

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Härtel

Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung im pädiatrischen Setting
Identifikation von Charakteristika mit Fokus auf die Immunrekonstitution
dendritischer Zellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Lisa Susanne Peter
aus Bremen

Würzburg, Juni 2023

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

Korreferent: Prof. Dr. med. Stefan Knop

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2024

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hintergrundinformationen zur hämatopoietischen Stammzelltransplantation	1
1.2 Grundlagen der hämatopoietischen Stammzelltransplantation	1
1.2.1 Stammzellquellen.....	1
1.2.2 HLA-Kompatibilität	2
1.2.3 Ablauf	2
1.2.4 Immunrestitution.....	3
1.3 Auswirkungen der aHSCT auf Grunderkrankung und Organismus	4
1.3.1 Therapieassoziierte Komplikationen.....	4
1.3.2 Rezidiv	4
1.3.3 Interaktionen des Stammzelltransplantats.....	4
1.4 Graft-versus-Host-Erkrankung.....	5
1.4.1 Akute Graft-versus-Host-Erkrankung	6
1.4.2 Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung.....	8
1.5 Dendritische Zellen.....	11
1.5.1 Charakteristika.....	11
1.5.2 Subpopulationen	11
1.5.3 Reifung	12
1.5.4 Toleranzmechanismen.....	13
1.5.5 Dendritische Zellen und chronische Graft-versus-Host-Erkrankung	13
1.6 Fragestellung	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum	16
2.2 Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....	16
2.3 Probengewinnung und Verarbeitung	17
2.4 Gatingstrategie.....	19

2.4.1 Lymphozyten	19
2.4.2 Zytokine	21
2.4.3 Dendritische Zellen	23
2.5 Statistik	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Patient:innenkollektiv	27
3.1.1 Patient:innenbezogene Daten	27
3.1.2 aHSCT-bezogene Daten	29
3.1.3 Signifikante Unterschiede hinsichtlich der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung	31
3.2 Immunrekonstitution nach der aHSCT	33
3.2.1 Lymphozyten	34
3.2.2 Intrazelluläre Zytokinexpression der T-Zellen	37
3.2.3 Dendritische Zellen	42
4. Diskussion	48
4.1 Patient:innen- und aHSCT-bezogene Einflüsse auf das Auftreten der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung	48
4.2 Pädiatrisches Setting, Immunzellen und Immunrekonstitution	49
4.3 Rekonstitution der dendritischen Zellen	51
4.4 Dendritische Zellen und Outcome nach der aHSCT	51
4.5 Pathogenese der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung und dendritische Zellen	52
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	56

Appendix	62
I Abkürzungsverzeichnis	62
II Abbildungsverzeichnis.....	66
III Tabellenverzeichnis.....	67
IV Danksagung.....	68
V Lebenslauf	69
VI Publikationen	70

1. Einleitung

1.1 Hintergrundinformationen zur hämatopoietischen Stammzelltransplantation

Eine hämatopoietische Stammzelltransplantation (*engl.* hematopoietic stem cell transplantation, HSCT), die Übertragung von Blutstammzellen, ist in vielen Fällen der einzige oder letzte kurative Therapieansatz, um diverse lebensbedrohliche Erkrankungen bei Erwachsenen und Kindern zu behandeln. Ursprünglich als Therapieform für die Strahlenkrankheit am Tiermodell entwickelt (Lorenz, Congdon, and Uphoff 1952), ist die HSCT zu einer etablierten Therapieoption geworden.

Alleine die European Society for Blood and Marrow Transplantation erfasste jährlich für Europa sowie neun nicht-europäische Länder über 40.000 HSCT, darin enthalten sind über 5.000 pädiatrische Patient:innen. Deutschland zählt mit neun HSCT pro 100.000 Einwohnenden zu den führenden Ländern (Passweg et al. 2020). Jährlich sind über 300 HSCT pädiatrischer Patient:innen in Deutschland gelistet (Sykora 2013).

Zu den Indikationen für eine HSCT zählen lymphoproliferative Erkrankungen (64%), Leukämien (25%) und solide Tumore (4%) wie Neuroblastome oder das Ewing-Sarkom (Passweg et al. 2020). Nichtmaligne Erkrankungen (7%) wie die schwere aplastische Anämie, die Thalassämie, die Sichelzellerkrankheit sowie weitere angeborene Immundefekte, Autoimmunerkrankungen oder Stoffwechselstörungen sind ebenfalls eine Indikation zur HSCT (Passweg et al. 2020).

1.2 Grundlagen der hämatopoietischen Stammzelltransplantation

1.2.1 Stammzellquellen

Bei der Herkunft hämatopoietischer Stammzellen wird zwischen autolog und allogon differenziert. Sind Spendende:r und Empfangende:r der Stammzellspende identisch, handelt es sich um eine autologe HSCT. Die Stammzellen werden entnommen, aufbereitet und konserviert, um sie nach einem aggressiven Therapieregime zu reinfundieren.

Oft ist es wegen therapeutischer Überlegungen oder der Grunderkrankung nicht möglich oder sinnvoll, eine autologe HSCT durchzuführen. Unterscheiden sich Stammzellspendende:r und Stammzellempfangende:r, spricht man von einer allogenen HSCT (aHSCT). Als Stammzellquelle können peripheres Blut, Knochenmark sowie

Nabelschnurblut fungieren, wobei bei letzterem die begrenzte Menge der gewinnbaren Stammzellen ein limitierender Faktor ist (Welniak, Blazar, and Murphy 2007). Als allogene Spendende können sowohl Eltern oder Geschwister als auch unverwandte Spendende in Frage kommen. Entscheidend ist die Kompatibilität der humanen Leukozytenantigene (*engl.* human leukocyte antigen, HLA) (Welniak, Blazar, and Murphy 2007).

1.2.2 HLA-Kompatibilität

Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 liegt der für HLAs kodierende Genort, der allgemein als Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) bezeichnet wird. Beim Menschen werden die Gene des MHC als HLA-Gene bezeichnet. Transplantationsrelevant sind die HLAs HLA-A, HLA-B und HLA-C für MHC-Klasse1-Moleküle sowie HLA-DRB1 und HLA-DQB1 für MHC-Klasse2-Moleküle (Eyrich and Schulze 2019). Die HLAs dienen der Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Peptiden sowie der Einleitung einer entsprechenden Immunreaktionen.

Die HLA-Gene werden autosomal-kodominant vererbt und weisen verschiedene Allele auf, sodass knapp 10.000 mögliche Kombinationen für die zehn transplantationsrelevanten HLA-Antigene existieren. Geschwister bieten eine Wahrscheinlichkeit zwischen 25% und 30% HLA-identische Spendende zu sein (Bertaina and Andreani 2018). Alternativen sind HLA-identische Fremdspendende oder HLA-differente Familienspendende (Bertaina and Andreani 2018).

1.2.3 Ablauf

Ist eine oder ein passende:r Stammzellspendende:r gefunden, kann die aHSCT Teil der Therapie der Grunderkrankung werden. Diese erfolgt bei pädiatrischen Patient:innen nach dem Protokoll einer Therapieoptimierungsstudie. Vor der aHSCT wird eine myeloablative Hochdosis-Therapie, die Konditionierung, durchgeführt. Sie beinhaltet Zytostatika und je nach Protokoll, eine Ganzkörperbestrahlung (*engl.* total body irradiation, TBI). Ziel ist die Elimination des blutbildenden Systems der Empfangenden. Anschließend erfolgt die intravenöse Transfusion des Stammzelltransplantats.

Je nach Anforderung an das Stammzelltransplantat kann dieses vor der aHSCT einer Graftmanipulation unterzogen werden. Eine Graftmanipulation ist die Modifizierung der zellulären Zusammensetzung des Stammzelltransplantats. Ausschlaggebend ist die Abwägung einer Graft-versus-Host-Erkrankung gegen den Graft-versus-Tumor-Effekt.

Durch die Blutbahn gelangen die transplantierten Stammzellen in das Knochenmark der Empfangenden und nisten sich dort ein. Es folgt die Rekonstitutionsphase, die Phase der Wiederherstellung einer intakten Blutbildung. Nach erfolgreicher aHSCT wird die Hämatopoese aus den Blutstammzellen der Spendenden bewerkstelligt.

1.2.4 Immunrekonstitution

Die Anzahl an Neutrophilen normalisiert sich bis zu einem Monat nach der aHSCT, ebenso die Anzahl an natürlichen Killerzellen und Makrophagen (Storek et al. 2008).

Die Rekonstitution der antigenspezifischen Immunabwehr ist vergleichbar mit der Ontogenese der Lymphozyten. Bis zum Wiedererlangen der vollen Funktionstüchtigkeit der Immunabwehr kann es Jahre dauern (Crooks, Weinberg, and Mackall 2006; Hannel et al. 1992).

In den ersten Monaten nach der aHSCT liegt ein Großteil der B-Zellen als naive B-Zellen vor, während B-Gedächtniszellen selten sind. Der für ihre Entstehung obligate Isotypswitch erfordert folliculäre dendritische Zellen und T-Helferzellen (CD4+ T-Zellen), deren Anzahl nach der aHSCT vermindert ist (Storek et al. 2008; Eyrich et al. 2002). Erst über ein Jahr nach der aHSCT werden normale Spiegel aller B-Zell-Subpopulationen erreicht (Storek et al. 2008).

Die Rekonstitution der T-Zellen erfolgt aus zwei unterschiedlichen Quellen. Zum einen expandieren die reifen T-Zellen der Spendenden im Blut, zum anderen entwickeln sich de-novo T-Zellen aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus migrieren (Storek et al. 2008; van Den Brink et al. 2013). Die erste Option geht mit einem begrenzten T-Zell-Repertoire einher, während aus der de-novo Synthese naiver T-Zellen ein volles T-Zell-Repertoire entstehen kann (Storek et al. 2008). Über ein halbes Jahr nach der aHSCT ist die Anzahl naiver T-Zellen vermindert (van Den Brink et al. 2013). Die Anzahl der T-Zellen insgesamt erholt sich nach ungefähr 2-6 Monaten (van Den Brink et al. 2013). Durch das initial begrenzte Repertoire an T-Zell-Rezeptoren kann innerhalb des ersten Jahres nach der aHSCT nicht von einer voll funktionierenden Immunabwehr ausgegangen werden (Eyrich et al. 2003).

Dendritische Zellen (*engl.* dendritic cells; DCs) lassen sich 2-3 Wochen nach der aHSCT in geringer Zahl im Blut nachweisen (Storek et al. 2008). In einer Studie mit pädiatrischen Patient:innen erreichten im Altersvergleich myeloide DCs nach 10-14 Monaten normale Werte (Vakkila et al. 2005). Die Anzahl plasmazytoider DCs erholte sich sehr langsam

und blieb auch nach 7 Jahren gegenüber der Zellzahl gesunder Patient:innen zurück (Vakkila et al. 2005).

1.3 Auswirkungen der aHSCT auf Grunderkrankung und Organismus

1.3.1 Therapieassoziierte Komplikationen

Bedingt durch Zytostatika, Bestrahlung, Medikamente und Interaktionen des Stammzelltransplantats mit dem Organismus der Empfangenden erstrecken sich mögliche Komplikationen während einer aHSCT über nahezu alle Organsysteme. Am häufigsten ist bei pädiatrischen Patient:innen mit endokrinen Störungen, Beeinträchtigung der Lungenfunktion und infektiösen Komplikationen wie Mykosen, bakteriellen und viralen Infektionen sowie viralen Reaktivierungen zu rechnen (Hierlmeier et al. 2018).

1.3.2 Rezidiv

Wurde die aHSCT aufgrund einer malignen Erkrankung durchgeführt, besteht zu jedem Zeitpunkt das Risiko eines Rezidivs der Grunderkrankung.

1.3.3 Interaktionen des Stammzelltransplantats

1.3.3.1 Graft-versus-Tumor-Effekt

Der Graft-versus-Tumor-Effekt (*engl.* graft-versus-tumor-effect; GvT) beschreibt die Reaktion allogener Immunzellen gegen maligne Zellen der Empfangenden einer aHSCT. Der GvT ist Teil des kurativen Potentials der aHSCT, da er das Risiko eines Rezidivs reduziert, und Gegenstand aktueller Forschung (Fry, Willasch, and Bader 2010). Neben T-Zellen des Stammzelltransplantats sind auch natürliche Killerzellen und B-Zellen Teil des GvT (Fry, Willasch, and Bader 2010). Der Pathomechanismus weist Parallelen zu dem der Graft-versus-Host-Erkrankung auf, allerdings mit positivem Effekt für die Empfangenden (Welniak, Blazar, and Murphy 2007).

1.3.3.2 Host-versus-Graft-Reaktion

Im Falle einer Host-versus-Graft-Reaktion (*engl.* host-versus-graft-reaction, HvG) reagieren immunkompetente Zellen der Empfangenden, die nicht durch Konditionierung eliminiert wurden, gegen das Stammzelltransplantat. Diese immunkompetenten Zellen sind natürliche Killerzellen, natürliche Killer-T-Zellen, Gammadelta-T-Zellen ($\gamma\delta$ TCR T-Zellen), T-Helferzellen (CD4+ T-Zellen) oder zytotoxische T-Zellen (CD8+ T-Zellen) (Welniak, Blazar, and Murphy 2007). Folge der Reaktion ist die Abstoßung des

Stammzelltransplantats oder Transplantatversagen. Im Rahmen der Stammzelltransplantation besteht diese Gefahr vor allem bei einer low-intensity Konditionierung (Welniak, Blazar, and Murphy 2007).

1.3.3.3 Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Graft-versus-Host-Erkrankung (*engl.* graft-versus-host-disease, GvHD) ist eine immunvermittelte Erkrankung, entstehend aus komplexen Interaktionen zwischen der adaptiven Immunität der Spendenden und Empfangenden.

1.4 Graft-versus-Host-Erkrankung

Als Komplikation der aHSCT ist die GvHD sowohl bei adulten als auch bei pädiatrischen Patient:innen ausschlaggebend für das Überleben und die Lebensqualität nach der aHSCT.

Man unterscheidet zwischen der akuten GvHD (aGvHD) und der chronischen GvHD (cGvHD). Anfänglich wurde eine GvHD als akut bezeichnet, wenn sie weniger als 100 Tage nach der aHSCT auftrat, als chronisch, wenn sie mehr als 100 Tage nach der aHSCT auftrat. Die Auswertung späterer Studien führte zu der Abschaffung dieser Einordnung, da sich aGvHD und cGvHD nicht nur nach dem Zeitpunkt des Auftretens unterscheiden (Jagasia et al. 2015). Vor allem die Pathogenese und damit auch die Symptomatik scheint different zu sein (Jagasia et al. 2015).

Bereits 1966 erkannte Billingham die Voraussetzungen, die für das Auftreten einer GvHD erfüllt sein müssen. Die Empfangenden müssen unfähig sein das Transplantat abzustößen, das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten und es müssen Inkompatibilitäten im Antigenmuster der Spendenden sowie der Empfangenden vorliegen (Billingham 1966; Welniak, Blazar, and Murphy 2007).

Als Risikofaktoren, die das Auftreten einer GvHD wahrscheinlicher machen, gelten sowohl Unterschiede innerhalb der HLAs als auch innerhalb der Minor-Histokompatibilitätsantigene (*engl.* minor histocompatibility antigens, MiHA) (Eyrich and Schulze 2019). MiHAs sind polymorphe Peptide, die sich zwischen Spendenden und Empfangenden aufgrund von einzelnen Nukleotid-Polymorphismen, Gen-Insertionen oder Gen-Deletionen unterscheiden.

Zudem zählen ein höheres Alter, sowohl der Spendenden als auch der Empfangenden, Sexmismatch, peripheres Blut als Stammzellquelle, reduzierte GvHD-Prophylaxe sowie

eine vorausgegangene Infektion nach aktueller Forschung zu den Risikofaktoren für das Auftreten einer aGvHD und cGvHD (Zeiser and Blazar 2017a; Flowers et al. 2011).

Zusätzlicher und wichtigster Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD ist eine vorausgegangene aGvHD (Atkinson et al. 1990; Zecca et al. 2002).

Eine Prophylaxe der GvHD kann je nach Indikation zur aHSCT und Art der aHSCT erwogen werden. Mittel der ersten Wahl ist ein Calcineurin-Inhibitor kombiniert mit einem Antimetabolit, beispielsweise Cyclosporin A oder Mycophenolat-Mofetil (Penack et al. 2020).

1.4.1 Akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Bei adulten Patient:innen tritt eine aGvHD mit einer Wahrscheinlichkeit von 30%-50% nach der aHSCT auf, bei Kindern und Jugendlichen mit einer Wahrscheinlichkeit von 20%-40%. Damit zählt die aGvHD zu den relevanten Komplikationen nach einer aHSCT (Zeiser and Blazar 2017a).

1.4.1.1 Diagnosekriterien

Die Diagnosestellung beruht auf Klinik, Laborparametern und Biopsien der betroffenen Organe. Hauptmanifestationsstellen der aGvHD sind, in absteigender Häufigkeit, die Haut, der Gastrointestinaltrakt und die Leber (Harris et al. 2016). Um die Diagnosestellung und Einteilung des Schweregrades einer aGvHD zu vereinheitlichen, wurde durch das Mount Siani Acute GVHD International Consortium eine Leitlinie veröffentlicht. Als Beurteilungskriterium der Haut wurde der Umfang ausgebildeter makulopapulärer Effloreszenzen festgelegt, als Beurteilungskriterium des Gastrointestinaltraktes Milliliter Diarrhoe pro Tag, als Beurteilungskriterium der Leberschädigung das Bilirubin im Blut, entstehend durch die Schädigung der kleinen Gallengänge (Harris et al. 2016). Die Diagnose kann durch histologische Befunde verifiziert werden.

1.4.1.2 Schweregrad

Zusammen mit dem Karnofsky-Index erfolgt die Einteilung des Gesamtschweregrades der aGvHD modifiziert nach Glucksberg auf einer Skala von 0 bis 4, dargestellt in Tabelle 1 (Glucksberg et al. 1974).

Tabelle 1 : Einteilung des Gesamtschweregrades der aGvHD, modifiziert nach Glucksberg

aGvHD: acute graft-versus-host-disease/ akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Schweregrad	Haut	Leber	Darm	Karnofsky
0 (keine aGvHD)	0	0	0	100 %
1 (leicht)	1-2 0	0 0-1	0 0-1	80%
2 (moderat)	0 1-3 3	0-1 1 0	1 0-1 0	70%
3 (schwer)	2-3	2-3	2-3	60%
4 (lebensbedrohlich)	2-4	2-4	2-4	40%-50%

1.4.1.3 Therapie

Mittel der ersten Wahl zur Therapie der aGvHD sind sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern und Jugendlichen Glucocorticoide. Reicht bei einer aGvHD Grad 1 oft eine topische Anwendung aus, stellt eine aGvHD Grad 2, 3 oder 4 eine Indikation zur systemischen Therapie mit Glucocorticoiden dar (Penack et al. 2020). Bei Symptombefreiheit kann mit dem langsamen Ausschleichen begonnen werden. Bei Symptompersistenz gibt es bisher keine einheitliche Second-Line-Therapie.

1.4.1.4 Pathophysiologie

Die aGvHD scheint, nach Forschungen an Tiermodellen und klinischen Daten, überwiegend T-Zell-vermittelt zu sein. Die populärste Hypothese besagt, dass eine aGvHD durch inflammatorische Trigger entsteht (Zeiser and Blazar 2017a). Diese Trigger werden durch Zellschädigung, allen voran durch Schädigung von Zellen des Gastrointestinaltraktes, freigesetzt (Zeiser and Blazar 2017a). Inflammatorische Trigger sind Zytokine, hauptsächlich IL1 β , IL6 und TNF α , damage-associated molecular patterns (DAMPs) und pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), die von Bakterien, Pilzen oder Viren stammen (Stenger et al. 2012; Zeiser and Blazar 2017a).

Zytokine, DAMPs und PAMPs initiieren über ihre korrespondierenden Rezeptoren eine unspezifische Inflamationsreaktion.

Zentrale Bedeutung hat während des Inflamationsprozesses die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC; *engl.* antigen-presenting cell) wie DCs, Monozyten und Neutrophilen (Zeiser and Blazar 2017a). Die aktivierten APCs stammen sowohl von den Empfangenden als auch von den Spendenden ab (Zeiser and Blazar 2017a). Sie präsentieren MHC-Moleküle oder Minor-Histokompatibilitätsantigene der Empfangenden. T-Zellen der Spendenden, die einen passenden T-Zell-Rezeptor exprimieren, interagieren mit diesen APCs (Stenger et al. 2012). Es kommt zur Aktivierung auto- und alloreaktiver T-Zellen der Spendenden (Stenger et al. 2012).

Die aktivierten T-Zellen sind Hauptinitiator des Zelltodes von Zielgeweben, meist Epithelien (Zeiser and Blazar 2017a). Es kommt zu den Symptomen einer aGvHD.

1.4.2 Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

Neben einem Rezidiv ist die cGvHD die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität nach einer aHSCT, die aufgrund einer malignen Vorerkrankung durchgeführt wurde (Baird, Cooke, and Schultz 2010). Bei Erwachsenen beträgt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer cGvHD nach einer aHSCT 60%-70%, bei pädiatrischen Patient:innen 20%-50% (Baird, Cooke, and Schultz 2010).

Symptome können ubiquitär auftreten, was die Diagnose einer cGvHD erschwert. Zudem ist die Pathophysiologie noch nicht komplett verstanden und spezifische Biomarker fehlen. Die cGvHD ist ein Multiorgansyndrom das eine Entzündungsreaktion sowie Fibrosierung verschiedener Gewebe auslöst und oft in einer permanenten Dysfunktion der Organe endet (Lee 2017).

Eine cGvHD kann de-novo oder abhängig von einer aGvHD auftreten. Bei progressivem Auftreten entsteht die cGvHD direkt aus einer aGvHD heraus, bei quieszenten Auftreten tritt die cGvHD nach abgeklungener aGvHD auf (Jagasia et al. 2015). Auch das gleichzeitige Auftreten von Symptomen einer aGvHD und einer cGvHD ist möglich und wird als Overlap-Syndrom bezeichnet (Jagasia et al. 2015).

1.4.2.1 Diagnosekriterien

Erster Schritt zur Diagnosestellung ist der Ausschluss einer Infektion, einer Medikamentennebenwirkung, einer neuen malignen Erkrankung oder einer anderen Ursache der aufgetretenen Symptome. Differentialdiagnostisch muss zudem anhand der Symptome eine aGvHD ausgeschlossen werden.

Zuletzt wurde 2014 eine Definition der cGvHD sowie eine Schweregradeinteilung durch die National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference veröffentlicht (Jagasia et al. 2015). Es muss entweder eine diagnostische Manifestation der cGvHD vorliegen oder eine distinktive Manifestation zusammen mit einem passenden Diagnostikbefund, wie einer Biopsie, Laborkonstellation oder Bildgebung (Jagasia et al. 2015). Zu den diagnostischen Manifestationen gehören Lichen-Planus-artige, Lichen-Sklerosus-artige und Morphea-artige Veränderungen der Haut, des Mundes oder der Genitalien sowie Poikilodermie, Sklerosen, Web-Stenosen des Ösophagus oder das Bronchiolitis-obliterans-Syndrom der Lunge (Jagasia et al. 2015). Distinktive Manifestationen sind beispielsweise papulosquamöse Läsionen der Haut, orale Ulzerationen, Onycholyse oder trockene Augen (Jagasia et al. 2015).

1.4.2.2 Schweregrad

Die NIH Consensus Conference hat für jedes der acht am häufigsten betroffenen Organsysteme, Haut, Mund, Leber, Auge, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Gelenke/Bindegewebe und Genitaltrakt einen Schweregrad von 0 bis 3 etabliert; keine cGvHD, mild, moderat und schwer (Detrait et al. 2015).

Die einzelnen Scores der Organsysteme werden für die Feststellung des Gesamtschweregrades der cGvHD genutzt. Wie in Tabelle 2 ersichtlich wird der Gesamtschweregrad ebenfalls über eine Skala von 0 bis 3 definiert.

Tabelle 2: Einteilung des Gesamtschweregrades der cGvHD nach der NIH Consensus Conference 2014

cGvHD: chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

Schweregrad der cGvHD	Zahl der betroffenen Organe	Schweregrad der Organmanifestation
0 (keine cGvHD)	0	keine Symptome
1 (mild)	1-2	mild (außer Lunge)
2 (moderat)	>2	mild-moderat (Lunge: nur mild)
3 (schwer)	>2	schwer (Lunge: moderat-schwer)

1.4.2.3 Therapie der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung

Eine endgültige Aufklärung der Pathogenese der cGvHD ist entscheidend, um spezifischere Therapien einleiten zu können. Die aktuellen Therapieansätze wirken unspezifisch und haben eine Vielzahl schwerer Nebenwirkungen, insbesondere begünstigen sie das Auftreten lebensbedrohlicher Infektionen (Stenger et al. 2012).

Medikamentöse Therapien können sowohl topisch als auch systemisch eingeleitet werden. Mögliche Medikamente sind Glucocorticoide, Calcineurininhibitoren oder Biologika (Penack et al. 2020). Ebenso ist eine Kombination der medikamentösen Therapie mit Therapieverfahren wie der extrakorporalen Photopherese möglich (Penack et al. 2020). Die Therapie pädiatrischer Patient:innen leitet sich von der Therapie Erwachsener ab. Ein Standard konnte bisher nicht etabliert werden. Im Fokus stehen altersabhängige, multidisziplinäre und ganzheitliche Ansätze, um eine bestmögliche Behandlung, Symptomkontrolle und Lebensqualität zu erreichen (Baird, Cooke, and Schultz 2010). Eine einheitliche Second-Line-Therapie bei Therapieversagen konnte bisher weder bei adulten noch bei pädiatrischen Patient:innen etabliert werden.

1.4.2.4 Pathophysiologie

Die exakte Pathophysiologie der cGvHD ist noch weitgehend unverstanden. Es existieren Hypothesen, die sich aus Tier-Modellen in der Zusammenschau mit Patient:innendaten generieren. Die ursprüngliche Hypothese besagt, dass die cGvHD eine hauptsächlich Th2-Zell-vermittelte Erkrankung mit autoimmunen Komponenten sei (Welniak, Blazar, and Murphy 2007). Neuere Studien fokussieren sich jedoch zunehmend auf eine gestörte Homöostase und Immunrestitution, nicht nur der T-Zellen, sondern auch der B-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie der DCs (Zeiser and Blazar 2017b).

Durch R. Zeiser und B. Blazar wurde 2017 im New England Journal of Medicine ein Review zum aktuellsten Stand der Forschung veröffentlicht. Beachtet wurden Daten von Patient:innen aller Altersgruppen. Nach dieser Publikation kann die Pathogenese der cGvHD in drei Phasen gegliedert werden, wobei nicht zwingend alle drei Phasen durchlaufen werden (Zeiser and Blazar 2017b).

Die erste Phase sei eine unspezifische Entzündungsreaktion der angeborenen Immunabwehr. Schlüsselmechanismus sei die Aktivierung von APCs durch inflammatorische Trigger, die nach Zellschädigung freigesetzt werden. Die zweite Phase sei geprägt von chronischen Entzündungsreaktionen, Thymusverletzung, fehlregulierter

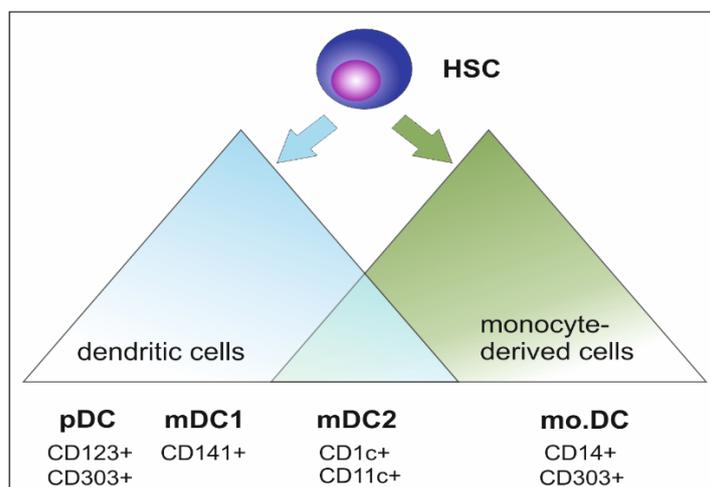
T-Zell- und B-Zell-Immunität sowie mangelnder Regulationsmechanismen. Die dritte Phase sei dominiert von Gewebereparaturmechanismen und Fibrosierung, potenziert durch Th2-Zytokine, PDGF α (engl. platelet-derived growth factor) und TGF β (engl. transforming growth factor- β) der Makrophagen sowie TNF α , IL1 β und IL6 myeloischer Zellen.

1.5 Dendritische Zellen

1.5.1 Charakteristika

DCs sind eine seltene, heterogene Gruppe von professionellen APCs. Sie sind von zentraler Bedeutung für das Erkennen von Antigenen und für das Einleiten einer gezielten Immunantwort (Banchereau and Steinman 1998). Sie interagieren sowohl mit Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr (Palucka and Banchereau 2012). DCs sind in Pathomechanismen und Therapien von Krebserkrankungen, den Pathomechanismen von Autoimmunerkrankungen sowie in allergische Reaktionen involviert (Steinman and Banchereau 2007). Aufgrund ihrer zentralen Rolle innerhalb dieser immunologischen Prozesse untersucht diese Arbeit die Rekonstitution der DCs im Zusammenhang mit dem Auftreten einer cGvHD.

1.5.2 Subpopulationen



HSC: hematopoietic stem cell/ hämatopoietische Stammzelle, **mDC:** myeloid dendritic cell/ myeloide dendritische Zelle, **mo.DC:** monocyte-derived dendritic cell/ monozytäre dendritische Zelle, **pDC:** plasmacytoid dendritic cell/ plasmazytoide dendritische Zelle

Abbildung 1: Abstammung und mögliche Oberflächenmerkmale der DCs modifiziert nach Collin and Bigley 2018

Es existiert eine Vielzahl an Subpopulationen der DCs (Abbildung 1). Die meisten DCs stammen von myeloiden und lymphoiden Progenitorzellen des Knochenmarks ab und lassen sich in myeloide dendritische Zellen (*engl.* myeloid dendritic cells; mDCs) und plasmazytoide dendritische Zellen (*engl.* plasmacytoid dendritic cells; pDCs) unterteilen (Collin and Bigley 2018). Innerhalb der mDCs existieren zwei Hauptpopulationen; mDC1 und mDC2 (Collin and Bigley 2018).

Konventioneller Marker der mDC1 sind CD 141, der mDC2 CD1c und CD11c (Collin and Bigley 2018). Diese Marker reichen jedoch nicht zuverlässig zur Differenzierung aus. Im Kontext einer Inflammation können sich Monozyten zu DCs differenzieren, die eine hohe Ähnlichkeit zu mDC2 aufweisen (Collin and Bigley 2018). Hier ist eine Unterscheidung mittels des Oberflächenmerkmals CD14 möglich, das insbesondere durch Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Collin and Bigley 2018).

Bezüglich der pDCs wurden CD123 und CD303 als konventionelle Marker etabliert (See et al. 2017). Problematisch ist, dass auch Vorläuferzellen der mDCs CD123 und CD303 exprimieren können und diese zukünftig um weitere Marker ergänzt werden müssen (See et al. 2017).

1.5.3 Reifung

Unreife DCs sind im Blut, in Geweben sowie in den lymphatischen Organen lokalisiert (Steinman and Banchereau 2007). Ihre Lebensdauer beträgt wenige Tage bis Wochen (Stenger et al. 2012). Sie haben die Kompetenz große Mengen an Antigenen aufzunehmen und zu prozessieren (Steinman and Banchereau 2007).

Zur Reifung kommt es durch das simultane Vorhandensein verschiedener Stimuli. Mögliche Stimuli sind exogene oder endogene Antigene, Immunkomplexe, Liganden des CD40-Rezeptors oder proinflammatorische Zytokine (Stenger et al. 2012). Reifung bedeutet, dass Zelloberflächenmoleküle wie MHC, kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86, CD83) sowie passende Chemokinrezeptoren, besonders CCR7, hochreguliert werden (Galluzzi et al. 2012).

Mit Hilfe ihres einzigartigen Spektrums an Chemokinrezeptoren migrieren die DCs in die T-Zell-Zonen des lymphatischen Gewebes (Collin and Bigley 2018). Ein MHC der DC, beladen mit einem Antigen, stimuliert dort einen passenden T-Zell-Rezeptor (Collin and Bigley 2018). Parallel interagiert ein komplexes Netzwerk an costimulierenden Oberflächenmolekülen der DCs, allen voran Moleküle der B-7-Familie, CD80 (B7.1) und CD86(B7.2), und der TNF α -Rezeptorfamilie mit ihren korrespondierenden Liganden der

T-Zelle (Hubo et al. 2013). Lösliche Mediatoren wie IL12, IL15, IL6 und TNF α tragen dazu bei, die naive T-Zelle zu aktivieren (Hubo et al. 2013). Zusammen mit CD40 und CD83 gelten CD80 und CD86 als gängige Marker für aktivierte DCs (Hubo et al. 2013).

1.5.4 Toleranzmechanismen

Liegen keine Reifungssignale vor, können DCs inhibitorisch wirken. Werden Antigene ohne weitere Reifungssignale an T-Zellen präsentiert, können antigenspezifische T-Zell-Klone zerstört werden und regulatorische T-Zellen (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺) expandieren (Palucka and Banchereau 2012). Eine Selbsttoleranz wird etabliert. Zudem bringt die gegenseitige Stimulation von tolerogenen DCs und regulatorischen T-Zellen sowohl regulatorische T-Zellen aus naiven T-Zellen hervor als auch tolerogene DCs aus DC-Progenitorzellen (Stenger et al. 2012). Über tolerogene Zytokine wird ebenfalls Selbsttoleranz vermittelt. IL10 oder TGF β vermindern lokal die DC-Aktivierung und somit pathologische Entzündungsreaktionen (Hubo et al. 2013). Bei reifen DCs sind die inhibitorischen Rezeptoren wie der IL10-Rezeptor herunterreguliert und die Fähigkeit Antigene aufzunehmen ist kompromittiert (Hubo et al. 2013).

1.5.5 Dendritische Zellen und chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

DCs interagieren sowohl mit T-Zellen als auch mit B-Zellen. In diesen Interaktionen werden Schlüsselmechanismen in der Entstehung einer cGvHD vermutet (Hong et al. 2021).

1.5.5.1 Dendritische Zellen und T-Zellen

Sowohl die Reifung als auch die Negativselektion von T-Zellen findet im Thymus statt. Thymusgewebe wird durch multiple zytotoxische Reize im Rahmen der Therapie der Grunderkrankung oder einer aGvHD geschädigt (Zeiser and Blazar 2017b). Neben den medullären Thymusepithelzellen sind auch mDCs und pDCs des Thymus elementar für die Depletierung autoreaktiver T-Zellen, indem sie Autoantigene präsentieren (Zeiser and Blazar 2017b). Versagt die Negativselektion, gelangen naive, funktionstüchtige, allo- und autoreaktiven T-Zellen in die Peripherie (Stenger et al. 2012).

Zudem gibt Hinweise, dass im Verlauf einer cGvHD auch in der Peripherie DCs mit auto- und alloreaktiven T-Helferzellen interagieren (Zeiser and Blazar 2017b). Folge ist beispielsweise die Produktion von Interleukin17A durch T-Helferzellen, welches die Entzündungsreaktion und Makrophagenmigration und somit die cGvHD aufrecht erhält (MacDonald, Hill, and Blazar 2017).

Gegen die Induktion autoimmuner Reaktionen steht die Fähigkeit der DCs, die Expansion regulatorischer T-Zellen zu fördern und pathologische T-Zell-Antworten zu unterdrücken (Stenger et al. 2012). Klinische Daten deuten darauf hin, dass eine geringe Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut mit einer cGvHD vergesellschaftet ist (Hong et al. 2021).

1.5.5.2 Dendritische Zellen und B-Zellen

Neben Interaktion zwischen DCs und T-Zellen, auch außerhalb der Antigenpräsentation, ist der mögliche Einfluss von DCs auf die B-Zellen, bezogen auf die Entstehung einer cGvHD, erst später in den Fokus der Forschung gerückt.

Nicht nur eine gestörte Negativselektion im Knochenmark und der damit einhergehende Verlust der B-Zell-Toleranz vermittelt eine Korrelation zwischen B-Zellen und dem Entstehen von Immunreaktionen wie einer cGvHD (Zeiser and Blazar 2017b). Auch das direkte Zusammenspiel zwischen DCs und B-Zellen kann ein entscheidender Faktor für die Entstehung einer cGvHD sein.

So führt nur die gemeinsame Präsentation von Antigenen durch DCs und B-Zellen zu einer optimalen und effektiven T-Helferzell-Funktion in vivo (Kleindienst and Brocker 2005). pDCs können zudem die Differenzierung von CD40-aktivierten B-Zellen, auch allo- und autoreaktiver B-Zellen, in antikörperproduzierende Plasmazellen durch sequenzielle Sekretion von IL6 und Interferon α (IFN α) induzieren (Jego et al. 2003). Ein weiteres Zytokin, BAFF (*engl.* B cell activating factor), fördert über seine korrespondierenden Rezeptoren die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen (Shaw et al. 2010). BAFF wird durch aktivierte DCs sezerniert und ist ein Zytokin der TNF α Superfamilie. Durch das Sezernieren von IL6, IFN α und BAFF tragen vor allem pDCs, neben dem Zell-Zell-Kontakt, partiell zur B-Zell-Aktivierung bei (Shaw et al. 2010).

Um weitere Grundlagen zur Rolle der DCs im Entstehen der cGvHD zu evaluieren erfassten wir Daten 61 stammzelltransplantierter Kinder und Jugendlicher.

1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es potentielle Unterschiede zwischen stammzelltransplantierten pädiatrischen Patient:innen mit und ohne cGvHD zu erfassen. Einerseits wurde der Gewinn neuer Erkenntnisse über die Pathogenese der cGvHD im pädiatrischen Bereich angestrebt, andererseits die Identifikation potentieller Biomarker, die mit einem erhöhten Risiko für eine cGvHD einhergehen. Die Pathogenese der cGvHD ist im pädiatrischen Setting weitestgehend unbekannt und Daten pädiatrischer Patient:innen zur Rekonstitution der DCs sind in Hinblick auf eine aGvHD und cGvHD weitestgehend nicht vorhanden.

Wir analysierten allgemeine klinische Charakteristika von 61 allogenen stammzelltransplantierten Patient:innen sowie prospektiv deren Immunrekonstitution nach aHSCT. Besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf die Rekonstitution der DCs und deren Rolle in der Pathogenese der cGvHD. Hierzu lagen keine pädiatrischen Daten vor.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen für die Analyse der von uns generierten Daten:

Gab es signifikante Unterschiede bezüglich der patient:innen- und aHSCT-bezogenen Daten zwischen Patient:innen mit und ohne cGvHD?

Gab es signifikante Unterschiede bezüglich der Rekonstitution der Immunzellen nach aHSCT zwischen Patient:innen mit und ohne cGvHD? Wenn ja, zu welchem Zeitpunkt traten sie auf, korrelierten sie mit dem Schweregrad der cGvHD und waren sie reversibel?

Hierbei lag der Fokus auf:

- Subpopulationen der Lymphozyten allgemein
- der intrazellulären Expression der Zytokine in T-Zellen
- Subpopulationen der dendritischen Zellen

2. Material und Methoden

Die Pathogenese der cGvHD pädiatrischer Patient:innen sollte besser verstanden und potentielle Biomarker für das Auftreten einer cGvHD identifiziert werden. Hierzu wurden verschiedene Subpopulationen der Immunzellen des peripheren Blutes untersucht. Dies geschah zu sieben verschiedenen Zeitpunkten nach der aHSCT (<1 Monat, 1-2 Monate, 2-6 Monate, ½-1 Jahr, 1-2 Jahre, 2-5 Jahre, >5 Jahre) mittels FACS (*engl.* fluoreszenz-activated cell sorting), einer Form der Durchflusszytometrie. Durchgeführt wurden die Analysen von den Mitarbeitenden des Stammzell-Labors des Universitätsklinikums Würzburg. Die Beschreibung des Kollektivs der 61 stammzelltransplantierten Patient:innen, die in diese Studie eingeschlossen wurden, ist Bestandteil des Ergebnisteils.

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Ein positives Ethikvotum durch die Ethikkommission der Universität Würzburg lag vor (228/11).

2.2 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur optischen Erfassung von Partikeln, meist Zellen. Innerhalb eines Flüssigkeitsstroms werden diese Partikel an der Flow-Zelle, dem Messpunkt, vorbeigeleitet. Innerhalb der Flow-Zelle werden die Partikel anhand von Laserlicht differenziert. Es werden Streulicht und Fluoreszenzsignale erfasst.

Die Streuung des Lichtes ist abhängig von der Querschnittsfläche, der intrazellulären Komponenten, dem Refraktionsindex sowie der Membranstruktur der zu untersuchenden Zellen. Je unregelmäßiger eine Zelle beschaffen ist, desto mehr Licht streut sie. Erfasst wird diese Streuung durch zwei Photodetektoren. Ein Photodetektor misst senkrecht zum Laserlicht und erfasst sämtliches gebrochenes Streulicht (Seitenstreulicht; *engl.* sideward scatter; SSC). Die Brechung des Seitenstreulichtes ist vor allem von den intrazellulären Komponenten abhängig. Der zweite Photodetektor misst parallel zum Laserlicht, ist durch Blockerstreifen geschützt und erfasst deshalb selektiv Licht, welches in einem flachen Winkel von der durchfließenden Zelle gebrochen wird (Vorwärtsstreulicht; *engl.* forward scatter; FSC). Das Vorwärtsstreulicht verhält sich direkt proportional zum Zellvolumen.

Durch ihre Scatter-Eigenschaften erfolgt die Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.

Neben den beiden Photodetektoren zum Analysieren des Seitenstreulichtes und des Vorwärtsstreulichtes ist das Durchflusszytometer mit vier weiteren Photodetektoren ausgestattet. Diese erfassen Licht anderer Wellenlängen senkrecht zum einfallenden Licht. Durch das Versetzen der Zellen mit Antikörpern können so weitere Differenzierungen vorgenommen werden. Die Antikörper sind für ein bestimmtes Oberflächenmerkmal spezifisch und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Eigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe ist es, Licht einer Wellenlänge zu absorbieren, jedoch unterschiedlich zu emittieren (unterschiedliche Stokes-Verschiebung). Drei Laseremitter (405nm, 488nm, 633nm) erzeugen Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Durch die mit Antikörpern versetzten Zellen wird dieses Licht verschieden emittiert und gelangt von den jeweiligen Sammeloptiken durch Spektralfilter zu den Photodetektoren.

Die Photodetektoren übersetzen die emittierten Photonen in elektrische Impulse, wozu verschiedene Verstärker nötig sind. Zur Visualisierung der Ergebnisse kann ein Histogramm erzeugt werden, das logarithmisch die Häufigkeitsverteilung der Intensitäten der emittierten Fluoreszenzsignale darstellt. Die Erfassung der Intensitäten erfolgt durch den Analog-Digital-Konverter.

Ebenfalls ist es möglich die Ergebnisse mittels eines Zweiparameterpunktediagramms (*engl.* Dot-Plot) gegeneinander aufzutragen. Ein Punkt verkörpert eine Zelle sowie zwei Charakteristika dieser Zelle. Hier müssen die Fluoreszenzsignale gegeneinander auskompensiert werden, da sich Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzsignale überschneiden können.

Durch FACS können die Zellen ihren erfassten Merkmalen nach sortiert und gezählt werden. Dies ist mittels hydrodynamischer Fokussierung und einem elektrostatischen Sortiermechanismus möglich.

In dem durchgeführten Versuch wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie das Seitenstreulicht, das Vorwärtsstreulicht sowie die Signale sechs unterschiedlicher Fluorochrome gleichzeitig erfasst.

2.3 Probengewinnung und Verarbeitung

Das periphere Blut der Studienpatient:innen wurde in EDTA-Monovetten asserviert. Die Probe wurde innerhalb von 24 Stunden standardisiert weiterverarbeitet, um die Zelloberflächenmerkmale zu erhalten.

Durch das Ficoll Verfahren wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Diese mononukleären Zellen waren Lymphozyten und Monozyten sowie Vorläuferzellen von Makrophagen und DCs.

Die Probe wurden mit mindestens 1200µl phosphatgepufferter Salzlösung aufgefüllt, via Durchflusszytometrie gezählt und in zehn Tubes zu je 100 µl gefüllt. Sämtliche Daten des Versuchs wurden durch das Durchflusszytometer FACS Canto generiert.

Um eine Differenzierung der Leukozyten (dt. Immunzellen) zu ermöglichen, wurden die monozytären Blutzellen mit monoklonalen Antikörpern versetzt, 15 Minuten dunkel inkubiert und danach per lyse no-wash approach prozessiert. Jeder Antikörper war jeweils für ein Oberflächenmerkmal oder ein intrazelluläres Merkmal spezifisch und an ein Fluorochrom gebunden. Für intrazelluläre Färbungen waren nach der Färbung der Oberflächenmerkmale noch weitere Wasch-, Färbe- und Fixierschritte nötig (vgl. (Wiegering et al. 2009)). Anschließend erfolgte die Durchflusszytometrie.

Als Fluorochrome wurden Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCp), Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-Cyanin7 (APC-H7), Phycoerythrin-Cyanin7 (PE-Cy7), R-Phycoerythrin (R-PE), BD Horizon™ V500 (V500), BD Horizon™ V450 (V450) sowie Fluorescein Isothiocyanat (FITC) verwendet. Alle monoklonalen Antikörper stammten von der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland).

Da nicht mehr als sechs verschiedene Fluorochrome gleichzeitig via Durchflusszytometrie erfasst werden konnten, erfolgt die Aufteilung in verschiedene Tubes. In Tube 10 wurden T-Zellen (CD3), ein Subtyp (CD8) und Th1-Zytokine (TNF α , IL2, IFN γ) erfasst, in Tube 11 Th2-Zytokine (IL10, IL4) sowie T-Gedächtniszellen (CD3, CD45RO), in Tube 12 B-Zellen (CD19) sowie natürliche Killerzellen (CD15/56). Die Messungen der mDCs (CD 45, CD1c, CD11c) und deren Subtypen (CD80, CD83, CD86, CCR7) erfolgte in Tube 6 und 7, die Messungen der pDCs (CD45, CD303, CD11c-) und deren Subtypen (CD80, CD83, CD 86, CCR7) in Tube 8 und 9.

Eine Auflistung der verschiedenen Tubes, der verwendeten fluoreszierenden Antikörper sowie deren dazugehörigen Antigene zeigt Tabelle 3. Intrazelluläre Marker wurden zur Erhebung des Zytokinstatus benötigt und sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Tabelle 3: Antigene und deren dazugehörige an Antikörper gebundene Fluorochrome

APC: Allophycocyanin, **APC-H7:** Allophycocyanin-Cyanin7, **CCR:** Chemokinrezeptor, **CD:** cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **FITC:** Fluorescein Isothiocyanat, **IFN:** Interferon, **IL:** Interleukin, **PE-CY7:** Phycoerythrin-Cyanin7, **PerCP:** Peridinin-Chlorophyll-Protein, **R-PE:** R-Phycoerythrin **TNF:** Tumornekrosefaktor, **V450:** BD Horizon™ V450, **V500:** BD Horizon™ V500

Tube	Fluorochrom							
	FITC	PerCP	APC	PE-CY7	APC-H7	V450	V500	R-PE
	Antigen							
6	CD1c			CD 83	CD 80	CD 86		
7			CD1c			CD11c	CD45	CCR7
8			CD303		CD80	CD86	CD14	
9			CD303	CD83		CD11c	CD45	CCR7
10		CD3	<u>TNFα</u>		CD8	<u>IL2</u>	<u>IFNγ</u>	
11	<u>IL4</u>		<u>IL10</u>		CD45RO	CD3		
12				CD15/56	CD19			

Um auch für seltene Zellen, wie die DCs, ausreichend hohe Zahlenwerte zu generieren, wurden pro Probe 100.000 Events via Durchflusszytometrie erfasst. Die Daten wurden zwischen den Jahren 2012 bis 2015 erhoben. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten wurde eine monatliche Kalibrierung des Durchflusszytometers FACS Canto nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4 Gatingstrategie

Die durchflusszytometrisch erfassten Ergebnisse wurden in einem Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. So war es möglich verschiedene Zellpopulationen einer Blutprobe im Graphen zu identifizieren, entsprechend zu markieren (*engl.* gaten) und diese Subpopulation in einem nächsten Schritt weiter zu analysieren. Die dazu verwendete Software war FACS Diva. Der Gatingvorgang wurde von denselben beiden erfahrenen Personen durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.4.1 Lymphozyten

Erstes Unterscheidungsmerkmal stellten die Scatter-Eigenschaften der Blutzellen dar (Abbildung 2). Das Vorwärtsstreulicht (FSC) erlaubte eine Bestimmung der Zellgröße, durch das Seitenstreulicht (SSC) war es möglich kaputte und sehr kleine Zellen

graphisch auszusortieren. Die Population der Lymphozyten zeichnete sich durch geringe FSC- und geringe SSC-Eigenschaften aus.

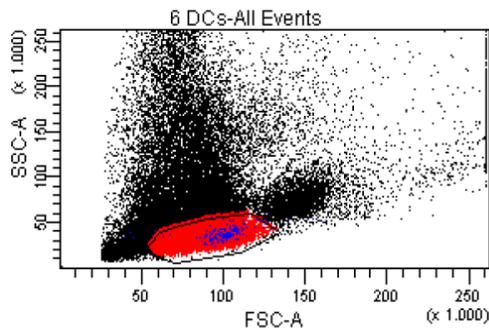


Abbildung 2: Lymphozytengate

Nur die im Lymphozytengate enthaltenen Ereignisse wurden für die weitere Differenzierung in Subpopulationen berücksichtigt. Die Unterteilung in Subpopulationen erfolgte anhand der Oberflächenmerkmale CD3, CD4, CD8, CD19 und CD16/56. Diese Oberflächenmerkmale wurden durch korrespondierende fluoreszierende Antikörper markiert. Die Intensität der Fluoreszenzsignale dieser Antikörper wurde logarithmisch erfasst. Anhand der Intensität der Signale erfolgte die Unterteilung in für das entsprechende Merkmal positive oder negative Zellen.

Die erste Unterteilung erfolgte in CD3-positive (CD3+) und CD3-negative (CD3-) Zellen (Abbildung 3). Die Subpopulation der CD3+ Zellen wurde anschließend nach dem zusätzlichen Vorhandensein des Oberflächenmerkmals CD8 unterteilt (Abbildung 4). Alle CD8-negativen Zellen wurden als CD4-positive Zellen (CD3+ CD4+) definiert. Die Kombination der Oberflächenmerkmale CD3+ CD4+ war charakteristisch für T-Helferzellen, die Kombination CD3+ CD8+ für zytotoxische T-Zellen.

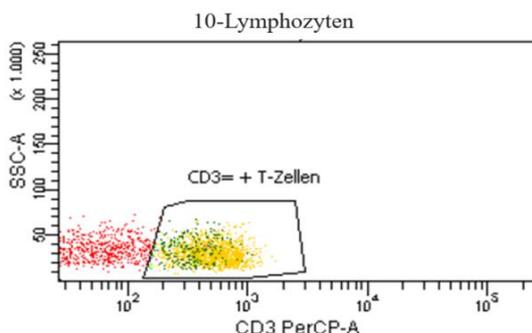


Abbildung 3: Subpopulation CD3+ Zellen

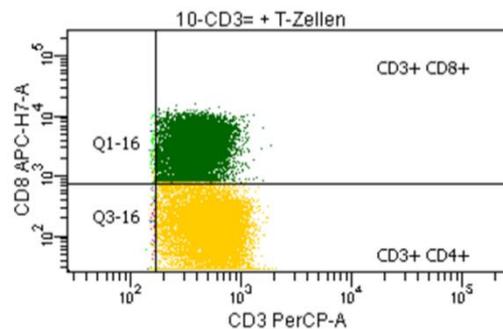


Abbildung 4: Subpopulation CD3+CD4+ und CD3+CD8+ Zellen

Zudem wurden aus der Gesamtheit der Fluoreszenzsignale des Lymphozytengates CD19-positive sowie CD16/CD56-positive Zellen bestimmt. Das Oberflächenmerkmal CD19 war charakteristisch für B-Zellen, natürliche Killerzellen exprimierten die Oberflächenmerkmale CD16 und CD56 (Abbildung 5 und 6).

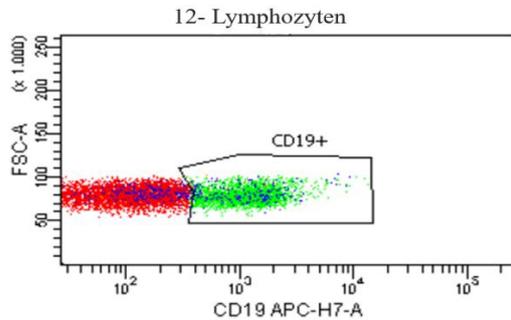


Abbildung 5: Subpopulation CD19+ Zellen

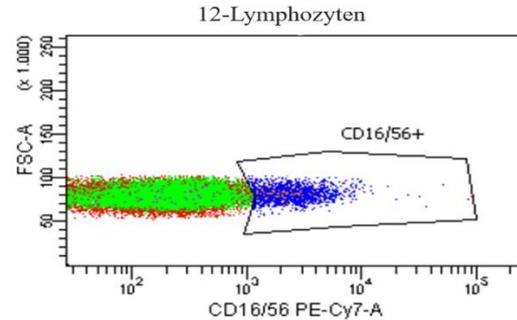


Abbildung 6: Subpopulation CD16/56+ Zellen

2.4.2 Zytokine

Die Zytokinexpression der CD3+ Zellen (T-Zellen) wurde in einem weiteren Schritt untersucht. Analog zu dem vorrausgehenden Abschnitt wurde die Subpopulation der T-Zellen bestimmt. Die T-Zellen wurden anschließend nach der Expression oder Nicht-Expression eines Zytokins unterteilt. Erfasst wurde die Expression der für Th1-Zellen charakteristischen Zytokine $TNF\alpha$, IL2 und $IFN\gamma$ (Abbildung 7-9) sowie die Expression der für Th2-Zellen charakteristischen Zytokine IL4 und IL10 (Abbildung 10 und 11).

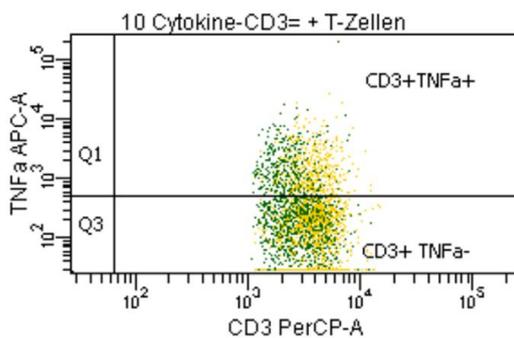


Abbildung 7: Subpopulation $TNF\alpha$ -exprimierender T-Zellen

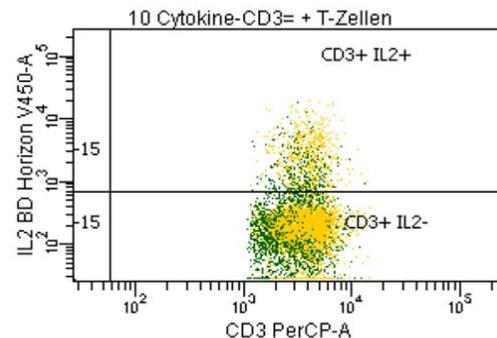
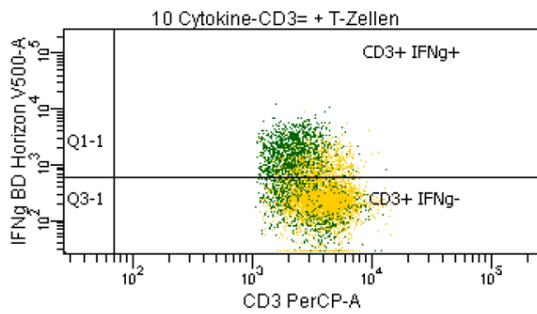
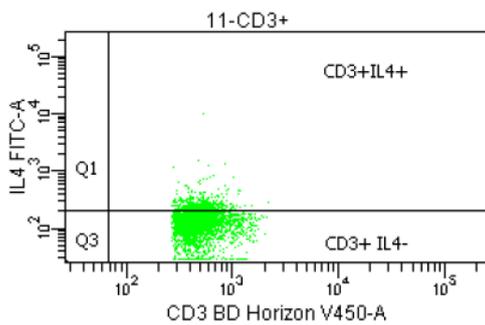


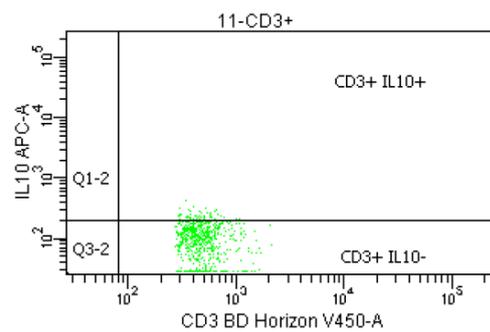
Abbildung 8: Subpopulation IL2-exprimierender T-Zellen



**Abbildung 9: Subpopulation
IFN γ -exprimierender T-Zellen**

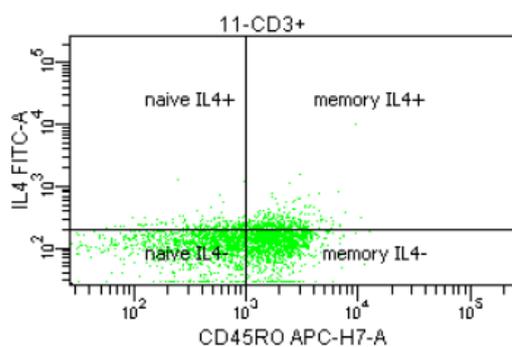


**Abbildung 10: Subpopulation
IL4-exprimierender T-Zellen**



**Abbildung 11: Subpopulation
IL10-exprimierender T-Zellen**

Ebenso wurde die Expression von IL4 durch naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen untersucht. Charakteristisches Oberflächenmerkmal der T-Gedächtniszellen war CD45RO. CD45RO-negative Zellen wurden als CD45RA-positive Zellen definiert. CD45RA war das charakteristische Oberflächenmerkmal naiver T-Zellen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Subpopulation IL4-exprimierender
naiver T-Zellen und T-Gedächtniszellen**

2.4.3 Dendritische Zellen

Zur Identifizierung der DCs wurden alle CD45-positiven Zellen erfasst (Abbildung 13). CD45 wurde von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert.

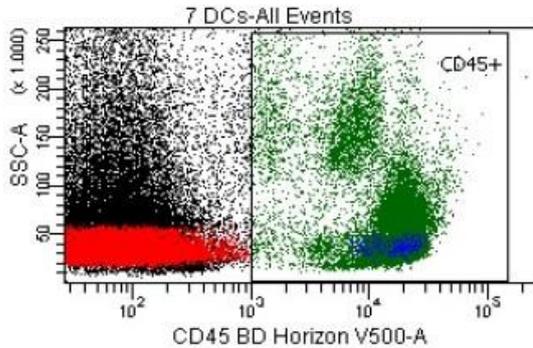


Abbildung 13: Subpopulation CD45-exprimierender Zellen

Analog zur Gatingstrategie der Lymphozyten erfolgte die Erfassung der DCs anhand ihrer Streueigenschaften und ihrer unterschiedlichen Oberflächenmerkmale. Die mittels CD45 vorselektionierten Ereignisse wurden gegen die SSC-Eigenschaften sowie logarithmisch gegen ein, für DCs charakteristisches, Oberflächenmerkmal aufgetragen. Als charakteristische Oberflächenmerkmale der mDCs wurden CD1c sowie CD11c gewählt (Abbildung 14,16), als charakteristisches Oberflächenmerkmal der pDCs CD303 sowie die Abwesenheit von CD 11c (Abbildung 15,17).

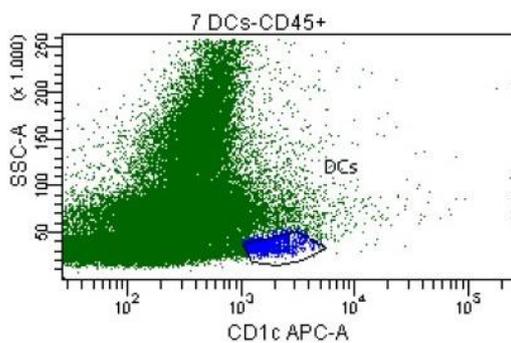


Abbildung 14: Gate der CD1c+ DCs

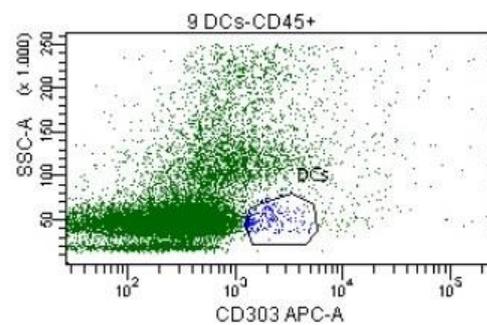


Abbildung 15: Gate der CD303+ DCs

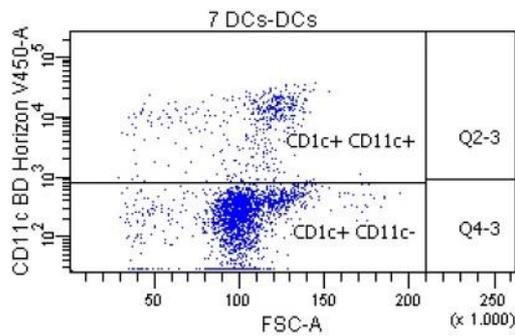


Abbildung 16: Subpopulation der CD1c+ CD11c+ myeloiden DCs

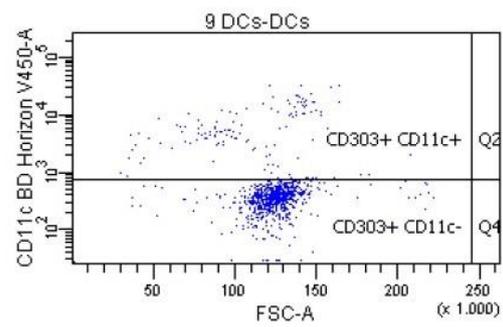


Abbildung 17: Subpopulation der CD303+ CD11c- plasmazytoiden DCs

Um die Rekonstitution der DCs detaillierter zu untersuchen, wurden diese ebenfalls in Subpopulationen unterteilt. Die Unterteilung erfolgte nach dem Vorhandensein der immunstimulatorischen Oberflächenmerkmale CD80, CD83 und CD86 sowie nach dem Vorhandensein des Chemokinrezeptors CCR7. Erfasst wurden diese Oberflächenmerkmale sowohl für mDCs als auch für pDCs. Exemplarisch wurde in den Abbildungen 17-20 der Gatingvorgang für die pDCs dargestellt.

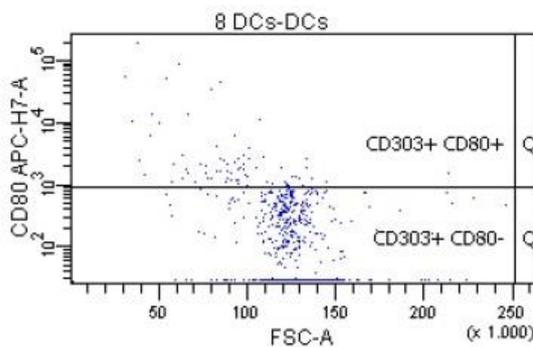


Abbildung 18: Subpopulation CD80+ plasmazytoider DCs

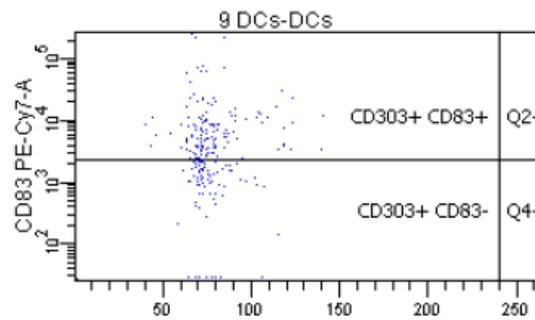


Abbildung 19: Subpopulation CD83+ plasmazytoider DCs

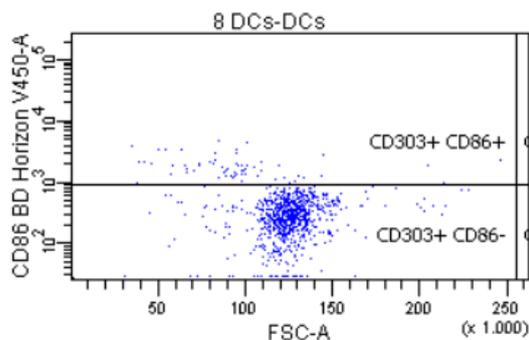


Abbildung 20: Subpopulation CD86+ plasmazytoider DCs

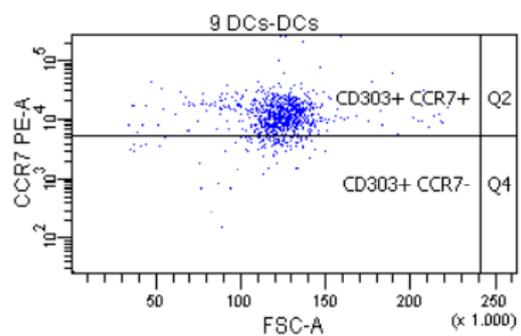


Abbildung 21: Subpopulation CCR7+ plasmazytoider DCs

Zudem wurden monozytäre DCs erfasst, die über die Expression der Oberflächenmerkmale CD303 und CD14 definiert wurden (Abbildung 22).

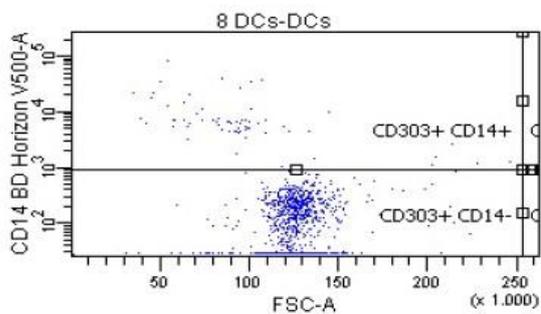


Abbildung 22: Subpopulation monozytärer DCs

2.5 Statistik

Die Verwaltung der Daten erfolgte mittels Excel Files (Microsoft Office Excel), die statistische Auswertung mittels IBM SPSS Statistics. Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit einer Statistikerin der Bioinformatik der Universität Würzburg durchgeführt.

Methodisch wurde die Nullhypothese angenommen. Die Nullhypothese postuliert, dass die Gleichheit der Mittelwerte gegeben ist und damit kein Unterschied zwischen den zu testenden Stichproben besteht. Verglichen wurden die Patient:innen, die eine cGvHD entwickelten, mit den Patient:innen, die keine cGvHD entwickelten. Mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt, mit $p \geq 0,05$ beibehalten. Um signifikante Korrelationen zwischen den klinischen Charakteristika zu erfassen wurde der χ^2 -Test oder Fisher-Exact-Test verwendet. Konnten die Testbedingungen dieser beiden Tests nicht erfüllt werden, wurde der Mehta-Patel-Test zur Untersuchung auf Signifikanz verwendet. Zur statistischen Auswertung von Rangzahlen wurden Rangsummentests genutzt, da Bedingungen für andere Tests nicht erfüllt werden konnten.

Aus allen verfügbaren Werten des jeweiligen Zeitraums wurde der Mittelwert inklusive der Standardabweichung und der Median ermittelt. Dies gilt sowohl für die absolute Anzahl an Zellen pro μl Probe, als auch für die prozentuale Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen an der Grundgesamtheit. Die Anzahl der verfügbaren Werte je Zeitpunkt variierte zwischen 2 und 18. Es wurde jedoch stets nur ein Wert pro Patient:in und Zeitpunkt berücksichtigt.

Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein verschiedener Untergruppen an DCs und den klinischen Charakteristika wurde, je nach Erfüllbarkeit der Testbedingungen, mit dem χ^2 -Test, dem Fisher-Exact-Test oder dem Mehta-Patel-Test untersucht. Multivariate Analysemethoden wurden angewandt um mittels U-Test zwei unverbundene Stichproben und mittels Kruskal-Wallis-Test mehr als zwei unverbundene Stichproben miteinander zu vergleichen. Zum Erfassen der Überlebens- oder Rezidivraten der verschiedenen Gruppen wurden die Kaplan-Meier-Methode sowie der Logranktest angewandt. Mittels hierarchisch linearer Modellierung wurde der Zeitverlauf dargestellt.

3. Ergebnisse

Wir erfassten Charakteristika von 61 allogenen stammzelltransplantierten Kindern und Jugendlichen, die an der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg behandelt wurden. Anhand der Daten wurden Unterschiede bezüglich des Auftretens oder des Nicht-Auftretens einer cGvHD analysiert. Hauptaugenmerk lag auf der Rekonstitution der Immunzellen, insbesondere auf der Rekonstitution der DCs.

3.1 Patient:innenkollektiv

In Tabelle 4 und 5 wurden die allgemeinen, krankheits- und transplantationsrelevanten Merkmale der 61 Patient:innen erfasst. Die Daten wurden prospektiv zwischen 2012 und 2015 erhoben.

3.1.1 Patient:innenbezogene Daten

Tabelle 4: Patient:innenbezogene Daten, unterteilt nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD

CAVE:

Die Anzahl der Patient:innen insgesamt sowie die Summe der Patient:innen mit und ohne cGVHD differiert um einen Patienten. Dieser verstarb kurze Zeit nach der aHSCT und konnte nicht in der Unterteilung berücksichtigt werden.

aHSCT: allogene hematopoietic stem cell transplantation/ allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation, **cGvHD:** chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung, **CR:** complete remission/ komplette Remission, **m:** männlich, **w:** weiblich, **PD:** progressive disease/ voranschreitende Erkrankung, **PR:** partial remission/ partielle Remission, **SD:** stable disease/ stabile Erkrankung, **TBI:** Total body irradiation/ Ganzkörperbestrahlung

	Patient:innen kollektiv	Patient:innen ohne cGvHD	Patient:innen mit cGvHD	p-Wert
Allgemeines				
Patient:innenanzahl(n)	61	44	16	
Geschlecht (m/w)	40/21	29/15	11/5	n.s.
Mittleres Alter (in Jahren)	9,1 _{+6,2}	8,8 _{+6,3}	10,0 _{+6,3}	n.s.
Diagnosen				
Leukämie	28	17	10	
Lymphom	5	3	2	
Sonstiges	24	20	4	
Solider Tumor	4	4	0	0.02
Status vor aHSCT				
CR	30	24	5	
PR	4	0	4	
SD	16	12	4	
PD	11	8	3	0.007
TBI				
nein/ja	34/27	29/15	5/11	0.019

Das Patient:innenkollektiv umfasste zu 34,4% weibliche Patientinnen (n=21) und zu 65,6% männliche Patienten (n=41). Das arithmetische Mittel des Alters betrug am Tag der Stammzelltransplantation 9,1 Jahre, mit einer Standardabweichung von 6,2 Jahren.

Die Diagnosen, anhand derer die Indikation zur aHSCT gestellt wurde, unterteilten wir in verschiedene Grunderkrankungen. Zu 45,9% (n=28) war die Grunderkrankung eine Leukämie, zu 8,2% (n=5) ein Lymphom, zu 6,6% (n=4) ein solider Tumor und zu 39,3% (n=24) eine sonstige Erkrankung. Die sonstigen Erkrankungen setzten sich aus semi-malignen und nicht-malignen Krankheitsbildern wie Immundefekten, Anämien und myelodysplastischen Syndromen zusammen.

Der Krankheitsstatus vor der aHSCT wurde vier unterschiedlichen Stadien zugeordnet. Bei 49,2% der Patient:innen (n=30) wurde eine komplette Remission (CR) erreicht, bei 6,6% (n=4) eine partielle Remission (PR). Bei 26,2% der Patient:innen (n=16) blieb der Krankheitsstatus stabil (SD), bei 18,0% (n=11) verlief die Erkrankung, trotz Therapie, progressiv (PD).

Im Rahmen der Konditionierung wurden 44,3% der Patient:innen (n=27) bestrahlt.

3.1.2 aHSCT-bezogene Daten

Tabelle 5: aHSCT-bezogene Daten, unterteilt nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD

CAVE:

Die Anzahl der Patient:innen insgesamt sowie die Summe der Patient:innen mit und ohne cGVHD differiert um einen Patienten. Dieser verstarb kurze Zeit nach der aHSCT und konnte nicht in der Unterteilung berücksichtigt werden.

aGvHD: acute graft-versus-host-disease/ akute Graft-versus-Host-Erkrankung, **CD:** cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **cGvHD:** chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung, **CMV:** Cytomegalievirus, **CR:** complete remission/ komplette Remission, **GvHD:** graft-versus-host-disease/ Graft-versus-Host-Erkrankung, **HLA:** human leukocyte antigen/ humanes Leukozytenantigen, **Ig:** Immunglobulin, **m:** männlich, **w:** weiblich

	Patient:innen kollektiv	Patient:innen ohne cGvHD	Patient:innen mit cGvHD	p-Wert
Stammzellspendende				
Geschwister	16	10	6	
Mutter	5	4	1	
Vater	2	1	1	
Unrelated Donor	38	29	8	n.s.
Stammzellquelle				
Peripheres Blut/ Knochenmark	44/17	30/14	14/2	0.03
Graftmanipulation				
Keine	44	33	11	
CD34	3	2	1	
CD3/CD19-Depletion	8	6	2	
T-Zell-R $\alpha\beta$ /CD19-Depletion	4	2	1	
Partielle T-Zell-Depletion	2	1	1	n.s.
HLA-Kompatibilität				
ident/haplo/mismatch	49/5/7	37/3/4	12/2/2	n.s.
Blutgruppenmismatch				
nein/ja	36/25	24/20	11/5	0.05
Sexmismatch				
nein/ja	38/23	33/11	5/11	0.0016
Spendende anti CMV IgG				
negativ/positiv	36/25	28/16	8/8	n.s.
Spendende anti CMV IgG negativ, Empfangende anti CMV IgG positiv				
	3	3	0	n.s.
Spendende anti CMV IgG positiv, Empfangende anti CMV IgG negativ				
	12	8	4	n.s.
Akute GvHD				
nein/ja	17/44	13/31	4/12	n.s.
Grad der aGvHD in Gruppen				
0-1	39	33	6	
2-4	22	11	10	0.008
Grad der aGvHD				
0	17	14	3	
1	22	20	2	
2	14	7	7	
3	6	2	4	
4	2	1	0	n.s.
Chronische GvHD				
nein/ja	44/16			
Grad der cGvHD				
1-mild	4	0	4	
2-moderat	5	0	5	
3-schwer	7	0	7	

Erstes aHSCT-bezogenes Merkmal, das erfasst wurde, war der Verwandtschaftsgrad von Stammzellspendenden zu Stammzellempfängenden. 26,2% der Patient:innen (n=16) erhielten die Stammzellspende von einem Geschwisterteil (*engl.* sibling), 8,2% (n=5) von der Mutter, 3,3% (n=2) vom Vater und 62,3% (n=38) von, über ein zentrales Register vermittelten, nicht-verwandten Spendenden (*engl.* unrelated donor).

Die Stammzellspende wurde in 72,1% der Fälle (n=44) aus dem peripheren Blut der Spendenden gewonnen, in 27,9% der Fälle (n=17) direkt aus dem Knochenmark.

Eine Graftmanipulation wurde bei 27,9% der Transplantate (n=17) durchgeführt. Dies geschah auf vier unterschiedliche Arten. Zu 17,6% (n=3) wurden CD34-positive Zellen (CD34+) selektiert und anschließend transplantiert. 47,1% der Graftmanipulationen (n=8) erfolgte durch eine CD3/CD19-Depletion, 23,5% (n=4) durch eine T-Zell-Rezeptor $\alpha\beta$ /CD19-Depletion. 11,8% der Transplantate (n=2) wurden partiell T-Zell-depletiert.

Bezüglich der HLA-Kompatibilität konnte für 80,3% der Patient:innen (n=49) eine oder ein HLA-identische:r Stammzellspendende:r gefunden werden. Es stimmten alle zehn der transplantationsrelevanten HLAs überein. Bei 19,7% (n=12) musste auf eine HLA-differente Stammzellspende zurückgegriffen werden. Es erhielten 8,2% der Patient:innen (n=5) eine haploidentische Stammzellspende (5 übereinstimmende HLAs von 10), 11,5% (n=7) eine nicht optimal passende Stammzellspende (*engl.* mismatch). Hier stimmten lediglich acht oder neun der zehn transplantationsrelevanten HLAs zwischen Spendenden und Empfängenden überein.

Die Blutgruppe der Stammzellspendenden stimmte in 41,0% der Fälle (n=25) nicht mit der Blutgruppe der Stammzellempfängenden überein (Blutgruppenmismatch).

Das Geschlecht der Stammzellspendenden und -empfängenden unterschied sich in 37,7% der Fälle (n=23) (*engl.* sex mismatch).

41,0% der Stammzellspendenden (n=25) besaßen Anti-CMV-IgG. Bei 4,9% der aHSCT (n=3) lag die Kombination einer oder eines anti-CMV-IgG-negativen Spendenden mit einer oder einem anti-CMV-IgG-positiven Empfängenden vor, bei 19,7% der aHSCT (n=12) die Kombination einer oder eines anti-CMV-IgG-positiven Spendenden mit einer oder einem anti-CMV-IgG-negativen Empfängenden.

Nach der aHSCT erkrankten 72,1% der Empfängenden (n=44) an einer aGvHD. Bei 50,0% dieser Patient:innen (n=22) handelte es sich um eine aGvHD des Grades 2, 3

oder 4, definiert nach der Leitlinie des Mount Siani Acute GVHD International Consortium (Harris et al. 2016).

Im Verlauf trat bei 26,2% der Patient:innen (n=16) eine cGvHD auf. Bei 25,0% dieser Patient:innen (n=4) wurde die cGvHD als Grad 1 (mild), bei 31,3% (n=5) als Grad 2 (moderat) und bei 43,8% (n=7) als Grad 3 (schwer) eingestuft. Die Einteilung der cGvHD erfolgte nach den Kriterien der NIH Consensus Conference 2014 (Lee 2017). 77% der cGvHD-Patient:innen (n=12) zeigten eine Hautmanifestation, 11% (n=2) zeigten den Befall von mindestens zwei Organsystemen.

3.1.3 Signifikante Unterschiede hinsichtlich der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung

Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Evaluation von Merkmalen, die im Zusammenhang mit dem Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD stehen. Wir gliederten das Patient:innenkollektiv nach diesem Kriterium in zwei Gruppen. Die Gruppen verglichen wir anhand der in den Tabellen 4 und 5 aufgeführten Merkmale.

Insgesamt waren die Patient:innen, die an einer cGvHD erkrankten, etwas älter (10,0 Jahre \pm 6,3 Jahre) als diejenigen, die nicht an einer cGvHD erkrankten (8,8 Jahre \pm 6,3 Jahre). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Geschlecht und Alter der stammzelltransplantierten Patient:innen und dem Auftreten einer cGvHD.

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gab es zwischen dem Auftreten einer cGvHD und dem Verwandtschaftsgrad der Stammzellspendenden zu den -empfangenden, der Form der Graftmanipulation, der HLA-Kompatibilität sowie dem Vorhandensein von Anti-CMV-IgG. Nicht in der Tabelle vermerkt und ebenfalls nicht signifikant war die Art der Nachsorge, die Zahl der transplantierten Zellen, die Art der Chemotherapie im Rahmen des Konditionierungsregimes sowie die initiale immunsuppressive Therapie.

Bezüglich der Grunderkrankungen konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0.02$) zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne cGvHD festgestellt werden. So erkrankten im Verhältnis mehr Patient:innen (35,7%; n=10) mit einer Leukämie oder einem Lymphom (40,0%; n=2) an einer cGvHD, als Patient:innen mit einem soliden Tumor (0,0%; n=0) oder einer sonstigen Erkrankung (16,7%; n=4).

Ebenfalls signifikant ($p=0,007$) war der Zusammenhang zwischen dem Krankheitsstatus vor der aHSCT und dem Auftreten einer cGvHD. Es erkrankten mehr Kinder und Jugendliche, bei denen lediglich eine partielle Remission der Grunderkrankung erreicht

werden konnte an einer cGvHD (100%; n=4) als Kinder und Jugendliche in anderen Krankheitsstadien.

Bei Patient:innen, die im Rahmen der Konditionierung bestrahlt wurden, trat in 40,7% der Fälle (n=11) eine cGvHD auf. Das ist signifikant häufiger ($p=0,019$) als bei nicht-bestrahlten Patient:innen.

Wurden die Stammzellen aus dem peripheren Blut gewonnen, konnte ein signifikant häufigeres Auftreten einer cGvHD ($p=0,03$) beobachtet werden. 31,8% dieser Patient:innen (n=14) erkrankten an einer cGvHD.

Im Merkmal Blutgruppenmismatch unterschieden sich die Gruppe mit cGvHD und die Gruppe ohne cGvHD ebenfalls signifikant ($p=0,05$) voneinander. Häufiger trat mit 30,6% (n=11) in der Gruppe ohne Blutgruppenmismatch eine cGvHD auf.

Signifikant ($p=0,0016$) war auch das häufigere Erkranken an einer cGvHD, wenn ein Sexmismatch vorlag. 47,8% (n=11) der Patient:innen mit vorliegendem Sexmismatch erkrankten an einer cGvHD.

Ebenfalls wurde der Einfluss einer aGvHD auf das Auftreten einer cGvHD evaluiert. Das alleinige Erkranken an einer aGvHD stand nicht signifikant mit dem Erkranken an einer cGvHD in Zusammenhang. Teilte man die Patient:innen mit aGvHD jedoch dem Schweregrad nach in zwei Gruppen auf, konnte ein signifikanter Unterschied für das Entwickeln einer cGvHD gezeigt werden. Die erste Gruppe bestand aus Patient:innen mit keiner aGvHD oder einer aGvHD des Schweregrades 1. Die zweite Gruppe bestand aus Patient:innen mit einer aGvHD des Schweregrades 2-4. Die nicht oder leichter an einer aGvHD erkrankten Patient:innen entwickelten zu 15,4% eine cGvHD (n=6). Die schwerer an einer aGvHD erkrankten Patient:innen entwickelten mit 45,5% (n=10) signifikant häufiger ($p=0,008$) eine cGvHD. Zudem unterschied sich der Krankheitsverlauf von Patient:innen mit cGvHD bezüglich einer im Vorfeld aufgetretenen aGvHD. In der Regel war die cGvHD bei Patient:innen, deren cGvHD de-novo entstand, schwerer ausgeprägt als bei Patient:innen, deren cGvHD auf eine aGvHD folgte.

Der Beobachtungszeitraum dieser Studie endete am 01.06.2016. Der mittlere Beobachtungszeitraum lag bei 5,5 Jahren mit einer Standardabweichung von 3,2 Jahren.

Es verstarben insgesamt 8,2% der Patient:innen (n=5), entweder an ihrer Grunderkrankung (n=2), aufgrund von transplantationsbedingten Ursachen (n=2) oder aus anderen Gründen (n=1). Einer dieser Patienten verstarb kurze Zeit nach der aHSCT

und konnte wegen des zu kurzen Beobachtungszeitraums weder der Gruppe mit noch ohne cGVHD zugeordnet werden. Kein Todesfall war eine Folge der cGVHD. Ebenfalls erlitt keiner der Patient:innen mit cGVHD ein Rezidiv der Grunderkrankung. Bezüglich des Gesamtüberlebens und der Rezidivrate unterscheiden sich die beiden Patient:innengruppen nicht signifikant voneinander.

3.2 Immunrekonstitution nach der aHSCT

Um die Rekonstitution der Immunzellen nach der aHSCT zu erfassen, wurde den Patient:innen im Rahmen von Klinikaufenthalten und Routineuntersuchungen peripher Blut entnommen. Die Eltern willigten den Blutentnahmen ein. Die Proben wurden sieben verschiedenen, in der klinischen Praxis gebräuchlichen, Zeitpunkten zugeordnet. Insgesamt konnten 151 Proben entnommen werden, 15 davon jedoch vor der aHSCT.

Zeitpunkt 1 beinhaltete alle Blutproben, die bis zu einem Monat nach der aHSCT gewonnen wurden (n=4), Zeitpunkt 2 alle Blutproben, die 1-2 Monate nach der aHSCT gewonnen wurden (n=11). Zeitpunkt 3 umfasste alle Blutproben 2-6 Monaten nach der aHSCT (n=31), Zeitpunkt 4 alle Blutproben ½-1 Jahre nach der aHSCT (n=23). Zeitpunkt 5 beinhaltete Werte der Blutproben, die 1-2 Jahre nach der aHSCT gewonnen wurden (n=25), Zeitpunkt 6 alle Werte 2-5 Jahre nach der aHSCT (n=26). Unter Zeitpunkt 7 wurden Blutproben erfasst, die länger als 5 Jahre nach der aHSCT gewonnen wurden (n=20).

Ausnahme bildet der Abschnitt über die Rekonstitution der DCs. Die Daten wurden gebündelt und lediglich vier Zeitpunkten, Engraftment (n=19), Tag 60-100 nach der aHSCT (n=22), Tag 101-365 nach der aHSCT (n=43) und über 365 Tage nach der aHSCT (n=58), zugeordnet. So konnten pro Zeitpunkt mehr Daten erfasst werden.

Absolute Zahlenwerte sowie anteilig erfasste Subpopulationen wurden in den Tabellen 6 bis 11 dargestellt. Die anteiligen Werte wurden mittels FACS und der Software FACS Diva ermittelt. Um das arithmetische Mittel der absoluten Anzahl an Immunzellen pro μl Blut zu bestimmen, wurde dieselbe Blutprobe, die durchflusszytometrisch analysiert wurde, auch durch Advia analysiert. Advia ist ein Gerät zur hämatologischen Labordiagnostik und erfasst Zellzahlen. Die Zellzahl pro μl Blutprobe innerhalb einer Subpopulationen wurde aus diesen beiden Datensätzen errechnet.

3.2.1 Lymphozyten

Wir erfassten initial die Rekonstitution der Hauptpopulationen der T-Zellen (CD3+), der T-Helferzellen (CD3+ CD4+), der zytotoxischen T-Zellen (CD3+ CD8+), der B-Zellen (CD19+) und der natürlichen Killerzellen (CD16/56+) sowie Unterschiede innerhalb dieser Zellpopulationen zwischen Patient:innen mit oder ohne cGvHD. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Rekonstitution der DCs, wozu bisher wenig bekannt war. Die Erhebung der Rekonstitution oben erwähnter Hauptpopulationen war wichtig, um den repräsentativen Charakter der Kohorte einordnen zu können.

Die untersuchten Immunzellen verhielten sich wie in bereits veröffentlichten Arbeiten (Eyrich et al. 2003; Wiegering et al. 2013). Eine adäquate Rekonstitution der T-Zellen (CD3+) konnte 2-6 Monate nach der aHSCT erreicht werden, eine adäquate Rekonstitution der B-Zellen (CD19+) nach ½-1 Jahren, eine adäquate Rekonstitution der natürlichen Killerzellen (CD16/56+) bereits nach 1-2 Monaten. Definiert ist eine adäquate Rekonstitution als das Erreichen altersentsprechender relativer und absoluter Zellzahlen. Zudem zeigte sich bis 2-6 Monate nach der aHSCT ein inverses Verhältnis zwischen der absoluten Anzahl an T-Helferzellen (CD3+ CD4+) pro μl Blut und der absoluten Anzahl an zytotoxischen T-Zellen (CD3+ CD8+) pro μl Blut, welches sich ½-1 Jahr nach der aHSCT normalisierte. Nicht in Tabelle 6 erfasst, jedoch ebenfalls vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten, ist ein verminderter Anteil an naiven T-Zellen (CD45RA+) innerhalb der ersten 200 Tage nach der aHSCT.

Signifikante Unterschiede zwischen Patient:innen mit oder ohne cGvHD wurden in der Tabelle 6 durch Unterstreichen hervorgehoben. Unterschiede lagen eher zu späteren Zeitpunkten vor. Über 5 Jahre nach der aHSCT lagen bei Patient:innen ohne cGvHD signifikant ($p=0,019$) mehr T-Zellen (CD3+ Zellen) pro μl Blut, signifikant ($p=0,019$) mehr zytotoxische T-Zellen (CD3+ CD8+ Zellen) pro μl Blut sowie signifikant ($p=0,019$) mehr natürliche Killerzellen (CD16/56+ Zellen) pro μl Blut vor, als bei Patient:innen mit cGvHD. Diese wenigen signifikanten Unterschiede muss man wegen ihres späten Auftretens aller Wahrscheinlichkeit nach als therapieassoziiert werten.

Tabelle 6: Rekonstitution der Subpopulationen der Lymphozyten nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung

CD: cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **cGvHD:** chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung, **HSCT:** hematopoietic stem cell transplantation/ hämatopoietische Stammzelltransplantation

	Zeitpunkt 1 (< 1Monat nach HSCT)	Zeitpunkt 2 (1-2Monate nach HSCT)	Zeitpunkt 3 (2 Monate – ½ Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 4 (½ Jahr bis 1 Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 5 (1 – 2 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 6 (2 – 5 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 7 (>5 Jahre nach HSCT)
CD3+ (in % der Lymphozyten)	gesamt	36,925 +24,369 43,4	39,691 +19,007 37,438	48,475 +24,807 53,48	50,616 +22,628 47,681	63,789 +15,717 63,917	61,839 +12,313 62,697
	ohne cGvHD	+0,424 30,55	+16,798 45,7	+23,269 39,3	+28,027 53,55	+20,33 63,643	+12,506 59,608
	mit cGvHD	+40,234 0,67	+27,281 0,32	+27,022 0,18	+17,088 0,83	+9,704 0,5	+12,902 0,35
	p-Wert						
CD3+ (pro µl Blut)	gesamt	378,739 +483,324 547,344	322,651 +392,652 374,1	433,036 +575,185 534,825	898,977 +707,338 969,626	1457,575 +729,455 1625,405	1420,702 +675,856 1527,195
	ohne cGvHD	+707,469 210,134	+455,101 185,455	+693,462 246,423	+782,503 828,327	+861,036 1265,769	+678,25 1143,819
	mit cGvHD	+294,252 0,33	+84,535 0,5	+179,771 0,67	+669,633 1	+544,199 0,18	+654,649 0,26
	p-Wert						
CD3+ CD4+ (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	58,825 +10,785 51,2	50,082 +19,414 45,363	47,760 +17,532 45,247	52,631 +16,939 50,25	66,424 +15,134 70,802	67,337 +8,365 69,079
	ohne cGvHD	+10,465 66,45	+20,233 62,667	+18,828 52,367	+18,597 55,013	+16,326 61,421	+7,867 62,806
	mit cGvHD	+2,616 0,17	+11,18 0,097	+15,303 0,15	+16,002 0,36	+12,987 0,067	+8,739 0,073
	p-Wert						
CD3+ CD4+ (pro µl Blut)	gesamt	272,508 +339,541 372,258	198,343 +309,746 226,564	150,514 +139,433 168,772	471,616 +406,678 460,302	947,289 +564,000 1138,018	979,006 +489,770 1072,035
	ohne cGvHD	+497,285 172,757	+363,843 123,084	+161,613 117,041	+372,994 482,93	+704,36 729,313	+503,175 737,13
	mit cGvHD	+242,428 0,33	+68,527 0,41	+88,869 0,67	+463,663 0,96	+243,881 0,23	+398,317 0,11
	p-Wert						
CD3+ CD8+ (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	41,175 +10,785 48,8	48,873 +20,094 53,138	52,240 +17,523 54,753	47,369 +16,939 49,75	33,552 +15,137 29,198	32,662 +8,365 30,921
	ohne cGvHD	+10,465 33,55	+21,545 37,5	+18,828 47,633	+18,597 44,988	+16,326 38,529	+7,867 37,19
	mit cGvHD	+2,616 0,17	+11,293 0,14	+15,303 0,15	+16,022 0,36	+13,018 0,067	+8,732 0,073
	p-Wert						

	Zeitpunkt 1 (< 1Monat nach HSCT)	Zeitpunkt2 (1-2Monate nach HSCT)	Zeitpunkt 3 (2 Monate – ½ Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 4 (½ Jahr bis 1 Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 5 (1 – 2 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 6 (2 – 5 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 7 (>5 Jahre nach HSCT)	
CD3+ CD8+ (pro µl Blut)	gesamt	106,231 +148,129 _175,086	123,235 +132,107 _146,022	282,522 +451,709 _366,053	427,361 +367,194 _509,324	510,221 +351,964 _487,388	441,693 +220,380 _455,16	483,890 +224,939 _536,023
	ohne cGvHD	+210,184 _37,377	+150,3 _62,47	+547,621 _129,381	+455,665 _345,397	+370,733 _536,316	+209,22 _406,679	+224,111 _292,735
	mit cGvHD	+51,824	+24,084	+98,289	+256,786	+356,667	+270,128	+89,427
	p-Wert	0,33	0,41	0,5	0,83	1	0,35	0,019
CD19+ (in % der Lymphozyten)	gesamt	7,533 +3,620	14,036 +8,518 _13,888	16,197 +14,836 _12,7	15,554 +9,567 _11,844	14,068 +7,838 _12,802	17,642 +5,828 _17,992	13,607 +6,407 _13,495
	ohne cGvHD		+8,738	+8,009	+7,36	+9,347	+4,983	+6,061
	mit cGvHD		14,433 +9,755	22,608 +22,356	19,265 +10,511	15,514 +6,069	16,73 +8,272	14,017 +9,1
	p-Wert		0,5	0,5	0,062	0,18	0,41	0,48
CD19+ (pro µl Blut)	gesamt	19,206 +12,550	94,901 +96,029 _104,531	98,465 +107,301 _83,88	187,029 +142,188 _171,263	334,689 +228,223 _301,651	390,362 +211,163 _432,31	283,787 +171,676 _303,247
	ohne cGvHD		+105,42	+74,551	+140,209	+228,335	+198,946	+182,591
	mit cGvHD		69,219 +76,485	125,203 +156,211	202,795 +151,974	372,446 +239,999	281,296 +224,007	212,432 +123,107
	p-Wert		0,5	0,88	0,71	0,6	0,13	0,28
CD16/56+ (in % der Lymphozyten)	gesamt	42,167 +18,048	24,164 +19,063 _20,35	18,234 +13,662 _13,648	12,821 +8,126 _13,369	4,771 +2,862 _4,246	5,611 +4,313 _5,979	3,833 +2,194 _4,165
	ohne cGvHD		+13,504	+8,707	+9,783	+3,043	+4,792	+2,265
	mit cGvHD		34,333 +31,073	26,642 +17,737	12,273 +6,715	372,446 +239,999	4,652 +2,93	2,617 +1,678
	p-Wert		0,32	0,051	0,96	0,23	0,54	0,18
CD16/56+ (pro µl Blut)	gesamt	184,546 +181,945	138,460 +134,467 _112,075	124,163 +97,758 _113,091	195,130 +188,817 _212,728	93,133 +49,675 _91,417	125,429 +134,302 _147,747	75,079 +34,108 _85,134
	ohne cGvHD		+96,67	+77,322	+244,809	+46,449	+151,968	+30,075
	mit cGvHD		208,82 +217,921	144,461 +133,64	177,533 +125,529	95,094 +56,853	67,401 +39,322	38,212 +21,079
	p-Wert		0,25	0,88	0,61	0,97	0,13	0,019

3.2.2 Intrazelluläre Zytokinexpression der T-Zellen

Neben der Rekonstitution von Immunzellen allgemein wurde auch die zeitliche Entwicklung der intrazellulären Zytokinexpression der T-Zellen nach der aHSCT analysiert. Analog zum vorherigen Abschnitt wurden die Ergebnisse nach Patient:innen mit und ohne cGvHD unterteilt und einem der sieben festgelegten Zeitpunkte zugeordnet. Diese Daten wurden in Tabelle 7 dargestellt. Signifikante Ergebnisse wurden durch Unterstreichen hervorgehoben.

Untersucht wurden die überwiegend durch Th1-Zellen exprimierte Zytokine $TNF\alpha$, IL2 und $IFN\gamma$ sowie die überwiegend durch Th2-Zellen exprimierte Zytokine IL4 und IL10. Zusätzlich wurde die Expression von Zytokinen durch T-Gedächtniszellen ($CD3+$ $CD45RO+$) und durch naive T-Zellen ($CD3+$ $CD45RA+$) erfasst. Exemplarisch wurde in Tabelle 7 die IL4-Expression der T-Gedächtniszellen ($CD3+$ $CD45RO+$ $IL4+$) dargestellt.

Die absolute Anzahl $TNF\alpha$ -exprimierender T-Zellen ($CD3+$ $TNF\alpha+$) stieg ab Engraftment nahezu kontinuierlich an. Die absolute Anzahl IL2-exprimierender T-Zellen ($CD3+$ $IL2+$) sowie die absolute Anzahl $IFN\gamma$ -exprimierender T-Zellen ($CD3+$ $IFN\gamma+$) zeigte ebenfalls einen nahezu kontinuierlichen Anstieg, jedoch erst ab 2-6 Monate nach der aHSCT.

Folglich nahm die absolute Anzahl aller T-Zellen, die Th1-typische Zytokine exprimierten, kontinuierlich nach der aHSCT zu. Altersentsprechende Normwerte der $TNF\alpha$ -exprimierenden T-Zellen ($CD3+$ $TNF\alpha+$) und der $IFN\gamma$ -exprimierenden T-Zellen ($CD3+$ $IFN\gamma+$) wurden 1-2 Jahre nach der aHSCT erreicht. Die Anzahl der IL2-exprimierenden T-Zellen ($CD3+$ $IL2+$) blieb auch über 5 Jahre nach der aHSCT hinter altersentsprechenden Normwerten zurück.

Die Expression von IL4 durch T-Zellen ($CD3+$ $IL4+$) sowie durch T-Gedächtniszellen ($CD3+$ $CD45RO+$ $IL4+$) blieb ab ½-1 Jahr nach der aHSCT niedrigschwellig konstant und entsprach damit altersentsprechenden Normwerten. Gleiches galt für die Expression von IL10 durch T-Zellen ($CD3+$ $IL10+$). Eine konstante niedrigschwellige Expression von IL10 durch T-Zellen ($CD3+$ $IL10+$) war ab ½-1 Jahr nach der aHSCT zu beobachten und entsprach damit ebenfalls altersentsprechenden Normwerten.

Insgesamt exprimierten die T-Zellen nach der aHSCT bevorzugt Th1-Zytokine. Die Th2-Zytokine wurden niedrigschwellig und konstant nach der aHSCT exprimiert. Dieses Verhalten der T-Zellen, ebenso wie die Rekonstitution der anderen Immunzell-Subpopulationen, stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein (Wiegering et al. 2013; Eyrich et al. 2004; Wiegering et al. 2009). Die wenigen erfassten

signifikanten Unterschiede zwischen Patient:innen mit und ohne cGvHD traten innerhalb der Zytokin-Subpopulationen nicht konsistent auf. Neue Hinweise auf mögliche Pathomechanismen oder geeignete Biomarker gaben sie nicht.

Tabelle 7: Rekonstitution der T-Zellen und Zytokinexpression nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung

CD: cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **cGvHD:** chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung, **HSCT:** hematopoietic stem cell transplantation/ hämatopoietische Stammzelltransplantation, **IFN:** Interferon, **IL:** Interleukin, **TNF:** Tumornekrosefaktor

	Zeitpunkt 1 (< 1 Monat nach HSCT)	Zeitpunkt 2 (1-2 Monate nach HSCT)	Zeitpunkt 3 (2 Monate -½ Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 4 (½ Jahr bis 1 Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 5 (1-2 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 6 (2-5 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 7 (>5 Jahre nach HSCT)	
CD3+ TNFα (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	28,400 +28,075	26,018 +25,004	29,975 +23,576	31,293 +24,230	29,416 +19,614	40,204 +16,639	
	ohne cGvHD	27,2 +37,76	34,863 +23,754	36,339 +25,918	38,675 +27,855	29,798 +21,117	25,233 +10,048	35,356 +12
	mit cGvHD	29,6 +30,547	2,433 +1,943	18,308 +13,519	23,91 +18,909	28,979 +19,416	39,354 +16,108	58,35 +21,236
	p-Wert	0,67	0,0061	0,099	0,2	0,6	0,09	0,044
CD3+ TNFα (pro μ l Blut)	gesamt	148,630 +199,275	88,178 +110,107	89,987 +163,893	239,764 +372,258	443,923 +388,754	428,278 +301,278	525,926 +259,526
	ohne cGvHD	211,209 +298,362	110,144 +121,676	118,683 +195,45	366,58 +494,712	474,654 +445,045	407,416 +278,841	510,572 +277,746
	mit cGvHD	86,051 +120,199	29,603 +41,51	37,378 +66,486	112,948 +124,291	408,802 +344,764	482,519 +383,95	582,222 +214,558
	p-Wert	0,67	0,25	0,024	0,83	0,6	0,62	0,4
CD3+ IL2+ (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	10,050 +6,460	13,482 +9,450	15,791 +14,539	15,253 +13,074	18,889 +11,688	20,635 +9,209	23,990 +13,835
	ohne cGvHD	11,6 +4,808	14,25 +8,217	18,691 +15,945	12,025 +13,459	21,935 +12,449	19,015 +10,023	23,07 +14,941
	mit cGvHD	8,5 +9,617	11,433 +14,197	10,475 +10,751	18,481 +12,701	15,407 +10,505	24,846 +5,325	27,367 +10,306
	p-Wert	0,67	0,32	0,12	0,16	0,18	0,13	0,28
CD3+ IL2+ (pro μ l Blut)	gesamt	116,538 +132,595	35,780 +31,019	27,655 +21,604	82,973 +80,013	255,309 +178,590	284,431 +163,566	359,350 +288,376
	ohne cGvHD	123,976 +169,868	29,687 +27,326	36,098 +20,55	85,869 +87,227	305,174 +210,485	282,838 +173,602	384,132 +322,269
	mit cGvHD	109,1 +153,843	52,027 +40,655	12,175 +14,291	80,076 +78,045	198,32 +125,01	288,574 +152,518	268,479 +74,117
	p-Wert	0,33	0,14	0,0052	1	0,18	0,54	0,56
CD3+ IFNγ (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	27,450 +28,482	32,436 +23,795	32,813 +22,774	30,682 +24,142	24,772 +20,008	20,502 +16,514	28,648 +10,462
	ohne cGvHD	36,1 +46,103	37,013 +22,657	35,774 +24,417	29,95 +24,756	23,104 +23,071	16,515 +14,068	29,079 +8,381
	mit cGvHD	18,8 +2,97	20,233 +26,966	27,383 +20,314	31,415 +25,196	26,679 +17,468	30,868 +19,475	27,067 +18,854
	p-Wert	0,67	0,19	0,58	0,83	0,42	0,09	0,34

	Zeitpunkt 1 (< 1 Monat nach HSCT)	Zeitpunkt 2 (1-2 Monate nach HSCT)	Zeitpunkt 3 (2 Monate - $\frac{1}{2}$ Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 4 ($\frac{1}{2}$ Jahr bis 1 Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 5 (1-2 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 6 (2-5 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 7 (> 5 Jahre nach HSCT)	
CD3+ IFNγ+ (pro μ l Blut)	gesamt	222,494 +363,009	90,954 +110,739	58,816 +62,598	247,151 +361,324	360,011 +367,551	299,195 +260,113	
	ohne cGvHD	380,579 +535,889	97,059 +127,489	67,043 +68,423	333,019 +450,166	373,793 +472,921	262,073 +250,109	449,461 +270,351
	mit cGvHD	64,41 +90,479	74,673 +62,31	43,733 +52,479	161,283 +245,475	344,261 +231,853	395,713 +414,219	271,834 +192,735
	p-Wert	0,33	0,5	0,22	0,71	0,71	0,41	0,11
CD3+ IL10+ (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	3,075 +2,547	6,355 +4,183	4,005 +2,963	3,468 +1,829	3,421 +3,378	3,111 +2,616	3,494 +2,317
	ohne cGvHD	5,15 +0,495	6,638 +4,354	2,939 +2,076	3,45 +1,616	4,296 +4,353	1,985 +1,584	2,933 +2,116
	mit cGvHD	1 +1,414	5,6 +4,468	6,35 +3,488	3,485 +2,135	2,421 +1,527	6,04 +2,592	5,55 +2,108
	p-Wert	0,17	0,41	0,034	0,96	0,42	0,0014	0,044
CD3+ IL10+ (pro μ l Blut)	gesamt	25,223 +41,571	9,701 +2,861	10,763 +12,656	27,901 +29,000	35,292 +39,558	33,187 +28,928	39,419 +27,401
	ohne cGvHD	8,857 +6,507	8,857 +6,507	12,663 +14,783	27,023 +25,259	48,865 +51,606	26,096 +23,048	35,786 +29,25
	mit cGvHD	11,952 +14,522	11,952 +14,522	7,279 +7,28	28,904 +34,869	19,779 +4,23	51,622 +37,075	52,743 +16,235
	p-Wert	0,5	0,58	0,58	0,97	0,28	0,11	0,11
CD3+ IL4+ (in % der CD3+ Zellen)	gesamt	5,275 +5,182	4,464 +3,854	3,388 +2,737	2,464 +1,465	1,498 +0,789	1,781 +0,781	1,527 +1,089
	ohne cGvHD	3,4 +0,99	5,55 +4,006	2,959 +0,795	2,063 +1,495	1,421 +0,753	1,715 +0,708	1,198 +0,962
	mit cGvHD	7,15 +7,99	1,567 +0,896	4,33 +4,99	2,865 +1,413	1,586 +0,879	1,95 +1,02	2,773 +0,551
	p-Wert	0,67	0,024	0,31	0,1	0,83	0,3	0,019
CD3+ IL4+ (pro μ l Blut)	gesamt	9,703 +15,681	7,788 +9,149	8,189 +9,539	22,873 +30,472	20,261 +12,288	21,729 +13,556	21,316 +22,838
	ohne cGvHD	9,207 +10,317	9,207 +10,317	9,926 +10,679	19,893 +29,19	19,478 +11,768	23,264 +13,476	20,057 +25,874
	mit cGvHD	4,005 +3,546	4,005 +3,546	5,004 +6,654	26,279 +33,87	21,256 +13,748	17,739 +15,252	25,932 +1,492
	p-Wert	0,25	0,099	0,099	0,42	0,97	0,22	0,019

	Zeitpunkt 1 (< 1 Monat nach HSCT)	Zeitpunkt 2 (1-2 Monate nach HSCT)	Zeitpunkt 3 (2 Monate -½ Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 4 (½ Jahr bis 1 Jahr nach HSCT)	Zeitpunkt 5 (1-2 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 6 (2-5 Jahre nach HSCT)	Zeitpunkt 7 (>5 Jahre nach HSCT)
CD3+	3,150	2,736	1,906	1,554	0,626	1,22	0,956
CD45RO+ IL4+	+2,684	+2,099	+1,534	+1,242	+0,629	+1,781	+0,763
(in % der CD3+ Zellen)	2,7	3,363	1,573	1,625	0,498	0,944	0,73
	+0,566	+2,122	+0,567	+1,653	+0,474	+0,46	+0,698
	3,6	1,067	2,64	1,483	0,771	1,586	1,783
	+4,525	+0,723	+2,654	+0,749	+0,783	0,9	+0,202
	p-Wert	0,024	0,79	0,61	0,71	0,09	0,019
CD3+	6,848	6,376	4,898	13,819	7,836	13,411	13,521
CD45RO+ IL4+	+10,933	+7,682	+6,119	+22,431	+7,814	+9,337	+15,888
(pro µl Blut)		7,811	5,993	16,24	5,73	13,258	12,439
		+8,633	+6,998	+30,542	+3,524	+8,992	+17,78
		2,55	2,891	10,847	10,242	14,178	17,485
		+2,014	+3,793	+8,15	+10,738	+11,271	+5,49
		p-Wert	0,15	0,5	0,83	0,79	0,063

3.2.3 Dendritische Zellen

Zur Rolle der DCs in der Pathogenese der cGvHD war bisher wenig bekannt. Auch Referenzwerte während der Immunrestitution nach der aHSCT, insbesondere bei pädiatrischen Patient:innen, waren rar. Wir untersuchten die Reconstitution der DCs insgesamt sowie die Reconstitution diverser Subpopulationen im Zeitverlauf. Subpopulationen waren die Gruppe der mDCs und pDCs sowie die jeweilige Ausprägung der Oberflächenmerkmale CCR7, CD80, CD83 und CD86. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der während der Reifung der DCs hochreguliert wird. CD80, CD83 und CD86 sind Oberflächenmerkmale reifer DCs. Zudem wurde die Reconstitution monozytärer DCs erfasst.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir die Daten hinsichtlich eines Zusammenhangs der Reconstitution mit möglichen Einflussfaktoren. Neben dem Vorhandensein einer cGvHD waren dies patient:innen- und aHSCT-bezogene Faktoren sowie das Vorhandensein einer aGvHD. Im Gegensatz zu den vorherigen Abschnitten ordneten wir die Daten vier bestimmten Zeitpunkten nach der aHSCT zu. So konnte für insgesamt zwölf Patient:innen ein kompletter Datensatz erreicht werden. Signifikante Unterschiede wurden durch Unterstreichen hervorgehoben.

3.2.3.1 Reconstitution der dendritischen Zellen

Wir definierten die mDCs ihren Oberflächenmerkmalen nach als CD45+ CD1c+ CD11c+, die pDCs ihren Oberflächenmerkmalen nach als CD45+ CD303+ CD11c-, die monozytären DCs ihren Oberflächenmerkmalen nach als CD45+ CD303+ CD14+.

Es war eine schnelle Reconstitution des Kompartiments der DCs insgesamt zu beobachten. Ab 60-100 Tagen nach der aHSCT war die absolute Anzahl an mDCs (CD45+ CD1c+ CD11c+) sowie die absolute Anzahl an pDCs (CD45+ CD303+ CD11c-) mit den Werten vor der aHSCT vergleichbar. Die Schnelligkeit der Reconstitution korrelierte negativ mit dem Alter. Im Individuum dauerte es jedoch bis zum Erreichen stabiler Zellzahlen innerhalb der mDC-Population ein Jahr, innerhalb der pDC-Population noch länger.

Tabelle 8: Rekonstitution der DCs und Rekonstitution der Subpopulationen der DCs, Median sowie die 5te und 95te Perzentile

aHSCT: allogene hematopoietic stem cell transplantation/ allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation, **CCR:** Chemokinrezeptor, **CD:** cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **DC:** dendritic cell/ dendritische Zelle, **mDC:** myeloid dendritic cell/ myeloide dendritische Zelle, **pDC:** plasmacytoid dendritic cell/ plasmazytoide dendritische Zelle

Zellpopulation	Engraftment	Tag 60–100	Tag 101-365	Tag >365 nach der aHSCT
DCs insgesamt				
DCs (pro µl Blut)	2,9 (0,1-52,9)	26,5 (18,7-71,8)	30,3 (2,2-62,7)	56,3 (28,4-84,2)
mDCs				
mDCs (pro µl Blut)	1,7 (0,08-36,2)	21,1 (10,8-53,0)	22,3 (0,5-44,6)	38,6 (19,4-57,8)
mDCs (in % der DCs)	50,6 (41,0-60,2)	34,8 (26,1-43,5)	20,0 (13,5-26,3)	29,0 (23,6-34,4)
CCR7 + mDC (in % der mDCs)	78,0 (73,3-82,7)	78,2 (74,0-82,5)	80,6 (77,5-83,7)	83,2 (80,6-85,8)
CD80 + mDC (in % der mDCs)	18,6 (12,4-24,9)	17,7 (12,1-23,7)	11,4 (7,4-15,5)	15,2 (11,7-18,7)
CD83 + mDC (in % der mDCs)	69,4 (60,6-76,2)	66,3 (58,3-74,2)	65,1 (59,3-71,0)	62,6 (57,7-67,6)
CD86 + mDC (in % der mDCs)	25,6 (17,6-29,5)	18,8 (13,3-24,4)	9,4 (5,6-13,3)	12,3 (8,9-15,6)
pDCs				
pDCs (pro µl Blut)	1,2 (0,02-17,5)	6,3 (8,3-21,1)	7,9 (2,6-18,4)	17,7 (8,6-26,8)
pDCs (in % der DCs)	22,7 (14,2-31,2)	21,9 (14,2-29,6)	27,2 (21,7-32,7)	26,9 (22,1-31,6)
CCR7+ pDC (in % der pDCs)	82,3 (75,7-88,8)	76,1 (70,3-81,9)	80,0 (75,8-84,1)	78,5 (74,7-82,1)
CD80+ pDC (in % der pDCs)	14,7 (8,4-20,9)	15,1 (9,4-20,7)	16,2 (12,2-20,3)	17,0 (13,5-20,5)
CD83+ pDC (in % der pDCs)	65,9 (56,5-75,4)	63,7 (55,2-72,3)	61,7 (55,7-68,0)	59,5 (54,3-64,8)
CD86+ pDC (in % der pDCs)	15,0 (7,3-22,8)	14,5 (7,5-21,4)	17,8 (12,8-22,8)	18,5 (14,2-22,8)
Monozytäre DCs				
CD14+ DCs (pro µl Blut)	0,3 (0,01-1,85)	0,8 (0,5-2,2)	1,5 (0,5-2,5)	2,6 (1,8-3,5)
CD14+ DCs (in % der DCs)	17,2 (9,7-24,7)	14,0 (7,1-20,7)	17,6 (12,7-22,5)	22,4 (18,2-26,5)

3.2.3.2 Rekonstitution der dendritischen Zellen und patient:innen- sowie aHSCT-bezogene Einflussfaktoren

Keinen signifikanten Einfluss auf die Rekonstitution der DCs hatten das HLA-Matching, die Indikation zur aHSCT und die Art oder das Vorhandensein einer Graftmanipulation. Jedoch schien das Konditionierungsregime einen Einfluss zu haben. Wir fanden einen signifikant ($p=0,04$) größeren Anteil CCR7-positiver DCs (CCR7+ DC) während des Engraftments bei Patient:innen, die eine TBI erhalten hatten (Tabelle 9). Ein größerer Anteil an CCR7+ DCs, sowohl an CCR7+ mDCs als auch CCR7+ pDCs, wirkte sich zu jedem erfassten Zeitpunkt signifikant ($p<0,004$) positiv auf das Gesamtüberleben aus.

Unabhängig anderer Einflussfaktoren wirkte sich weder eine hohe absolute Anzahl an DCs noch eine niedrige absolute Anzahl an pDCs in unserer Kohorte positiv auf das Gesamtüberleben aus.

Tabelle 9: Rekonstitution der DCs und verschiedener Subpopulationen im Zusammenhang mit einer TBI, Mittelwerte mit Standardabweichung

aHSCT: allogene hematopoietic stem cell transplantation/ allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation, **CCR:** Chemokinrezeptor, **CD:** cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **DC:** dendritic cell/ dendritische Zelle, **mDC:** myeloid dendritic cell/ myeloide dendritische Zelle, **pDC:** plasmacytoid dendritic cell/ plasmazytoide dendritische Zelle, **TBI:** Total body irradiation/ Ganzkörperbestrahlung

Zellpopulation	Engraftment	Tag 60-100	Tag 101-365	Tag >365 nach der aHSCT
TBI nein/ja	7 / 12	12 / 10	20 / 23	31 / 27
DCs (pro μl Blut)	6,4 \pm 5,7 vs. 7,9 \pm 4,2	29,3 \pm 12,5 vs. 22,5 \pm 15,0	25,7 \pm 6,3 vs. 34,2 \pm 5,9	35,6 \pm 31,1 vs. 74,3 \pm 29,2
mDCs (pro μl Blut)	4,9 \pm 2,7 vs. 2,7 \pm 2,0	25,0 \pm 11,6 vs. 16,0 \pm 13,7	16,9 \pm 4,9 vs. 27,0 \pm 4,5	25,4 \pm 21,2 vs. 50,1 \pm 19,6
pDCs (pro μl Blut)	1,4 \pm 4,3 vs. 5,3 \pm 3,2	6,2 \pm 1,9 vs. 6,6 \pm 2,2	8,8 \pm 1,9 vs. 7,2 \pm 1,8	10,3 \pm 10,2 vs. 24,2 \pm 9,6
CD14+ DCs (pro μl Blut)	0,2 \pm 0,2 vs. 0,5 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3 vs. 0,7 \pm 0,3	1,7 \pm 0,5 vs. 1,4 \pm 0,5	1,7 \pm 0,9 vs. 3,5 \pm 0,6
CCR7+ DC (in % der DCs)	76,5 \pm 3,4 vs. 87,3 \pm 2,5	72,2 \pm 4,9 vs. 81,7 \pm 5,8	83,0 \pm 2,5 vs. 77,3 \pm 2,3	79,6 \pm 2,9 vs. 77,5 \pm 2,7
CD83+ DC (in % der DCs)	67,2 \pm 6,6 vs. 66,8 \pm 6,3	63,0 \pm 5,4 vs. 64,8 \pm 6,5	61,4 \pm 4,0 vs. 62,3 \pm 3,7	56,7 \pm 4,2 vs. 62,0 \pm 3,9
CD86+ DCs (in % der DCs)	19,1 \pm 6,0 vs. 15,2 \pm 4,4	16,0 \pm 3,4 vs. 12,2 \pm 4,1	17,7 \pm 4,4 vs. 17,8 \pm 4,1	20,1 \pm 3,2 vs. 17,0 \pm 3,0

3.2.3.3 Rekonstitution der dendritischen Zellen und die akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Korrelation zwischen der Rekonstitution der DCs und dem Auftreten einer aGvHD wurde ebenfalls evaluiert.

Während des Engraftments war kein signifikanter Unterschied zwischen der Rekonstitution der DCs und dem späteren Auftreten einer aGvHD zu verzeichnen. Bei Patient:innen, die 60-365 Tage nach der aHSCT an einer aGvHD des Grades 2-4 erkrankten, konnten verminderte absolute und relative Zellzahlen an der Gesamtpopulation der DCs sowie an der Subpopulation der mDCs festgestellt werden ($p < 0,05$). Bezüglich der Subpopulation der pDCs war dies lediglich um Tag 60-100 zu beobachten ($p < 0,05$).

Tabelle 10: Rekonstitution der DCs und verschiedener Subpopulationen im Zusammenhang mit dem Auftreten einer aGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung

aGvHD: acute graft-versus-host-disease/ akute Graft-versus-Host-Erkrankung, **aHSCT:** allogene hematopoietic stem cell transplantation/ allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation, **CCR:** Chemokinrezeptor, **CD:** cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **DC:** dendritic cell/ dendritische Zelle, **mDC:** myeloid dendritic cell/ myeloide dendritische Zelle, **pDC:** plasmacytoid dendritic cell/ plasmazytoide dendritische Zelle

Zellpopulation	Engraftment	Tag 60-100	Tag 101-365	Tag >365 nach der aHSCT
aGvHD Grad 0-1 / 2-4	5 / 14	10 / 12	41 / 22	36 / 22
DCs (pro μl Blut)	3,5 \pm 6,6 vs. 8,7 \pm 3,8	50,1 \pm 12,3 vs. 6,9 \pm 11,1	42,8 \pm 7,7 vs. 25,4 \pm 4,9	31,1 \pm 43,6 vs. 64,2 \pm 24,6
mDCs (pro μl Blut)	2,0 \pm 3,2 vs. 4,0 \pm 1,8	39,6 \pm 11,7 vs. 4,4 \pm 11,1	32,7 \pm 6,2 vs. 18,3 \pm 3,8	20,1 \pm 29,5 vs. 44,5 \pm 16,7
pDCs (pro μl Blut)	1,5 \pm 5,1 vs. 4,7 \pm 2,9	10,5 \pm 1,7 vs. 2,9 \pm 1,5	10,2 \pm 2,4 vs. 7,1 \pm 1,5	11,1 \pm 14,4 vs. 19,8 \pm 8,1
CD14+ DCs (pro μl Blut)	0,3 \pm 0,3 vs. 0,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3 vs. 0,5 \pm 0,2	1,9 \pm 0,7 vs. 1,4 \pm 0,4	2,0 \pm 1,2 vs. 2,8 \pm 0,7
CCR7+ DC (in % der DCs)	87,3 \pm 4,5 vs. 82,2 \pm 2,6	74,6 \pm 5,7 vs. 80,3 \pm 5,3	79,2 \pm 3,2 vs. 80,3 \pm 2,0	81,3 \pm 3,9 vs. 77,6 \pm 2,2
CD83+ DC (in % der DCs)	53,2 \pm 9,4 vs. 71,6 \pm 5,4	54,2 \pm 5,5 vs. 71,6 \pm 5,0	66,7 \pm 5,0 vs. 60,0 \pm 3,1	56,3 \pm 5,8 vs. 60,6 \pm 3,2
CD86+ DCs (in % der DCs)	8,6 \pm 6,9 vs. 19,3 \pm 3,9	14,5 \pm 3,0 vs. 14,4 \pm 3,6	22,4 \pm 5,7 vs. 16,0 \pm 3,5	13,5 \pm 4,4 vs. 20,0 \pm 2,5

3.2.3.4 Rekonstitution der dendritischen Zellen und die chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

Am wenigsten bekannt waren bisher mögliche Einflüsse der Rekonstitution der DCs auf das Auftreten einer cGvHD.

Patient:innen mit oder ohne cGvHD wiesen zu mehreren Zeitpunkten signifikante Unterschiede in der Rekonstitution der DCs auf. Patient:innen, die an einer cGvHD erkrankten, zeigten signifikant ($p < 0,05$) verminderte absolute und relative Werte an mDCs zum Zeitpunkt des Engraftments bis Tag 60-100 (Tabelle 11) nach der aHSCT. Ab 101-365 Tagen nach der aHSCT waren bei Patient:innen mit cGvHD durchgehend signifikant ($p < 0,05$) verminderte absolute und relative Werte an DCs insgesamt festzustellen (Tabelle 11). Signifikant ($p < 0,05$) war ebenfalls der erhöhte Anteil an pDCs bei Patient:innen mit cGvHD ab 101-365 Tage nach der aHSCT (Tabelle 11) und während des Beginns der cGvHD.

Die Rekonstitution der Subpopulationen der CD45+ CD1c+ CD11c+ Zellen, CD45+ CD303+ CD11c+ Zellen, CD45+ CD303+ CD80+ Zellen und CD45+ CD303+ CD80+ Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihres prozentualen Anteils an der Gesamtheit der mDCs (CD45+ CD1c+) oder pDCs (CD45+CD303+) hinsichtlich der Entwicklung einer cGvHD (Tabelle 11).

Betrachtet man den prozentualen Anteil der monozytären DCs (CD45+ CD303+ CD14+) an der Population aller DCs, war ab 60-100 Tage nach der aHSCT eine Überexpression bei Patient:innen mit cGvHD zu beobachten.

Tabelle 11: Rekonstitution der DCs und verschiedener Subpopulationen im Zusammenhang mit dem Auftreten einer cGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung

aHSCT: allogene hematopoietic stem cell transplantation/ allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation, **CCR:** Chemokinrezeptor, **CD:** cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene, **cGvHD:** chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung, **DC:** dendritic cell/ dendritische Zelle, **mDC:** myeloid dendritic cell/ myeloide dendritische Zelle, **pDC:** plasmacytoid dendritic cell/ plasmazytoide dendritische Zelle

Zellpopulation	Engraftment	Tag 60-100	Tag 101-365	Tag >365 nach der aHSCT
cGvHD nein/ja	14 / 5	19 / 3	28 / 15	42 / 16
DCs (pro µl Blut)	5,6 ± 2,1 vs. 1,8 ± 3,5	29,2 ± 10,2 vs. 9,7 ± 25,6	35,4 ± 5,2 vs. 20,8 ± 7,1	66,7 ± 15,7 vs. 32,7 ± 16,5
mDCs (pro µl Blut)	4,0 ± 1,9 vs. 0,7 ± 3,1	22,3 ± 9,4 vs. 10,0 ± 29,0	26,2 ± 4,1 vs. 15,2 ± 5,6	45,9 ± 9,9 vs. 24,6 ± 14,7
pDCs (pro µl Blut)	1,5 ± 0,3 vs. 1,1 ± 0,6	6,7 ± 1,5 vs. 3,1 ± 4,6	9,2 ± 1,6 vs. 5,6 ± 2,1	22,6 ± 8,7 vs. 7,9 ± 11,9
pDCs (in % der DCs)	19,9 ± 3,3 vs. 26,4 ± 5,5	22,6 ± 3,8 vs. 17,5 ± 9,5	20,5 ± 3,8 vs. 28,5 ± 5,2	22,7 ± 2,9 vs. 34,6 ± 4,1
CD14+ DCs (pro µl Blut)	0,3 ± 0,1 vs. 0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2 vs. 0,7 ± 0,5	1,8 ± 0,4 vs. 1,1 ± 0,6	2,7 ± 0,8 vs. 2,4 ± 1,0
CD14+ DCs (in % der DCs)	19,9 ± 4,6 vs. 6,8 ± 7,6	11,8 ± 1,8 vs. 27,5 ± 4,4	16,4 ± 3,3 vs. 20,0 ± 4,5	18,5 ± 2,5 vs. 29,7 ± 3,5
CCR7+ DC (in % der DCs)	83,1 ± 2,7 vs. 82,5 ± 4,7	74,7 ± 4,1 vs. 84,4 ± 10,3	80,4 ± 2,1 vs. 79,0 ± 2,9	82,5 ± 2,2 vs. 70,6 ± 3,3
CD83+ DC (in % der DCs)	67,8 ± 6,2 vs. 63,6 ± 10,4	61,5 ± 4,3 vs. 78,0 ± 10,8	62,9 ± 3,3 vs. 59,9 ± 4,6	62,8 ± 3,5 vs. 53,3 ± 4,8
CD86+ DCs (in % der DCs)	17,5 ± 4,3 vs. 16,7 ± 7,2	13,3 ± 2,8 vs. 21,9 ± 6,9	19,1 ± 3,7 vs. 15,4 ± 5,1	20,2 ± 2,7 vs. 15,2 ± 3,7

4. Diskussion

4.1 Patient:innen- und aHSCT-bezogene Einflüsse auf das Auftreten der chronischen Graf-versus-Host-Erkrankung

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem möglichen Einfluss patient:innen- und aHSCT-bezogener Faktoren auf das Entstehen einer cGvHD.

Patient:innenbezogene Risikofaktoren für das Auftreten einer cGvHD waren in dieser Studie eine Leukämie oder ein Lymphom als Grunderkrankung sowie eine lediglich partielle Remission vor der aHSCT. Eine Vergleichbarkeit zu anderen Patient:innenkollektiven ist nicht gegeben, da sich die Therapieregime, die Einfluss auf das Auftreten einer cGvHD haben, innerhalb der einzelnen Patient:innen deutlich voneinander unterscheiden (Flowers et al. 2011; Baron et al. 2012).

Bezüglich der Therapieregime wurde eine TBI während der Konditionierung bereits in vorherigen Studien als Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD identifiziert (Zeiser and Blazar 2017b). In unserem Patient:innenkollektiv war eine TBI ebenfalls signifikanter Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD.

aHSCT-bezogener Faktor, auf dem bisher das Hauptaugenmerk eines erhöhten Risikos, sowohl für das Auftreten einer aGvHD als auch einer cGvHD, lag, war die HLA-Kompatibilität (Eyrich and Schulze 2019). In unserem kleinen, rein pädiatrischen Patient:innenkollektiv konnte eine HLA-Inkompatibilität nicht als signifikanter Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD evaluiert werden. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz in diese Richtung. Gründe für ein Abweichen unserer Daten könnten unter anderem die bessere Thymusfunktion im Kindesalter sowie die Graftmanipulation sein. In Bezug auf das Auftreten einer aGvHD, cGvHD und auf das Transplantations-Outcome wurden jedoch zunehmend aHSCT-bezogene Risikofaktoren betrachtet, die unabhängig der HLA-Kompatibilität sind.

Signifikante aHSCT-bezogene Risikofaktoren für das Auftreten einer cGvHD waren in dieser Studie peripheres Blut als Stammzellquelle sowie ein Sex- oder Blutgruppenmismatch. Studien mit adulten Patient:innen zeigten, dass peripheres Blut unverwandter Spendender als Stammzellquelle ein höheres Risiko für das Auftreten einer cGvHD barg als Knochenmark unverwandter Spendender (Anasetti et al. 2012). Bei pädiatrischen Patient:innen resultierte die zunehmende Verwendung von peripherem Blut als Stammzellquelle ebenfalls in einem vermehrtem Auftreten einer

cGvHD (Baird, Cooke, and Schultz 2010). Jedoch geht mit der Verwendung von peripherem Blut als Stammzellquelle der Vorteil einer möglichen Graftmanipulation einher. Bezüglich des Sexmismatches wurde gezeigt, dass ein erhöhtes Risiko sowohl einer aGvHD als auch einer cGvHD bei männlichen Patienten vorlag, die eine aHSCT von einer weiblichen Spenderin erhalten hatten. Der am besten dokumentierte Alloantikörper in diesem Zusammenhang ist das H-y-Antigen (Miklos et al. 2005). Die Blutgruppe stellt nach aktueller Auffassung keinen signifikanten Risikofaktor für das Auftreten einer cGvHD dar (Zeiser and Blazar 2017b).

Das Vorhandensein einer höhergradigen aGvHD zählte sowohl in unserem Patient:innenkollektiv als auch in bereits veröffentlichten Daten zu den Risikofaktoren für das Auftreten einer cGvHD. Zahlreiche Studien, sowohl mit pädiatrischen als auch adulten Patient:innenkollektiven, ermittelten eine vorausgegangene aGvHD und deren Schweregrad als stärksten Prädiktor für das Auftreten einer cGvHD (Atkinson et al. 1990; Zecca et al. 2002).

Zum Großteil stimmen unsere Daten mit dem bisherigen Kenntnisstand über Risikofaktoren für das Auftreten einer cGvHD überein. Jedoch war die Vergleichbarkeit mit vor 2004, beziehungsweise vor 2014 erhobenen Daten, begrenzt, da erst 2004 eine aktualisierte, vereinheitlichte Definition der cGvHD durch die NIH Consensus Conference veröffentlicht wurde. 2014 wurde diese Definition erweitert (Jagasia et al. 2015; Filipovich et al. 2005). Die Datenlage bisher war rar, sodass trotzdem ältere Vergleichsdaten herangezogen werden mussten.

4.2 Pädiatrisches Setting, Immunzellen und Immunrekonstitution

Neben den patient:innen- und aHSCT-bezogenen Risikofaktoren befasste sich diese Studie vor allem auf Zellebene mit den Risikofaktoren einer cGvHD. Ein Großteil der Forschung auf dem Gebiet der Immunologie bezieht sich auf adulte Patient:innen. Exklusive pädiatrische Daten waren kaum vorhanden. Jedoch unterscheiden sich pädiatrische und adulte Patient:innen auch auf immunzellulärer Ebene voneinander.

Die Rekonstitution der Lymphozyten nach der aHSCT ist altersabhängig. Gleiches gilt für die Expression von $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL2, IL4 und IL10 durch T-Zellen, sowohl bei gesunden Kindern und Jugendlichen, als auch bei Patient:innen nach der aHSCT (Wiegering et al. 2013; Eyrich et al. 2004; Wiegering et al. 2009).

Die Altersabhängigkeit der T-Zell-Rekonstitution nach der aHSCT erklärte sich teilweise aus der Thymusfunktionalität. Die de-novo Synthese naiver T-Zellen ist eine wichtige

T-Zell-Quelle während der Rekonstitution nach der aHSCT (Zeiser and Blazar 2017b). Im Thymus reifen die von transplantierten Stammzellen abstammenden T-Zellen heran (Zeiser and Blazar 2017b). Ab der Pubertät beginnt die Involution des Thymus (Mackall et al. 1995). Die Fähigkeit des Thymus reife T-Zellen zu produzieren und die damit verbundene Funktionalität von Immunreaktionen ist mit steigendem Alter deutlich vermindert (Mackall et al. 1995). Diese Immunreaktionen können sowohl erwünschter Natur sein, in Form von Selbsttoleranzmechanismen oder Erregerabwehr, als auch pathologischer Natur, in Form einer aGvHD oder cGvHD (Welniak, Blazar, and Murphy 2007).

Das Alter unserer Patient:innen variierte zum Zeitpunkt der Probengewinnung zwischen 0 und 23 Jahren. Deshalb verglichen wir die Zellzahlen der Lymphozyten inklusive $\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IFN}\gamma$ -, IL2-, IL4- und IL10-exprimierenden T-Zellen mit bereits veröffentlichten Daten (Wiegering et al. 2013; Eyrich et al. 2004; Wiegering et al. 2009). Unsere Daten stimmten mit den altersentsprechenden Referenzwerten überein. Wir werten dies als Qualitätskontrolle, insbesondere in Bezug auf die Immunrekonstitution der DCs pädiatrischer Patient:innen nach der aHSCT.

Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag auf der Rekonstitution der DCs. Auch DCs müssen im altersentsprechenden Kontext betrachtet werden. Referenzwerte der DCs sowie deren Subpopulationen sind bei gesunden Kindern und Jugendlichen in Bezug auf Alter und Geschlecht different (Heinze et al. 2013). So können die Zahlenwerte dieser Studie nicht unkritisch mit Referenzwerten adulter Patient:innen verglichen werden. Gleiches gilt für Hypothesen zur Rolle der DCs bei Entstehung einer cGvHD.

Eine cGvHD nach der aHSCT tritt bei Kindern und Jugendlichen mit 20%-50% seltener auf als bei adulten Patient:innen (Baird, Cooke, and Schultz 2010). Die Wahrscheinlichkeit beträgt hier 60%-70% (Lee, Vogelsang, and Flowers 2003). In unserem Kollektiv trat bei 26,2% der Patient:innen (n=16) eine cGvHD auf. Die bessere Funktionalität des Thymus und damit eine bessere Etablierung von Selbsttoleranz bei jüngeren Patient:innen wird als mögliche Ursache diskutiert (Eapen et al. 2004). Zur Rolle der DCs bei der Entstehung einer cGvHD wurde während der letzten beiden Jahrzehnte intensiv geforscht (Stenger et al. 2012; Reddy et al. 2004; Clark et al. 2003; Chan et al. 2003; Lau et al. 2007; Mohty et al. 2005; Rajasekar et al. 2010).

Exklusiv pädiatrische Daten für die Rekonstitution der DCs im Zusammenhang mit einer cGvHD lagen noch nicht vor.

Mit dem Wissen, dass sich Immunzellen von Kindern und Jugendlichen unterschiedlicher Altersklassen in Funktion und Rekonstitution nach der aHSCT unterscheiden ist es nicht überraschend, dass unsere Kohorte sich in Teilen von anderen Kohorten unterscheidet. Zudem gab es in unserer Kohorte mit der niedrigen Patient:innenanzahl und der kleinen Anzahl an DCs im peripheren Blut weitere Einschränkungen, die, wie in anderen Studien, die Messgenauigkeit beeinflussten (Elze et al. 2015; Dzionek et al. 2000). Gleiches gilt für die Heterogenität der Grunderkrankungen und der Stammzellquellen (Elze et al. 2015; Dzionek et al. 2000).

4.3 Rekonstitution der dendritischen Zellen

DCs spielen als APCs eine zentrale Rolle innerhalb immunologischer Prozesse (Banchereau and Steinman 1998). Ein Einfluss von DCs auf Immunreaktionen während und nach der Immunrekonstitution lag nahe.

Wir konnten bestätigen, dass die Rekonstitution der DCs 2-3 Wochen nach der aHSCT beginnt. Gleichsam gemischaltriger Patient:innenkollektive wurde eine schnelle Rekonstitution der mDCs festgestellt (Storek et al. 2008). Die pDCs erreichten auch 12 Monate nach der aHSCT keine normalen Spiegel (Storek et al. 2008). Im Individuum dauerte es zum Erreichen konstanter Werte innerhalb der mDCs ein Jahr. Innerhalb der pDCs wurden auch nach einem Jahr keine konstanten Werte erreicht. Diese Inkonstanz wurde bereits in Bezug auf ein pädiatrisches Patient:innenkollektiv beschrieben (Elze et al. 2015).

Zudem wurden im Laufe der Jahrzehnte Oberflächenmerkmale der DCs und ihrer Subpopulationen geändert oder ergänzt, was die Vergleichbarkeit mit anderen Studien erschwerte (Stenger et al. 2012). Zum Zeitpunkt der Datenerhebung wurde als charakteristisches Oberflächenmerkmal der mDCs CD1c+ CD11c+ gewählt, als charakteristisches Oberflächenmerkmal der pDCs CD303+ CD11c-. Problematisch ist, dass mit den mDC1 10% der mDC-Population ausgeschlossen wurden, da sie weder CD1c noch CD11c als charakteristisches Oberflächenmerkmal exprimieren, sondern CD141 (Collin and Bigley 2018). Bezüglich der pDCs wurde CD123 nach weiteren Studien als charakteristisches Oberflächenmerkmal neben CD303 ergänzt (See et al. 2017).

4.4 Dendritische Zellen und Outcome nach der aHSCT

Bisher wurden in gemischaltrigen Patient:innenkollektiven einige Daten zur Rekonstitution der DCs nach der aHSCT und dem Outcome erfasst. Die hierzu

diskutierten Zellzahlen beziehen sich auf das periphere Blut. Das Überleben korrelierte negativ mit einer niedrigen Anzahl mDCs und pDCs zum Zeitpunkt des Engraftments. Auch eine höhere Anzahl an DCs insgesamt ab Tag 100 und eine niedrigen Anzahl an pDCs ab Tag 100 wirkten sich negativ auf das Überleben aus (Reddy et al. 2004; Chan et al. 2003; Mohty et al. 2005; Stenger et al. 2012).

In unserem pädiatrischen Patient:innenkollektiv konnten wir jedoch, unabhängig von anderen Einflussfaktoren, keine Korrelation zwischen einer hohen Anzahl an DCs oder einer niedrigen Anzahl an pDCs und dem Überleben finden. Diese beiden Faktoren zeigten jedoch im Verlauf eine Korrelation mit dem Auftreten einer cGvHD.

Signifikant positiv auf das Gesamtüberleben wirkte sich in unserem Patient:innenkollektiv zu jedem erfassten Zeitpunkt ein großer Anteil an CCR7+ DCs, sowohl an CCR7+ mDCs als auch CCR7+ pDCs, aus. Ein Zusammenhang zwischen einer TBI und dem Outcome konnte ausgeschlossen werden.

4.5 Pathogenese der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung und dendritische Zellen

Neben dem Überleben ist die Lebensqualität nach der aHSCT entscheidend. Diese wird maßgeblich durch eine GvHD beeinflusst. Beide Arten der GvHD entstehen aus einem Zusammenspiel komplexer immunologischer Prozesse zwischen Zellen der Spendenden und Empfangenden.

Die Rolle aktivierter T-Zellen der Spendenden für das Ausbrechen einer aGvHD und cGVHD wurde bereits bestätigt (Takahashi et al. 2000; Zeiser and Blazar 2017a, 2017b). Belege für die Annahme, dass auch diverse Zytokine zum Ausbrechen einer aGvHD und cGVHD beitragen, gab es ebenfalls (Takahashi et al. 2000; Zeiser and Blazar 2017b, 2017a). Die klinische Symptomatik der cGvHD ähnelt anderen Autoimmunerkrankungen. Dass in der Klinik regelmäßig Allo- und Autoantikörper verschiedener Genese bei Patient:innen mit cGvHD detektiert wurden, spricht für eine Beteiligung der B-Zellen bei der Pathogenese einer cGvHD (Fujii et al. 2008; Rouquette-Gally et al. 1988).

DCs interagieren sowohl mit T-Zellen als auch mit B-Zellen. Sie produzieren Zytokine und induzieren die Freisetzung von Zytokinen. Unsere Daten suggerieren einen Einfluss der DCs auf die Entstehung des klinischen Bildes einer cGvHD.

Ab dem Engraftment bis Tag 60-100 nach der aHSCT konnten bei unseren Patient:innen, die im Verlauf an einer cGvHD erkrankten, verminderte absolute und relative Zahlenwerte an mDCs signifikant nachgewiesen werden. Dies wurde zuvor bei adulten Patient:innenkollektiven beschrieben (Reddy et al. 2004; Lau et al. 2007). Ebenso zeigte sich bei adulten Patient:innen mit einer aGvHD während des Engraftments eine niedrige Anzahl an pDCs sowie eine verhältnismäßig erhöhte Zahl an pDCs (Reddy et al. 2004; Lau et al. 2007). Diese Tendenz zeigten unserer Daten auch für eine cGvHD, jedoch nicht auf signifikantem Niveau.

Im Verlauf war bei unseren Patient:innen mit cGvHD der Anteil an pDCs ab Tag 101-365 sowie zu Beginn der cGvHD signifikant erhöht. In vorherigen Studien mit gemischtaltrigen Patient:innen wurde ein Zusammenhang sowohl zwischen einer aGvHD als auch einer cGvHD und einer erhöhten Anzahl an pDCs, aber auch DCs insgesamt, zu Tag 100 und später nach der aHSCT gezeigt (Chan et al. 2003; Clark et al. 2003). Im Gegensatz hierzu waren in unserem pädiatrischen Patient:innenkollektiv die absoluten und relativen Zahlenwerte an DCs bei cGvHD-Patient:innen ab Tag 101-365 vermindert. Ein Einfluss von insbesondere immunsupprimierenden Medikamenten kann hier nicht sicher ausgeschlossen werden.

CD83 und CD86 sind beides Oberflächenmerkmale, die bei aktivierten DCs erhöht sind und eine wichtige Rolle für die T-Zell-Kostimulation spielen (Galluzzi et al. 2012). Wir untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein dieser Oberflächenmerkmale und dem Auftreten einer cGvHD. Andere Studien hatten bereits den Zusammenhang mit dem Auftreten einer aGvHD untersucht (Lau et al. 2007). Jedoch konnten weder wir noch andere Studien eine Korrelation feststellen.

So bleibt die pathophysiologische Relevanz der DCs für eine cGvHD weiter unklar. Ko-Kultur-Experimente unserer Arbeitsgruppe deuteten auf einen regulierenden Effekt von B-Zellen der Empfangenden auf die Homöostase von mDCs der Spendenden hin (Zipfel 2016). Eine andere Studie zeigte, dass die experimentelle Depletion von mDCs der Empfangenden nicht einer GvHD vorbeugte (Li et al. 2012).

Stattdessen führte die Transplantation von CD11b-depletiertem Knochenmark zu erhöhten Spiegeln von Spender-Milz-bezogenen CD4+ T-Gedächtnszellen, die im Empfänger verstärkte GvT-Effekte und einen erhöhten Spiegel an Interferon γ (IFN γ) bewirkten (Li and Waller 2004). Dies zeigte, dass mDCs nicht exklusiv für die Entstehung einer GvHD vorhanden sein müssen.

Niedrige Zahlen an mDCs und pDCs während des Engraftment bei GvHD-Patient:innen könnten für eine regulatorische Komponente sprechen oder dafür, dass eine schnelle Rekonstitution vor einer GvHD schützt.

Aktiviert pDCs sind zudem entscheidend für die Ausbildung von Plasmazellen und die Antikörperantwort (Jego et al. 2003). Hier spricht ein erhöhter Anteil ab Tag 101-365 nach der aHSCT sowie zu Beginn einer cGvHD eher für eine autoimmune als immunregulatorische Komponente. Durch die Produktion großer Mengen an Interferonen tragen pDCs zur Aktivierung von B-Zellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen und mDCs bei (Shaw et al. 2010).

Zusammenfassend deuten unsere Daten auf einen Einfluss der DCs in der Pathogenese der cGvHD hin. Die Pathogenese der cGvHD bleibt komplex und die mannigfaltige klinische Ausprägung, besonders im Vergleich von pädiatrischen zu adulten Patient:innen, deutet auf unterschiedliche Subtypen der cGvHD hin. Zudem können DCs nicht nur mögliche Biomarker für die Vorhersage einer cGvHD sein, sondern auch eine Zellpopulation mit deren Manipulation man einer cGvHD vorbeugen kann.

5. Zusammenfassung

Die aHSCT ist oft der einzige oder letzte kurative Therapieansatz zur Behandlung diverser lebensbedrohlicher Erkrankungen. Die cGvHD ist eine relevante Komplikation, die Einfluss auf die Morbidität und Mortalität nach der aHSCT hat. Die genaue Pathogenese ist unbekannt. Ein Einfluss dendritischer Zellen als Schlüsselzellen immunologischer Prozesse auf die Entstehung einer cGvHD ist wahrscheinlich. In dieser Studie erfassten wir patient:innen- und aHSCT-bezogene Daten 61 stammzelltransplantierten Kinder und Jugendlicher sowie deren möglichen Einfluss auf das Auftreten einer cGvHD. Zudem wurde die Rekonstitution der Immunzellen, insbesondere der DCs, nach der aHSCT evaluiert und auf Zusammenhänge mit diversen patienten- und aHSCT-bezogenen Faktoren, dem Auftreten einer aGvHD und dem Auftreten einer cGvHD hin untersucht. Signifikante Risikofaktoren für das Auftreten einer cGvHD waren eine Leukämie oder ein Lymphom als Grunderkrankung, eine partielle Remission vor der aHSCT, eine TBI, peripheres Blut als Stammzellquelle, ein Blutgruppen- oder Sexmismatch und eine höhergradige aGvHD. Im Gesamtüberleben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patient:innen mit oder ohne cGvHD. Jedoch erlitt keiner der Patient:innen mit cGvHD ein Rezidiv.

Die Rekonstitution der Lymphozyten sowie die Zytokinexpression der T-Zellen während der Rekonstitution verhielt sich ähnlich zu vorherigen Studien. Signifikante Unterschiede zwischen Patient:innen mit oder ohne cGvHD zeigten sich nicht konsistent. Die Rekonstitution der DCs erfolgte innerhalb von 60-100 Tagen. Stabile Werte zeigten sich jedoch frühestens ein Jahr nach der aHSCT. Während des Engraftments war der Anteil CCR7+ DCs bei Patient:innen erhöht, die eine TBI erhalten hatten. Ein hoher Anteil CCR7+ DCs wirkte sich zu jedem Zeitpunkt positiv auf das Gesamtüberleben aus. Trat eine höhergradige aGvHD auf, konnte eine verminderte absolute und relative Zellzahl 60-365 Tage nach der aHSCT für DCs insgesamt und mDCs erfasst werden, für pDCs 60-100 Tage nach aHSCT. Zwischen der Rekonstitution der DCs und dem Auftreten einer cGvHD konnten wir vier Korrelationen beobachten. Der absolute und relative Zahlenwert an mDCs war während des Engraftments bis Tag 60-100 vermindert. Der absolute und relative Zahlenwert an DCs insgesamt war ab Tag 101-365 vermindert. Ein erhöhter Anteil an pDCs konnte ab Tag 101-365 sowie zu Beginn einer cGvHD bestimmt werden. Der Anteil monozytärer DCs war ab Tag 60-100 erhöht. Die Pathogenese der cGvHD bleibt weiter teilweise unklar. Unsere Daten suggerieren einen Einfluss der DCs auf die Entstehung einer cGvHD. Zur weiteren Klärung der Pathogenese der cGvHD und der Rolle der DCs sollten weitere Studien erfolgen.

6.Literaturverzeichnis

- Anasetti, C., B. R. Logan, S. J. Lee, E. K. Waller, D. J. Weisdorf, J. R. Wingard, C. S. Cutler, P. Westervelt, A. Woolfrey, S. Couban, G. Ehninger, L. Johnston, R. T. Maziarz, M. A. Pulsipher, D. L. Porter, S. Mineishi, J. M. McCarty, S. P. Khan, P. Anderlini, W. I. Bensinger, S. F. Leitman, S. D. Rowley, C. Bredeson, S. L. Carter, M. M. Horowitz, D. L. Confer, Blood, and Network Marrow Transplant Clinical Trials. 2012. 'Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors', *N Engl J Med*, 367: 1487-96.
- Atkinson, K., M. M. Horowitz, R. P. Gale, D. W. van Bekkum, E. Gluckman, R. A. Good, N. Jacobsen, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, and et al. 1990. 'Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation', *Blood*, 75: 2459-64.
- Baird, K., K. Cooke, and K. R. Schultz. 2010. 'Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children', *Pediatr Clin North Am*, 57: 297-322.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. 'Dendritic cells and the control of immunity', *Nature*, 392: 245-52.
- Baron, F., M. Labopin, D. Niederwieser, S. Vigouroux, J. J. Cornelissen, C. Malm, L. L. Vindelov, D. Blaise, J. J. Janssen, E. Petersen, G. Socie, A. Nagler, V. Rocha, and M. Mohty. 2012. 'Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation', *Leukemia*, 26: 2462-8.
- Bertaina, A., and M. Andreani. 2018. 'Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism', *Int J Mol Sci*, 19.
- Billingham, R. E. 1966. 'The biology of graft-versus-host reactions', *Harvey Lect*, 62: 21-78.
- Chan, G. W., G. Gorgun, K. B. Miller, and F. M. Foss. 2003. 'Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease', *Biol Blood Marrow Transplant*, 9: 170-6.
- Clark, F. J., L. Freeman, A. Dzionek, J. Schmitz, D. McMullan, P. Simpson, J. Mason, P. Mahendra, C. Craddock, M. Griffiths, P. A. Moss, and R. Chakraverty. 2003. 'Origin and subset distribution of peripheral blood dendritic cells in patients with chronic graft-versus-host disease', *Transplantation*, 75: 221-5.
- Collin, M., and V. Bigley. 2018. 'Human dendritic cell subsets: an update', *Immunology*, 154: 3-20.
- Crooks, G. M., K. Weinberg, and C. Mackall. 2006. 'Immune reconstitution: from stem cells to lymphocytes', *Biol Blood Marrow Transplant*, 12: 42-6.
- Detrait, M. Y., S. Morisset, R. Peffault de Latour, I. Yakoub-Agha, R. Crocchiolo, R. Tabrizi, J. O. Bay, P. Chevalier, F. Barraco, N. Raus, S. Vigouroux, L. Magro, M. Mohty, N. Milpied, D. Blaise, G. Socie, and M. Michallet. 2015. 'Pre-

- transplantation risk factors to develop sclerotic chronic GvHD after allogeneic HSCT: a multicenter retrospective study from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire (SFGM-TC)', *Bone Marrow Transplant*, 50: 253-8.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, and J. Schmitz. 2000. 'BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood', *J Immunol*, 165: 6037-46.
- Eapen, M., M. M. Horowitz, J. P. Klein, R. E. Champlin, F. R. Loberiza, Jr., O. Ringden, and J. E. Wagner. 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', *J Clin Oncol*, 22: 4872-80.
- Elze, M. C., O. Ciocarlie, A. Heinze, S. Kloess, T. Gardlowski, R. Esser, T. Klingebiel, P. Bader, S. Huenecke, M. Serban, U. Kohl, and J. L. Hutton. 2015. 'Dendritic cell reconstitution is associated with relapse-free survival and acute GVHD severity in children after allogeneic stem cell transplantation', *Bone Marrow Transplant*, 50: 266-73.
- Eyrich, M., T. Croner, C. Leiler, P. Lang, P. Bader, T. Klingebiel, D. Niethammer, and P. G. Schlegel. 2002. '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*, 100: 1915-8.
- Eyrich, M., C. Leiler, T. Croner, P. Lang, M. Schumm, B. Mascher, K. Schilbach, T. Klingebiel, R. Handgretinger, D. Niethammer, and P. G. Schlegel. 2004. 'Impaired T-cell activation and cytokine productivity after transplantation of positively selected CD34+ allogeneic hematopoietic stem cells', *Hematol J*, 5: 329-40.
- Eyrich, M., C. Leiler, P. Lang, K. Schilbach, M. Schumm, P. Bader, J. Greil, T. Klingebiel, R. Handgretinger, D. Niethammer, and P. G. Schlegel. 2003. 'A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors', *Bone Marrow Transplant*, 32: 379-90.
- Eyrich, M., and H. Schulze. 2019. 'HLA Matching in Pediatric Stem Cell Transplantation', *Transfus Med Hemother*, 46: 348-55.
- Filipovich, A. H., D. Weisdorf, S. Pavletic, G. Socie, J. R. Wingard, S. J. Lee, P. Martin, J. Chien, D. Przepiorka, D. Couriel, E. W. Cowen, P. Dinndorf, A. Farrell, R. Hartzman, J. Henslee-Downey, D. Jacobsohn, G. McDonald, B. Mittleman, J. D. Rizzo, M. Robinson, M. Schubert, K. Schultz, H. Shulman, M. Turner, G. Vogelsang, and M. E. Flowers. 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', *Biol Blood Marrow Transplant*, 11: 945-56.

- Flowers, M. E., Y. Inamoto, P. A. Carpenter, S. J. Lee, H. P. Kiem, E. W. Petersdorf, S. E. Pereira, R. A. Nash, M. Mielcarek, M. L. Fero, E. H. Warren, J. E. Sanders, R. F. Storb, F. R. Appelbaum, B. E. Storer, and P. J. Martin. 2011. 'Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria', *Blood*, 117: 3214-9.
- Fry, T. J., A. Willasch, and P. Bader. 2010. 'The graft-versus-tumor effect in pediatric malignancy', *Pediatr Clin North Am*, 57: 67-81.
- Fujii, H., G. Cuvelier, K. She, S. Aslanian, H. Shimizu, A. Kariminia, M. Krailo, Z. Chen, R. McMaster, A. Bergman, F. Goldman, S. A. Grupp, D. A. Wall, A. L. Gilman, and K. R. Schultz. 2008. 'Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children's Oncology Group', *Blood*, 111: 3276-85.
- Galluzzi, L., L. Senovilla, E. Vacchelli, A. Eggermont, W. H. Fridman, J. Galon, C. Sautes-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2012. 'Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy', *Oncoimmunology*, 1: 1111-34.
- Glucksberg, H., R. Storb, A. Fefer, C. D. Buckner, P. E. Neiman, R. A. Clift, K. G. Lerner, and E. D. Thomas. 1974. 'Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors', *Transplantation*, 18: 295-304.
- Hannet, I., F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys, and M. DeBruyere. 1992. 'Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations', *Immunol Today*, 13: 215, 18.
- Harris, A. C., R. Young, S. Devine, W. J. Hogan, F. Ayuk, U. Bunworasate, C. Chanswangphuwana, Y. A. Efebera, E. Holler, M. Litzow, R. Ordemann, M. Qayed, A. S. Renteria, R. Reshef, M. Wolfl, Y. B. Chen, S. Goldstein, M. Jagasia, F. Locatelli, S. Mielke, D. Porter, T. Schechter, Z. Shekhovtsova, J. L. Ferrara, and J. E. Levine. 2016. 'International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium', *Biol Blood Marrow Transplant*, 22: 4-10.
- Heinze, A., M. C. Elze, S. Kloess, O. Ciocarlie, C. Konigs, S. Betz, M. Bremm, R. Esser, T. Klingebiel, M. Serban, J. L. Hutton, and U. Koehl. 2013. 'Age-matched dendritic cell subpopulations reference values in childhood', *Scand J Immunol*, 77: 213-20.
- Hierlmeier, S., M. Eyrich, M. Wolfl, P. G. Schlegel, and V. Wiegering. 2018. 'Early and late complications following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients - A retrospective analysis over 11 years', *PLoS One*, 13: e0204914.
- Hong, C., R. Jin, X. Dai, and X. Gao. 2021. 'Functional Contributions of Antigen Presenting Cells in Chronic Graft-Versus-Host Disease', *Front Immunol*, 12: 614183.
- Hubo, M., B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuettenberg, K. Steinbrink, and H. Jonuleit. 2013. 'Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells', *Front Immunol*, 4: 82.

- Jagasia, M. H., H. T. Greinix, M. Arora, K. M. Williams, D. Wolff, E. W. Cowen, J. Palmer, D. Weisdorf, N. S. Treister, G. S. Cheng, H. Kerr, P. Stratton, R. F. Duarte, G. B. McDonald, Y. Inamoto, A. Vigorito, S. Arai, M. B. Datiles, D. Jacobsohn, T. Heller, C. L. Kitko, S. A. Mitchell, P. J. Martin, H. Shulman, R. S. Wu, C. S. Cutler, G. B. Vogelsang, S. J. Lee, S. Z. Pavletic, and M. E. Flowers. 2015. 'National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report', *Biol Blood Marrow Transplant*, 21: 389-401 e1.
- Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, and J. Banchereau. 2003. 'Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6', *Immunity*, 19: 225-34.
- Kleindienst, P., and T. Brocker. 2005. 'Concerted antigen presentation by dendritic cells and B cells is necessary for optimal CD4 T-cell immunity in vivo', *Immunology*, 115: 556-64.
- Lau, J., M. Sartor, K. F. Bradstock, S. Vuckovic, D. J. Munster, and D. N. Hart. 2007. 'Activated circulating dendritic cells after hematopoietic stem cell transplantation predict acute graft-versus-host disease', *Transplantation*, 83: 839-46.
- Lee, S. J. 2017. 'Classification systems for chronic graft-versus-host disease', *Blood*, 129: 30-37.
- Lee, S. J., G. Vogelsang, and M. E. Flowers. 2003. 'Chronic graft-versus-host disease', *Biol Blood Marrow Transplant*, 9: 215-33.
- Li, H., A. J. Demetris, J. McNiff, C. Matte-Martone, H. S. Tan, D. M. Rothstein, F. G. Lakkis, and W. D. Shlomchik. 2012. 'Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction', *J Immunol*, 188: 3804-11.
- Li, J. M., and E. K. Waller. 2004. 'Donor antigen-presenting cells regulate T-cell expansion and antitumor activity after allogeneic bone marrow transplantation', *Biol Blood Marrow Transplant*, 10: 540-51.
- Lorenz, E., C. Congdon, and D. Uphoff. 1952. 'Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections', *Radiology*, 58: 863-77.
- MacDonald, K. P., G. R. Hill, and B. R. Blazar. 2017. 'Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies', *Blood*, 129: 13-21.
- Mackall, C. L., T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein, M. E. Horowitz, I. T. Magrath, A. T. Shad, S. M. Steinberg, and et al. 1995. 'Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy', *N Engl J Med*, 332: 143-9.
- Miklos, D. B., H. T. Kim, K. H. Miller, L. Guo, E. Zorn, S. J. Lee, E. P. Hochberg, C. J. Wu, E. P. Alyea, C. Cutler, V. Ho, R. J. Soiffer, J. H. Antin, and J. Ritz. 2005. 'Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission', *Blood*, 105: 2973-8.

- Mohty, M., D. Blaise, C. Faucher, V. J. Bardou, J. A. Gastaut, P. Viens, D. Olive, and B. Gaugler. 2005. 'Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation', *Leukemia*, 19: 1-6.
- Palucka, K., and J. Banchereau. 2012. 'Cancer immunotherapy via dendritic cells', *Nat Rev Cancer*, 12: 265-77.
- Passweg, J. R., H. Baldomero, C. Chabannon, G. W. Basak, S. Corbacioglu, R. Duarte, H. Dolstra, A. C. Lankester, M. Mohty, S. Montoto, R. Peffault de Latour, J. A. Snowden, J. Styczynski, I. Yakoub-Agha, N. Kroger, Blood European Society for, and Transplantation Marrow. 2020. 'The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CAR-T's come into focus', *Bone Marrow Transplant*.
- Penack, O., M. Marchetti, T. Ruutu, M. Aljurf, A. Bacigalupo, F. Bonifazi, F. Ciceri, J. Cornelissen, R. Malladi, R. F. Duarte, S. Giebel, H. Greinix, E. Holler, A. Lawitschka, S. Mielke, M. Mohty, M. Arat, A. Nagler, J. Passweg, H. Schoemans, G. Socie, C. Solano, R. Vrhovac, R. Zeiser, N. Kroger, and G. W. Basak. 2020. 'Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation', *Lancet Haematol*, 7: e157-e67.
- Rajasekar, R., K. M. Lakshmi, B. George, A. Viswabandya, R. Thirugnanam, A. Abraham, M. Chandy, A. Srivastava, and V. Mathews. 2010. 'Dendritic cell count in the graft predicts relapse in patients with hematologic malignancies undergoing an HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant', *Biol Blood Marrow Transplant*, 16: 854-60.
- Reddy, V., J. A. Iturraspe, A. C. Tzolas, H. U. Meier-Kriesche, J. Schold, and J. R. Wingard. 2004. 'Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease', *Blood*, 103: 4330-5.
- Rouquette-Gally, A. M., D. Boyeldieu, A. C. Prost, and E. Gluckman. 1988. 'Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term-surviving patients', *Transplantation*, 46: 238-40.
- See, P., C. A. Dutertre, J. Chen, P. Gunther, N. McGovern, S. E. Irac, M. Gunawan, M. Beyer, K. Handler, K. Duan, H. R. B. Sumatoh, N. Ruffin, M. Jouve, E. Gea-Mallorqui, R. C. M. Hennekam, T. Lim, C. C. Yip, M. Wen, B. Malleret, I. Low, N. B. Shadan, C. F. S. Fen, A. Tay, J. Lum, F. Zolezzi, A. Larbi, M. Poidinger, J. K. Y. Chan, Q. Chen, L. Renia, M. Haniffa, P. Benaroch, A. Schlitzer, J. L. Schultze, E. W. Newell, and F. Ginhoux. 2017. 'Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques', *Science*, 356.
- Shaw, J., Y. H. Wang, T. Ito, K. Arima, and Y. J. Liu. 2010. 'Plasmacytoid dendritic cells regulate B-cell growth and differentiation via CD70', *Blood*, 115: 3051-7.
- Steinman, R. M., and J. Banchereau. 2007. 'Taking dendritic cells into medicine', *Nature*, 449: 419-26.

- Stenger, E. O., H. R. Turnquist, M. Y. Mapara, and A. W. Thomson. 2012. 'Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity', *Blood*, 119: 5088-103.
- Storek, J., M. Geddes, F. Khan, B. Huard, C. Helg, Y. Chalandon, J. Passweg, and E. Roosnek. 2008. 'Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans', *Semin Immunopathol*, 30: 425-37.
- Sykora, K. W. 2013. "Pädiatrisches Register für Stammzell-Transplantationen (PRST)." In.
- Takahashi, H., T. Furukawa, S. Hashimoto, N. Suzuki, T. Kuroha, F. Yamazaki, K. Inano, M. Takahashi, Y. Aizawa, and T. Koike. 2000. 'Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation', *Bone Marrow Transplant*, 26: 1317-23.
- Vakkila, J., A. W. Thomson, L. Hovi, K. Vetteranta, and U. M. Saarinen-Pihkala. 2005. 'Circulating dendritic cell subset levels after allogeneic stem cell transplantation in children correlate with time post transplant and severity of acute graft-versus-host disease', *Bone Marrow Transplant*, 35: 501-7.
- van Den Brink, M., A. M. Leen, K. Baird, M. Merchant, C. Mackall, and C. M. Bollard. 2013. 'Enhancing immune reconstitution: from bench to bedside', *Biol Blood Marrow Transplant*, 19: S79-83.
- Welniak, L. A., B. R. Blazar, and W. J. Murphy. 2007. 'Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Annu Rev Immunol*, 25: 139-70.
- Wiegering, V., M. Eyrich, C. Wunder, H. Gunther, P. G. Schlegel, and B. Winkler. 2009. 'Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children', *Eur Cytokine Netw*, 20: 75-80.
- Wiegering, V., B. Winkler, I. Haubitz, M. Wolfl, P. G. Schlegel, and M. Eyrich. 2013. 'Lower TGF β s serum levels and higher frequency of IFN γ -producing T cells during early immune reconstitution in surviving children after allogeneic stem cell transplantation', *Pediatr Blood Cancer*, 60: 121-8.
- Zecca, M., A. Prete, R. Rondelli, E. Lanino, A. Balduzzi, C. Messina, F. Fagioli, F. Porta, C. Favre, A. Pession, F. Locatelli, Aieop-Bmt Group. Italian Association for Pediatric Hematology, and Transplant Oncology-Bone Marrow. 2002. 'Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome', *Blood*, 100: 1192-200.
- Zeiser, R., and B. R. Blazar. 2017a. 'Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy', *N Engl J Med*, 377: 2167-79.
- . 2017b. 'Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets', *N Engl J Med*, 377: 2565-79.
- Zipfel, J., Eyrich, M., Schlegel, PG. et al. 2016. 'Disturbed B cell and DC Homeostasis in pediatric cGVHD patients cocultivation experiments and review of literature', *Clin Oncol*. 2016 1: 1-11.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	acute graft-versus-host-disease/ akute Graft-versus-Host-Erkrankung
aHSCT	allogene hematopoietic stem cell transplantation/ allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation
APC	antigen-presenting cell/ antigenpräsentierende Zelle
BAFF	B-cell activating factor/ B-Zell aktivierender Faktor
BM	bone marrow/ Knochenmark
CD	cluster of differentiation/ Differenzierungsantigene
cGvHD	chronic graft-versus-host-disease/ chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
CMV	Cytomegalievirus
CR	complete remission/ komplette Remission
DAMP	damage-associated molecular patterns/ schadenassoziierte molekulare Muster
DC	dendritic cell/ dendritische Zelle

DNA	deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
engl.	englisch
FACS	fluoreszenz-activated cell sorting/ auf Fluoreszenz basierende Form der Durchflusszytometrie
FSC	forward scatter/ Vorwärtsstreulicht
GvHD	graft-versus-host-disease/ Graft-versus-Host-Erkrankung
GvT	graft-verus-tumor-effect/ Graft-versus-Tumor-Effekt
HLA	human leukocyte antigen/ humanes Leukozytenantigen
HSC	hematopoietic stem cell/ hämatopoietische Stammzelle
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation/ hämatopoietische Stammzelltransplantation
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

mDC	myeloid dendritic cell/ myeloide dendritische Zelle
MiHA	minor histocompatibility antigens/ Minor-Histokompatibilitätsantigene
MHC	major histocompatibility complex/ Haupthistokompatibilitätskomplex
NLR	nukleotide-binding oligomerization domain-like receptor/ NOD-like-Rezeptor
PAMP	pathogen-associated molecular patterns/ pathogenassoziierte molekulare Muster
PB	peripheral blood/ peripheres Blut
PD	progressive disease/ voranschreitende Erkrankung
pDC	plasmacytoid dendritic cell/ plasmazytoide dendritische Zelle
PDGF	platelet-derived growth factor/ aus Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor
PR	partial remission/ partielle Remission
RLR	retinoic acid-inducible genen-I-like receptor/ RIG-I-like-Rezeptor
RNA	ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure

SD	stable disease/ stabile Erkrankung
SSC	side scatter/ Seitenstreulicht
TBI	total body irradiation/ Ganzkörperbestrahlung
TGF	transforming growth factor/ transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzelle
TLR	toll-like receptor/ toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatory T-cell/ regulatorische T-Zelle
UD	unrelated donor/ nicht-verwandter Spendender
vs	versus

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abstammung und mögliche Oberflächenmerkmale der DCs modifiziert nach Collin and Bigley 2018	11
Abbildung 2: Lymphozytengate	20
Abbildung 3: Subpopulation CD3+ Zellen	20
Abbildung 4: Subpopulation CD3+CD4+ und CD3+CD8+ Zellen	20
Abbildung 5: Subpopulation CD19+ Zellen	21
Abbildung 6: Subpopulation CD16/56+ Zellen	21
Abbildung 7: Subpopulation TNF α -exprimierender T-Zellen	21
Abbildung 8: Subpopulation IL2-exprimierender T-Zellen	21
Abbildung 9: Subpopulation IFN γ -exprimierender T-Zellen	22
Abbildung 10: Subpopulation IL4-exprimierender T-Zellen	22
Abbildung 11: Subpopulation IL10-exprimierender T-Zellen	22
Abbildung 12: Subpopulation IL4-exprimierender naiver T-Zellen und T-Gedächtniszellen	22
Abbildung 13: Subpopulation CD45-exprimierender Zellen	23
Abbildung 14: Gate der CD1c+ DCs	23
Abbildung 15: Gate der CD303+ DCs	23
Abbildung 16: Subpopulation der CD1c+ CD11c+ myeloiden DCs	24
Abbildung 17: Subpopulation der CD303+ CD11c- plasmazytoiden DCs	24
Abbildung 18: Subpopulation CD80+ plasmazytoider DCs	24
Abbildung 19: Subpopulation CD83+ plasmazytoider DCs	24
Abbildung 20: Subpopulation CD86+ plasmazytoider DCs	24
Abbildung 21: Subpopulation CCR7+ plasmazytoider DCs	24
Abbildung 22: Subpopulation monozytärer DCs	25

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Einteilung des Gesamtschweregrades der aGvHD, modifiziert nach Glucksberg	7
Tabelle 2: Einteilung des Gesamtschweregrades der cGvHD nach der NIH Consensus Conference 2014	9
Tabelle 3: Antigene und deren dazugehörige an Antikörper gebundene Fluorochrome	19
Tabelle 4: Patient:innenbezogene Daten, unterteilt nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD	27
Tabelle 5: aHSCT-bezogene Daten, unterteilt nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD	29
Tabelle 6: Rekonstitution der Subpopulationen der Lymphozyten nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung	35
Tabelle 7: Rekonstitution der T-Zellen und Zytokinexpression nach Auftreten oder Nicht-Auftreten einer cGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung	39
Tabelle 8 :Rekonstitution der DCs und Rekonstitution der Subpopulationen der DCs, Median sowie die 5te und 95te Perzentile	43
Tabelle 9: Rekonstitution der DCs und verschiedener Subpopulationen im Zusammenhang mit einer TBI, Mittelwerte mit Standardabweichung	44
Tabelle 10: Rekonstitution der DCs und verschiedener Subpopulationen im Zusammenhang mit dem Auftreten einer aGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung	45
Tabelle 11: Rekonstitution der DCs und verschiedener Subpopulationen im Zusammenhang mit dem Auftreten einer cGvHD, Mittelwerte mit Standardabweichung	47

IV Danksagung

Hiermit möchte ich mich von ganzem Herzen bei den folgenden Personen bedanken:

Prof. Dr. med. Verena Wiegering für die freundliche Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die Geduld.

Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel und Prof. Dr. med. Stefan Knop für die Unterstützung und konstruktive Kritik als Mitglieder des Betreuungskomitees.

Den Mitarbeitenden des Stammzell-Labors der Universität Würzburg, insbesondere Marieke Frietsch, für die Unterstützung während der Datenerhebung.

Yannis Kappelmann, Christina Reichenberger und Katja Schumann dafür, dass ihr immer ein offenes Ohr habt und ihr mich sowohl fachlich als auch emotional bei der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet habt.

Meiner Familie, die mich zu jeder Zeit unterstützt.

V Lebenslauf

VI Publikationen

Wiegering, V., L. Peter, M. Frietsch, P. G. Schlegel, and M. Eyrich. 2019. 'Differences of Immune Reconstitution of Dendritic Cells in Pediatric GvHD Patients After Allogenic Stem Cell Transplantation', *J Pediatr Hematol Oncol*, 41: e101-e07.