

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele**

**Analysen zur zellulären Immunrekonstitution  
nach allogener Stammzelltransplantation**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Sabrina Pohlmann**

**aus Faulbach**

**Würzburg, Februar 2015**

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. Götz Ulrich Grigoleit

**Korreferent:** Prof. Dr. Matthias Eyrich

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16.03.2016

**Die Promovendin ist Ärztin**

Meiner Familie.

## Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1       | Generelle Therapieoptionen bei malignen Tumoren .....   | 3         |
| 1.2       | Die Blutstammzelltransplantation als Therapieoption bei malignen Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems ..... | 5         |
| 1.2.1     | Die allogene Blutstammzelltransplantation .....   | 6         |
| 1.2.1.1   | Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation .....   | 8         |
| 1.2.1.2   | Graft-versus-Host-Disease (GvHD) .....  | 9         |
| 1.2.1.3   | Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation .....   | 10        |
| 1.3       | Lymphozyten: B-, T- und NK-Zellen .....   | 12        |
| 1.4       | Fragestellung der Arbeit .....  | 14        |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b> .....  | <b>18</b> |
| 2.1       | Patienten und Spenderkollektiv .....  | 18        |
| 2.2       | Geräte und Gebrauchsmaterialien .....   | 19        |
| 2.3       | Reagenzien .....  | 21        |
| 2.4       | Verwendete Kits .....   | 25        |
| 2.5       | Stammlösungen .....   | 25        |
| 2.6       | Isolierung von PBMNC .....  | 26        |
| 2.7       | Zellzahlbestimmung mittels Neubauer – Zählkammer .....  | 28        |
| 2.8       | Einfrieren von Zellen .....   | 29        |
| 2.9       | Auftauen von Zellen .....   | 29        |
| 2.10      | Durchflusszytometrische Methoden .....  | 30        |
| 2.10.1    | Immunsotypisierung von PBMNC mittels FACS - Analyse .....   | 31        |
| 2.10.2    | Foxp3 – Färbung .....   | 32        |
| 2.10.3    | Intrazelluläre FACS – Analyse von Interferon gamma (IFNgamma) .....   | 34        |
| 2.10.4    | Spezifische T – Zell – Subtypisierung mittels MHC-Tetrameren .....  | 36        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>38</b> |
| 3.1       | Allgemeine Immunrestitution .....   | 38        |
| 3.1.1     | T-Zellen gesamt .....   | 39        |
| 3.1.2     | B-Zellen .....  | 41        |
| 3.1.3     | Natürliche Killerzellen .....   | 41        |
| 3.1.4     | T-Zell-Untergruppen .....   | 46        |
| 3.2       | T – Zell – Subtypisierung .....   | 49        |

## **Inhaltsverzeichnis**

---

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3.3 | Antigen-spezifische Immunrekonstitution ..... | 54 |
| 3.4 | Regulatorische T – Zellen .....               | 59 |
| 4.  | Diskussion .....                              | 64 |
| 4.1 | Allgemeine Immunrekonstitution .....          | 64 |
| 4.2 | T-Zell-Subtypisierung .....                   | 70 |
| 4.3 | Antigen-spezifische Immunrekonstitution ..... | 74 |
| 4.4 | Regulatorische T-Zellen.....                  | 78 |
| 5.  | Zusammenfassung .....                         | 84 |
|     | Literaturverzeichnis .....                    | 86 |
|     | Abkürzungsverzeichnis .....                   | 92 |
|     | Abbildungsverzeichnis .....                   | 95 |
|     | Tabellenverzeichnis .....                     | 96 |

## 1. Einleitung

Krebserkrankungen haben sich zu einer der häufigsten Todesursachen weltweit entwickelt. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) verursachen sie jährlich insgesamt 13 Millionen Todesfälle weltweit, was 13% aller Todesfälle entspricht (1). Während in Entwicklungsländern trotz dieser Zahlen immer noch Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache darstellen, hat sich das Erkrankungsspektrum durch weitreichende Impfaktionen und verbesserte hygienische Bedingungen in den Industrienationen immer weiter in Richtung anderer Leiden wie Herz – Kreislauferkrankungen oder Krebserkrankungen verschoben. In Deutschland nehmen Malignome nach den Krankheiten des Kreislaufsystems bereits den zweiten Platz der Todesursachen ein (Abbildung 1).

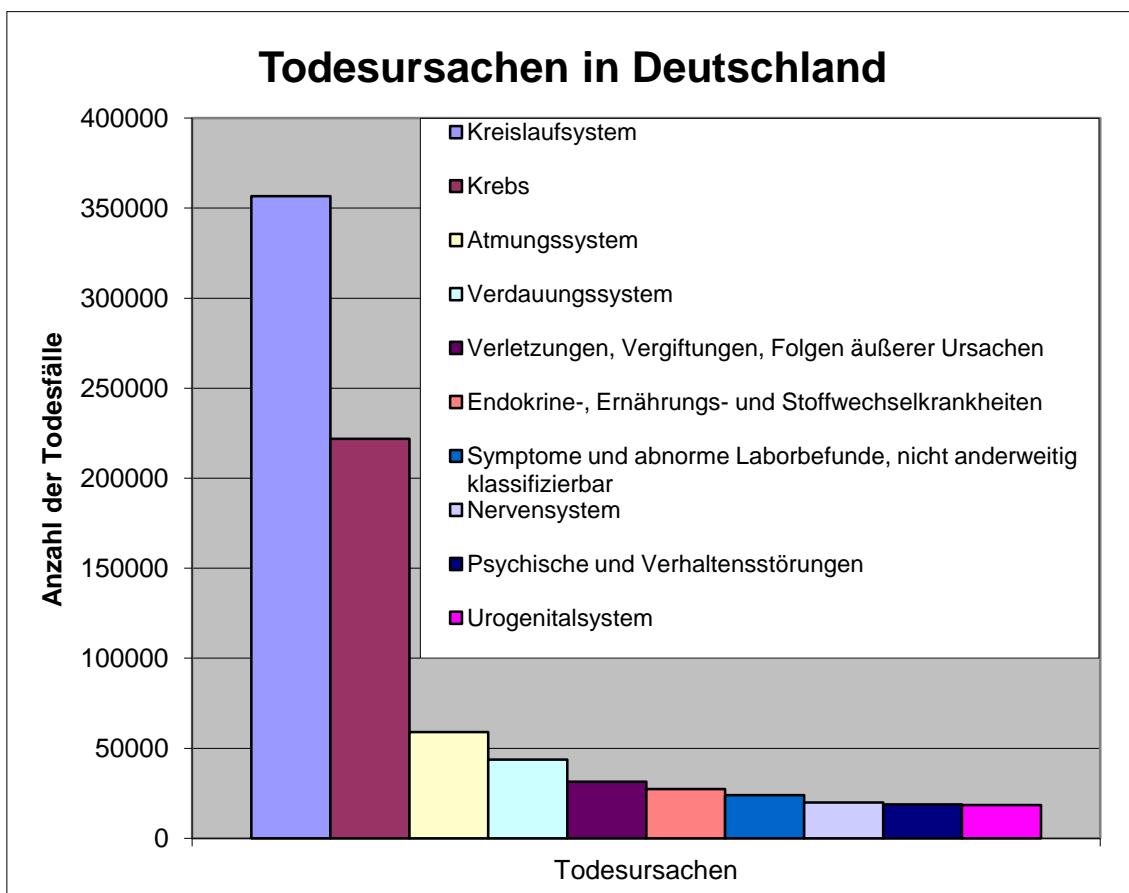


Abbildung 1: Überblick der Todesursachen in Deutschland  
Eigene Darstellung basierend auf Daten des Statistischen Bundesamts Deutschland.  
<http://www.destatis.de>

## 1. Einleitung

Maligne Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems, zu denen beispielsweise Leukämien oder Lymphome gehören, waren im Jahr 2007 für 7,3% aller krebserkrankten Todesfälle bei der Frau und 7,5% aller Krebstodesfälle beim Mann verantwortlich ( vgl. Abbildung 2 )

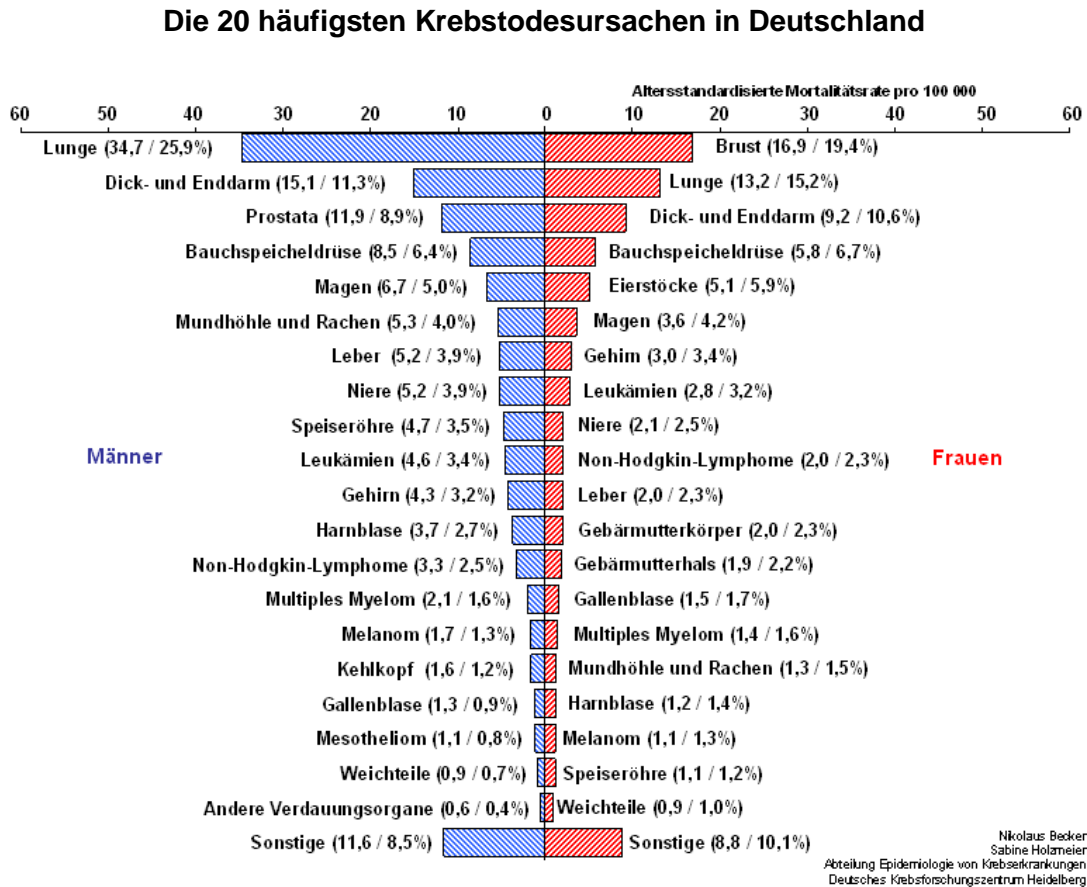


Abbildung 2: Krebsmortalität nach Organen

<http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html>

### 1.1 Generelle Therapieoptionen bei malignen Tumoren

Im Rahmen von Krebserkrankungen unterscheidet man im Wesentlichen fünf Therapiekonzepte:

- Operation
- Strahlentherapie
- Chemotherapie
- Molekulare Therapie
- Immuntherapie

Während bei soliden Tumorerkrankungen wie z.B. des Magen-Darm-Traktes oder des Nasen-Rachen-Raumes oftmals eine Kombination, z.B. aus Operation und Chemotherapie oder aus Operation mit Nachbestrahlung angewandt wird, stehen bei hämatologischen und lymphatischen Krebserkrankungen chemotherapeutische Therapiekonzepte mit zytotoxischen Substanzen im Vordergrund. Dabei werden in der Regel keine einzelnen Substanzen verwendet, sondern meist eine Kombination aus verschiedenen Substanzklassen, um eine synergistische Wirksamkeit zu erzielen. Die Auswahl der Therapien für hämatologische Erkrankungen erfolgt in der Regel nach speziellen Schemata, deren Wirksamkeit in Studien überprüft wurde oder wird. Einen wichtigen Forschungsschwerpunkt stellt die Immuntherapie als neueste der genannten Methoden dar. Sie soll es dem Immunsystem, welches eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Bekämpfung maligner Erkrankungen spielt, ermöglichen, effizient gegen maligne neoplastische Zellen vorzugehen und diese zerstören (2).

Bei den verschiedenen Therapiekonzepten werden folgende Begriffe unterschieden (3):

- Eine **kurative Therapie** erfolgt mit der Zielsetzung, den Patienten vom Tumorleiden zu heilen.



- Bei der **palliativen Therapie** dagegen ist keine Heilung der Tumorerkrankung möglich. Hierbei sollen tumorbedingte Beschwerden gelindert werden (Verringerung der Tumormasse bei mechanisch bedingten Symptomen, Schmerztherapie, Ernährungstherapie), um so die Lebensqualität zu verbessern und die Lebenszeit zu verlängern.
- Bei einer **adjuvanten Therapie** erfolgt nach einer kurativen Lokalthherapie durch eine Operation eine zusätzliche systemische oder strahlentherapeutische Behandlung, um Rezidive oder Metastasen zu verhindern.
- Um vor einer kurativen Lokalthherapie die Tumormasse zu reduzieren und so die kurative Therapie überhaupt zu ermöglichen, werden **neoadjuvante Therapien** durchgeführt.

Vor der Therapie erfolgt zudem ein Ausgangsstaging, welches je nach zugrundeliegender Erkrankung verschiedene Untersuchungen, wie beispielsweise Konchenmarkspunktionen oder CT-Untersuchungen umfasst, um das Ansprechen der Therapie beurteilen zu können.

Zur Kontrolle des Therapieerfolgs während und nach der Therapie erfolgen immer wieder umfassende Staging - Untersuchungen des Patienten. Der Erfolg der Therapie wird dabei folgendermaßen definiert:

- Unter einer **kompletten Remission** versteht man ein Verschwinden aller Tumormanifestationen sowohl bei histologischen und laborchemischen als auch bei bildgebenden Nachweisverfahren.
- Bei der **partiellen Remission** erfolgte eine Tumorreduktion um mindestens 50%.
- Man spricht von **Progression**, wenn die Tumormasse um mehr als 25% zunimmt.
- Ein **Rezidiv** bezeichnet ein erneutes Tumorwachstum nach bereits stattgefundener Remission.

## **1.2 Die Blutstammzelltransplantation als Therapieoption bei malignen Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems**

Viele Erkrankungen aus dem hämatoonkologischen Formenkreis, wie beispielsweise Leukämien, Lymphome oder Myelodysplastische Syndrome (MDS), können nicht allein durch eine Chemotherapie geheilt werden, da sich als dosislimitierender Faktor die Hämatotoxizität der Chemotherapeutika, also die Toxizität auf das blutbildende Knochenmark, darstellt. Das Knochenmark kann durch die Therapie irreversibel geschädigt werden. Folgen dieser Schädigung sind z.B. eine Anämie durch ungenügende Bildung von Erythrozyten, erhöhtes Blutungsrisiko durch reduzierte Thrombozytenzahlen oder eine erhöhte Infektanfälligkeit durch eine Leukopenie. Um diese Dosislimitierung zu umgehen, kann nach einer Hochdosischemotherapie ein sogenannter Stammzellrescue, also eine Stammzelltransplantation, durchgeführt werden. Dabei werden hämatopoietische Stammzellen im Rahmen dieser Transplantation in den Organismus gebracht und übernehmen dort wieder die Aufgabe der Blutbildung. Man unterscheidet dabei zwischen der autologen Stammzelltransplantation, bei der die Stammzellen vom Patienten selbst stammen und vor der myeloablativen Therapie gesammelt werden, und der allogenen Transplantation, bei der die Stammzellen von einem Familien- oder Fremdspender stammen. Bei der autologen Transplantation steht dabei im Vordergrund, die Myelotoxizität als Nebenwirkung und Limitation der Chemotherapie durch den Stammzellrescue aufzuheben. Bei der allogenen Stammzelltransplantation kommt zusätzlich durch den Aufbau eines „Fremd“ – Immunsystems noch ein immuntherapeutischer Effekt hinzu.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation untersucht wurde, soll nachfolgend lediglich die allogene Stammzelltransplantation näher erläutert werden.

### 1.2.1 Die allogene Blutstammzelltransplantation

Die Hauptindikationen zur allogenen Stammzelltransplantation bilden Leukämien, lymphoproliferative Erkrankungen und einige nichtmaligne Erkrankungen (z.B. Aplastische Anämie). Die Anzahl der durchgeführten Transplantationen steigt in allen europäischen Ländern an und Hochrechnungen zur mittelfristigen Entwicklung der verschiedenen Krankheitsbilder, die eine Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation darstellen, prognostizieren einen weiteren Anstieg der Durchführung der allogenen Stammzelltransplantation (4). Weltweit wird jedes Jahr bereits bei ca. 18.000 Patienten eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt (5).

Zur Durchführung der allogenen Stammzelltransplantation werden sog. hämatopoietische Stammzellen benötigt. Diese Stammzellen gehören zu einer Zellfraktion im Knochenmark, die den Oberflächenmarker CD34 exprimieren, nicht aber den Marker CD38 oder andere bekannte myeloische oder lymphatische Marker. Sie besitzen also die Oberflächeneigenschaft „CD34+/CD38-“, und können nach intravenöser Gabe ins Knochenmark des Empfängers gelangen, sich dort festsetzen und die Hämatopoese regenerieren (6).

Zurzeit stehen drei Quellen für das Stammzelltransplantat zur Verfügung:

- Knochenmark
- periphere Blutstammzellen
- Nabelschnurblut

Das Nabelschnurblut wird aus der Nabelschnur Neugeborener entnommen, kryokonserviert und in Nabelschnurbanken gelagert. Diese Quelle wird heute hauptsächlich bei Kindern oder jungen Erwachsenen verwendet, die meisten Präparate verfügen über einen niedrigen Stammzellgehalt (7; 8).

Beim Knochenmark als Stammzellquelle wird dem Spender bei multiplen Punktionen aus dem hinteren Beckenkamm ca. 10-15ml/kg KG des Empfängers Knochenmark entnommen, um auf eine Zielmenge von  $2-3 \times 10^8$  nukleären Zellen pro kg KG zu kommen. Der Eingriff erfolgt stationär unter Narkose, welche zugleich das Hauptrisiko der Spende darstellt. Schwerere

Komplikationen wie Blutungen oder Infektionen werden nur äußerst selten beobachtet, es sind in der Regel keine Langzeitkomplikationen zu befürchten. Das so gewonnene Transplantat wird bis zu seinem Einsatz kryokonserviert gelagert oder frisch transplantiert (6; 9).

Um periphere Blutstammzellen sammeln zu können, wird dem Spender der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) zugeführt, welcher eine Anhebung der Konzentration von CD34+/CD38- Stammzellen im peripheren Blut um den Faktor 100 nach vier bis sechs Tagen bewirkt. Die Stammzellsammlung erfolgt anschließend mittels Leukapherese. Dieses Vorgehen erfolgt ambulant, mögliche Nebenwirkungen von G-CSF können Allgemeinsymptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Gelenkbeschwerden oder grippeähnliche Symptome sein (10; 11; 9).

Die Verwendung der einzelnen Stammzellquellen hat sich im Laufe der Zeit geändert: Während 1990 noch fast alle allogenen Transplantate aus dem Knochenmark stammten, werden heutzutage ca. 53% der Transplantate aus peripheren Blutstammzellen und nur noch 47% aus dem Knochenmark gewonnen (4).

Die am besten geeigneten Spender für eine allogene Stammzelltransplantation stellen Familienangehörige dar, bei denen alle getesteten humanen Leukozyten Antigene (HLA) mit dem Empfänger übereinstimmen, sog. HLA-identische Familienangehörige. Unter den humanen Leukozyten Antigenen versteht man eine Gruppe von in der Zellmembran verankerten Glykoproteinen, die den Körperzellen eine Art individuellen Fingerabdruck verleihen und so bei der Unterscheidung zwischen körpereigenen- und körperfremden Zellen von zentraler Bedeutung sind. Ihre Testung dient der Bestimmung der Histokompatibilität, denn je ähnlicher sich Spender und Empfänger in den HLA-Merkmalen sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion nach einer Transplantation. Als Standard werden dabei die Antigene HLA-A, B, C, DR/DQ getestet. Solche Familienspender finden sich weltweit in ca. 20 % der Fälle der allogenen Transplantationen. Für die restlichen 80 % stehen als Spender HLA – passende Fremdspender, partiell

passende Familien- oder Fremdspender, haplo-identische Familienspender oder Transplantate aus Nabelschnurblut zur Verfügung (6; 12; 13; 9). Der Ausbau weltweiter Dateien mit freiwillig registrierten Stammzellspendern und die Einrichtung von Nabelschnurblutbanken in Nordamerika und Europa haben dabei auch einem Großteil der Patienten ohne HLA-identische Familienspender zu einer Stammzelltransplantation verholfen (4).

Der allogenen Stammzelltransplantation wird beim Empfänger des Transplantats eine Hochdosischemotherapie oder eine Kombinationstherapie aus Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung vorgeschaltet, die sog. Konditionierung. Sie besitzt einerseits einen zytoreduktiven Effekt zur Beseitigung der vorhandenen Tumorzellen, andererseits verfolgt sie beim Empfänger das Ziel einer Immunsuppression, um dem Transplantat das Anwachsen zu ermöglichen und in gewissem Umfang eine Myeloablation, um überhaupt Platz für das Transplantat zu schaffen. Welche Kombination genau eingesetzt wird hängt von der Art der jeweiligen Erkrankung und dem Allgemeinzustand des Patienten ab (6).

### **1.2.1.1 Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation**

Wichtige Komplikationen stellen akute Nebenwirkungen auf Therapien und Medikamente dar. So kommt es z.B. nach Hochdosischemotherapie und Bestrahlung zu Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall oder strahleninduzierten Irritationen an Haut und Speicheldrüsen. Bei Cyclophosphamidgabe (zur Konditionierung vor Transplantation) tritt beispielsweise häufig eine Diarrhö oder Zystitis auf (6).

Von primärer Transplantatabstoßung spricht man, wenn die absolute Neutrophilenzahl von  $0,2-0,5 \times 10^9/l$  bis zum 42. Tag nach Transplantation nicht erreicht wird.

Um eine späte oder sekundäre Transplantatabstoßung handelt es sich, wenn nach bereits erfolgtem Engraftment ein späterer Abfall der Neutrophilenzahl  $< 0,5 \times 10^9/l$  für mindestens drei Tage stattfindet. (14; 15)

Wie bei allen Transplantationen stellt die Transplantatabstoßung, das sog. Graft failure, eine zwar eher seltene, aber dennoch bedeutende und schwerwiegende Komplikation dar. Normalerweise wird nach Konditionierung und allogener Transplantation zwischen dem 12. und 16. Tag nach Transplantation ein stabiles Engraftment, also ein stabiler Wert der neutrophilen Granulozyten  $> 1,0 \times 10^9/l$  erreicht.

Weitere wichtige Komplikationen stellen die Graft-versus-Host-Disease, kurz GvHD, und Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation dar.

### **1.2.1.2 Graft-versus-Host-Disease (GvHD)**

Die GvHD stellt eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation dar. Verantwortlich hierfür sind die T-Lymphozyten des Spenders im Transplantat. Bei einem gesunden Menschen würden die übertragenen T-Lymphozyten schnell aus dem Organismus eliminiert werden, der Transplantatempfänger befindet sich jedoch in einem immunsupprimierten Zustand, um eben dieses Transplantat nicht abzustößen. So können die Spender-T-Lymphozyten zu einer Zellschädigung, vor allem an Haut, Darm, Leber oder Lunge führen.

Man unterscheidet generell zwischen akuter, chronischer und overlap Form der GvHD (16). Die akute Form kann sich durch Exantheme, Diarrhö, Koliken oder Leberversagen äußern. In der chronischen Phase treten eher chronische fibrosierende Prozesse an der Dermis oder inneren Organen, wie z.B. Krankheitsbilder ähnlich der primär biliären Sklerose, Augen- und Mundtrockenheit oder eine obliterierende Bronchiolitis auf (17).

Die akute GvHD wird je nach Ausprägungsgrad und Anzahl der befallenen Organe durch die bereits 1974 von Glucksberg etablierte Einteilung in verschiedene Organstadien und schließlich einen Gesamtgrad der GvHD eingeteilt (18).

Das Risiko, eine GvHD zu entwickeln, hängt davon ab, wie gut Spender und Empfänger in ihren HLA-Merkmalen übereinstimmen. Je größer der Unterschied zwischen beiden ist, desto größer das Risiko zur Entwicklung einer GVHD und desto kleiner ist entsprechend die Gesamtüberlebensrate (10).

Um einer GvHD vorzubeugen, können die T-Lymphozyten aus dem Transplantat entfernt werden. Diese T-Zell-Depletion kann ex-vivo, in-vivo oder als eine Kombination aus beidem erfolgen. Bei einer ex-vivo Auftrennung werden mit magnetisch markierten Antikörpern beladene Zellen durch eine Trennsäule heraussortiert. So wird eine Reinheit des Transplantats von >95% erreicht. Zudem kann eine massive Immunsuppression des Empfängers z.B. durch polyklonale Thymozyten- oder Lymphozyten – Antikörper (ATG), Calcineurininhibitoren (Ciclosporin A), Mycophenolsäurederivate (Mycophenolat – Mofetil), mTOR – Inhibitoren (z.B. Sirolimus) oder Glucocorticoide erfolgen, womit zugleich auch die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung reduziert wird. Trotz all dieser Maßnahmen entwickelt ein Teil der Patienten eine so ausgeprägte GvHD, dass eine zusätzliche Therapie, meist in Form eines Corticosteroids, erforderlich ist (17).

### **1.2.1.3 Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation**

Patienten nach allogener Stammzelltransplantation sind durch den temporär entstandenen Immundefekt sehr anfällig für Neuinfektionen oder auch für die Reaktivierung bereits bestehender Infektionen. Atkinson et al. (19) zeigten, dass bei 87% aller Patienten nach allogener Transplantation mindestens eine Infektion direkt nach der Transplantation und bei 48% mindestens drei Infektionen im Zeitraum von zwei Jahren auftraten, ausgenommen waren bei

## 1. Einleitung

---

der Untersuchung Infektionen des oberen Respirationstraktes (20). Sowohl bakterielle als auch virale oder parasitäre Erkrankungen können potenziell tödliche Verläufe verursachen. Die Neigung zu solchen Infektionen wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, wie der Grunderkrankung, der ausgewählten Konditionierungstherapie oder der Übereinstimmung der Gewebemerkmale zwischen Spender und Empfänger (21; 22). Weitere wichtige Faktoren hierfür sind die Phase der Immunrestitution, in der sich der Patient jeweils befindet, sowie die jeweilig verwendete Kombination der verschiedenen Chemotherapeutika, die für die Konditionierung des Patienten genutzt wurde. Einen Überblick über den zeitlichen Verlauf verschiedener Infektionen (23) (24) gibt Abbildung 3.

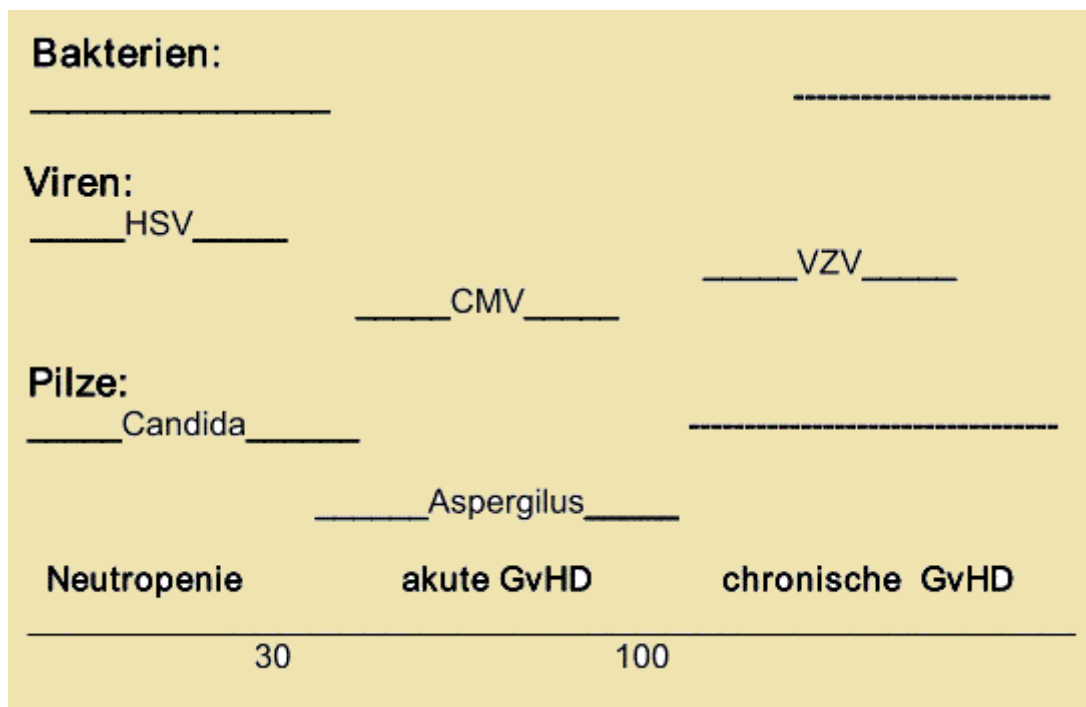


Abbildung 3: Infektiöse Komplikationen nach Transplantation, Zeitangabe in Tagen  
<http://niedersaechsische-gespraech.de/buecher/blutstammzellen.html>

Ein wichtiges Beispiel für eine virale Infektion nach allogener Stammzelltransplantation stellt die Infektion mit dem Cytomegalievirus (CMV) dar, welche trotz großer Fortschritte in Diagnostik und Therapie weiterhin für eine relevante Morbidität und Mortalität nach der Transplantation verantwortlich ist (25). Eine Reaktivierung von CMV tritt meist zwischen Tag 30 und 100 nach



Transplantation auf, teilweise auch später, wobei eine frühe CMV – Reaktivierung u.a. ein Risikofaktor für eine „late onset“ Reaktivierung darstellt. Es handelt sich dabei fast immer um eine Reaktivierung einer bereits bestehenden Infektion bei seropositiven Patienten, Neuerkrankungen sind sehr selten. Problematisch hierbei ist der hohe Durchseuchungsgrad durch CMV, nach dem 35. Lebensjahr liegt dieser in Deutschland zwischen 40 und 70% (26). Die Infektion manifestiert sich beispielsweise als interstitielle Pneumonie, durch Myelosuppression mit Thrombo- und Leukopenie oder als Gastroenteritis, wobei lebensbedrohliche Verläufe entstehen können. Als Therapie wird Ganciclovir, alternativ Cidofovir oder Foscarnir, für mindestens 14 Tage verabreicht. Um die Letalität durch die CMV-Infektion zu senken, erfolgt ein Monitoring der Patienten auf einen Nachweis der Virus-DNA mittels PCR, der dann in PCR – gesteuerten Therapiekonzepten mündet (27; 28; 23; 24).

### 1.3 Lymphozyten: B-, T- und NK-Zellen

Bei einer adäquaten Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation spielen die Lymphozyten, unter ihnen allen voran die T-Zellen als Vertreter der spezifischen Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Lymphozyten machen ca. 25 – 40% aller Leukozyten aus. Sie bestehen aus drei Hauptuntergruppen: den B-Zellen, die ca. 20% aller Lymphozyten ausmachen und deren Reifung im Knochenmark stattfindet, den T-Zellen, die ca. 70% der Lymphozyten ausmachen und im Thymus ausreifen und der kleineren Gruppe der Natürlichen Killerzellen (29).

Die B-Zellen dienen der spezifischen humoralen Immunabwehr, indem sie nach ihrer Aktivierung zu sog. Plasmazellen spezifische, gegen ein bestimmtes Antigen gerichtete Immunglobuline bilden. Zudem bilden sich bei einer Immunantwort Gedächtniszellen aus, die bei einem erneuten Eindringen des Antigens in den Organismus zu einer schnelleren und damit effektiveren Immunantwort gegen das Antigen führen. Die B-Zellen können anhand ihres Oberflächenmarkers CD19 detektiert werden (30).

Die T-Zellen dagegen dienen der zellvermittelten spezifischen Immunabwehr. Unter ihnen werden zwei Hauptgruppen anhand ihrer unterschiedlichen Oberflächenmarker unterschieden: CD4 positive und CD8 positive T-Zellen. Aus „naiven“ CD8 positiven T-Zellen entstehen nach Antigenkontakt zytotoxische T-Zellen, die das zu ihrer Aktivierung zugehörige Antigen auf infizierten Körperzellen, Tumorzellen oder Zellen transplantiert Organe erkennen und anschließend diese Zellen eliminieren (30). Aus „naiven“ CD4 positiven T-Zellen können sich nach Antigenkontakt zwei Untergruppen von sog. T-Helferzellen differenzieren: inflammatorische Typ 1 T-Helferzellen ( $T_{H1}$ ), die mittels Produktion von IFN $\gamma$  Makrophagen aktivieren können, oder Typ 2 T-Helferzellen ( $T_{H2}$ ), die für die Aktivierung der B-Zellen nötig sind (30). Um jedoch eine überschießende inflammatorische Reaktion des Immunsystems auf fremde Antigene zu verhindern, wie sie beispielsweise nach der allogenen Stammzelltransplantation im Rahmen einer GvHD häufig auftritt, ist eine weitere Untergruppe der T-Zellen von zentraler Bedeutung. Denn CD4 $^{+}$ /CD25 $^{high}$  regulatorische T-Zellen, sog. Tregs, haben die Aufgabe, autoreaktive T-Zellen zu unterdrücken und so eben diese übermäßige Immunantwort zu verhindern (31; 32).

Die Natürlichen Killerzellen als letzte Lymphozytenuntergruppe sind auf die direkte unspezifische Abwehr vor allem von Viren und Tumorzellen spezialisiert. Sie erkennen diese Zellen an ihrer körperfremden Oberfläche und führen zur Zerstörung der Zellen. Das Erkennen der körperfremden Zellen erfolgt über ein Fehlen der körpereigenen, bekannten MHC – Moleküle, zudem erkennen die Natürlichen Killerzellen körperfremde Zellen mit Hilfe ihres KIR – Rezeptors (killer cell immunoglobulin-like receptor), der nicht an diese fremden Zellen binden kann.

### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Der Wiederaufbau des neu erworbenen Immunsystems im Empfänger nach der Transplantation, die sog. Immunrekonstitution, imponiert als ein äußerst komplexes und störanfälliges Geschehen nach einer Stammzelltransplantation, das bis jetzt noch nicht in seiner Ganzheit verstanden wurde.

In der Literatur werden meist kleine Teile des ganzen Zusammenspiels genauer betrachtet.

Bei der Untersuchung der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation wurden in verschiedenen Arbeiten die Erholung einzelner Lymphozyten- und insbesondere auch der T-Zell-Populationen betrachtet. In den ersten vier Wochen nach Transplantation dominieren dabei die Natürlichen Killerzellen, kurz NK-Zellen. Die T-Zellen beginnen nach fünf bis sechs Wochen zu regenerieren, wobei sich CD4+ Zellen deutlich langsamer als CD8+ Zellen regenerierten. Die B-Zellen stellen die sich am langsamsten erholende Zellpopulation mit der Folge einer eingeschränkten Antikörperproduktion während dieser Zeit dar (33; 34; 35).

Bei der genaueren Charakterisierung der verschiedenen Untergruppen der Gedächtnis-T-Zellen, also der für das immunologische Gedächtnis verantwortlichen T-Zellen, liegen zwei unterschiedliche Typen vor: Effector memory T-Zellen (TEM) repräsentieren einen sofort nach stattgehabter Infektion verfügbaren Pool funktioneller Zellen, die in peripheren Geweben inflammatorische Reaktionen initiieren können. Central memory T-Zellen (TCM) dagegen sind eine Gruppe klonal expandierter Zellen, die zu sekundären Lymphorganen wandern und bei der zweiten Antigenstimulation mit dendritischen Zellen interagieren, B-Zellen helfen oder neue effector memory T-Zellen generieren können (36). Rezvani et al. definieren die TCM als CD45RO+CD27+CD57- und die TEM als CD45RO-CD27-CD57+ (37). Dagegen werden bei Sallusto et al. drei Gruppen unterschieden, wobei die TCM als CD45RA-CCR7+, die TEM CD45RA-CCR7- und naive T-Zellen als CD45RA+CCR7+ definiert werden. CCR7 dient bei den Definitionen als Homing

Rezeptor, CD45RO/RA dienen dem differentiellen Splicing und agieren als Aktivierungsmoleküle im T- oder B – Zell – Rezeptorsignalweg.

Über eine weitere wichtige Zellgruppe beim Wiederaufbau des Immunsystems, den CD4+/CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen, sog. Tregs, liegen viele verschiedene Erkenntnisse vor. Diese Zellen haben die Aufgabe autoreaktive T-Zellen zu unterdrücken und eine überschießende inflammatorische Reaktion des Immunsystems auf Antigene zu verhindern (31; 32). Bezüglich der Korrelation zwischen GvHD und Tregs existieren divergierende Daten: Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass eine höhere Anzahl von Tregs mit der Entwicklung einer chronischen GvHD einherging (38), auf der anderen Seite zeigte sich dagegen eine deutlich geringere Anzahl an Tregs bei Patienten mit chronischer GvHD (39). Eine signifikant niedrigere Expression von Fox-p3, einem als Hauptregulator für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen dienender Transkriptionsfaktor (40), wurde bei Miura et al. für Patienten mit GvHD nach Stammzelltransplantation dargestellt (41), in Untersuchungen der Arbeitsgruppe um M. Edinger spielen Tregs eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung einer GvHD (42). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, inwiefern die Rekonstitution von Tregs im untersuchten Patientenkollektiv mit der Entwicklung oder dem Fehlen einer GvHD einhergeht.

Des Weiteren ist es interessant zu untersuchen, ob sich nach allogener Stammzelltransplantation nach 120 Tagen spezifische T-Zellen gegen ausgewählte Virus- und Tumorpeptide nachweisen lassen, da diese beispielsweise bei der Reaktivierung von verschiedenen Erregern, wie z.B. CMV eine wichtige Rolle spielen. Die Auswahl der einzelnen Peptid – Antigene erfolgte anhand ihres HLA – Typs, ihres CMV – Status und der möglichen Überexpression und Mutation von einzelnen Genen und Antigenen bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen. MUC1, ein epitheliales Tumorantigen, wird bei vielen hämatologischen Erkrankungen wie beispielsweise dem Multiplen Myelom (MM) oder auch der Akuten myeloischen Leukämie (AML) überexprimiert (43). Ebenfalls eine wichtige Rolle beim MM spielt das HM1.24 Antigen. Es wird dort überexprimiert und dient in einigen

Studien als Zielmolekül für die Immuntherapie (44). Bei akuten Leukämien findet sich eine Expression des Wilms Tumor Proteins WT1 (45), Proteinase 3 wird als ein mit Leukämien assoziiertes Antigen in Impfstudien zu myeloischen Erkrankungen evaluiert (46). In Anlehnung an diese Überlegungen wurden Patienten mit MM oder Plasmazellleukämie auf MUC1 und HM1.24, Patienten mit myeloischen Erkrankungen auf MUC1, Proteinase 3 und auf WT1 getestet. Zusätzlich erfolgte die Testung auf CMV-spezifische T-Zellen, sobald entweder Spender oder Empfänger einen positiven CMV – Status aufwiesen.

In Anlehnung an diese Literaturergebnisse und auch darüber hinaus wurden in der hier vorgelegten Arbeit 27 Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation an jeweils vier festgelegten Zeitpunkten (Tag 30, 60, 90 und 120 nach Transplantation) auf die Regeneration verschiedener Zellpopulationen und hier insbesondere auf die Rekonstitution spezifischer T-Zellen und eine mögliche Korrelation zum klinischen Verlauf hin untersucht. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Können bei der Immunrekonstitution typische Verlaufsmuster in der Regeneration untersuchter Zellpopulationen beobachtet werden und gibt es Unterschiede bezüglich der Expression von Markern und ihrer Verteilung in der Untersuchungsgruppe zu den Populationen von gesunden Spendern?

Es wurden hierbei vor allem die fünf wichtigsten Zellpopulationen der Lymphozyten mit ihren jeweils spezifischen Markern untersucht: CD3 als Pan - T-Zell-Marker, CD16/CD56 als Marker für Natürliche Killerzellen, CD19 als allgemeiner B-Zell-Marker, CD4 als Marker für T-Helfer-Zellen und CD8 als Marker für zytotoxische T-Zellen.

2. Stimmen die beiden gängigen Klassifikationen von Central und Effector memory T-Zellen nach Sallusto und Rezvani beim vorliegenden Patientenkollektiv und bei gesunden Spendern überein oder gibt es Unterschiede?

Rezvani et al. definieren die Central memory T-Zellen als CD45RO+CD27+CD57- und die Effector memory T-Zellen als CD45RO-CD27-CD57+. (37) Sallusto et al. unterscheiden drei Gruppen, wobei die Central memory T-Zellen als CD45RA-CCR7+, die Effector memory T-Zellen als CD45RA-CCR7- und naive T-Zellen als CD45RA+CCR7+ definiert werden. (36)

3. Zeigt sich innerhalb der ersten 120 Tage nach allogener Stammzelltransplantation im Rahmen der Antigen-spezifischen Immunrekonstitution bei den Patienten eine positive Antwort im IFNgamma ICS auf CMV – Peptide oder Peptide aus Tumorantigenen (MUC1, HM1.24, Proteinase 3, WT1)?
4. Lässt sich bei der Rekonstitution der Tregs ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der vorhandenen Fox-p3 positiven regulatorischen T-Zellen oder deren Verlauf nach Transplantation und der Entwicklung einer GvHD und Infektionen bei den Patienten erkennen?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und Spenderkollektiv**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden alle gesunden Spender, alle Stammzellspender und alle Patienten pseudonymisiert.

#### Gesunde Spender

Alle 10 untersuchten gesunden Spender werden in der vorgelegten Arbeit aus datenschutzrechtlichen Gründen stets als „Zapfenspender 1 bis 10“ bezeichnet.

#### Patienten

Ebenfalls aus datenschutzrechtlichen Gründen werden je 27 Patienten, die für diese Arbeit untersucht wurden, im Folgenden immer als „Patient X“ bezeichnet, wobei jedem Patienten in nachfolgender Tabelle eine entsprechende Nummer zugeordnet wurde.

## 2. Material und Methoden

| Nr. | Erkrankung           | CMV-Status<br>Spender/Empfänger | Analysezeitpunkte |
|-----|----------------------|---------------------------------|-------------------|
| 1   | AML                  | pos./pos.                       | d30, 55, 92, 125  |
| 2   | ALL                  | pos./pos.                       | d24, 56, 110, 134 |
| 3   | Mantelzelllymphom    | pos./pos.                       | d29, 99, 118, 141 |
| 4   | ALL                  | neg./neg.                       | d27, 80, 115, 173 |
| 5   | ALL                  | neg./neg.                       | d30, 70, 107, 133 |
| 6   | Follikuläres Lymphom | pos./neg.                       | d30, 68, 95, 124  |
| 7   | AML                  | pos./pos.                       | d39, 63, 88, 123  |
| 8   | MM                   | pos./pos.                       | d35, 60, 85, 124  |
| 9   | OMF                  | neg./neg.                       | d32, 56, 84, 117  |
| 10  | OMF                  | pos./pos.                       | d30, 58, 85, 120  |
| 11  | CLL                  | neg./neg.                       | d29, 54, 97, 114  |
| 12  | CLL                  | pos./neg.                       | d34, 55, 121, 157 |
| 13  | sek. AML             | neg./pos.                       | d33, 64, 91, 138  |
| 14  | ALL                  | neg./neg.                       | d39, 62, 90, 124  |
| 15  | MM                   | neg./neg.                       | d29, 67, 95, 123  |
| 16  | ALL                  | pos./pos.                       | d28, 65, 93, 120  |
| 17  | OMF                  | pos./neg.                       | d35, 59, 87, 123  |
| 18  | AML                  | pos./pos.                       | d36, 55, 76, 118  |
| 19  | AML                  | neg./neg.                       | d41, 55, 97, 125  |
| 20  | VSAA                 | neg./pos.                       | d31, 68, 96, 110  |
| 21  | AML                  | neg./pos.                       | d35, 62, 84, 120  |
| 22  | CLL                  | pos./neg.                       | d33, 61, 89, 148  |
| 23  | CLL                  | pos./neg.                       | d24, 60, 85, 119  |
| 24  | T-LBL                | pos./neg.                       | d25, 63, 91, 113  |
| 25  | MM                   | pos./pos.                       | d27, 55, 83, 111  |
| 26  | MDS                  | neg./neg.                       | d42, 50, 83, 116  |
| 27  | MDS                  | neg./neg.                       | d289, 71, 82, 124 |

**Tabelle 1: Patientendaten**

|      |                                  |       |   |
|------|----------------------------------|-------|---|
| AML  | Akute myeloische Leukämie        | T-LBL | T-lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom |
| ALL  | Akute lymphatische Leukämie      | MDS   | Myelodysplastisches Syndrom             |
| MM   | Multiples Myelom                 |       |   |
| OMF  | Osteomyelofibrose                |       |   |
| CLL  | Chronische lymphatische Leukämie |       |   |
| VSAA | Very Severe Aplastic Anemia      |       |   |

### 2.2 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Brutschrank (Heraeus BBD 6220)

Kendro Laboratory Products,  
Langenselbold

Cryo - und Lagerbox

Laborhaus Scheller, Euerbach

Durchflusszytometer: FACS Calibur

BD Biosciences, Heidelberg

- CellQuest-Pro

BD Biosciences, Heidelberg

- Computer: Macintosh, OS X

Apple Computer, USA



## 2. Material und Methoden

---

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Einfrierröhrchen (1,5ml)          | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen      |
| FACS-Röhrchen (5ml)               | BD Falcon, Heidelberg                       |
| Falcon Röhrchen (15ml, 50ml)      | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen      |
| Kühlschränke:                     |   |
| • -80°C                           | Thermo Scientific, Karlsruhe                |
| • -20°C / +4°C                    | Liebherr, Ochsenhausen                      |
| Mikroskop:                        |   |
| • DM 1000                         | Leica, Wetzlar                              |
| Neubauer-Zählkammer               | Assistent, Sondheim                         |
| Pipetten:                         |   |
| • 10, 100, 1000µl                 | Eppendorf, Hamburg                          |
| • 5, 10, 25ml                     | Corning Inc., USA                           |
| Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl) | Sarstedt, Nümbrecht                         |
| Pipettierhilfe Pipetboy acu       | Integra Biosciences, Fernwald               |
| Sterilbank HERAsafe KS            | Kendro Laboratory Products,<br>Langensebold |
| Stickstofftank CryoCon AFT-L      | Taylor-Wharton, USA                         |
| Vortex Genie 2                    | Scientific Industries, USA                  |
| Wasserbad:                        |   |
| • 37°C                            | Memmert, Schwabach                          |
| Zellkulturplatte:                 |   |
| • Microtest (96 Well)             | BD Falcon, Heidelberg                       |
| Zentrifugen:                      |   |
| • Heraeus Multifuge 3-S-R         | Thermo Scientific, Karlsruhe                |
| • Rotanta 46 RC                   | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen             |

### 2.3 Reagenzien

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Aqua ad iniectabilia          | B. Braun Melsungen AG,<br>Melsungen            |
| Biocoll Separating Solution   | Biochrom AG, Berlin                            |
| BSA (Bovine Serum Albumin)    | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                |
| Brefeldin A                   | Invitrogen, Karlsruhe                          |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,5% | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                |
| Dulbecco`s PBS                | PAA Laboratories GmbH,<br>Pasching, Österreich |
| Ethanol 70%                   | Apotheke des Universitätsklinikum              |

#### FACS – Antikörper

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| • Isotyp - IgG <sub>1κ</sub> / IgG <sub>2aκ</sub> (FITC) | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Isotyp - IgG <sub>1κ</sub> (PE)                        | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Isotyp - IgG <sub>1κ</sub> (PerCp)                     | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Isotyp - IgG <sub>1κ</sub> (PeCy7)                     | Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M. |
| • Isotyp - IgG <sub>1κ</sub> / IgG <sub>2aκ</sub> (APC)  | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD3 (FITC) IgG <sub>1κ</sub>                    | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD3 (PE) IgG <sub>1κ</sub>                      | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD3 (PerCp) IgG <sub>1κ</sub>                   | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD4 (PE) IgG <sub>1κ</sub>                      | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD6 (PE) IgG <sub>1κ</sub>                      | Biolegend, USA                        |
| • Anti – CD8 (PerCp) IgG <sub>1κ</sub>                   | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD8 (APC) IgG <sub>1κ</sub>                     | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD16 (FITC) IgG <sub>1κ</sub>                   | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD19 (APC) IgG <sub>1κ</sub>                    | BD Biosciences, Heidelberg            |
| • Anti – CD25 (PeCy7) IgG <sub>1κ</sub>                  | Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M. |
| • Anti – CD27 (PeCy7) IgG <sub>1κ</sub>                  | Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M. |
| • Anti – CD28 (APC) IgG <sub>1κ</sub>                    | Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M. |

## 2. Material und Methoden

---

|  |   |
|--|---|
| • Anti – CD45 RA (FITC) IgG <sub>1κ</sub>  | BD Biosciences, Heidelberg  |
| • Anti – CD45 RO (FITC) IgG <sub>2aκ</sub> | Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M.   |
| • Anti – CD45 RO (PE) IgG <sub>2aκ</sub>   | BD Biosciences, Heidelberg  |
| • Anti – CD56 (APC) IgG <sub>1κ</sub>      | Biolegend, USA  |
| • Anti – CD57 (FITC) IgM <sub>1κ</sub>     | BD Biosciences, Heidelberg  |
| • Anti – CD62 L (APC) IgG <sub>1κ</sub>    | Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M.   |
| • Anti – CD69 (APC) IgG <sub>1κ</sub>      | BD Biosciences, Heidelberg  |
| • Anti – CD161 (APC) IgG <sub>1κ</sub>     | BD Biosciences, Heidelberg  |
| • Anti – CCR7 (APC) IgG <sub>2aκ</sub>     | R & D, Wiesbaden  |
| • Anti – IFNγ (PE) IgG <sub>1</sub>        | Beckmann Coulter, Krefeld   |
| • Anti – iNKT (FITC) IgG <sub>1κ</sub>     | BD Biosciences, Heidelberg  |
| • Anti – IL-15R (FITC) IgG <sub>2b</sub>   | Beckmann Coulter, Krefeld   |
| • Anti – Vα24 (PE) IgG <sub>1κ</sub>       | Beckmann Coulter, Krefeld   |
| • Anti – Vβ11 (FITC) IgG <sub>2a</sub>     | Beckmann Coulter, Krefeld   |
| <br>                                       |   |
| FACS Clean                                 | BD Biosciences, Heidelberg  |
| FACS Flow                                  | BD Biosciences, Heidelberg  |
| FACS Permeabilisation Solution 2 (10x)     | BD Biosciences, Heidelberg  |
| FACS Rinse                                 | BD Biosciences, Heidelberg  |
| FCS (Fetales Kälberserum)                  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim   |
| Formaldehyd 4%, neutral gepuffert          | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim   |
| Gentamicin 50mg/ml                         | GIBCO, UK   |
| Ionomycin                                  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim   |
| Kiovig (humanes IgG)                       | Baxter AG, Wien, Österreich   |
| <br>                                       |   |
| Peptide (in Klammern die interne Nr.)      | Herr Prof. Dr. Stefan Stevanović<br>Interfakultäres Institut für<br>Zellbiologie<br>Abteilung Immunologie<br>Universität Tübingen |

### HLA A\*0101

- |                |             |
|----------------|-------------|
| • MUC1 (50588) | SLEDPSTDY   |
| • MUC1 (50589) | ISEMFLQIY   |
| • MUC1 (50591) | DVETQFNQY   |
| • MUC1 (50592) | SLETPSTDYY  |
| • MUC1 (50596) | QLDIFPARDTY |
| • WT1 (40107)  | TSEKRPFMCAY |

### HLA A\*0201

- |                         |           |
|-------------------------|-----------|
| • CMV pp_65 (3360/1764) | NLVPMVATV |
| • MUC1 (51005/2128)     | STAPPVHNV |
| • WT1 (3181/0208)       | RMFPNAPYL |
| • Proteinase 3 (0322)   | VLQELNVTV |
| • HM1.24 (40134)        | LLIIVILGV |
| • HM1.24 (40135)        | KLLLGIGIL |
| • HM1.24 (40136)        | LLGIGILVL |
| • HM1.24 (40137)        | VLLGLSALL |
| • HM1.24 (40138)        | QLLIVLLGL |
| • HM1.24 (40140)        | KLQDASAEV |

### HLA A\*0301

- |            |             |
|------------|-------------|
| • CMVpp_65 | TTVYPPSSTAK |
|------------|-------------|

### HLA A\*68

- |               |             |
|---------------|-------------|
| • CMVpp_65    | FVFPTKDVALR |
| • WT1 (40042) | CTGSQAALLLR |
| • WT1 (40084) | FTGTAGACR   |

### HLA B\*0702

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| • CMVpp_65 (3066)      | TPRVTGGGAM  |
| • MUC1 (40001)         | RPGSVVVQL   |
| • MUC1 (40003)         | TPGTQSPFFL  |
| • MUC1 (40005)         | SPFFLLLLL   |
| • MUC1 (40009)         | VPGWGIALL   |
| • MUC1 (40010)         | DPSTDYYQEL  |
| • MUC1 (40011)         | APPAHGV TSA |
| • MUC1 (40017)         | APGSTAPPA   |
| • WT1 (40043)          | TPSHHAAQF   |
| • Proteinase 3 (40127) | SPALASVLL   |
| • Proteinase 3 (40145) | PPSPALASVL  |
| • Proteinase 3 (40148) | IPQRLVNVVL  |
| • Proteinase 3 (40149) | QPVPHGTQCL  |

### HLA B\*4402

|                     |            |
|---------------------|------------|
| • MUC1 (50628/2132) | TEAASRYNGL |
| • MUC1 (2134)       | LEDPSTDYY  |

Peptid (in Klammer die interne Nr.)

Don Diamond

City of Hope, Duoster, USA

### HLA A\*0201

|                      |            |
|----------------------|------------|
| • Proteinase 3 (PR2) | RLFPDFFTRV |
|----------------------|------------|

PMA

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

RPMI 1640 + GlutaMAX™

GIBCO, UK

Tetramere (PE konjugiert)

- Negativ Tetramer
- HLA A\*0201 CMV  
(NLVPMVATV)

Beckmann Coulter, Krefeld

Beckmann Coulter, Krefeld

## 2. Material und Methoden

---

- HLA B\*0702 CMV (TPRVTGGGAM) Beckmann Coulter, Krefeld

Trypanblau 0,4% GIBCO, UK

### 2.4 Verwendete Kits

APC Anti-Human Foxp3 Staining Set Natutec: eBioscience, Frankfurt a. M.

Fixation/Permeabilization Concentrate 30ml

Fixation/Permeabilization Diluent 100ml

10x Permeabilization Buffer 100ml

Normal Mouse Serum 0,5ml

Anti-human Fox-p3 (APC) IgG<sub>1</sub> 2ml

### 2.5 Stammlösungen

**Brefeldin A** wurde als Stammlösung von 5 mg/ml in Ethanol angesetzt und bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde es im Verhältnis 1:10 mit RPMI/10% FCS verdünnt und letztlich in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

**Ionomycin** wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in DMSO angesetzt und bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde es im Verhältnis 1:10 mit RPMI/10% FCS verdünnt und letztlich in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

**PMA** wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in DMSO angesetzt und bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde es im Verhältnis 1:20 mit RPMI/10% FCS verdünnt und letztlich in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt.

**FCS** wurde 1 Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren und gelagert.

**RPMI/10% FCS** wurde routinemäßig zur Kontaminationsprophylaxe mit 0,1µl pro ml Medium des Aminoglykosid – Antibiotikums Gentamicin (50 mg/ml) versetzt.

Die **Peptide** wurden als Lyophilisate vom Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, Universität Tübingen (Prof. Dr. Stefan Stevanović) bezogen, wo sie als Laborsynthesen nach Standard-Fmoc-Chemie mit anschließender Charakterisierung durch HPLC und Massenspektroskopie synthetisiert wurden. Die lyophilisierten Peptide wurden in DMSO zu einer Lösung von 10 mg/ml aufgenommen und mit Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C eingefroren und nach einmaligem Auftauen bei 4°C aufbewahrt (47).

### 2.6 Isolierung von PBMNC

Für alle hier beschriebenen Versuche wurden sog. PBMNC, humane „**P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells“ verwendet. Diese sind definiert als einkernige Blutzellen, die einen runden Zellkern besitzen, und bestehen hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten. PBMNC können aus Blut mittels einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Bei den gesungen Spendern wurde zur PBMNC-Isolierung der Inhalt einer sog. LRSC („leukoreduction system chamber“) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine kleine zapfenförmige Kammer für Leukozyten und Erythrozyten, die darin bei der Thrombozytenspende aufgefangen werden (48). Die gesunden Spender werden deshalb im weiteren Verlauf als sog. Zapfen-Spender bezeichnet. Zur Isolierung bei den Patienten wurde jeweils 50 ml EDTA Blut vom

Stammzellspender und dem jeweiligen Patienten zu den verschiedenen Analysezeitpunkten verwendet.

Das Blut wird hierbei während der Zentrifugation durch die Ficoll Trennlösung, ein synthetisch hergestelltes verzweigtes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin, in verschiedene Schichten aufgetrennt. Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten (z.B. Granulozyten) sind dichter als Lymphozyten und Monozyten und wandern so zum Boden des Gefäßes durch. Die mononukleären Zellen sammeln sich als „Interphase“ zwischen dem oben stehenden Serum und dem sedimentierten Zellen an.

### Durchführung:

In 50 ml Falcon – Röhren wurden jeweils 15 ml Ficoll Separating Solution vorgelegt. Darüber wurde das 1:1 mit Dulbecco's PBS verdünnte Blut geschichtet und anschließend 20 Minuten bei 1800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde daraufhin abpipettiert und die Interphase (PBMNC) abgenommen, in ein frisches Falcon – Röhren überführt, mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und die Zellen danach gezählt.

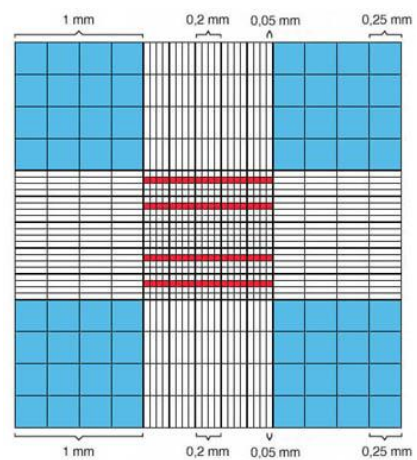


### 2.7 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer – Zählkammer

Die Zellmembran intakter Zellen ist für den Farbstoff Trypanblau undurchlässig, so dass dieser nur tote Zellen blau anfärbt. Zur Zellzahlbestimmung wird Trypanblau 1:5 mit PBS verdünnt. 90 µl dieses Gemischs werden mit 10 µl der zu zählenden Zellsuspension in einer 96 Well Rundbodenplatte vermennt und anschließend in einer Neubauer – Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

Unter einer Neubauer – Zählkammer versteht man einen Objektträger, auf dem zwei 3 x 3 mm große Zählgitter eingraviert wurden. Jedes dieser Zählgitter besteht aus neun 1 x 1 mm großen Quadraten, welche jeweils wiederum aus 16 Kleinquadraten bestehen.

Zur Bestimmung der PBMNC – Zellzahl werden die vier Eckquadrate, in Abbildung 4 blau schattiert, ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Neubauer - Zählkammer**

Liegt das Deckglas plan auf der Kammer auf, besteht ein Abstand von 0,1 mm zwischen Glas und Zählgitter, was der Kammertiefe entspricht. Das Volumen über einem der neun Quadrate beträgt also  $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 0,1 \text{ }\mu\text{l}$ . Die Zellzahl in einem Quadrat entspricht also der Zellzahl in  $0,1 \text{ }\mu\text{l}$  der zu zählenden Zellsuspension. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, müssen alle weiteren Verdünnungsfaktoren, z.B. 1:10 mit Trypanblau, zusätzlich mit eingerechnet werden.

### 2.8 Einfrieren von Zellen

Die Zellsuspension wurde hierzu 10 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur pelletiert und anschließend in eiskaltem FCS, das die Hälfte des Einfriervolumens darstellt, aufgenommen und gut resuspendiert. Nun wurde dasselbe Volumen RPMI/20% DMSO zugegeben, gut durchmischt und sofort auf die Einfrierröhrchen (1,5 ml) verteilt. Bei allen Arbeitsschritten wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt. Die Einfrierröhrchen wurden anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden eingefroren und danach in den Stickstofftank bei ca.  $-170^{\circ}\text{C}$  überführt. Pro Röhrchen wurden  $1 \times 10^7$  bis maximal  $5 \times 10^7$  PBMNC eingefroren.

### 2.9 Auftauen von Zellen

Beim Auftauen von Zellen muss vor der Weiterverarbeitung das für die Zellen bei Raumtemperatur schädliche DMSO ausgewaschen werden.

Dazu wurden in einem 50 ml Falcon – Röhrchen 15 ml RPMI / 10 % FCS vorgelegt und im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt. Anschließend wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  so lange angetaut, bis sich der Eisblock vom Gefäßboden abgelöst hatte. Das Zellmaterial wurde dann sofort in das vorgewärmte RPMI / 10 % FCS überführt und 10 Minuten bei  $20^{\circ}\text{C}$  und 1500 rpm abzentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet mit 10 ml RPMI / 10 % FCS resuspendiert. Ca.  $10 \mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer – Zählkammer entnommen und die Suspension anschließend nochmals 10 Minuten bei  $20^{\circ}\text{C}$  und 1500 rpm zentrifugiert. Danach wurde das entstandene Zellpellet entsprechend der darauf folgenden Arbeitsschritte in Medium oder Puffer resuspendiert und weiterverarbeitet.

### 2.10 Durchflusszytometrische Methoden

Die Durchflusszytometrie beruht auf dem Prinzip der Emission von optischen Signalen einer Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert.

Beim Durchflusszytometer werden die Zellen durch eine Kapillare angesaugt und einzeln durch einen Laserstrahl geleitet. Die dabei entstehende Streuung des Laserlichts wird mit Detektoren, sogenannten Photomultipliern, gemessen.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist abhängig von der Zellgröße, das seitliche Streulicht (SSC = Sideward Scatter) wird im 90° - Winkel dazu gemessen und ist abhängig von der Granularität bzw. dem Kern – Plasma – Verhältnis der Zellen. Man kann so große Zellen mit hoher Kern – Plasma – Relation und granuliertem Zytoplasma (Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (Lymphozyten) oder Zellen mit einem intermediären Verhalten (Monozyten) unterscheiden.

In den so eingrenzbaren Zellfraktionen kann als zusätzlicher Parameter die Fluoreszenz bestimmt werden. Es können zugleich mehrere Antikörper, die gegen unterschiedliche Oberflächenantigene gerichtet und an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, PE, PerCp, PECy7 oder APC) gekoppelt sind, verwendet werden. Durch das Laserlicht werden die verschiedenen Farbstoffe angeregt und zeigen unterschiedliche Emissionsgipfel.

Die Messungen wurden gemäß den Bedienungsanleitungen der verwendeten Hard- und Software durchgeführt (FACS Calibur Durchflusszytometer, BD Biosciences). Da es sich bei allen Färbungen um Mehrfachfärbungen handelte, waren zu Beginn stets Kompensationseinstellungen an Kontrollproben nötig.

Die Auswertungen der Messungen erfolgte mittels CellQuestPro – Software von BD Biosciences.

### 2.10.1 Immunsotypisierung von PBMC mittels FACS - Analyse

Alle Spender- und Patientenproben wurden auf die Zusammensetzung ihrer Lymphozyten – und T-Zell-Populationen hin untersucht. Zur Analyse solcher Zellpopulationen können die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff – gekoppelten Antikörpern, die jeweils spezifisch gegen ein bestimmtes, für die Zellpopulation interessantes Oberflächenmolekül der Zelle gerichtet sind, verwendet werden. So werden die Populationen mittels der Expression bestimmter Proteine auf ihrer Oberfläche, den sogenannten „Oberflächenmarkern“ klassifiziert.

#### Durchführung:

$5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  PBMC pro FACS – Röhrchen wurden jeweils in 100  $\mu$ l IS – Puffer (PBS / 0,5 % BSA) vorgelegt. Anschließend wurden 50  $\mu$ l humanes IgG dazugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken und so die Spezifität zu erhöhen.

Daraufhin erfolgte die Zugabe der entsprechenden Oberflächenantikörper nach folgenden Schemata:

| Subtypisierung T-Zellen allgemein |                   |                  |                         |                   |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------|
|                                   | FITC              | PE               | PerCp/PE Cy7            | APC               |
| 1                                 | IgG <sub>1</sub>  | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> PerCp  | IgG2 <sub>a</sub> |
| 2                                 | IgG2 <sub>a</sub> | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> PE Cy7 | IgG <sub>1</sub>  |
| 3                                 | CD45RA            | CD45RO           | CD3 PerCp               | CCR7              |
| 4                                 | CD57              | CD3              | CD27 PE Cy7             | CD28              |
| 5                                 | CD45RO            | CD3              | CD27 PE Cy7             | CD62L             |
| 6                                 | IL-15R            | CD3              | CD25 PE Cy7             | CD69              |

Tabelle 2: Pipettierschema zur allgemeinen T – Zell – Subtypisierung

| NKT - Klassifizierung |                   |                  |                        |                  |
|-----------------------|-------------------|------------------|------------------------|------------------|
|                       | FITC              | PE               | PerCp/PE Cy7           | APC              |
| 1                     | IgG <sub>1</sub>  | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> PerCp | IgG <sub>1</sub> |
| 2                     | IgG2 <sub>a</sub> | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> PerCp | IgG <sub>1</sub> |
| 3                     | CD3               | CD4              | CD8 PerCp              | CD19             |
| 4                     | CD16              | CD6              | CD3 PerCp              | CD56             |
| 5                     | Vβ11              | Vα24             | CD3 PerCp              | CD161            |
| 6                     | iNKT              | Vα24             | CD3 PerCp              | CD161            |

Tabelle 3: Pipettierschema zur Klassifizierung der NKT - Zellen

Je nach Antikörper wurden die Zellen 20 bis 25 Minuten bei 4 °C abgedunkelt inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit 1000 µl IS – Puffer je Röhrchen gewaschen und in ca. 100 µl IS – Puffer für die anschließende FACS – Messung aufgenommen. Falls das Messen erst am nächsten Tag möglich war, wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl FACS – Fixierlösung (2 % Formaldehyd) und Zentrifugation von 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm fixiert und konnten so bis zur Messung abgedunkelt bei 4 °C aufbewahrt werden.

### 2.10.2 Foxp3 – Färbung

Über die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 lassen sich Regulatorische T – Zellen, sogenannte Tregs, identifizieren. Foxp3 ist einer der Hauptregulatoren in der Entwicklung und Funktion der Tregs, welche eine wichtige Rolle bei der GvHD nach allogener Stammzelltransplantation zugesprochen wird (40). Deshalb wurden alle Spender und Patienten auf das Vorhandensein von Foxp3 hin untersucht.

### Durchführung:

Im vorgefertigten Kit wurden pro Test wurden in 2 FACS – Röhrrchen je  $1 \times 10^6$  PBMNC in 100  $\mu$ l IS – Puffer vorgelegt. Daraufhin wurden 50  $\mu$ l humanes IgG zum Blocken unspezifischer Bindungen zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1000  $\mu$ l IS – Puffer (5 Minuten, 4 °C, 1500 rpm) erfolgte die Oberflächenfärbung der Zellen nach folgendem Schema:

| Fox p3 (Regulatorische T-Zellen) |                  |                  |                         |                  |
|----------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------|
|                                  | FITC             | PE               | PE Cy7                  | APC              |
| 1                                | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> PE Cy7 | IgG <sub>1</sub> |
| 2                                | CD3              | CD4              | CD25 PE Cy7             |                  |

**Tabelle 4: Pipettierschema zur Färbung der Regulatorischen T - Zellen**

Nach dem Färben wurden die Zellen 15 Minuten bei 4 °C abgedunkelt inkubiert und einmal mit IS – Puffer gewaschen. Nun wurden je Röhrrchen 1 ml Fixation – Permeabilisations – Lösung, bestehend aus Fixation/Permeabilization Concentrate und Fixation/Permeabilization Diluent im Verhältnis 1:4, zugegeben, da es sich bei Foxp3 um einen intrazellulären Marker handelt. Die Röhrrchen wurden gemischt und 30 bis 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie jeweils 2 Mal mit 2 ml Permeabilisation Buffer, welcher zuvor 1:10 mit Aqua dest verdünnt wurde, 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm gewaschen. Röhrrchen 1 konnte danach gemischt und bis zur FACS – Messung bei 4 °C aufgehoben werden. Zu Röhrrchen 2 wurden 2  $\mu$ l Maus - Serum zum Blocken zugegeben und dieses 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden 10  $\mu$ l des anti – human Foxp3 – Antikörpers (APC – konjugiert) hinzugegeben und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit je 2 ml Permeabilisation Buffer, wurden die Zellen in 100  $\mu$ l IS – Puffer resuspendiert und mit dem FACS Calibur gemessen.

### 2.10.3 Intrazelluläre FACS – Analyse von Interferon gamma (IFNgamma)

Das Zytokin IFNgamma spielt eine wichtige Rolle in der Antwort des adaptiven Immunsystems. Es wird beispielsweise von spezifischen zytotoxischen T – Zellen bei ihrer Antwort auf Antigene, z.B. CMV oder Tumorantigene, gebildet. Die Bildung solcher cytotoxischer T – Zellen ist für Patienten nach Stammzelltransplantation von besonderer Bedeutung, weshalb alle Spender – und Patientenproben auf IFNgamma-Produktion hin untersucht wurden, falls passende HLA – Typen für die vorhandenen Peptide vorlagen.

Die Produktion von IFNgamma auf Einzelzellebene kann durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dazu werden die T – Zellen in vitro mit bestimmten Peptiden und stark stimulierenden Substanzen wie Ionomycin (eine vom Bakterium *Streptomyces conglobatus* gebildete Sustanz, die Calciumionen durch biologische Membranen transportieren und die intrazelluläre Produktion von z.B. Interferonen beeinflussen kann) und PMA (ein Proteinkinase C Aktivator) als Positivkontrolle stimuliert. Zusätzlich werden Substanzen zugegeben, die den Abtransport des IFNgamma und aller Weiterhin gebildeten Proteine aus der Zelle über den Golgi Apparat hemmen, wie z.B. Brefeldin A. So häuft sich IFNgamma intrazellulär an und kann nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen direkt innerhalb der Zelle mit einem Fluoreszenzfarbstoff – konjugierten Antikörper angefärbt und so detektiert werden. Diese Methode zeigt eine Sensitivität von bis zu 0,1 % aller CD3<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

#### Durchführung:

5 x 10<sup>5</sup> bis 1 x 10<sup>6</sup> PBMC / Well wurden jeweils in 200 µl RPMI / 10 % FCS in einer 96 – Well – Rundbodenplatte vorgelegt. Da stets eingefrorene Zellen verwendet wurden, wurden sie nach dem Auftauen für mindestens 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank ruhengelassen. Folgende Ansätze waren für eine Versuchsreihe nötig:

|                         | <b>Peptide bzw. PMA/Ionomycin</b>                                | <b>Brefeldin A</b>                       |
|-------------------------|--|--|
| <b>Isotyp-Ko.</b>       |  | <b>Brefeldin A</b><br>10µg/ml = 4µl/Well |
| <b>Geräteinstellung</b> |  |  |
| <b>Negativ-Ko.</b>      | Nur Medium RPMI / 10 % FCS                                       |  |
| <b>Positiv-Ko.</b>      | 0,5 µg/ml <b>PMA</b><br>1µg/ml <b>Ionomycin</b><br>= je 2µl/Well |  |
| <b>Peptid 1</b>         | <b>Peptid</b> z. B. MUC<br>10µg/ml = 2µl/Well                    |  |
| <b>Peptid 2...</b>      | <b>Peptid</b> z. B. WT1<br>10µg/ml = 2µl/Well                    |  |

**Tabelle 5: Ansatzreihe zur Intrazellulären Bestimmung von IFNgamma**

Nach der Ruhephase erfolgte die Zugabe von je 2 µl der entsprechenden Peptide / Virusantigene je nach HLA – Typ und Erkrankung des Patienten nach dem entsprechenden Schema.

Die Zellsuspension wurde gut gemischt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 2 µl Ionomycin und PMA und je 4 µl Brefeldin A entsprechend Tabelle 4. Nach Durchmischung wurde die Zellsuspension 16 bis 18 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nachdem die Zellen in FACS – Röhrchen überführt und einmal mit 500 µl IS – Puffer 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von je 500 µl FACS – Permeabilisierungslösung, bestehend aus BD FACS Permeabilizing Solution 2 und Aqua dest. im Verhältnis 1:10. Die Zellen wurden 12 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin einmal mit 1000 µl IS – Puffer pro Röhrchen 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm gewaschen. In 100 µl IS – Puffer resuspendiert, erfolgte die Antikörperzugabe zu den Zellen nach folgendem Schema:



|                     | PE               | PerCp | APC              |
|---------------------|------------------|-------|------------------|
| 1 Isotyp            | IgG <sub>1</sub> | IgG1  | IgG <sub>1</sub> |
| 2 Komp.             | CD4              | CD3   | CD8              |
| 3 Neg. Ko. Medium   | IFN <sub>γ</sub> | CD3   | CD8              |
| 4 Pos. Ko. PMA/Iono | IFN <sub>γ</sub> | CD3   | CD8              |
| 5 Peptide ...       | IFN <sub>γ</sub> | CD3   | CD8              |

Tabelle 6: Pipettierschema zur Intrazellulären Bestimmung von IFNgamma

Der Ansatz wurde 30 Minuten abgedunkelt bei 4 °C inkubiert, anschließend noch einmal mit 1000 µl IS – Puffer pro Röhrchen 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm gewaschen und schließlich am FACS – Calibur gemessen.

### 2.10.4 Spezifische T – Zell – Subtypisierung mittels MHC-Tetrameren

Wenn bei der Intrazellulären FACS – Analyse von IFNgamma bei Patienten mit HLA – Typ A\*0201 oder B\* 0702 eine ausreichend hohe Menge (~0,5 %) an CMV spezifischen T – Zellen detektiert werden konnte, erfolgte anstatt der in Punkt 2.10.1 beschriebenen allgemeinen T – Zell – Subtypisierung eine Spezifische T – Zell – subtypisierung mittels PE – konjugierten CMV – Tetrameren.

Lösliche Schwereketten von MHC-Klasse-I-Molekülen werden in E.coli exprimiert. Die Moleküle nehmen ihre Konformation erst nach Zugabe von  $\beta_2$ -Mikroglobulin und einem synthetischen Peptid, welches das Epitop darstellt, das vom interessierenden TCR erkannt wird, an. Dieses Peptid ist in der Lage, an das MHC-Molekül zu binden. Zusätzlich wird das Enzym BirA dazu verwendet, ein Biotinmolekül an die spezifische BirA-Erkennungssequenz, die gentechnisch in den C-Terminus des MHC-Moleküls eingebaut wurde, zu koppeln. Vier MHC-Biotin-Komplexe binden an ein Streptavidin-Molekül, wobei die spezifische Biotin-Avidin-Wechselwirkung dazu verwendet wird ein Tetramer

## 2. Material und Methoden

---

zu bilden. Das Streptavidin-Molekül ist mit einem Fluorochrom (z.B. PE) gekoppelt (47).

Die Tetramere werden hierzu zuerst auf die Zellen gegeben, sodass nur solche T – Zellen es binden können, deren T – Zell – Rezeptoren in der Lage sind, die ihm vorliegende MHC – Peptid – Kombination des Tetramers zu erkennen. Es handelt sich um eine sehr sensitive Methode, da spezifische T – Zellen bis zu einer Grenze von 0,1 %, also eine antigenspezifische T – Zelle wird unter 1000 anderen erkannt, nachgewiesen werden können.

### Durchführung:

Je  $1 \times 10^6$  PBMNC wurden in 100  $\mu$ l IS – Puffer in einem FACS – Röhrchen vorgelegt und 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 50  $\mu$ l humanes IgG zum Blocken unspezifischer Bindungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2  $\mu$ l des entsprechenden PE – Konjugierten CMV – Tetramers bzw. eines Negativ – Tetramers in den beiden Isotyp – Kontrollen. Nach 20 – minütiger, abgedunkelter Inkubation bei Raumtemperatur wurden die restlichen Antikörper zur Detektion der T – Zell – Subpopulationen nach folgendem Schema zugegeben:

| Subtypisierung spezifischer T-Zellen (z.B. CMV B7) |                   |           |                         |                   |
|--|-------------------|-----------|-------------------------|-------------------|
|  | FITC              | PE        | PerCp/PE Cy7            | APC               |
| 1  | IgG <sub>1</sub>  | Neg. Tet. | IgG <sub>1</sub> PerCp  | IgG2 <sub>a</sub> |
| 2  | IgG2 <sub>a</sub> | Neg. Tet. | IgG <sub>1</sub> PE Cy7 | IgG <sub>1</sub>  |
| 3  | CD45RA            | Tetramer  | CD8 PerCp               | CCR7              |
| 4  | CD57              | Tetramer  | CD27 PE Cy7             | CD28              |
| 5  | CD45RO            | Tetramer  | CD27 PE Cy7             | CD62L             |
| 6  | IL-15R            | Tetramer  | CD25 PE Cy7             | CD69              |

Tabelle 7: Pipettierschema zur spezifischen T – Zell - Subtypisierung

Die Ansätze wurden weitere 25 Minuten abgedunkelt bei 4 °C inkubiert und anschließend einmal mit 1000  $\mu$ l IS – Puffer 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Falls die Messung erst am nächsten Tag erfolgte, wurde einmal mit 500  $\mu$ l FACS – Fixierlösung 5 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm zur Fixation zentrifugiert und das Pellet danach in ca. 100  $\mu$ l der Lösung resuspendiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeine Immunrekonstitution

Nach allogener Blutstammzelltransplantation erfolgt beim Patienten der Wiederaufbau eines neuen Immunsystems aus Spenderzellen. Dieser Aufbau findet nicht bei allen Zellpopulationen gleichzeitig und gleichmäßig statt, sondern verläuft je nach Zellsubtyp früher oder später, schnell oder langsam. Ein Ziel der Arbeit war, bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation die Entwicklung der verschiedenen Lymphozyten- und T-Zell-Populationen im Verlauf darzustellen und zu vergleichen, ob und zu welchem Zeitpunkt die Zusammensetzung der Zellen vergleichbar mit den gesunden Spendern ist. Deshalb wurde das Patientenkollektiv zu jeweils vier verschiedenen Analysezeitpunkten und die Stammzellspender sowie die gesunden Spender einmalig auf folgende Zellpopulationen hin untersucht:

| Zelltyp                             | Marker  | passende Abb. |
|-------------------------------------|---------|---------------|
| alle T-Zellen                       | CD3     | 5             |
| T-Zellen, B-Zellen                  | CD6     | 6             |
| alle B-Zellen                       | CD19    | 7             |
| Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) | CD16/56 | 8             |
| Zytotoxische T-Zellen               | CD8     | 15            |
| T-Helfer-Zellen                     | CD4     | 16            |
| Prä-T-Lymphozyten                   | CD8/CD4 | 19            |

**Tabelle 8: getestete Marker bei der allgemeinen Immunrekonstitution**

Dabei wurde einerseits der prozentuale Anteil der einzelnen Unterpopulationen in Bezug zu den Gesamtlymphozyten und T-Zellen ermittelt, andererseits wurden zusätzlich bei den Patienten an allen vier Analysezeitpunkten die zugehörigen Absolutzahlen berechnet. Insgesamt entsprechen sich die Verläufe der Prozent- und Absolutzahlen in Bezug auf CD3, CD6, CD19, CD16, CD56, CD8 und CD4 (siehe Tabelle 8) weitestgehend, sodass sich keine entscheidenden Unterschiede darin ergaben.

Die Abbildungen fünf bis zehn sowie 15, 16 und 19 der folgenden Abschnitte zeigen die Werte der Prozentzahlen in Bezug zu den Lymphozyten bzw. den T-Zellen an den vier Analysezeitpunkten bei allen Patienten und bei den

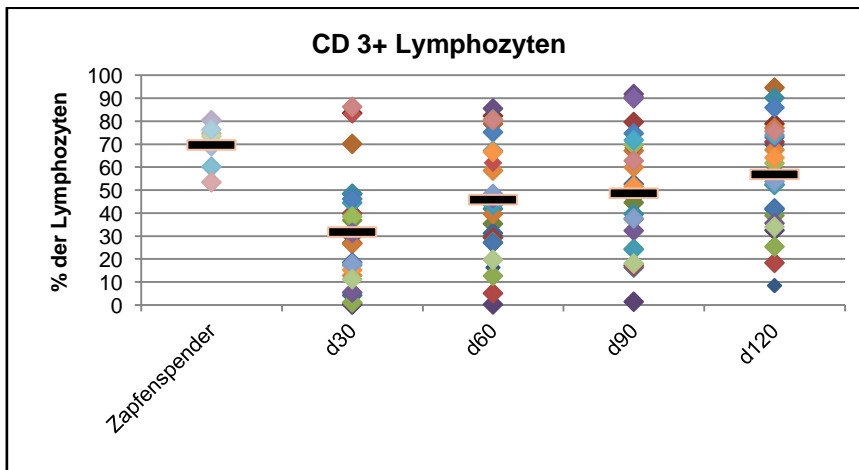
gesunden Spendern. Zudem wurde der Mittelwert zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelt und markiert. Bei den Diagrammen entspricht jeweils eine farbige Raute einem Patienten (P1 bis P27), die Rauten der linken Spalte entsprechen je einem gesunden Zapfenspender (Z1 bis Z7).

#### **3.1.1 T-Zellen gesamt**

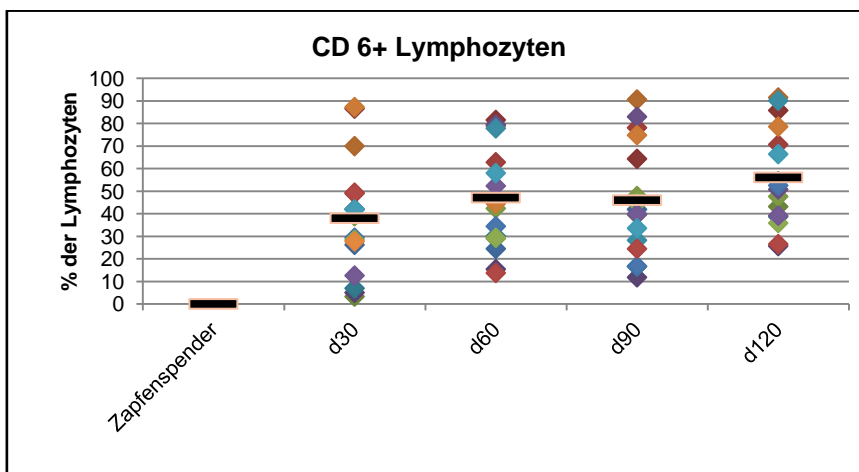
CD3 als Oberflächenmarker wird von allen T-Zellen exprimiert und stellt so den T-Zellmarker überhaupt dar. Auf ca. 80% aller reifen T-Zellen findet sich außerdem der Oberflächenmarker CD6 (49), wobei dessen genaue Funktion noch nicht endgültig verstanden ist.

Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigen die CD3+ und CD6+ Lymphozytenanteile über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg stets einen parallelen, zum Teil sogar identischen prozentualen Kurvenverlauf. Die CD3+ Zellen bewegen sich dabei insgesamt in einem Bereich von einem bis 95%, meist liegen sie jedoch zwischen 32 und 57%, die CD6+ Zellen weisen insgesamt eine Streuung von drei bis 91% auf, sie liegen meist zwischen 38 und 56%. Bei einem Teil der Patienten stellten die CD3+ T-Zellen so zugleich den höchsten aller untersuchten Lymphozytenanteile, beim anderen Patiententeil hatten sie dagegen einen niedrigeren Anteil an den Lymphozyten als CD16/CD56+ Zellen. Dieser Verlauf bei den Patienten steht in deutlichen Gegensatz zu dem bei gesunden Spendern, denn hier zeigte sich die CD3-Population stets dominant gegenüber allen anderen Zellpopulationen.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 5: Verlauf CD3+ Lymphozyten**  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.



**Abbildung 6: Verlauf CD6+ Lymphozyten**  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass meist der größte Anteil der Lymphozyten im vorliegenden Patientenkollektiv sowohl CD3 als auch CD6 exprimiert. Wie erwartet finden sich jedoch auch einige Ausreißer nach oben und nach unten, da das Kollektiv an allogenen stammzelltransplantierten Patienten eine große Streuung der gemessenen Werte aufweist.

#### 3.1.2 B-Zellen

Zur Detektion der B-Zellen im vorliegenden Patientenkollektiv wurde der Oberflächenmarker CD19 verwendet, da dieser von allen B-Zellen exprimiert wird und sich so als B-Zellmarker eignet.

Die CD19+ Zellen zeigten bei den Patienten einen extrem niedrigen Gesamtverlauf und waren stets deutlich die niedrigste aller Lymphozytenpopulationen. Das gleiche Bild zeigte sich bei den gesunden Spendern. Eine Ausnahme hiervon bildeten jedoch sechs Patienten, bei denen CD19+ Zellen einen unerwartet hohen Anteil an den Lymphozyten bildeten.

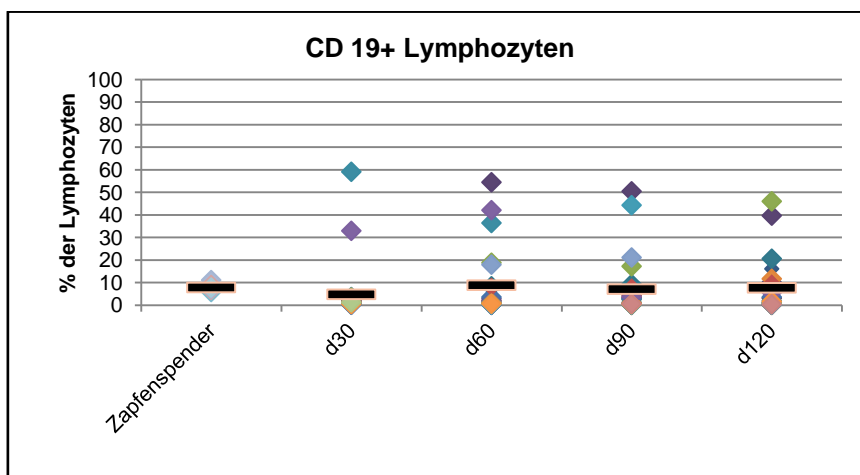


Abbildung 7: Verlauf CD19+ Lymphozyten  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

Bei der Mehrzahl der Patienten bildeten die CD19+ Zellen den erwartungsgemäß niedrigsten aller untersuchten Lymphozytenpopulationen (vergleiche Abbildung 7).

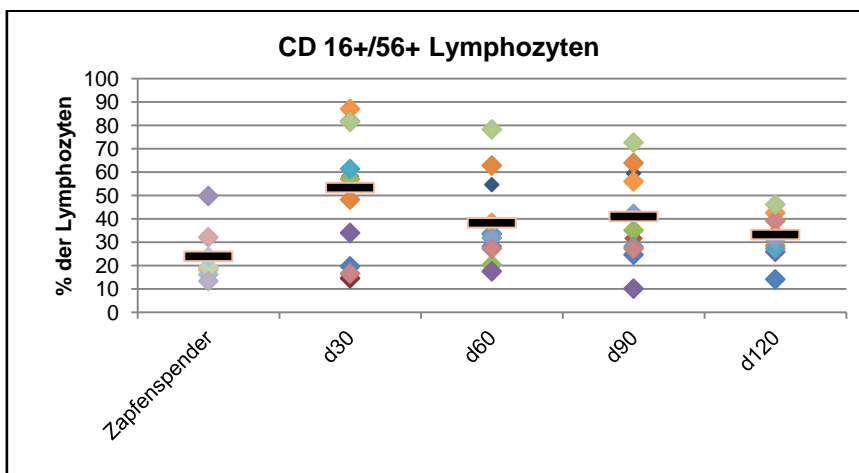
#### 3.1.3 Natürliche Killerzellen

Die Oberflächenmarker CD16 und CD56 werden von den Natürlichen Killerzellen exprimiert und wurden im vorliegenden Patientenkollektiv in einer Doppelfärbung verwendet, um alle Natürlichen Killerzellen zu detektieren. Generell liegen zwei Untergruppen an Natürlichen Killerzellen vor, eine Untergruppe exprimiert hauptsächlich CD56 (CD56+/CD16-), die andere

### 3. Ergebnisse

Untergruppe exprimiert die Marker in umgekehrter Weise (CD16+/CD56-). Diese Unterteilung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen.

Die Verlaufskurve CD16/56+ Zellen zeigte dabei eine typische Verlaufsform, die bei Tag 30 ihren Höhepunkt aufwies, zu diesem Zeitpunkt höher lag als die CD3+ Zellen, und dann zum Ende des Beobachtungszeitraums hin abfiel (siehe Abb. 8). Im Gegensatz dazu stellten bei den gesunden Spendern CD16/56+ doppelt positive Natürliche Killerzellen immer einen wesentlich geringeren Anteil der Lymphozyten dar als CD3+ Zellen, welche bei allen Gesunden immer den größten Anteil der Lymphozyten darstellte.



**Abbildung 8: Verlauf CD16/56+ Lymphozyten**  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

Bei einem Teil der Patienten, bei dem zu allen vier Analysezeitpunkten genug Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand, wurde hinsichtlich der Färbung der Zellen eine Differenzierung vorgenommen, indem CD16 und CD56 getrennt voneinander gefärbt wurden. Bei der deutlichen Mehrheit der Patienten lag der Anteil der CD56+ Zellen dabei während des gesamten Beobachtungszeitraums deutlich über dem der CD16+ Zellen. Dieses Ergebnis spricht für das gleichzeitige Vorliegen von unterschiedlichen Reifungsstufen der Natürlichen Killerzellen.

### 3. Ergebnisse

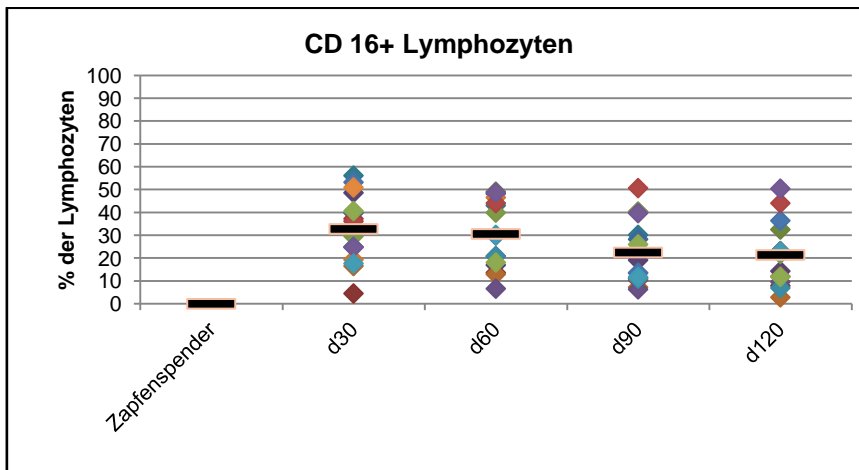


Abbildung 9: Verlauf CD16+ Lymphozyten

Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

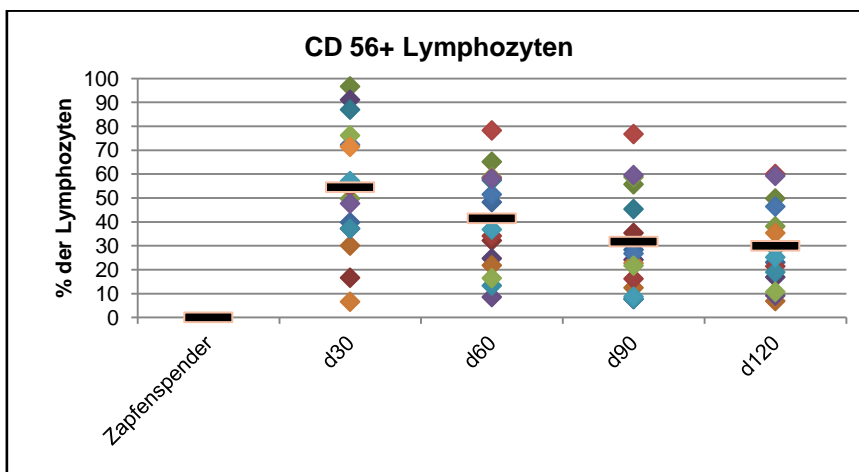


Abbildung 10: Verlauf CD 56+ Lymphozyten

Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

Zusammengefasst ergibt sich beim Vergleich der Immunrekonstitution von T-Zellen und NK-Zellen folgendes Bild:

- Bei neun von 27 Patienten, also einem Drittel, stellten die T – Zellen den deutlich größten Lymphozytenanteil bis Tag 120 dar.
- Bei neun von 27 Patienten zeigten sich die NK – Zellen als der dominante Teil der Lymphozyten bis Tag 120.
- Bei 9 von 27 Patienten waren die NK-Zellen nur zu Beginn (Tag 30 bis 60) der höchste Lymphozytenanteil, danach dominierten die T-Zellen.



### 3. Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Absolutzahlen von T- und NK-Zellen zeigt sich dabei, dass ein erhöhter Anteil an NK-Zellen meist auch mit einer niedrigeren Anzahl an T-Zellen einhergeht. Sobald diese ansteigt, wird auch der Anteil an NK-Zellen kleiner, was darauf schließen lässt, dass ein erhöhter Anteil an NK-Zellen durch das Fehlen von T-Zellen verursacht wird. Exemplarisch dargestellt werden die prozentualen Verläufe der Lymphozytenzahlen von Patient 6 für den ersten Fall und von Patient 3 für den zweiten Fall. Bei Patient 6 liegen die Kurven für CD3+ und CD6+ Zellen zu allen vier Analysezeitpunkten über 70% und stellen so den größten Anteil aller Lymphozyten dar. Die CD16+ und CD56+ Zellen liegen mit einem maximalen Anteil von 30% an Tag 30 nach Stammzelltransplantation deutlich darunter. Bei Patient 3 dagegen liegt der Anteil CD56+ Zellen an Tag 30 nach Stammzelltransplantation mit über 90% aller Lymphozyten deutlich über dem Anteil an CD3+ und CD6+ Zellen. Erst am letzten der vier Analysepunkte fällt die Kurve CD56+ Zellen unter die der CD3+ Zellen ab. Abbildung 13 stellt den Lymphozytenverlauf bei Patient 12 als Beispiel für den dritten genannten Fall dar. Hier sind die NK-Zellen bis Tag 60 die dominante Population, anschließend werden sie von den CD3+ und CD6+ Zellen überholt.

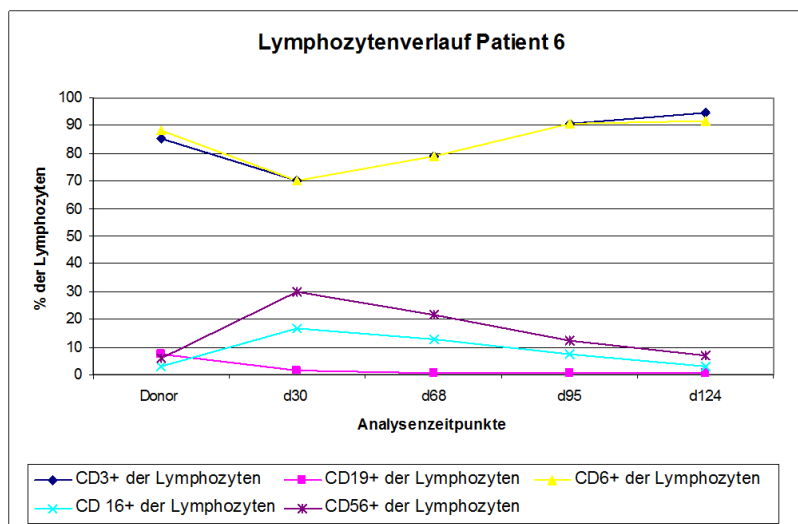


Abbildung 11: Lymphozytenverlauf bei Patient 6

### 3. Ergebnisse

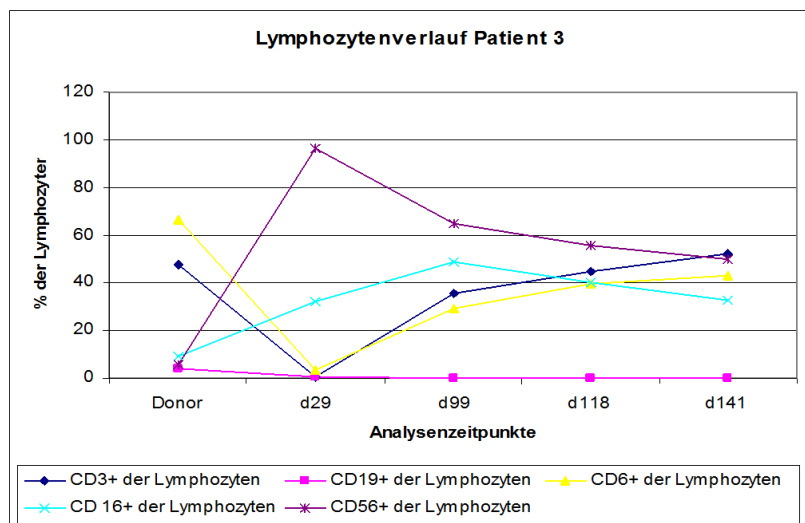


Abbildung 12: Lymphozytenverlauf bei Patient 3

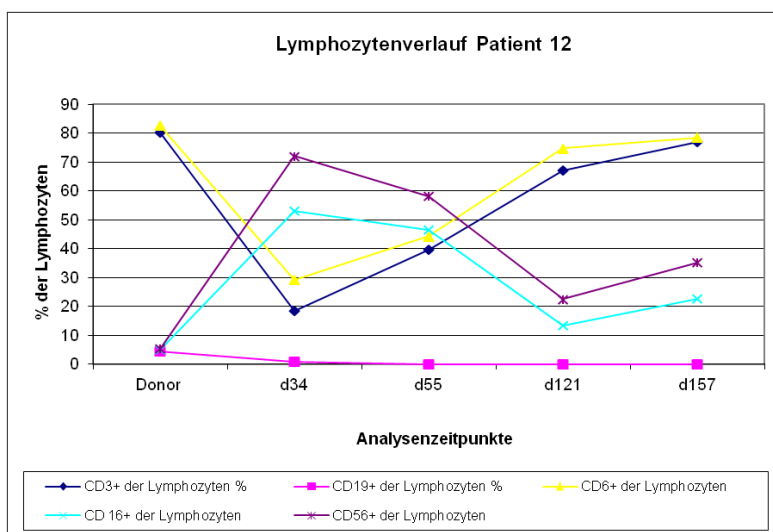


Abbildung 13: Lymphozytenverlauf bei Patient 12

Bei 1/3 der Patienten ist also CD3 dominant, vergleichbar zu den Ergebnissen der gesunden Spender, und bei 2/3 sind zumindest zu Beginn (bis Tag 60) oder sogar immer die NK – Zellen die dominante Zellpopulation und stellen somit die „erste Welle“ der Immunrekonstitution dar, die dann meist im weiteren Verlauf von den T-Zellen als „zweite Rekonstitutionswelle“ überholt werden. Eine bessere Veranschaulichung über die T-Zell – und NK-Zell – Immunrekonstitution gibt Abbildung 14.

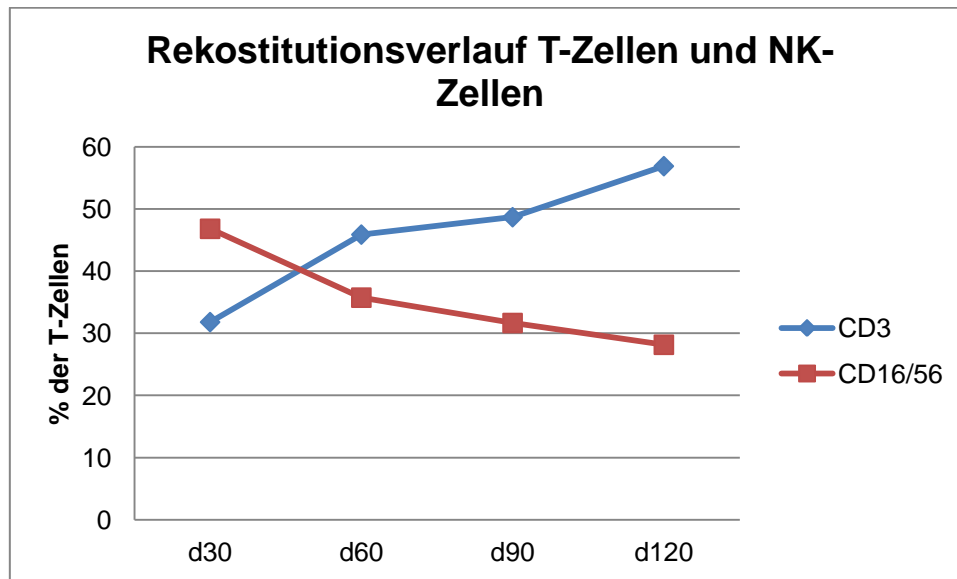


Abbildung 14: Rekonstitutionsverlauf von T-Zellen und NK-Zellen, dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Messergebnisse aller Patienten zum jeweiligen Analysezeitpunkt.

#### 3.1.4 T-Zell-Untergruppen

Innerhalb der T-Zellen gibt es verschiedene Untergruppen mit verschiedenen Oberflächenmarkern. Die beiden wichtigsten Untergruppen sind dabei CD4+ und CD8+ T-Zellen. Den Oberflächenmarker CD4 findet man auf den sog. T – Helferzellen. Diese Zellen dienen der Erkennung von in den Organismus eingedrungenen Antigenen, sie aktivieren mit Hilfe verschiedener Botenstoffe andere Immunzellen und leiten so eine Immunantwort gegen ein Antigen ein. CD8 findet sich als Oberflächenmarker auf Zytotoxischen T-Zellen. Diese können nach ihrer Aktivierung infizierte Körperzellen abtöten und so eine zelluläre Immunantwort in Gang setzen.

Im vorliegenden Patientenkollektiv stellte sich eine Dominanz der Immunrekonstitution der CD8+ Zellen gegenüber den CD4+ Zellen im gesamten Beobachtungszeitraum dar. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den gesunden Spendern ein genau umgekehrtes Verhältnis: Hier bildeten die CD4+ Zellen den wesentlichen höheren T-Zell-Anteil als CD8+ Zellen.

### 3. Ergebnisse

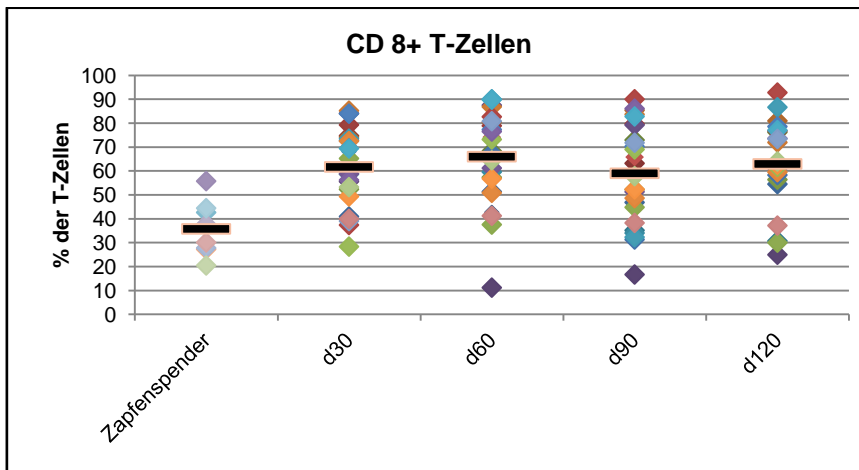


Abbildung 15: Verlauf CD8+ T- Zellen  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

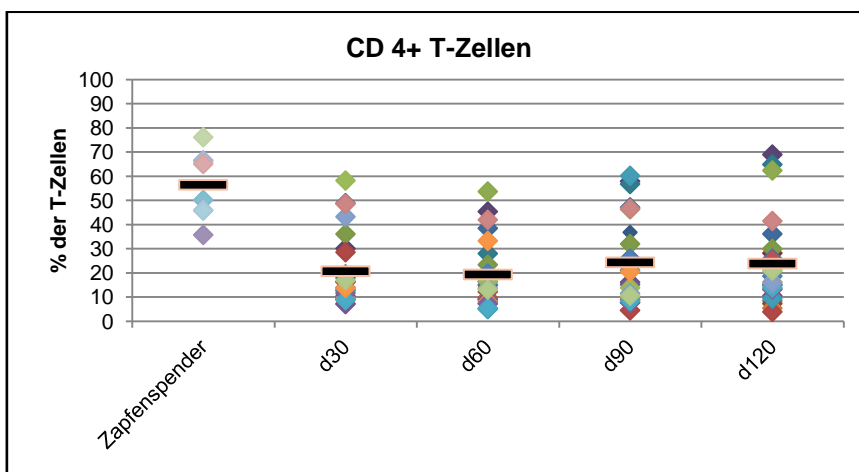


Abbildung 16: Verlauf CD4 + T- Zellen  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

Von diesem Muster wichen jedoch sechs Patienten ab. Diese Patienten zeigten teilweise oder auch komplett höhere Anteile an CD4+ T-Zellen als an CD8+ T-Zellen.

Interessant ist, dass fünf aller 27 Patienten sowohl die Ausnahme in Bezug auf CD19+ Zellen als auch in Bezug auf CD4+ Zellen aufwiesen. Bei den Patienten 1, 4, 15, 17 und 22 bildeten die CD19+ Zellen einen relativ hohen Anteil an den Lymphozyten und zugleich war der Anteil an CD4+ T-Zellen höher als der Anteil an CD8+ T-Zellen. Alle diese fünf Patienten erhielten in ihrem Konditionierungsschema ATG, was die Annahme zulässt, dass durch ATG die Rekonstitution von B-Zellen bzw. T-Zellen, die mit B-Zellen agieren begünstigt

### 3. Ergebnisse

werden könnte. Jedoch war auch bei der Mehrzahl der verbleibenden 22 Patienten ATG in deren Konditionierungsschema vorhanden, in diesen Fällen kam es dabei nicht zu einem höheren Anteil an CD4+ T-Zellen gegenüber CD8+ T-Zellen. Es liegt also keine allgemeingültige Tendenz vor.

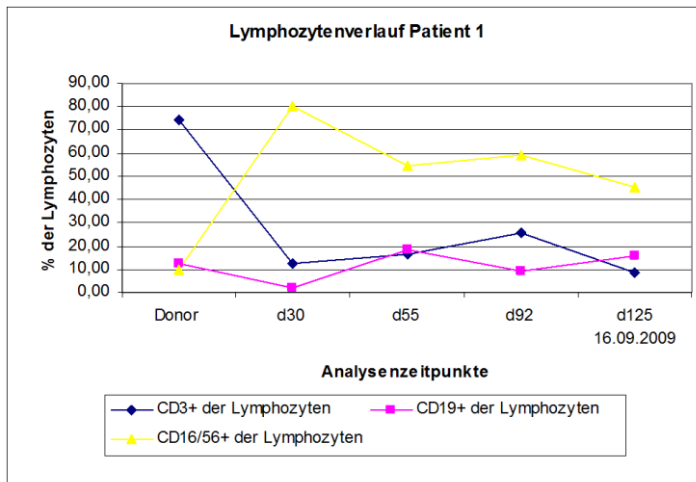


Abbildung 17: Lymphozytenverlauf bei Patient 1

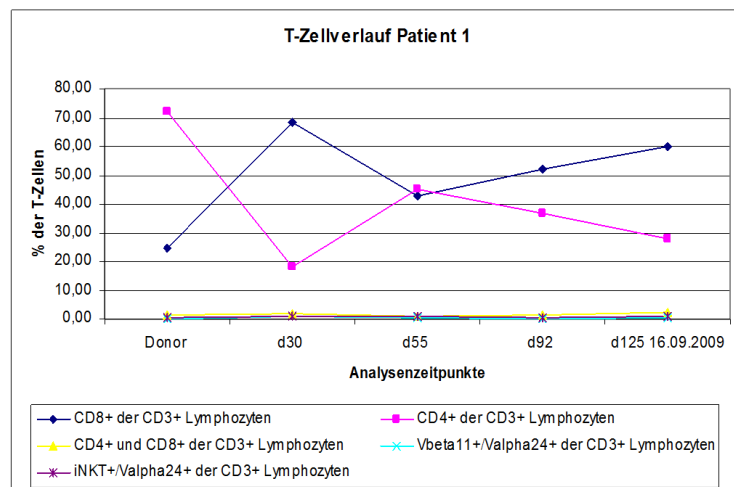


Abbildung 18: T-Zellverlauf bei Patient 1

Bei der Mehrheit der Patienten waren, wie aus der Literatur erwartet, die CD8+ T-Zellen also dominant gegenüber den CD4+ T-Zellen, also genau umgekehrt zu den gesunden Spendern.

CD8/CD4 doppelt positive Zellen bildeten über den gesamten Beobachtungszeitraum einen vernachlässigbar niedrigen Anteil der T-Zellen, sowohl bei den Patienten als auch bei den Zapfenspendern, wie auch in Abb. 18 zu sehen.

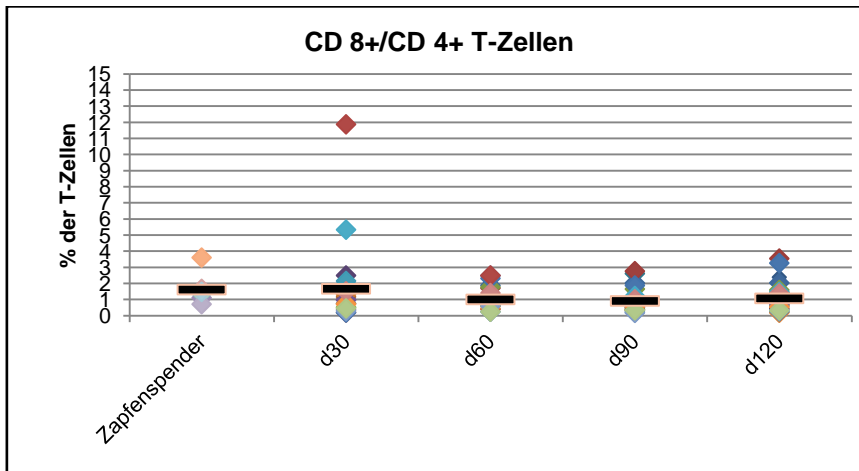


Abbildung 19: Verlauf CD8+/CD4+ T- Zellen

Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Raute verwendet.

### 3.2 T – Zell – Subtypisierung

Bei allen Stammzellspendern, Patienten und gesunden Spendern wurden die T – Zellen nach den beiden verschiedenen Klassifikationen von Sallusto und Rezvani gefärbt. Die Untergruppen definieren sich dabei wie folgt:

Einteilung nach Sallusto:

- effector memory Zellen nach Sallusto (emS):  
CD45RA-/CCR7- der T – Zellen
- central memory Zellen nach Sallusto (cmS):  
CD45RA-/CCR7+ der T – Zellen
- naive Zellen nach Sallusto (nS):  
CD45RA+/CCR7+ der T – Zellen

Einteilung nach Rezvani:

- effector memory Zellen nach Rezvani (emR):  
CD27-/CD57+ der T – Zellen
- central memory Zellen nach Rezvani (cmR):  
CD27+/CD57- der T – Zellen

Auch hier wurden Prozent – und Absolutzahlen berechnet.

### 3. Ergebnisse

Folgende Diagramme zeigen den Verlauf der emS, emR, cmS, cmR und nS über alle vier Analysezeitpunkte hinweg sowie die Vergleichswerte bei den gesunden Spendern prozentual zu allen T-Zellen.

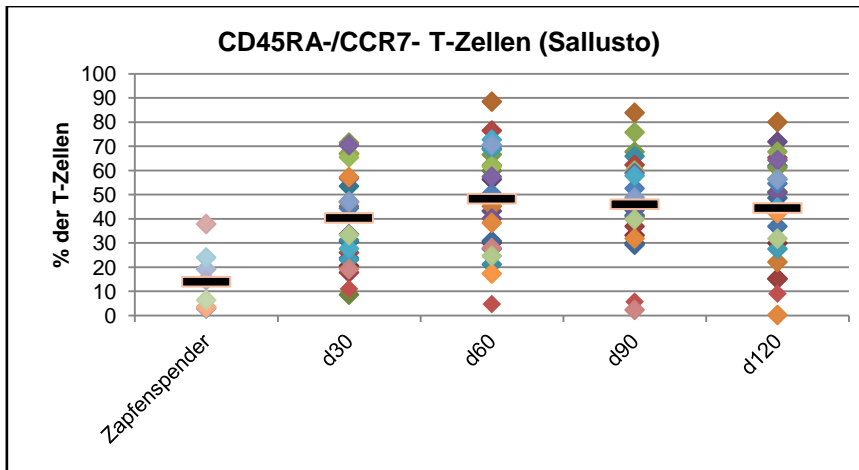


Abbildung 20: Verlauf Effector Memory T-Zellen nach Sallusto  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

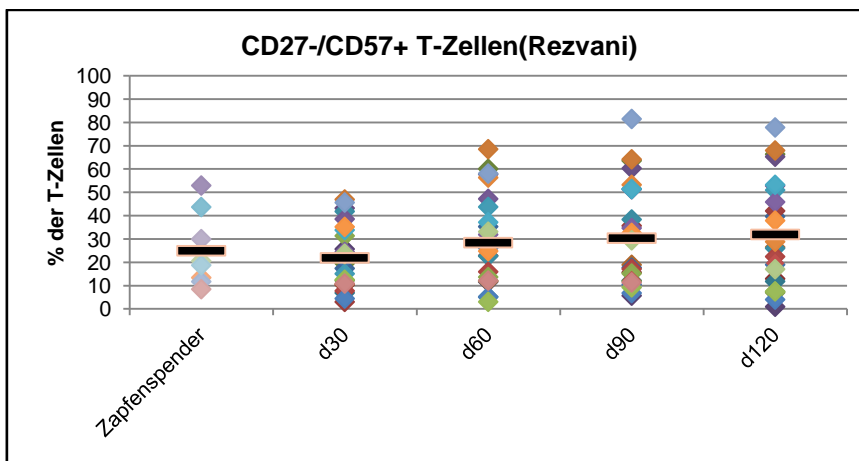
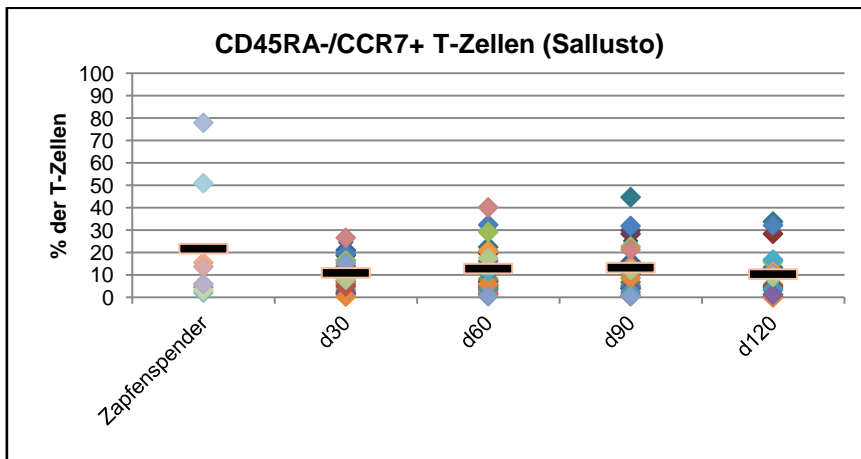
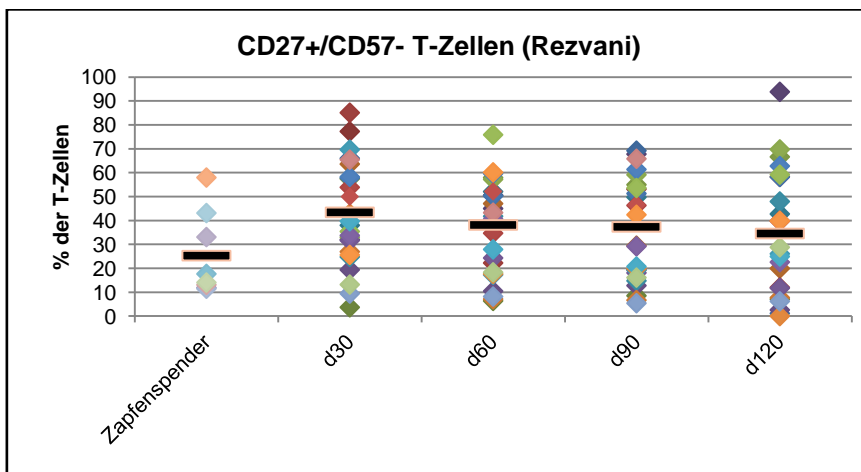


Abbildung 21: Verlauf Effector Memory T-Zellen nach Rezvani  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

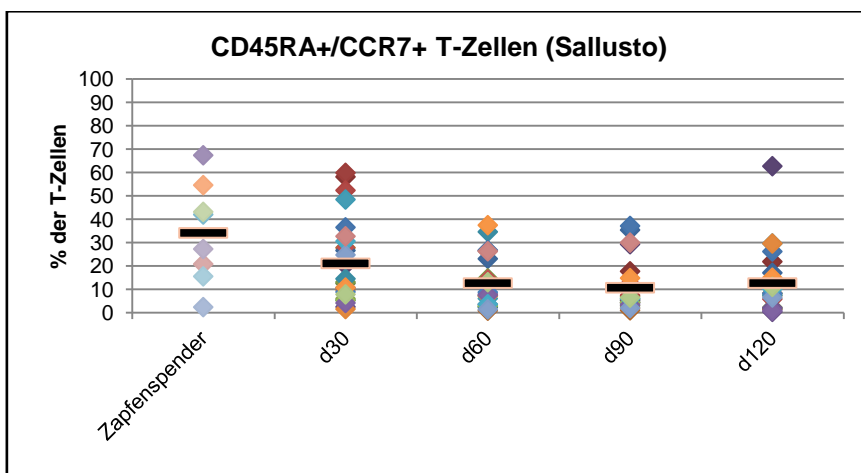
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 22: Verlauf Central Memory T-Zellen nach Sallusto**  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.



**Abbildung 23: Verlauf Central Memory T-Zellen nach Rezvani**  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.



**Abbildung 24: Verlauf Naive T-Zellen nach Sallusto**  
Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.



### 3. Ergebnisse

Es ließ sich dabei generell, sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Spendern keine Übereinstimmung der beiden Definitionen feststellen. Wobei man in diesem Zusammenhang darauf hinweisen muss, dass die Streuung bei den gesunden Spendern wesentlich geringer ausgeprägt war als bei den Patienten. Das deutet darauf hin, dass die Definitionen bei gesunden Spendern eher übereinstimmen, als bei rekonstituierten Patienten. Die Rekonstitution des T-Zellkompartiments nach allogener Stammzelltransplantation scheint also den Unterschied zwischen den T-Zellsubpopulationen nach den beiden Definitionen deutlich werden zu lassen. Der Ergebnistrend ging dahin, dass die Werte für emS höher lagen als für emR, nämlich bei 18 von 27 Patienten, was ca. 66% entspricht. Dagegen lagen bei 25 von 27 Patienten, also bei mehr als 90%, die cmR deutlich höher als die cmS. Auch die Differenz, die zwischen den jeweiligen effector oder central memory Zellen lag, variierte zwischen einem und über 60% ohne erkennbares Muster. Beispielhaft ist hier der Verlauf von Patient 9 dargestellt.

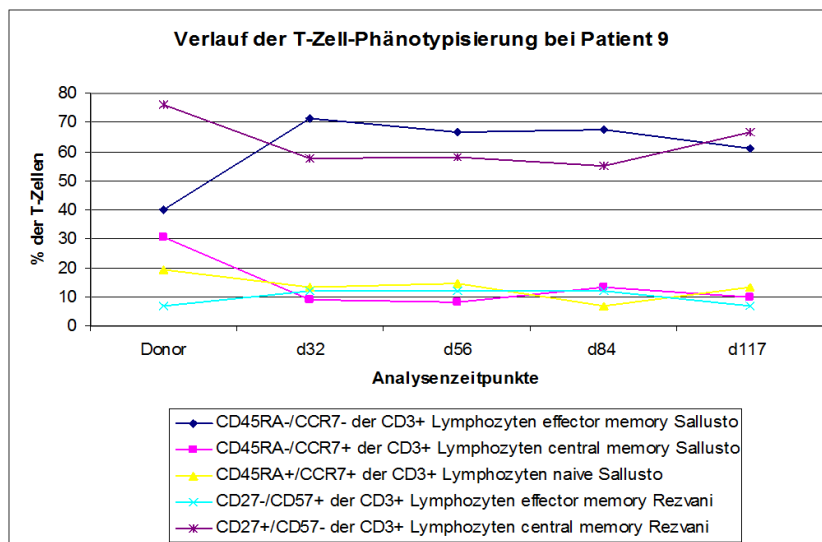


Abbildung 25: Verlauf der T-Zell-Phänotypisierung bei Patient 9

Bei 13 der 27 Patienten zeigte sich ein genau umgekehrtes Muster der beiden Definitionen: bei diesen 13 Patienten zeigten emS und cmR hohe, relativ identische Verlaufskurven und emR und cmS die niedrigere, auch fast

identische Verlaufskurven (siehe z.B. Abb. 25 von Pat.9). Bei den anderen 14 Patienten war kein solches Muster erkennbar.

Insgesamt lässt sich sagen, dass im vorliegenden Patientenkollektiv keine Übereinstimmung der beiden Definitionen nach Sallusto und Rezvani vorliegt. Auf den meisten Lymphozyten des Kollektivs werden sowohl CD3 als auch CD6 exprimiert, jedoch auch hier erwartungsgemäß mit einigen Ausreißern nach oben und unten. Auch die CD19 positiven Lymphozyten als die sich erwartungsgemäß am langsamsten rekonstitutionierende Zellgruppe zeigt einige wenige Ausnahmen von dieser Regel. Bei zwei Drittel des Kollektivs stellen die NK-Zellen die erste Rekonstitutionswelle dar, die anschließend von den T-Zellen als zweite Welle überholt werden. Diese Ergebnisse bilden gut das nicht vorselektierte Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit ab.

#### 3.3 Antigen-spezifische Immunrekonstitution

Die Rekonstitution der zytotoxischen T – Zellen nach der allogenen Blutstammzelltransplantation ist von besonderer Bedeutung, da diese Zellen wichtige Träger der zellulären Immunantwort sind. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen und bei der Kontrolle entarteter Tumorzellen. Da allogene Stammzelltransplantierte Patienten für eben solche Infektionen extrem anfällig sind, ist es wichtig, dass sich wieder zytotoxische T-Zellen bilden. Deshalb wurde bei allen Patienten und ihren Stammzellspendern getestet, ob sich nach Stimulation mit CMV – Peptiden oder Peptiden aus Tumorantigenen eine spezifische Immunantwort bei der intrazellulären FACS – Analyse mit IFN $\gamma$ , kurz ICS, zeigt.

Entsprechend ihres HLA – Typs, dem CMV – Status bei Spender und Empfänger und der Art ihrer Erkrankung wurden die Proben nach bestimmten Schemata in Bezug auf die Auswahl der Virus- und Tumorpeptide getestet. Bei dieser Auswahl spielten die potentielle Überexpression oder Mutation der einzelnen Gene und Antigene bei den verschiedenen hämatologischen Erkrankungen eine Rolle. So wird das epitheliale Tumorantigen MUC1 bei vielen hämatologischen Erkrankungen, wie z.B. beim Multiplen Myelom (MM) oder der AML überexprimiert (43). Das HM1.24 Antigen wird ebenfalls beim Multiplen Myelom überexprimiert und dient bei einigen Studien als Zielmolekül für die Immuntherapie beim Multiplen Myelom (44). Proteinase 3 ist ein mit Leukämien assoziiertes Antigen, welches in Impfstudien zu myeloischen Erkrankungen evaluiert wird (46), die Expression des Wilms Tumor Proteins WT1 findet sich bei akuten Leukämien (45). Durch darauf beruhende Überlegungen entstanden folgende Testschemata der spezifischen Immunrekonstitution:

Bei Patienten mit

- Multiplen Myelom, Plasmazellleukämie: MUC1, HM1.24, CMV
- myeloischen Erkrankungen (AML, CML, MDS, OMF): MUC1, Proteinase 3, CMV
- lymphatischen Erkrankungen (ALL, CLL): WT1, CMV

### 3. Ergebnisse

Von den 27 Patienten konnten 19 nach diesen Schemata getestet werden, für die übrigen waren entweder keine passenden Peptide für ihren HLA – Typ vorhanden oder sowohl Spender als auch Empfänger waren CMV negativ.

| getestetes Peptid  | Anzahl getesteter Patienten | Anzahl damit durchgeführter IFNgamma FACS-Analysen (5Analysen/Pat.) | davon positive Antworten |
|--|-----------------------------|---|--------------------------|
| CMVpp_65 A*0201<br>(3360/1764)                                 | 8                           | 40  | 20                       |
| CMVpp_65 A*0301  | 4                           | 20  | 0                        |
| CMVpp_65 A*6801  | 1                           | 5   | 0                        |
| CMVpp_65 B*0702<br>(3066)                                      | 4                           | 20  | 9                        |
|  |                             |   |                          |
| MUC1 A*0101<br>(50588,50589,50591,50592,50596)                 | 4                           | 20  | 0                        |
| MUC1 A*0201<br>(51005/2128)                                    | 6                           | 30  | 0                        |
| MUC1 B*0702<br>(40001,40003,40005,40009,<br>40010,40011,40017) | 3                           | 15  | 0                        |
| MUC1 B*4402<br>(50028/2132,2134)                               | 1                           | 5   | 0                        |
|  |                             |   |                          |
| WT1 A*0101<br>(40107)  | 2                           | 10  | 0                        |
| WT1 A*0201<br>(3181/0208)                                      | 3                           | 15  | 0                        |
| WT1 A*6801<br>(40042,40084)                                    | 1                           | 5   | 0                        |
| WT1 B*0702<br>(40043)  | 1                           | 5   | 0                        |
|  |                             |   |                          |
| Proteinase 3 A*0201<br>(0322, PR2)                             | 4                           | 20  | 0                        |
| Proteinase 3 B*0702<br>(40127,40145,40148,40149)               | 3                           | 15  | 0                        |
|  |                             |   |                          |
| HM1.24 A*0201<br>(40134,40135,40136,<br>40137,40138,40140)     | 1                           | 5   | 0                        |

Tabelle 9: IFNgamma - ICS - Ergebnisse

Ein Nachweis spezifischer zytotoxischer T-Zellen konnte im vorliegenden Patientenkollektiv nur für CMV gezeigt werden, nicht jedoch für tumorspezifische T-Zellen. Die 29 positiven Testergebnisse verteilen sich dabei auf insgesamt acht CMV positive Patienten. Also konnten bei acht von 19

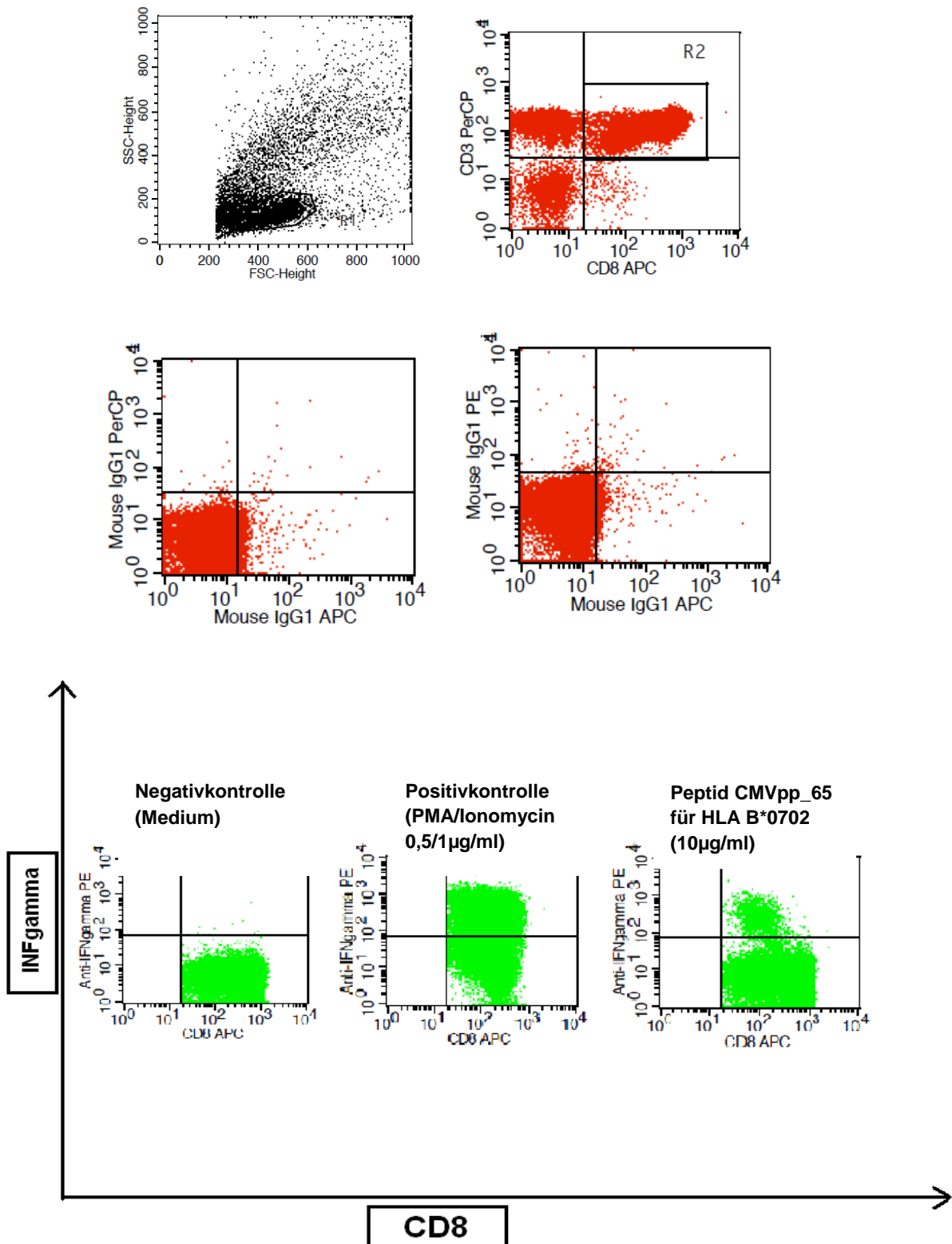
### 3. Ergebnisse

---

getesteten Patienten CMV – spezifische T-Zellen schon bis Tag 120 nach allogener Stammzelltransplantation durch die Produktion von IFNgamma nachgewiesen werden.

Als Beispiel einer solchen FACS – Analyse dient die Messung von Patient 6 an Tag 120 nach Transplantation. Positive Ergebnisse lagen für CMV pp<sub>65</sub> für HLA B\*0702 an den Tagen 60, 90 und 120 nach Transplantation vor, das stärkste positive Ergebnis wie dargestellt an Tag 120.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 26:** IFN-gamma-ICS von Patient 6 an Tag 124, Follikuläres Lymphom, CMV-Status Spender/Empfänger: neg./pos., HLA A\*2402, 6801, HLA B\* 0702, getestete Peptide: CMV pp\_65, WT1 je für HLA A\*6801 und B\*0702; Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die CMV-spezifischen T-Zellen sind in der Darstellung in der untertesten Reihe im rechten oberen Quadranten dargestellt

Bei fünf dieser acht Patienten mit IFN $\gamma$  – Produktion auf CMV – spezifische Peptide zeigte sich im weiteren Verlauf klinisch eine CMV – Reaktivierung.

In diesem Zusammenhang war es dann noch interessant, die Konstellationen zwischen Spender und Empfänger bezüglich ihres CMV – Status bei eben diesen Patienten mit IFN $\gamma$  – Produktion zu betrachten. Bei drei der acht Patienten war der Stammzellspender CMV positiv und der Patient selbst CMV negativ, bei den anderen fünf Patienten waren sowohl der Stammzellspender als auch der Patient selbst CMV positiv. Damit lagen bei allen Patienten mit IFN $\gamma$  – Produktion auf CMV – spezifische Peptide bereits beim Spender der jeweiligen Stammzellen CMV – spezifische T-Zellen vor, auch nach Transplantation waren bei den Patienten CMV – spezifische T-Zellen nachweisbar.

Bei den elf Patienten ohne CMV – spezifische T-Zellen zeigte sich bei keinem eine CMV – Reaktivierung im beobachteten Zeitraum. Bei diesen elf Patienten war die CMV – Konstellation zwischen Spender und Empfänger CMV positiv/CMV positiv, CMV positiv/CMV negativ oder CMV negativ/CMV positiv. Doch bei keinem dieser Patienten ließen sich CMV – spezifische T-Zellen nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nur bei Patienten mit Immunrestitution von CMV – spezifischen T-Zellen im klinischen Verlauf zu einer CMV – Reaktivierung kam, dagegen kam es bei keinem Patienten ohne spezifische Immunrestitution zu einer Reaktivierung von CMV. Dieses Ergebnis war so nicht unbedingt zu erwarten, da sich in der Literatur eine frühe Reconstitution von CMV – spezifischen T-Zellen meist protektiv auf eine CMV – Reaktivierung oder Erkrankung auswirkt und Patienten ohne eine solche frühe Reconstitution häufiger an einer CMV – Reaktivierung oder Erkrankung leiden (50; 51). Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die Reaktivierung durch Antigen(re)exposition zur Expansion von CMV – spezifischen T-Zellen führt, und dass ohne eine solche Reaktivierung die CMV – spezifischen T-Zellen nicht detektiert werden können, da sie unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

### 3.4 Regulatorische T – Zellen

Es wurden an allen vier Zeitpunkten bei 27 Patienten und bei zehn gesunden Zapfenspendern die CD25+/Foxp3+ Zellen der CD4+ T – Zellen, die sog. regulatorischen T-Zellen (Tregs), bestimmt. Bei den Patienten wieder sowohl als Prozent – als auch als Absolutzahlen ausgedrückt. Bei den gesunden Spendern konnten keine Absolutzahlen berechnet werden, da bei ihnen kein Differenzialblutbild zur Zellzahlbestimmung vorlag. Die Darstellung erfolgt mittels folgenden Diagramms, welches die Streuung der Werte zu den vier Analysezeitpunkten der Patienten zeigt.

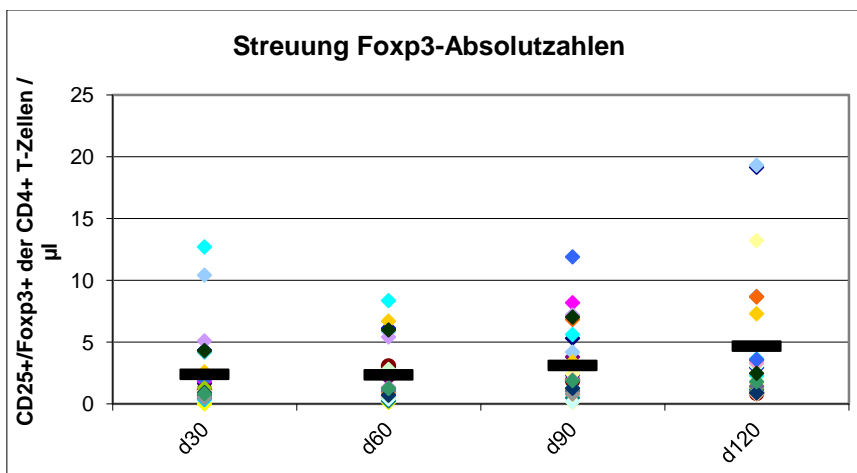


Abbildung 27: Streuung der Foxp3- Absolutzahlen  
 Jede Raute entspricht jeweils einem Zapfenspender bzw. Patienten; zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Farben für die einzelnen Rauten verwendet.

Da hier nur ein Wert und keine Gruppe mit Untergruppen, wie beispielsweise bei den Lymphozyten im Ganzen, betrachtet wurde, wurden bei den weiteren Beobachtungen die Verläufe der Absolutzahlen verwendet und mit der Klinik der einzelnen Patienten verglichen. Relevant waren hierbei drei Punkte:

- Rekonstitution der Tregs: Gab es insgesamt einen Anstieg, also höhere End- als Ausgangswerte, der Foxp3 – positiven Zellen im Verlauf, oder blieben die Werte auf ihrem Ausgangsniveau oder fielen sogar ab? Wie verhielten sich die Werte bei gesunden Spendern?
- Entwickelte sich bei den Patienten eine klinisch relevante GvHD nach der Transplantation? Dabei galt als klinisch relevant, d.h. systemisch



### 3. Ergebnisse

behandlungsbedürftig, eine GvHD Grad II bis IV und eine chronische GvHD und als negative Entwicklung keine GvHD oder eine GvHD vom Grad I.

- Zeigten sich bei den Patienten Infektionen nach der Transplantation? Als Infektion wurde Fieber nach Tag 30, ein CRP – Anstieg über den Normwert nach Tag 30 oder der direkte Erregernachweis gewertet, nicht jedoch Fieber während der Aplasie oder eine leichte klinische Infektsymptomatik ohne Notwendigkeit einer Therapie.

Dabei zeigte sich folgende Verteilung:

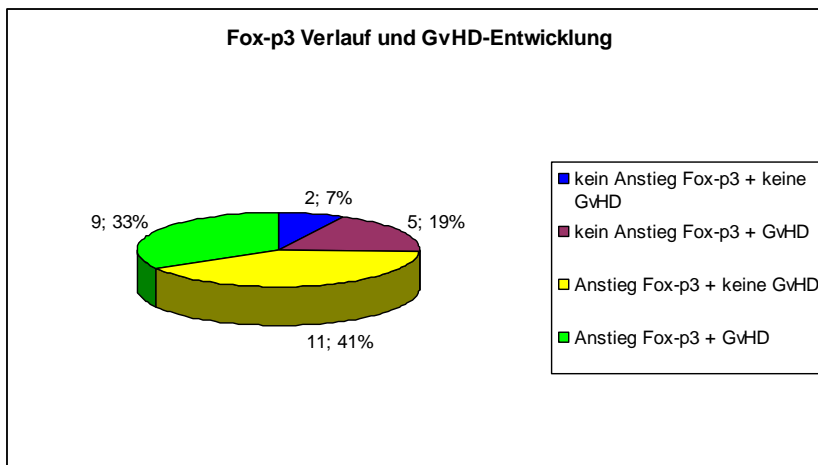


Abbildung 28: Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer GvHD

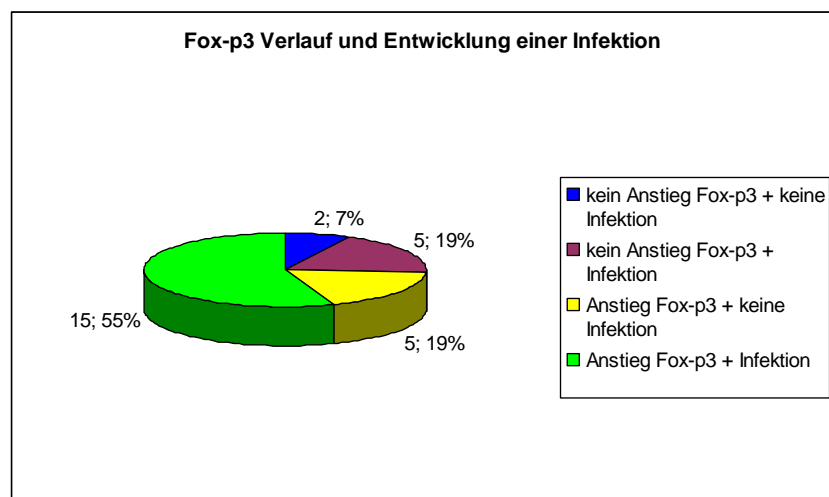


Abbildung 29: Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer Infektion

Insgesamt gab es bei 20 der 27 Patienten, also bei ca.  $\frac{3}{4}$ , einen Anstieg der Foxp3 – Werte. Von diesen 20 Patienten entwickelten elf keine GvHD, bei neun

### 3. Ergebnisse

---

Patienten zeigte sich eine GvHD. Von den sieben Patienten ohne Anstieg der Foxp3 – Werte, ca.  $\frac{1}{4}$ , kam es bei fünf Patienten zu einer GvHD – Entwicklung und bei zwei Patienten entwickelte sich keine GvHD. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass eine schnelle Rekonstitution regulatorischer T-Zellen nach Stammzelltransplantation einen gewissen Schutz vor der Entwicklung einer GvHD darstellen könnte.

Bei der Infektionsentwicklung ergab sich folgendes Bild: Bei den 20 Patienten mit Anstieg der Foxp3 – Werte entwickelten fünf Patienten keine Infektion, 15 dagegen entwickelten eine Infektion. Bei den sieben Patienten ohne Foxp3 – Anstieg kam es bei fünf Patienten zu einer Infektion, bei zwei Patienten dagegen nicht. Als Beispiel für einen Foxp3 – Verlauf dient der von Patient 16.

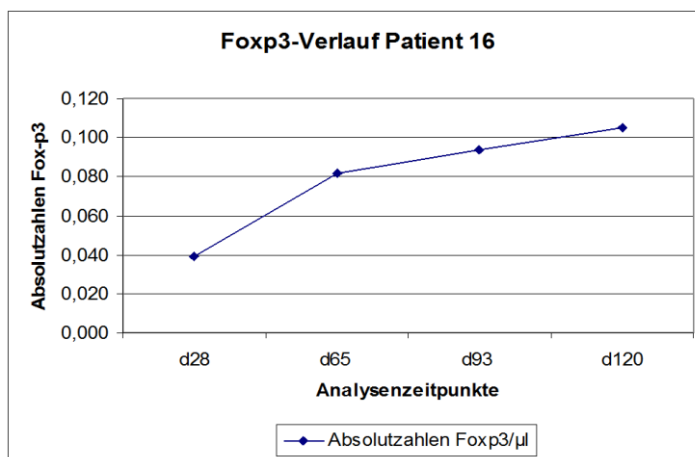


Abbildung 30: Foxp3-Verlauf bei Patient 16

**ALL, kontinuierlich ansteigende Werte nach Transplantation, keine GvHD, Infektion in Form einer behandlungsbedürftigen CMV-Reaktivierung**

Um zu zeigen, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verlauf der regulatorischen T – Zellen und der Entwicklung einer GvHD bzw. Infektion vorliegt, wurde ein statistischer Vergleich der Daten durchgeführt.

Als Nullhypothese  $H_0$  wurde dabei kein Zusammenhang zwischen dem (Nicht)Anstieg der Tregs und der Entwicklung einer GvHD oder einer Infektion angenommen und als Alternativhypothese  $H_1$  wurde ein solcher Zusammenhang vorgegeben. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  definiert. Da sowohl bei den Tregs (Anstieg ja / nein) als auch bei der Entwicklung einer GvHD bzw. Infektion (ja / nein) dichotome Daten vorlagen

### 3. Ergebnisse

und es sich insgesamt um ein eher kleines Patientenkollektiv handelte, wurde Fishers exakter Test gewählt und berechnet ([www.research.microsoft.com](http://www.research.microsoft.com)).

|                        |               |      |       |
|------------------------|---------------|------|-------|
| <b>n</b>               | 27            |      |       |
|                        |               |      |       |
|                        | Foxp3-Anstieg |      |       |
| GvHD                   | Ja            | Nein | Total |
| Ja                     | 9             | 5    | 14    |
| Nein                   | 11            | 2    | 13    |
| Total                  | 20            | 7    | 27    |
|                        |               |      |       |
|                        |               |      |       |
| <b>2 sided p-value</b> | 0,3845        |      |       |

**Tabelle 10: 4-Felder-Tafel von Fishers exaktem Test zur Signifikanzbewertung des Zusammenhangs zwischen Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer GvHD nach allogener Stammzelltransplantation**

|                        |               |      |       |
|------------------------|---------------|------|-------|
| <b>n</b>               | 27            |      |       |
|                        |               |      |       |
|                        | Foxp3-Anstieg |      |       |
| Infektion              | Ja            | Nein | Total |
| Ja                     | 15            | 5    | 20    |
| Nein                   | 5             | 2    | 7     |
| Total                  | 20            | 7    | 27    |
|                        |               |      |       |
|                        |               |      |       |
| <b>2 sided p-value</b> | 1,000         |      |       |

**Tabelle 11: 4-Felder-Tafel von Fishers exaktem Test zur Signifikanzbewertung des Zusammenhangs zwischen Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer Infektion nach allogener Stammzelltransplantation**

Beide ermittelten p – Werte liegen mit 0,3845 und 1,000 deutlich über dem geforderten Signifikanzniveau, die Nullhypothese konnte beide Male nicht verworfen und damit kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Zwar konnte beim vorliegenden kleinen Patientenkollektiv kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verlauf der regulatorischen T – Zellen und der Entwicklung einer GvHD oder einer Infektion nach allogener Stammzelltransplantation ermittelt werden, dennoch besteht eine Tendenz. Diese zeigt, dass die schnelle Rekonstitution regulatorischer T-Zellen nach Stammzelltransplantation einerseits einen Schutz vor der Entwicklung einer

GvHD darstellen könnte. Andererseits könnte diese schnelle Rekonstitution die Entwicklung einer Infektion begünstigen. Diese beiden Tendenzen rechtfertigen trotz fehlender Signifikanz auf jeden Fall die Untersuchung in einem größeren Kollektiv.

### 4. Diskussion

Nach der allogenen Stammzelltransplantation wird im Empfänger des Transplantats ein vollständig neues Immunsystem aufgebaut. Die Rekonstitution geht dabei sehr langsam von Statten und ist auch zum Teil noch nach Jahren unvollständig. Einige Zellpopulationen bauen sich früher auf, andere brauchen mehr Zeit, vor allem das adaptive Immunsystem benötigt oft Jahre zum vollständigen Wiederaufbau. In dieser Arbeit wurden deshalb bis zu einem Zeitpunkt von 120 Tagen nach allogener Stammzelltransplantation der Wiederaufbau des Immunsystems von 27 Patienten untersucht, um mögliche gemeinsame Tendenzen in dieser Phase zu erkennen und möglicherweise Rückschlüsse auf die Klinik der Patienten ziehen zu können. Um den Vergleich zur Normalbevölkerung herstellen zu können, wurden ebenfalls zehn gesunde Spender auf die verschiedenen Zellpopulationen ihres Immunsystems hin untersucht.

#### 4.1 Allgemeine Immunrekonstitution

In vielen bereits zu dieser Thematik durchgeführten Studien zeigte sich generell ein einheitliches Bild: Das angeborene Immunsystem mit den NK-Zellen zeigt von Beginn an die schnellste Rekonstitution, das adaptive Immunsystem mit den T- und B-Zellen dagegen regeneriert sich oft über Monate, manchmal auch Jahre hinweg, auch dann noch zum Teil unvollständig.

Bereits einen Monat nach Transplantation zeigt sich eine gute Rekonstitution der NK-Zellen, die so den Patienten einen ersten Grad an Immunschutz, v.a. gegen durch Viren infizierte und veränderte Körperzellen bietet (35; 52). Anders als in dieser Arbeit wurden in einigen Studien die NK-Zellen noch weiter auf ihre spezielle Zusammensetzung der Untergruppen untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei den früh dominanten NK-Zellen der Patienten eine Subgruppe, charakterisiert durch CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low</sup>, für ca. ein Jahr die dominierende Untergruppe mit einem intermediären Reifungsprofil bleibt. Diese Zellen bilden

bei einer Immunantwort besonders viel IFN $\gamma$  und können Vorläuferzellen für die reifen NK-Zellen bei Gesunden, charakterisiert durch CD56<sup>dim</sup>, sein (53; 54). Es zeigten sich auch Vorteile im Überleben von Patienten, bei denen sich die Natürlichen Killerzellen besonders früh erholten (55). Auch im vorliegenden Patientenkollektiv zeigen die CD56 und CD16 positiven Natürlichen Killerzellen, übereinstimmend mit der Literatur, von allen Zellpopulationen die schnellste Rekonstitution, die oft in den ersten 120 Tagen einen höheren Anteil an allen Lymphozyten darstellt als dies bei Gesunden der Fall ist. Bei einem Drittel der Patienten bleiben sie über den gesamten Beobachtungszeitraum die dominante Zellpopulation, bei einem weiteren Drittel zumindest bis zu Tag 60 nach Transplantation. Diese Ergebnisse zeigen also ebenfalls, dass sich das angeborene Immunsystem nach Stammzelltransplantation wesentlich schneller als das adaptive erholt und so auch den ersten Immunschutz für den Patienten darstellt. Es zeigte sich zudem bei den Ergebnissen, dass die CD56 positiven Zellen stets den höheren Anteil an den NK-Zellen als die CD16 positiven stellten. Es wäre nun interessant zu wissen, ob die stärkere CD56 positive NK-Zellpopulation mit der in der Literatur als CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low</sup> charakterisierten Zellpopulation übereinstimmt und so eine Gruppe von Vorläuferzellen für reife NK-Zellen repräsentiert (54). Es wäre deshalb sinnvoll bei den nächsten Untersuchungen auch Färbungen zur Charakterisierung von NK-Zelluntergruppen durchzuführen. Eine weitere interessante Frage war es, ob die bei Triplet et al. beschriebenen Vorteile im Überleben, der Rezidivrate oder Infektentwicklung der Patienten mit frühen hohen NK-Zellzahlen auch für das vorliegende Patientenkollektiv gelten. Acht der untersuchten 27 Patienten wiesen früh hohe NK-Zell-Werte mit >70% aller Lymphozyten auf, bei diesen acht Patienten blieben die NK-Zellen auch die dominante Zellgruppe in den ersten 120 Tagen nach allogener Stammzelltransplantation. Drei dieser acht Patienten entwickelten eine GvHD, sieben dieser acht Patienten erlitten behandlungsbedürftige Infektionen. Das zeigt, dass sich im vorliegenden Patientenkollektiv kein wesentlicher Vorteil für Patienten mit frühen hohen NK-Zellwerten in Bezug auf die Entwicklung einer GvHD oder eines Infektes zeigt. Hier könnte die Kollektivgröße von 27 Patienten im Vergleich zu 184 Patienten

bei Triplett et al eine Rolle spielen. Aussagen zur Häufigkeit eines Rezidivs können hier nur bis zum Tag 120 nach Transplantation getroffen werden, der weitere Verlauf ist nicht vorhersehbar und könnte durch einen längeren Beobachtungszeitraum besser beleuchtet werden. Prinzipiell stellt die Rekonstitution der Natürlichen Killerzellen eine der zentralen und bedeutendsten Phasen der Immunrekonstitution dar, da sie den ersten Immunschutz für den Empfänger des neuen Immunsystems beinhaltet. Deshalb ist auch zukünftig eine genauere Untersuchung dieses Abschnitts von essentieller Bedeutung und wird in weiteren Untersuchungen des hier dargestellten Kollektives im Langzeitverlauf beobachtet werden.

In bisher durchgeführten Untersuchungen erholten sich die T-Zellen zu Beginn stets langsamer, wurden jedoch bereits nach fünf bis sechs Wochen zur dominanten Zellpopulation (35), oder präsentierten sich sogar von Beginn an mit normalen Zellzahlwerten (56). Die CD3 positiven T-Zellen erreichten im gegenwärtigen Patientenkollektiv bis Tag 120 nach Transplantation nicht das Niveau von gesunden Spendern und wurden auch nur bei einem Drittel der Patienten generell die zahlenmäßig dominante Zellpopulation. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Soiffer et al. Hier zeigte sich bereits nach fünf bis sechs Wochen eine zahlenmäßig adäquate T-Zell-Rekonstitution, zudem konnte eine Diskrepanz zwischen CD3 und CD6 positiven Zellen beobachtet werden, die im hier vorliegenden Patientenkollektiv ebenfalls nicht zu finden ist. Bei den hier untersuchten Patienten zeigt sich vielmehr das gleiche Bild wie bei Gesunden, nämlich dass CD6 auf ca. 95% aller reifen CD3 positiven Zellen zu finden ist. Dieser Unterschied könnte beispielsweise mit den beiden völlig verschiedenen verwendeten Patientenkollektiven erklärt werden: Während bei Soiffer et al. alle Patienten ein HLA-identisches Transplantat von Geschwistern mit dem selben Konditionierungsprotokoll erhielten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kollektiv gewählt, indem hauptsächlich Fremdspender als Stammzellquelle dienten und auch verschiedene Konditionierungsschemata verwendet wurden. Die gewonnenen Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die T-Zellimmunrekonstitution bei anderen Stammzellspendern als Familienspendern,

eben vor allem Fremdspendern, völlig andere Ergebnisse erbringt. Deswegen erscheinen die Ergebnisse von Soiffer et al. im Familienspenderkollektiv nicht auf ein großes Fremdspenderkollektiv übertragbar. Insbesondere die Verwendung von ATG, die bei Fremdspendertransplantationen üblich ist und hier zu Unterschieden führt, die in einer größeren Studie vergleichend geklärt werden muss. Interessant wäre es, in solchen Untersuchungen dann auch ganz spezielle Kategorien gegenüberzustellen, wie beispielsweise mismatch-Stammzellspender gegen match-Stammzellspender oder HLA-passende Familienspender (matched related donor, MRD) gegen HLA-passende Fremdspender (matched unrelated donor, MUD). Weitere wichtige Vergleiche wären Transplantationen mit aus Knochenmark gewonnenen Stammzellen gegenüber solchen aus peripherer Stammzellsammlung gewonnenen Stammzellen.

Generell lässt sich aus den Ergebnissen jedoch schlussfolgern, dass bis zum Tag 120 nach Stammzelltransplantation das adaptive Immunsystem nach Fremdspender-Stammzelltransplantation zahlenmäßig nicht den Hauptteil des neuen Immunsystems des Transplantatempfängers darstellen muss, sondern vielmehr erst später wieder die entscheidende Rolle in der Immunabwehr übernehmen kann. Somit steht diesen Patienten in der Zeit nach allogener Stammzelltransplantation nur eingeschränkt die Möglichkeit, eine spezifische und sich ständig verbessernde Immunantwort auszuführen sowie ein adäquates Immungedächtnis auszubilden, zur Verfügung.

In Bezug zu den T-Zelluntergruppen kristallisiert sich meist folgendes Bild heraus: Die CD4 positiven Zellen persistieren auf einem niedrigen Zellzahlniveau, wohingegen die CD8 positiven Zellen von Beginn an die dominante T-Zelluntergruppe darstellen (56; 57). Dieses umgekehrte Verhältnis von CD4 zu CD8 Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern bleibt über längere Zeit nach Transplantation, auch bis zu zwei Jahren danach, bestehen (35). Diese niedrigen T-Helferzellzahlen legen so den Schluss nahe, dass der Immundefekt in der Posttransplantationsperiode mit auf einer fehlerhaften Antigenerkennung durch zahlenmäßig zu geringe und zudem nicht voll



ausgereifte CD4 positive Zellen beruht (56). Bei dem Wiederaufbau der T-Zellen im vorliegenden Kollektiv zeigte sich die aus verschiedenen Publikationen bekannte umgekehrte CD8:CD4 Relation (35; 53) bestätigt. Dieser anfängliche Mangel an T-Helferzellen könnte ebenfalls wiederum die zu Beginn sehr niedrigen B-Zellzahlen mit erklären und des Weiteren ein erneuter Hinweis auf die enge Beziehung bei der Rekonstitution von B- und T-Helferzellen darstellen. Bei fünf aller untersuchten Patienten gab es eine Ausnahme von der umgekehrten CD8:CD4 Relation, bei ihnen waren die CD4 positiven Zellen genauso stark oder stärker als die CD8 positiven Zellen rekonstituiert. Es wäre denkbar, dass sich hierdurch Vorteile in Bezug auf die Entwicklung einer GvHD oder Infektion ergeben könnten, doch dies traf nur bei zwei dieser fünf Patienten zu. Die fünf Patienten zeigten des Weiteren keine Übereinstimmung bezüglich ihrer Grunderkrankung, ihres Konditionierungsschemas oder ihres Stammzellspenders. Hier könnten die zwar zahlenmäßig gut vertretenen T-Helferzellen trotz ihrer hohen Zellzahl noch nicht ausgereift und so nicht voll funktionsfähig sein. Diese Tatsache würde die ungenügende Funktion der B-Zellen nach Transplantation, die in ihrer Ausreifung auf die T-Helferzellen angewiesen sind, mit erklären.

Die B-Zellen stellen die sich mit Abstand am langsamsten regenerierende Zellpopulation dar. Bei Williams et al. wurden die verschiedenen B-Zellsubtypen in ihrer Rekonstitutionsphase genauer betrachtet: Nach zwei bis sechs Monaten erholen sich zuerst die IgM-produzierenden B-Zellen, ihnen folgen nach drei bis 18 Monaten die IgG-produzierenden, abschließend nach ca. drei Jahren werden IgA-produzierende B-Zellen gebildet. Die Rekonstitution von Gedächtniszellen dauert bis zu fünf Jahren. Allerdings bleibt die Funktion dieser neu gebildeten B-Zellen für ca. ein bis zwei Jahre durch einen gleichzeitig bestehenden T-Zell-Defekt und niedrige Zahlen CD4 positiver T-Zellen beeinträchtigt (52). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die nach Stammzelltransplantation keine GvHD entwickelten, die B-Zellzahlen schneller wieder anstiegen, als bei Patienten, die eine GvHD durchmachten (53). Im hier untersuchten Patientenkollektiv zeigten die B-Zellen von allen untersuchten

Zellpopulationen eindeutig die niedrigste und langsamste Rekonstitution, was zugleich dem Zustand bei Gesunden und der Literatur entspricht. Zwar erreichten die B-Zellen schnell wieder normale Zellzahlen (ab ca. Tag 60 nach Transplantation), dennoch ergab sich kein signifikanter Vorteil bezüglich der Entwicklung von Infekten oder GvH-Reaktionen. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, dass die Unterstützung der sich zu Beginn der Immunrekonstitution ebenfalls sehr langsam regenerierenden CD4 positiven T-Helferzellen noch nicht voll zur Verfügung steht (52). Eine Ausnahme von der langsamen Immunrekonstitution der B-Zellen zeigten fünf Patienten des untersuchten Kollektivs. Sie wiesen von Beginn an hohe B-Zell-Werte und T-Helferzellzahlen gemeinsam auf. Dieser Zustand zeigt die starke Verbindung zwischen B- und T-Helferzell-Rekonstitution. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei diesen fünf Patienten bezüglich Vor- oder Nachteilen im klinischen Verlauf beobachtet werden, was dafür spräche, dass andere Zellpopulationen, wie z.B. CD8 positive Zellen, einen noch wichtigeren Einfluss auf den klinischen Verlauf der Patienten nach Stammzelltransplantation nehmen, als dies B- und T-Helferzellen tun, beziehungsweise die Funktion der Zellen eingeschränkt bleibt. Als Gemeinsamkeit dieser fünf Patienten kann lediglich erwähnt werden, dass bei ihnen jeweils ATG in ihrem Konditionierungsschema vorhanden war. Da es sich bei ATG um einen polyklonalen Antikörper handelt, der gegen menschliche T-Zellen gerichtet ist, wäre wie bei diesen fünf Patienten beschrieben zu erwarten gewesen, dass man niedrige T-Zellen und hohe Zahlen an B-Zellen während der Immunrekonstitution vorfindet. Jedoch war dieser Fall nur bei diesen fünf Patienten vorhanden, nicht bei den anderen Patienten dieser Arbeit, obwohl auch viele der restlichen Patienten ATG in ihrem Konditionierungsschema aufwiesen.

Es zeigte sich in der vorgelegten Arbeit also, dass die NK-Zellen die „erste Rekonstitutionswelle“ nach Stammzelltransplantation darstellen und so den ersten Schutz für die Patienten liefern. Die T-Zellen dagegen benötigen im hier hauptsächlich untersuchten Fremdspenderkollektiv längere Zeit zur Rekonstitution, als bisherige Untersuchungen erwarten ließen. Die B-Zellen

zeigen die langsamste Immunrekonstitution, ebenso wie die T-Helferzellen, was auf deren enge Verbindung während der Rekonstitution hindeutet. Bei sechs Patienten aus dem vorliegenden Kollektiv zeigten sich im Gegensatz zur Literatur früh hohe Zahlen an CD4 positiven Zellen sowie B-Zellen. Die hier vorgelegten Untersuchungen legen die Grundlage für eine weitere Studie, in der die Unterschiede der Immunrekonstitution nach Familien - und Fremdspender – Transplantation in Bezug auf die zelluläre Immunrekonstitution untersucht wird. Besonderes Augenmerk muss hierbei auf die Verwendung von ATG und anderen T – Zellantikörpern gelegt werden, die Unterschiede in der T – Zellrekonstitution erklären könnten.

### **4.2 T-Zell-Subtypisierung**

Bei der Rekonstitution des T-Zell – Kompartiments können neben CD4 und CD8 positiven T-Zellen auch weitere Untergruppen von T-Zellen betrachtet werden, nämlich die Gedächtniszellen, bestehend aus central memory T-Zellen, den TCM, und effector memory T-Zellen, den TEM. Deren Eigenschaften und Differenzierung war und ist Gegenstand vieler Studien und Untersuchungen. TCM sind vor allem in Lymphknoten und Tonsillen zu finden, sie haben selbst zwar nur eine limitierte Effektorfunktion, proliferieren aber beim zweiten Kontakt des Organismus mit einem bestimmten Antigen schnell, wandeln sich zu TEM um und erhalten so stets den Pool an Effektor-T-Zellen aufrecht. Die TCM bieten so einen langfristigen Immunschutz. TEM dagegen bieten einen sofortigen Schutz beim Eindringen eines Antigens in den Organismus, sie sind auch in nicht lymphatischem Gewebe, wie Lunge, Leber oder Darm zahlenmäßig stark vertreten und können dort schnell eine inflammatorische Reaktion mit Zytokinproduktion hervorrufen. Jedoch besitzen die TEM selbst nur limitierte Proliferationskapazität (58; 59).

Es gibt sehr viele verschiedene Methoden, die TCM und TEM zu detektieren, beispielsweise anhand der Oberflächenmarker, die sie exprimieren. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Definitionen der TCM und TEM verwendet:

Rezvani et al. definieren die TCM als CD45RO+CD27+CD57- und die TEM als CD45RO-CD27-CD57+ (37), Sallusto et al. dagegen definieren drei Gruppen, wobei die TCM als CD45RA-CCR7+, die TEM CD45RA-CCR7- und naive T-Zellen als CD45RA+CCR7+ festgelegt werden (36).

In der Literatur wurde gezeigt, dass sich ein lymphopenisches T-Zellkompartiment, wie es z.B. bei den hier untersuchten Patienten nach allogener Stammzelltransplantation vorliegt, auf zwei Arten rekonstituieren kann: Zum Einen Thymus-abhängig, indem naive Zellen über den Thymus reifen und emigrieren und so das T-Zellkompartiment auffüllen, zum Anderen durch eine Expansion von peripheren reifen T-Zellen. Des Weiteren ging aus dieser Arbeit hervor, dass ca. sechs Monate nach Stammzelltransplantation die ersten naiven funktionsfähigen T-Zellen beim Patienten erscheinen, nach erst ca. zwei Jahren wird dann schließlich das gleiche Verhältnis von naiven zu memory T-Zellen im Patienten wie im jeweiligen Spender durch die Expansion der naiven T-Zellen, die ausschließlich vom Stammzellspender stammen, erreicht (60). Im Patientenkollektiv dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich Trends in Bezug zu den beiden T-Zelluntergruppen TCM und TEM zeigen, und ob die beiden unterschiedlichen Definitionen nach Rezvani und Sallusto übereinstimmen. Es lässt sich dabei zeigen, dass 120 Tage nach allogener Stammzelltransplantation keine Übereinstimmung zwischen diesen beiden Klassifikationen zu finden ist. Vielmehr geht der Trend dahin, dass bei der Klassifikation nach Rezvani die TCM über den gesamten Beobachtungszeitraum ein etwas höheres Level erreichen als die TEM, bei der Definition nach Sallusto dagegen die TEM das deutlich höhere Level erreichen als die TCM und die naiven T-Zellen nach 120 Tagen die kleinste Fraktion darstellen. Dieser Zustand wirft die Frage auf, warum sich die beiden Definitionen im vorliegenden Patientenkollektiv so stark unterscheiden.

Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass die zur Definition herangezogenen Marker nicht den Schluss auf die gleichen T-Zelluntergruppen zulassen und so auch nicht die exakt gleichen Untergruppen anzeigen können. Die Definition von Sallusto stützt sich vor allem auf die beiden Marker CD45RA und CCR7. CCR7 stellt dabei einen Homing-Rezeptor dar, der die memory T-

Zellen zu sekundären Lymphorganen zurückholt, CD45RA ist ein Aktivierungsmolekül im B- und T-Zell – Signalweg. Bei der Definition von Rezvani werden neben CD45RO, ebenfalls ein Aktivierungsmolekül im B- und T-Zell – Signalweg, die Marker CD27 und CD57 verwendet. CD27 dient als TNF – Rezeptor, der für Generierung und Aufrechterhaltung der T-Zellimmunität von Bedeutung ist und auch von naiven T-Zellen exprimiert wird, CD57 wird von NK-Zellen sowie T-Zellen exprimiert und findet sich vor allem auf Zellen im aktiven Zentrum von Lymphknoten. Zwar lassen sich den Markern CD45RA und CD45RO ähnliche Eigenschaften zusprechen, dennoch unterscheidet sich beispielsweise CCR7 als Homing-Rezeptor für sekundäre Lymphorgane auch sehr stark von einem Marker wie CD57, den man schon in aktiven Zentren von Lymphknoten antrifft, wodurch eben nur ähnliche, aber nicht identische T-Zell – Kollektive abgebildet werden, die sich dann in sehr unterschiedlichen Messergebnissen äußern können.

Die beiden Definitionen von Rezvani und Sallusto wurden jeweils in größeren Kollektiven mit anderen Einschlusskriterien herausgearbeitet, sodass die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit darauf hindeuten könnten, dass die Zuordnung durch die jeweilige Definition nicht gleich auf verschiedene Kollektive anwendbar ist. Die Ergebnisse der T – Zellanalyse nach dem Sallusto – Protokoll erscheinen durch die niedrige Anzahl an TCM und hohe an TEM als die für das Fremdspenderstammzellkollektiv korrekter.

In einer Studie mit Langzeitüberlebenden (durchschnittlich 12 Jahre) nach Stammzelltransplantation zeigte sich, dass zwar normale Zahlen für die T-Zellen allgemein, die NK-Zellen und die von den B-Zellen gebildete Antikörpermenge vorlagen, die Untergruppen der T-Zellen jedoch nicht die gleiche Zusammensetzung wie vor der Stammzelltransplantation oder den jeweiligen Stammzellspendern aufwiesen: Nach 12 Jahren zeigte sich eine signifikant geringere Zahl an TCM, vor allem unter den CD4 positiven T-Zellen, und von naiven T-Zellen, sowie eine höhere Anzahl an TEM, vor allem bei den CD8 positiven T-Zellen, und Tregs. Die niedrigen Zahlen an TCM könnten dabei auf einem persistierenden Defekt im Thymus-Output bei den Langzeitüberlebenden zurückgeführt werden. Deshalb wäre für eine langfristige

Rekonstitution von T-Zellen die de novo Zellgenerierung aus einem funktionstüchtigen Thymus ebenfalls von großer Bedeutung (61). In diesem Zusammenhang gesehen, könnten beim untersuchten Patientenkollektiv 120 Tage nach allogener Stammzelltransplantation, meist noch unter bestehender Immunsuppression, eben noch Funktionsstörungen im Thymus der Patienten vorliegen, die eine einheitliche und geordnete Rekonstitution aus dem naiven Pool zusätzlich verhindern.

Des Weiteren muss man sich die Frage stellen, ob ein Beobachtungszeitraum von 120 Tagen generell zu kurz ist, da das adaptive Immunsystem, wie im vorigen Punkt beschrieben, und damit auch die TCM und TEM als sehr wichtige Bestandteile dieses Systems, Jahre braucht, um sich wieder vollständig herzustellen. Die übertragenen Stammzellen des Spenders brauchen sicherlich länger Zeit, um beim Empfänger über naive T-Zellen neue geordnete und funktionsfähige TCM und TEM zu bilden, die nach ihrer Ausreifung sicher und zweifelsfrei identifiziert werden können. Dem gegenüber steht jedoch die Tatsache, dass ein längerer Beobachtungszeitraum zwar signifikante Ergebnisse erbringen könnte, aber keine völlig neuen Aussagen an sich, da die Unterschiede zwischen den Methoden von Sallusto und Rezvani generell existieren. Zudem kann ein längerer Beobachtungszeitraum auch Schwierigkeiten mit sich bringen, wie beispielsweise Rezidive der Grunderkrankung, Infektionen, Langzeitveränderungen durch gegebene Medikamente. In der vorgelegten Arbeit wurde ein Beobachtungszeitraum von 120 Tagen gewählt, da in der Literatur nach dieser Zeit die zahlenmäßige Rekonstitution schon abgelaufen ist (55). Zudem treten in dieser Zeit besonders viele akute Infektionen und GvH – Reaktionen auf, weshalb starke Entwicklungen in der T – Zellrekonstitution vermutet wurden. Eine Verbesserungsmöglichkeit wäre, den gewählten Beobachtungszeitraum beizubehalten, aber ein größeres Patientenkollektiv an mehr als vier Analysezeitpunkten zu untersuchen, um so auch kleinere Unterschiede in der Immunrekonstitution signifikant herausarbeiten zu können.

Prinzipiell wurden die beiden Klassifikationen von Rezvani und Sallusto bisher nicht im selben Patientenkollektiv nach allogener Stammzelltransplantation miteinander verglichen. Anhand der hier vorgelegten Ergebnisse lässt sich sagen, dass sich zumindest in unserem Kollektiv die Populationen nach Sallusto und Rezvani nicht decken und somit also auch als funktionell unterschiedlich angenommen werden müssen. Augenblicklich sollte deshalb die Definition nach Sallusto als Standard angenommen werden, da diese besser funktionell belegt und weitreichend anerkannt ist. Es ist jedoch ein detaillierterer Vergleich zwischen den beiden Populationen notwendig, um definitive Aussagen zu den funktionellen Unterschieden treffen zu können, was in neuen Studien untersucht werden sollte.

### **4.3 Antigen-spezifische Immunrekonstitution**

Die CMV – Reaktivierung ist und bleibt noch immer einer der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität in der Phase des Immundefekts nach allogener Stammzelltransplantation (50). Deshalb wurde in der vorgelegten Arbeit getestet, ob man eine CMV – spezifische Immunrekonstitution anhand IFNgamma produzierender CMV – spezifischer T-Zellen schon 120 Tage nach erfolgter Transplantation erkennen kann, und ob zu diesem Zeitpunkt zusätzlich schon tumorantigenspezifische T-Zellen vorhanden sind.

Beim hier untersuchten Patientenkollektiv gab es nur bei acht von 19 getesteten Patienten positive Antworten im IFNgamma – ICS, dabei ausschließlich für CMV – Peptide, gegen die getesteten Tumorpeptide gab es dagegen keine positiven Antworten. Hierbei war auffällig, dass bei diesen acht Patienten der Stammzellspender stets einen positiven CMV – Status aufwies. Auch in der Literatur wird die CMV – spezifische Immunrekonstitution häufig thematisiert. In einer Studie wurde beispielsweise gezeigt, dass sich nach Stammzelltransplantationen, bei denen sowohl Spender als auch Empfänger CMV positiv waren, deutlich mehr multifunktionelle T-Zellen gegen CMV zeigten als bei Transplantationen mit CMV negativen Stammzellspendern, und dass diese Patienten nach der Transplantation auch weniger an antiviraler Therapie

benötigten (50). Im hier untersuchten Patientenkollektiv hatten zwar auch alle Patienten mit CMV – spezifischen T-Zellen einen CMV positiven Spender, aber auch acht Patienten ohne CMV – spezifische T-Zellen hatten einen solchen positiven Spender, diese Beobachtung, dass ein CMV positiver Stammzellspender einen positiven Einfluss auf die CMV – Reaktivierung hat, konnte hier nicht bestätigt werden. Des Weiteren zeigte sich in dieser und anderen Studien, dass Patienten, deren Stammzellspender CMV negativ ist, später eine CMV – spezifische Immunrestitution aufweisen als Patienten mit CMV positiven Spender (50; 62; 63). Diese Betrachtung korreliert gut mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen: keiner der untersuchten Patienten mit CMV negativem Stammzellspender zeigte überhaupt eine Antwort im IFN $\gamma$  – ICS auf CMV – Peptide, alle positiven Antworten stammten von Patienten mit CMV positivem Spender, sodass man diesen als eine Art Voraussetzung für eine schnelle CMV- spezifische Immunrestitution ansehen muss.

Ein weiterer Punkt, der häufig untersucht wird, ist der, ob die CMV – spezifischen T-Zellen die Patienten nach der Stammzelltransplantation vor einer CMV – Reaktivierung oder Infektion schützen. Bei einigen Autoren kam man zu dem Schluss, dass die spezifischen T-Zellen den Patienten sowohl vor einer CMV – Reaktivierung als auch vor einer neuen Infektion schützen (51), bei anderen zeigte sich als Ergebnis, dass die spezifischen T-Zellen keinen Schutz vor einer Reaktivierung bieten, sondern nur vor Infektion und Krankheit (50). Zum hier untersuchten Patientenkollektiv passt eher die zweite Beobachtung, da fünf der acht Patienten mit nachweisbaren CMV – spezifischen T-Zellen eine CMV – Reaktivierung boten, die T-Zellen dafür also keinen adäquaten Schutz darstellen konnten. Es wäre bei dieser Beobachtung allerdings auch denkbar, dass die T-Zellen hier doch einen potentiellen Schutz gegen Reaktivierung vermitteln. Denn die CMV – Last könnte bei diesen fünf Patienten niedriger sein als bei Patienten ohne CMV – spezifische T-Zellen, was Gegenstand einer neuen Arbeit sein sollte. Auch denkbar wäre, dass generell doch noch seltener Reaktivierungen auftreten als bei Patienten ohne CMV – spezifische T-Zellen. Ob über den Beobachtungszeitraum hinaus dennoch eine weitere Infektion oder



Erkrankung bei den Patienten stattgefunden hat, konnte naturgemäß in dieser Arbeit nicht untersucht werden, sollte jedoch in weiteren Untersuchungen nachgeprüft werden, um einen möglichen Infektionsschutz gegen CMV zu erkennen.

Aber auch der Status des Stammzellempfängers spielt eine wichtige Rolle bei der spezifischen Immunrestitution. Bei Lillierie et al. wurde gezeigt, dass ein positiver CMV –Status des Empfängers eine Art beschleunigte Expansion für eventuell schon mit dem Transplantat übertragene, mit dem CMV – Antigen in Kontakt gekommene T-Zellen sein kann. Bei diesen CMV positiven Empfängern verlief die CMV – spezifische Immunrestitution wesentlich schneller als bei den CMV negativen Patienten, von denen sie generell nur bei 40% stattfand (62). Beim vorliegenden Patientenkollektiv lag zehnmal die Konstellation positiver Spender / positiver Empfänger vor, dabei waren in 50% CMV – spezifische T-Zellen nachweisbar, was die These unterstützt, aber nicht definitiv sichert.

Einen weiteren wichtigen Punkt in der spezifischen Immunrestitution stellt die Art der T-Zell – Detektion selbst dar. In der vorliegenden Arbeit erfolgte diese ausschließlich über die Messung des von den spezifischen T-Zellen nach Stimulation durch ausgewählte Peptide produzierten IFN $\gamma$ . Es wäre denkbar, dass vielleicht T-Zellantworten gegen andere Epitope, präsentiert über andere HLA – Antigene bestehen. In vielen anderen Studien wird bei der Detektion der T-Zellen außerdem mindestens ein zusätzlicher Marker gemessen, wie z.B. Interleukin-2, welches mehr Informationen über die CMV – spezifischen T-Zellen bringt, da ein Mangel an Interleukin-2 die Bildung von stärker differenzierten Effektorfunktionen der T-Zellen negativ beeinflussen kann (62). Weitere Beispiele sind der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  oder das Makrophagen-Inflammatorische-Protein 1 $\beta$ , welche in multifunktionellen CD8 positiven spezifischen T-Zellen vorkommen (50). Es wäre daher zu überlegen, ob man durch die zusätzliche Messung solcher Marker weitere Erkenntnisse über die funktionelle Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation gewinnen könnte und deren Messung deshalb ferner zum IFN $\gamma$  hinzu durchzuführen wäre.

In der Literatur wurde, wie bereits beschrieben, generell als wichtigster Einflussfaktor der Stammzelltransplantation auf die CMV – spezifische T-Zell – Immunrekonstitution der CMV – Status des Stammzellspenders herausgearbeitet (62; 63): Dabei ging ein CMV negativer Spender stets mit einer verspäteten CMV – spezifischen Immunität einher, was sich gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren lässt, da auch hier nur für Patienten mit CMV positivem Spender nach 120 Tagen spezifische T-Zellen gegen CMV nachweisbar waren, bei Patienten mit CMV negativem Spender nach diesem Beobachtungszeitraum dagegen noch nicht. Überlegungen für die Zukunft wären demnach dahingehend zu treffen, bei der Auswahl der Stammzellspender, wenn möglich, noch mehr auf deren CMV – Status zu achten und dabei immer die beste Möglichkeit für den jeweiligen Patienten, also CMV positive Stammzellspender in Bezug auf den Schutz gegen CMV, auszuwählen. Denn bei der Konstellation CMV negativer Spender und CMV positiver Empfänger scheint der Boost, den die CMV – spezifischen T-Zellen durch den positiven Patienten erhalten, bei einem gleichzeitig CMV negativen Stammzellspender für eine spezifische Immunrekonstitution nicht auszureichen. Eine Besonderheit in der vorgelegten Arbeit war in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass es wider Erwarten bei allen Patienten ohne CMV – spezifische T-Zellrekonstitution keine CMV – Reaktivierung auftrat. Diese Tatsache spräche gegen einen Schutz von CMV – spezifischen T-Zellen vor einer CMV – Reaktivierung. Es wäre denkbar, dass die Patienten dennoch spezifische T-Zellen aufwiesen, die mit den Untersuchungen in der vorgelegten Arbeit jedoch nicht erfasst wurden, da sie beispielsweise mit einem anderen HLA – Antigen assoziiert sein können, welches nicht getestet wurde. Es wäre auch denkbar, dass die spezifischen T-Zellen bei den Patienten durch andere Einflüsse, wie z.B. durch Immunsuppressivgabe während der Therapie, nicht detektierbar waren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die T-Zellen im untersuchten Kollektiv unterhalb des Detektionsbereiches lagen, und erst eine CMV – Reaktivierung zu einem „Boost“ der T-Zellen und so zu ihrer Messbarkeit führt. Deshalb wäre es sinnvoll, zukünftig in einem größeren Kollektiv weitere HLA –

Antigene zu testen und etwaige Störgrößen bei den Patienten herauszuarbeiten.

Insgesamt bleibt nun noch die Frage offen, warum sich bei keinem der untersuchten Patienten eine positive Antwort auf die verwendeten Tumorpeptide zeigen lässt. Einen Grund könnte die Auswahl der Peptide darstellen. Zwar lässt sich für die ausgewählten Peptide immer eine Assoziation mit den jeweiligen hämatopoetischen Erkrankungen herstellen, dennoch könnten die Patienten spezifische T-Zellen gegen andere, in dieser Arbeit nicht getestete Antigene gehabt haben, weshalb zukünftig die Testung anderer zusätzlicher Antigene sehr sinnvoll ist. Zudem wäre es denkbar, dass die Patienten spezifische T-Zellen gegen andere HLA – Typen als die hier untersuchten besaßen, sodass auch die Testung weiterer HLA – Typen folgerichtig erscheint. Die Sensitivität der T-Zelldetektion an sich könnte ebenfalls beeinträchtigt worden sein, beispielsweise könnte die alleinige Messung von IFN $\gamma$  für tumorspezifische T-Zellen nicht ausreichen. Diese Überlegungen sollten bei weiteren Untersuchungen von tumorspezifischen T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation bedacht werden.

### **4.4 Regulatorische T-Zellen**

Die Graft-versus-Host-Disease, GvHD, ist eine der Hauptdeterminanten für das Überleben von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Dabei bestimmt das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Immunmechanismen die Inzidenz und Schwere der GvHD (64). Bei der Entwicklung und Kontrolle der GvHD spielen regulatorische T-Zellen, kurz Tregs, eine wichtige Rolle, unter ihnen insbesondere CD4+CD25+Foxp3+ Tregs. Foxp3 ist einer der Hauptregulatoren in der Entwicklung und Funktion der Tregs. Die regulatorischen T-Zellen sind ausschlaggebend für die periphere Selbsttoleranz im menschlichen Organismus, ein Verlust der Foxp3 – Funktionen beispielsweise durch Mutationen bedingt eine tödliche

Autoimmunität (65; 40). Deshalb ist es wichtig, die Funktionalität der Tregs in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation zu verstehen.

Tregs und GvHD waren schon das Thema vieler Studien, wobei sich dabei divergierende Daten in Bezug auf die Korrelation zwischen den Tregs und der Entwicklung einer GvHD zeigten. Auf der einen Seite wurde vielfach beschrieben, dass eine niedrige Anzahl an Tregs nach Stammzelltransplantation mit der Entwicklung einer GvHD einhergeht (64), oder eine hohe Treg – Anzahl die GvHD – Entwicklung weniger wahrscheinlich macht (66). Hierzu passt ebenfalls, dass eine niedrige Expression untersuchter Zellen von Foxp3 und so ein langsamer Anstieg des regulatorischen T-Zellsystems mit einer höheren Wahrscheinlichkeit, eine GvHD zu entwickeln, einhergeht (41). Auf der anderen Seite wurden auch höhere Zahlen an Tregs bei Patienten, die eine chronische GvHD entwickelten, beobachtet (39), was die immunmodulatorische Potenz der Tregs in Frage stellen würde.

Beim Patientenkollektiv dieser Arbeit konnte keine Signifikanz zwischen der Anzahl oder dem Verlauf der Tregs und der Entwicklung einer GvHD oder Infektion über einen Beobachtungszeitraum von 120 Tagen nach allogener Stammzelltransplantation hergestellt werden. Diese auf den ersten Blick willkürlich erscheinende Entwicklung der Tregs und GvHD passt in dieser Hinsicht jedoch zu divergierenden Ansichten in der Literatur, da weder der Schutz einer hohen Treg – Anzahl vor einer GvHD noch die Begünstigung der Entwicklung einer GvHD durch eine hohe Treg – Zahl bestätigt oder widerlegt werden konnten.

Es könnte mehrere Erklärungen für diese Tatsache geben: Die Tregs liegen zwar in ausreichender Anzahl vor und sind so auch an allen vier Analysezeitpunkten, oftmals auch in aufsteigender Anzahl, messbar, sie könnten dabei aber funktionell noch nicht reif genug sein, um zu so einem frühen Zeitpunkt nach Stammzelltransplantation die GvHD kontrollieren zu können. Es wäre ebenfalls denkbar, dass sie schon suppressive Funktionen besitzen, sie aber dennoch nicht bei jedem Patienten die GvHD unterdrücken. Eine mögliche Hypothese hierbei wäre, dass Tregs gut Autoimmunität kontrollieren können, sie aber nicht potent genug in der Unterdrückung der

Alloimmunität, also der GvHD, sind, da beiden unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen könnten. Einer solchen Überlegung wurde auch bei Noël et al. nachgegangen: Patienten nach Knochenmarktransplantation zeigten dort zwar einen Anstieg der Tregs, diesen Tregs war es aber nicht möglich, die GvHD – Induktion zu verhindern, sodass man zu dem Schluss kam, dass CD4+CD25+Foxp3+ Tregs das Ergebnis bei einer GvHD nicht beeinflussen und somit nicht bestimmend für die Prävention einer GvHD nach Knochenmarktransplantation sind (67). Genauere Funktionsanalysen der gemessenen Tregs könnten hierbei in Zukunft helfen.

Auch der Zeitpunkt der Blutentnahme der zur Detektion der Tregs verwendeten Proben kann für unterschiedliche oder uneinheitliche Ergebnisse bei den Patienten mit verantwortlich sein. In der vorliegenden Arbeit wurden feste Analysezeitpunkte gewählt, unabhängig davon, ob und wie lange zu diesem Zeitpunkt schon eine GvHD oder Infektion vorlag. Eine andere Möglichkeit wäre es, wie bei Lu et al., direkt nach Beginn einer GvHD noch vor ihrer Therapie die Blutentnahme durchzuführen (68), und zusätzlich dazu die einzelnen festen Analysezeitpunkte zu verwenden. Dadurch könnte man viel genauer einen Anstieg oder Abfall der Tregs mit der GvHD – Entwicklung korrelieren.

Die Definition der Tregs spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden sie als CD4+CD25+Foxp3+ Zellen definiert, da Foxp3 als Transkriptionsfaktor einen der Hauptregulatoren für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen darstellt (40). Für die Verwendung von Foxp3 als Marker spricht weiterhin, dass die im Thymus generierten Tregs in Bezug zu ihrer Entwicklung und suppressiven Funktion von einer hohen und kontinuierlichen Foxp3 – Expression abhängig sind (65). Bei Lu et al. wurden, anstatt Foxp3 in der Definition zu verwenden, die Tregs als CD4+CD25-CD69+ T-Zellen definiert, deren schneller Anstieg dort das Risiko der Entwicklung einer akuten GvHD senken konnte (68). Demnach wäre es durchaus vorstellbar, dass Foxp3 als früher Marker für Tregs bis 120 Tage nach Stammzelltransplantation noch keine einheitlichen Ergebnisse liefern kann und man auch, wie bei Lu et al. andere Definitionen der Tregs zur Messung verwenden könnte. Umgekehrt wäre es jedoch auch möglich, dass bei Lu et al. keine funktionellen Tregs

gemessen wurden, weshalb der schnelle Anstieg der gemessenen Zellen eben schon einheitliche Ergebnisse liefern konnte, aber möglicherweise nicht über funktionelle Tregs.

In einer weiteren Arbeit wurde näher auf die verschiedenen Untergruppen Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen eingegangen. Sie werden dort als eine sehr heterogene Gruppe beschrieben, die sowohl regulatorische als auch nichtregulatorische T-Zellen enthält. Deshalb sei es wichtig und notwendig qualitative und quantitative Einschätzungen über die einzelnen Foxp3<sup>+</sup> T-Zelluntergruppen vorzunehmen. Diese verschiedenen Untergruppen lassen sich anhand ihrer Expression von Zelloberflächenmarkern wie beispielsweise CD45RA oder CD45RO und dem Niveau ihrer Foxp3 – Expression einteilen (69). Bei den Messungen des vorliegenden Patientenkollektives konnte keine weitere Einteilung der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen vorgenommen werden, da nicht genug Patientenmaterial zur Verfügung stand, sodass im Hinblick auf die Arbeit von Sakaguchi et al. durchaus auch nichtregulatorische T-Zellen ohne Möglichkeit zur GvHD – Kontrolle mit gemessen worden sein können. Es wäre deshalb für zukünftige Arbeiten sinnvoll, über eine genauere Detektion der Untergruppen von Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen nachzudenken, wofür aber die Entnahmemenge für Blutproben erheblich gesteigert werden müsste, was bei schwerkranken Patienten nach allogener Stammzelltransplantation nicht ohne weiteres möglich ist.

Ein weiteres Problem, was die in der vorgelegten Arbeit fehlende Signifikanz zwischen Tregs – Verhalten und GvHD- oder Infektionsentwicklung erklären könnte, könnte die starke Heterogenität des vorliegenden Patientenkollektives im Vergleich zu den stark selektionierten Kollektiven, die meist in großen Untersuchungen in der Literatur vorliegen, darstellen. Bei den hier untersuchten 27 Patienten liegen verschiedene Arten der Stammzellspende vor, meist handelt es sich um Fremdspender, es liegen viele verschiedene Grunderkrankungen und Konditionierungsschemata vor, sodass das Kollektiv, wenn auch in einem kleinen Rahmen, gut die Situation der allogenen Stammzelltransplantation in der Klinik abbildet. Es ergaben sich zuvor keine Signifikanzen, wie in anderen Untersuchungen, dennoch lassen sich einige Trends ableiten:

Bei elf von 20 Patienten mit Anstieg der Tregs entwickelte sich keine GvHD, dagegen kam es bei fünf von sieben Patienten ohne Treg – Anstieg zur Entwicklung einer GvHD. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die schnelle Rekonstitution regulatorischer T-Zellen einen Schutz vor der Entwicklung einer GvHD darstellen könnte. Die immuninhibitorische Potenz der Tregs müsste aber durch prospektive Studien in großen Kollektiven gesichtet werden. Bei 15 der 20 Patienten mit Anstieg der Tregs kam es darüber hinaus zur Entwicklung einer Infektion, was darauf hinweist, dass die schnelle Rekonstitution der Tregs eine Infektionsentwicklung begünstigen kann. Diese beiden Tendenzen rechtfertigen auf jeden Fall die Untersuchung der Treg – Rekonstitution und GvHD- oder Infektionsentwicklung in einem größeren Kollektiv als dem hier untersuchten, was jedoch bezüglich der verschiedenen Stammzellspender, Grunderkrankungen und Konditionierungsschemata keine vorige Selektion durchlaufen haben sollte.

In der vorgelegten Arbeit lassen sich also folgende Punkte herausarbeiten, die sich von den bisherigen Ergebnissen in der Literatur unterscheiden:

Die Natürlichen Killerzellen bleiben bis zu Tag 120 nach Stammzelltransplantation die dominante Zellpopulation im untersuchten Kollektiv, wobei hier nicht wie meist in der Literatur ein Kollektiv von Familienspendern, sondern ein Fremdspenderkollektiv verwendet wurde. Dieses spiegelt besser die tatsächlich vorhandene Situation im klinischen Alltag wieder. Es sollte daher in größeren Studien ein Familienspenderkollektiv einem Fremdspenderkollektiv gegenübergestellt werden, um diese Unterschiede sicher herausarbeiten zu können.

Die Definitionen der T-Zellen nach Sallusto und Rezvani unterscheiden sich bei den stammzelltransplantierten Patienten in der vorgelegten Arbeit sehr stark voneinander. Es wäre jedoch wichtig, in zukünftigen Untersuchungen von stammzelltransplantierten Patienten eine einheitliche Definition der T – Zelluntergruppen zu verwenden, um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen. Die Definition nach Sallusto stellt hierbei aufgrund der niedrigeren

Anzahl an TCM und der höheren Zahl an TEM die Verhältnisse bei stammzeltransplantierten Patienten besser dar und sollte deshalb zukünftig in einem solchen Kollektiv verwendet werden.

Bei der Bildung CMV – spezifischer T-Zellen konnte beobachtet werden, dass nur bei Patienten mit einem CMV – positiven Stammzellspender die Bildung CMV – spezifischer T-Zellen beim Stammzellempfänger detektierbar war. Des Weiteren zeigten sich wider erwarten bei keinem Patienten ohne CMV – spezifische T-Zellen eine CMV - Reaktivierung, was gegen einen Schutz von CMV – spezifischen T-Zellen gegen eine Reaktivierung sprechen könnte. Bei der Stimulation mit tumorspezifischen Peptiden konnte keine positive Antwort gemessen werden.

Bei den regulatorischen T-Zellen konnte im untersuchten Kollektiv dieser Arbeit keine Signifikanz zwischen Anzahl oder Verlauf der Tregs und der GvHD- oder Infektionsentwicklung aufgezeigt werden. Es ergaben sich jedoch zwei Tendenzen, die weitere Untersuchungen in größeren Kollektiven rechtfertigen: die schnelle Rekonstitution von Tregs könnte einen Schutz vor der GvHD – Entwicklung darstellen (elf von 20 Patientin mit schnellem Anstieg der Tregs blieb ohne GvHD) und könnte gleichzeitig eine Infektionsentwicklung begünstigen (bei 2 dieser 15 Patienten kam es zur Entwicklung einer Infektion).



## 5. Zusammenfassung

Für viele hämatopoetische Erkrankungen, wie Lymphome oder Leukämien, stellt die allogene Stammzelltransplantation auch heute noch die einzige Heilungschance dar. Dabei ist der Wiederaufbau des Immunsystems nach der Transplantation von essentieller Bedeutung für das Überleben der Patienten. In dieser Arbeit wurden 27 Patienten nach allogener Stammzelltransplantation an vier definierten Messzeitpunkten (Tag 30, 60, 90 und 120 nach Transplantation) auf ihre Immunrestitution hin untersucht und die dabei erhobenen Daten auf gemeinsame Verläufe und eine mögliche Korrelation zur Klinik der Patienten untersucht.

Die Zellen wurden dabei anhand ihrer Oberflächenmarker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Um spezifische T-Zellen zu detektieren, wurden die Zellen zusätzlich vor dem Färben über Nacht mit spezifischen Peptiden stimuliert und dann ihre IFN $\gamma$  – Produktion gemessen. Zur Messung der Tregs wurde ein spezielles Kit zur Färbung des Markers Foxp3 verwendet.

Es zeigte sich dabei, dass die NK-Zellen die „erste Welle“ der Immunrestitution darstellen, die T-Zellen erholen sich dagegen erst später als eine Art „zweite Welle“. CD8+ zytotoxische T-Zellen sind bei den Patienten gegenüber CD4+ T – Helferzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg dominant, genau umgekehrt zu Gesunden. Die B-Zellen stellten konstant die niedrigste und sich am langsamsten regenerierende Population dar, bei kleineren untersuchten Zellpopulationen war kein einheitlicher Verlauf erkennbar. Diese Daten zeigen, dass das angeborene Immunsystem im Zeitraum nach Transplantation den Hauptschutz für die Patienten bietet, während sich das adaptive Immunsystem in seiner Größe und Funktionsfähigkeit erst über eine sehr viel längere Zeit hinweg erholt und erst später wieder die Hauptschutzfunktion für den Organismus übernehmen kann. Gängige Beschreibungen von T – Zellsubpopulationen, den central und effector memory T-Zellen nach Sallusto und Rezvani, die in der Literatur

gleichbedeutend verwendet werden, lassen sich in einem Kollektiv mit stammzelltransplantierten Patienten nicht zur Deckung bringen.

Bei der Rekonstitution von spezifischen T-Zellen konnten im Beobachtungszeitraum von 120 Tagen keine Antworten auf die Stimulation mit tumorspezifischen Peptiden gezeigt werden, eine Reaktion auf die Stimulation mit CMV – Peptiden war bei fünf Patienten zu erkennen, wobei dies nur bei Patienten der Fall war, die einen CMV positiven Stammzellspender aufwiesen, was als Voraussetzung für eine schnelle CMV spezifische T-Zellimmunrekonstitution anzusehen ist. Deshalb sollte zukünftig noch stärker auf die Auswahl der Stammzellspender bei der allogenen Stammzelltransplantation geachtet werden, um den Empfängern möglichst optimale Voraussetzungen für eine schnelle T – Zellrekonstitution und so einen möglichen Schutz gegen eine CMV-Reaktivierung zu bieten.

Bei der Rekonstitution der Tregs konnte in diesem Patientenkollektiv keine Korrelation zwischen ihrem Verlauf oder ihrer Anzahl und der Entwicklung einer GvHD oder Infektion gezeigt werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die bisher erhobenen Daten, die stets in Kollektiven mit engen Einschlusskriterien und oft ähnlichen Konstellationen was Spender und Empfänger angeht, nicht auf alle Stammzelltransplantationspatienten und Spender übertragbar sind. Es sollte daher zukünftig in größeren repräsentativen Kollektiven eine erneute Untersuchung der regulatorischen T-Zellen erfolgen.

Auch zukünftig wird die Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation Gegenstand vieler Studien bleiben, um so die Voraussetzungen für und das Outcome nach der Transplantation für die Patienten ständig zu verbessern. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bisher in der Literatur erhobenen Ergebnisse auf ein heterogenes Fremdspenderkollektiv ohne spezielle Einschlusskriterien, wie es also der Situation im klinischen Alltag am nächsten kommt, nicht übertragbar sind, sondern sich vielmehr wesentliche Unterschiede ergeben. Es sollte daher in zukünftigen Untersuchungen ein Augenmerk auf die Verwendung repräsentativerer Kollektive für die klinische Realität geachtet werden.

## Literaturverzeichnis

1. [Online] 2010. [Zitat vom: 07. Oktober 2010.]  
[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html).
2. **Heslop HE., Stevenson FK., Mouldrem JJ.** Immunotherapy of Hematologic Malignancy. *Hematology*. 2003.
3. **Wilmanns W., Huhn D., Wilms K.** *Internistische Onkologie*. Stuttgart : Thieme-Verlag, 2000. ISBN 3-13-127702-5.
4. **Gratwohl A., Baldomero H., Horisberger B., Schmid C., Passweg J. and Urbano-Ispizua A. for the Accreditation Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).** Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *BLOOD*. 01. Oktober 2002, Bd. 100, 7, S. 2374-2386.
5. **FR., Appelbaum.** Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001, Bd. 411.
6. **Priv.- Doz. Dr. Nicolaus Kröger, Prof. Dr. Dr. h.c. Axel R. Zander.** *Allogene Stammzelltherapie- Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. Bremen : UNI- MED Verlag AG, 2004. S. 30.
7. **Rubinstein P., Carrier C., Scharadavou A. et al.** Outcomes among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors. *New England Journal of Medicine*. 1998, 339.
8. **Rocha V., Cornish J., Sievers E. et al.** Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukaemia. *BLOOD*. 2001, Bd. 97.
9. **Stachel, D.** Stammzelltransplantation Teil 1: Verfahren, Indikationen, Ablauf, Fremdspende. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 1999, Bd. 147.
10. **Levesque JP., Takamatsu Y., Nilsson SK. et al.** Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony- stimulating factor. *BLOOD*. 2001, Bd. 98.
11. **Kröger N., Zeller W., Hassan HT. et al.** Steady- state mobilization of peripheral blood progenitor cells by cytokines alone in patients with solid tumors or hemtological malignancies. *Infusion Therapy and Transfusion Medicin*. 199, Bd. 26.
12. **Chao NJ., Emerson SG., Weinberg KI.** Stem Cell Transplantation (Cord Blood Transplants). *Hematology*. 2004.
13. **Aversa F., Velardi A., Tabilio A. et al.** Haploidentical stem cell transplantation in leukemia. *BLOOD Reviews*. 2001, Bd. 15.

14. **Anasetti C., Amos D., Beatty PG. et al.** Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 1989, Bd. 320 (4).
15. **Champlin RE., Horowitz MM., van Bekkum DW. et al.** Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: Risk factors and treatment results. *BLOOD*. 1989, Bd. 73 (2).
16. **Filipovich A.H., Weisdorf D., Pavletic S. et al.** National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: 1. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 11, 2005, 12.
17. **Ridell SR., Appelbaum FR.** Graft- Versus- Host Disease: A Surge of Developments. *PLoS Med* 4 (7): e198 doi: 10.1371/journal.p.med.0040198. 2007.
18. **Glucksberg RE., Storb R., Fefer A., et al.** Clinical manifestations of graft- versus- host disease in human recipients of marrow from HLA- matched sibling donors. *Transplantation*. 1974, Bd. 18.
19. **Atkinson K., Farewell V., Storb R. et al.** Analysis of late infections after human bone marrow transplantation: role of genotypic nonidentity between marrow donor and recipient and of nonspecific suppressor cells in patients with chronic graft- versus- host disease. *BLOOD*. 1982, Bd. 60.
20. **Storek J., Dawson M., Storer B. et al.** Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *BLOOD*. 2001, Bd. 97, 11.
21. **Donnall Thomas E., MD, Blume K.G., MD, Forman S.J., MD.** *Hematopoietic Cell Transplantation. Second Edition*. s.l. : Blackwell Science Inc., 1999.
22. **Lister J., Law P., Ball ED.** *Hematopoietic Stem Cell Therapy. First Edition*. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2000.
23. **Einsele H., Ehninger G., Hebart H. et al.** PCR-monitoring after BMT to reduce the incidence of CMV disease and the duration and side effects of antiviral therapy. 1995, 86.
24. **Einsele H., Hebart H., Kauffmann-Schneider C. et al.** Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. 2000, 25.
25. **Hebart H., Dagnik S., Stevanovic S. et al.** Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide- specific cytotoxic T- lymphocyte responses by interferon-gamma- enzyme- linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *BLOOD*. 2002, Bd. 99, 10.

26. **Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann.** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* s.l. : Springer-Verlag, 2000.
27. **Ring J., Zander AR., Malin JP.** *Diagnostik und Therapie von Herpesvirus-Infektionen.* Karlsruhe : G. Braun Verlag, 1995.
28. **Ljungman P., De Bock R., Cordonnier C. et al.** Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogenic bone marrow transplant recipients: A report from the Working Party for Infectious Diseases of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 1993, Bd. 12 (4).
29. **Theml, Harald.** *Taschenatlas der Hämatologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1998. ISBN 3-13-631604-5.
30. **Stefan Silbernagel, Agamemnon Despopoulos.** *Taschenatlas der Physiologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2007. ISBN 978-3-13-567707-1.
31. **Fehérvári Z., Sakaguchi S.** Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology.* 2004, Bd. 16.
32. **Piccirillo AC., Shevach EM.** Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the area of peripheral tolerance. *Seminars in Immunology.* 2004, Bd. 16.
33. **Matthews K., Lim ZY., Afzali B. et al.** Imbalance of effector and regulatory CD4 T cells is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen and alemtuzumab. *Haematologica.* 2009, Bd. 94, 7.
34. **Novitzky N., Davison GM.** Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Cytotherapie.* 2001, Bd. 3, 3.
35. **Soiffer RJ., Bosserman L., Murray C. et al.** Reconstitution of T-Cell Function After CD6-Depleted Allogenic Bone Marrow Transplantation. *BLOOD.* 1990, Bd. 75, 10.
36. **Sallusto F., Lenig D., Förster R. et al.** Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999, Bd. 401.
37. **Rezvani K., Grube M., Brenchley JM. et al.** Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *BLOOD.* 2003, Bd. 102, 8.
38. **Zorn E., Haesook TK., Lee ST. et al.** Reduced frequency of FOXP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *BLOOD.* 2005, Bd. 106, 8.

39. **Clark FJ., Gregg R., Piper K. et al.** Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *BLOOD*. 2004, Bd. 103, 6.
40. **Zhang L., Zhao Y.** The regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells: Multiple pathways on the road. *Journal of Cellular Physiology*. 2007, Bd. 211, 3.
41. **Miura Y., Thoburn CJ., Bright EC. et al.** Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *BLOOD*. 2004, Bd. 104, 7.
42. **Edinger M., Hoffmann P., Ermann J. et al.** CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nature Medicine*. 2003, Bd. 9.
43. **Brossart P., Schneider A., Dill P. et al.** The Epithelial Tumor Antigen MUC1 Is Expressed in Hematological Malignancies and is Recognized by MUC1-specific Cytotoxic T-Lymphocytes. *Cancer Research*. 61, 2001, 6846.
44. **Jalili A., Ozaki S., Hara T. et al.** Induction of HM1.24 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by using peripheral-blood stem-cell harvests in patients with multiple myeloma.
45. **King-Underwood L., Renshaw J., Pritchard-Jones K.** Mutations in the Wilms Tumor Gene WT1 in Leukemias. *BLOOD*. 87, 1996, 6.
46. **Greiner J., Bullinger L., Giunn B. et al.** Leukemia-Associated Antigens Are Critical for the Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells.
47. **Kapp, M.S.** Definition neuer MHC-Klasse-I-Epitope aus dem Tumor-assozierten Antigen MUC1 und Untersuchungen zur Bedeutung von T-Zellantworten gegen Tumor-assozierte Antigene in der Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin*. Tübingen : s.n., 2008.
48. **Dietz AB., Bulur PA., Emery RL. et al.** A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *TRANSFUSION*. 2006, Bd. 46.
49. **Rasmussen RA., Counts SL., Daley JF. et al.** Isolation and characterization of CD6 T cells from peripheral blood . *The Journal of Immunology*. 152: 527-36, 1994.
50. **Zhou W., Longmate J., Lacey SF. et al.** Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*. 2009, Bd. 113, 25.
51. **Pourgheysari B., Piper KP., McLarnon A. et al.** Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplantation*. 2009, 43, 853-861.

52. **Williams KM., Gress RE.** Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008, Bd. 21, 3.
53. **Storek J., Geddes M., Khan F. et al.** Reconstitution of the immun system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol.* 2008, Bd. 30.
54. **Dulphy N., Haas P., Busson M. et al.** An Unusual CD56bright CD16low NK Cell Subset Dominates the Early Posttransplant Period following HLA-Matched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The Journal of Immunology.* 2008, Bd. 181.
55. **Triplett B., Horwitz E., Iyengar R. et al.** Effects of Activating NK Cell Receptor Expression and NK Cell Reconstitution on the Outcome of Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation for Hematologic Malignancies. *Leukemia.* 23, 2009, Bd. 7.
56. **Galy A., Rudraraju S., Baynes R. et al.** Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets after autologous CD34+ cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.* 2000, Bd. 25, 12.
57. **Mackall CL., Fleisher TA., Brown MR. et al.** Age, Thymopoiesis, and CD4+ T-Lymphocyte Regeneration after intensiv Chemotherapy. *The New England Journal of Medicine.* 1995, Bd. 332, 3.
58. **Lanzavecchia A., Sallusto F.** Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current Opinion in Immunology.* 2005, 17: 326-332.
59. **Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A.** Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Reviews of Immunology.* 2004, 22: 745-63.
60. **Rufer N., Helg C., Chapuis B. et al.** Human memory T cells: lessons from stem cell transplantation. *TRENDS in Immunology.* 2001, Bd. 22, 3.
61. **Quan Le R., Melenhorst JJ., Battiwalla M. et al.** Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogenic stem cell transplantation. *Blood.* 2011, 117: 5250-5256.
62. **Lilleri D., Fornara C., Chiesa A. et al.** Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogenic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica.* 2008, Bd. 93, 2.
63. **Avetisyan G., Aschan J., Hägglund H. et al.** Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogenic SCT. *Bone Marrow Transplantation.* 2007, 40, 865-869.
64. **Schneider M., Munder M., Karakhanova S. et al.** The initial phase of graft-versus-host disease is associated with a decrease of CD4+CD25+ regulatory T cells in the

peripheral blood of patients after allogeneic stem cell transplantation. *Clinical and Laboratory Hematology*. 2006, 28: 382-390.

65. **Edinger M., Hoffmann P.** Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Current Opinion in Immunology*. 2011, 23: 679-684.

66. **Rezvani K., Mielke S., Ahmadzadeh M. et al.** High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006, Bd. 108, 4.

67. **Noël G., Bruniquel D., Birebent B. et al.** Patients suffering from acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation have functional CD4+CD25hi Foxp3+ regulatory T cells. *Clinical Immunology*. 2008, 129: 241-248.

68. **Lu S-Y., Huang X-J., Liu D-H. et al.** High frequency of CD4+CD25-CD69+ T cells is correlated with a low risk of acute graft-versus-host disease in allotransplants. *Clinical Transplantation*. 2012, 26: E158-E167.

69. **Sakaguchi S., Miyara M., Costantino CM. et al.** FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology* . 2010, 10: 490-500.



### **Abkürzungsverzeichnis**

|             |  |
|-------------|--|
| ~           | ungefähr                                   |
| µl          | Mikroliter                                 |
| Abb.        | Abbildung                                  |
| ALL         | Akute Lymphatische Leukämie                |
| AML         | Akute Myeloische Leukämie                  |
| APC         | Allophycocyanin                            |
| Aqua dest   | destilliertes Wasser                       |
| ATG         | Anti-Thymozyten-Globulin                   |
| Bir A       | Biotin ligase Enzym                        |
| B-Lymphozyt | Bone-Marrow-Lymphozyten                    |
| BSA         | Bovine Serum Albumin                       |
| B-Zellen    | Bone-Marrow-Zellen                         |
| ca.         | circa                                      |
| CCR7        | Chemokinrezeptor 7                         |
| CD          | Cluster of Differentiation                 |
| CLL         | Chronische Lymphatische Leukämie           |
| cmR         | central memory Zellen nach Rezvani         |
| cmS         | central memory Zellen nach Sallusto        |
| CMV         | Cytomegalievirus                           |
| CRP         | C-reaktives Protein                        |
| CT          | Computertomographie                        |
| d30         | Tag 30 (30 dient hier als Beispiel)        |
| DMSO        | Dimethylsulfoxid                           |
| DNA         | desoxyribonucleic acid                     |
| emR         | effector memory Zellen nach Rezvani        |
| emS         | effector memory Zellen nach Sallusto       |
| et al.      | et alii/aliae/alia ("und andere")          |
| FACS        | fluorescence-activated cell sorting        |
| FCS         | Fetal Calf Serum                           |
| FITC        | Fluoresceinisothiocyanat                   |
| Fmoc        | Flourenylmethoxycarbonyl                   |
| Foxp3       | Forhead Box Protein 3                      |
| FSC         | Forward Scatter                            |
| G-CSF       | Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|              |  |
|--------------|--|
| GvHD         | Graft-versus-Host-Disease                |
| HLA          | Humanes Leukozyten Antigen               |
| HM1.24       | Thetherin                                |
| HPLC         | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HSV          | Herpes simplex Virus                     |
| ICS          | intrazelluläre FACS-Analyse von IFNgamma |
| IFN gamma    | Interferon gamma                         |
| Ig           | Immunglobulin                            |
| IL-15R       | Interleukin 15-Rezeptor                  |
| iNKT         | invariant natural killer T cells         |
| Iono         | Ionomycin                                |
| kg           | Kilogramm                                |
| KG           | Körpergewicht                            |
| KIR-Rezeptor | Killer cell immunglobulin-like Rezeptor  |
| Ko.          | Kontrolle                                |
| l            | Liter                                    |
| LRSC         | Leukoreduction system chamber            |
| MDS          | Myelodysplastisches Syndrom              |
| mg           | Milligramm                               |
| ml           | Milliliter                               |
| mm           | Millimeter                               |
| MM           | Multiplés Myelom                         |
| MRD          | matched related donor                    |
| mTGR         | mechanistic Target of Rapamycin          |
| MUC1         | Mucin 1 Antigen                          |
| MUD          | matched unrelated donor                  |
| NK-Zellen    | Natürliche Killerzellen                  |
| Nr.          | Nummer                                   |
| nS           | naive memory Zellen nach Sallusto        |
| OMF          | Osteomyelofibrose                        |
| Pat.         | Patient                                  |
| PBMNC        | Peripheral Blood Mononuclear Cells       |
| PBS          | Phosphat buffered Saline                 |
| PCR          | Polymerase Chain Reaction                |
| PE           | Phycoerythrin                            |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|               |  |
|---------------|--|
| PeCy7         | Phycoerythrin-Cyanin-7   |
| PerCp         | Peridinin-Chlorophyll-Komplex                                      |
| PMA           | Proteinkinase-C-Aktivator  |
| PX            | Patient X (X dient zur Durchnummerierung, z.B. P1)                 |
| rpm           | rounds per minute  |
| RPMI          | Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial<br>Institute |
| sog.          | sogenannt  |
| SSC           | Sideward Scatter   |
| T-CBL         | T-lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom                            |
| TCM           | Central memory T-Zellen  |
| TCR           | T-Zell-Rezeptor  |
| TEM           | Effector memory T-Zellen   |
| TH1           | Typ 1 Helferzellen   |
| TH2           | Typ 2 Helferzellen   |
| T-Lymphozyt   | Thymus-Lymphozyt   |
| Tregs         | regulatorische T-Zellen  |
| T-Zellen      | Thymus-Zellen  |
| VSAA          | Very Severe Aplastic Anemia  |
| VZV           | Varizella-Zoster-Virus   |
| V $\alpha$ 24 | Oberflächenmolekül des T-Zell-Rezeptors                            |
| V $\beta$ 11  | Oberflächenmolekül des T-Zell-Rezeptors                            |
| WHO           | World Health Organisation  |
| WT1           | Wilms-Tumor-Antigen 1  |
| ZY            | Zapfenspender Y (Y dient zur Durchnummerierung, z.B. Z1)           |

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Überblick der Todesursachen in Deutschland 2008 ..... 1  
Abbildung 2: Krebsmortalität nach Organen im Jahr 2007 ..... 2  
Abbildung 3: Infektiöse Komplikationen nach Transplantation, Zeitangabe in Tagen .. 11  
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Neubauer - Zählkammer..... 28  
Abbildung 5: Verlauf CD3+ Lymphozyten ..... 40  
Abbildung 6: Verlauf CD6+ Lymphozyten ..... 40  
Abbildung 7: Verlauf CD19+ Lymphozyten ..... 41  
Abbildung 8: Verlauf CD16/56+ Lymphozyten..... 42  
Abbildung 9: Verlauf CD16+ Lymphozyten ..... 43  
Abbildung 10: Verlauf CD 56+ Lymphozyten..... 43  
Abbildung 11: Lymphozytenverlauf bei Patient 6..... 44  
Abbildung 12: Lymphozytenverlauf bei Patient 3..... 45  
Abbildung 13: Lymphozytenverlauf bei Patient 12..... 45  
Abbildung 14: Rekonstitutionsverlauf von T-Zellen und NK-Zellen..... 46  
Abbildung 15: Verlauf CD8+ T- Zellen..... 47  
Abbildung 16: Verlauf CD4 + T- Zellen..... 47  
Abbildung 17: Lymphozytenverlauf bei Patient 1..... 48  
Abbildung 18: T-Zellverlauf bei Patient 1..... 48  
Abbildung 19: Verlauf CD8+/CD4+ T- Zellen ..... 49  
Abbildung 20: Verlauf Effector Memory T-Zellen nach Sallusto..... 50  
Abbildung 21: Verlauf Effector Memory T-Zellen nach Rezvani ..... 50  
Abbildung 22: Verlauf Central Memory T-Zellen nach Sallusto ..... 51  
Abbildung 23: Verlauf Central Memory T-Zellen nach Rezvani ..... 51  
Abbildung 24: Verlauf Naive T-Zellen nach Sallusto ..... 51  
Abbildung 25: Verlauf der T-Zell-Phänotypisierung bei Patient 9 ..... 52  
Abbildung 26: IFNgamma- ICS von Patient 6 an Tag 124, ..... 57  
Abbildung 27: Streuung der Foxp3- Absolutzahlen ..... 59  
Abbildung 28: Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer GvHD..... 60  
Abbildung 29: Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer Infektion..... 60  
Abbildung 30: Foxp3-Verlauf bei Patient 16 ..... 61

**Tabellenverzeichnis**

*Tabelle 1: Patientendaten ..... 19*

*Tabelle 2: Pipettierschema zur allgemeinen T – Zell – Subtypisierung..... 31*

*Tabelle 3: Pipettierschema zur Klassifizierung der NKT - Zellen ..... 32*

*Tabelle 4: Pipettierschema zur Färbung der Regulatorischen T - Zellen ..... 33*

*Tabelle 5: Ansatzreihe zur Intrazellulären Bestimmung von IFNgamma..... 35*

*Tabelle 6: Pipettierschema zur Intrazellulären Bestimmung von IFNgamma ..... 36*

*Tabelle 7: Pipettierschema zur spezifischen T – Zell - Subtypisierung ..... 37*

*Tabelle 8: getestete Marker bei der allgemeinen Immunrekonstitution..... 38*

*Tabelle 9: IFNgamma - ICS - Ergebnisse..... 55*

*Tabelle 10: 4-Felder-Tafel von Fishers exaktem Test zur Signifikanzbewertung des  
Zusammenhangs zwischen Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer GvHD nach  
allogener Stammzelltransplantation ..... 62*

*Tabelle 11: 4-Felder-Tafel von Fishers exaktem Test zur Signifikanzbewertung des  
Zusammenhangs zwischen Foxp3 - Verlauf und Entwicklung einer Infektion nach  
allogener Stammzelltransplantation ..... 62*

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. Grigoleit bedanken, der es mir mit der Vergabe dieser Arbeit erst ermöglicht hat, überhaupt zu promovieren und so zugleich mein Interesse für das Fachgebiet der Hämatologie und Onkologie geweckt hat. Die Betreuung gestaltet sich durch seine ruhige und entspannte Art immer sehr angenehm.

Ein großer Dank gilt zudem Herrn Dr. med. Markus Kapp, der sowohl während der Arbeit im Labor als auch während der Schreibphase dieser Arbeit immer ein offenes Ohr und gute Ideen bei entstehenden Problemen hatte und den dabei entstehenden Rückfragen nie müde wurde. Vielen Dank auch an Elke Baumeister und vor allem Kerstin Kapp, die mich zu Beginn der Arbeit in alle Methoden im Labor stets geduldig eingelernt haben und mir alles für ein selbstständiges Arbeiten beigebracht haben. Sie nahmen sich immer Zeit für alle Fragen und Probleme.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich während der ganzen Zeit immer unterstützt haben, sowie bei meinem Mann, der mich mit viel Geduld und Verständnis die manchmal sehr anstrengenden Abende und Wochenenden begleitet hat und immer wusste, wie man mich doch aufmuntern und motivieren kann.

## **Sabrina Pohlmann**

---

Geburtsname Schlereth  
Geburtsdatum/ -ort 20.06.1987 in Miltenberg  
Adresse Sanderring 21  
97070 Würzburg  
Konfession katholisch

### **Schullaufbahn**

---

1993 – 1997 Grundschule Faulbach  
1997 – 2006 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wertheim  
Abiturnote: 1,1

### **Studium**

---

10/2006 – 11/2012 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/2008 Physikum, Note: 1,5  
11/2012 2.Staatsexamen, Note: 2,0  
Abschluss der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: 1,83  
Approbation

### **Praktisches Jahr**

---

Neurologie: Neurologische Klinik u. Poliklinik der Uni-Klinik Würzburg  
(Intensivstation, Stroke-Unit, Allgemeinstation)  
Innere Medizin: Medizinische Klinik u. Poliklinik der Uni-Klinik Würzburg  
(I.: Kardiologie, II.: Hämatookologie)  
Chirurgie: Uni-Klinik Würzburg:  
I.: Allgemeinchirurgie, Gefäßchirurgie  
II.: Unfallchirurgie (Poliklinik Notaufnahme)

### **Famulaturen**

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| Chirurgie:      | Rot-Kreuz-Klinik Wertheim (03/2009)  |
| Innere Medizin: | Juliusspital Würzburg (Gastroentero-, Rheumatologie)<br>(09/2009)<br>Praxis für Innere Medizin u. Dialysezentrum Würzburg<br>(03/2011)<br>Dres Schramm, Zimmermann, Netzer, Heyd-Schramm |
| Neurologie:     | Juliusspital Würzburg (09/2010)  |
| Dermatologie:   | Praxis Dres Schubert, Frank, Konrad, Eggert in Würzburg<br>(04/2011)   |

### **Berufliche Laufbahn**

---

|              |  |
|--------------|--|
| ab März 2013 | Assistenzärztin Innere Medizin Juliusspital Würzburg,<br>Abteilung Gastroenterologie/Rheumatologie |
|--------------|--|