizierung aller CDR3-Sequenzen einer V β -Familie entsteht ein Pool von, in ihrer Länge differierenden CDR3-Fragmenten, die im nächsten Schritt auf einem Polyacrylamid-Sequenzier-Gel sichtbar gemacht werden können.

Zu Beginn dieses ganzen Prozesses steht die RNA-Isolation. Im darauf folgenden Schritt muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden, bevor die PCR-Reaktion angesetzt werden kann.

Um zu unseren Ergebnissen zu gelangen, kamen in unserer Versuchsphase einige andere PCR-Methoden (Real-time-PCR, Nested-PCR) zum Einsatz, die im folgenden ebenfalls beschrieben werden.

3.3.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte, unter Verwendung des Sigma GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kits, in vier Schritten mit den ficollierten Blutproben als Ausgangsmaterial:

- 1) Lyse der Proben (5x10.000.000 Zellen):
Hierbei werden jeweils 1 ml der Probelösungen mit 8 ml PBS versetzt. Nach 6-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14500 G kann der flüssige Überstand abpipettiert werden, bis ein Pellet am Boden übrig bleibt. Dieses wird nun mit 250 ml Lyse Puffer, bestehend aus 2-Mercaptoethanol und Lyse Lösung, im Verhältnis 1:100 gemischt und das Lysat in eine blaue Filtrationssäule (Kit) transferiert.
- 2) Binden der RNA:
Zur Beseitigung von zellulären Bestandteilen wird eine zweiminütige Zentrifugation bei 15000 G vorgenommen. Danach wird dieselbe Menge des jeweiligen Probenvolumens an 70%igen Ethanol zum Filtrat dazugegeben, die Lösung kräftig durchmischt und in eine Bindsäule umpipettiert, deren Filtereinsatz die Gesamt-RNA nach Zentrifugation zurückhält.
- 3) Auswaschen der Kontaminanten:
Beim ersten Waschzyklus werden 500 µl Waschlösung 1 (Kit) hinzugegeben und eine 15 Sekunden andauernde Zentrifugation bei 15000 G durchgeführt. Der zweite und dritte Waschschritt erfolgt durch Zugabe von jeweils 500 µl Waschlösung 2 (Kit) mit einer Zentrifugationsdauer von 15 Sekunden beim zweiten und zwei Minuten beim dritten Zyklus, da bei letzterem das Ethanol aus der Lösung entfernt werden soll. Der Durchfluss wird nach jedem Schritt verworfen.
- 4) Lösen der isolierten RNA:
Das Lysat wird mit 30 µl Elutionslösung (Kit) versetzt und eine Minute bei 15000G zentrifugiert, woraufhin die reine RNA vorliegt.

3.3.2. cDNA- Synthese

Für den Umschrieb von RNA in cDNA wurde der „Superscript Kit“ verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

Mit dem Ziel der Herstellung komplementärer DNA-Stränge wurde für jeweils einen Ansatz 9,5µl RNA, 1µl dNTP`s (Kit) und 2,5µl oligodT (Kit) zusammengegeben, dieser zur Denaturierung für 5 min bei 65°C im Cycler erhitzt und daraufhin zur Verhinderung einer Renaturierung sofort auf Eis gestellt.

Um den Pipettierfehler bei der Umsetzung der RNA so gering wie möglich zu halten, wurde für alle Proben ein gemeinsamer Mastermix als Pool vorbereitet.

Die dazu verwendeten Reagenzien stammen ebenfalls aus dem Kit. Pro Ansatz wurden 4 µl RT-Puffer, 1 µl DTT, 1 µl RNase Inhibitor und zuletzt 2 µl Superscript-RT zusammengegeben und vorsichtig durchmischt. Von diesem Mastermix wurden jeweils 7 µl auf die einzelnen RNA Ansätze verteilt, sodass sich ein jeweiliges Gesamtvolumen von 20 µl ergibt. Es folgte eine 50 minütige Inkubation bei 50°C, weitere 15 min standen die Proben bei 70°C im Cycler und wurden schließlich auf Eis gestellt.

3.3.3. Prinzip der Polymerase- Kettenreaktion

Die Polymerase- Ketten- Reaktion ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich in jeder neuen Runde die Anzahl der DNA- Kopien verdoppelt. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung, bei der die Einzelstränge der Ziel- DNA durch Erhitzen voneinander getrennt werden. Im Anschluss wird die Reaktion abgekühlt, um eine spezifische Primeranlagerung an die komplementäre Zielregion zu ermöglichen. Die DNA- Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* , verlängert die Primer unter Verwendung der zugegebenen dNTP`s, die in einem geeigneten Puffer gelöst sind und komplettiert sie zu einem Doppelstrang. Bei einem Temperaturoptimum von

72°C synthetisiert die Taq-DNA-Polymerase DNA mit einer Geschwindigkeit von 35-100 Nukleotiden pro Stunde.

So entstehen Kopien der ursprünglichen Zielregion. Dieser Zyklus wird in der Regel 20-40 Mal wiederholt (20).

Ansatz der Immunoscope- PCR:

- 1µl cDNA
- 5µl Puffer S [10x]
- 2µl DNTP`s
- 6µl MgCl [25x]
- 0,25µl Taq Polymerase
- 5µl Primer forward (Vβ-Primer, nach Schemata siehe Tab.)
- 1µl Primer reverse (BC_3-Primer)
- 29,75µl Aqua dest

Σ 50µl

Tabelle 5: Primeranordnung bei Immunoscope-PCR

SPUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A TCRV	9	23	16	3	22	21	24	15	17	7	12	1
B TCRV	18	6b	4	13a	11	8	20	2	13b	6a	14	5

3.3.4. Prinzip der „nested“ PCR

Die nested PCR (=geschachtelte PCR) ist ein hochsensitives PCR-Verfahren, bei dem zwei PCR-Reaktionen nacheinander geschaltet werden. Das Annealing erfolgt hierbei auf dem Amplifikat der ersten PCR, die nun als Matrize fungiert. In unseren Versuchen werden ein V β -Primer der ersten Runde und ein neuer, eingerückter Primer verwendet.

Durch diese verschachtelte Form der PCR erhöht sich die Empfindlichkeit und die Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich. Die Ursache für die höhere Spezifität kommt dadurch zustande, dass bei dieser Methode nahezu alle falschen unspezifischen Kopien unberücksichtigt bleiben. Denn nach der ersten PCR-Runde bieten die unspezifischen Produkte nicht mehr genügend komplementäre Sequenzen für den weiter nach innen eingerückten Primer und scheiden damit in den weiteren Runden als Matrize aus. Aus diesem Grund wird vorzugsweise die Zielsequenz amplifiziert.

Ansatz „nested“ PCR:

2 μ l	PCR-Amplifikate aus Immunoscope-PCR
2,5 μ l	Puffer S [10x]
1 μ l	dNTP`s
3 μ l	MgCl [25x]
0,125 μ l	Taq- Polymerase
5 μ l	Primer forward (V β -Primer)
1 μ l	Primer reverse (BC_4-Primer, _700- oder 800-markiert)
<u>10,375μl</u>	<u>Aqua dest</u>

Σ 25 μ l

3.3.5. Prinzip der Real- Time- PCR

Das Prinzip der Real Time-PCR beruht auf einer normalen Polymerase Ketten Reaktion, auch hier wird mittels zweier genspezifischer Primer das zu untersuchende DNA-Fragment vervielfältigt. Zusätzlich wird hierbei eine Sonde verwendet, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist und sequenzspezifisch an das vervielfältigte PCR-Produkt bindet. Wenn die beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch die Sonde in unmittelbarer Nähe zum Liegen kommen, wird, nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des Reporterfarbstoffes (R) auf den Quencherfarbstoff (Q) übertragen, woraufhin nur dieser Licht emittiert. Während der PCR werden beide Primer mittels der Taq-Polymerase so lange verlängert, bis sie auf die Sonde treffen. Dort wird diese dann von dem DNA-Strang gelöst und mit Hilfe der 5' Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Das Resultat ist, dass die beiden Fluoreszenzfarbstoffe voneinander getrennt werden und somit kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Es können nun also beide Fluoreszenzfarbstoffe Licht emittieren.

Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes sollte proportional zur gebildeten DNA-Menge sein. Durch die Messung dieser entstehenden Fluoreszenz kann zu jedem Zeitpunkt während der PCR-Reaktion die Menge des entstehenden Produktes berechnet werden. Durch Verwendung von Standards mit bekannten Konzentrationen an Ausgangsmaterial kann die Menge des in der Probe ursprünglich vorhandenen Targets bestimmt werden, was in unserem Falle zur Kontrolle der cDNA nach dem Umschreibungsvorgang (RNA zu cDNA) herangezogen wurde.

Ansatz RT- PCR:

10µl	Universal Mastermix
0,5µl	Sonde [.10µM]
0,5µl	BC_Primer forward [20µM]
0,5µl	BC_Primer reverse [20µM]
7,5µl	Aqua dest
1µl	<u>cDNA</u>
Σ 20µl	

3.3.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Herstellung der 8%igen Polyacrylamidgele:

Das 8%ige Polyacrylamidgel besteht aus 20 ml Polyacrylamid, 5 ml Pufferlösung mit Temed und 200 µl Ammoniumpersulfat (APS). Die Zugabe von APS erfolgte erst kurz vor dem Gießen des Gels, um eine vorzeitige Polymerisation im Gefäß zu verhindern. Zügig wurde die flüssige Gelmatrix nun zwischen zwei gereinigte Glasplatten gegossen, denen ein Spacer einen Abstand von 1,5 mm voneinander verleiht. Eventuell entstandene Luftblasen wurden entweder durch leichtes Anklopfen oder mithilfe von sogenannten Bubble-hooks entfernt. Um Probenauftragstaschen zu erhalten, wurde am oberen Ende ein Kamm mit 48 Zacken zwischen beide Glasplatten gesteckt. Nach 60min bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert. Der Kamm konnte entfernt werden und die Glasplatten wurden aufrecht in die Gelelektrophoresekammer eingespannt.

Gelelektrophorese:

Die, während der PCR noch isoliert voneinander laufenden, einander zugehörigen langen und kurzen Fragmente der Vbeta Familien (z.B. Vbeta 18

und Vbeta 9) wurden mit einem jeweiligen Einzelvolumen von 2 µl in einer neuen 96well Platte zusammenpipettiert. Um insgesamt 8 Patientenproben auf einem Gel unterzubringen, wurden die mit BC4_700 markierten PCR-Produkte mit den BC4_800 Markierten ebenfalls zusammenpipettiert und alle Proben im Verhältnis 1: 2 mit Wasser verdünnt. Des Weiteren erfolgte eine Versetzung der Produkte mit Ladepuffer im Verhältnis 2: 1 und eine darauffolgende 4-minütige Denaturierung bei 75°C im Thermocycler, um eine Doppelstrangbildung zu verhindern.

Nach Zentrifugation der Produkte und einem 15- minütigen Vorlauf des Polyacrylamidgels, wurden 0, 4 µl jeder Probe auf das Gel aufgetragen.

Das Auftragungsschema lautet:

Lane 1/50: Size Marker_700+_800

Lane 2-13/14-25/26-37/38-49: Proben (jeweils _700+_800)

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 1500V, 40mA und 45°C für 2 Stunden, unter Verwendung von 1xTBE- Pufferlösung als Laufpuffer.

Analyse des Polyacrylamidgels

Anhand der fluoreszenzmarkierten Primer konnte die Software des LI-COR-Geräts e-Seq die PCR-Produkte analysieren. Es erfolgt sowohl eine EDV-kompatible als auch eine photographische Dokumentation der Gele.

3.4. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie, oder auch FACS (fluorescence activated cell sorter)-Analyse, werden einzelne, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel durch Streulicht und Fluoreszenzsignale analysiert. Im Analysepunkt des Durchflusszytometers werden die Zellen durch einen umgebenden Flüssigkeitsstrom fokussiert und von einem Laser beleuchtet. Das Streulicht

einer jeden beleuchteten Zelle hat dabei aus physikalischen Gründen eine unterschiedliche Qualität und Quantität. Faktoren wie Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Struktur der Membran sowie intrazelluläre Bestandteile wirken sich auf die Lichtstreuung aus. Je unregelmäßiger die Partikelbeschaffenheit, umso größer ist das Streulicht, das die Zelle erzeugt. Zwei Photodetektoren erkennen das Streulicht: der Sideward- und der Forward-Scatter, die jeweils die Seitwärts- und die Vorwärtsstreuung detektieren. Im peripheren Blut können damit Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten ohne Markierung bereits durch ihre Größe (gemessen durch den Forward-Scatter, FSC) und ihre Granularität (gemessen durch den Sideward-Scatter, SSC) unterschieden werden. Die Populationen werden elektronisch eingegrenzt („gated“). Dabei entsteht ein sogenannter Scatter-Plot (21).

Nun folgt die Phäotypisierung der verschiedenen Populationen mittels CD-spezifischer, monoklonaler Antikörper, die an Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, PE, PerCP, APC) gekoppelt sind und mit denen die Zellen zuvor inkubiert wurden. Dabei kommen vier weitere Detektoren des Durchflusszytometers ins Spiel, die die Farben der Fluoreszenzfarbstoffe detektieren. Die Konstruktion der Farbstoffe ist so, dass alle das Licht der Wellenlänge von 488 nm (Argonglas-Emission bei 519 nm, grün) absorbieren, jedoch bei verschiedenen Wellenlängen abstrahlen (unterschiedlicher Stoke`s Shift). Die Photonen werden von den Photodetektoren mit Hilfe von verschiedenen Verstärkern in elektrische Impulse umgesetzt. Die auftreffenden Fluoreszenzsignale werden von einem logarithmischen Amplifikator nach ihrer Intensität (ca. 4 Dekaden) sortiert und von einem analogen Digital-Konverter erneut, in Abhängigkeit ihrer Stärke, in bestimmte Gruppen eingeteilt. Dadurch entsteht ein Histogramm, in dem nach rechts die Fluoreszenzintensität und nach oben die Anzahl der Ereignisse aufgetragen ist.

Außerdem kann die graphische Darstellung in Form eines Zweiparameterpunkte-Diagrammes erfolgen (Dot-Plot). Dabei steht jeder Punkt für eine bestimmte Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Eine Korrelation aller Parameter ist möglich (z.B. FSC/SSC), nachdem die verschiedenen Fluoreszenzsignale miteinander auskompensiert wurden. Das funktioniert durch

eine teilweise Überschneidung in den Bereichen des von den Farbstoffen emittierten Lichtes: ein Teil des FITC-Signals wird auch vom PE-Detektor erkannt und erscheint als falsches PE-Signal (spektrale Überstrahlung der Zytochrome). Beim Kompensieren wird der Teil des FITC-Signals, der in das PE-Signal hineinleuchtet, von diesem abgezogen. Auf diese Art werden alle vier Farben gegeneinander auskompensiert.

In der Durchflusszytometrie werden die Zellen somit durch sechs Parameter gemessen: FSC und SCC als Kriterien der Morphologie sowie vier Fluoreszenz-Signale (PE, APC, FITC, PerCP), mit denen die Zellen antikörper-gebunden inkubiert wurden (22).

3.5. Statistik

Die Patientendaten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel zusammengetragen und in Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) durch BoxPlots, Histogramme und Liniendiagrammen graphisch dargestellt.

Der parameterfreie, statistische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde zum statistischen Vergleich der Werte nach CD3/CD19-depletierter versus CD34⁺-selektionierter Stammzelltransplantation zu definierten Zeitpunkten eingesetzt. Ein p-Wert < 0,1 wurde dabei als statistische Signifikanz zwischen beiden Gruppen angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Rekonstitution des Immunsystems

4.1.1. T-Zell-Rekonstitution: Erreichen einer CD3- T-Zellzahl von > 100/ μ l

Die Rekonstitution der CD3⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bei 10 Würzburger Patienten unseres Studienkollektivs nach CD3/19 Depletion des Transplantates gemessen. Dabei lag die Zeitspanne bis zum Erreichen einer T-Zellzahl von > 100/ μ l Vollblut bei unserem Patientenkollektiv bei einem medianen Wert von 41 Tagen (Bereich 26-59 Tage). In der historischen Kontrollgruppe mit CD34+ selektionierten Transplantaten dagegen wird eine T-Zellzahl von > 100/ μ l im Median erst nach 72 Tagen erreicht (Bereich 14-123 Tage), Abb. 3. Dies bedeutet einen Trend zu einem Vorteil hinsichtlich dieses Kriteriums für unser Patientenkollektiv der CD3/19 Depletierten (p-Wert= 0,0576).

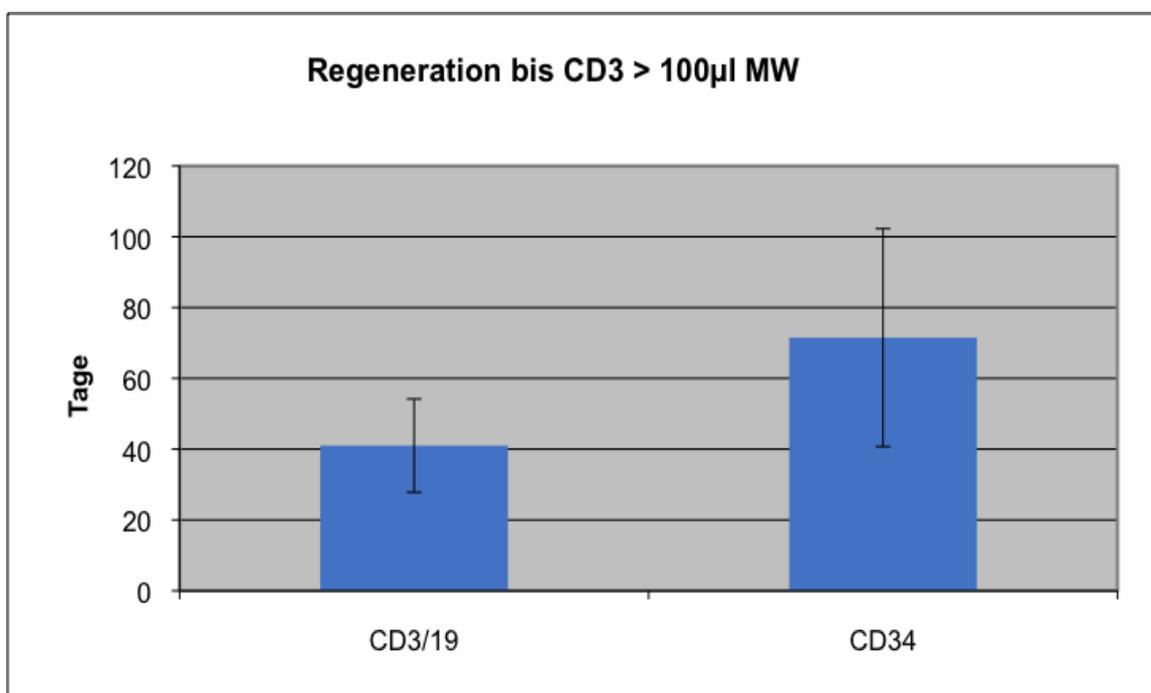


Abb. 3: Zeitspanne bis zum Erreichen einer T-Zellzahl von >100/ μ l Vollblut nach CD3/19-Depletion und nach CD34+-Selektion mit Standardabweichungen

4.1.2. T-Zell-Rekonstitution im zeitlichen Verlauf:

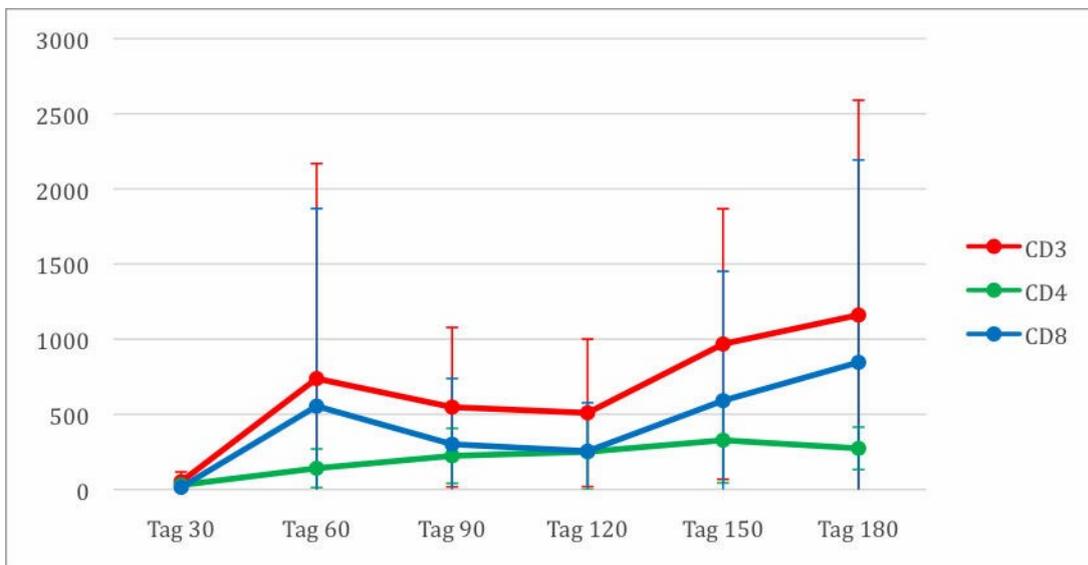


Abb. 4: Mittelwerte (in μl) von CD3^+ / CD4^+ und CD8^+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf nach CD3/19 -Depletion mit Standardabweichungen

Der Anstieg der Gesamt-T-Zellzahl wird durch die, mit CD3 markierte, rote Kurve dargestellt. T-Zell-Zahlen $>100/\mu\text{l}$ wurden, wie unter 4.1.1 erwähnt, im Median bereits nach 41 Tagen erreicht. Nach Ablauf des ersten Halbjahres nach SZT wurde ein Maximalwert von $1161/\mu\text{l}$ erreicht.

Zytotoxische T-Zellen (CD8^+) erholten sich wesentlich schneller als T-Helferzellen (CD4^+) und erreichten höhere Maximalwerte.

4.1.3. B- und NK-Zell-Regeneration im zeitlichen Verlauf:

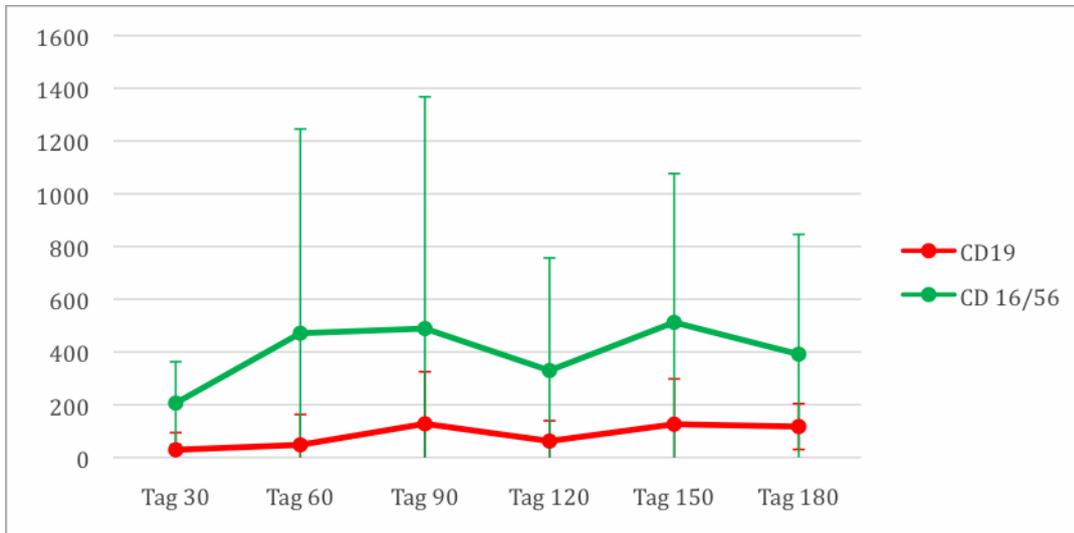


Abb. 5: Mittelwerte (in μl) von CD19- und CD16/56 positiven Zellen im zeitlichen Verlauf nach CD3/19-Depletion mit Standardabweichungen.

Die NK-Zellen, definiert durch CD16/56 positive Zellen, stellen hier die am frühesten und zahlenmäßig am stärksten vertretene Zellfraktion aller lymphozytären Zellen dar. Sie erleben zwischen Tag 30 und 60 einen Anstieg um mehr als das Doppelte und bewegen sich im weiteren Verlauf um Werte zwischen 400-500/ μl .

Wie in Abbildung Abb. 5 zu sehen, verläuft die B-Zell-Rekonstitution, dargestellt durch die rote Kurve, deutlich langsamer. Ein Anstieg der B-Zell-Zahl $>100/\mu\text{l}$ wird erst um den Tag 80 erreicht und hält sich dann in etwa auf diesem Mittelwert. Ein signifikanter Anstieg ist im Untersuchungszeitraum nicht zu verzeichnen.

4.2. T-Zell-Rezeptor-Komplexizität

Um die Diversität des T-Zellrepertoires nach allogener, CD3/CD19-depletierter Stammzelltransplantation zu beurteilen, führten wir eine Fragmentlängenanalyse der CDR3-Region des T-Zellrezeptors an einem erweiterten Patientenkollektiv von n=43 Patienten, das auch Patienten aus anderen Kliniken umfasste, durch.

Zur Untersuchung des variablen β -Ketten (BV)-T-Zell-Repertoires verwendeten wir die Methode des Spectratypings unter Anwendung der von Pannetier et al. beschriebenen Methodik und BV-Primern (14).

Jede BV-Familie (V β 1-24) wurde auf die Anzahl der detektierbaren Banden pro Gelspur untersucht. Innerhalb der ersten 120 Tage post transplantationem zeigte sich ein stabiles T-Zell-Repertoire (Mittelwert von 3,5) mit einem signifikanten Vorteil zwischen Tag 31-90 für die CD3/CD19 Depletierten gegenüber den CD34-Selektionierten.

In der Phase 121-180 kommt es numerisch zu einer Verschlechterung des T-Zell-Repertoires auf einen Mittelwert von 2,09. Nach Tag 180 zeigt sich, bis auf einen kurzzeitigen Abfall im Zeitraum 301-365 um 1,34, ein stetiger Anstieg der T-Zell-Repertoire-Komplexizität auf einen Mittelwert von 6,04 im Zeitraum >365 Tage (Mittelwert 4,37 für den gesamten Zeitraum). Zusätzlich zur numerischen Verbesserung kommt es auch zu einer zunehmend normaleren Verteilung der Fragmentgrößen im Sinne einer Gaußschen Normalverteilung (siehe Abb. 6).

4.2.1. Rohdaten

TZR-Repertoire:		Mittelwert	
Tag	p-Wert	CD3/19 (n=43)	CD 34 (n=16)
gesamt	<0,0001	4,02	4,67
0-30	0,3146	2,92	3,14
31-90	0,0053	3,69	1,75
91-120	0,7851	3,96	3,87
121-180	0,2289	2,09	2,2
181-240	<0,0001	3,48	5,45
241-300	0,1261	4,65	5,12
301-365	<0,0001	3,31	5,53
>365	<0,0001	6,04	8,80

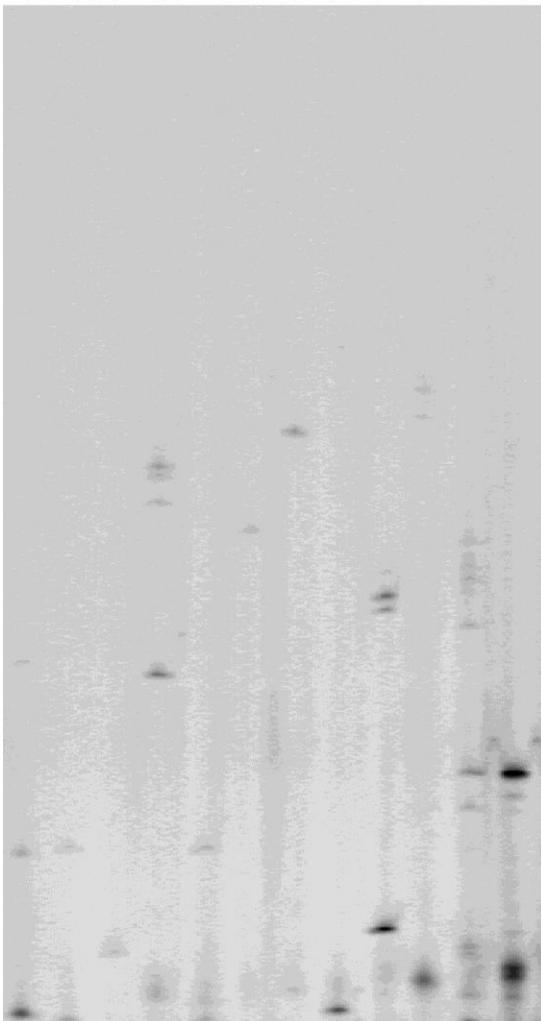
Tabelle 6: T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analyse nach CD 3/19-Depletion *versus* CD34⁺ Selektion. Angegeben sind die Mittelwerte der Bandenanzahl pro BV-Familie. p-Wert errechnet mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U Testes.

4.2.2. Bildliche Darstellung

Die Entwicklung der Komplexizität des T-Zellrezeptor-Repertoires soll anhand von zwei exemplarischen Gelbildern eines einzelnen Patienten dargestellt werden. Während zu einem frühen Zeitpunkt (Tag +144) nur sehr wenige Banden zu sehen sind und in vielen BV-Familien jegliche Signale fehlen, hat sich das Bild an Tag +298 schon merklich gewandelt. Insgesamt kommt es im Verlauf zum Erscheinen neuer T-Zellen, was sich in einer Zunahme der Banden pro BV-Familie, als auch in einer zunehmend normaleren Verteilung der Fragmentanordnung widerspiegelt.

Tag +144

BV 9 BV 18
BV 23 BV6b
BV 16 BV 4
BV 3 BV 13a
BV 22 BV11
BV 21 BV8
BV 24 BV20
BV 15 BV2
BV 17 BV 13b
BV 7 BV6a
BV 12 BV14
BV 1 BV5



Tag +298

Längenstandard
BV 9 BV 18
BV 23 BV6b
BV 16 BV 4
BV 3 BV 13a
BV 22 BV11
BV 21 BV8
BV 24 BV20
BV 15 BV2
BV 17 BV 13b
BV 7 BV6a
BV 12 BV14
BV 1 BV5

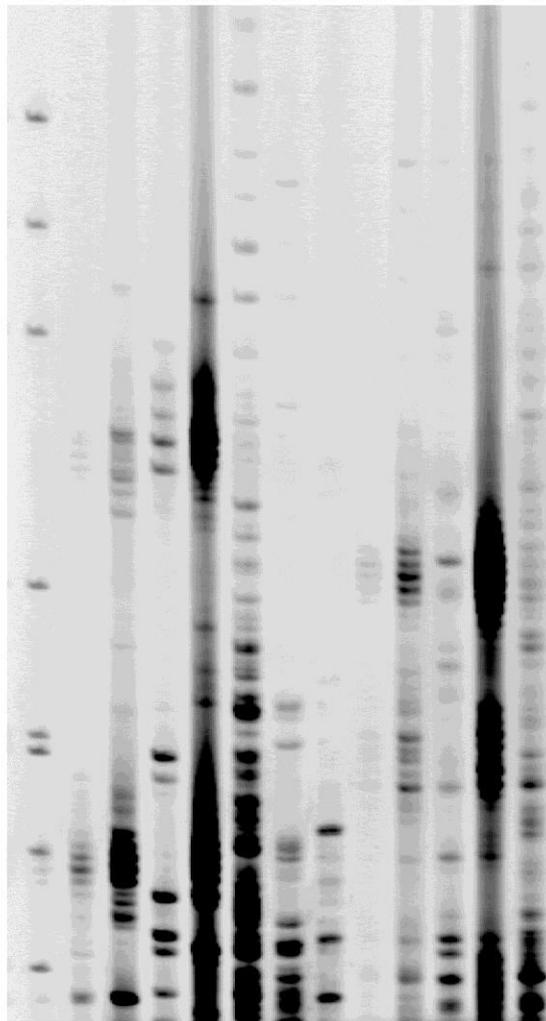


Abb. 6: Exemplarische Gelbilder von zwei Untersuchungszeitpunkten eines Patienten an Tag +144 und +298 Tage nach Transplantation

4.2.3. Darstellung anhand eines Boxplots

Da in der oben genannten Tabelle die Zahl der Einzelwerte pro Zeitpunkt gering ist und der Verlauf etwas sprunghaft erscheint, wurden die Gesamtdaten hier in drei Zeitintervalle gruppiert. Damit erreichen wir eine höhere Anzahl von Messwerten pro Gruppe mit insgesamt ruhigerem Verlauf und besser zu interpretierenden Ergebnissen.

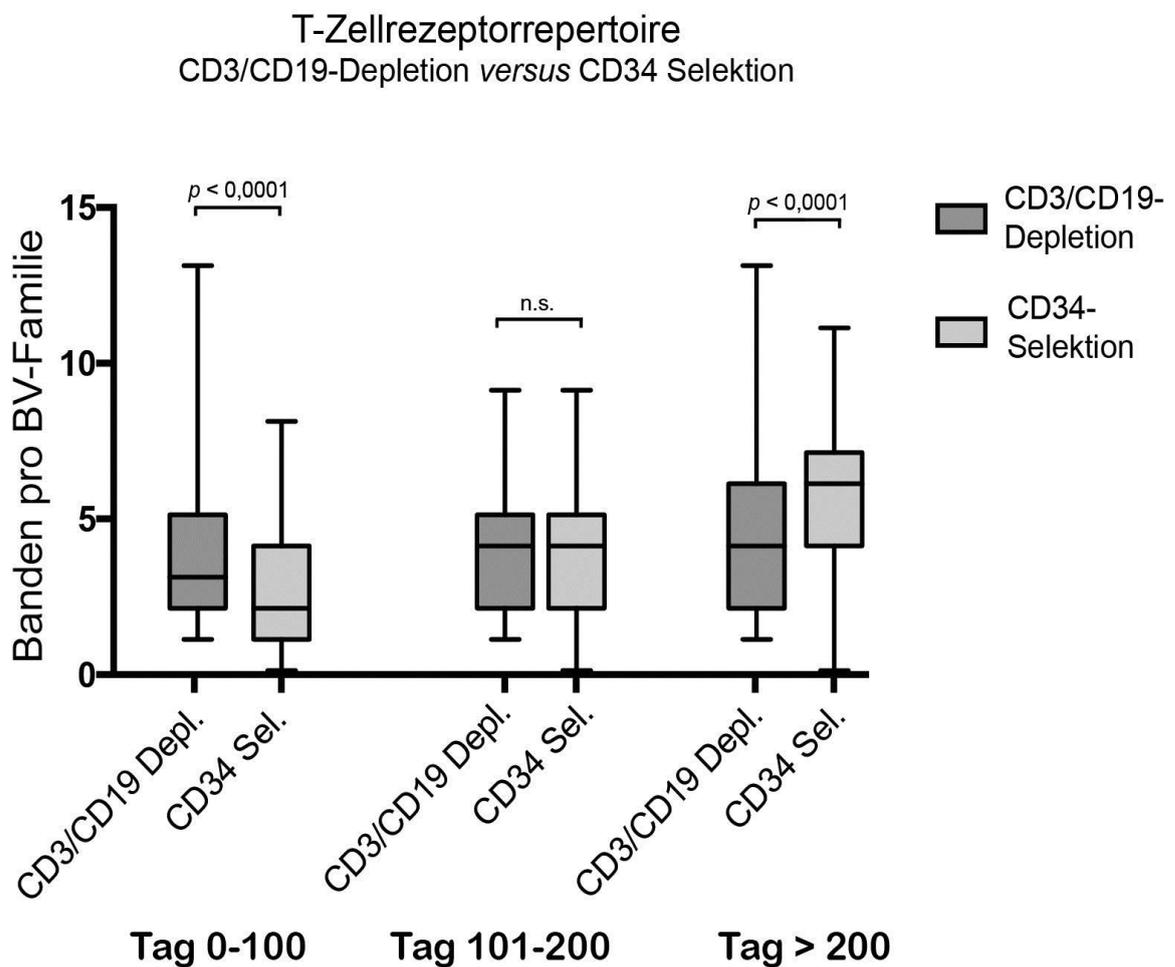


Abb. 7: T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analyse nach CD3/19-Depletion versus CD34+ Selektion. Boxplot der Bandenzahl pro BV-Familie in 3 Zeitintervallen nach Transplantation. Linie=50. Perzentile (median), Box=75. und 25. Perzentile, Fehlerbalken=90. und 10. Perzentile.

5. Diskussion

Die allogene haploidente HSZT ermöglicht auch im Falle eines fehlenden HLA-identen oder rasch verfügbaren Spenders die Durchführung einer SZT als oftmals einzig kurative Therapieoption bei verschiedenen hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankungen. Dabei müssen, aufgrund der 50%igen HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger, verschiedene immunologische Risiken in Kauf genommen werden, jedoch wurden in der Literatur auch einige potentielle Vorteile dieser Transplantationsform beschrieben.

Als größtes Risiko dabei gilt die GVHD, deren schwerwiegende Komplikationen den Erfolg einer Transplantation zunichte machen können. Durch eine effektive T-Zell-Depletion, die sowohl über Negativselektion, wie in unserem Fall der CD3/19-Depletion, als auch über Positivselektion der CD34+ Zellen, wie in unserer Vergleichsgruppe, erfolgen kann, kann dieses Risiko weitestgehend ausgeschaltet und trotzdem ein Engraftment sichergestellt werden (23).

In der vorliegenden Studie untersuchten wir das periphere Blut von pädiatrischen Empfängern eines CD3/19-depletierten, haploidenten Stammzelltransplantates mit unterschiedlichen hämatologischen Grunderkrankungen.

Im Gegensatz zu CD34-positiv selektionierten Stammzellen entfernt dieses Verfahren nur T- und B-Zellen auf direktem Weg und belässt eine Vielzahl von Leukozytenpopulationen wie NK-Zellen, dendritische Zellen, Gamma delta T-Zellen und Monozyten im Transplantat, die einen protektiven Effekt für den Empfänger ausüben können. Dies könnte sich positiv auf die Immunrekonstitution auswirken. Die Vergleichsgruppe, die hochaufgereinigte, CD34⁺ Stammzellen als Transplantat enthalten hatten, entstammen einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe (Eyrich 2001).

5.1. Rekonstitution des Immunsystems

Immunrekonstitution bezeichnet den Reifungsprozess transplanteder hämatopoetischer Stammzellen und Progenitorzellen zu Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr. Ziel nach HSZT ist die möglichst vollständige und rasche Wiederherstellung der Immunität, um schwerwiegende infektiöse Komplikationen zu verhindern, die aus einer verzögerten Immunrekonstitution resultieren und u.U. sogar tödlich verlaufen können. Die unterschiedlichen Zellreihen des Immunsystems benötigen durch ihre verschiedenen Entwicklungswege unterschiedliche Zeitspannen für ihre Ausreifung.

Die Regeneration der unspezifischen zellulären Immunität stellt dabei einen relativ schnell abgeschlossenen Prozess dar (i.d.R. innerhalb weniger Monate), wohingegen die Rekonstitution der spezifischen, zellulären Immunität deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt (24). Letztere wird im Folgenden separat anhand unserer Ergebnisse für die T-, B- und NK-Zellen durch durchflusszytometrische Untersuchungen sowie durch Untersuchungen des T-Zell-Rezeptorrepertoires betrachtet und beurteilt.

5.1.1 T-Zell-Rekonstitution

Den T-Zellen kommt bei Infektionen mit Pilzen, Viren, Protozoen sowie für die B-Zellstimulierung und Kontrolle bei intrazellulären Erregern eine entscheidende Rolle als Teil der zellvermittelten Immunität zu (25). Damit stellt die T-Zell-Rekonstitution einen der wichtigsten Determinanten für das erfolgreiche Outcome einer Stammzelltransplantation dar.

Bezüglich der T-Zell-Regeneration finden sich in der Literatur zwei beschriebene Wege:

- 1) Die periphere Expansion von reifen Spender-T-Zellen, die sich vor allem bei Patienten mit eingeschränkter Thymusfunktion (z.B. ältere Erwachsene oder Patienten nach intensiver Chemotherapie/

Thymektomie) findet und immer in der Frühphase nach Transplantation stattfindet (26, 27) und

- 2) Die „de novo-Reifung“ von naiven T-Zellen, die Patienten mit ausreichender Thymusaktivität vorbehalten ist (v.a. Kindern) und i.d.R. nach 4-6 Monaten beginnt. Wenn dieser Weg ausbleibt, ist die Regeneration immer unzureichend. (28, 29).

In unseren Ergebnissen zeigen sich die T-Zellen als die am zweitschnellsten regenerierende Zellfraktion nach den NK-Zellen.

Auf der Zeitachse bis zum Erreichen einer T-Zellzahl von $> 100/\mu\text{l}$ findet sich ein marginal signifikanter Vorteil von 30 Tagen für die Gruppe nach CD3/19-Depletion gegenüber der Gruppe nach CD34-Selektion ($p= 0,0576$), siehe Abb. 3.

Im weiteren Verlauf entwickelt sich das T-Zell-System konsequent weiter wie bildlich dargestellt durch die steigende Gesamtzahl der T-Zellen in Abb. 4. Das Maximum für die Gesamtzahl der T-Zellen, dargestellt durch die CD3^+ Population, wird am Ende der 180-tägigen Nachbeobachtungszeit mit einem Mittelwert von $1161/\mu\text{l}$ erreicht. An diesem Tag lag die Gesamtzahl in der Vergleichsgruppe bei $450/\mu\text{l}$. Es ist zu erwarten, dass die T-Zellzahl im weiteren Verlauf noch weiter bis zum Erreichen eines Normalwertes ansteigen wird. Ursache für die etwas schnellere T-Zell-Regeneration nach CD3/CD19-Depletion im Vergleich zur CD34^+ -Selektion könnte u.a. die fast fünffach höhere Anzahl an residuellen T-Zellen im Transplantat (nach CD3/CD19-Depletion $57 \times 10^3 \text{ CD3}^+/\text{kg}$ im Graft, nach CD34-Selektion $12,5 \times 10^3 \text{ CD3}^+/\text{kg}$) sowie die nach CD3/CD19-Depletion im Transplantat enthaltenen *facilitating cells* sein (z.B. dendritische Zellen, NK-Zellen, Gamma delta T-Zellen, Monozyten). Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird die T-Zell-Regeneration in unserem pädiatrischen Kollektiv durch die oben beschriebene „de novo-Reifung“ der T-Zellen aus transplantierten Stammzellen heraus unterstützt, welche im Kindesalter durch eine vorhandene Thymusrestfunktion gewährleistet wird und im Vergleich zu Studien bei Erwachsenen nach HSCT die Immunrekonstitution der T-Zellen positiv beeinflusst und beschleunigt (24, 30). Leider ist unser Beobachtungszeitraum für eine suffiziente Beurteilung dieses

Regenerationswegs zu kurz, da sich dessen Auswirkungen i.d.R. erst nach ca. 4-6 Monaten zeigen (29).

Die zytotoxischen T-Zellen, dargestellt durch die CD8⁺-Zellen in Abb. 4, zeigen sich in der Regeneration hinsichtlich Geschwindigkeit als auch der Gesamtzahl den CD4⁺ T-Helfer-Zellen deutlich überlegen. Dies verhielt sich in der CD34⁺-Vergleichsgruppe ähnlich, und wurde bislang in allen Studien zur Immunrekonstitution nach allogener SZT so beschrieben (23, 31). Dahinter könnte ein Proliferationsvorteil der CD8⁺ gegenüber der CD4⁺-Zellen stecken oder eine antigen-spezifische Stimulation der CD8⁺-Zellen zugrunde liegen. Auch die Absolutzahlen der CD4⁺-T-Helferzellen zeigen sich jenseits Tag 90 stabil über 200/μl.

Zusammenfassend konnten wir damit bei unseren Patienten einen Trend zu einer schnelleren T-Zell-Regeneration in der Frühphase nach CD3/CD19-Depletion im Vergleich zu CD34-selektionierten Stammzelltransplantaten nachweisen. Die CD8⁺-T-Zellen zeigen sich in ihrer Gesamtzahl den CD4⁺-Zellen überlegen bei konstant stabiler Regeneration beider Zellfraktionen. Die in der frühen Phase expandierenden, zytotoxischen T-Zellen nehmen eine wichtige Abwehrfunktion gegenüber Virus-infizierten Zellen und vermutlich auch residuellen malignen Blasten wahr.

Mit dieser besseren frühen Immunrekonstitution ist eine wichtige Grundlage zur weiteren Entwicklung eines funktionierenden Immunsystems gemacht. Des Weiteren ist zu hoffen, dass eine frühzeitigere T-Zellrekonstitution einen suffizienteren Graft-versus-leukemia-Effekt vermittelt und Rezidive zu reduzieren hilft. Diese Frage wird jedoch erst in klinischen Studien mit höheren Fallzahlen zu beantworten sein.

5.1.2. NK-Zell-Rekonstitution

Ähnlich wie in der Vergleichsgruppe der CD34-Selektionen, zeigen sich auch bei CD3/19-Depletion die NK-Zellen (CD16/56⁺) als die direkt nach Transplantation am stärksten vertretene Zellfraktion mit der schnellsten Regeneration aller lymphozytären Zellen, siehe Abb. 5.

Die anfängliche starke Präsenz dieser Zellpopulation könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der CD3/CD19-Depletion neben den CD34⁺ Progenitorzellen unter anderem die NK-Zellen des Spenders im Transplantat verbleiben.

Jedoch zeigt sich auch in der Vergleichsgruppe der CD34-Selektionen am Tag 30 eine hohe Anzahl an NK-Zellen, der Mittelwert ist mit 305 Zellen/ μ l sogar größer als unser Mittelwert von 206/ μ l zu diesem Zeitpunkt, was auf den ersten Blick verwunderlich ist, da ja bei CD34+-Selektion nahezu keine NK-Zellen mehr im Transplantat vorhanden waren.

Eine Ursache dafür könnte die höhere Bestrahlungsresistenz der NK-Zellen sein, die von Kook et al. 1996 beschrieben wurde (33) und demnach auch NK-Zellen des Empfängers in der peripheren Zirkulation überleben können und bei Transplantationsregimes mit Bestrahlung für einen schnelleren NK-Anstieg sorgen können.

Betrachtet man die Dynamik der jeweiligen Kurven, so zeigt sich, dass auf Seite der CD34+ Vergleichsgruppe zu einem früheren Zeitpunkt, wie zum Beispiel an Tag 15, die NK-Zellen noch bei unter 25/ μ l rangieren, während in unserem Patientenkollektiv bereits eine NK-Zahl mit einem Mittelwert von 203/ μ l existiert. Dies untermauert die Annahme, dass die NK-Zellen von Anfang an in etwa dieser Anzahl mit transplantiert wurden und stimmt mit Beobachtungen aus anderen Studien, die sich ebenfalls mit der Immunrekonstitution nach CD3/19-Depletion beschäftigt haben, überein (24). In der CD34+ Vergleichsgruppe scheint der rasche initiale Anstieg der NK-Zellen durch den Proliferationserfolg von PBMCs stimuliert durch IL-2 bedingt zu sein (9). Allerdings zeigen Chimärismusuntersuchungen auch in der Frühphase nach haploidenter Transplantation überwiegend Donorsignale, sodass dieser Mechanismus nicht

die alleinige Ursache für die NK-Prädominanz sein kann. Ein weiterer Grund für die frühe NK-Zellpräsenz könnte sein, dass die Ausreifung lymphoider Vorläuferzellen beim vollständigen Fehlen von peripheren T-Zellen in die NK-Zellreihe bevorzugt ist. Überschüssige homöostatische Zytokine können dazu beitragen. Eine Bestätigung dieser Hypothese kann man daraus ableiten, dass die früh regenerierenden NK-Zellen oft einen unreifen CD56^{bright} Phänotyp zeigen (34).

Nach CD34-Selektion zeigt sich um den Tag 60 eine Reduktion auf Werte von ca. 175/ μ l, wohingegen in unserer Patientengruppe zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg auf einen Wert von 471/ μ l zu finden ist. Damit haben die NK-Zellen ihre Absolutzahl zwischen Tag und 30 und 60 mehr als verdoppelt und bewegen sich auch im weiteren verfolgten Zeitfenster um einen Mittelwert von 430/ μ l. Der Maximalwert von 512/ μ l wird in unserer Gruppe an Tag 150 erreicht, in der Vergleichsgruppe lag der Maximalwert mit 480/ μ l etwas niedriger und wurde erst deutlich später erreicht (Tag 225).

Die somit stabile und vor allem frühe hohe Präsenz der NK-Zellen bei den CD3/19 Depletierten stellt einen erheblichen Vorteil bei der Entwicklung eines funktionsfähigen Immunsystems nach Stammzelltransplantation dar. Gerade bei haploidenter Transplantation, bei dem eine starke T-Zell-Depletion zur Vermeidung einer GVHD durchgeführt wird und in der der T-Zell-vermittelte Graft-*versus*-leukemia-Effekt vorerst fehlt, spielt die Alloreaktivität der NK-Zellen, die auch als „first line of defense“ bekannt sind (35), eine immense Rolle.

NK-Zellen haben, wie auch die T-Zellen, eine wichtige Verwendung als Immuntherapeutika zur Behandlung maligner Erkrankungen gefunden. Durch ihre Ausstattung mit aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren vermitteln sie ebenfalls einen Graft-*versus*-leukemia-Effekt in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen. Zusätzlich vermeidet ihre Toleranz gegenüber gesunden Zellen des Spenders und des Empfängers eine GVHD (20).

Die rasche Regeneration der NK-Zellen sowie der frühe Anstieg der T-Zellen in unseren Untersuchungen nach CD3/CD19-Depletion bieten damit die Vorzüge

in Form eines unverändert sehr niedrigen Risikos für die Entwicklung einer GvHD sowie eines verbesserten frühen Graft-*versus*-leukemia-Effektes. Auch infektiologische Komplikationen sollten damit noch besser verhindert werden können.

5.1.3. B-Zell-Rekonstitution

Die B-Zell-Rekonstitution in unserem Kollektiv läuft, im Vergleich zu den NK-Zellen, deutlich verzögert ab, der Verlauf der CD19⁺-Zellen (siehe Abb. 5) ist im Untersuchungszeitraum kaum zunehmend, insgesamt aber stabil. Ein Anstieg der B-Zellen über einen Wert von 100/ μ l wird in etwa an Tag 80 verzeichnet, in der Vergleichsgruppe der CD34-Selektionen wurde dieser Schwellenwert fast zeitgleich erreicht (ca. 12 Tage früher), stieg nach Tag 100 jedoch steil an bis auf Maximalwerte um 850/ μ l an Tag >300 post transplantationem. In unserem Beobachtungszeitraum, der leider nur bis Tag +180 reicht, konnte ein Anstieg über einen Mittelwert von 128/ μ l nicht verzeichnet werden.

Die Suche nach der Ursache für die verzögerte B-Zell-Rekonstitution in unserer Gruppe bleibt momentan leider unklar. Unsere Ergebnisse decken sich jedoch mit den Ergebnissen anderer Studien, die sich mit der Immunrekonstitution nach CD3/19 depletierter allogener SZT beschäftigten, in denen ebenfalls deutliche Verzögerungen der B-Zellrekonstitution im Vergleich zu anderen Formen der allogenen SZT beschrieben wurden (24).

5.2. T-Zell-Rezeptor Komplexizität

Anhand der durchflusszytometrischen Daten konnten wir zwar Rückschlüsse auf die Entwicklung des Immunsystems und im Besonderen des T-Zellkompartimentes nach Transplantation ziehen, jedoch erlaubt dies noch keine Aussage über die Zusammensetzung des T-Zell-Pools. Die Durchflusszytometrie stellt eine quantitative Art der Analyse zur Untersuchung

der T-Zellregeneration dar, wohingegen das CDR3-Längenspectratyping eine qualitative Analyse desselben zulässt.

Zur Darstellung der Diversität des T-Zell-Repertoires und damit der Immunrekonstitution nach CD3/CD19-Transplantation, nutzten wir daher die Möglichkeit des CDR3-Längenspectratyping, wie durch Pannetier et al. beschrieben (14). Dafür wurde die BV-Kette des T-Zell-Rezeptors durch 24 BV-Primer in allen Patienten aus dem größeren Patientenkollektiv B, in dem wir auch Patienten aus anderen Kliniken untersuchten, in regelmäßigen Abständen auf die Anzahl der Banden pro Lane analysiert und die Ergebnisse mit der Bandenverteilung der Vergleichsgruppe der CD34⁺-Selektionen verglichen. In einem immunkompetenten Menschen zeigen sich etwa 5-8 Banden pro BV-Familie mit einer Gaußschen Normalverteilung der TCR-Fragmentgrößen (19). In unseren Untersuchungen der CD3/CD19-depletierten Gruppe zeigte sich im Zeitraum 31-90 nach Transplantation mit einem Mittelwert von 3,7 Banden pro BV-Familie ein signifikanter Vorteil gegenüber den CD 34⁺-selektionierten hämatopoetischen Stammzelltransplantaten, welche in diesem Bereich einen Mittelwert von 1,75 aufwiesen (siehe Tab. 6).

Dazu passt unsere Beobachtung des steilen Anstiegs der Gesamtzahl der T-Zellen zwischen Tag 30 und Tag 60, gemessen durch Durchflusszytometrie in unserem Würzburger-Patientenkollektiv (Kollektiv A).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe deutet dies auf eine initial auch qualitativ bessere Immunrekonstitution in unserer Patientengruppe hin, die damit, gemeinsam mit den rasch regenerierenden Zellen der angeborenen Immunität, frühen infektiologischen Komplikationen besser entgegenwirken kann. Andere Arbeitsgruppen, die sich mit der Immunrekonstitution bei Erwachsenen nach CD3/19-Depletion beschäftigten, beobachteten dahingegen in den ersten 200 Tagen nach Transplantation ein noch deutlich reduzierteres T-Zell-Repertoire gegenüber deren Vergleichsgruppen CD34⁺-Selektionierter, auch wenn die Untersuchungen durch unterschiedliche Studiendesigns und Untersuchungstechniken nicht direkt miteinander vergleichbar sind (24).

Zwischen Tag 100 und 200 kommt es in beiden Gruppen zu einem weiteren Anstieg des Repertoires, der dann zwischen den beiden Gruppen nicht mehr signifikant verschieden ist. Wie auch bei den CD34⁺ Selektionen, ist in diesem Zeitraum weiterhin ein oligoklonales Bandenmuster ohne Präferenz für größere oder kleinere Fragmentgrößen erkennbar, was auf ein noch lückenhaftes T-Zell-Repertoire hindeutet (siehe Abb. 6).

Im weiteren Verlauf (jenseits von Tag +200) zeigt sich dann jedoch ein relativ stabiler Anstieg der Komplexizität bis auf einen Mittelwert von 6,0 Banden pro Lane mit einer Normalisierung der Fragmentgrößen im Sinne einer Gaußschen Normalverteilung (Abb. 6), ähnlich zum Repertoire eines gesunden Individuums. In diesem Zeitabschnitt kommt in einem pädiatrischen Kollektiv die thymusabhängige T-Zellrekonstitution zum Tragen, die neue T-Zellrezeptoren entstehen lässt und so zur Komplettierung des TCR-Repertoires beiträgt (30, 36).

Interessanterweise haben die CD34⁺-Selektionen jenseits von Tag 200 eine signifikant bessere Repertoirekomplexizität. Diese Differenz könnte durch die unterschiedliche Gesamtzahl transplanteder Stammzellen bedingt sein, da die Patienten mit CD3/CD19-depletierten Transplantaten mit 10×10^6 CD34⁺/kg weniger Stammzellen erhielten als die Vergleichsgruppe mit $23,2 \times 10^6$ CD34⁺/kg.

Außerdem ist der Altersdurchschnitt in der Vergleichsgruppe niedriger (16 vs. 4 Jahre), was daran liegt, dass im CD3/CD19-Depletionskollektiv auch einige Patienten älter als 18 Jahre waren. Auch dies könnte eine Erklärung für die niedrigere Repertoirekomplexizität aufgrund der altersbedingt eingeschränkteren Thymusfunktion in unserem Kollektiv sein.

Des Weiteren wurden in der CD3/CD19-Depletionsgruppe die Patientenproben größtenteils extern entnommen und per Post zur Untersuchung nach Würzburg versandt. Trotz größter Bemühungen um optimale Transportbedingungen und rasche Weiterverarbeitung, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es hierdurch zu Qualitätseinschränkungen der RNA gekommen sein könnte und dadurch das TCR-Repertoire in der CD3/CD19-Depletionsgruppe artifiziell zu

niedrig eingeschätzt wurde. Zur Bewertung des TCR-Repertoires werden in letzter Zeit zunehmend Hochdurchsatzverfahren wie das Next Generation Sequencing (NGS) angewendet, um die Diversität des T-Zellkompartimentes in noch höherer Auflösung auf CDR3-Sequenzniveau einschätzen zu können (37).

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass sich die CD3/CD19-Depletion eines haploidenten Stammzelltransplantates im Gegensatz zu einer CD34-Selektion positiv auf die frühe Regeneration der T- und NK-Zellen auswirkt. Kritische Werte für die T-Zellregeneration ($>100/\mu\text{l}$) werden nach CD3/CD19-Depletion schneller überschritten und auch die Zusammensetzung des TCR-Repertoires ist breiter gefächert als nach Transplantation hochreiner hämatopoetischer Stammzellen. Dies deckt sich mit der Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass auch die GvHD-Inzidenz nach dieser Transplantationsform etwas höher zu sein scheint (23). Ob diese beschleunigte T-Zellrekonstitution sich auch klinisch positiv auf den Transplantationsverlauf auswirkt, muss in kommenden, größeren Studien geklärt werden. Von den meisten der 43 in unserer Studie untersuchten Patienten aus externen Kliniken lagen keine klinischen Daten zur GvHD-Inzidenz, Infektionskomplikationen und Rezidivhäufigkeit vor. Trotzdem liefern die hier gezeigten Daten einen starken Hinweis darauf, dass die CD3/CD19-Depletion zu einer signifikanten Verbesserung der frühen und damit klinisch sehr bedeutenden Immunrekonstitution nach haploidenter Stammzelltransplantation führt. Die CD3/CD19-Depletionstechnik stellt damit einen wichtigen Fortschritt in der Weiterentwicklung der haploidentischen Stammzelltransplantation dar.

6. Zusammenfassung

Die *in-vitro* Depletion von T- und B-Zellen stellt eine wichtige Weiterentwicklung der T-Zelldepletionstechniken von Stammzelltransplantaten dar. Im Gegensatz zur bisherigen Positivselektion von CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen werden hierbei nur noch Zellen depletiert, die entweder zu einer GvHD führen können (CD3⁺ T-Zellen) oder ein Sicherheitsrisiko bzgl. lymphoproliferativer Erkrankung nach Transplantation darstellen (CD19⁺ B-Zellen). In unseren Untersuchungen zogen wir einen Vergleich zwischen dem Verlauf der Immunrekonstitution bei Kindern nach CD3/19 depletierter Stammzelltransplantation und historischen Daten von Kindern nach CD34+ selektionierter Stammzelltransplantation.

In der Frühphase nach Transplantation zeigen sich in unseren Ergebnissen signifikante Vorteile der CD3/CD19-Depletion gegenüber der Vergleichsgruppe, insbesondere hinsichtlich der numerischen NK- sowie der T-Zell-Rekonstitution. Auf qualitativer Ebene können wir anhand unserer Ergebnisse der CDR3-Längen-Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires (Spectratyping) vor dem Tag +100 ebenfalls eine höhere Repertoirekomplexität nach CD3/CD19-Depletion nachweisen. Jenseits von Tag 200 zeigen beide Gruppen eine weitgehende Normalisierung der Fragmentlängenverteilung, wobei sich in der Gruppe der CD34+-Selektionen eine etwas bessere Repertoirekomplexität zeigt. Dies könnte durch das etwas jüngere Alter sowie die höheren verabreichten Stammzell Dosen in der CD34-Gruppe erklärbar sein. Leider konnten wir unsere Labordaten nicht mit den klinischen Verläufen der Patienten korrelieren, da der Hauptanteil der Patienten extern transplantiert wurde und klinische Daten nicht vorlagen. Zusammenfassend kommen wir zu dem Schluss, dass die CD3/19-Depletion eine vermutlich positive Weiterentwicklung der T-Zelldepletion bei haploidentischer Transplantation darstellt. Aus den etwas höheren T-Zellzahlen im Transplantat sowie den zusätzlich enthaltenen akzessorischen Zellen resultiert ein Vorteil in der frühen T- und NK-Zellrekonstitution. Weitere Studien müssen klären, inwieweit sich diese

messbare Beobachtung auch in einem klinischen Benefit bzgl. der Inzidenz und Schwere opportunistischer Infektionen sowie in einem stärkeren Graft-versus-Leukemia Effekt niederschlägt. Künftige Studien sollten auch weitere phänotypische Marker zur Unterscheidung von thymusabhängiger und – unabhängiger T-Zellregeneration beinhalten sowie spätere Untersuchungszeitpunkte mitberücksichtigen.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Anasetti C, Beatty PG, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE, Thomas ED, Hansen JA. Effect of HLA incompatibility on GVHD, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum. Immunol.* 1990 Oct;29(2):79-91
- (2) Bethge WA, Haegele M, Faul C, Lang P, Schumm M, Bornhauser M, Handgretinger R, Kanz L. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: Fast engraftment and low toxicity. *Experimental Hematology.* 2006 Dec;34(12):1746-52
- (3) Siegmund-Schultz N. Therapie von Leukämien bei Kindern: Optimierte Stammzelltransplantate. *Dtsch Arztebl.* 2012; 109(16):A-808/B-700/C-696
- (4) Handgretinger R, Schumm M, Lang P, Greil J, Reiter A, Bader P, Niethammer D, Klingebiel T. Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 1999 Apr 30;872:351-61
- (5) Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Gianni C, Iacucci R, Zei T, Martelli MP, Gambelunghe C. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical „three loci“ incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood.* 1994 Dec 1;84:3948-55
- (6) Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, Stelljes M, Vogel W, Hägele M, Handgretinger R, Kanz L. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/19 depletion and reduced intensity conditioning: An update. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 Jan-Feb;40(1):13-9
- (7) Barfield RC, Otto M, Houston J, Holladay M, Geiger T, Martin J, Leimig T, Gordon P, Chen X, Handgretinger R. A one-step large-scale

- method for T- and B-Cell-depletion of mobilized PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*. 2004;6(1):1-6
- (8) Hale GA, Kasow K A, Lovins R, Woodard JP, Leung WH, Yusuf U, Horwitz EM, Srivastava DK, Tong X, Benaim E, Handgretinger R. CD3 depleted hematopoietic peripheral blood stem cell grafts in children with refractory hematologic malignancies undergoing transplantation from mismatched related donors. *Blood*. 2005;106:5458
- (9) Eyrich M, Lang P, Lal S, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Niethammer D, Schlegel PG. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leukocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parenteral donors, *British journal of haematology*. 2001 Apr;114:422-432
- (10) Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 2011:3-4
- (11) Rieger MA, Schroeder T. 03/07. Hämatopoetische Stammzellen, *BIOspektrum*, 2007 Mar; 13:254-256
- (12) Holländer, GA. *Immunologie*, München: Elsevier GmbH, Urban&Fischer- Verlag; 2006: 111-112,127
- (13) Schiebler T, Schmidt W, Zilles K. *Anatomie*. Berlin: Springer; 1997.
- (14) Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zöller M, Kourilsky P. The sizes of the cdr3 hypervariable regions of the murine t-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. 1993 May. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:4319-4323
- (15) Holländer GA. *Immunologie*. München: Elsevier GmbH, Urban&Fischer-Verlag; 2006:82-88.
- (16) Schilbach K, Schick J, Wehrmann M, Wollny G, Simon P, Schlagel PG, Eyrich M. PD-1-PD-L1 pathway is involved in suppressing alloreactivity of heart infiltrating T cells during murine GvHD across minor histocompatibility antigen barriers. *Transplantation* 2007;84:214-222

- (17) Candeias S, Waltzinger C, Benoist C, Mathias D. The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *J. Exp. Med.* 1991 Nov 1;174:989-1000.
- (18) Cochet M, Pannetier C, Regnault A, Darche S, Leclerc C, Kourilsky P. Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein Antigen. *Eur. J. Immunol.* 1992 Oct;22(10):2639-2647
- (19) Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissella B, Keever C, Flomenberg N. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. *J. Immunol.* 1994 May 15;152(10): 5109-5119
- (20) Newton C, Graham A. PCR. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1994.
- (21) Schütt C, Bröker B. Grundwissen Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011:128-130.
- (22) Eyrich M, Wiegering V, Lim A, Schrauder A, Winkler B, Schlegel PG. Immune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukemia – a prospective study of 20 paediatric patients. *Br J Haematol* 2009;147:360-370
- (23) Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen DW, Stuhler G, Stelljes M, Schwerdtfeger R, Christopeit M, Behre G, Faul C, Vogel W, Schumm M, Handgretinger R, Kanz L, Bethge WA. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica.* 2012 Oct;97(10):1523-31
- (24) Hägele M. Immunrekonstitution nach haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation: Einfluss eines CD3/CD19 depletierten gegenüber einem CD34 selektionierten Transplantat [Dissertation]. Tübingen: Eberhard Karls Universität; 2009.
- (25) Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol,* 2007.20(2):329-48

- (26) Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *Journal of Immunology*. 1996 Jun 15;156(12):4609-4616
- (27) Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Horowitz ME, Magrath IT, Shad AT, Steinberg SM, Wexler LH, Gress RE. Age, thymopoiesis and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 1995 Jan 19;332:143-149
- (28) Mackall CL, Hakim F, Gress R. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunity Today*. 1997 May;18(5):245-251
- (29) Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro Malaspina H, Childs BH, Collins N, Gillio A, George D, Jakubowski A, Heller G, Fazzari M, Kernan N, MacKinnon S, Szabolcs P, Young JW, O'Reilly RJ. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*. 1999;93:467-480
- (30) Eyrich M, Wollny G, Tzaribashev N, Dietz K, Brügger D, Schilbach K, Winkler B, Bader P, Lang P, Niethammer D, Schlegel PG. Onset of thymic recovery and plateau of thymic function are differentially regulated after stem cell transplantation in children. *Biology of Blood and Marrow Transplant*. 2005;11:194-205
- (31) Wu CJ, Chillemi A, Alyea EP, Orsini E, Neuberg D, Soiffer RJ, Ritz J. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood*. 2000 Jan;95(1):352-359
- (32) Mackall, CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways

- result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*. 1997 May 15;89(10): 3700-7
- (33) Kook H, Goldman F, Padley D, Giller R, Rumelhart S, Holidia M, Lee N, Peters C, Comito M, Huling D, Trigg M. Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):1089-97
- (34) Huenecke S, Cappel C, Esser R, Pfirrmann V, Salzmann-Manrique E, Betz S, Keitl E, Banisharif-Dehkordi J, Bakhtiar S, Königs C, Jarisch A, Soerensen J, Ullrich E, Klingebiel T, Bader P, Bremm M. Development of three different NK cell subpopulations during immune reconstitution after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: prognostic markers in GvHD and viral infections. *Frontiers in Immunology*. 2017 Feb 10;8(Art109):1-8
- (35) Papamichail M., Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Mar;53(3):176-86
- (36) Eyrich M, Croner T, Leiler C, Lang P, Bader P, Klingebiel T, Niethammer D, Schlegel PG. Distinct contributions of CD4+ and CD8+ naive and memory T-cell subsets to overall T-cell-receptor repertoire complexity following transplantation of T-cell-depleted CD34-selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1915-1918
- (37) Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, Riddell SR, Warren EH, Carlson CS. Comprehensive assessment of T-cell receptor β -chain diversity in $\alpha\beta$ T cells. *Blood*. 2009 Nov 5;114(19):4099-4107

8. Abbildungsverzeichnis

7.1 Einleitung

Abb. 1 Schema der adulten murinen Hämatopoese

7.2 Material

Tab. 1 Primer und Sonde für Real Time-PCR

Tab. 2 Primer V β forward für die Identifizierung der langen Fragmentabschnitte des T-Zell-Rezeptors

Tab. 3 Primer V β forward für die Identifizierung der kurzen Fragmentabschnitte des T-Zell-Rezeptors

Tab. 4 Reverse Primer

Abb. 2 Verwendeter Längenstandard

7.3 Methoden

Tab. 5 Primeranordnung bei Immunoscope-PCR

7.4 Ergebnisse

Abb. 3 Zeitspanne bis zum Erreichen einer T-Zellzahl von >100/ μ l Vollblut nach CD3/19-Depletion und nach CD34⁺-Selektion mit Standardabweichungen

Abb. 4 Mittelwerte (in μ l) von CD3⁺/CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf nach CD3/19-Depletion mit Standardabweichungen

Abb. 5 Mittelwerte (in μ l) von CD19⁻ und CD16/56⁺ Zellen im zeitlichen Verlauf nach CD3/19-Depletion mit Standardabweichungen

Tab. 6 T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analyse nach CD 3/19-Depletion *versus* CD34⁺ Selektion

- Abb. 6 Exemplarische Gelbilder von zwei
Untersuchungszeitpunkten eines Patienten an Tag
+144 und +298 Tage nach Transplantation
- Abb. 7 T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analyse nach CD3/19-
Depletion versus CD34+ Selektion (Boxplot)

Danksagung

Da ich während der Fertigstellung dieses Werkes mehrere Lebensphasen durchlaufen habe, möchte ich an dieser Stelle verschiedenen Menschen danken!

An erster Stelle danke ich meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Eyrich, der mich an die experimentelle Forschungsarbeit geduldig und eigenhändig herangeführt hat, mir die Möglichkeit gegeben hat, in einem bestens ausgestatteten Labor arbeiten zu dürfen und mich mit seiner Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen und Arbeit angesteckt hat. In all den Jahren war er stets für mich erreichbar, hatte immer ein offenes Ohr für alle Belange und hat nie den Glauben an mich verloren. Ein herzliches Dankeschön für sein immer sympathisches und geduldiges Wesen!

Weiterhin danken möchte ich Frau Barbara Bunting, die als medizinisch technische Assistentin in dieser Zeit unterstützend an meiner Seite stand und die Pipettierarbeit mit dem ein oder anderen humorvollen Gespräch kurzweiliger werden ließ. Auch den Damen im Stammzelllabor der Kinderklinik danke ich für Ihre Hilfe!

Danke an Frau Dr. V. Wiegering, die als meine Vorgängerin einige Vorarbeiten für diese Arbeit geleistet hat.

Für die Unterstützung bei der Erstellung der ein oder anderen Grafik und Hilfe bei PC-Problemen danke ich Simon Greiner sowie Anne Born.

Des Weiteren geht mein unendlicher Dank an meine lieben Eltern Inge und Helmut Lippert, meine Großeltern Hedwig und Kurt Frey und meine Schwester Anna, die mich während all der Jahre immer wieder für diese Arbeit motiviert haben und mir mit Optimismus zur Seite standen.

Meinem Lebensgefährten Oliver Toal und unserem kleinen Sohn Mio möchte ich Danke sagen, dass sie mich mit ihrem Dasein und ihrer Liebe auf der letzten Strecke der Fertigstellung meiner Arbeit begleitet haben.

Lebenslauf

Lippert, Lena

18. März 1983	geboren in Mannheim
1989-1993	Grundschule Zotzenbach/ Odenwald
1993-2002	Martin-Luther-Schule Rimbach/ Odenwald
11. Juni 2002	Schulabschluß mit Abitur
10/2002- 09/2003	Studium der Mineralogie, Universität zu Köln
10/2003- 11/2009	Studium der Humanmedizin, Julius- Maximilians-Universität Würzburg
11. November 2009	Abschluß des Studiums der Humanmedizin mit Absolvierung der ärztlichen Prüfung
02/2010- 09/2013	Assistenzärztin an der Kinderklinik Coburg
10/2013-04/2015	Assistenzärztin an der Kinderklinik der Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden
22. April 2015	Anerkennung als Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin
05/2015- jetzt	Fachärztin für Kinder- und Jugendheilkunde in der Schwerpunktweiterbildung Neuropädiatrie an den Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden