



Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Melanie Bremm (geb. König)
aus Frankfurt

Frankfurt 2011
(D30)

Vom Fachbereich Biologie der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Gisbert Schneider

2. Gutachter: PD Dr. Ulrike Köhl

Datum der Disputation:

Forschung bedeutet, zu sehen, was alle anderen auch sehen, und zu denken, was noch niemand gedacht hat. (Albert Szent-Györgyi)

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	9
2. Einleitung	11
2.1. Das blutbildende System	11
2.2. Maligne Erkrankungen im Kindesalter und deren Therapie	12
2.3. Stammzelltransplantation (SZT)	13
2.3.1. Optionen bei der Auswahl von Stammzellspendern	14
2.3.2. Stammzellquellen bei der allogenen SZT	16
2.3.3. Infektionen nach SZT	16
2.3.4. Immunologische Spender-Empfänger Reaktionen	19
2.4. Immunrekonstitution nach SZT	22
2.4.1. T-Zellen	23
2.4.2. B-Zellen	28
2.4.3. Natürliche Killer-Zellen	29
2.4.4. Monitoring der Immunrekonstitution	31
2.4.5. Zelluläre Immuntherapien	32
3. Zielsetzung	33
4. Material und Methoden	35
4.1. Materialien	35
4.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	35
4.1.2. Software	38
4.2. Patienten und Spender	39
4.2.1. Spender der multivariaten Normwertgenerierung	39
4.2.2. Patienten	39
4.3. Labormethoden	44
4.3.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie	44
4.3.2. Phänotypisierung von Immunzellen	47
4.3.3. Messung CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) mit Hilfe der Tetramertechnologie	55
4.4. Statistische Methoden	60
4.4.1. Statistische Verfahren zur Signifikanz- und Korrelationsanalyse . . .	60
4.4.2. Verfahren zum Data-Pre-Processing	61

5. Ergebnisse	65
5.1. Entwicklung von Datenbanken für univariate und multivariate Auswertungen	65
5.1.1. Altersabhängige Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation	65
5.1.2. Multizentrische Studie zur CMV-CTL Regeneration	67
5.2. Analyse von Immunrekonstitutionsdaten	69
5.2.1. Multivariate Auswertung: Modellbeschreibung	69
5.2.2. Ergebnisse: Rekonstitution von Leukozytensubgruppen im Hinblick auf das Überleben	72
5.2.3. Immunrekonstitution und Impfschutz nach intensiver Chemotherapie	74
5.3. Rekonstitution von CMV-CTLs nach allogener SZT	75
5.3.1. Bestimmung der Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT mit Hilfe der Tetramertechnologie	75
5.3.2. CMV-CTL Rekonstitution im Hinblick auf eine CMV-Reaktivierung	78
5.3.3. Einfluss der Transplantataufreinigung auf die Rekonstitution von CMV-CTLs	80
5.3.4. Dominanz der Immunantwort bestimmter CMV-spezifischer Tetramere	80
5.4. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT	84
5.4.1. Bestimmung von Tregs im peripheren Blut gesunder Individuen mittels 10-Farb-Durchflusszytometrie	84
5.4.2. Vergleich durchflusszytometrischer Methoden zur Treg Bestimmung mit Hilfe von 5-Farb-Durchflusszytometrie	85
5.4.3. Rekonstitution von Tregs im Hinblick auf GvHD und Rezidiventwicklung	87
6. Diskussion	91
6.1. Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation	91
6.2. Applikation und Optimierung adoptiver Zelltherapien	92
6.3. Multivariate und univariate Auswertungen zur Immunrekonstitution	94
6.4. Rekonstitution CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) nach allogener SZT	98
6.4.1. Bestimmung von CMV-CTLs mit Hilfe der Tetramertechnologie . .	98
6.4.2. Wie viele CMV-CTLs braucht ein Patient zum Schutz vor einer CMV-Reaktivierung?	99
6.4.3. Dominanz von HLA-Merkmalen/ CMV-Epitopen	100
6.4.4. Faktoren, welche die CMV-CTL Regeneration beeinflussen	101
6.5. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT	103
6.5.1. Durchflusszytometrische Bestimmung von Tregs	103
6.5.2. Faktoren, die Einfluss auf die Rekonstitution von Tregs nehmen . .	104

7. Ausblick	107
8. Literaturverzeichnis	109
9. Abbildungsverzeichnis	123
10. Tabellenverzeichnis	125
11. Abkürzungsverzeichnis	125
Anhang	129
A. Cluster of Differentiation (CD)-Marker	133
B. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge	135
B.1. Erstautorenschaften in Peer-Reviewed Journals	135
B.2. Co-Autorenschaften in Peer-Reviewed Journals	136
B.3. Kongressbeiträge	136
C. Danksagung	137
D. Eidesstattliche Erklärung	139
E. Lebenslauf	141

1. Zusammenfassung

Eine verzögerte und mitunter unvollständige Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) birgt ein erhöhtes Risiko für Infektionen und das Auftreten eines Rezidivs. Adoptive Immuntherapien können dazu beitragen, die Immunrekonstitution zu beschleunigen. Die Indikation hierzu ist jedoch streng geregelt, da eine zusätzliche Immuntherapie mit Risiken, wie z.B. dem Auftreten einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD), verbunden ist.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der Immunrekonstitution im Hinblick auf das Auftreten von Komplikationen und das Überleben nach SZT. Dazu wurde ein multivariates Normwertmodell entwickelt, das die Beurteilung der Rekonstitution verschiedener Leukozytensubpopulationen ermöglicht. Der Einfluss der Regeneration spezifischer Immunzellen wie Cytomegalievirus-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) und regulatorischer T-Zellen (Tregs) auf den Verlauf nach SZT wurde insbesondere hinsichtlich CMV-bedingter Komplikationen, GvHD und Rezidiv untersucht.

Basierend auf Leukozytensubgruppen von gesunden Spendern (80 Kinder, 20 Erwachsene) wurde ein ellipsenförmiges Normwertmodell generiert. An einer Gruppe von 32 Patienten wurde geprüft, in welchem Zeitraum nach SZT sie den Normwertbereich erreichen und ob ein Einfluss verschiedener Aspekte der Immunregeneration auf die Überlebenswahrscheinlichkeit besteht. Ziel war es, zu prüfen, ob mit Hilfe dieses Modells frühzeitig Patienten mit einem höheren Risiko identifiziert werden können. Patienten, die das Normwertellipsoid zu den Klassifikationszeitpunkten 200 bzw. 300 Tage nach SZT erreicht hatten und mindestens einen Monat stabile, im Normwertbereich liegende Werte aufwiesen (Niedrigrisiko-Gruppe), zeigten eine bessere Überlebensrate als die restlichen Patienten (Hochrisiko-Gruppe). Bei der Klassifikation an Tag 200 nach SZT beinhaltete die Niedrigrisiko-Gruppe 18 Patienten, von denen 13 überlebten. In der Hochrisiko-Gruppe überlebten drei von 14 Patienten ($p=0,001$). Durch die Klassifikation 300 Tage nach SZT wurden elf Patienten der Hochrisiko-Gruppe zugeteilt. Alle elf Patienten verstarben. In der Niedrigrisiko-Gruppe überlebten 16 von 21 Patienten ($p<0,0001$)¹.

Die Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT kann einen Patienten vor einer CMV-Reaktivierung und CMV-bedingten Komplikationen schützen. In einer multizentrischen Studie mit der Medizinischen Hochschule Hannover und Internisten der Universitätsklinik Frankfurt wurde die Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT mit Hilfe von sechs

1. Zusammenfassung

verschiedenen HLA-spezifischen Tetramerkomplexen bestimmt. 110 der 201 betrachteten Patienten (55%) regenerierten zwischen 1 und 1235 CMV-CTLs/ μ l. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Anzahl gemessener CMV-CTLs für die einzelnen Tetramere. Die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion erwies sich als negativ im Hinblick auf das Überleben der Patienten nach SZT. Patienten, die zu einem frühen Zeitpunkt mindestens 1 CMV-CTL/ μ l regenerierten, zeigten signifikant seltener eine CMV-Reaktivierung als Patienten mit verzögerter oder ausbleibender CMV-CTL Rekonstitution. Bei Patienten, deren HLA-Merkmale mit mehreren Tetrameren übereinstimmten, wurden Analysen bzgl. der Dominanz einzelner Tetramere durchgeführt. Dabei wurden auch zwölf Patienten identifiziert, bei denen sich die Dominanz im Laufe der CMV-CTL Regeneration änderte.

Um den Zusammenhang zwischen der Rekonstitution von Tregs und dem Auftreten von GvHD oder Rezidiv nach SZT zu untersuchen, wurden CD25⁺CD127^{neg/dim} Tregs im peripheren Blut von 16 Patienten bestimmt. Bei allen Patienten zeigte sich eine Reduktion in der CD127 Expression kurz nach SZT. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein auf 10-Farb-Durchflusszytometrie basierender Ansatz zur Bestimmung von Tregs und Treg-Untergruppen etabliert. Dabei zeigten zehn gesunde Individuen im Median 6,4% CD25^{bright} und 7,5% CD25⁺CD127^{neg/dim} Tregs.

Innerhalb der ersten zwei Monate nach SZT liegt der prozentuale Anteil an Tregs von Patienten im Median zwischen 10 und 20%. Bei Patienten ohne GvHD oder mit GvHD Grad I nimmt dieser Prozentsatz innerhalb der nächsten zwei bis drei Monate wieder ab. Er erreicht mit 7-8% einen Wert, der mit dem Median der gesunden Spender vergleichbar ist. Patienten ohne GvHD zeigten signifikant niedrigere Treg-Prozentwerte als Patienten zum Zeitpunkt einer GvHD Grad II-IV ($p < 0,01$) oder Rezidivpatienten ($p < 0,001$).

Im Vergleich zu Patienten mit einer GvHD Grad II-IV stiegen die Treg-Absolutwerte im Verlauf der Immunrekonstitution schneller bei Patienten ohne GvHD ($p < 0,5$).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, ein multivariates Modell zu generieren, mit dem Patienten mit schneller Immunrekonstitution von solchen mit langsamer Regeneration unterschieden werden können. Weitere Arbeiten in einem größeren Patientenkollektiv müssen zeigen, ob man dieses oder ähnliche Modelle zur Therapieintervention einsetzen könnte. Die Untersuchungen über die Rekonstitution spezifischer T-Zellen können darüber hinaus einen Beitrag zur Therapiesteuerung leisten und eine Integration dieser Subpopulationen könnte zur Verbesserung des multivariaten Modells beitragen.

2. Einleitung

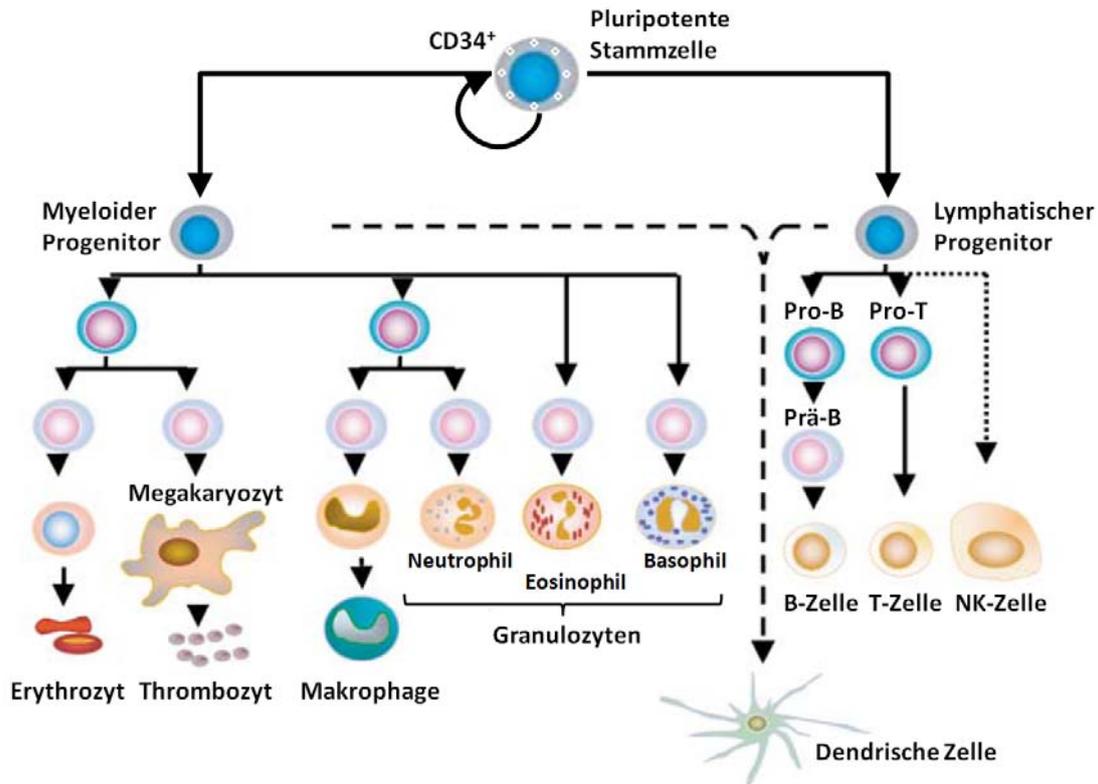
2.1. Das blutbildende System

Das Blut besteht aus Plasma und zellulären Bestandteilen, den Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen). Diese werden zum größten Teil im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Neben der Ausreifung zu Blutzellen haben diese hämatopoetischen Stammzellen auch die Möglichkeit sich selbst zu erneuern. Die Differenzierung zu reifen Blutzellen wird Hämatopoese genannt und kann durch Wachstumsfaktoren wie z.B. Erythropoetin, Interleukine und Kolonie-stimulierende Faktoren gesteuert werden. Aus der pluripotenten Stammzelle entwickeln sich myeloische und lymphatische Progenitorzellen. Myeloische Vorläuferzellen können zu Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen differenzieren. Aus multipotenten lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich T-Zellen (s. 2.4.1), B-Zellen (s. 2.4.2) und Natürliche Killer (NK)-Zellen (s. 2.4.3) (Abb. 2.1). Dieser Vorgang wird als Lymphopoese bezeichnet und findet im Gegensatz zur Myelopoese nicht ausschließlich im Knochenmark statt, da T-Zellen zur Reifung in den Thymus abwandern³⁻⁵. Dendritische Zellen können sowohl einen lymphatischen als auch einen myeloischen Vorläufer haben².

Die gebildeten lymphatischen Blutzellen lassen sich der angeborenen und der erworbenen Immunität zuordnen. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr von Krankheitserregern und ist hochkonserviert über verschiedene Spezies. Sie basiert hauptsächlich auf dem Mechanismus der Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. T-Zellen und B-Zellen sind Vertreter der erworbenen Immunität. Eine wichtige Rolle in der erworbenen Immunität spielen hochspezifische Rezeptoren, sowie die Generierung von Antikörpern durch B-Zellen⁶. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität, die sofort verfügbar ist, kann es mehrere Tage dauern, bis die spezifische Antwort der erworbenen Immunität erfolgt. Ist die spezifische Immunantwort gebildet, so entstehen nach Abklang der Infektion sogenannte Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger schnell zur Verfügung stehen^{7,8}.

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems können anhand ihrer Oberflächenmoleküle, den sogenannten *Cluster of Differentiation* (CD)-Markern beschrieben und durchflusszytometrisch charakterisiert werden (die hämatopoetische Stammzelle z.B. trägt u.a. CD34).

2. Einleitung



Entnommen aus: Larsson und Karlsson, *Oncogene*, Aug 2005.

Abbildung 2.1.: Hämatopoese². Bildung der Blutzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Aus myeloiden Vorläufern entwickeln sich Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Granulozyten. T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen entstehen aus lymphatischen Progenitorzellen. Dendritische Zellen können sowohl aus myeloiden, als auch aus lymphatischen Vorläufern gebildet werden.

2.2. Maligne Erkrankungen im Kindesalter und deren Therapie

Krebs ist ein Oberbegriff für eine Vielzahl maligner (bösartiger) Erkrankungen die meist durch verändertes, unkontrolliertes Wachstum von Zellen geprägt sind. In Deutschland erkranken jährlich ca. 1800 Kinder unter 15 Jahren an Krebs⁹. Die häufigste Krebsart im Kindesalter ist die Leukämie, von der mehr als 1/3 aller krebskranken Kinder betroffen sind. Sie entsteht, wenn die Hämatopoese durch einen Fehler frühzeitig unterbrochen wird und es dadurch zur Produktion einer Vielzahl unreifer Leukozyten (Blasten) und zur Verdrängung funktionstüchtiger Leukozyten kommt. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Leukämien, wobei die chronische Form im Kindesalter nur sehr selten auftritt. Zu den akuten Leukämien zählen die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die akute myeloische Leukämie (AML). Beide Erkrankungen ent-

stehen durch maligne Transformationen von frühen lymphatischen (ALL) oder myeloiden (AML) Vorläuferzellen. Im Gegensatz zur AML, die 80% aller Leukämien im Erwachsenenalter ausmacht, erkranken mehr als 80% aller pädiatrischen Leukämiepatienten an einer ALL¹⁰.

Die Therapie beginnt mit einer intensiven, kombinierten Chemotherapie, deren Ziel es ist, innerhalb weniger Wochen 99% der Blasten zu zerstören und dadurch die sogenannte Remission zu erreichen. Im Anschluss folgt eine Dauertherapie mit chemotherapeutischen Medikamenten, um die Remission zu erhalten. Diese Therapie umfasst etwa einen Zeitraum von 2 Jahren und ca. 80% aller an ALL erkrankten Kinder können damit geheilt werden⁹. Für Patienten, bei denen das beschriebene Verfahren nicht zum Erfolg führt oder die einen Rückfall (Rezidiv) erleiden, stellt die Stammzelltransplantation eine erfolgreiche Therapieoption dar.

Neben Leukämien treten auch solide Tumoren im Kindesalter auf wie z.B. das Neuroblastom oder das Rhabdomyosarkom. Behandelt werden diese Erkrankungen durch Operation, Chemotherapie und Bestrahlung. Sehr invasive Formen können mit einer Hochdosis-Chemotherapie behandelt werden. Dieser Behandlung folgt zwingend die Stammzelltransplantation, da sich diese Form der Chemotherapie schädigend auf das Knochenmark (myelotoxisch) auswirkt¹⁰.

2.3. Stammzelltransplantation (SZT)

Die Möglichkeit einer Stammzelltransplantation (SZT) hat die Überlebenschancen von Kindern mit Hochrisiko-Leukämien deutlich verbessert und ist ein wichtiger Bestandteil vieler hämato-onkologischer Therapieprotokolle. Für Patienten mit lebensbedrohlichen nicht-malignen Erkrankungen, wie z.B. schweren Immundefekten, stellt sie die einzige kurative Therapiemöglichkeit dar. Man unterscheidet zwischen autologer und allogener SZT. Bei der autologen SZT werden dem Patienten eigene Stammzellen vor einer Hochdosis Chemotherapie zur Behandlung besonders maligner Erkrankungen (z.B. solider Tumoren) entnommen. Diese Zellen werden kryokonserviert und ihm nach der Intensivtherapie, welche eine schädigende Wirkung auf das Knochenmark nimmt, wieder verabreicht. Durch die Transplantation der autologen Zellen kann die Funktion des blutbildenden Systems wiedergewonnen werden.

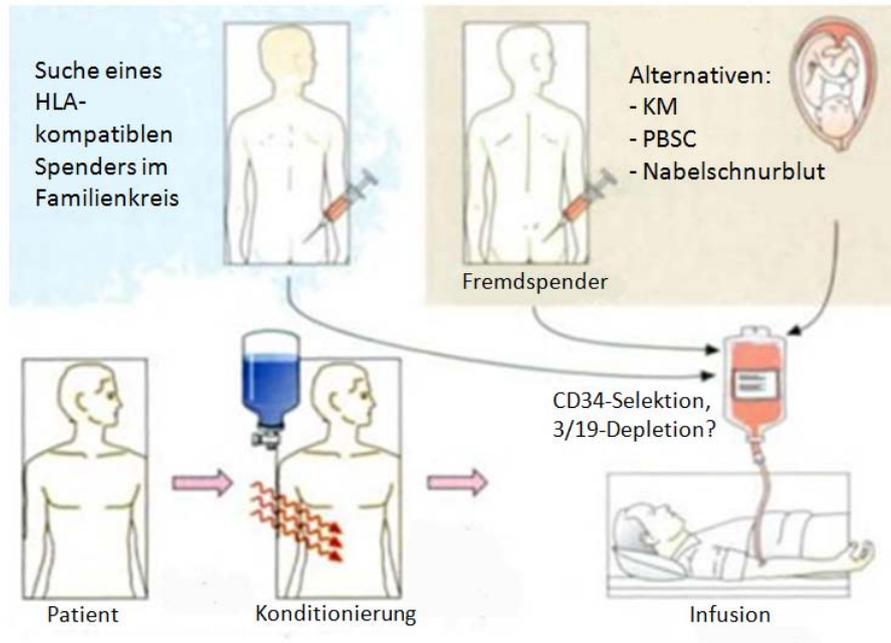
Bei der allogenen SZT werden dem Patienten Stammzellen eines gesunden Spenders übertragen. Sie wird hauptsächlich bei Leukämien und schweren nicht-malignen Erkrankungen angewendet, findet aber in den letzten Jahren auch häufiger Anwendung in der Behandlung solider Tumoren nach erfolgloser autologer Transplantation.

Vor der Transplantation muss eine Konditionierung stattfinden (Chemotherapie mit oder

2. Einleitung

ohne Bestrahlung) zur Eradikation der Empfänger-Hämatopoese und in der allogenen SZT, um schwere immunologische Komplikationen zu vermeiden.

Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Ablauf einer allogenen SZT.



Entnommen aus: Antonio Pezzutto, Taschenatlas der Immunologie, Thieme Verlag, 2006.

Abbildung 2.2.: Allogene Stammzelltransplantation⁶. Zunächst wird nach einem geeigneter Familien- oder Fremdspender gesucht (s. 2.3.1). Vor der Transplantation erhält der Patient eine Konditionierung. Als Stammzellquelle werden häufig Knochenmark (KM) oder periphere Blutstammzellen (PBSC) ausgewählt. Nabelschnurblut wird in Deutschland nur selten als Stammzellquelle eingesetzt. Bei Bedarf kann das Präparat vor der Gabe immunomagnetisch aufgereinigt werden (z.B. durch eine CD34-Selektion oder CD3/CD19-Depletion) (s. 2.3.2)

2.3.1. Optionen bei der Auswahl von Stammzellspendern

Bei der allogenen SZT werden dem Empfänger Stammzellen eines fremden Spenders infundiert. Dabei spielt die Übereinstimmung bestimmter Gewebemerkmale, den sogenannten Major Histocompatibility (MHC)-Molekülen, die beim Menschen auch Histokompatibilitätsantigene (HLA) genannt werden, eine wichtige Rolle. Die Funktion der HLA-Moleküle besteht darin, antigene Peptide zu binden und diese dem Immunsystem zu präsentieren¹¹. Man kennt zwei Klassen von HLA-Molekülen, die beide auf Chromosom sechs codiert werden und hoch polymorph sind. HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren Fragmente intrazellulärer Proteine. Zu ihnen gehören die Untergruppen HLA-A, HLA-B und HLA-C. HLA-Klasse-II-

Moleküle werden auf allen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) (dendritische Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen) exprimiert und präsentieren prozessierte Antigene, die via Endozytose/Phagozytose aufgenommen wurden¹². Die Gruppe der HLA-Klasse-II-Moleküle beinhaltet die Molekülklassen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP¹³. Sowohl HLA-Moleküle, als auch die durch sie präsentierten Peptide können aufgrund genetischer Polymorphismen für das Immunsystem des Empfängers fremd sein. Die Erkennung von HLA-Molekülen als fremd geschieht hauptsächlich über den T-Zellrezeptor, welcher in der Lage ist, strukturelle Konfigurationen zu erkennen, die über verschiedene Allele konserviert sind¹⁴. Stimmen die HLA-Moleküle von Spender und Empfänger nicht überein, können die T-Zellen des Transplantats Empfängerzellen als fremd erkennen (s. GvHD (2.3.4)). Aber auch residuale Empfänger-Lymphozyten nach der Konditionierung können das Transplantat als fremd erkennen (s. Abstoßung (2.3.4)). Deshalb ist es sehr wichtig, einen Spender zu finden, der in seinen HLA-Merkmalen mit dem Empfänger übereinstimmt. Bei Geschwistern liegt die Wahrscheinlichkeit, dass sie HLA-ident sind bei ca. 25%. Wird in der Familie kein passender Spender gefunden, ist es möglich, weltweit in Datenbanken nach einem passenden Fremdspender zu suchen (z.B. DKMS¹⁵). Kann kein passender Spender gefunden werden, so wird die Priorität der HLA-Kompatibilität in der Reihenfolge DR – B – A – C gesetzt⁶. Andernfalls werden auch Spender ausgewählt, die mit dem Empfänger in 2-5 von 10 HLA-Merkmalen nicht übereinstimmen. Man spricht dann von der sogenannten „haploidenten Transplantation“. Eine Indikation zur haploidenten Transplantation besteht, wenn kein passender Spender gefunden werden konnte oder dieser sehr schnell benötigt wird. Des weiteren wird diese Transplantationsart bei Patienten mit sehr schlechter Prognose eingesetzt, da man sich ein aggressives Vorgehen der haploidenten Zellen gegen residuale Tumorzellen oder Leukämiezellen erhofft (s. Graft-versus-Tumor-Effekt / Graft-versus-Leukämie-Effekt (2.3.4)). In den meisten Fällen spenden Eltern für ihre Kinder, seltener werden erwachsene haploidente Geschwister oder Fremdspender ausgewählt. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht in Frage kommender Spender.

HLA-Matching	Familienspender	Fremdspender
10/10 oder 9/10	MFD* (Matched Family Donor)	MUD (Matched Unrelated Donor)
≤8/10 - Haploident	MMFD (Mismatched Family Donor)	MMUD (Mismatched Unrelated Donor)

* Bei einem HLA-identen Geschwisterspender wird anstatt MFD auch der Begriff MSD (Matched Sibling Donor) verwendet.

Tabelle 2.1.: Spenderauswahl.

2.3.2. Stammzellquellen bei der allogenen SZT

Man unterscheidet drei Stammzellquellen: Knochenmark (KM), periphere Blutstammzellen (PBSC) und Nabelschnurblut. Das Knochenmark wird dem Spender unter Vollnarkose vor der Transplantation aus dem Beckenknochen entnommen. Bei einer PBSC-Spende wird dem Spender fünf Tage lang der Wachstumsfaktor G-CSF verabreicht. Dieser Faktor wird vom Körper auch selbst gebildet, stimuliert die Produktion der Stammzellen und bewirkt die vermehrte Ausschüttung von Stammzellen ins periphere Blut. Diese Stammzellen können dann über ein ambulantes Verfahren, das Apherese genannt wird, aus dem Blut gesammelt werden. Die Verwendung von Nabelschnurblut wird in Deutschland seltener eingesetzt, da die Anzahl der enthaltenen Stammzellen oftmals zu gering ist und in Deutschland wenig Erfahrung damit vorliegt.

Entscheidet man sich für PBSC als Stammzellquelle, gibt es verschiedene Verfahren, die zur Aufreinigung der Zellen vor der Transplantation verwendet werden. Hierzu gehören z.B. die CD34-Selektion und die CD3/CD19-Depletion. Häufig werden diese Verfahren angewendet, wenn Spender und Empfänger nicht HLA-ident sind, da hierdurch das Auftreten immunologischer Komplikationen reduziert werden kann. Beide Methoden basieren auf der Markierung von Zellen mit Antikörpern, die mit Magnetkügelchen verbunden sind. Mit Hilfe einer magnetischen Säule wird im Anschluss die markierte Zellfraktion von den nicht-markierten Zellen separiert. Bei der CD34-Selektion handelt es sich um eine Positivanreicherung reiner $CD34^+$ Stammzellen, die dem Patienten im Anschluss verabreicht werden. Dieses Verfahren kann analog mit dem Stammzellmarker CD133 durchgeführt werden (CD133-Selektion). Bei der CD3/CD19-Depletion werden T- und B-Zellen markiert, von den restlichen Zellen getrennt und verworfen. Der Empfänger bekommt ein Transplantat, das Stammzellen, NK-Zellen und antigenpräsentierende Zellen enthält, aber nur noch residuale T- und B-Zellen beinhaltet. T-Zellen werden zur Vermeidung einer GvHD (s. 2.3.4) und B-Zellen zum Schutz vor lymphoproliferativer Erkrankungen entfernt. Man verspricht sich von der 3/19-Depletion, dass die zusätzlich zu den Stammzellen enthaltenen Leukozyten ein schnelleres Engraftment (s. 2.4) und einen gesteigerten GvT/GvL Effekt (s. 2.3.4) ermöglichen^{16,17}.

2.3.3. Infektionen nach SZT

Nach einer SZT haben Patienten ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Während der Konditionierung und in der Zeit bis zum *Engraftment* werden sehr wenig Immunzellen gebildet. In der darauf folgenden Phase muss ein Schutz gegen Erreger erst wieder aufgebaut werden. Aus diesem Grund können auch Infektionen, die bei einem gesunden Menschen harmlos oder sogar unbemerkt verlaufen für einen Transplantierten lebensbedrohlich werden.

Die Patienten erhalten in der frühen Phase nach SZT entweder prophylaktisch Medikamente gegen nosokomiale Infektionen oder beim Auftreten einer Infektion Antibiotika, Virostatika oder Antimykotika. Besonders gefährlich sind Infektionen mit Viren, die auch durch die Reaktivierung einer latenten Infektion ausgelöst werden können. In vielen Fällen liegen das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und/oder Adenoviren latent vor. Neben bakteriellen und viralen Infektionen stellen auch Pilze wie z.B. Candida und Aspergillus während des ersten Jahres nach SZT eine große Gefahr dar. Abbildung 2.3 zeigt in welchem Zeitraum nach SZT welche Infektionen gehäuft auftreten^{13,18}.

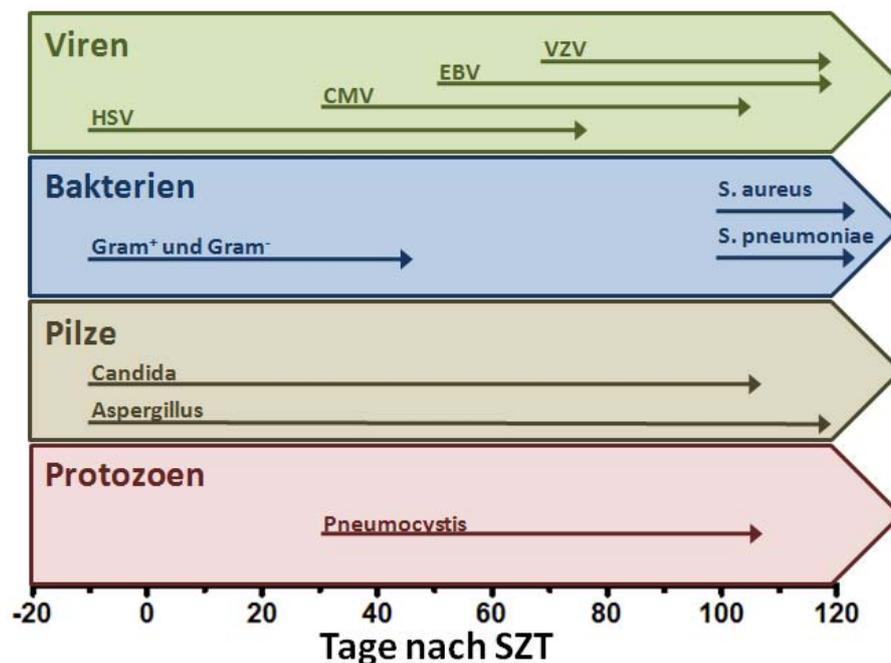
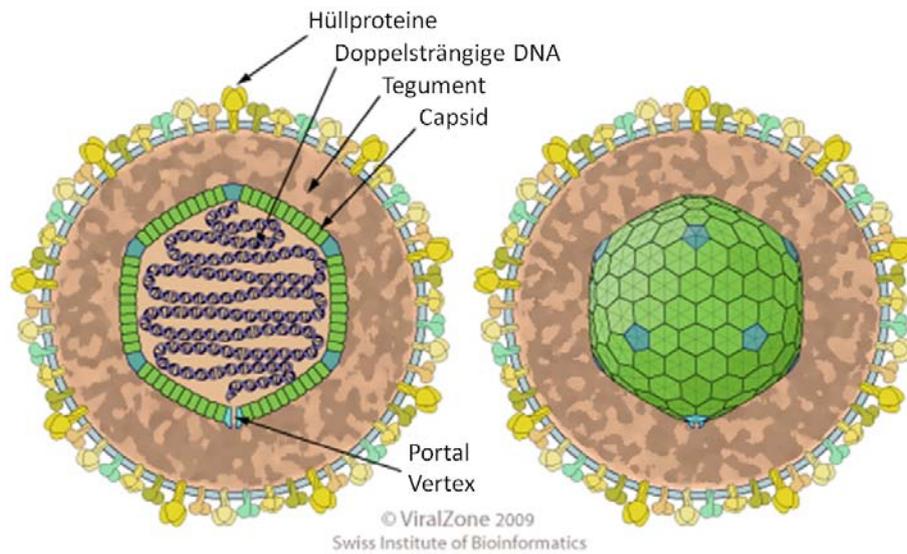


Abbildung 2.3.: Infektionen nach SZT¹⁹. Nach SZT treten oft Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen auf. Bei verlangsamter Immunrekonstitution oder GvHD auch über einen weitaus längeren Zeitraum als hier gezeigt.

Das Cytomegalievirus (CMV)

In der vorliegenden Arbeit wurde u.a. die Immunantwort gegen CMV bei Patienten nach SZT untersucht. Das Cytomegalievirus gehört zur Gruppe der β -Herpesviren. Das Virusgenom befindet sich im Capsid und besteht aus doppelsträngiger DNA. Zwischen dem Capsid und der Hülle des Virus liegt eine unstrukturierte Proteinmatrix, das sogenannte Tegument (Abb. 2.4)²⁰. Die Infektion mit dem Cytomegalievirus bzw. die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion stellt eine häufige Komplikation nach SZT dar. Klinische Folgen einer CMV-Infektion sind z.B. eine CMV-Retinitis oder eine CMV-Pneumonie²². Außerdem begünstigt eine CMV-Erkrankung die zusätzliche Infektion mit Bakterien oder

2. Einleitung



Entnommen aus: Hulo *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, Jan 2011.

Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung eines Herpesvirus²¹. Das CMV gehört zur Gruppe der β -Herpesviren. Es besteht aus einem Capsid, das die doppelsträngige Virus-DNA enthält. Diese wird normalerweise nach der Capsidbildung durch eine Öffnung, die sogenannte „Portal Vertex“ ins Capsid integriert. Das Capsid wird vom Tegument, einer unstrukturierten Matrix umgeben. Die Virusmembran umschließt das Virus, sie besitzt eine Reihe von Glykoproteinen auf ihrer Oberfläche.

Pilzen²³ und die Entstehung einer GvHD²⁴. Durch die Anwendung antiviraler Medikamente wie z.B. Ganciclovir oder Foscarnet konnte die Häufigkeit des Auftretens sowie die Schwere der Infektion signifikant reduziert werden. Allerdings haben diese Medikamente häufig eine myelotoxische Nebenwirkung²⁵. In manchen Zentren werden diese Virostatika als CMV-Prophylaxe verabreicht. Andere Kliniken, wie auch die Frankfurter Universitätskinderklinik, verwenden eine „präemptive“ antivirale Therapie. Möglich ist dies, indem die CMV-DNA-Last im peripheren Blut und im Stuhl des Patienten regelmäßig mit Hilfe der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) kontrolliert wird. Im Falle positiver DNA-Last werden antivirale Medikamente verabreicht. Dies führt dazu, dass auch Patienten, die während der Immunrestitution nach SZT eine Immunantwort gegen CMV entwickeln, mit Virostatika behandelt werden. Bei diesen Patienten ist es daher sinnvoll, ihre CMV-Immunität zu bestimmen, da eine Reconstitution CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) sie vor einer CMV-Reaktivierung und dem Ausbruch der CMV-Krankheit schützen kann (s. 5.3). Die quantitative Bestimmung der CMV-CTLs könnte somit zur Therapiesteuerung genutzt werden.

2.3.4. Immunologische Spender-Empfänger Reaktionen

Graft-versus-Host-Disease

Die Graft-versus-Host-Disease (GvHD) ist eine häufig auftretende Komplikation nach allogener SZT und wird durch Spender T-Zellen, die das Gewebe des Empfängers als fremd erkennen, verursacht. Sind Spender und Empfänger nicht HLA-ident, ist das Risiko für eine GvHD erhöht. Allerdings kann eine GvHD auch nach HLA-identer Transplantation auftreten, da auch Nebengewebeträgheitsantigene eine wichtige Rolle spielen. Eine akute GvHD tritt innerhalb der ersten 100 Tage nach SZT auf, danach spricht man von einer chronischen Form^{26,27}. Die GvHD betrifft vor allem Haut, Leber und Darm, ferner können auch Lunge und Schleimhäute betroffen sein. Die akute Form wird je nach Ausprägung in vier Schweregrade eingeteilt (s. Tabelle 2.2)²⁸. Um das Auftreten einer GvHD

GvHD Grad	Haut (Exanthem/Körperoberfläche)	Leber (Bilirubin mg/100ml)	Darm (Durchfall (ml/Tag))
I	<25%	2-3	500-1000
II	25%-50%	3-6	1000-1500
III	>50%	6-15	>1500
IV	>50% & Erythrodermie mit Blasenbildung	>15	>1500 & Ileus & starke Schmerzen

Tabelle 2.2.: Einteilung der GvHD Schweregrade²⁸.

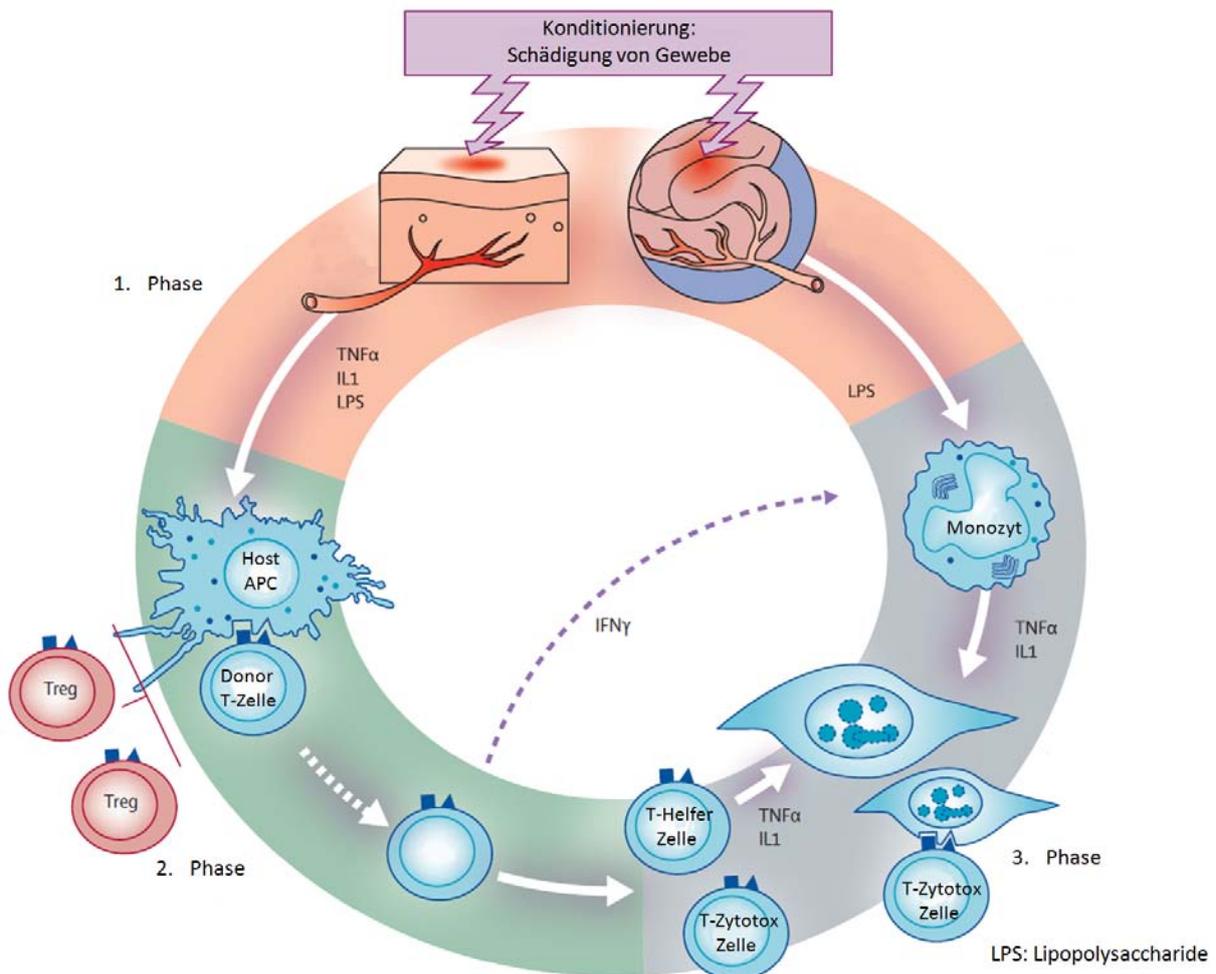
zu vermeiden, erhalten die Patienten nach SZT eine GvHD-Prophylaxe, die häufig aus dem Calcineurin-Hemmer Cyclosporin A (CsA) in Kombination mit Methotrexat (MTX) und/oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) besteht^{17,26,29}. Trotz dieser Prophylaxe tritt eine akute GvHD großer Grad II bei 20-50% aller Transplantierten auf²⁸. Die Entstehung einer GvHD kann in drei Phasen eingeteilt werden.

- *1. Phase:* Schädigung von Gewebe und Aktivierung von APZs
- *2. Phase:* T-Zell Aktivierung und Proliferation
- *3. Phase:* Effektorphase: Angriff von Spendergewebe

Zunächst tritt eine Schädigung von Gewebe (z.B. Leber und Darm) durch die Konditionierung ein. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen (z.B. IL-1, TNF α). Diese Zytokine führen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und HLA auf APZs, wodurch die Entstehung einer GvHD begünstigt wird. Aufgrund der Permeabilität von geschädigten Zellwänden können Bakterienprodukte (z.B. Lipopolysaccharide)

2. Einleitung

eindringen und die Produktion inflammatorischer Zytokine bewirken, wodurch die GvHD ebenfalls begünstigt wird. T-Zellen des Spenders erkennen die Zellen des Empfängers als fremd, werden dadurch aktiviert und proliferieren. Zytotoxische $CD3^+CD8^+$ T-Zellen greifen das Spendergewebe an und leiten die Apoptose ein (Abb. 2.5)^{26,28,29}. Die GvHD wird mit Steroiden behandelt, welche eine lympholytische Wirkung haben und die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine verhindern. Regulatorische T-Zellen (Tregs) und mesenchymale Stammzellen können eine GvHD unterdrücken²⁹⁻³¹.



Entnommen aus: Ferrara *et al.*, Lancet, Mai 2009.

Abbildung 2.5.: Entwicklung einer GvHD²⁶. Drei Phasen der GvHD Entstehung. 1. Phase: Schädigung von Gewebe und Aktivierung von APZs, 2. Phase: T-Zell Aktivierung und Proliferation, 3. Phase: Effektorphase: Angriff von Spendergewebe.

Graft-versus-Tumor-Effekt / Graft-versus-Leukämie-Effekt

Spender T-Zellen sind in der Lage, den erwünschten Graft-versus-Tumor- (GvT) bzw. Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL) zu vermitteln. Ähnlich wie bei der GvHD richten sich alloreaktive T-Zellen gegen Empfängerzellen, nur dass sie sich in diesem Falle gegen residuale Leukämie bzw. Tumorzellen richten und nicht gegen das gesunde Spendergewebe. Es wurde gezeigt, dass bei Patienten, die unter einer GvHD leiden, das Rezidivrisiko geringer ist als bei Patienten ohne GvHD¹². Dies legt einen Zusammenhang zwischen GvHD und GvT/GvL nahe (Abb. 2.6). Der GvT/GvL-Effekt kann aber auch ohne An-

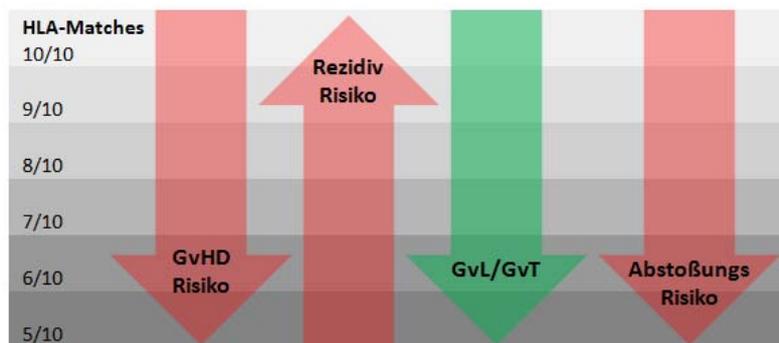


Abbildung 2.6.: Auftreten von GvT/GvL-Effekt nach SZT und Risiko für GvHD, Abstoßung und Rezidiv im Bezug auf HLA-Matching. Mit steigender Anzahl von HLA-Mismatches zwischen Spender und Empfänger steigt das Risiko für eine GvHD oder eine Abstoßung; allerdings steigt auch die Wahrscheinlichkeit des GvT/GvL-Effekts. Das Rezidivrisiko ist am höchsten bei HLA-identen Transplantationen.

zeichen einer GvHD vermittelt werden. Dies geschieht z.B., wenn ausschließlich residuale Tumor-/Leukämiezellen bestimmte Nebengewebeverträglichkeitsantigene tragen, bei denen ein Mismatch zwischen Spender und Empfänger vorliegt³².

Neben Spender T-Zellen sind auch NK-Zellen in der Lage, einen GvT/GvL-Effekt zu vermitteln. Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang KIR-Rezeptoren (Killer-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren) (s. 2.4.3) auf der Oberfläche von NK-Zellen. Liegt zwischen Spender und Empfänger ein KIR-Mismatch in GvT/GvL Richtung vor, so können NK-Zellen residuale Tumorzellen abtöten. Vermutlich geschieht dies, ohne dass dabei eine GvHD ausgelöst wird^{29,33}.

Transplantatabstoßung

Man unterscheidet insgesamt drei unterschiedliche Mechanismen der Transplantatabstoßung, HLA-gebundene akute Transplantatabstoßung, langsame Abstoßung aufgrund von Nebengewebeverträglichkeitsantigenen und hyperakute Abstoßung. Für die hyperakute Abstoßung sind Antikörper verantwortlich, die z.B. gegen Blutgruppenantigene des Spenders gerichtet sind. Deshalb wird normalerweise vor Transplantation ein Blutgruppens-

2. Einleitung

witch durchgeführt, wenn Spender und Empfänger unterschiedliche Blutgruppen aufweisen. Alternativ muss das Transplantat von Erythrozyten befreit werden. Die akute Abstoßung wird hauptsächlich von residualen T-Zellen des Empfängers vermittelt, die sich gegen fremde HLA-Moleküle des Transplantats richten. Aber auch, wenn Spender und Empfänger in ihren HLA-Molekülen übereinstimmen, kann es zu einer Abstoßung kommen. Ursache für diese sogenannte langsame Abstoßung sind polymorphe Proteine, die auch als Nebengewebeverträglichkeitsantigene bezeichnet werden.

2.4. Immunrekonstitution nach SZT

Die Regeneration von Immunzellen aus Spenderstammzellen nach SZT (Immunrekonstitution) spielt eine entscheidende Rolle im Hinblick auf den Verlauf der Transplantation und das Überleben des Patienten. Zum Zeitpunkt der Transplantation befindet sich der Patient in der Aplasie und hat somit zu diesem Zeitpunkt kein funktionsfähiges Immunsystem. Als *Engraftment* bezeichnet man den Zeitpunkt nach SZT, an dem im Patientenblut mehr als 1000 Leukozyten/ μl , 500 neutrophile Granulozyten/ μl und 20000 Thrombozyten/ μl nachweisbar sind. Normalerweise engraften die Patienten ca. drei bis vier Wochen nach SZT. Im Anschluss folgt die Rekonstitution aller weiteren Komponenten der angeborenen und der erworbenen Immunität aus den Spenderzellen (Abb. 2.7). Eine schnelle

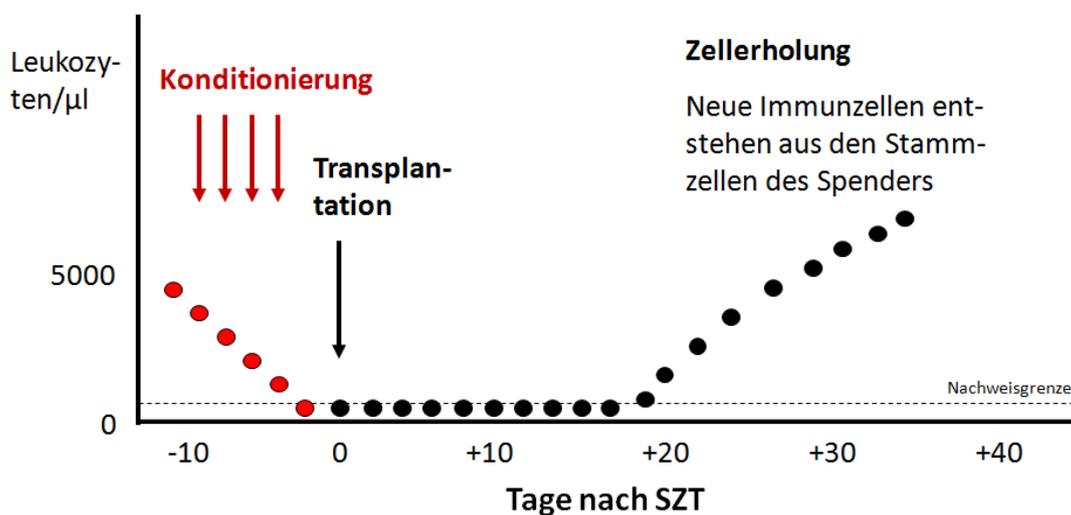


Abbildung 2.7.: Immunrekonstitution. Vor SZT erhält der Patient Chemotherapie mit oder ohne Bestrahlung, die ihn in die Aplasie führt. Nach etwa drei bis vier Wochen entwickeln sich neue Immunzellen aus den Spenderzellen (*Engraftment*).

Immunrekonstitution, vor allem von NK-Zellen und T-Zellen, kann Patienten vor Infektionen schützen und durch das Einsetzen des GvT/GvL-Effekts ein Rezidiv verhindern. Die Schnelligkeit der Rekonstitution von Immunzellen nach SZT ist von Patient zu Patient

unterschiedlich und wird u.a. von der Art der Transplantation, der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger, der Immunsuppression, dem Remissionsstatus vor SZT und dem Auftreten von Infektionen beeinflusst³⁴⁻³⁸. Nach Storek *et al.* rekonstituiert das pädiatrische Immunsystem nach SZT innerhalb von ein bis drei Jahren, wohingegen die vollständige Rekonstitution bei erwachsenen Patienten häufig länger als drei Jahre dauert^{39,40}. Dieser Unterschied ist vor allem auf die mit dem Alter abnehmende Thymusfunktion zurückzuführen, aber auch ein vermehrtes Auftreten von Infektionen bei Erwachsenen (z.B. durch die Reaktivierung latenter Viren) kann zu einer verlangsamten Rekonstitution führen^{41,42}. Monozyten und Granulozyten entwickeln sich bei den meisten Patienten nach SZT innerhalb weniger Wochen, wohingegen die vollständige Rekonstitution von NK-, B- und T-Zellen mehrere Monate bis Jahre dauern kann. Im Folgenden werden deshalb Funktion und Entwicklung der zuletzt genannten Immunzellen beschrieben.

2.4.1. T-Zellen

T-Zellen sind Teil der erworbenen Immunität und können eine Vielzahl von Fremdan antigenen erkennen. Die Klasse der T-Zellen beinhaltet bei gesunden Menschen ca. 60-70% der Lymphozyten und besteht hauptsächlich aus T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen. Über ihren T-Zellrezeptor (TCR) können T-Zellen Peptide, die ihnen von APZs über HLA-Klasse-I und -II präsentiert werden, erkennen¹⁴. Man unterscheidet zwischen $\alpha\beta$ -TCR und $\gamma\delta$ TCR, wobei die meisten T-Zellen einen $\alpha\beta$ -TCR tragen (Abb. 2.8). Werden einer T-Zelle z.B. virale Peptide präsentiert, wird die Immunantwort eingeleitet. Durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD3 ausschließlich auf T-Zellen können diese durchflusszytometrisch sehr gut von anderen Zellen unterschieden werden. T-Helferzellen tragen zusätzlich CD4 und zytotoxische T-Zellen CD8.

Entwicklung von T-Zellen

Die Vorläufer von T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und wandern zur vollständigen Ausreifung über die Blutbahn in den Thymus ein. Zu diesem Zeitpunkt tragen sie weder CD3 noch CD4 oder CD8 auf ihrer Zelloberfläche. Diese Zellen werden als „doppelt negative (DN)“ T-Zellen bezeichnet. Sie gelangen in den Thymus-Cortex, wo die Bildung des $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptors (TCR) eingeleitet wird. Zuerst entsteht die β -Kette des TCR, die mit einer provisorischen prä-T α -Kette assoziiert, wodurch der sogenannte Prä-TCR entsteht⁴³. Im nächsten Schritt wird die Umlagerung der α -Kette eingeleitet und es entsteht der $\alpha\beta$ -TCR. Die Zellen begeben sich ins „doppelt positive (DP)“ Stadium, in dem sie CD4 und CD8 exprimieren. Nun folgt die „Positiv Selektion“ der T-Zellen. In diesem Schritt wird überprüft, ob der gebildete TCR in der Lage ist, HLA zu binden. Hierzu

2. Einleitung

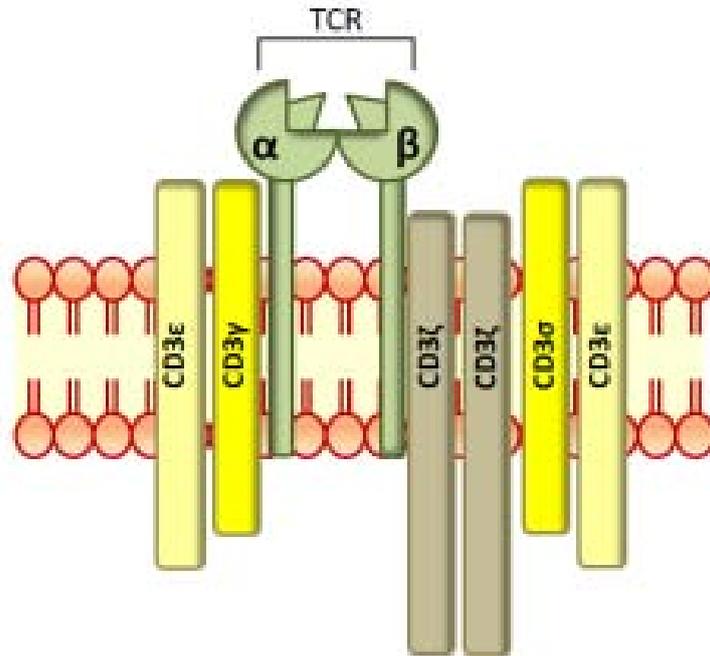


Abbildung 2.8.: T-Zellrezeptor (TCR). Schematische Darstellung des $\alpha\beta$ -TCR. Der $\alpha\beta$ -TCR besteht aus zwei Transmembranproteinen (α und β) und Komponenten des CD3-Komplex. Durch die Assoziation mit CD3, können externe Signale an zytoplasmatische Proteine weitergegeben werden. Vorallem die langen intrazellulären CD3 ζ -Domänen spielen bei der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle.

binden die heranreifenden T-Zellen an cortikale Epithelzellen des Thymus, die HLA auf ihrer Oberfläche tragen. Zellen die nicht in der Lage sind, HLA zu binden, werden aussortiert und gehen in Apoptose. Alle anderen T-Zell-Vorläufer treten nun, vermittelt über den Botenstoff CCR7, in die Thymus-Medulla ein und gehen in ein Stadium über, in dem sie entweder CD4 oder CD8 tragen („einfach positive (SP)“ T-Zelle). Jetzt geschieht die „Negativ Selektion“ an medullären Epithelzellen und DCs, die sicherstellt, dass keine Zellen HLA zu stark binden, denn dies könnte dazu führen, dass sich die T-Zellen gegen körpereigene Strukturen richten. Die meisten Zellen, die zu stark HLA binden, gehen in Apoptose, der Rest reift zu regulatorischen T-Zellen (Tregs) aus³⁻⁵. Nur ca. 2-3% der T-Zellvorläufer, die aus dem Knochenmark in den Thymus wandern, werden als reife T-Zellen in die Blutbahn entlassen. Ein kleiner Teil der Vorläufer aus dem Knochenmark durchläuft nicht den kompletten beschriebenen Prozess, sondern reift zu „NK ähnlichen T-Zellen“ oder T-Zellen heran, die einen $\gamma\delta$ -TCR tragen (Abb. 2.9). Im Hinblick auf die Transplantation geht man davon aus, dass T-Zellen aus Spenderstammzellen, die im Empfängerthymus ausreifen, kaum GvHD verursachen¹¹.

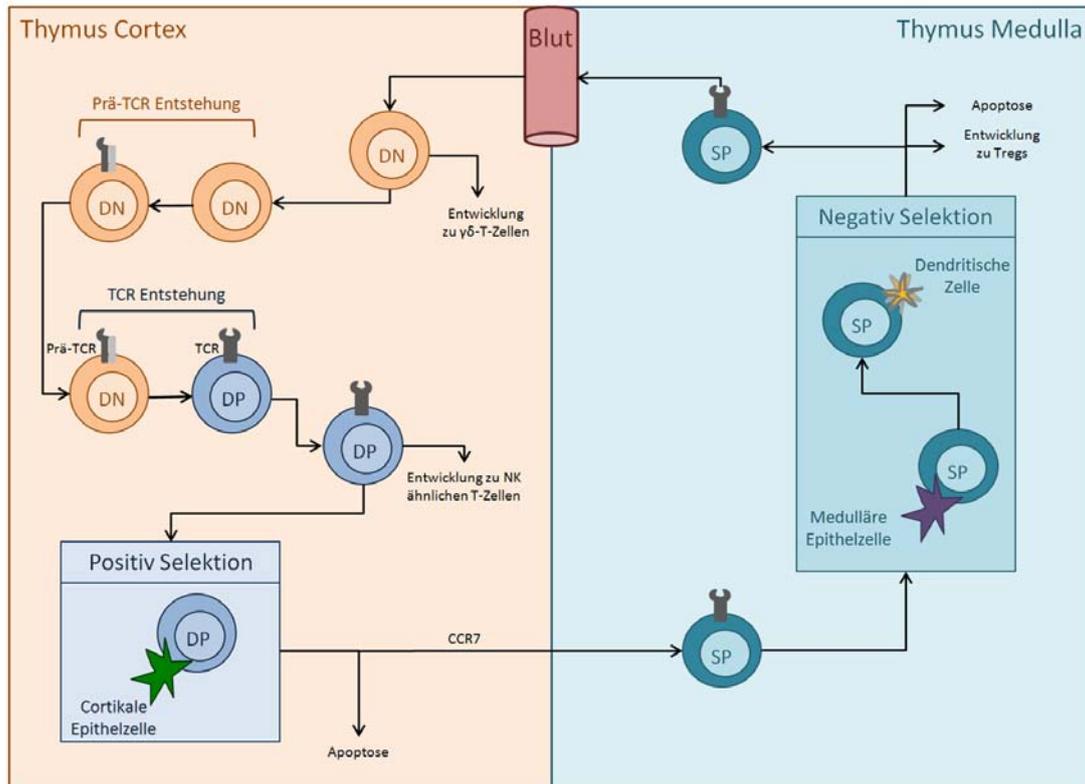


Abbildung 2.9.: Entwicklung von T-Zellen. Im Thymus entwickeln sich die T-Zellvorläufer aus dem Knochenmark zu reifen T-Zellen. Zunächst tragen die heranreifenden Zellen weder CD4 noch CD8 (DN-T-Zellen). Nach der Bildung des TCR exprimieren sie sowohl CD4 als auch CD8 (DP-T-Zellen). Sie treten in die „Positiv Selektion“ ein, in der Zellen die kein HLA binden aussortiert werden. Im Anschluss tragen sie entweder CD4 oder CD8 (SP-T-Zellen). Während der „Negativ Selektion“ werden potentiell autoreaktive Zellen, die HLA stark binden aussortiert. DN = doppelt negativ; DP = doppelt positiv; SP = einfach positiv.

T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen

Naive $CD4^+$ T-Zellen binden HLA-Klasse-II und werden durch DCs aktiviert. Dies geschieht meistens im lymphatischen Gewebe, da dort die Dichte von T-Zellen und DCs sehr hoch ist¹¹. Durch die Bindung von T-Helferzelle und DC über HLA-Klasse-II erhält der TCR ein Signal. Eine Aktivierung der T-Helferzelle geschieht allerdings nur, wenn sie auch ein zweites kostimulatorisches Signal erhält. Nach der Aktivierung sind T-Helferzellen in der Lage DCs, Makrophagen und B-Zellen zu aktivieren.

Eine wichtige Untergruppe der T-Helferzellen stellen die regulatorischen T-Zellen (Tregs) dar. Bislang wurden hauptsächlich zwei Klassen dieser Zellart beschrieben, die natürlichen Tregs, die sich nach gescheiterter negativer Selektion im Thymus entwickeln und induzierte Tregs. Induzierte Tregs entstehen während der T-Zellaktivierung in der Peripherie wahrscheinlich unter Einfluss des Zytokins $TGF-\beta$ ^{44,45}. In wenigen Arbeiten wurden außerdem $CD8^+$ Tregs beschrieben⁴⁶. Regulatorische T-Helferzellen tragen neben den Oberflächen-

2. Einleitung

markern CD3 und CD4 auch den Aktivierungsmarker CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) und exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3. Der Nachweis von FoxP3 muss über intrazelluläre Färbung geschehen. Eine Alternative hierzu stellt die Definition von Tregs als $CD4^+CD25^{bright}$ T-Zellen dar. $CD25^{bright}$ bedeutet, dass diese Zellfraktion CD25 sehr hoch exprimiert. Allerdings ist bislang nicht vollständig geklärt, ob diese Zellfraktion nur eine Untergruppe der Gesamt-Tregs enthält^{45,47}. In neueren Publikationen werden Tregs als $CD4^+CD25^+CD127^{neg/dim}$ Zellen beschrieben, die den Oberflächenmarker CD127 (α -Kette des IL-7 Rezeptors) nicht oder nur wenig exprimieren⁴⁷⁻⁴⁹.

Tregs können die Reaktion anderer Lymphozyten unterdrücken und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren. Es sind mehrere Mechanismen beschrieben, über die es Tregs gelingt, die Proliferation anderer T-Zellen, B-Zellen, DCs aber auch die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen zu unterdrücken. Hierbei sind Mechanismen beschrieben, die auf Zell-Zell-Kontakt basieren, wie z.B. die Interaktion mit den Oberflächenmolekülen CD80 und CD86 auf konventionellen T-Zellen, sowie die Induktion der Apoptose über CD95/CD95L (s. 2.4.1)^{45,50}. Außerdem gibt es Suppressionsmechanismen, die auf der Ausschüttung von Zytokinen basieren. Es ist beschrieben, dass TGF- β eine wichtige Rolle bei der Suppression von NK-Zellen durch Tregs spielt. Es wird des weiteren vermutet, dass Tregs andere T-Zellen durch Absorption von IL-2 an der Proliferation hindern^{45,51}. Außerdem werden die Zytokine IL-10 und IL-35 im Zusammenhang mit Suppressionsmechanismen genannt⁵¹⁻⁵³. Nach allogener Transplantation können Tregs eine Abstoßungsreaktion oder das Entstehen einer GvHD verhindern^{30,31,54}. Allerdings werden Tregs auch im Zusammenhang mit *Tumor-Escape-Mechanismen* genannt, d.h. sie unterdrücken Reaktionen des Immunsystems gegen den Tumor^{55,56}.

Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen (CTLs) besitzen die Fähigkeit, virusinfizierte oder entartete Zellen abzutöten. Naive $CD8^+$ CTLs werden ebenfalls von DCs aktiviert. Dies geschieht aber im Gegensatz zur T-Helferzelle über die Bindung des TCR an HLA-Klasse-I. Zusätzlich ist auch hier ein zweites Signal notwendig. Nach der Aktivierung kann eine CTL ihre Zielzelle abtöten. Dies geschieht über einen der folgenden Mechanismen (Abb. 2.10):

- *Fas-Ligandenvermittelter Mechanismus:* Über ihren Fas-Rezeptor (CD95) binden Zielzellen an den Fas-Liganden (CD95L) auf der CTL/NK-Zelle. Hierdurch wird die Caspasekaskade aktiviert und die Apoptose der Zielzelle eingeleitet⁵⁷.
- *Sekretion von Perforin und Granzym:* Nach der Bindung des TCR oder des NK-Zellrezeptors an die Zielzelle werden Perforin und Granzym aus Vesikeln über Exozytose ausgeschüttet. Die Perforine wirken porenbildend und ermöglichen das Ein-

dringen von Granzymen in die Zielzelle. Außerdem können Granzyme über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor in die Zielzelle gelangen. Granzyme sind Serinproteasen, welche proteolytische Eigenschaften besitzen und die Apoptose der Zielzelle einleiten⁵⁸. Zusätzlich kommt es zu einer Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$, wodurch die benachbarten Zellen HLA hochregulieren, was eine bessere Erkennung durch CTLs gewährleistet⁵⁹.

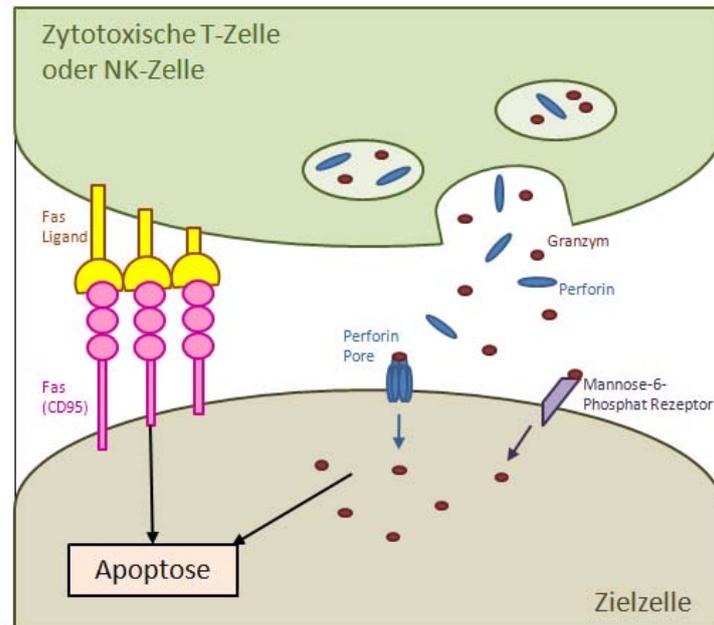


Abbildung 2.10.: Mechanismen der Zielzellyse. (a) Zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen können die Apoptose ihrer Zielzellen über die Bindung von Fas-Ligand an Fas-Rezeptor oder (b) die Sekretion von Granzym und Perforin auslösen.

Nach allogener SZT spielen CTLs eine sehr große Rolle. Durch die Bildung spezifischer CTLs z.B. gegen CMV (CMV-CTLs) oder Aspergillus können die Patienten vor diesen Infektionen geschützt werden. Außerdem sind CTLs in der Lage, den GvT/GvL-Effekt zu vermitteln.

Bildung von Gedächtnis-T-Zellen

Nach der T-Zellaktivierung, die durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD69 („frühe Aktivierung“) oder HLA-DR („späte Aktivierung“) gekennzeichnet ist, kommt es zu einer starken Expansion von T-Zellen. Dabei entstehen größtenteils Effektorzellen, die meist nach Ablauf der Immunantwort absterben. Außerdem entstehen wenige langlebige Gedächtnis-T-Zellen, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Erreger sehr schnell eine Immunantwort einleiten können. Zur Entstehung dieser Gedächtniszellen sind unterschiedliche Modelle beschrieben. Zum einen gibt es die Theorie, dass Gedächtnis-T-Zellen

2. Einleitung

aus naiven T-Zellen entstehen. Erhält eine naive T-Zelle ein starkes Aktivierungssignal, entsteht eine Effektorzelle, bei einem schwachen Signal eine Gedächtniszelle. Zum anderen gibt es ein Modell, dass die Entstehung von Gedächtniszellen aus Effektorzellen beschreibt^{7,8}.

Bei der Entwicklung von naiven T-Zellen zu Effektor- bzw. Gedächtniszellen kommt es zur Änderung der CD45-Isoform. Die CD45RA-Isoform wird von naiven T-Zellen exprimiert, wohingegen Effektor- und die meisten Gedächtniszellen die CD45RO-Isoform tragen. Mit Hilfe dieser Oberflächenmoleküle gelingt es, naive T-Zellen durchflusszytometrisch von Effektor- und Gedächtniszellen zu unterscheiden. Gedächtnis-T-Zellen lassen sich in die Untergruppen Effektor-Gedächtniszellen und Zentrale-Gedächtniszellen unterteilen^{7,14,60}.

- *Zentrale-Gedächtniszellen* (T_{CM}) exprimieren CD62L und CCR7, was sie befähigt, in lymphatisches Gewebe einzuwandern („Homing“). Sie halten sich bevorzugt in Lymphknoten, Blut und Milz auf und besitzen nur eine eingeschränkte Effektorfunktion. Sie sind in der Lage, neue T_{CM} und T_{EM} zu bilden.
- *Effektor-Gedächtniszellen* (T_{EM}) können in entzündetes Gewebe auswandern und befinden sich hauptsächlich in Darm, Lunge und Leber. Sie tragen weder CD62L noch CCR7, haben im Vergleich zu T_{CM} eine kürzere Lebensdauer und können sich nicht selbst reproduzieren.

2.4.2. B-Zellen

B-Lymphozyten sind ein wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunität. Nach SZT gibt es die Möglichkeit, die Funktion der B-Zellen durch die Gabe von Antikörpern (Immunglobulinen) zumindest teilweise zu ersetzen. Daher spielt die Schnelligkeit der Rekonstitution von B-Zellen nach SZT eine weniger wichtige Rolle als z.B. die der T- und NK-Zellen. Aus diesem Grund wird die Funktion und Entstehung von B-Zellen in diesem Kapitel nur sehr kurz dargestellt.

Im Gegensatz zu T-Zellen reifen B-Zellen vollständig im Knochenmark aus, wo sie die zentrale Toleranz durchlaufen. Sie verlassen das Knochenmark als reife B-Zellen, die als B-Zellrezeptor (BCR) membranständiges IgM und IgD besitzen, welches nicht kovalent mit $Ig\alpha\beta$ assoziiert ist. Der BCR kann Antigene binden, welche in die Zelle aufgenommen, prozessiert und via HLA-Klasse-II präsentiert werden. T-Helferzellen erkennen HLA-Klasse-II auf B-Zellen und können sie aktivieren. Dabei schüttet die T-Helferzelle Zytokine aus, welche B-Zellen anregen, zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen zu differenzieren^{6,8,11,61}.

2.4.3. Natürliche Killer-Zellen

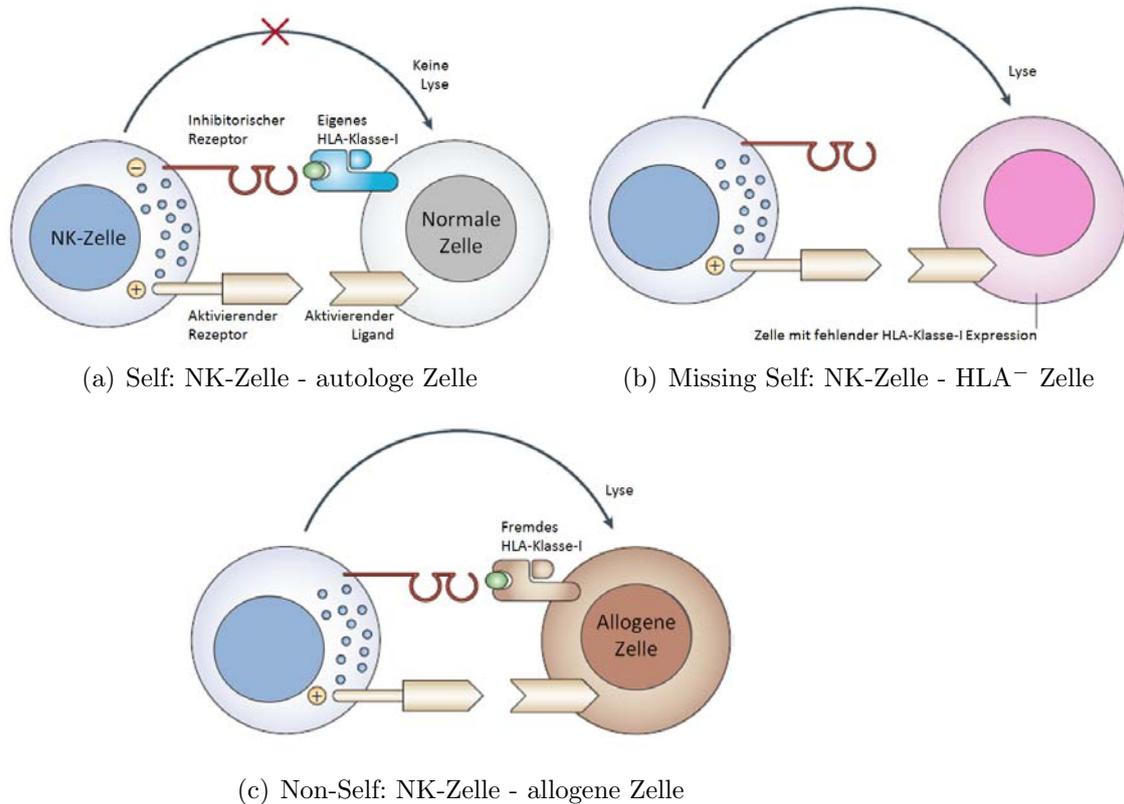
Virusinfizierte Zellen und entartete Zellen können von natürlichen Killer (NK)-Zellen ohne vorherige Antigenstimulation erkannt und lysiert werden. NK-Zellen sind Teil der angeborenen Immunität und agieren daher wesentlich früher als z.B. T- und B-Zellen. Über die Sekretion von Zytokinen können Sie aber Einfluss auf Zellen der erworbenen Immunität nehmen⁶². NK-Zellen und T-Zellen entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, allerdings entwickeln sich NK-Zellen vollständig im Knochenmark. Ausgereifte NK-Zellen sind negativ für den T-Zellmarker CD3 und exprimieren CD56. Über die Intensität der CD56-Expression lassen sich zwei Untergruppen von NK-Zellen unterscheiden.

- $CD3^-CD56^{dim}$ zytotoxische NK-Zellen enthalten Perforin und Granzym, sind CD16 hochexprimierend und zeigen eine starke Zytotoxizität. Ca. 90% aller NK-Zellen eines gesunden Individuums gehören zu dieser NK-Zell-Subgruppe.
- $CD3^-CD56^{bright}$ immunregulatorische NK-Zellen besitzen eine niedrige Zytotoxizität bei hoher Zytokinproduktion. Sie sind in der Lage, in lymphoide Organe einzuwandern. Bei gesunden Menschen zählen ca. 10% der NK-Zellen zu diesem Phänotyp^{63,64}.

Interessanterweise entwickeln viele Patienten nach SZT zunächst ausschließlich immunregulatorische $CD3^-CD56^{bright}$ NK-Zellen. Erst im Laufe der Immunrekonstitution stellt sich ein Verhältnis wie bei gesunden Individuen ein.

NK-Zellen können ihre Zielzellen über die Sekretion von Perforin/Granzym oder den Fas/Fas-L Mechanismus abtöten (vgl. zytotoxische T-Zellen 2.4.1). Zusätzlich können Zielzellen, die Antikörper gebunden haben, von NK-Zellen lysiert werden. Dieser Mechanismus wird „Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC)“ genannt^{65,66}. Um ihre zytotoxische Wirkung auszuüben, benötigen NK-Zellen keine spezifische Aktivierung. Sie werden über eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Mit Hilfe dieser Rezeptoren sind NK-Zellen in der Lage, HLA-Klasse-I niedrig exprimierende Zellen zu lysieren. Tumorzellen und Zellen, die von einem Virus befallen wurden, zeigen häufig eine verminderte HLA-Klasse-I Expression⁶³. Trifft eine NK-Zelle auf eine HLA-Klasse-I negative Zelle, so erhält sie nur ein aktivierendes Signal und tötet die Zielzelle („Missing Self Hypothese“)⁶⁷. Trägt die allogene Zielzelle ein für den NK-Zell-Rezeptor unbekanntes HLA-Klasse-I Molekül, so erhält sie ebenfalls kein inhibierendes Signal und es kommt zur Lyse der Zielzelle (Abb. 2.11). Folgend sind die wichtigsten Rezeptoren auf NK-Zellen kurz erläutert.

2. Einleitung



Entnommen aus: Kumar und McNerney, Nature Reviews Immunology, Apr. 2005.

Abbildung 2.11.: NK-Zellen: Missing Self Hypothese. (a) Interaktion zwischen NK-Zelle und autologer Zelle. Die NK-Zelle bekommt ein aktivierendes und ein inhibierendes Signal. Es kommt nicht zur Lyse der autologen Zelle. (b) Die Zielzelle ist HLA-Klasse-I negativ. Die NK-Zelle erhält nur ein aktivierendes Signal und tötet die Zielzelle. (c) Die allogene Zielzelle trägt ein für den NK-Zell-Rezeptor unbekanntes HLA-Klasse-I Molekül. Die NK-Zelle erhält kein inhibierendes Signal und es kommt zur Lyse der Zielzelle.

- *Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIRs)* erkennen HLA-Klasse-I. Sie besitzen einen extrazellulären, ligandenbindenden Abschnitt, der entweder aus zwei (KIR2D) oder aus drei (KIR3D) antikörperähnlichen Domänen besteht. Außerdem besitzt jeder KIR einen zytosomatischen Abschnitt, der entscheidend dafür ist, ob es sich um einen aktivierenden oder inhibierenden KIR handelt. Aktivierende KIRs besitzen kurze intrazelluläre Abschnitte und inhibierende Rezeptoren lange Abschnitte^{63,65}.
- *C-Typ Lektin Rezeptoren* sind Heterodimere aus CD94 und einem Molekül der NKG2-Familie. Rezeptoren bestehend aus CD94 und NKG2A/B wirken inhibierend, während Rezeptoren aus CD94 und NKG2C/E/F eine aktivierende Funktion besitzen. Mit Ausnahme von NKG2D binden alle Rezeptoren HLA-Klasse-I. NKG2D bildet ein Homodimer mit DAP10 oder KAP10 (keine Assoziation mit CD94). Der

NKG2D-Rezeptor wirkt aktivierend und ist HLA-unabhängig. Er erkennt die polymorphen „MHC-Class-I-Chain related“ (MIC) Peptide A und B, welche häufig auf Tumorzellen, normalerweise aber nicht auf gesunden ausgereiften Zellen zu finden sind. Außerdem erkennt er bestimmte virale Peptide⁶³.

- *Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs)* agieren ebenfalls HLA unabhängig. Der Großteil von NCR-Liganden ist bislang unbekannt, lediglich BAT3 wurde als Ligand des NCRs NKp30 identifiziert⁶⁸.

Die Zytotoxizität der NK-Zelle wird durch die Balance aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Fehlt zu einem vorliegenden KIR-Rezeptor der NK-Zelle der spezifische Ligand auf der Target-Zellseite, wird die Lyseaktivität induziert⁶⁶. Um den GvT/GvL zu steigern, versucht man daher Spender auszuwählen, die KIR-Liganden Mismatche mit dem Patienten aufweisen³³. Zusätzlich werden in klinischen Phase I/II-Studien aufgereinigte Spender-NK-Zellen als Immuntherapie eingesetzt (s. 2.4.5)⁶⁹⁻⁷¹.

2.4.4. Monitoring der Immunrekonstitution

Die Regeneration von Immunzellen nach allogener SZT spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf den Verlauf der Transplantation und das Überleben des Patienten. Immunkompetente Zellen bieten dem Patienten einen Schutz vor Infektionen und der Entstehung eines Rezidivs. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden kann die Immunrekonstitution der Patienten regelmäßig kontrolliert werden. Dies geschieht in der Frankfurter Universitätskinderklinik wöchentlich innerhalb der ersten drei Monate nach SZT. Bis zu sechs Monate nach SZT werden die Immunzellen im Abstand von zwei Wochen überprüft. Im Abschnitt sechs Monate bis ein Jahr nach SZT wird monatlich der Immunstatus des Patienten bestimmt. Im letzten Abschnitt des Monitorings (> ein Jahr bis vier Jahre nach SZT), wird alle drei Monate ein Immunstatus erstellt (Abb. 2.12). Die durchfluss-

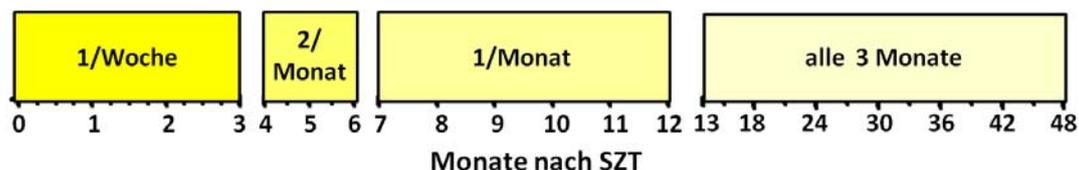


Abbildung 2.12.: Monitoring der Immunrekonstitution. Innerhalb der ersten drei Monate nach SZT wird wöchentlich ein Immunstatus erstellt. Zwischen Monat vier und sechs nach SZT finden die Messungen alle zwei Wochen statt. Im Anschluss erfolgt eine durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellen monatlich. Im Intervall > ein Jahr bis vier Jahre nach SZT wird alle drei Monate der Immunstatus des Patienten bestimmt.

2. Einleitung

zytometrische Charakterisierung von Immunzellen beinhaltet die Bestimmung von Leukozyten, Monozyten, Lymphozyten, T-Zellen incl. T-Helfer- und zytotoxischer T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen (s. 4.3.2). Zu bestimmten Zeitpunkten oder auch bei Verdacht auf eine Infektion oder GvHD werden zusätzlich T-Zelluntergruppen (aktivierte T-Zellen, Gedächtniszellen und Tregs) sowie DCs und CMV-CTLs bestimmt (s. 4.3.3).

2.4.5. Zelluläre Immuntherapien

Adoptive zelluläre Immuntherapien beinhalten die erneute Infusion von Spenderzellen. Die Indikation hierzu ist streng geregelt, da eine zusätzliche Immuntherapie auch mit Risiken verbunden ist. Spender-T-Zellen können z.B. eine schwere GvHD auslösen (s. 2.3.4). Indikationen für zelluläre Immuntherapien nach allogener SZT sind:

- *Vorliegen eines gemischten Chimärismus*: Bei einem gemischten Chimärismus (steigender Anteil von Patientenzellen im Vergleich zu Spenderzellen) wird mit der Infusion von Spenderlymphozyten (DLI) versucht, ein beginnendes Rezidiv oder eine Abstoßung zu verhindern⁷²⁻⁷⁴.
- *Steigerung des GvT/GvL Effekts*: Zur Steigerung des GvT/GvL werden DLIs eingesetzt, aber auch die Infusion aufgereinigter Spender-NK-Zellen (NK-DLI) wird seit einigen Jahren angewendet. NK-Zellen können GvT/GvL vermitteln, vermutlich ohne eine GvHD auszulösen⁶⁹⁻⁷¹.
- *Infektion*: Bei der akuten Infektion mit Viren (z.B. CMV) und Pilzen (z.B. Aspergillus oder Candida) können antigen-spezifische Spender-T-Zellen selektioniert werden, die dem Patienten infundiert werden und spezifisch gegen die vorliegende Infektion wirken⁷⁵⁻⁷⁸.
- *Verzögerte Bildung von Immunzellen*: Um die Immunrekonstitution zu *boosten*, wird eine erneute, geringere Gabe von Spenderstammzellen eingesetzt.

Bisher gibt es keine zuverlässigen Methoden, um Patienten, die von einer Immuntherapie profitieren von solchen zu unterscheiden, die keine zusätzliche Therapie benötigen. Mit einem neuen Ansatz zur frühzeitigen Immunintervention bei Hochrisiko-Patienten basierend auf der zellulären Immunrekonstitution beschäftigt sich die vorliegende Arbeit¹ (s. 5.2).

3. Zielsetzung

Die Rekonstitution von Immunzellen aus Spenderstammzellen nach SZT spielt eine entscheidende Rolle im Hinblick auf den Verlauf der Transplantation. Bei Patienten mit verzögerter immunologischer Rekonstitution treten gehäuft Komplikationen wie z.B. Infektionen oder ein Rückfall der Erkrankung auf, was mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist. Bei diesen Hochrisiko-Patienten können zelluläre Immuntherapien eingesetzt werden, um die Immunrekonstitution zu unterstützen und einen GvT/GvL-Effekt zu bewirken. Die Indikation hierzu ist streng geregelt, da eine zusätzliche Immuntherapie auch mit Risiken, wie z.B. dem Auftreten einer schweren GvHD, verbunden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen retrospektiv Immunrekonstitutionsdaten ausgewertet werden. Ziel hiervon ist es, Risikofaktoren zu ermitteln, die bereits während des Immunmonitorings erkannt und langfristig zur Steuerung der Immunintervention eingesetzt werden können. Hierzu wurden folgende Schwerpunkte gewählt:

- ***Multivariate Modellierung von Immunrekonstitutionsdaten***

Mittels multivariater Analyse soll die Korrelation zwischen verschiedenen Aspekten der Immunregeneration und dem Überleben untersucht werden. Hierzu sollen statistische Methoden verwendet werden, um frühzeitig Hochrisiko-Patienten zu erkennen, die von einer Immuntherapie (z.B. T- oder NK-Zellgabe des Spenders) profitieren würden.

- ***Rekonstitution spezifischer Immunzellen***

Eine besondere Bedeutung bei der Immunrekonstitution haben die regulatorischen T-Zellen (Tregs) und die antigen-spezifischen T-Zellen. Diese sollen im Rahmen der Doktorarbeit mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden immunologisch charakterisiert und quantifiziert werden. Eine mögliche Korrelation zwischen der Rekonstitution von Tregs sowie der von antigen-spezifischen T-Zellen gegen CMV Infektionen und dem Überleben nach SZT soll ermittelt werden.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	FC500	Beckman Coulter, Krefeld, GER
	NAVIOS	Beckman Coulter, Krefeld, GER
	Epics TM XL TM	Beckman Coulter, Krefeld, GER
Hämatozytometer	Ac. T diff TM	Beckman Coulter, Krefeld, GER
Kühlschränke		Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, GER
		Liebherr, Ochsenhausen, GER
Lysegerät	TQ-Prep TM Workstation	Beckman Coulter, Krefeld, GER
Pipetten	Multipette [®] plus	Hirschmann, Eberstadt, GER
	Eppendorf Reference (10µl-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, GER
	Pipetus [®]	Hirschmann, Eberstadt, GER
Vortexgeräte	Ika [®] MS1 Minishaker	IKA, Staufen, GER
	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, GER
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R	Haraeus, Hanau, GER
	Multifuge 4 KR	Haraeus, Hanau, GER

Tabelle 4.1.: Laborgeräte.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
FACS Röhrchen	Röhrentubes 5ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Falcon Röhrchen	CellStar [®] (15, 50ml)	Greiner, Frickenhausen, GER
Handschuhe	Peha-Soft	HARTMANN AG, Heidenheim, GER
Pipettenmaterial	Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25, 50ml)	Costar, Offenburg, GER
	Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, GER

Tabelle 4.2.: Verbrauchsmaterialien.

4. Material und Methoden

Chemikalien, Reagenzien, Zellmedien und Puffer

Produkt	Hersteller
Aqua ad iniectabilia [®]	B. Braun AG, Melsungen, GER
Coulter Clenz [®]	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Flow-Check TM Fluorespheres	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Flow-Count TM Fluorespheres	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Human FoxP3 Buffer Set	BD Biosciences, San Jose, USA
IMMUNOPREP TM Reagent System	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
IMMUNO-TROL TM Cells	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
IOtest [®] 3 Fixative Solution	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
IsoFlow TM Sheat Fluid	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Stem-Kit TM Reagents Lysing Solution 10X - NH ₄ Cl Concentrated	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Octeniderm farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, GER
PBS Dulbecco (ohne Ca & Mg)	PAA Laboratories, Pasching, AT
VersaLyse TM Lysing Solution	Beckman Coulter, Marseilles, FRA

Tabelle 4.3.: Chemikalien, Reagenzien, Zellmedien und Puffer.

Antikörper und HLA-spezifische Tetramere für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrome	Klon	Subtyp	Hersteller
Anti-CD3*	FITC, PacO, PC5	UCHT1	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD4*	FITC, PacB, PE	13B8.2	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
	ECD	T4	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD8*	FITC, PC5	B9.11	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD14	PC7	RMO52	IgG2a	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD16	APC A-750, PC7	3G8	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD19*	ECD	3G8	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD25	PC5	B1.49.9	IgG2a	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
	PC7	2A3	IgG1	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-CD45*	FITC, PC7	J.33	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD45RA	ECD	2H4	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD56*	APC, PE	N901	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD62L	FITC, PC5	DREG56	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD69	PC5	TP1.55.3	IgG2b	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD117	PE	104D2D1	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-CD127	APC A-700, PE, PC7	R34.34	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
Anti-FoxP3	PE	259D/C7	IgG1	Beckman Coulter, Marseilles, FRA

* Auch als Antikörper Mix eingesetzt (Beckman Coulter, Marseilles, FRA):
 CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1⁺/CD8-ECD/CD3-PC5
 CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1[§]/CD19-ECD/CD3-PC5

§ Entspricht einer PE-Markierung

Tabelle 4.4.: Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie.

4. Material und Methoden

iTA ^g TM MHC Tetramer	Fluorochrome	Epitop	Hersteller
HLA-A*0101	PE	CMV (VTEHDTLLY)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
HLA-A*0201	PE	CMV (NLVPMVATV)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
HLA-A*1101	PE	CMV (ATVQGQNLK)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
HLA-A*2402	PE	CMV (QYDPVAALF)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
HLA-B*0702	PE	CMV (TPRVTGGGAM)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
HLA-B*0801	PE	CMV (ELRRKMMYM)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
HLA-B*3501	PE	CMV (IPSINVHHY)	Beckman Coulter, Marseilles, FRA
MHC Class I Negative Tetramer	PE		Beckman Coulter, Marseilles, FRA

Tabelle 4.5.: Übersicht der verwendeten HLA-spezifischen CMV Tetramere.

4.1.2. Software

Software	Version	Hersteller
CXP System II	2.2	Beckman Coulter, Krefeld, GER
DB Designer	4	fabFORCE.net
GraphPad Prism	4 und 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Kaluza [®]	1.1	Beckman Coulter, Krefeld, GER
R	2.11	r-project, Wien, AT
SIMCA-P+	12	Umetrics, Umeå, Schweden
XAMPP (incl. MySQL, PHP und phpMyAdmin)	mySQL: 5.1.51 PHP: 5.3.3 XAMPP: 1.7.3	apachefriends, Berlin, GER

Tabelle 4.6.: Software.

4.2. Patienten und Spender

4.2.1. Spender der multivariaten Normwertgenerierung

Zur Generierung des multivariaten Normwertellipsoids wurden Daten verwendet, die von Huenecke *et al.* im Rahmen einer Normwertstudie zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen erhoben wurden⁷⁹. Hierbei handelt es sich um Analysen von 20 gesunden Erwachsenen und 80 Kindern. Die Blutproben der Kinder wurden vor einem kleinen chirurgischen Eingriff zur Korrektur von Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten oder Phimosen entnommen. Die Kinder erhielten keine Medikamente, die einen Einfluss auf das hämatopoetische System nehmen. Eine Einwilligung der Eltern, dass die Reste der Blutproben für Forschungszwecke verwendet werden dürfen, lag vor und erfolgte nach den Richtlinien der Ethikkommission der Universitätsklinik Frankfurt. Die Altersverteilung der 100 gesunden Spender zeigt Tabelle 4.7.

Alter (Jahre)	<1	1-3	4-9	10-18	19-40
Anzahl Patienten	14	25	31	10	20

Tabelle 4.7.: Normwertstudie: Spenderalter.

4.2.2. Patienten

Die Blutabnahmen zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Leukozytensubpopulationen bei pädiatrischen Patienten mit Leukämien und Tumoren wurden entweder innerhalb der klinischen Routinekontrolle angefordert oder erfolgten im Rahmen einer Studie zur Analyse der „Altersabhängigen Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation“. Bei Patienten, bei denen im Zuge der Studie Blut entnommen wurde, lag eine Einverständniserklärung der Eltern nach Richtlinien der Ethikkommission der Universitätsklinik Frankfurt vor (Ethik-Nummer 50/07). Die Studie beinhaltete die Messung aller in dieser Arbeit beschriebenen Leukozytenuntergruppen. Bei den Routineleistungen wurden mitunter nur Teilmengen der zur Auswertung benötigten Messdaten durch die Stationen angefordert. Aus den Resten der Blutproben wurden anschließend die Daten erhoben, die nicht angefordert wurden, aber zur Auswertung der Forschungsergebnisse benötigt wurden (z.B. CMV-CTLs oder Tregs). Die Einwilligung der Eltern, dass diese Reste der Blutproben zu Forschungszwecken verwendet werden dürfen, lag ebenfalls vor. Die in dieser Arbeit beschriebenen Auswertungen wurden im Rahmen folgender drei Studien durchgeführt:

4. Material und Methoden

- *Zelluläre Immunrekonstitution nach SZT*: Erreichen eines multivariaten Normwertellipsoids im Hinblick auf das Überleben der Patienten (n=32 Patienten, Universitätskinderklinik Frankfurt, Tabelle 4.8).
- *Rekonstitution CMV-CTLs nach SZT*: Monitoring der CMV-CTL Regeneration mit Hilfe der Tetramertechnologie. Auswertung der Daten im Hinblick auf die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion und das Überleben der Patienten (n=201, multizentrische Studie: Universitätsklinik Frankfurt und medizinische Hochschule Hannover, Tabelle 4.9). Von den 201 Patienten wurden 123 in Hannover und 78 in Frankfurt behandelt. Bei den Hannoveraner Patienten handelte es sich ausschließlich um internistische Patienten. Die Frankfurter Kohorte setzte sich in etwa zu gleichen Teilen aus internistischen und pädiatrischen Patienten zusammen. Die CMV-CTL Messungen wurden in Hannover und Frankfurt durchgeführt, wobei alle Proben von Frankfurter Patienten im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien der Universitätskinderklinik durchflusszytometrisch bestimmt wurden.
- *Immunregeneration von Tregs nach SZT*: Longitudinalanalyse zur Treg Rekonstitution nach SZT (n=16, Universitätskinderklinik Frankfurt, Tabelle 4.10) als Teilprojekt der Studie „Altersabhängige Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation“.

Die Immunrekonstitutionsdaten der multizentrischen CMV-CTL Auswertung und der Studie „Altersabhängige Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation“ wurden in Datenbanken eingetragen und archiviert. Klinische Daten zum Patientenverlauf nach SZT wie z.B. aufgetretene Infektionen, Spenderchimärismus oder GvHD Entwicklung wurden vermerkt und wenn möglich in die Auswertung einbezogen. Die Erfassung dieser klinischen Daten geschah im Zuge von Routineuntersuchungen nach SZT.

Geschlecht, Alter	Diagnose, Remission	Konditionierung	Spender	Stammzellquelle	CD34 ⁺ (-10 ⁶ /kgKG)	CD3 ⁺ (-10 ⁶ /kgKG)	DLI	Steroidapplikation	Status, Monate nach SZT, aGvHD Grad	Erreicht* (200/300)
1 M, 7	AML, CR2	Bu, CY	MFD	KM	9,1	37,0	-	-	CR, +63, -	+/+
2 M, 14	ALL, CR1	CY, TBI, VP16	MFD	KM	3,9	21,0	-	+	+ , +26, III	+/+
3 M, 4	JMML, NR	ATG, Bu, CY, Mel	MFD	KM	15,1	30,0	+	-	+ Rezidiv, +25, -	+/+
4 F, 12	ALL, CR2	TBI, VP16	MFD	KM	4,4	10,0	-	-	CR, +13, -	+/+
5 M, 12	ALL, CR3	ATG, CY, TBI, VP16	MUD	KM	2,9	27,0	-	+	CR, +58	-/+
6 F, 6	ALL, CR1	CY, TBI, VP16	MFD	KM	8,3	25,0	-	-	+ Rezidiv, +20, -	-/-
7 M, 17	AML, CR2	ATG, Bu, CY, Mel	MUD	KM	5,6	43,0	-	+	CR, +13, -	+/+
8 M, 17	MDS	ATG, Bu, CY, Mel	MFD	KM	2,2	37,0	-	+	+ Rezidiv, +49, -	-/-
9 M, 2	ALL, CR2	TBI, VP16	MFD	KM	10,5	38,0	-	-	CR, +54, -	-/-
10 M, 16	AML, CR1	Bu, CY	MFD	KM	1,8	14,0	+	-	+ Rezidiv, +6, -	-/-
11 F, 17	AML, CR2	ATG, Bu, CY, Mel	MUD	KM	5,2	26,0	-	+	+ Rezidiv, +6, II	-/-
12 F, 13	ALL, CR1	Flu, Mel, OKT3, Thio	MUD	KM	5,0	33,0	-	+	CR, +46, I	-/-
13 F, 10	AML, NR	ATG, Bu, CY, Mel	MUD	KM	6,9	58,0	-	+	+ CR, +15, -	+/+
14 M, 17	ALL, CR2	CY, VP16	MFD	PBSC	7,8	340,0	-	+	+ Rezidiv, +9, -	+/+
15 F, 3	MDS	Bu, CY, Mel, ATG	MFD	PBSC	7,3	1200,0	-	+	CR, +97, III	+/+
16 F, 12	CLL, CR1	Bu, Flu, ATG	MUD	PBSC	3,3	550,0	-	-	CR, +25, -	+/+
17 M, 6	ALL, CR2	ATG, CY, TBI, VP16	MUD	PBSC	9,5	570,0	-	+	+ Infektion, +11, -	-/-
18 M, 10	AML, CR2	Bu, CY, ATG, Thio	MUD	PBSC	6,6	1300,0	+	+	CR, +10, -	+/+
19 M, 6	AML, NR	Ara-C, CY, Topotecan	MUD	CD34 - PBSC§	9,8	0,031	-	+	+ Rezidiv, +6, IV	-/-
20 M, 3	ALL, CR2	ATG, CY, TBI, VP16	MUD	CD34 - PBSC§	16,2	0,0066	-	+	CR, +57, -	+/+
21 F, 5	ALL, CR2	CY, ATG, TBI, VP16	MUD	CD34 - PBSC§	12,4	0,0093	+	-	+ Infektion, +29, -	-/-
22 M, 11	ALL, CR1	CY, ATG, TBI, VP16	MUD	CD34 - PBSC§	7,2	0,0093	-	+	+ Rezidiv, +34, -	+/+
23 M, 15	AML, CR1	ATG, Bu, CY, Thio	MUD	CD34 - PBSC§	14,4	0,0093	-	+	CR, +48, -	+/+
24 M, 4	AML, CR2	Bu, CY, Mel, ATG	MUD	CD34 - PBSC§	31,9	0,014	-	-	CR, +46, -	+/+
25 M, 5	ALL, CR2	ATG, CY, TBI, VP16	MUD	CD34 - PBSC§	13,4	0,021	-	+	+ Rezidiv, +8, -	-/-
26 M, 7	ALL, CR2	Flu, ATG, TBI, VP16	MMFD	CD34 - PBSC§	16,4	0,016	-	+	CR, +90, -	+/+
27 M, 4	ALL, CR2	Flu, ATG, TBI, VP16	MMFD	CD34 - PBSC§	15,4	0,016	-	+	+ , +6, IV	-/-
28 M, 3	ALL, CR1	Flu, ATG, TBI, VP16	MMFD	CD34 - PBSC§	36,9	0,024	+	+	CR, +60, III	+/+
29 F, 12	ALL, NR	Flu, ATG, TBI, VP16	MMFD	CD34 - PBSC§	20,1	0,02	-	+	+TRD, +7, -	-/-
30 F, 9	ALL, CR2	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMFD	CD34 - PBSC§	12,7	0,0071	+	+	+CR, +16, III/IV	-/-
31 M, 23	ALL, CR3	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMFD	CD34 - PBSC§	10,3	0,0044	-	+	CR, +41, -	+/+
32 M, 4	MDS	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMFD	CD3/19 - PBSC#	7,0	0,051	-	+	CR, +30, -	-/+

*Erreichen der Referenzzellspoids an Tag 200 bzw. 300; §CD34-Selektioniertes PBSC; #CD3/19-Depletiertes PBSC

Tabelle 4.8.: Patienten der multivariaten Immunrekonstitutionsanalyse.

4. Material und Methoden

Patienten		n=201
Alter (Range)		41,5 (2-71)
<hr/>		
<i>Geschlecht</i>		n
	Weiblich	81
	Männlich	120
<hr/>		
<i>Diagnose</i>		n
	ALL	35
	AML	110
	CML	8
	MDS	15
	solide Tumore	15
	Andere Krankheiten mit Indikation zur SZT	18
<hr/>		
<i>CMV-Reaktivierung/De-Novo Infektion</i>		n(Reak.)/n(Ges.)
	Alle Patienten	78/201
	R+/D+	53/98
	R+/D-	20/33
	R-/D+	3/32
	R-/D-	2/38
<hr/>		
<i>Spender</i>		n
	MFD	57
	MUD	88
	MMUD	35
	MMFD	21
<hr/>		
<i>Transplantate</i>		n
KM		28
	CD34·10 ⁶ /kgKG	3,4
	CD3·10 ⁶ /kgKG	27
PBSC ohne T-Zelldepletion		152
	CD34·10 ⁶ /kgKG	6,7
	CD3·10 ⁶ /kgKG	420
PBSC mit T-Zelldepletion		21
	CD34·10 ⁶ /kgKG	10,4
	CD3·10 ⁶ /kgKG	0,03
<hr/>		
<i>Verwendete CMV-Tetramere</i>		n
	HLA-A*0101 (pp50)	68
	HLA-A*0201 (pp65)	109
	HLA-A*1101 (pp65)	1
	HLA-A*2402 (pp65)	43
	HLA-B*0702 (pp65)	49
	HLA-B*0801 (IE-1)	53
	HLA-B*3501 (pp65)	23

Tabelle 4.9.: Patienten der multi-zentrischen CMV-CTL Studie.

Geschlecht, Alter	Diagnose, Remission	Konditionierung	GvHD Prophylaxe	Spender	Stammzellquelle	CD34 ⁺ (-10 ⁶ /kgKG)	CD3 ⁺ (-10 ⁶ /kgKG)	DLI	Steroidapplikation	Status, Monate nach SZT, GvHD
1 M, 17	AML, CR2	Bu, CY	CsA	MFD	KM	5,57	43,9	-	+	+ Rezidiv, +7, -
2 F, 10	ALL, CR1	TBI, VP16	CsA	MFD	KM	6,19	57,0	-	+	CR, +25, aGvHD I
3 M, 14	ALL, CR1	TBI, VP16	CsA	MUD	KM	3,62	49,7	-	+	CR, +25, -
4 F, 6	ALL, CR2	TBI, VP16	CsA, MTX	MUD	KM	7,32	5,65	-	-	CR, +36, -
5 M, 10	ALL, CR2	ATG, TBI, VP16	CsA, MTX	MUD	KM	2,6	32,0	-	+	CR, +28, aGvHD I
6 M, 16	ALL, CR1	TBI, VP16	CsA, MTX	MUD	KM	2,2	24,3	-	+	CR, +36, aGvHD I/II
7 F, 7	ALL, CR1	TBI, VP16	CsA, MTX	MUD	KM	6,39	64,2	-	+	CR, +31, -
8 F, 16	ALL, CR2	ATG, TBI, Vp16	CsA, MTX	MUD	KM	3,38	43,8	+	+	+ Rezidiv, +5, aGvHD I
9 F, 18	NB, CR2	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMF	MMFD	3/19 - PBSC	10,0	0,097	+	+	CR, +17, aGvHD II
10 M, 7	NB, CR2	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMF	MMFD	3/19 - PBSC	13,84	0,029	+	+	CR, +30, aGvHD I/II
11 M, 3	NB, CR2	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMF	MMFD	3/19 - PBSC	16,84	0,05	+	+	+ Rezidiv, +6, aGvHD I
12 F, 6	AML, CR2	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMF	MMFD	3/19 - PBSC	15,5	0,059	-	+	CR, +26, aGvHD I
13 M, 8	NB, PR	Flu, Mel, OKT3, Thio	MMF	MMFD	3/19 - PBSC	9,73	0,025	+	-	CR, +6, aGvHD I/II
14 M, 6	ALL, CR2	ATG, TBI, VP16	CsA, MTX	MUD	3/19 - PBSC	11,19	0,18	+	+	+ Rezidiv, +7, aGvHD I
15 M, 30	AML, CR1	Bu, CY, Flamsa, TBI	CsA	MUD	PBSC	4,0		-	+	CR, +21, aGvHD III/IV, cGvHD
16 M, 45	ALL, CR2	Flu, TBI	CsA, MMF	MUD	PBSC	7,8	356,0	-	+	CR, +23, cGvHD

§ CD34-Selektiertes PBSC; # CD3/19-Depletiertes PBSC

Tabelle 4.10.: Patienten der Treg Studie.

4.3. Labormethoden

4.3.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen auf Einzelzellebene.

Das Prinzip zur Ermittlung molekularer Eigenschaften unter Verwendung eines Durchflusszytometers („FACS - Fluorescence-activated-cell-sorter“) beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung. Zum Einsatz kommen hierzu monoklonale fluorochrom-konjugierte Antikörper. Mit Hilfe eines Lasers als monochromatische Lichtquelle werden die Fluorochrome mit der für sie spezifischen Wellenlänge angeregt und können über das jeweilige charakteristische Emissionsspektrum detektiert werden. Des Weiteren können über die Streuung des Laserlichts Größe (FS: Forward-Scatter) und Granularität (SS: Side-Scatter) ermittelt werden (Abb. 4.1). Die Lichtsignale werden mit Hilfe einer optischen Bank (Filter/Spiegel) getrennt, durch Photomultiplier (PMT) verstärkt und zur Auswertung digitalisiert^{80,81}.

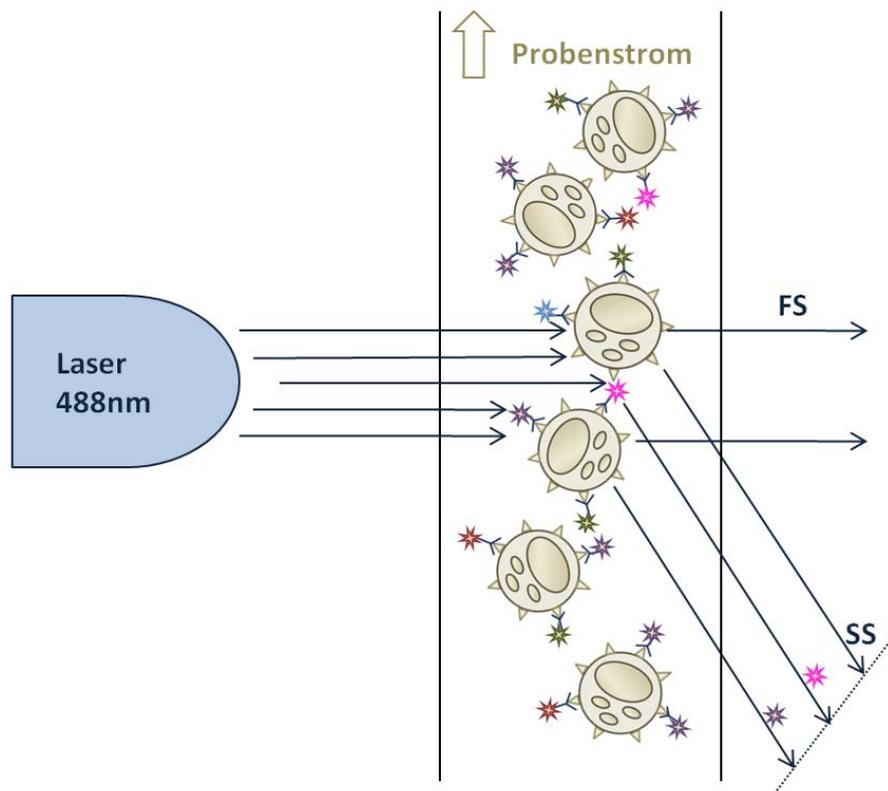


Abbildung 4.1.: Prinzip der durchflusszytometrischen Messung. Durch die Streuung in Richtung des Lichtstrahls (FS) kann die Größe von Zellen bestimmt werden. Die Ablenkung des Strahls im 90° Winkel (SS) gibt Informationen über die Granularität. Außerdem emittieren über Antikörper an die Zellen gekoppelte Fluorochrome Licht unterschiedlicher Wellenlängen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem FC-500 und einem Navios Durchflusszytometer gearbeitet. Zur univariaten und multivariaten Auswertung von Immurekonstitutionsdaten wurden teilweise Daten herangezogen, die vor Beginn der vorliegenden Dissertation im Labor für SZT und Immuntherapien mit Hilfe eines EpicsTMXLTM 4-Farb-Durchflusszytometers erhoben wurden. Das verwendete FC-500 Durchflusszytometer arbeitet mit einem blauen Laser, welcher monochromatisches Licht mit der Wellenlänge 488nm aussendet. Mit der angewendeten Konfiguration können die Fluorochrome FITC, PE, ECD, PC5 und PC7 detektiert werden. Das verwendete Navios Durchflusszytometer besitzt zusätzlich einen roten und einen violetten Laser, die Licht der Wellenlängen 638nm und 405nm aussenden. Hierdurch können zusätzlich die Fluorochrome APC, APC A-700, APC A-750, PacB und PacO detektiert werden. Tabelle 4.11 gibt einen Überblick der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Abbildung 4.2 zeigt die Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome.

Anregung	Fluoreszenzkanal	Fluoreszenzfarbstoff	Molekulargewicht des Farbstoffes (Dalton) ⁸²	Emissionsmaximum (nm)
488	FL1	FITC (Fluorescein Isothiocyanate)	389	820
	FL2	PE (Phycoerythrin)	240000	575
	FL3	ECD (PE-Texas Red)	240625	620
	FL4	PC5 (PE-cyanine 5)	241500	680
	FL5	PC7 (PE-cyanine 7)	241001	770
638	FL6	APC (Allophycocyanin)	105000	670
	FL7	APC A-700 (APC-Alexa Fluor [®] 700)	106400	720
	FL8	APC A-750 (APC-Alexa Fluor [®] 750)	106300	780
405	FL9	PacB (Pacific Blue TM)	406	450
	FL10	PacO (Pacific Orange TM)	800	550

Tabelle 4.11.: Fluoreszenzfarbstoffe. Verwendete Fluorochrome mit ihren Molekulargewichten und Emissionswellenlängen.

Nach Digitalisierung der Messwerte können die Daten mit Hilfe spezieller Software als sogenannte 2-Parameter-Plots dargestellt werden. Dem Anwender wird durch die Definition von Regionen ermöglicht, bestimmte Zellpopulationen von anderen zu separieren. Die Verknüpfung von Regionen zu *Gates* (Engl.: Tor) ermöglicht eine weitergehende Analyse von Zellen, die über mehrere Parameter definiert werden. Mit Hilfe logischer Operatoren lassen sich Gates beliebig kombinieren und zu einer „Gating-Strategie“ zusammenfassen.

4. Material und Methoden

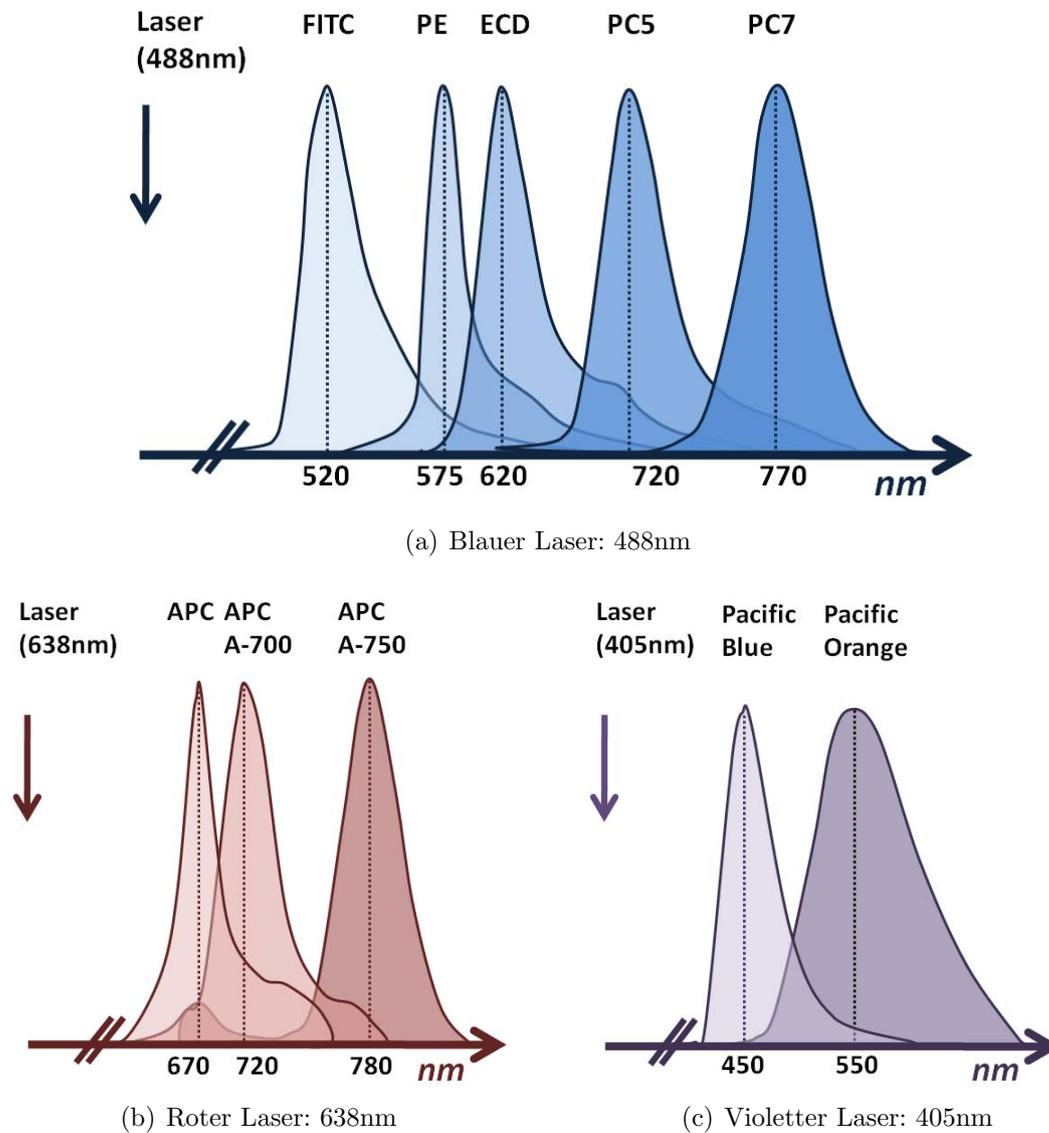


Abbildung 4.2.: Emissionsspektren. (a) Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE, ECD, PC5 und PC7 werden vom blauen Laser (488nm), (b) die Fluorochrome APC, APC A-700 und APC A-750 vom roten Laser und (c) die Farbstoffe PacB und PacO vom violetten Laser angeregt. Die Überlappung der Emissionsspektren muss durch eine geeignete Kompensation korrigiert werden.

4.3.2. Phänotypisierung von Immunzellen

Die Zellen des Immunsystems lassen sich aufgrund ihrer Expression spezifischer Oberflächenmoleküle (CD-Marker) voneinander unterscheiden. Mit Hilfe von fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern (Tabelle 4.4) können diese Oberflächenmoleküle angefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt werden. Neben der Markierung von Oberflächenmolekülen ist es auch möglich, intrazelluläre Antigene von Immunzellen zu färben und durchflusszytometrisch zu bestimmen. Hierzu müssen die Zellen zunächst fixiert und die Zellmembranen permeabilisiert werden. Die Charakterisierung von Immunzellen im peripheren Blut wird als Immunphänotypisierung bezeichnet. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wird EDTA-Vollblut benötigt. Dieses wurde bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb eines Zeitfensters von 24 Stunden nach Blutabnahme bearbeitet. Zur Angabe von Absolutzellzahlen pro μl Patientenblut wurden folgende Verfahren eingesetzt:

- *Dual Platform*: Bei dieser Methode wird zunächst die absolute Anzahl an Leukozyten/ μl mit Hilfe eines Hämatozytometers bestimmt. Anschließend wird der Anteil verschiedener Leukozytenuntergruppen durchflusszytometrisch charakterisiert. Da die Absolutzahl der Leukozyten/ μl bekannt ist, können anhand der ermittelten prozentualen Angaben auch die Zellzahlen/ μl der Untergruppen berechnet werden.
- *Single Platform*: Die Bestimmung der Absolutzellzahlen aller untersuchten Zellgruppen geschieht hierbei während der durchflusszytometrischen Messung. Hierzu werden Flow-CountTM Fluorespheres (Beads; Latex Partikel) eingesetzt, welche als interner Standard dienen. Sind Anzahl von Beads pro Volumeneinheit und die Menge der verwendeten Probe bekannt, so kann die Absolutzellzahl berechnet werden. Man sollte beachten, dass nur ein geradliniger Beadsverlauf (>95% im Gate) eine exakte Zellzahlbestimmung gewährleistet.

Bestimmung von T-, B-, NK-Zellen und Tregs mit Hilfe von 5-Farb Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung von T-, B-, NK-Zellen und Tregs in Patientenblut wurde eine „no-wash-Methode“ eingesetzt. Zur Bestimmung von Absolutzellzahlen wurde das Dual-Platform Verfahren gewählt. Die Leukozytenzahl lag in den meisten Fällen bereits vor, da sie im Zuge der Routineuntersuchung des Patientenbluts durch das hämatologische Labor der Kinderklinik bestimmt wurde. War dies nicht der Fall, wurde ein kleines Blutbild mit dem Hämatozytometer (Ac. T diffTM) erstellt. Zur Immunphänotypisierung wurden folgende Kombinationen von Antikörpern gewählt:

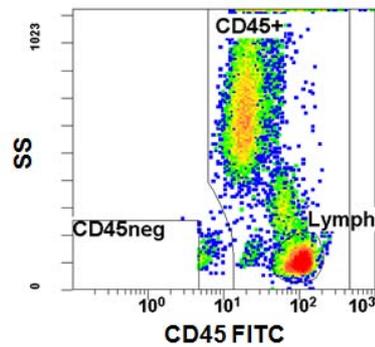
4. Material und Methoden

1. *CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5/CD14-PC7*: Mit dieser Markerkombination können Lymphozyten, $CD3^+$ T-Zellen, $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen, $CD3^+CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und $CD14^+$ Monozyten bestimmt werden.
2. *CD45-FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3-PC5/CD16-PC7*: Ansatz zur zusätzlichen Charakterisierung von $CD3^-CD56^+$ NK-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen.
3. *CD3-FITC/CD127-PE/CD4-ECD/CD62L-PC5/CD25-PC7*: Diese Antikörperkombination ermöglicht die Bestimmung von $CD25^{bright}$ und $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Tregs bezogen auf die $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen.

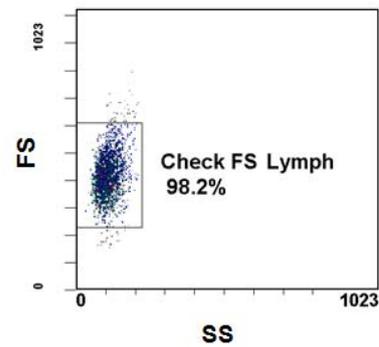
Für die Ansätze 1-3 wurde je ein Röhrchen mit jeweils $10/\mu\text{l}$ der beschriebenen Antikörper vorbereitet. Anschließend wurden je $100\mu\text{l}$ EDTA-Patientenblut zu dem Antikörpergemisch pipettiert. Zum Durchmischen von Blut und Antikörpergemisch wurden die Proben anschließend gevortext. Eine darauf folgende 15 minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur ist ausreichend, damit eine Bindung zwischen Antikörper und Immunzelle stattfinden kann. Die Lagerung der Proben während der Inkubationszeit sollte im Dunkeln stattfinden, da die fluorochrom-gekoppelten Antikörper sehr lichtempfindlich sind. Nach der Inkubation wurde mit Hilfe der TQ-PrepTM Workstation die Lyse von Erythrozyten und die Zellfixation durchgeführt. Hierzu wird das IMMUNOPREPTM Reagent System verwendet, welches die folgenden drei Reagenzien beinhaltet:

- *IMMUNOPREP A* enthält Ameisensäure (CH_2O_2) zur Lyse der Erythrozyten.
- *IMMUNOPREP B* besteht aus Natriumcarbonat (Na_2CO_3), Natriumchlorid ($NaCl$) und Natriumsulfat (Na_2SO_4) und dient der Stabilisierung der Leukozyten.
- *IMMUNOPREP C* beinhaltet Paraformaldehyd zur Fixierung der Membran.

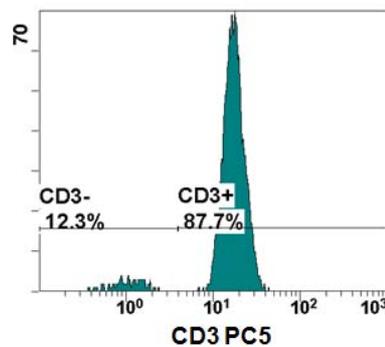
Innerhalb von 24 Stunden nach der Erythrozytenlyse und Fixation wurden die Zellen durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Daten wurde mit Hilfe der CXP System II Software ausgewertet. Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die Gating Strategie für Monozyten, Lymphozyten, T-Zellen (incl. T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen), B-Zellen und NK-Zellen bei einem Patienten 1 1/4 Jahre nach allogener SZT. Die Gating Strategie zur Auswertung von Tregs dieses Patienten zum gleichen Zeitpunkt zeigt Abbildung 4.5.



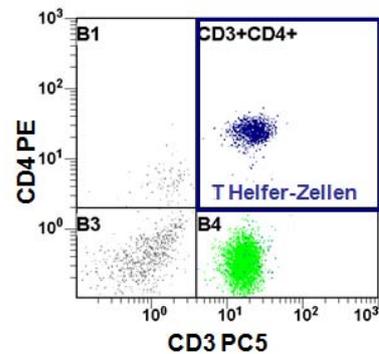
(a) Gate: Ungated



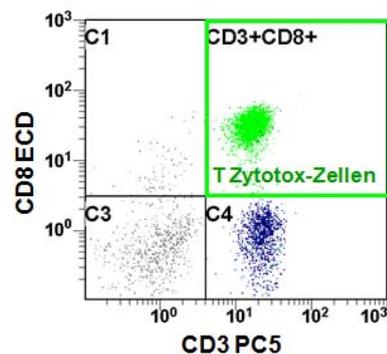
(b) Gate: Lymphozyten



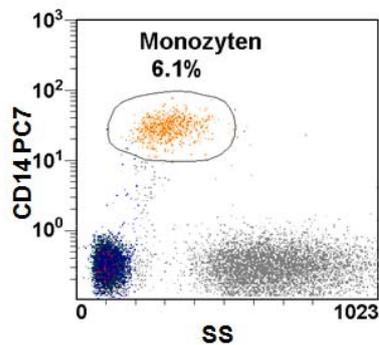
(c) Gate: Lymphozyten + Check FS



(d) Gate: Lymphozyten + Check FS



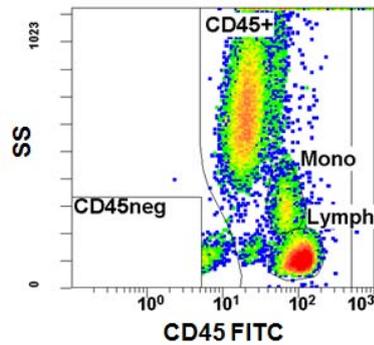
(e) Gate: Lymphozyten + Check FS



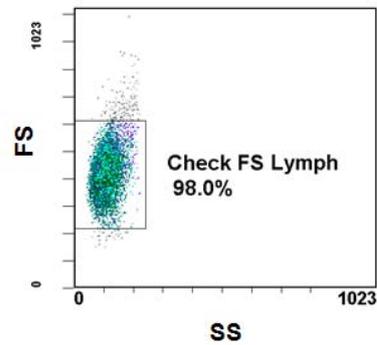
(f) Gate: Leukozyten

Abbildung 4.3.: Immunstatus 1: Bestimmung von T-Zellen und Monozyten. (a) Bestimmung des Lymphozytenanteils. Aufgetragen sind Granularität (SS: Side Scatter) gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45. (b) Die Granularität und die Größe (FS: Forward Scatter) sind gegeneinander aufgetragen. Zu große, zu kleine und Zellen die zu granulär sind, können aus der Lymphozytenpopulation ausgeschlossen werden. (c) Dieses Histogramm dient der eindeutigen Trennung von $CD3^+$ T-Zellen und $CD3^-$ Lymphozyten. (d) T-Helferzellen werden mit Hilfe der Marker CD3 und CD4 als $CD3^+CD4^+$ bestimmt. (e) Gatingstrategie für $CD3^+CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. (f) Die Monozyten werden mit Hilfe des Markers CD14 von den restlichen Leukozyten separiert.

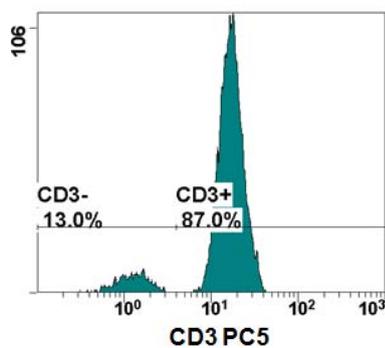
4. Material und Methoden



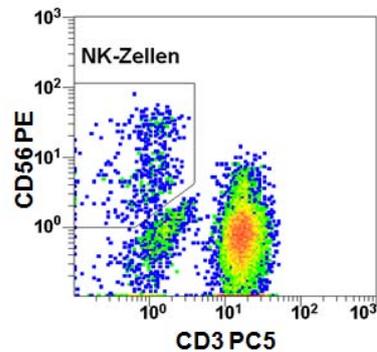
(a) Gate: Ungated



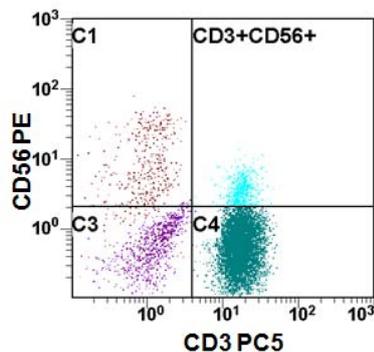
(b) Gate: Lymphozyten



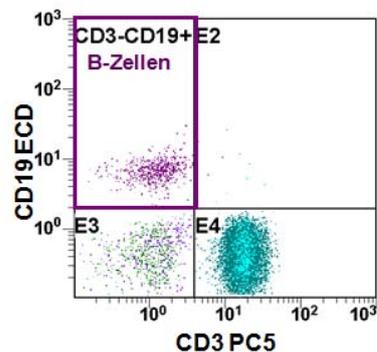
(c) Gate: Lymphozyten + Check FS



(d) Gate: Lymphozyten + Check FS



(e) Gate: Lymphozyten + Check FS



(f) Gate: Lymphozyten + Check FS

Abbildung 4.4.: Immunstatus 2: Bestimmung von NK- und B-Zellen. (a) Die Lymphozyten werden anhand von Granularität (SS) und CD45-Expression ausgewählt. (b) Überprüfung der Lymphozytenbestimmung durch FS und SS. (c) Ermittlung der CD3-Grenze zur Unterteilung in $CD3^+$ T-Zellen und $CD3^-$ Lymphozyten. (d) NK-Zellen werden mit Hilfe der Marker CD3 und CD56 als $CD3^-CD56^+$ Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. (e) Detektion von $CD3^+CD56^+$ NK ähnlichen T-Zellen. (f) Gatingstrategie zur Detektion $CD3^-CD19^+$ B-Zellen.

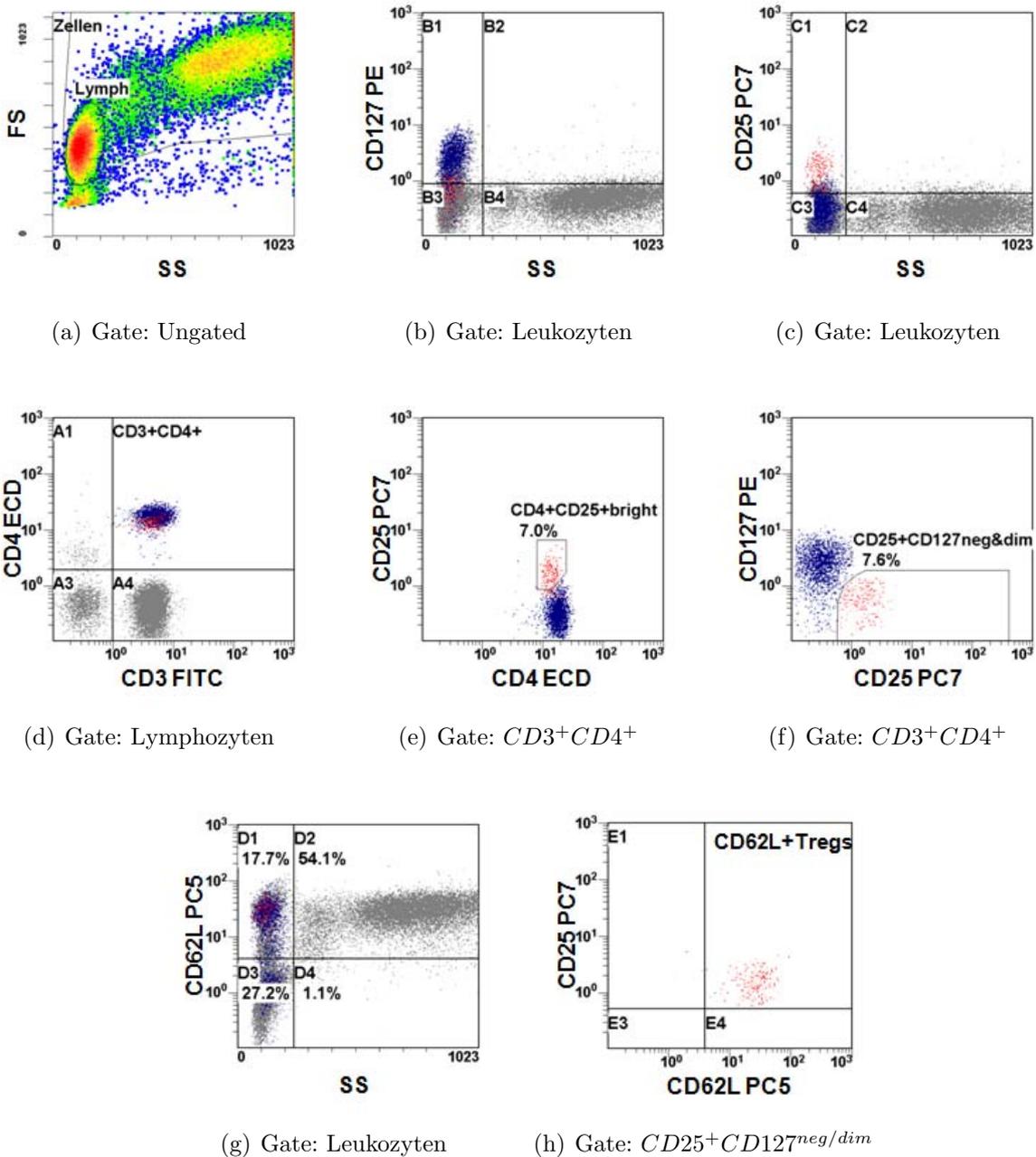


Abbildung 4.5.: Gating Strategie für regulatorische T-Zellen (Tregs). (a) Detektion der Lymphozyten durch Größe (FS) und Granularität (SS). (b) Hilfsplot zur Trennung $CD127^+$ und $CD127^-$ Zellen. (c) Hilfsplot zur Trennung $CD25^+$ und $CD25^-$ Zellen. (d) Bestimmung $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen. (e) Gatingstrategie für $CD4^+CD25^{bright}$ Tregs. (f) Treg Bestimmung unter zu Hilfenahme von CD127. In rot $CD4^+CD25^+CD127^{neg/dim}$ Tregs. (g) Hilfsplot zur Trennung $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Zellen. (h) Expression von CD62L auf $CD4^+CD25^+CD127^{neg/dim}$ Tregs.

Immunphäotypisierung von Treg- und NK-Zellsubpopulationen mit Hilfe von 10-Farb Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung von Treg- und NK-Zelluntergruppen mit Hilfe von 10-Farb Durchflusszytometrie wurden die Antikörper CD62L-FITC/CD117-PE/CD45RA-ECD/CD69-PC5/CD25-PC7/CD56-APC/CD127-APC A-700/CD16-APC A-750/CD4-PacB und CD3-PacO eingesetzt. Die Antikörpermengen wurden gemäß der Herstellerangaben in ein Röhrentube pipettiert. Nach einer Zugabe von 200 μ l EDTA-Blut wurde die Probe gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Zur Erythrozytenlyse wurden im Anschluss 2ml VersaLyseTM inklusive IOtest[®] 3 Fixative Solution (1:40 - Fixative:Lyse) hinzugefügt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen zwei Mal gewaschen. Hierzu wurden jeweils 3ml PBS zugegeben und die Proben wurden bei 300g fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die durchflusszytometrische Messung am Navios 10-Farb Durchflusszytometer durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der Kaluza[®]-Software ausgewertet. Abbildung 4.6 zeigt einen Beispielplot.

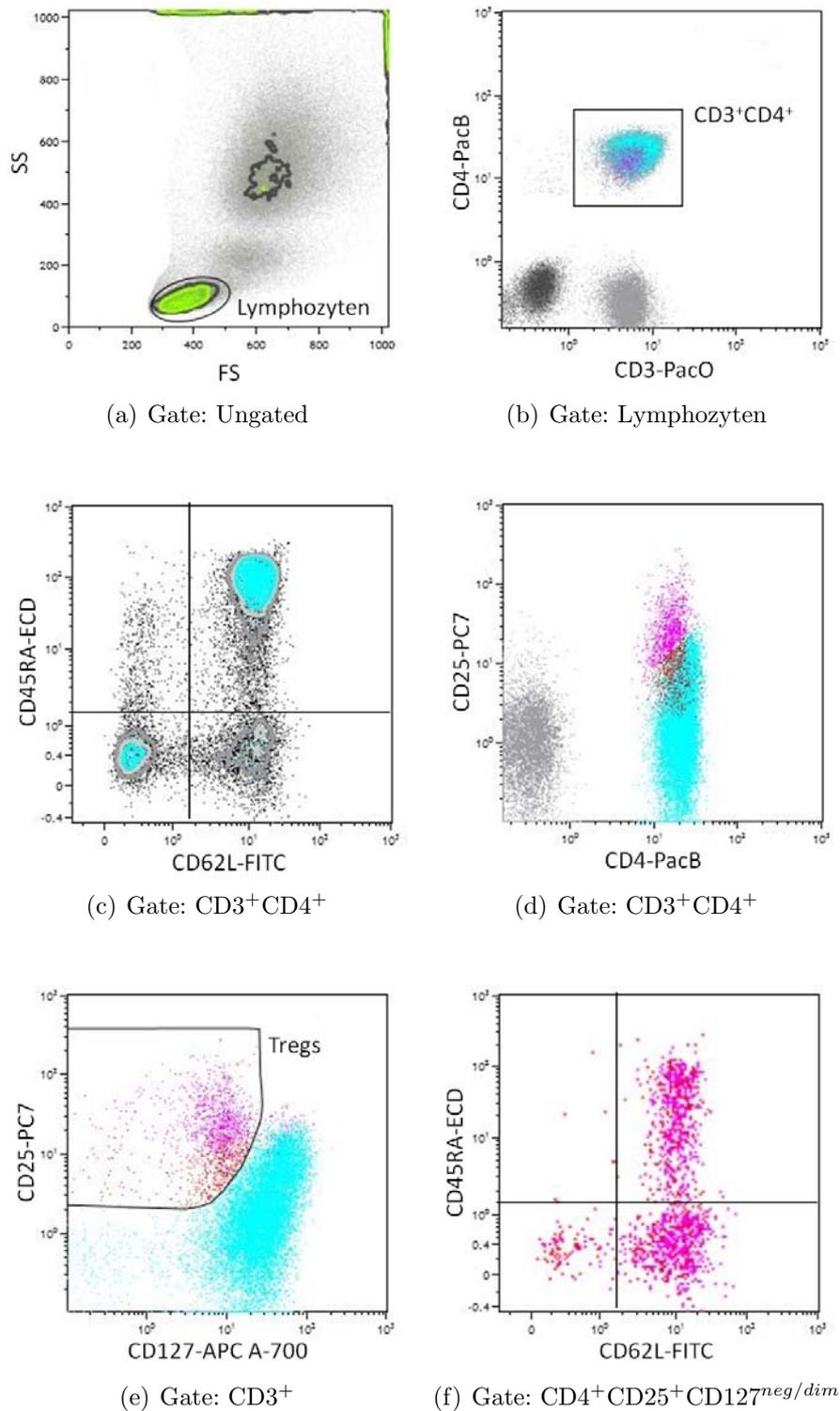


Abbildung 4.6.: Gating-Strategie: Messung von Tregs und Treg-Untergruppen mit Hilfe von 10-Farb-Durchflusszytometrie. Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Tregs und Treg-Untergruppen wurden die Oberflächenmarker CD62L-FITC, CD45RA-ECD, CD69-PC5, CD25-PC7, CD127-APC A-700, CD4-pacB und CD3-pacO eingesetzt. (a) Lymphozyten (b) $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen (c) $CD45RA^+CD62L^+$ Naive-, $CD45RA^-CD62L^+$ Zentrale-Gedächtnis- und $CD45RA^-CD62L^-$ Effektor-Gedächtnis T-Zellen (d) $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Tregs (e) Überschneidung von aktivierten $CD25^+$ T-Zellen und $CD25^{bright}$ Tregs (f) Naive-, Zentrale-Gedächtnis- und Effektor-Gedächtnis Tregs.

Intrazelluläre FoxP3 Färbung von Tregs

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird intrazellulär von Tregs exprimiert. Aus diesem Grund müssen die Zellen zur FoxP3 Bestimmung zunächst fixiert und die Zellmembranen geöffnet werden. Anschließend kann FoxP3 mit einem fluorochrom-gekoppelten Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Zur Fixation der Zellen und zur Öffnung der Zellmembran, der sogenannten Permeabilisierung, wurden zunächst zwei Pufferlösungen vorbereitet:

- *Puffer A* beinhaltet Diethylen Glycol und Formaldehyd und dient der Fixierung.
- *Puffer B* besteht aus Natrium Azid zur Permeabilisierung der Zellmembran.

Zunächst wurde die Leukozytenzahl/ μl mit Hilfe des Hämatozytometers (Ac. T diffTM) bestimmt. Für den Ansatz werden $1 \cdot 10^6$ Leukozyten absolut benötigt. Das Volumen, welches diese Zellzahl beinhaltet, wurde zunächst berechnet und anschließend in ein Röhrentube pipettiert. Zur Erythrozytenlyse wurde NH_4Cl Lyse (1:10 - Stem-KitTM Reagents Lysing Solution 10X:AquaDest) eingesetzt. Nach zwei Waschschritten (Zentrifugation: 257g, 4 Minuten) mit jeweils 2ml PBS wurden die Zellen mit den Oberflächenmarkern CD62L-FITC/CD4-ECD/CD25-PC5 und CD127-PC7 markiert. Darauf folgten ein Waschschriff (Zentrifugation: 257g, 4 Minuten) mit 2ml kaltem PBS und die Fixierung der Zellen mit 2ml Puffer A. Anschließend folgten ein Zentrifugations- und ein Waschschriff (Zentrifugation jeweils: 500g, 5 Minuten) sowie die Permeabilisierung der Membran durch die Zugabe von $500\mu\text{l}$ Puffer B. Nach einer erneuten Zentrifugation (500g, 5 Minuten) wurden $20\mu\text{l}$ FoxP3-PE Antikörper zugegeben und es wurde ein letzter Waschschriff (Zentrifugation: 500g, 5 Minuten) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in $500\mu\text{l}$ PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 4.7 zeigt eine Beispielmessung.

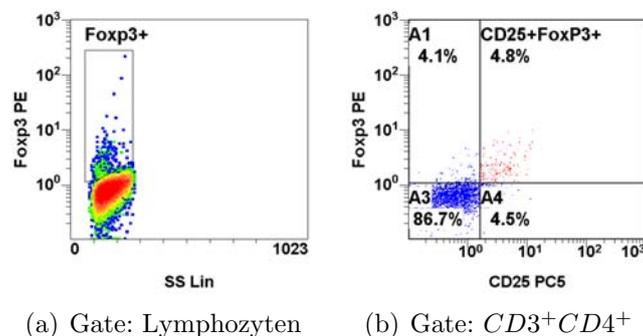
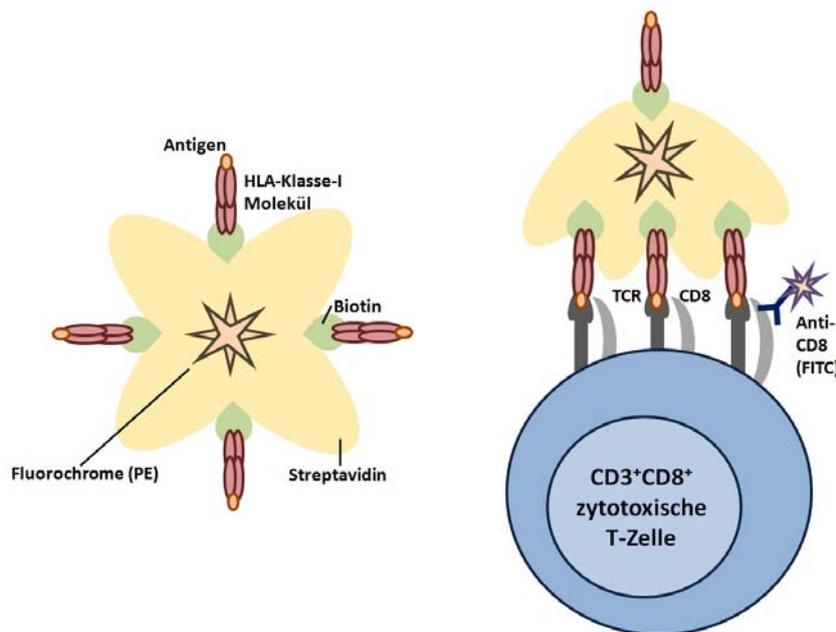


Abbildung 4.7.: Bestimmung von Tregs. Gezeigt ist eine Beispielmessung von Tregs mit Hilfe intrazellulärer FoxP3-Färbung. (a) FoxP3 Expression auf allen Lymphozyten. (b) Gating Strategie für $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}25^+\text{FoxP}3^+$ Tregs.

4.3.3. Messung CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) mit Hilfe der Tetramertechnologie

Tetramertechnologie

Ein Tetramer besteht aus vier HLA-Klasse-I Molekülen, welche mit einem CMV-Peptid beladen sind. Die HLA-Klasse-I Moleküle sind über Biotin an Streptavidin gebunden. Das Streptavidin ist mit einem Fluorochrom verbunden, das für die durchflusszytometrische Detektion notwendig ist⁸³. Abb. 4.8 zeigt den Aufbau eines Tetramers (s. 4.8(a)) und die Bindung eines Tetramers an eine CMV-CTL (s. 4.8(b)). Mittels dieser Tetramertechno-



(a) Aufbau eines Tetramers (b) Bindung von Tetramer und T-Zelle

Abbildung 4.8.: Tetramertechnologie. (a) Darstellung eines HLA-Klasse-I spezifischen Tetramers zur durchflusszytometrischen Bestimmung von CMV-CTLs. Ein Phycoerythrin (PE)-markiertes Streptavidin ist mit vier Biotinmolekülen verbunden. Diese sind jeweils mit einem HLA-Klasse-I Molekül verknüpft, das ein CMV-Antigen präsentiert. (b) Bindung des Tetramers an eine $CD3^+CD8^+$ zytotoxische T-Zelle. Die TCRs der T-Zelle binden an die HLA-Klasse-I Moleküle des Tetramers. Zur Messung wird die Zelle noch mit Antikörpern markiert, die andere Fluorochrome gebunden haben (z.B. CD8-FITC)

nologie kann eine sehr sensitive Quantifizierung von seltenen Zellpopulationen erreicht werden. Ein Nachteil des Verfahrens ist die HLA-Restriktion, denn man kann damit nur CMV-CTLs bei Patienten bestimmen, deren Zellen mindestens ein HLA-Klasse-I Molekül tragen, für das auch ein Tetramer vorhanden ist. Momentan sind neun verschiedene HLA-spezifische Tetramere auf dem Markt. Uns standen zu Beginn unserer Messungen sechs, später durch Hinzunahme von HLA-A*1101 sieben dieser Tetramere zur Verfügung (s. Tabelle 4.5). Die Verwendung von sechs Tetrameren ermöglichte uns die Bestimmung von

4. Material und Methoden

CMV-CTLs bei mehr als 85% unserer Patienten⁸⁴. Durch eine Verwendung aller Tetramere wäre eine Anwendung dieses Messverfahrens bei >90% der Patienten möglich.

Die verwendeten Tetramere sind mit Peptiden drei unterschiedlicher CMV-Proteine beladen (pp50, pp65 und IE-1). Tabelle 4.12 gibt eine Übersicht der verwendeten CMV-Tetramere und zeigt, von welchem CMV-Protein die an die Tetramere gekoppelten Peptide stammen. Fünf der Tetramere sind mit Peptiden des CMV-Proteins pp65 beladen.

HLA-Klasse-I Tetramer	CMV-Protein	Epitop
HLA-A*0101	pp50	CMV (VTEHDTLLY)
HLA-A*0201	pp65	CMV (NLVPMVATV)
HLA-A*1101	pp65	CMV (ATVQGQNLK)
HLA-A*2402	pp65	CMV (QYDPVAALF)
HLA-B*0702	pp65	CMV (TPRVTGGGAM)
HLA-B*0801	IE-1	CMV (ELRRKMMYM)
HLA-B*3501	pp65	CMV (IPSINVHHY)
Negativ Tetramer (HLA-Mix)	Unspezifisches Peptid	

Tabelle 4.12.: CMV-Tetramere und daran gekoppelte Virus-Peptide. Es wurden sieben HLA-Klasse-I spezifische Tetramere zur Bestimmung von CMV-CTLs eingesetzt. Fünf dieser Tetramere waren mit Peptiden des CMV-Proteins pp65 beladen. Jeweils ein Tetramer detektiert die Immunantwort gegen pp50 und IE-1.

CMV-pp65 ist ein Tegument-Protein, das eine dominante Immunantwort liefert⁸⁵. Es hat wahrscheinlich die Funktion einer Proteinkinase und fördert die Inkorporation weiterer Virusproteine²⁰. Das CMV-Protein pp50 (UL44) wird früh im Replikationszyklus des Virus exprimiert, es bindet doppelsträngige DNA und hat eine wichtige Funktion bei der Virusreplikation⁸⁶. Eines der ersten Proteine, das während der Virusreplikation gebildet wird, ist der Transaktivator Immediate-Early 1 (IE-1). Er leitet die Expression anderer viraler Proteine ein, stimuliert die Expression von NF κ B, einem weiteren Transaktivator und steigert die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine⁸⁷.

Gibt es eine Übereinstimmung mehrerer Tetramere mit den HLA-Molekülen des Patienten, wird die Messung mit allen passenden Tetrameren durchgeführt.

Messung von CMV-CTLs

Zur Bestimmung von CMV-CTLs in EDTA-Blut wurden folgende Ansätze durchgeführt:

1. *Absolutzellzahl-Bestimmung*: Single Platform Verfahren zur Messung von Leukozyten, Lymphozyten, $CD3^+$ T-Zellen, $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen und $CD3^+CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. Es wurden pro Patient zwei Ansätze durchgeführt:

- Bestimmung der Absolutzellzahlen im Patientenblut.
- Messung von Absolutzahlen in Kontrollblut (IMMUNO-TROLTM Cells) (dient der Validierung).

2. Messung von CMV-CTLs:

- Falls mindestens 100 $CD3^+CD8^+$ T-Zellen/ μ l nachgewiesen werden können, werden CMV-CTLs mit jedem HLA-Klasse-I spezifischen Tetramer, das mit einem HLA-Merkmal des Patienten übereinstimmt, bestimmt.
- Zusätzlich wird ein Ansatz mit einem Negativ-Tetramer durchgeführt, um unspezifische Bindungen zu ermitteln.

Zur Bestimmung der Absolutzahlen wurden zunächst jeweils 10 μ l der Antikörper CD8-FITC/CD4-PE/CD3-PC5 und CD45-PC7 vorgelegt. In reverser Pipettieretechnik wurden anschließend 100 μ l Patienten- bzw. Kontrollblut zugegeben. Die Proben wurden gevortext und für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 1 ml Lyse-Fixations-Reagenz (VersaLyseTM+IOtest[®] 3 Fixative Solution, 1:40) gegeben. Darauf folgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen. Bis zur Messung wurden die Proben höchstens 24 Stunden bei 4°C gelagert. Direkt vor der Messung wurden mit reverser Pipettieretechnik 100 μ l Flow-CountTM Fluorespheres (Beads) zur Probe gegeben. Abbildung 4.9 zeigt eine Beispielauswertung.

Zur Bestimmung von CMV-CTLs mit Hilfe von HLA-Klasse-I spezifischen Tetrameren wurden jeweils 10 μ l CD8-FITC und CD3-PC5 vorgelegt. Außerdem wurden 10 μ l iTAGTM MHC Tetramer (passendes HLA-Klasse-I spezifisches Tetramer bzw. Negativ Tetramers) hinzugefügt. Anschließend wurden 200 μ l Patientenblut dazu pipettiert und die Proben wurden für 20-30 min dunkel inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 1 ml Lyse-Fixations-Reagenz (VersaLyseTM+IOtest[®] 3 Fixative Solution, 1:40) gegeben. Darauf folgte eine zehn minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen. Im Anschluss wurden zwei Waschstschritte mit 3ml PBS durchgeführt (Zentrifugation: 257g, 4 Minuten). Abschließend wurden 500 μ l 0.1%iges Formaldehyd-PBS (PBS+IOtest[®] 3 Fixative Solution, 1:80) hinzugefügt. Die Ansätze wurden anschließend bei 4°C gelagert und nach vier bis 24 Stunden Inkubation durchflusszytometrisch charakterisiert. Tabelle 4.13 zeigt das Ansatzschema zur Bestimmung von CMV-CTLs. Die Abbildung 4.10 zeigt eine Beispielauswertung. Mit Hilfe dieses Ansatzes wird der prozentuale Anteil von CMV-CTLs bezogen auf die $CD3^+CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen ermittelt. Da wir die Anzahl zytotoxischer T-Zellen bereits mit dem Single Platform Verfahren bestimmt haben, lässt sich die Zellzahl der CMV-CTLs errechnen.

4. Material und Methoden

Reagenz	Patient neg. Tetramer	Patient HLA-A*0101	Patient HLA-A*0201	Patient HLA-A*1101	Patient HLA-A*2402	Patient HLA-B*0702	Patient HLA-B*0801	Patient HLA-A*3501
CD8-FITC	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Neg. Tetramer-PE	10 μ l							
HLA-A*0101-PE		10 μ l						
HLA-A*0201-PE			10 μ l					
HLA-A*1101-PE				10 μ l				
HLA-A*2402-PE					10 μ l			
HLA-B*0702-PE						10 μ l		
HLA-B*0801-PE							10 μ l	
HLA-B*3501-PE								10 μ l
CD3-PC5	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Probenmaterial	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
	Ansätze vortexen und 20-30 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubieren.							
Lyse-Fixations-Reagenz	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
	Ansätze vortexen und 10 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubieren.							
	4 Minuten bei 257g zentrifugieren, Überstand verwerfen, vortexen.							
PBS	Insgesamt 3ml PBS zugeben. Nach Zugabe von 1ml und 2ml PBS vortexen.							
	4 Minuten bei 257g zentrifugieren, Überstand verwerfen, vortexen.							
0.1% Formaldehyd-PBS*	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
	Ansätze vortexen und bei 4°C mindestens 1h, maximal 24h dunkel inkubieren.							
	Ansätze vortexen. Durchflusszytometrische Messung.							

* Bei sofortiger durchflusszytometrische Messung kann PBS ohne Formaldehyd eingesetzt werden.

Tabelle 4.13.: Ansatzschema - Bestimmung von CMV-CTLs.

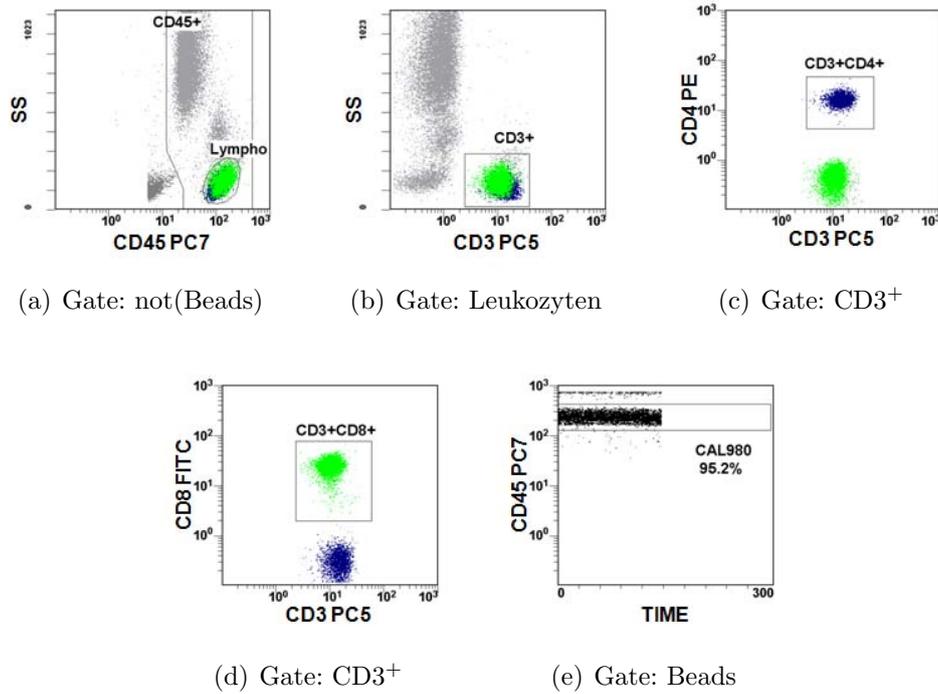


Abbildung 4.9.: Absolutzellzahlbestimmung. (a) Bestimmung der Leukozyten und Lymphozyten (b) Gatingstrategie für $CD3^+$ T-Zellen (c) Plot zur Zellzahlanalyse von $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen (d) Bestimmung $CD3^+CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen (e) Verlauf der Fluorespheres Beads.

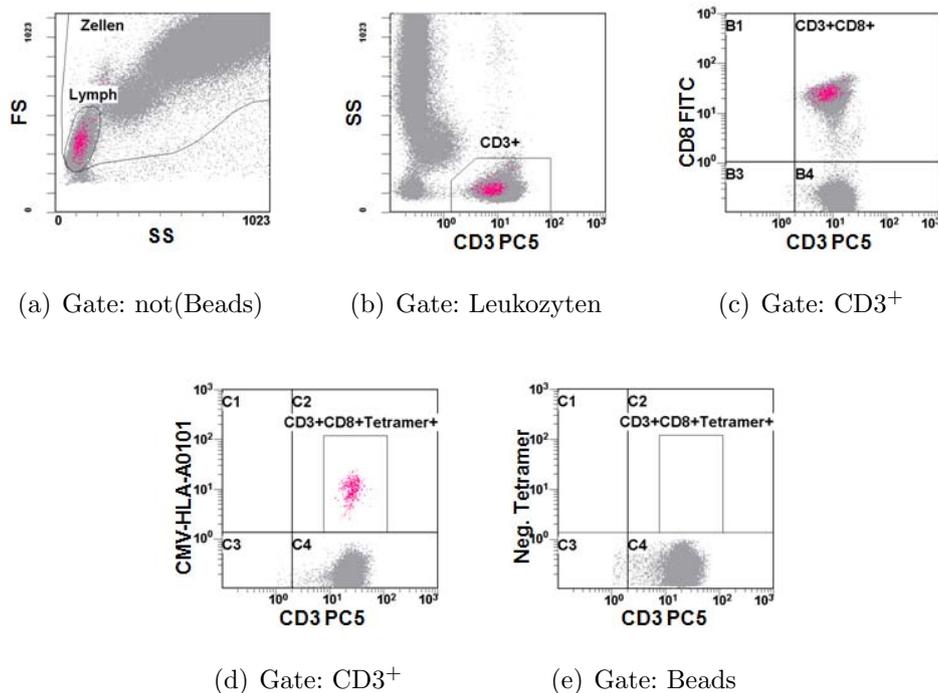


Abbildung 4.10.: Bestimmung von CMV-CTLs via Tetramertechnologie. (a) Lymphozyten bestimmt auf Basis von SS und FS (b) Gatingstrategie für $CD3^+$ T-Zellen (c) Analyse zytotoxischer $CD3^+CD8^+$ T-Zellen (d) Auswertung von CMV-CTLs mit dem Tetramer HLA-A*0101 (e) Test auf unspezifische Bindungen mit Hilfe eines Negativ Tetramers (separater Ansatz).

4.4. Statistische Methoden

4.4.1. Statistische Verfahren zur Signifikanz- und Korrelationsanalyse

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen einzelnen Gruppen wurden folgende Signifikanztests eingesetzt:

- *Unpaired T-Test*: Berechnung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen bei Annahme einer Normalverteilung.
- *Mann-Whitney-Test*: Ermittlung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen, wenn keine Normalverteilung der Daten vorliegt.
- *Kruskal-Wallis-Test + Dunn-Test*: Ermittlung der Signifikanzlevels zwischen drei oder mehr Gruppen.
- *Log-Rank-Test*: Berechnung von Signifikanzlevels bei Kaplan-Meier-Schätzung (Survival- und Rekonstitutionsanalysen).

Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$. Bei den in dieser Arbeit angegebenen p-Werten wurde jeweils vermerkt, welcher Test zur Berechnung des Signifikanzlevels eingesetzt wurde. Des Weiteren wurden Verfahren zur Berechnung der Korrelation zwischen einzelnen Gruppen bzw. Methoden verwendet:

- *Pearson Korrelations-Koeffizient*: Messung des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen. Bei Korrelations-Koeffizienten $r \geq 0,5$ wurde eine Korrelation angenommen.
- *Bland-Altman Diagramm*: Darstellung eines Vergleichs zweier Messmethoden. In einem Punktdiagramm werden die Differenzen der beiden Messmethoden gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen.

Zur Berechnung von Signifikanzlevels und zur Korrelationsanalyse wurden die Programme GraphPad Prism (Version 4 und 5) sowie die Statistiksoftware „R“ verwendet. Bland-Altman Diagramme wurden mit „R“ erzeugt. Kaplan-Meier Kurven, Punktdiagramme, Boxplots und Regressiongeraden wurden mit Hilfe von GraphPad Prism erstellt.

4.4.2. Verfahren zum Data-Pre-Processing

Zur Generierung eines multivariaten Modells zur Beurteilung der Immunrestitution bei Patienten nach SZT, wurden lineare Regression und Hauptkomponentenanalyse eingesetzt. Diese beiden Methoden werden folgend kurz erläutert⁸⁸⁻⁹¹.

Lineare Regression

Die lineare Regression wird auch als Methode des kleinsten quadratischen Fehlers („Least Squares Methode“) bezeichnet. Es handelt sich um eine numerische Methode zur Berechnung einer linearen Funktion basierend auf gegebenen Messpunkten (s. Gleichung 4.1). Hierbei werden die Abweichungen zwischen den Messpunkten und der ermittelten Geraden, die sogenannten Residuen, minimiert⁹². Bei der klassischen linearen Regression wird vorausgesetzt, dass die Residuen normalverteilt sind.

$$y = \beta \cdot x + \alpha \quad (4.1)$$

$$Y - \text{Achsenabschnitt} : \alpha = E(Y) - \beta \cdot E(X) \quad (4.1a)$$

$$\text{Steigung} : \beta = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - E(x))(y_i - E(y))}{\sum_{i=1}^n (x_i - E(x))^2} \quad (4.1b)$$

x_i =x-Wert des Punktes i; y_i =y-Wert des Punktes i; E= Erwartungswert

Abbildung 4.11 zeigt ein Beispiel für eine Regressionsgerade (Abb. 4.11(a)) und die dazugehörigen Residuen (Abb. 4.11(b)) für eine kleine Menge von Beispielpunkten.

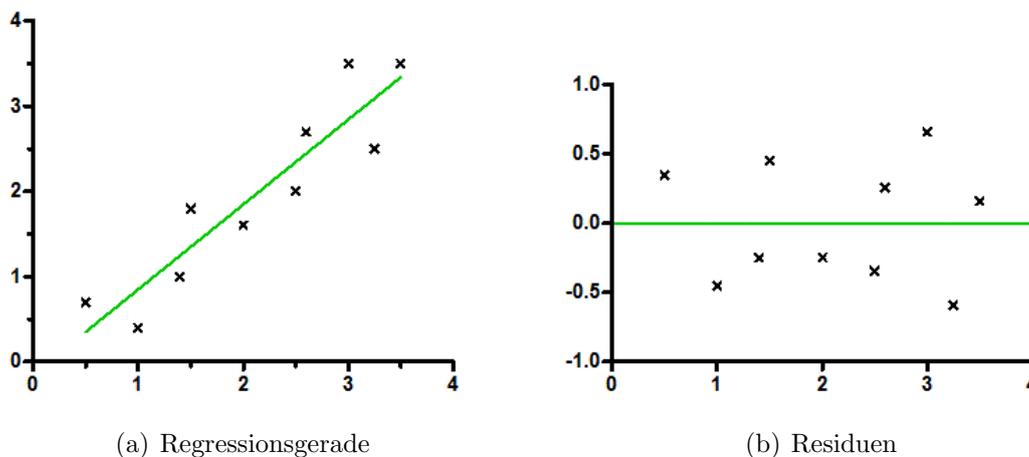


Abbildung 4.11.: Lineare Regression. (a) Regressionsgerade für eine kleine Menge von Beispielpunkten. (b) Abweichungen der einzelnen Punkte von der Geraden.

Hauptkomponentenanalyse (PCA - Principal Component Analysis)

Die Hauptkomponentenanalyse (Engl.: Principal Component Analysis) wird zur Dimensionsreduktion eingesetzt. Dabei wird der resultierende Ergebnisraum durch möglichst unabhängige Hauptachsen aufgespannt. Diese repräsentieren jeweils Linearkombinationen der ursprünglichen Merkmale, deren Abstände und Winkel dabei erhalten bleiben. Das Verfahren ist deterministisch und basiert auf der Varianzminimierung, die mittels Eigenwertdekomposition errechnet werden kann. Die resultierenden Hauptachsen sind daher gemäß ihrer Varianz und somit ihres Informationsgehaltes geordnet^{90,93,94}. Die Vorgehensweise bei der Eigenwertdekomposition wird nun kurz skizziert:

1. Berechne die Kovarianzmatrix $K = \frac{1}{n} \sum_{x \in D} (x - \bar{x})(x - \bar{x})^T$
mit $D =$ Menge der Datenpunkte x_1, \dots, x_n
2. Zerlege die Matrix in
 - Eine Orthogonalmatrix V bestehend aus den Eigenvektoren e_1, \dots, e_d , welche die Hauptausrichtung der Datenpunkte beschreiben.
 - Eine Diagonalmatrix Λ bestehend aus den Eigenwerten $\lambda_1, \dots, \lambda_d$, die die Varianz der Datenpunkte entlang der entsprechenden Eigenvektoren beschreiben.

\implies So dass $K = V\Lambda V$
3. Die Eigenvektoren bilden die Basis für den neuen Unterraum. Die k Eigenvektoren mit den kleinsten Eigenwerten werden ausgewählt und weggelassen. Der entstandene neue Raum ist $(d-k)$ -dimensional.

Alternativ zur Eigenwertzerlegung kann auch der NIPALS-Algorithmus zum Finden der Hauptachsen genutzt werden⁹⁵. Dabei werden die Hauptachsen iterativ durch Bildung des äußeren Produktes berechnet. Werden nur die ersten Hauptachsen benötigt, kann nach deren Berechnung der Prozess gestoppt werden und man erhält so bei sehr hochdimensionalen Räumen ein Zeitersparnis. Des Weiteren ist der NIPALS Algorithmus tolerant gegenüber einer geringen Zahl an fehlenden Werten. Da unsere Daten keine sehr hohe Dimensionalität aufwiesen, nutzten wir die Eigenwertdekomposition. Abbildung 4.12 zeigt an einem Beispiel eine Transformation von Punkten aus dem zweidimensionalen in einen eindimensionalen Raum.

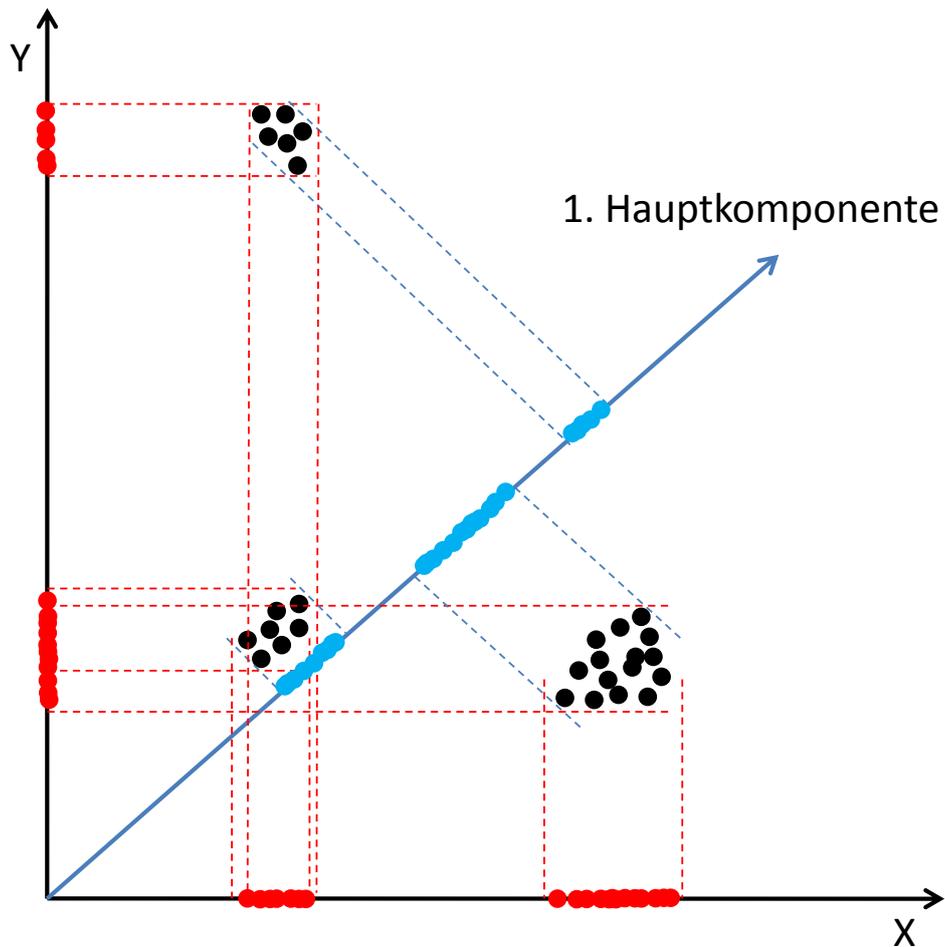


Abbildung 4.12.: Beispiel: Dimensionsreduktion durch PCA. In diesem Schaubild werden Punkte durch die PCA vom zweidimensionalen Raum (schwarze Achsen) in eindimensionalen Raum (blaue Achse) projiziert. Die Trennung der drei Gruppen im zweidimensionalen Raum bleiben dabei im eindimensionalen Raum erhalten. Würde um diese Dimensionsreduktion zu erzielen lediglich eine Achse des Ursprungsraums verworfen werden, blieben jeweils nur zwei der drei Gruppen erkennbar.

5. Ergebnisse

5.1. Entwicklung von Datenbanken für univariate und multivariate Auswertungen

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit habe ich zwei relationale Datenbanken mitsamt grafischer Benutzeroberflächen konzeptioniert und umgesetzt. Diese Datenbanken dienen der Speicherung und Pflege der Daten, die in den Studien „Altersabhängige Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation“ und der multizentrischen „CMV-CTL Studie“ erhoben werden.

5.1.1. Altersabhängige Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

In einer offenen Immunrekonstitutionstudie werden Daten von Patienten mit ALL und AML nach allogener SZT gesammelt. Zur Speicherung und Pflege der Daten wurde eine relationale Datenbank erstellt. Abbildung 5.1 zeigt *Screenshots* der grafischen Benutzeroberfläche. In dieser Datenbank werden neben Immunrekonstitutionsdaten auch Patienten-



Abbildung 5.1.: *Screenshots* der Datenbank Benutzeroberfläche zur Immunrekonstitutionsstudie. Gezeigt sind *Screenshots* des Eingabeformulars zur Anmeldung (a) und ein Ausschnitt der Benutzeroberfläche zur Eingabe von Immunstatuswerten (b).

5. Ergebnisse

daten (z.B. Alter und Geschlecht), Diagnose und Informationen bzgl. applizierter Zelltherapien gespeichert. Außerdem werden klinische Daten zum Verlauf der Transplantation wie z.B. die Medikation und aufgetretene Infektionen/ Ereignisse in der Datenbank dokumentiert. Das System kann von allen Mitarbeitern des Labor für SZT und Immuntherapien zur Eingabe von Daten verwendet werden. Abbildung 5.2 zeigt ein *Entity-Relationship-Diagramm*, welches einen Überblick über die vorhandenen Datenbankrelationen („Tabellen“) und deren Inhalte gibt. Die Beziehungen zwischen Relationen werden durch die Verbindungslinien im Diagramm deutlich. Im Zuge der Doktorarbeit wurde die Datenbank für

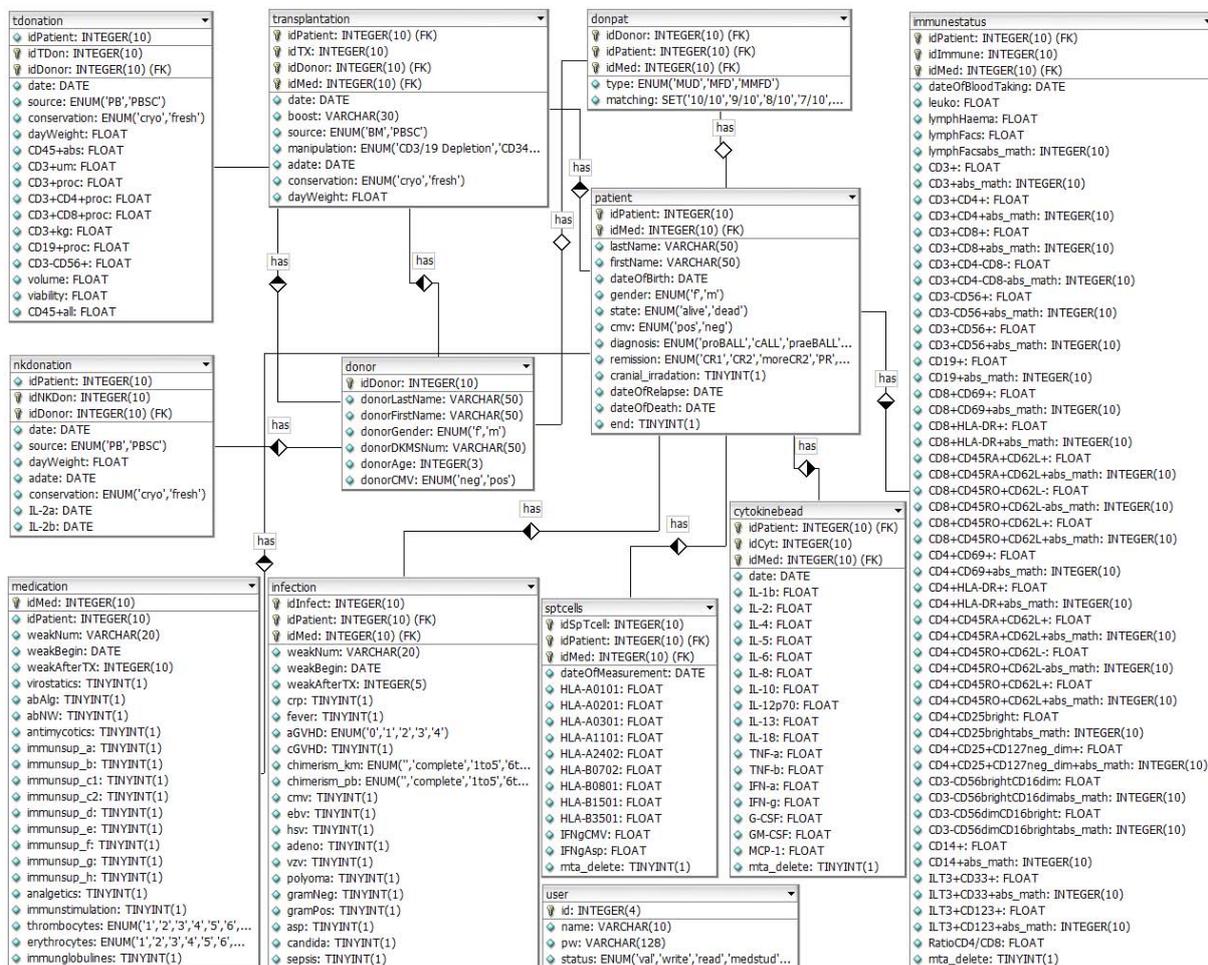


Abbildung 5.2.: Entity-Relationship-Diagramm der Immunrestitutions-Datenbank. Die Datenbank besteht aus Relationen, welche Informationen über den Patienten, seinen Stammzellspender, Zelltherapien, die Immunregeneration nach SZT (incl. CMV-CTL-, Treg- und Zytokinmessungen) und klinische Daten zum Transplantationsverlauf enthalten. 1:1 Verbindungen sind durch Linien mit weißen Quadraten gekennzeichnet. Solch eine Beziehung liegt zwischen „patient“ und „donor“ vor, da ein Patient genau einen Spender hat. Linien mit halb ausgefüllten Quadraten stellen 1:n Beziehungen dar. Eine 1:n Verbindung liegt z.B. zwischen „patient“ und „medication“ vor, weil ein Patient mehrere Medikamente erhält. In einer separaten Relation sind Anmelddaten unterschiedlicher Benutzer gespeichert.

5.1. Entwicklung von Datenbanken für univariate und multivariate Auswertungen

die komplette Studie konzipiert. Ausgewertet wurde das Teilprojekt „Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT“.

5.1.2. Multizentrische Studie zur CMV-CTL Regeneration

In den Transplantationszentren der Medizinischen Hochschule Hannover und der Universitätsklinik Frankfurt wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie insgesamt 900 CMV-CTL Messungen bei 201 Patienten durchgeführt. Die Daten aus den verschiedenen Quellen wurden zunächst gesammelt und in einer relationalen Datenbank verwaltet. Abbildung 5.3 zeigt ein *Entity-Relationship-Diagramm*, welches einen Überblick der vorhandenen Datenbankrelationen und deren Inhalte gibt. Da leider nicht alle Daten in digitaler

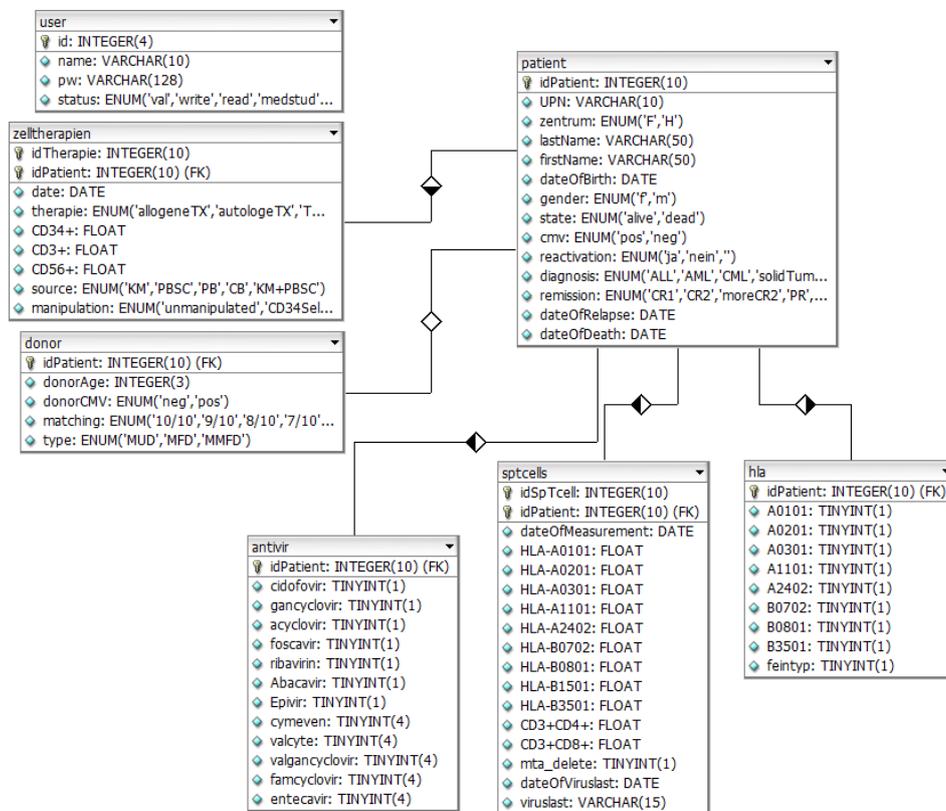


Abbildung 5.3.: Entity-Relationship-Diagramm der CMV-CTL Datenbank. Die Datenbank besteht aus sieben Relationen welche Informationen über den Patienten, seinen Stammzellspender, Zelltherapien, HLA-Merkmale, antivirale Medikation und CMV-CTLs beinhalten.

Form vorlagen, wurde eine Benutzeroberfläche zur leichten Eingabe von Informationen in die Datenbank implementiert. *Screenshots* hiervon zeigt Abbildung 5.4. Zur Auswertung der Daten wurde mit PHP-Skripten direkt auf die Datenbank zugegriffen.

5. Ergebnisse

Pers. Patientendaten

UPN: Muster Zentrum: F

Name: Mustermann

Vorname: Erika

Geburtsdatum: 11 05 1963

Geschlecht:
 männlich
 weiblich

Diagnose:
 AML

Datum des Rezidives: 16 11 2009

CMV:
 neg
 pos

CMV Reaktivierung:
 ja

Status:
 lebend
 verstorben

Andern

(a) Eingabeformular für Patientendaten

CMV-spezifische T Zellen

Datum der Messung		15.10.2009	01.09.2009
HLA-A0101	Zellen/ μ l	7	4
HLA-A0201	Zellen/ μ l		
HLA-A0301	Zellen/ μ l		
HLA-A1101	Zellen/ μ l		
HLA-A2402	Zellen/ μ l		
HLA-B0702	Zellen/ μ l		
HLA-B0801	Zellen/ μ l	19	13
HLA-B1501	Zellen/ μ l		
HLA-B3501	Zellen/ μ l		
CD3+CD4+	Zellen/ μ l		
CD3+CD8+	Zellen/ μ l		
Datum der zugehörigen Viruslast		15.10.2009	01.09.2009
Viruslast	Kopien/ml	0.0	0.0

Eintragen Ändern Ändern

Löschen Löschen

(b) Eingabeoberfläche für CMV-CTLs

Abbildung 5.4.: *Screenshots* der CMV-Datenbank Benutzeroberfläche. (a) Gezeigt sind *Screenshots* des Eingabeformulars für Patientendaten und (b) der Eingabeoberfläche für CMV-CTLs.

5.2. Analyse von Immunrekonstitutionsdaten

Um prognostische Marker zu identifizieren, die uns dabei helfen, Hochrisiko-Patienten zu erkennen, habe ich retrospektiv Immunrekonstitutionsdaten von Patienten nach SZT ausgewertet. Während zu Beginn dieser Doktorarbeit ausschließlich univariate Ergebnisse vorlagen³⁴, war es Ziel dieser Arbeit, multivariate Methoden zu entwickeln und umzusetzen¹. Bei der univariaten Analyse wurde jede Zellgruppe einzeln betrachtet und in Bezug auf ihren Einfluss auf das Überleben der Patienten gesetzt. Mit Hilfe multivariater Ansätze lassen sich verschiedene Marker kombinieren, wodurch möglicherweise das komplexe Zusammenspiel von Immunzellen besser beschrieben werden kann.

Zur Generierung des multivariaten Normwertmodells wurde ein Datensatz verwendet, der Messungen von Leukozytensubpopulationen von 100 gesunden Spendern (80 Kinder, 20 Erwachsene) enthält. Der zur Klassifikation verwendete Datensatz beinhaltet Immunrekonstitutionsdaten von 32 Patienten nach allogener SZT (Tabelle 4.8). Die Werte wurden in sehr regelmäßigen Abständen nach SZT bestimmt (s. 4.3.2). Beide Datensätze wurden mit Hilfe von 4- bzw. 5-Farb-Durchflusszytometrie erhoben und beinhalten Absolutzellwerte/ μl der folgenden Gruppen von Immunzellen:

- Leukozyten
- Lymphozyten
- Monozyten ($CD14^+$)
- T-Zellen ($CD3^+$)
- T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$)
- Zytotoxische T-Zellen ($CD3^+CD8^+$)
- NK-Zellen ($CD3^-CD56^+$)
- B-Zellen ($CD19^+$)

Meine Arbeit zur Generierung eines multivariaten Modells erfolgte in enger Kooperation mit Fachhochschule Frankfurt (Fachbereich Informatik und Ingenieurwissenschaften).

5.2.1. Multivariate Auswertung: Modellbeschreibung

Zur Generierung des multivariaten Normwertmodells wurde ein Datensatz verwendet, der Messungen von Leukozytensubpopulationen von 100 gesunden Kindern und jungen Erwachsenen enthält. Im Vergleich zu Erwachsenen haben Kleinkinder und Säuglinge deutlich höhere Leukozytenwerte^{79,96}. Betrachtet man die Zellzahl im Bezug auf das Alter der gesunden Kinder, so fällt auf, dass die Absolutwerte aller betrachteten Untergruppen innerhalb der ersten elf Jahre abnehmen. Dieses Verhalten kann durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden. Bei Kindern älter als 11 Jahre und Erwachsenen ist die Veränderung der Zellzahlen geringer und könnte gut durch eine lineare Funktion beschrieben werden (Abb. 5.5(a)). Um die Entwicklung der Zellzahlen aller 100 Spender (<11 Jahre und >11 Jahre) mit Hilfe einer linearen Funktion beschreiben zu können, wurden

5. Ergebnisse

die Daten transformiert⁸⁸. Zunächst wurden die Absolutwerte der Zellen mit Hilfe von $\log(x + 1)$ normalisiert (Abb. 5.5(b)). Außerdem wurde $\sqrt{\text{Alter in Monaten}}$ berechnet. Durch dieses Vorgehen ist es gelungen, die Daten zu linearisieren (Abb. 5.5(c)). Im Anschluss wurden Regressionsgeraden für alle acht Zellpopulationen erstellt (Abb. 5.5(c))⁸⁹.

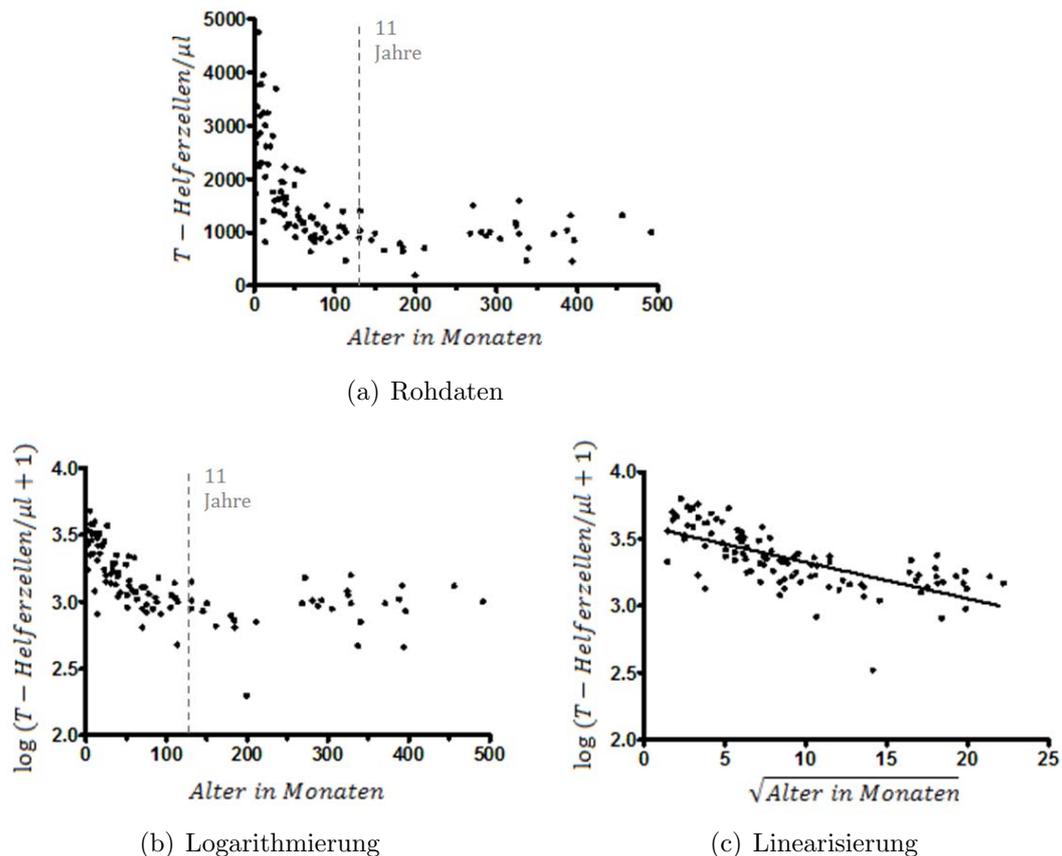
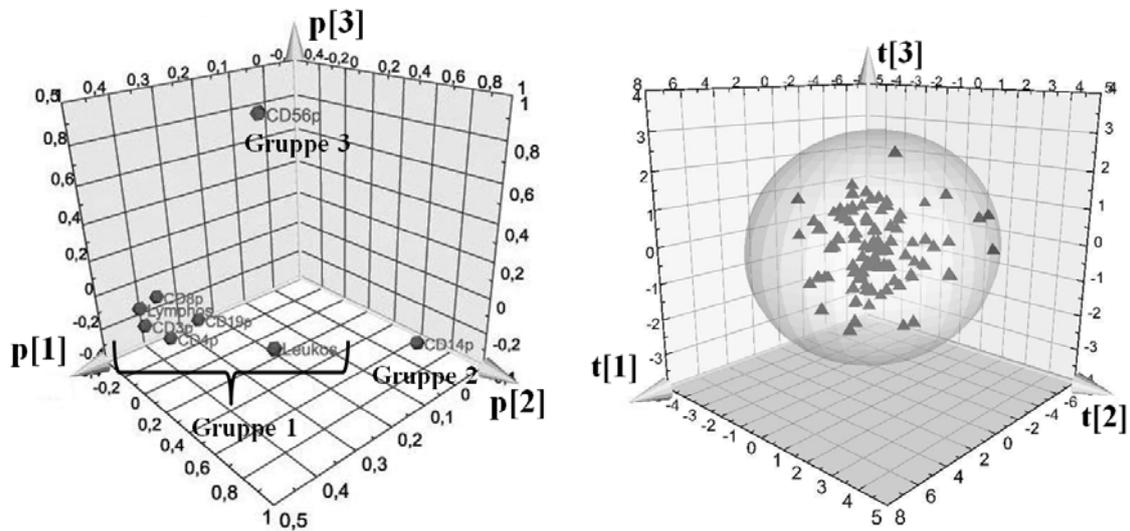


Abbildung 5.5.: Multivariate Modellierung - Transformation $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ Werte. (a) Transformation der Daten am Beispiel der T-Helferzellen. Daten vor der Transformation. Bis zu einem Alter von 11 Jahren könnten die Daten durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden. Bei Individuen, die älter als 11 Jahre sind, eignet sich eine lineare Funktion zur Beschreibung der Daten. (b) Normalisierung der Daten durch $\log(\text{CD3}^+\text{CD4}^+/\mu\text{l} + 1)$. (c) Linearisierung durch $\sqrt{\text{Alter in Monaten}}$.

Die Residuen die sich dadurch ergaben, wurden als Input für die Hauptkomponentenanalyse (PCA) verwendet. Die PCA dient der Reduktion der Dimensionalität⁹⁰. Das Verfahren ersetzt die Ursprungsvariablen durch eine geringere Zahl unkorrelierter Hauptkomponenten, wobei versucht wird, den dabei entstehenden Informationsverlust zu minimieren (s. 4.4.2). In unserem Fall wurde durch die PCA eine Reduktion von acht auf drei Dimensionen durchgeführt (Abb. 5.6(a)). Die Eigenwerte der Hauptkomponenten betragen 4,48 (1. Hauptkomponente), 1,38 (2. Hauptkomponente) und 0,81 (3. Hauptkomponente). Zur Erzeugung des ellipsenförmigen Normwertbereichs wurde anschließend die 99% Kon-

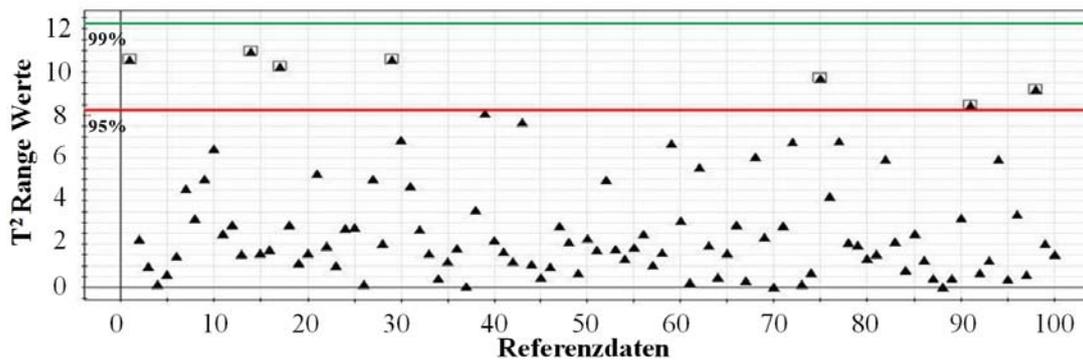
fidenzregion ausgewählt (Abb. 5.6(b), 5.6(c)).

Des Weiteren haben wir die T^2 Range Werte (Entfernung des Messpunktes vom Zen-



(a) Koordinatensystem nach PCA

(b) Ellipsoid mit Referenzwerten



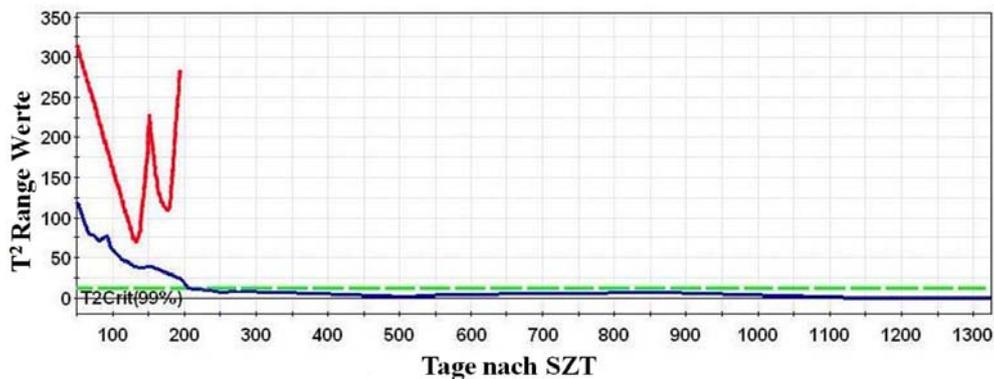
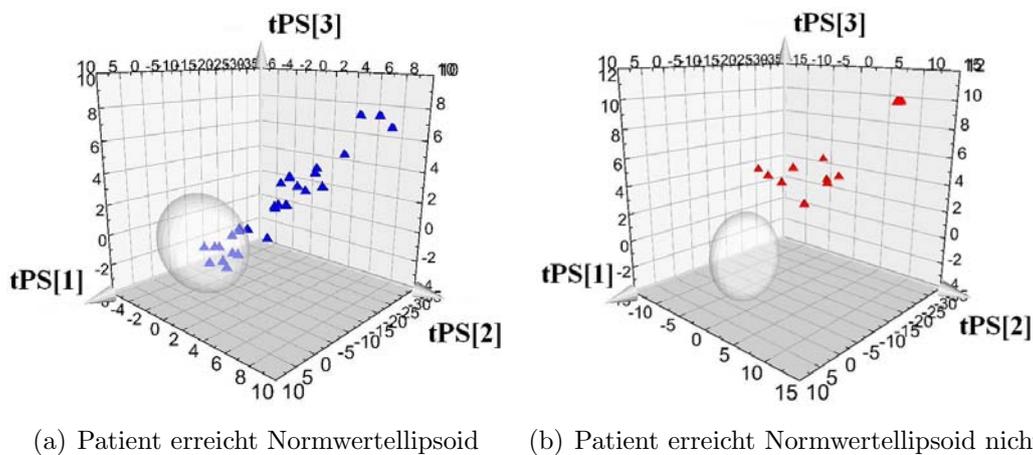
(c) T^2 Range Werte der Referenzdaten

Abbildung 5.6.: Multivariate Modellierung - Modellgenerierung. (a) Modellgenerierung basierend auf 100 Messwerten von Leukozytensubpopulationen gesunder Kinder und junger Erwachsener. Dreidimensionales Koordinatensystem nach PCA. Die erste Hauptkomponente $p[1]$ beschreibt hauptsächlich Lymphozyten, $CD3^+$ T-Zellen, $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen, $CD3^+CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen. $CD14^+$ Monozyten werden hauptsächlich durch die zweite Hauptkomponente $p[2]$ und $CD3^-CD56^+$ NK-Zellen durch die dritte Hauptkomponente $p[3]$ beschrieben. (b) Gezeigt ist das Normwertellipsoid und die Werte der 100 Referenzdatensets. (c) T^2 Range Werte der Referenzdaten. Für jeden der 100 Referenzwerte (x-Achse) ist der dazugehörige T^2 Range Wert (y-Achse) angegeben. Sieben Werte liegen zwischen dem 95. und dem 99. Konfidenzintervall, d.h. sie befinden sich am äußeren Rand des Ellipsoids.

trum des Ellipsoids) aller Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach SZT analysiert. Dadurch wurde ein Trend erkennbar, zu welchem Zeitpunkt nach SZT viele Patienten den Normwertbereich erreichen. In Kooperation mit klinischen Partnern (Ärzte der SZT) entschied ich mich für Tag 200 und Tag 300 als geeignete Klassifikationszeitpunkte.

5.2.2. Ergebnisse: Rekonstitution von Leukozytensubgruppen im Hinblick auf das Überleben

Mit Hilfe des generierten multivariaten Ellipsoidmodells habe ich überprüft, ob die 32 Patienten nach SZT diesen Normwertbereich erreichen. Abbildung 5.7(a) zeigt einen Patienten, der sehr schnell das Normwertellipsoid erreicht und nicht mehr verlässt. Dieser Patient gehört zur Gruppe mit niedrigem Risiko. Ein zweiter Patient (s. 5.7(b)) erreicht das Referenzellipsoid nicht und verstirbt etwa 200 Tage nach SZT. Einen zeitlichen Verlauf der Immunrekonstitution beider Patienten zeigt Abbildung 5.7(c).



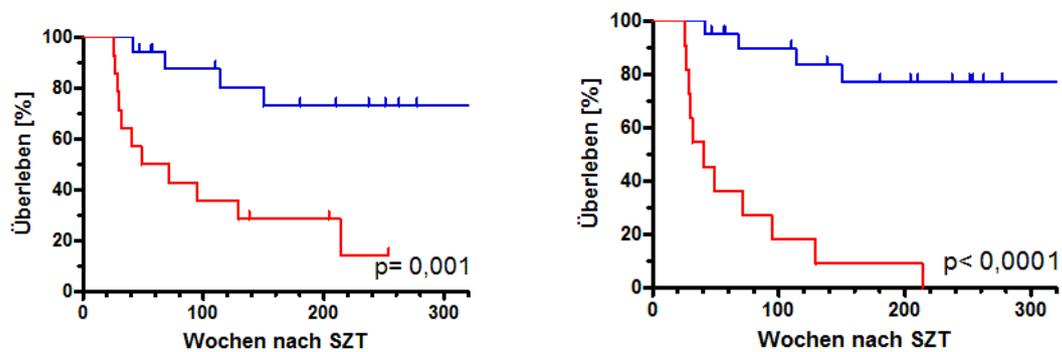
(c) T^2 Range Werte beider Patienten

Abbildung 5.7.: Multivariate Modellierung - Beispielverläufe. (a) Patient der den Normwertbereich sehr schnell erreicht und überlebt. (b) Verlauf eines Patienten, der den Normwertbereich nie erreicht und ca. 200 Tage nach SZT verstirbt. (c) Zeitlicher Verlauf beider Patienten. Die T^2 Range Werte geben die Entfernung der Patientenwerte vom Ellipsoid an. Werte unterhalb der grünen Linie sind gleichbedeutend mit dem Eintauchen in den Normwertbereich.

Zur Ermittlung von Hochrisiko-Patienten, wurden zu den Zeitpunkten 200 und 300 Tage nach SZT zwei Gruppen gebildet:

- *Hochrisiko-Gruppe*: Patienten die an Tag 200 bzw. 300 das Normwertellipsoid nicht erreicht haben oder nicht mindestens einen Monat stabile im Referenzbereich liegende Werte zeigten.
- *Niedrigrisiko-Gruppe*: Patienten die 200 bzw. 300 Tage nach SZT den Normwertbereich (Ellipsoid) erreicht haben und mindestens einen Monat stabile Werte zeigten.

Patienten, die den Normwertbereich zu den Zeitpunkten 200 und 300 Tage nach SZT erreicht hatten, zeigten ein signifikant höheres Überleben als Patienten, die das Ellipsoid gar nicht erreichten oder zu schnell wieder verließen. Bei der Klassifikation an Tag 200 nach SZT beinhaltete die Niedrigrisiko-Gruppe 18 Patienten, von denen 13 überlebten. Die Hochrisiko-Gruppe bestand aus 14 Patienten von welchen drei überlebten ($p=0,001$). Durch die Klassifikation 300 Tage nach SZT wurden elf Patienten der Hochrisiko-Gruppe zugeteilt, wovon niemand überlebte. In der Niedrigrisiko-Gruppe überlebten 16 von 21 Patienten ($p<0,0001$). Als statistisches Signifikanzmaß wurde der Log-Rank-Test verwendet. Die dazugehörigen Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 5.8 dargestellt.



(a) Klassifikation an Tag 200 nach SZT

(b) Klassifikation an Tag 300 nach SZT

Abbildung 5.8.: Multivariate Auswertung zur Klassifikation an Tag 200 und 300 nach SZT.
(a) Klassifikation in Hochrisiko- (rot) und Niedrigrisiko-Gruppe (blau) mit Hilfe des Normwertellipsoids 200 Tage nach SZT ($p<0,001$). **(b)** Auswertung der Patientendaten an Tag 300 nach SZT ($p<0,0001$).

5.2.3. Immunrekonstitution und Impfschutz nach intensiver Chemotherapie

Im Rahmen der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Protokolle zur Therapie pädiatrischer Patienten mit Leukämie wird bei Patienten ohne SZT eine kombinierte Chemotherapie und bei Patienten vor SZT eine intensivierete Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt. Beide Formen der Chemotherapie führen zu einer drastischen Abnahme der Zellen des Immunsystems, im letzteren Falle sogar zur Aplasie. Um den Einfluss des Verlustes des zellulären Immunsystems nach Chemotherapie auf den Immunschutz gegen Erreger und auf einen noch vorhandenen Impfschutz zu untersuchen, führte Lehrnbecher *et al.* eine Studie mit 53 an ALL erkrankten Kindern durch⁹⁷. Es konnte gezeigt werden, dass viele dieser Patienten auch drei bis neun Monate nach Chemotherapie einen nicht ausreichenden Schutz gegen eine Infektion mit Pneumokokken hatten. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde nach drei, sechs und neun Monaten nach Chemotherapie die Rekonstitution des Immunsystems im Hinblick auf das Erreichen altersgemachter Normwerte untersucht. Ich konnte zeigen, dass Patienten drei Monate nach Chemotherapie niedrige $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen, $CD3^+CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen aufwiesen. Nach ca. neun Monaten nach SZT hatten die Werte aber bei den meisten Kindern wieder den Normwertbereich erreicht. Zur Bewertung der $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ und $CD19^+$ Zellen wurden die Normwerte nach Huenecke *et al.* verwendet⁷⁹.

5.3. Rekonstitution von CMV-CTLs nach allogener SZT

Bei Patienten nach SZT besteht ein hohes Risiko einer CMV-Reaktivierung oder einer *de novo* CMV-Infektion (s. 2.3.3). Die Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT kann einen Patienten vor einer Reaktivierung und CMV-bedingten Komplikationen schützen. Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von CMV-CTLs können HLA-Klasse-I Tetramere eingesetzt werden (s. 4.3.3)^{84,98}. In einer multizentrischen Studie mit der Medizinischen Hochschule Hannover und Internisten der Universitätsklinik Frankfurt haben wir an einer Gruppe von 201 Patienten die Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT untersucht. Die Patientendaten sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Ein Manuskript zu den in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnissen ist zur Zeit in Revision (Borchers*, Bremm* *et al.*; * Geteilte Erstautorenschaft)⁹⁹.

5.3.1. Bestimmung der Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT mit Hilfe der Tetramertechnologie

Von den 201 Patienten der multizentrischen CMV-CTL Studie rekonstituierten 110 Patienten (55%) CMV-CTLs nach SZT. Die bestimmten CMV-CTL Absolutwerte zeigten eine große Streuung im Bereich 1-1235 Zellen/ μ l. Bei gleichzeitiger Messung mit mehreren Tetrameren zeigten sich außerdem große Unterschiede in der Zahl nachgewiesener CMV-CTLs. Der Median der mit den Tetrameren HLA-A*0101, HLA-B*0702 und HLA-B*0801 gemessenen CMV-CTLs ist sehr ähnlich. Die Bestimmung von CMV-CTLs mit den restlichen Tetrameren wies im Median geringere Absolutwerte auf. Für die Messung von CMV-CTLs mit Hilfe des Tetramers HLA-A*2402 ergaben sich signifikant niedrigere Absolutwerte im Vergleich zu Messungen mit den Tetrameren HLA-A*0101 ($p < 0,001$), HLA-B*0702 ($p < 0,05$) und HLA-B*0801 ($p < 0,01$) (Abb. 5.9). Zur Analyse medianer CMV-CTL Level bezogen auf die unterschiedlichen Tetramere wurde bei Patienten mit Mehrfachmessungen pro Tetramer der Mittelwert aus allen Messungen gebildet. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass Patienten mit vielen Messpunkten die Ergebnisse anderer Patienten mit wenig Messpunkten nicht dominieren.

Mit HLA-A*2402 konnten bei 74% der Messungen keine CMV-CTLs nachgewiesen werden. Bei den anderen Tetrameren waren nur bei 40-56% der Messungen keine CMV-CTLs detektierbar. Mit Ausnahme von CMV-CTLs spezifisch für HLA-A*2402 konnte mit Hilfe des Pearson-Koeffizienten eine schwache Korrelation zwischen der Rekonstitution von CMV-CTLs und der Entwicklung $CD3^+CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen gezeigt werden ($0,5 \leq r < 0,7$; $p < 0,0002$).

5. Ergebnisse

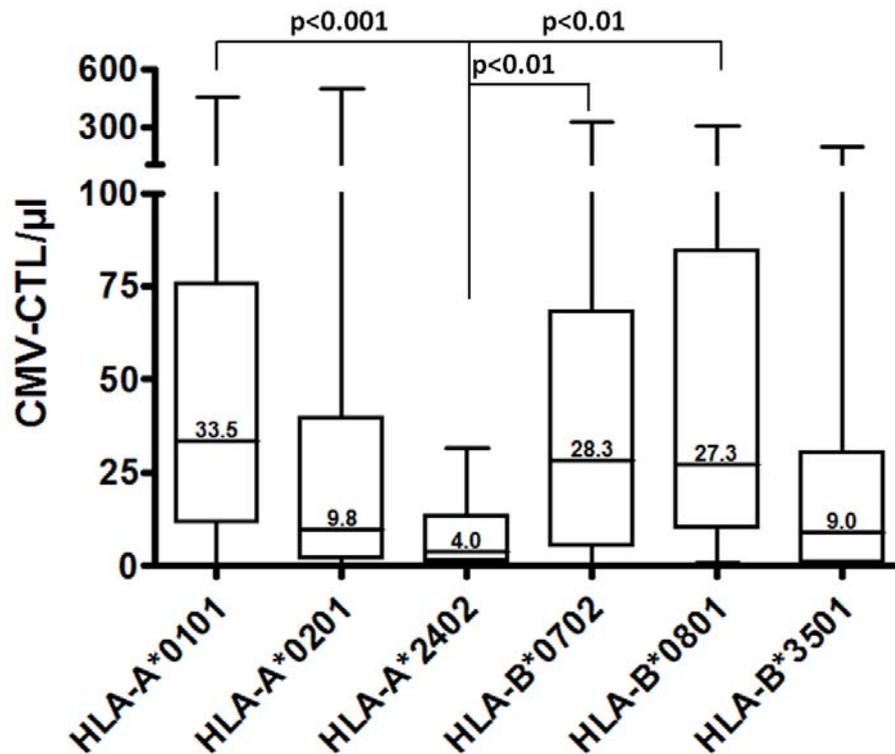


Abbildung 5.9.: Messung von CMV-CTL Absolutwerten mit verschiedenen Tetrameren. Bestimmung von CMV-CTLs mit Hilfe sechs verschiedener Tetramere in 201 Patienten nach SZT. CMV-CTLs, die mit dem Tetramer HLA-A*2402 gemessen wurden, zeigten signifikant niedrigere Absolutwerte im Vergleich zu Messungen mit den Tetrameren HLA-A*0101 ($p < 0,001$), HLA-B*0702 ($p < 0,01$) und HLA-B*0801 ($p < 0,01$). Insgesamt wurden 900 Messungen durchgeführt. Bei Patienten mit Mehrfachmessungen wurde jeweils der Mittelwert aller Messzeitpunkte gebildet. Die Signifikanzlevels wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test bestimmt.

Für die CMV Tetramere HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-B*0702 und HLA-B*0801 standen ausreichend Messdaten von unterschiedlichen Patienten zur Verfügung, um die CMV-CTL Rekonstitution innerhalb verschiedener Intervalle nach SZT zu analysieren. Patienten ohne CMV-CTL Rekonstitution wurden nicht betrachtet. Wir wählten die Zeiträume 0-49, 50-99, 100-199 und ≥ 200 Tage nach SZT. Ein kontinuierlicher Anstieg der CMV-CTLs/ μl ist bei allen Tetrameren bis zum Tag 200 nach SZT zu erkennen. Im Intervall ≥ 200 Tage nach SZT zeigen die Tetramere HLA-A*0101 und HLA-B*0702 im Median eine leichte Abnahme der CMV-CTL-Zahl. HLA-A*0201 und HLA-B*0801 hingegen zeigen im Intervall ≥ 200 Tage nach SZT im Median einen CMV-CTL Anstieg (Abb. 5.10).

5.3. Rekonstitution von CMV-CTLs nach allogener SZT

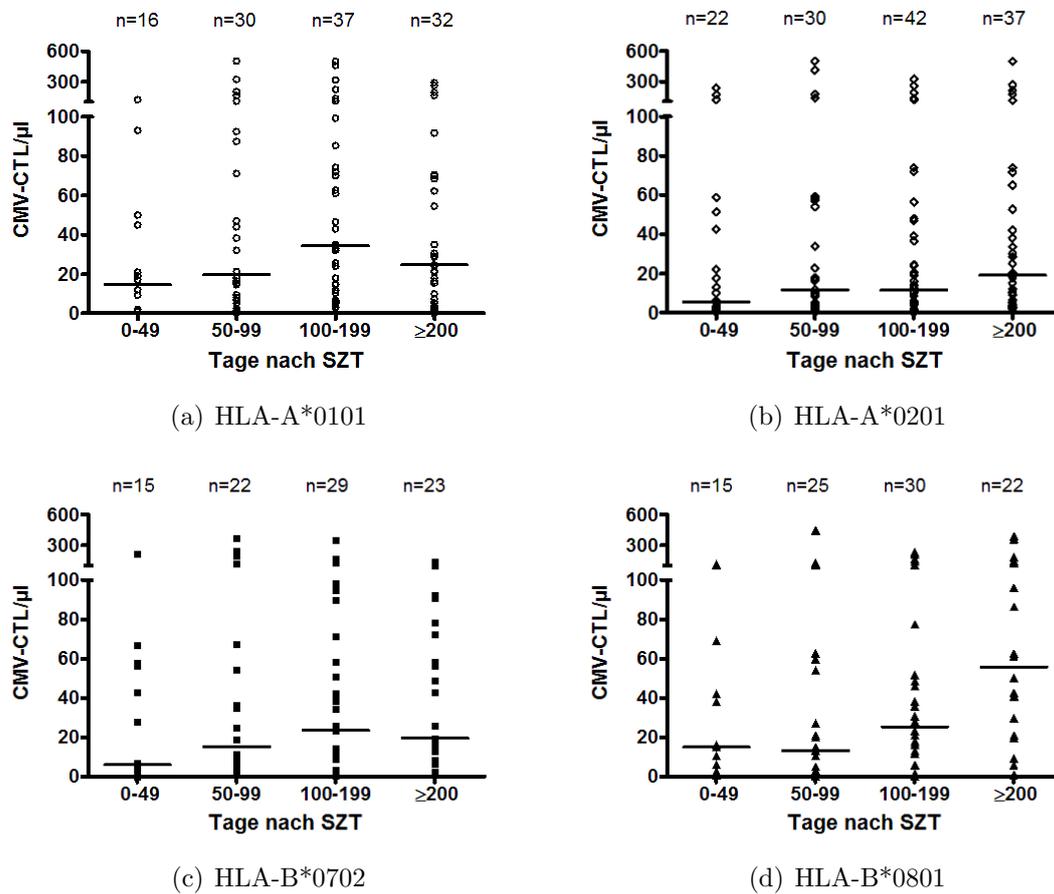


Abbildung 5.10.: Tetramerspezifische CMV-CTL Rekonstitution. Rekonstitution von CMV-CTLs innerhalb der Zeitfenster 0-49, 50-99, 100-199 und ≥ 200 Tage nach SZT für die Tetramere (a) HLA-A*0101, (b) HLA-A*0201, (c) HLA-B*0702 und (d) HLA-B*0801. Über den einzelnen Intervallen wurde die Anzahl der Patienten mit Messwerten für das jeweilige Tetramer vermerkt. Vor Tag 200 nach SZT zeigt sich bei allen Tetrameren ein CMV-CTL Anstieg. Im Intervall ≥ 200 Tage nach SZT zeigen die Tetramere HLA-B*0702 und HLA-B*0801 im Median einen weiteren Anstieg, wohingegen bei Messungen mit HLA-A*0101 und HLA-B*0702 die CMV-CTLs im Median leicht abnehmen.

CMV-R= Gruppe von Patienten mit CMV-Reaktivierung, noCMV-R= Patienten ohne CMV-Reaktivierung.

5.3.2. CMV-CTL Rekonstitution im Hinblick auf eine CMV-Reaktivierung

In unserer Kohorte von 201 Patienten konnten wir zeigen, dass Patienten mit CMV-Reaktivierung (n=78) im Vergleich zu Patienten ohne CMV-Reaktivierung nach SZT (n=123) eine signifikant schlechtere Überlebenschance hatten ($p < 0,003$) (Abb. 5.11). Wie

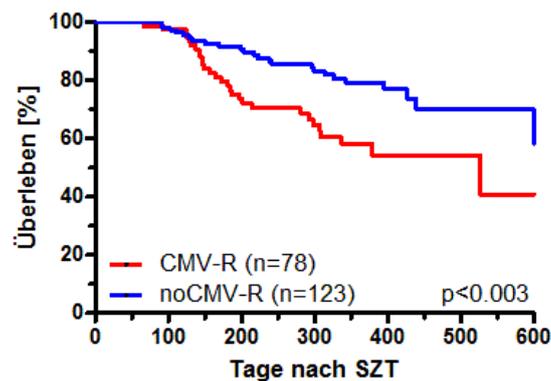
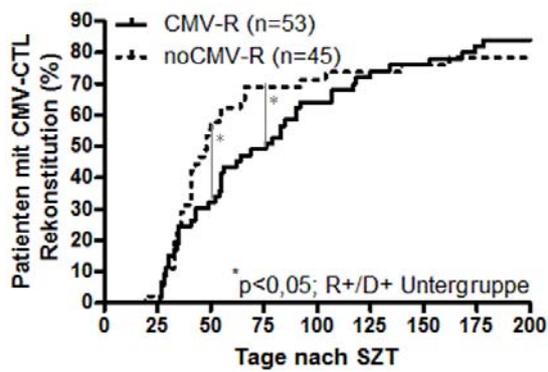


Abbildung 5.11.: Einfluss einer CMV-Reaktivierung auf das Überleben nach SZT. Patienten mit CMV-Reaktivierung (n=78) hatten eine signifikant schlechtere Überlebenschance als Patienten ohne CMV-Reaktivierung (n=123) ($p < 0,003$; Log-Rank-Test).

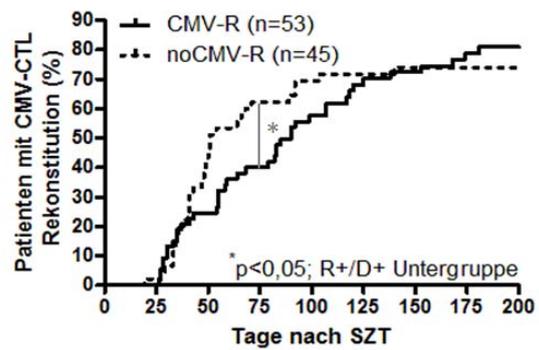
erwartet, zeigten Patienten, die vor SZT CMV-positiv (Recipient CMV-positiv - R⁺) waren und von einem CMV-positiven Spender (Donor CMV-positiv - R⁺) transplantiert wurden (R⁺D⁺ Untergruppe; n=98), die schnellste Rekonstitution von CMV-CTLs. Bei den ersten Patienten in dieser Gruppe konnte ich bereits 25 Tage nach SZT mindestens 1 CMV-CTL/ μ l nachweisen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Geschwindigkeit der CMV-CTL Rekonstitution zwischen Patienten mit (n=53) und ohne CMV-Reaktivierung (n=45). Im Vergleich zu Patienten mit Reaktivierung hatten zu den Zeitpunkten 50 und 75 Tage nach SZT signifikant mehr Patienten ohne Reaktivierung ≥ 1 CMV-CTL/ μ l gebildet ($p < 0,05$) (Abb. 5.12(a)). Nach ca. 100 Tagen post SZT zeigten sich nur noch geringe Unterschiede in der CMV-CTL Rekonstitution zwischen Patienten mit und ohne Reaktivierung. Insgesamt rekonstituierten mehr als 80% der Patienten in der R⁺D⁺ Untergruppe CMV-CTLs.

Im Gegensatz dazu zeigten Patienten, die vor SZT CMV-positiv waren aber einen CMV-negativen Stammzellspender hatten (R⁺D⁻ Gruppe; n=33), im Vergleich zu Patienten aus der R⁺D⁺ Gruppe eine verlangsamte CMV-CTL Rekonstitution. Ab Tag 40 nach SZT waren bei den ersten Patienten der R⁺D⁻ Gruppe CMV-CTL nachweisbar (Abb. 5.12(e)). Auch in dieser Patientengruppe zeigten sich signifikante Unterschiede in der Rekonstitution von CMV-CTLs zwischen Patienten mit und ohne Reaktivierung ($p < 0,04$).

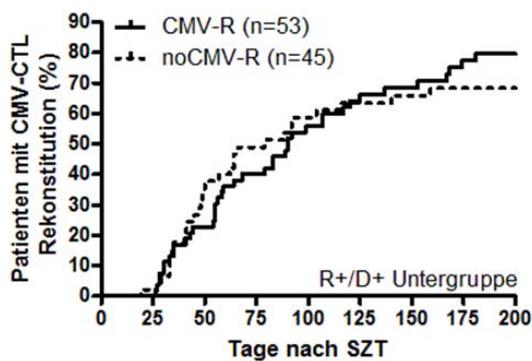
5.3. Rekonstitution von CMV-CTLs nach allogener SZT



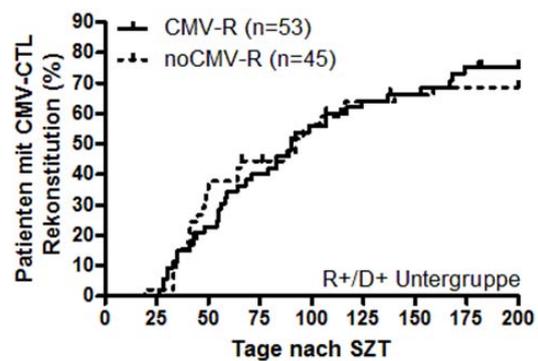
(a) R^+D^+ Untergruppe: 1 CMV-CTL/ μ l



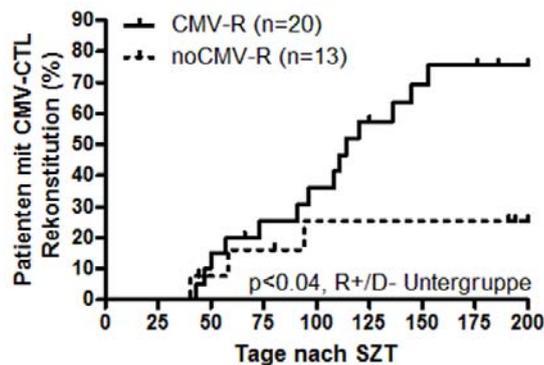
(b) R^+D^+ Untergruppe: 3 CMV-CTL/ μ l



(c) R^+D^+ Untergruppe: 7 CMV-CTL/ μ l



(d) R^+D^+ Untergruppe: 10 CMV-CTL/ μ l



(e) R^+D^- Untergruppe: 1 CMV-CTL/ μ l

Abbildung 5.12.: CMV-CTL Rekonstitution bei Patienten mit und ohne CMV-Reaktivierung. In der R^+D^+ Untergruppe konnte bei Patienten mit im Vergleich zu Patienten ohne CMV-Reaktivierung eine spätere CMV-CTL Rekonstitution nachgewiesen werden. Bei Verwendung der *Threshold-Levels* 1 (a), 3 (b), 7 (c) und 10 (d) CMV-CTL/ μ l zeigte sich, dass bei höheren Schwellenwerten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Patienten mit und ohne CMV-Reaktivierung erzielt werden. (e) Die CMV-CTL Rekonstitution bei Patienten der R^+D^- Untergruppe beginnt später als bei Patienten der R^+D^+ Gruppe. Alle Signifikanzlevel wurden mit Hilfe des Log-Rank-Tests bestimmt.

5. Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Trennschärfe zwischen Patienten mit Reaktivierung und ohne Reaktivierung mit steigender geforderter Anzahl von CMV-CTLs deutlich schlechter wurde (Abb. 5.12(a) - 5.12(d)). Bei einem Schwellenwert von 7 CMV-CTL/ μ l zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Patienten mit und ohne Reaktivierung (Abb. 5.12(c)).

5.3.3. Einfluss der Transplantataufreinigung auf die Rekonstitution von CMV-CTLs

Um den Einfluss der Transplantataufreinigung auf die Rekonstitution von CMV-CTLs beurteilen zu können, habe ich unsere Kohorte von 201 Patienten in zwei Gruppen geteilt. Patienten in der einen Gruppe wurden mit unmanipulierten Stammzellpräparaten (KM oder PBSC) transplantiert (n=180). Patienten in der anderen Gruppe erhielten ein T-Zelldepletiertes PBSC (n=21). Zur T-Zelldepletion wurde die CD3/CD19-Depletion sowie die Selektion von Stammzellen über die Marker CD34 oder CD133 eingesetzt (s. 2.3.2). An Tag 100 nach SZT hatten bereits 50% der Patienten, die mit unmanipulierten Präparaten transplantiert wurden, CMV-CTLs entwickelt. In der Gruppe der Patienten, die T-Zelldepletierte PBSCs erhalten haben, rekonstituierten bis Tag 100 post SZT nur 20% der Patienten CMV-CTLs. Dieser Unterschied ist signifikant mit $p < 0,02$ (Log-Rank-Test). An Tag 200 nach SZT ist kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen zu erkennen. Etwa 60% der Patienten beider Gruppen hatten zu diesem Zeitpunkt CMV-CTLs entwickelt (5.13).

5.3.4. Dominanz der Immunantwort bestimmter CMV-spezifischer Tetramere

Bei 124 der 201 Patienten war es möglich, die Rekonstitution von CMV-CTLs mit mehr als einem Tetramer zu überwachen. Insgesamt entwickelten 71 der 124 Patienten (57%) CMV-CTLs. In dieser Patientengruppe haben wir Veränderungen der Immunantwort gegen bestimmte CMV-Epitope und die Immundominanz einzelner HLA-Merkmale während der CMV-CTL Rekonstitution untersucht.

Bei den meisten Patienten, die mit den Tetrameren HLA-A*0101 (pp50) und HLA-A*0201 (pp65) beobachtet werden konnten, wurden über den gesamten Verlauf höhere CMV-CTLs mit dem Tetramer HLA-A*0101 (pp50) gemessen. Das weist darauf hin, dass HLA-A*0101 (pp50) die dominante Immunantwort gegenüber HLA-A*0201 (pp65) liefert. Des Weiteren erwies sich HLA-B*0702 (pp65) als dominant über HLA-A*0101 (pp50) und HLA-A*0201 (pp65). Die Prävalenz von HLA-B*0702 über HLA-A*0201 zeigt, dass auch bei Tetrame-

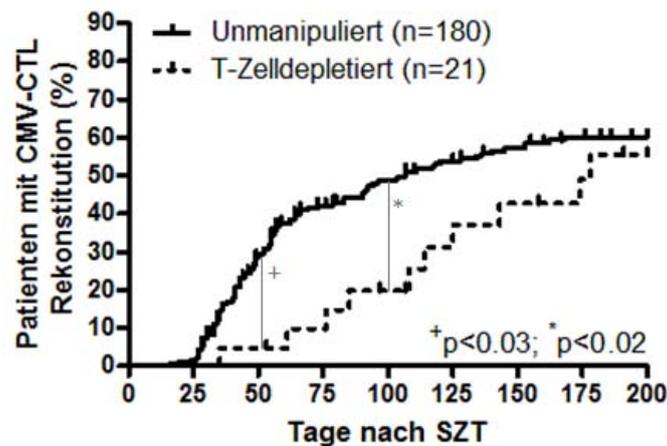


Abbildung 5.13.: Immunrekonstitution von CMV-CTLs (Unmanipuliertes vs. T-Zelldepletiertes Stammzellpräparat). Im Vergleich zu den Patienten, die unmanipulierte Präparate erhalten haben, zeigen Patienten mit T-Zelldepletierten Präparaten eine signifikant verlangsamte Rekonstitution von CMV-CTLs an Tag 50 ($p < 0,03$) und Tag 100 nach SZT ($p < 0,02$). An Tag 200 nach SZT gibt es keine Unterschiede in der Rekonstitution von CMV-CTLs mehr zwischen den beiden Gruppen.

ren, die gegen das gleiche CMV-Protein gerichtet sind, Dominanzen auftreten.

Außerdem identifizierte ich zwölf Patienten (17%), bei denen sich die Dominanz zwischen zwei HLA-/Epitop spezifischen Tetrameren änderte (Abb. 5.16). Insgesamt traten 21 *Switches* auf. Neun der zwölf Patienten zeigten eine CMV-Reaktivierung und einer der Patienten hatte eine *de novo* CMV-Infektion nach SZT. Ein vollständiger Spenderchimärismus zum Zeitpunkt des *Switches* konnte bei zehn von 21 *Switches* gezeigt werden. Ein Spenderchimärismus von 90-100% lag bei fünf und ein Spenderanteil $< 90\%$ lag bei vier *Switches* vor. Wir konnten aber in der kleinen Gruppe von zwölf Patienten keinerlei Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines *Switches* und klinischen Ereignissen zeigen. Besonders bemerkenswert ist aber, dass in 52% aller *Switches* die Änderung zu einer Dominanz von HLA-B*0801, also dem einzigen mit CMV-IE-1 Peptiden beladenen Tetramer, führte (Abb. 5.14). Beim Vergleich der Immunantwort gegen die verschiedenen Source-Proteine pp50, pp65 und IE-1 zeigte sich eine Dominanz von pp50 über pp65 (Abb. 5.15(a)). *Switches* traten mit einer Häufigkeit von 20-27% auf (Abb. 5.15). Abbildung 5.16 zeigt Messdaten eines Patienten mit *Switch* zu HLA*B0801 (IE-1).

5. Ergebnisse

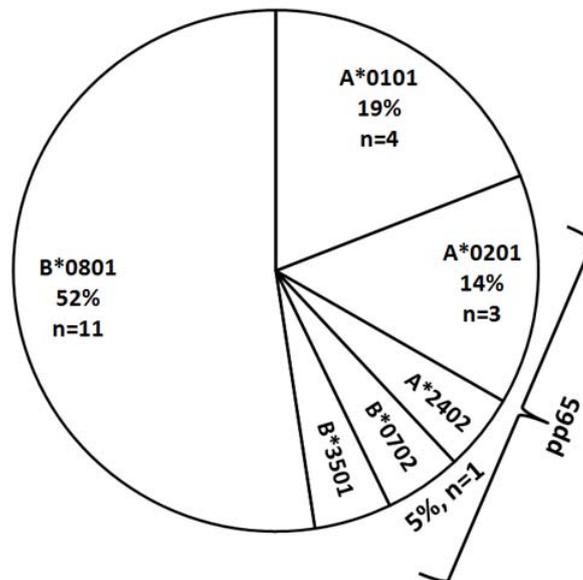


Abbildung 5.14.: Endpunkte der Tetramer-Switches. Bei 124 der 201 Patienten war es möglich, die Rekonstitution von CMV-CTLs mit mehr als einem Tetramer zu überwachen. Insgesamt entwickelten 71 dieser Patienten (57%) CMV-CTLs. Bei 12 Patienten änderte sich die Dominanz zwischen zwei HLA-/ Epitop spezifischen Tetrameren. 52% dieser Switches führten zu einer Dominanz von HLA-B*0801 (IE-1).

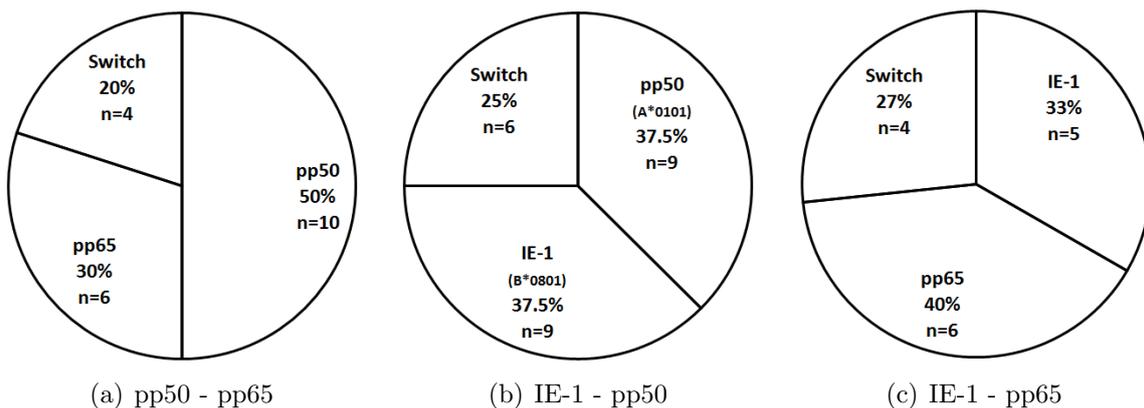
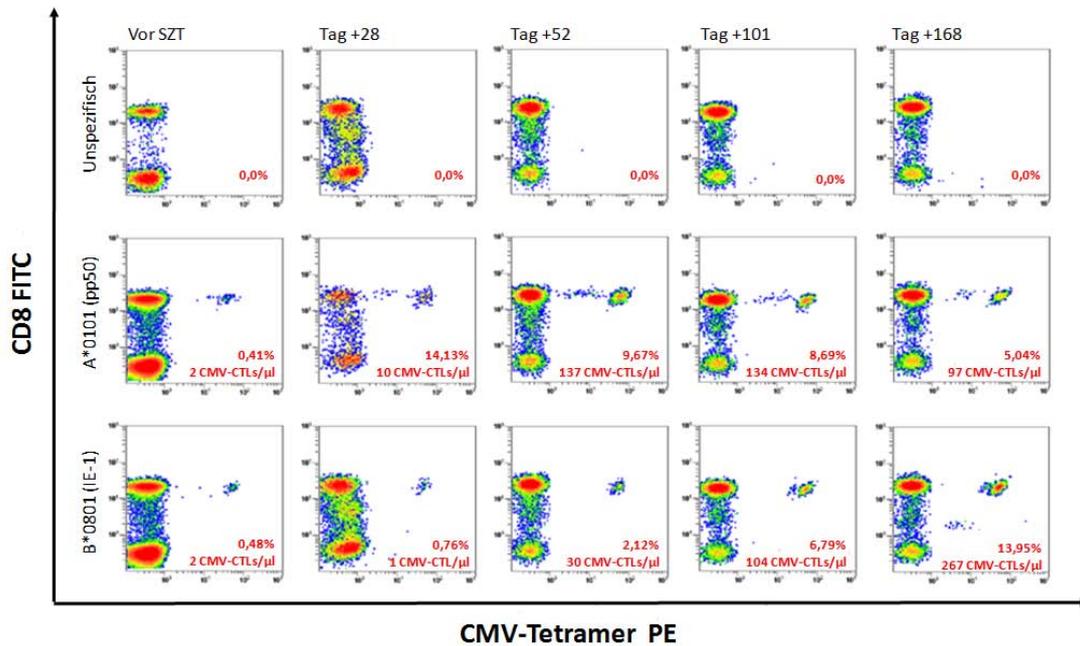
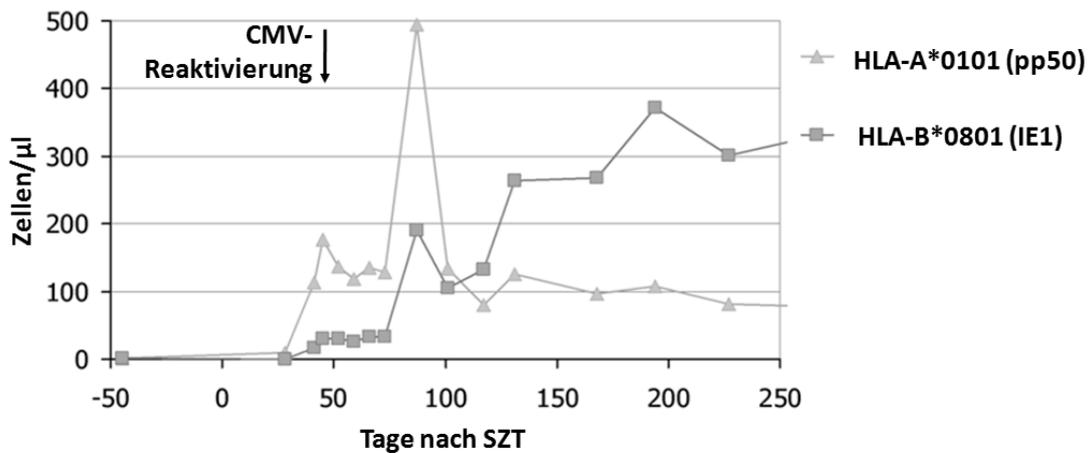


Abbildung 5.15.: Immunantwort gegen Epitope von CMV-Source Proteinen. (a) Die Immunantwort gegen pp50 ist dominant gegenüber der pp65 Antwort. Es gibt keine Dominanzen zwischen IE-1 und pp50 (b) und IE-1 und pp65 (c) Switches treten mit einer Häufigkeit von 20-27% auf.

5.3. Rekonstitution von CMV-CTLs nach allogener SZT



(a) Patient mit *Switch* zu IE-1: Durchflusszytometrische Messung



(b) Patient mit *Switch* zu IE-1: Diagramm der Absolutwerte

Abbildung 5.16.: Beispiel: Patient mit *Switch* zu HLA-B*0801 (IE-1). (a) Durchflusszytometrische Messung von CMV-CTLs bei einem Patienten mit *Switch* zu IE-1, der in Hannover transplantiert wurde. (b) Gezeigt sind die Absolutwerte von CMV-CTLs (y-Achse), gemessen mit den Tetrameren HLA-A*0101 (pp50) und HLA-B*0801 (IE-1) zu verschiedenen Zeitpunkten nach SZT (x-Achse). Vor Tag 100 war HLA-A*0101 dominant gegenüber HLA-B*0801. Etwa 100 Tage nach SZT fand ein Wechsel statt. Im Anschluss blieb HLA-B*0801 dominant gegenüber HLA-A*0101.

5.4. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT

Regulatorische T-Zellen (Tregs) (s. 2.4.1) sind eine Untergruppe der $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen und spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Selbst-Toleranz und der Kontrolle von Immunantworten^{48,100–102}. Sie können die Funktion, Zytokinproduktion und Proliferation konventioneller T-Zellen unterdrücken^{45,103,104} und sind dadurch in die Lage, die Entstehung einer GvHD oder die Abstoßung eines Transplantats zu verhindern^{31,54,105}. Bislang gibt es nur sehr wenig Informationen über die Immunrekonstitution von Tregs bei pädiatrischen Patienten nach SZT. Aus diesem Grund habe ich die Entwicklung von Tregs in einer Longitudinalstudie mit 16 Patienten und 239 Messungen nach SZT untersucht. Ein Manuskript zu den in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnissen wurde im Journal of Immunological Methods veröffentlicht¹⁰⁶.

5.4.1. Bestimmung von Tregs im peripheren Blut gesunder Individuen mittels 10-Farb-Durchflusszytometrie

Bisher basieren durchflusszytometrische Protokolle zur Bestimmung von Tregs weitestgehend auf 4-Farb-Analysen mit den Markern CD45, CD3, CD4 und CD25. Um auch Untergruppen von Tregs (Naive- und Gedächtnis-Tregs) zu bestimmen, wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ein neues 10-Farb-Protokoll zur durchflusszytometrischen Messung von Tregs und NK-Zellen sowie deren Untergruppen entworfen. Dieses Protokoll haben wir zum Testen bei zehn gesunden Spendern eingesetzt. Die Messergebnisse sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Im Median hatten diese gesunden Spender 6,4% $CD25^{bright}$ und 7,5% $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Tregs. Diese setzten sich im Median aus 40,3% $CD45RA^+CD62L^+$ Naiven-, 49,2% $CD45RA^-CD62L^+$ Zentralen-Gedächtnis- und 9,1% $CD45RA^-CD62L^-$ Effektor-Gedächtnis Tregs zusammen. Fast 90% der Tregs tragen das Oberflächenmolekül CD62L (L-Selektin). Dieses vermittelt die Leukozyten-Ädhäsion und ist sehr wichtig für Migration der Zelle in sekundäre lymphatische Organe. Eine Beispielauswertung ist in Kapitel 4, Abbildung 4.6 zu finden.

5.4. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT

		CD25 ^{bright} (%)	CD25 ⁺ CD127 ^{neg/dim} (%)	CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (%)	CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (%)	CD45RA ⁻ CD62L ⁻ (%)
Popula- tion		Tregs ^{bright}	Tregs ^{neg/dim}	Naive Tregs	Zentrale- Gedächtnis Tregs	Effektor- Gedächtnis Tregs
Gate		[CD3 ⁺ CD4 ⁺]	[CD3 ⁺ CD4 ⁺]	Tregs ^{neg/dim}	Tregs ^{neg/dim}	Tregs ^{neg/dim}
	1	5,6	7,4	47,0	47,6	5,1
	2	3,5	4,6	39,4	50,6	9,0
	3	6,4	7,6	50,7	41,2	6,8
	4	6,8	7,0	21,9	68,4	9,2
	5	3,3	5,3	32,9	56,7	9,9
	6	6,3	8,1	37,7	49,3	12,6
	7	8,6	10,7	41,3	44,7	13,2
	8	9,4	10,4	46,3	49,2	8,0
	9	6,5	7,3	56,9	40,8	1,8
	10	7,9	9,6	28,5	61,0	10,4
		Median	Median	Median	Median	Median
		6,4	7,5	40,3	49,2	9,1

Tabelle 5.1.: Messung von Tregs und Treg-Untergruppen mit Hilfe von 10-Farb-Durchflusszytometrie. Im peripheren Blut von zehn gesunden Individuen wurden CD25^{bright} und CD25⁺CD127^{neg/dim} Tregs bestimmt. Außerdem konnten auch Naive- sowie Zentrale-Gedächtnis- und Effektor-Gedächtnis- Tregs gemessen werden.

5.4.2. Vergleich durchflusszytometrischer Methoden zur Treg Bestimmung mit Hilfe von 5-Farb-Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Tregs existieren mehrere, auf verschiedenen Markerkombinationen basierende Ansätze. Um eine Methode zu finden, die sich gut für ein regelmäßiges Monitoring von Tregs nach SZT eignet, wurden folgende Methoden getestet:

- $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$
- $CD3^+CD4^+CD25^{bright}$
- $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{neg/dim}$

Je drei Blutproben gesunder Individuen und Patienten nach SZT Tregs wurden mit Hilfe aller drei Methoden bestimmt. Die erhobenen Treg Werte sind reproduzierbar und vergleichbar (Tabelle 5.2).

5. Ergebnisse

	$CD25^+FoxP3^+$		$CD25^{bright}$		$CD25^+CD127^{neg/dim}$	
	%	Zellen/ μ l	%	Zellen/ μ l	%	Zellen/ μ l
Patient 1	25,7	15	21,8	13	21,6	12
Patient 2	9,2	39	7,6	32	8,2	35
Patient 3	9,5	68	7,5	54	8,2	58
Gesunder Spender 1	4,8	22	6,2	29	5,5	26
Gesunder Spender 2	6,8	82	5,4	65	6,3	76
Gesunder Spender 3	8,8	119	8,3	113	8,6	117

Tabelle 5.2.: Treg-Bestimmung: Vergleichsmessungen. Bestimmung von Absolutwerten und prozentualen Treg-Werten als Untergruppe der T-Helferzellen bei gesunden Individuen und Patienten nach SZT.

Die Durchführung der intrazellulären FoxP3-Färbung ist deutlich zeitaufwändiger als die Treg Bestimmung durch die Markierung von Oberflächenmolekülen. Daher ist dieser Ansatz für ein häufiges Monitoring nach SZT nicht geeignet. Zum Vergleich der Ansätze $CD25^{bright}$ und $CD25^+CD127^{neg/dim}$ haben wir 239 Treg Messungen von 16 Patienten auf beide Arten ausgewertet. Es zeigte sich, dass mit Hilfe der $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Färbung etwas höhere Treg-Werte gemessen wurden. Die Abweichung belief sich auf etwa 0,5% (Abb. 5.17(a)). In der Gruppe von zehn gesunden Individuen fiel der Unterschied in der Treg-Bestimmung zwischen den beiden Methoden mit ca. 1,75% etwas höher aus (Abb. 5.17(b)).

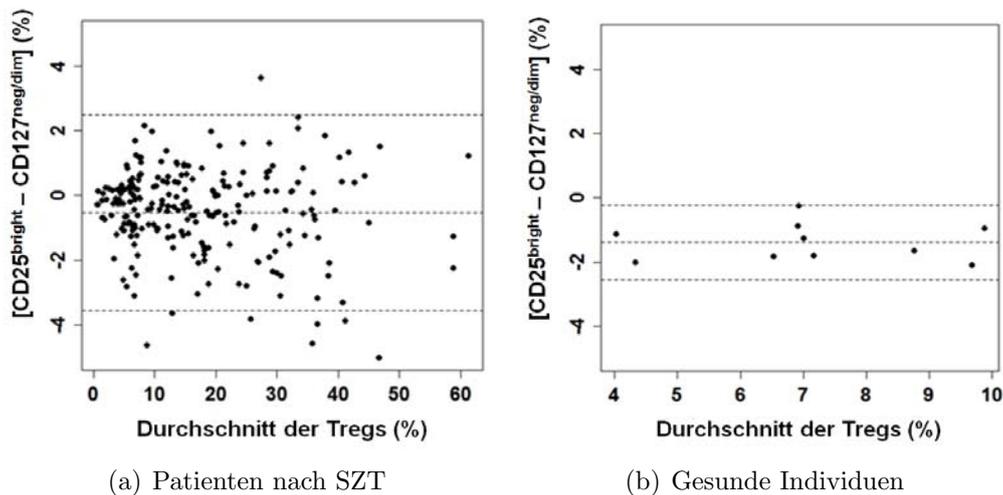


Abbildung 5.17.: Bland-Altman Diagramm zum Vergleich von $CD25^{bright}$ und $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Tregs. (a) Gezeigt ist jeweils die prozentuale Abweichung der beiden Methoden zur Treg-Bestimmung (y-Achse) sowie der durchschnittliche prozentuale Anteil von Tregs bezogen auf die T-Helferzellen (x-Achse). Bei den Patienten nach SZT liegt die Abweichung der beiden Methoden bei ca. 0,5% und (b) bei gesunden Individuen bei etwa 1,75%. In beiden Gruppen wurden im Durchschnitt höhere Werte mit dem $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Ansatz gemessen.

5.4. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT

Bei der Messung von Tregs via $CD25^+CD127^{neg/dim}$ fällt auf, dass es direkt nach SZT auf allen T-Zellen keine oder eine nur sehr geringe Expression von CD127 (α -Kette des IL-7 Rezeptor) gibt. Diese Runterregulation von CD127 konnten wir bei allen 16 Patienten beobachten. Durch Bestimmung der „Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI)“ zu verschiedenen Zeitpunkten nach SZT, konnte ich zeigen, dass die Expression von CD127 mit dem Fortschreiten der Tage nach SZT korreliert (Pearson Koeffizient $r=0,5$; $p<0,0001$). Abbildung 5.18 zeigt die CD127 MFI für einen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach SZT.

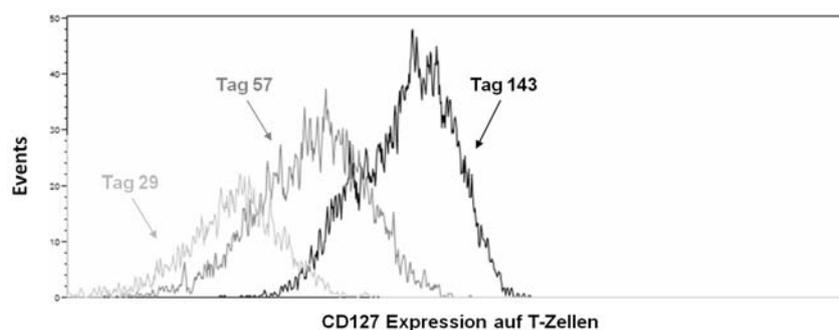


Abbildung 5.18.: Messung der CD127 Expression von einem Patienten zu drei Zeitpunkten nach SZT. Im Laufe der Immunrekonstitution steigt die CD127 Expression auf T-Zellen.

5.4.3. Rekonstitution von Tregs im Hinblick auf GvHD und Rezidiventwicklung

Zur Analyse der Immunrekonstitution wurden Tregs in 239 Blutproben von 16 Patienten innerhalb der ersten zwei Jahre nach SZT bestimmt. Obwohl unsere Patientengruppe im Bezug auf die Grunderkrankung und die Transplantationsart sehr heterogen war (Tabelle 4.10), konnte ich einen Unterschied in der Immunrekonstitution von Tregs zwischen Patienten ohne GvHD oder leichter GvHD und Transplantierten mit einer schweren GvHD oder einem Rezidiv nach SZT zeigen.

Innerhalb der ersten zwei Monate nach SZT liegt der Median der gemessenen Treg-Prozentwerte aller Patientengruppen, bezogen auf die $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen, zwischen 10 und 20%. Bei Patienten ohne GvHD ($n=3$) oder mit GvHD Grad I ($n=4$) nimmt dieser Wert innerhalb der nächsten 2-3 Monate wieder ab und liegt anschließend bei ca. 7-8%. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit einer GvHD Grad II-IV ($n=5$) und Patienten mit einem Rezidiv nach SZT mit einem Median von 20-30% über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr hohe Treg Werte (Abb. 5.19(a)).

Die Treg-Absolutwerte/ μ l stiegen schneller bei Patienten ohne GvHD im Vergleich zu Patienten mit einer GvHD Grad II-IV (Unpaired T-Test: $p<0,5$) (Abb. 5.19(b)).

5. Ergebnisse

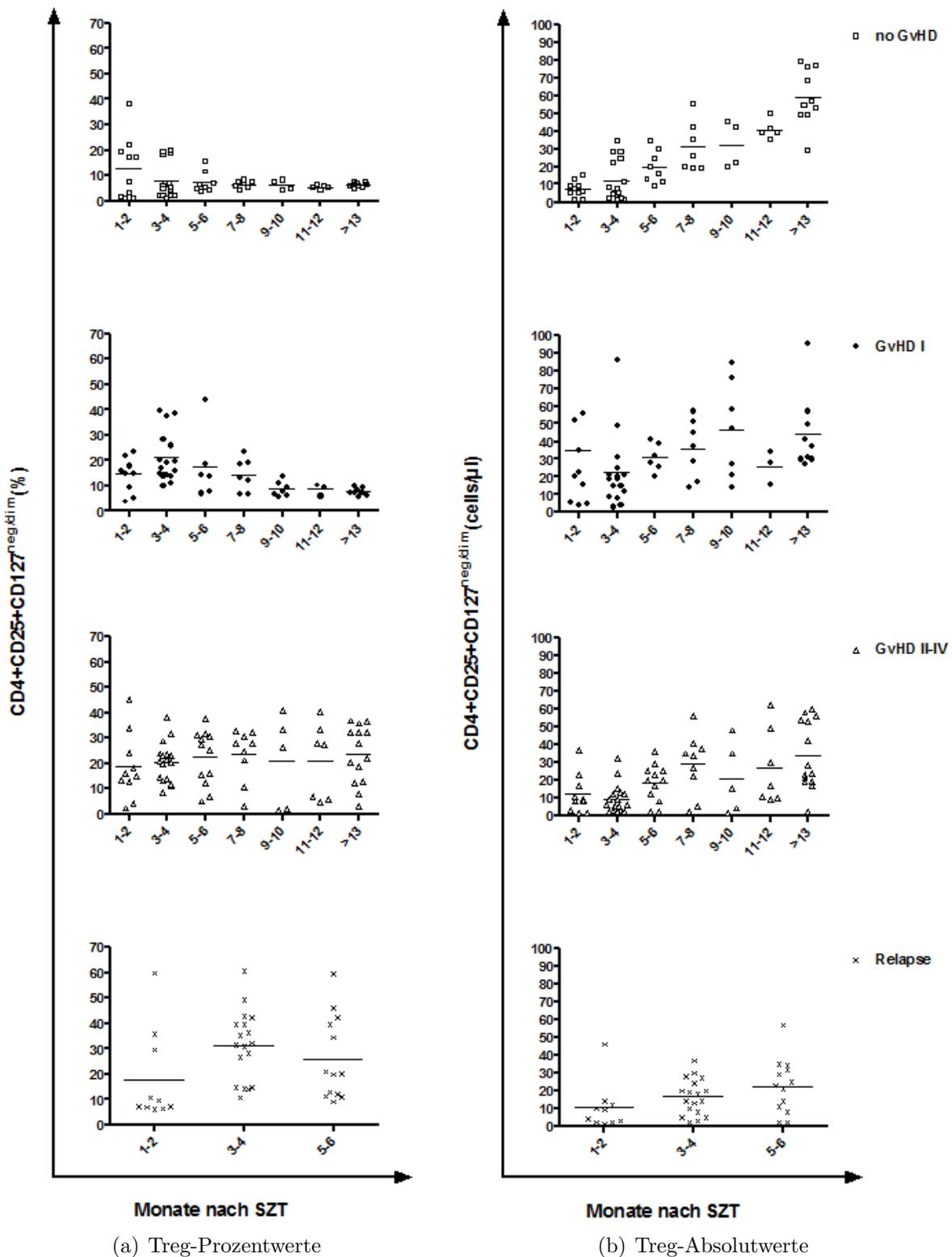
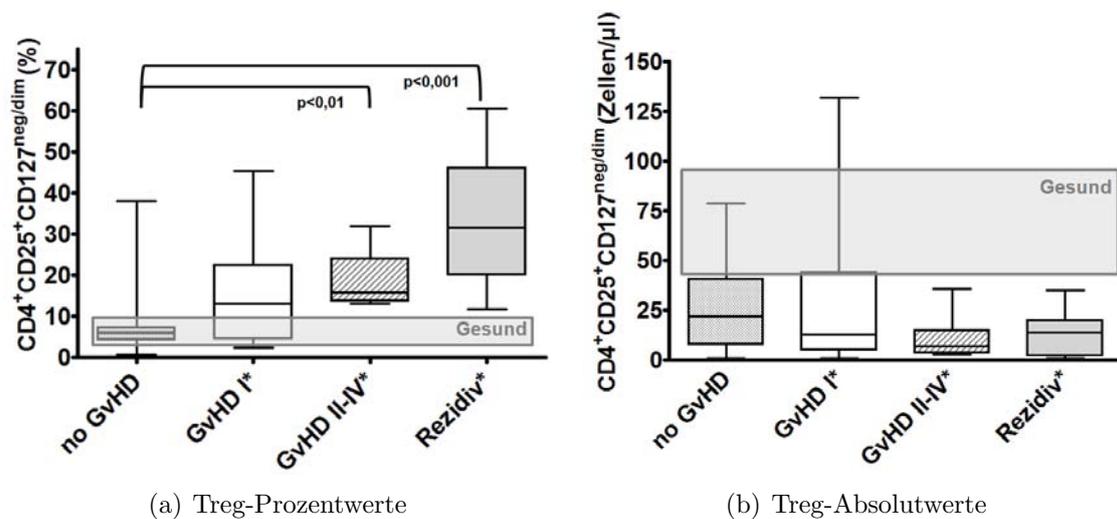


Abbildung 5.19.: Immunrekonstitution von Tregs nach SZT. (a) Die prozentualen Werte regulatorischer T-Zellen (Tregs) bezogen auf die T-Helferzellen im peripheren Blut von Patienten ohne GvHD oder GvHD Grad I pendeln sich innerhalb der ersten Monate nach SZT bei ca. 8% ein. Patienten mit GvHD Grad II-IV oder einem Rezidiv haben im Median höhere Werte. (b) Die Treg-Absolutwerte zeigen eine schnellere Rekonstitution bei Patienten ohne GvHD im Vergleich zu Patienten mit GvHD Grad II-IV ($p < 0,05$; Unpaired T-Test).

5.4. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT

Im nächsten Schritt habe ich untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Regeneration von Tregs und der Entstehung einer akuten GvHD oder eines Rezidivs vorliegt. Dafür habe ich mir die Treg-Werte gezielt nur an Tagen angesehen, an denen in der Krankenakte des jeweiligen Patienten eine akute GvHD vermerkt war oder ein Rezidiv nach SZT vorlag. Diese Werte habe ich mit den Tregs der Patienten ohne GvHD verglichen. Hierbei ergaben sich signifikant höhere Treg-Prozentwerte bei Patienten mit einer GvHD Grad II-IV ($p < 0,01$) oder Rezidivpatienten ($p < 0,001$). Patienten zum Zeitpunkt des Rezidivs zeigten die höchsten Treg-Prozentwerte mit einem Median von 31,6% (Abb. 5.20(a)). Im Gegensatz hierzu zeigten Patienten ohne GvHD die höchsten Treg-Absolutwerte, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich zu den anderen Gruppen (Abb. 5.20(b)).



*Messungen zu Zeitpunkten akuter GvHD oder im Rezidiv.

Abbildung 5.20.: Treg Entwicklung zu Zeitpunkten akuter GvHD oder im Rezidiv. (a) Patienten ohne GvHD zeigen signifikant niedrigere prozentuale Treg Werte als Patienten während einer GvHD II-IV ($p < 0,01$) oder im Rezidiv ($p < 0,001$) nach SZT (Kruskal-Wallis-Test + Dunn-Test). (b) Im Gegensatz hierzu gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Treg-Absolutwerten aller Gruppen.

6. Diskussion

6.1. Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation

Als Immunrekonstitution nach SZT bezeichnet man die Differenzierung transplantierte hämatopoetischer Stammzellen zu reifen Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr (s. 2.4). Die zügige Regeneration funktioneller Immunzellen ist ein entscheidender prognostischer Faktor im Hinblick auf das Überleben des Patienten nach SZT. Der Zeitpunkt, wann die einzelnen Zellpopulation nach SZT rekonstituieren, ist von Patient zu Patient unterschiedlich und ist z.B. vom Entwicklungsweg der einzelnen Zellpopulation, der Transplantataufreinigung und dem HLA-Matching zwischen Spender und Empfänger abhängig³⁴⁻³⁸. Bei den meisten Patienten ist die Regeneration des hämatopoetischen Systems und der angeborenen Immunität nach SZT innerhalb weniger Wochen weitestgehend abgeschlossen. Im Gegensatz hierzu bedarf die Rekonstitution der erworbenen Immunität oft mehrere Monate bis Jahre. Hierbei rekonstituieren Kinder schneller als Erwachsene^{39,40}, was u.a. auf die mit dem Alter abnehmende Thymusfunktion zurückgeführt werden kann^{41,42}. Eine verzögerte und mitunter unvollständige Immunrekonstitution nach SZT birgt ein erhöhtes Risiko für Infektionen und das Auftreten eines Rezidivs. Adoptive Immuntherapien können dazu beitragen, die Immunrekonstitution zu beschleunigen und den GvT/GvL-Effekt zu steigern. Die Indikation hierzu ist jedoch streng geregelt, da eine zusätzliche Immuntherapie mit dem Auftreten von Risiken verbunden ist (s. 2.4.5).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Immunrekonstitution auf das Auftreten von Infektionen, Rezidiv sowie das Überleben nach SZT untersucht. Mittels multivariater Analyse wurde die Immunregeneration von 32 Patienten nach SZT im Hinblick auf das Überleben des Patienten beurteilt. Außerdem wurde die Rekonstitution spezifischer Immunzellen und deren Einfluss auf den Transplantationsverlauf analysiert. Die Immunität gegen CMV wurde mit Hilfe HLA-Klasse-I spezifischer Tetramere beobachtet. Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektionen ausgewertet. Des Weiteren wurde in einer Longitudinalstudie die Rekonstitution von Tregs nach SZT untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Methoden zur durchflusszytometrischen Treg Bestimmung angewendet und verglichen. Die Absolut- und Prozentwerte der Tregs wurden im Hinblick auf die Entwicklung von GvHD bzw. eines Rezidivs ausgewertet.

6.2. Applikation und Optimierung adoptiver Zelltherapien

Die Identifikation von Hochrisiko-Patienten, welche von einer adoptiven Immuntherapie profitieren würden, ist sehr wichtig. Hat man einen Patienten ermittelt, der eine adoptive Therapie benötigt, so stellt sich die Frage, welche Zelltherapie am besten geeignet ist. Die Hauptziele der adoptiven Zelltherapie sind wie folgt:

- Steigerung des GvT/GvL-Effekts.
- Unterstützung der Immunrekonstitution.
- Vermeidung einer GvHD.

Es stehen verschiedene Möglichkeiten der adoptiven Immuntherapie zur Verfügung. Um die Immunrekonstitution zu beschleunigen, kann eine erneute, oftmals geringere Menge von Spenderstammzellen appliziert werden (*Stammzell-Boost*). Um das Risiko des Auftretens einer GvHD nach der Gabe eines *Stammzell-Boosts* zu minimieren, werden häufig CD34-selektionierte Stammzell-Präparate eingesetzt, da sie so gut wie keine T-Zellen enthalten.

Bei der akuten Infektion mit Viren (z.B. CMV) können spezifische Spender-T-Zellen (z.B. CMV-spezifische T-Zellen) selektiert werden, die dem Patienten infundiert werden und spezifisch gegen die vorliegende Infektion wirken^{77,78}.

Liegt ein Hinweis auf ein drohendes Rezidiv oder eine Transplantatabstoßung vor, werden in vielen Fällen Spenderlymphozyten (DLIs) verabreicht. Der Zeitpunkt der DLI-Applikation wird auf der Basis von Chimärismusanalysen gewählt. Mit Hilfe univariater und multivariater Modellierung ist es uns nun gelungen, Hochrisiko-Patienten anhand ihrer Immunrekonstitution zu erkennen. Bisher konnten DLIs erfolgreich zur Abwendung einer beginnenden Transplantatabstoßung eingesetzt werden⁷²⁻⁷⁴. Bei einem beginnenden Rezidiv führt eine DLI dagegen deutlich seltener zu einem Benefit für den Patienten. Obwohl die Menge der applizierten Lymphozyten in Abhängigkeit des HLA-Matchings individuell für den jeweiligen Patient angepasst wird, bergen DLIs ein großes GvHD Risiko¹⁰⁷. Sind nach der ersten DLI-Gabe weitere Applikationen von Spenderlymphozyten notwendig, so kann die Dosis langsam gesteigert werden, wenn bislang keine GvHD aufgetreten ist.

Der adoptive Transfer allogener hochaufgereinigter NK-Zellen ist eine weitere Therapieoption zur Steigerung des GvT/GvL-Effekts. Die applizierten NK-Zellen wirken sich möglicherweise auch positiv auf die Immunregeneration aus. In einer Phase I/II-Studie wurden im Transplantationszentrum der Frankfurter Universitätskinderklinik 14 Patienten mit hochaufgereinigten NK-Zellen nach SZT behandelt. Die Hälfte der Kinder erhielt NK-Zellen, die nach der Aufreinigung 10 Tage mit IL-2 stimuliert wurden. Die IL-2 Stimulation

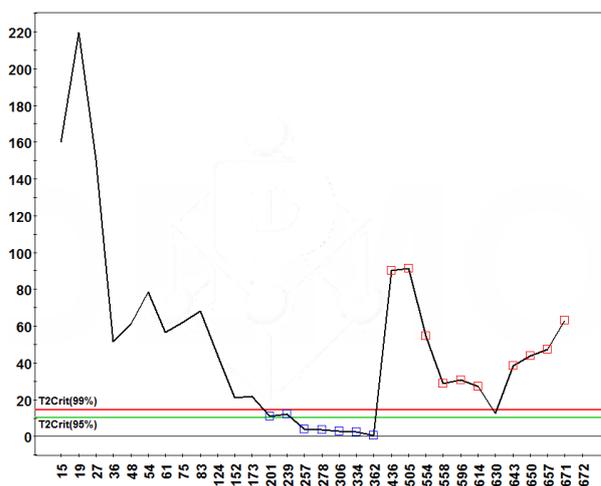
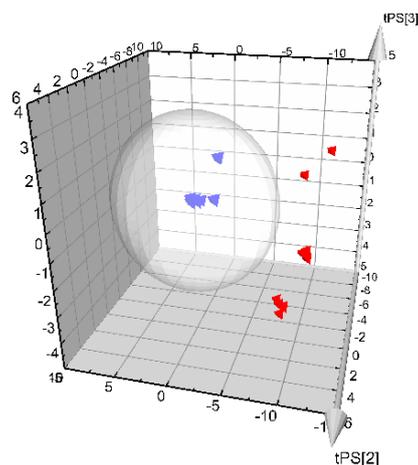
führte zu einer erhöhten Zytokinproduktion durch die NK-Zellen und zu einer Veränderung der Rezeptorexpression auf der NK-Zelloberfläche. Durch die Stimulation wurde eine gesteigerte Expression von Rezeptoren erreicht, welche für die Zytotoxizität der NK-Zellen notwendig sind (z.B. NKG2D und NCRs). Mit Hilfe funktionaler Assays konnte diese Steigerung in der zytotoxischen Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden⁶⁹. Die Therapie mit hochaufgereinigten IL-2 stimulierten NK-Zellen zur GvT/GvL-Steigerung stellt somit eine geeignete Alternative zu DLI dar. Bei den Patienten der Frankfurter Studie traten nur milde Formen einer GvHD nach NK-Zell-Applikation auf^{69,70}. Möglicherweise wurde die GvHD in diesen Fällen durch residuale *CD3*⁺ Zellen im NK-Zell-Präparat ausgelöst. Ob NK-Zellen selbst in der Lage sind, eine GvHD auszulösen, ist bislang nicht geklärt.

Leider kann durch die Applikation adoptiver Zelltherapien nicht bei allen Patienten der erwünschte Erfolg erzielt werden, obwohl eine hohe Zytotoxizität der Zellen *in vitro* gezeigt wurde. Dies hängt mit *Escape-Mechanismen* zusammen, die den Tumor vor Angriffen des Immunsystems schützen^{108,109}. Um die Wirksamkeit und Sicherheit des adoptiven Zelltransfers zu verbessern, sind daher ein weitgehendes Verständnis der Tumormunität und der GvHD-Entstehung notwendig.

6.3. Multivariate und univariate Auswertungen zur Immunrestitution

Es gibt zahlreiche Daten in der Literatur zur Immunrestitution nach SZT und Studien, die vor allem univariate prognostische Faktoren zur Erkennung von Hochrisiko-Patienten ermittelten^{34,110–114}. Um das komplexe Zusammenspiel des Immunsystems besser beschreiben zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit multivariate Ansätze verwendet und multivariate prognostische Faktoren ermittelt.

Basierend auf Messungen von Leukozytenuntergruppen gesunder Kinder wurde ein multivariates Normwertmodell erstellt. Dieses ellipsenförmige Modell wurde anschließend verwendet, um Patienten nach SZT in eine Hochrisiko- und eine Niedrigrisiko-Gruppe einzuteilen. Patienten, die den Normwertbereich zu den Zeitpunkten 200 und 300 Tage nach SZT erreicht hatten (Niedrigrisiko-Gruppe), zeigten ein signifikant höheres Überleben als die Patienten der Hochrisiko-Gruppe, die das Ellipsoid gar nicht erreichten oder zu schnell wieder verließen (Tag 200: $p=0,001$; Tag 300: $p<0,0001$). Durch die Klassifikation mit dem multivariaten Modell an Tag 200 nach SZT wurden drei Patienten falsch der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet. Fünf Patienten wurden an Tag 200 falsch der Niedrigrisiko-Gruppe zugeteilt und verstarben. Interessanterweise verließen drei von ihnen (Tabelle 4.8; Patienten 3, 21, 22) vor ihrem Tod das Normwertellipsoid. Abbildung 6.1 zeigt einen Beispielverlauf eines der drei Patienten, die den Normwertbereich nach Erreichen wieder verlassen.

(a) T^2 Range Plot

(b) Visualisierung mit Ellipsoid

Abbildung 6.1.: Beispiel: Verlassen des Normwertbereichs. (a) Gezeigt ist der T^2 Range Plot des Patienten Nr. 21 (Tabelle 4.8). Der Patient erreicht das Ellipsoid etwa 190 Tage nach SZT, aber verlässt es nach ca. 400 Tagen wieder. (b) Zur Verdeutlichung wurden die Messwerte im Normwertbereich blau und die Werte nach verlassen des Referenzbereichs rot markiert und in ein Koordinatensystem mit Ellipsoid eingezeichnet.

Um dieses Phänomen aber in die Modellierung zu integrieren, wäre eine deutlich größere Anzahl von Patienten nötig, die den Normwertbereich wieder verlassen.

Vor Beginn dieser Doktorarbeit wurde von Koehl *et al.* ein univariater Ansatz zur Identifikation von Hochrisiko-Patienten vorgeschlagen³⁴. Hierin konnte gezeigt werden, dass Patienten, die nicht innerhalb des ersten Jahres nach SZT die 5. Perzentile altersgemachter Normwerte für zytotoxische T-Zellen erreichten, schlechtere Überlebenschancen haben als Patienten, die diesen Schwellwert erreichen ($p < 0,001$). Durch die Analyse des Überschreitens der 5. Perzentile altersabhängiger Normwerte können zu niedrige Zellwerte erkannt werden können, zu hohe Werte bleiben jedoch unerkannt. Mit Hilfe des beschriebenen multivariaten Ansatzes können Abweichungen unterhalb und oberhalb des Normbereichs bestimmt werden. Erhöhte Werte zytotoxischer T-Zellen können z.B. aufgrund einer CMV-Infektion entstehen. Die Ursache für erhöhte Absolutwerte von T-Helferzellen kann eine Pilzinfektion sein. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 6.2 den Verlauf eines Patienten, der sehr schnell alle altersgemachten Perzentilen erreicht (Abb. 6.2(a)) und den Verlauf eines Patienten, der innerhalb der ersten 200 Tage nach SZT nur die 5. Perzentile altersgemachter NK-Zellen erreicht hat. Dieser Patient hat eine stark verlangsamte Rekonstitution und wäre durch Nicht-Erreichen der 5. Perzentile altersgemachter Normwerte zytotoxischer T-Zellen, durch das zuvor beschriebene univariate Modell einer „Hochrisiko-Gruppe“ zugeordnet worden (Abb. 6.2(b)). Außerdem sind zwei Beispiele von Patientenverläufen gezeigt, die mit ihren Absolutwerten weit über die 95. Perzentile hinaus-schießen, was mit Hilfe des oben beschriebenen Modells nicht hätte erkannt werden können (Abb. 6.2(c), 6.2(d)).

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit umgesetzten multivariaten Modell ist es gelungen, an Tag 300 nach SZT signifikantere Ergebnisse zu erlangen als in der gleichen Patientengruppe mit dem univariaten Ansatz ein Jahr nach SZT ($p < 0,0001$ vs. $p < 0,001$). Die mit dem multivariaten Modell erzielten Ergebnisse an Tag 300 nach SZT waren deckungsgleich mit den Ergebnissen an Tag 365 nach SZT.

Trotz dieser Erfolge wäre es besser, bereits zu einem früheren Zeitpunkt Hochrisiko-Patienten zu identifizieren, um so früh wie möglich eine immuntherapeutische Maßnahme einzuleiten. Unser Modell liefert auch an Tag 200 nach SZT signifikante Ergebnisse, wünschenswert für eine rechtzeitige klinische Entscheidung sind aber deutlich frühere Zeitpunkte wie Tag 60-120 nach SZT.

In der Literatur gibt es auch Ansätze, die Hochrisiko-Patienten zu früheren Zeitpunkten nach SZT identifizieren. Viele dieser Verfahren haben in multivariaten Analysen mehrere Variablen berücksichtigt, ermitteln aber univariate prognostische Faktoren mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Ansätze, die bereits an Tag 21 nach SZT Hochrisiko-Patienten identifizieren, wurden von Kumar *et al.* und Kim *et al.* beschrieben^{110,111}. In

6. Diskussion

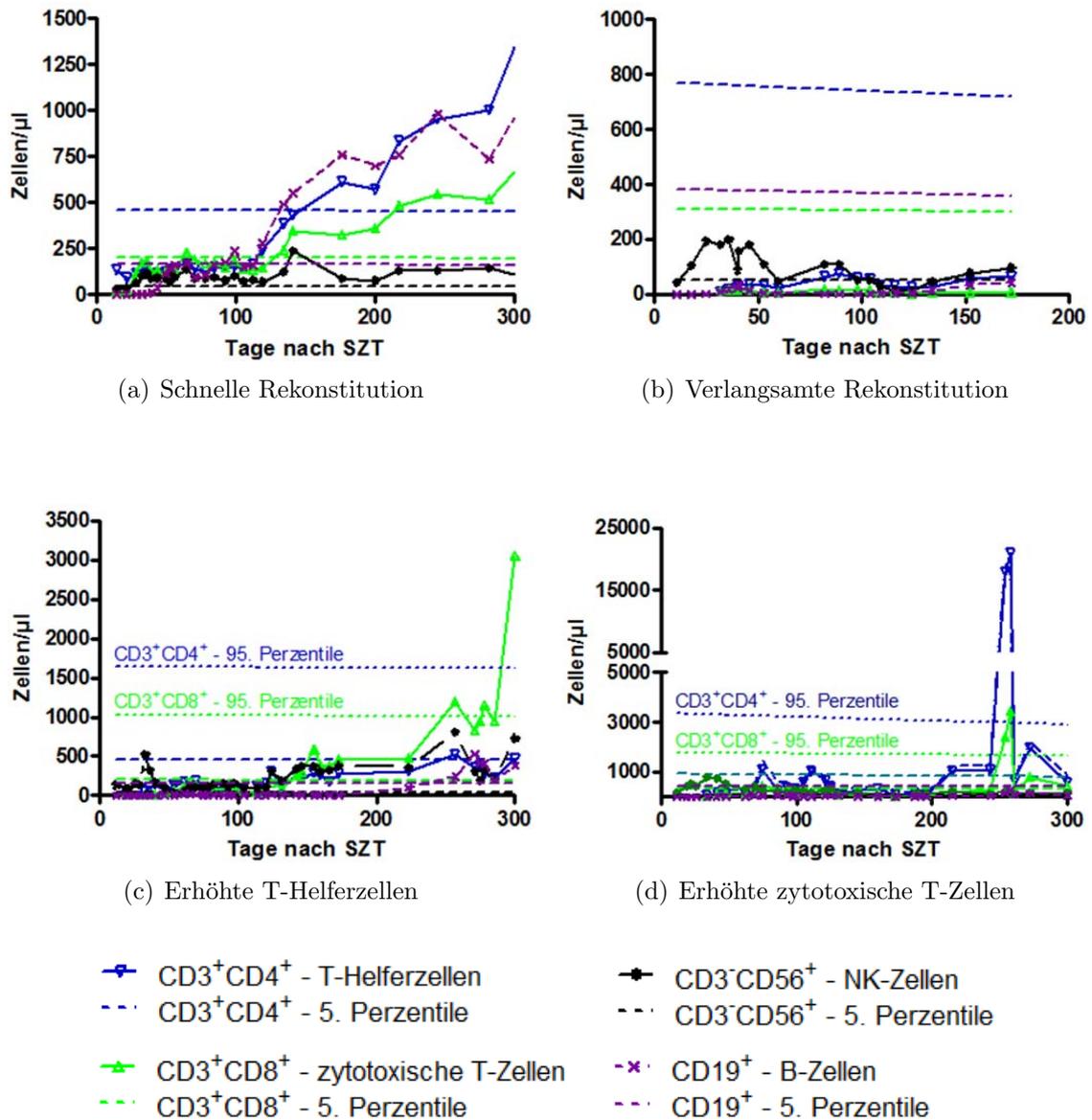


Abbildung 6.2.: Immunrekonstitution: Beispiele von Patientenverläufen. (a) Patient mit sehr schneller Immunrekonstitution. (b) Verlangsamte Immunrekonstitution. Der Patient hat bis 200 Tage nach SZT nur die 5. Perzentile altersabhängiger Normwerte für NK-Zellen erreicht. (c) Sehr starker Anstieg von $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen. (d) Anstieg $CD3^+CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen. Der Patient hatte zu diesem Zeitpunkt eine CMV-Infektion und eine große Anzahl CMV-CTLs konnte nachgewiesen werden.

6.3. Multivariate und univariate Auswertungen zur Immunrekonstitution

einer Gruppe von 43 erwachsenen ALL Patienten nach SZT zeigten Kumar *et al.*, dass Patienten mit einer Lymphozytenzahl $< 175 \cdot 10^6/l$ ein erhöhtes Rezidivrisiko haben¹¹⁰. Zu den gleichen Ergebnissen kamen Kim *et al.* in einer Gruppe von 82 erwachsenen Patienten. Diese Patientengruppe war sehr heterogen im Bezug auf Erkrankung und Transplantationsart¹¹¹. Allerdings konnten Afzal *et al.* die Ergebnisse in 71 Kindern mit AML weder an Tag 21 noch an Tag 30 bestätigen¹¹³.

Ein weiteres Modell zur Identifikation von Risikopatienten wurde ebenfalls von Kim *et al.* vorgeschlagen. Es ermittelte die Rekonstitution von $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen drei Monate nach SZT als prognostischen Faktor¹¹². Ein auf der Rekonstitution von $CD3^+CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen basierendes Modell wurde von Yakoub-Agha *et al.* vorgeschlagen. Es basiert darauf, dass sich die schnelle Rekonstitution von $CD8^+CD28^-$ Zellen bis Tag 60 positiv auf das Überleben auswirkt, allerdings steigt dadurch auch das Risiko einer GvHD¹¹⁴.

6.4. Rekonstitution CMV-spezifischer T-Zellen (CMV-CTLs) nach allogener SZT

Die CMV-Reaktivierung stellt eine häufige Komplikation nach SZT dar. In einer Pilotstudie mit 16 pädiatrischen Patienten⁸⁴ und einer tri-zentrischen Studie mit 201 Patienten (pädiatrisch und internistisch) konnten wir zeigen, dass eine Rekonstitution von CMV-CTLs einen Schutz gegen die CMV-Reaktivierung bietet.

6.4.1. Bestimmung von CMV-CTLs mit Hilfe der Tetramertechnologie

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von CMV-CTLs nach SZT habe ich Tetramerbasierte Ansätze verwendet. Die Tetramertechnologie erwies sich als sehr sensitiv und robust⁸³. Außerdem ermöglicht sie das Monitoring von CMV-CTLs in einer großen Patientengruppe, da die notwendige Menge an Patientenblut und die für den Ansatz benötigte Zeit deutlich geringer sind als z.B. für funktionale Assays. Allerdings ist die Methode HLA-restringiert, d.h. sie kann nur bei Patienten angewendet werden, die mindestens ein HLA-Klasse-I-Merkmal besitzen, für das ein CMV-spezifisches Tetramer vorhanden ist. Wir konnten aber zeigen, dass wir bei mehr als 85% der Patienten mit mindestens einem von sechs Tetrameren die Immunantwort gegen CMV messen konnten⁸⁴. Die Abdeckung dieser sehr großen Anzahl von Patienten mit nur wenigen HLA-spezifischen Tetrameren ist dadurch zu erklären, dass es zwar eine Vielzahl unterschiedlicher HLA-Merkmale gibt, diese aber in der Bevölkerung nicht gleichverteilt sind. In Deutschland besitzen z.B. ca. 29% der Bevölkerung das HLA-Klasse-I-Molekül A*0201¹¹⁵.

Leider sehen wir durch die Anwendung HLA-spezifischer Tetramere evtl. nur einen Ausschnitt der Immunität und nicht die gesamte Antwort gegen das Pathogen. Außerdem kann mit der Tetramertechnologie nicht die Antwort der $CD3^+CD4^+$ T-Helferzellen bestimmt werden, die von Widman *et al.* als prognostischer Faktor für die CMV-Reaktivierung beschrieben wird¹¹⁶. Ein weiterer Schwachpunkt der Methode ist, dass eine beeinträchtigte Funktionalität der Zellen (z.B. durch Steroidgaben) mit der Tetramertechnik nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Nakamura *et al.* vermuten zwar, dass die Proliferation von CMV-CTLs ein Marker für deren Funktionalität sein könnte¹¹⁷, trotzdem sind in manchen Fällen aber zusätzliche intrazelluläre Färbungen (z.B. mit $IFN\gamma$) notwendig, um die Funktionalität von CMV-CTLs sicher nachzuweisen.

In einer Studie mit 201 Patienten konnten wir zeigen, dass die Anzahl der CMV-CTLs zwischen den einzelnen Patienten stark streut. Außerdem war der Median der mit sechs verschiedenen Tetrameren gemessenen CMV-CTLs sehr unterschiedlich. HLA-A*0101,

HLA-B*0702 und HLA-B*0801 hatten einen ähnlichen Median. Die Werte der anderen Tetramere waren geringer. Für HLA-A*2402 ergaben sich sogar signifikant niedrigere Absolutwerte im Vergleich zu Messungen mit den Tetrameren HLA-A*0101 ($p < 0,001$), HLA-B*0702 ($p < 0,01$) und HLA-B*0801 ($p < 0,01$). Warum der Median der mit dem Tetramer HLA-A*2402 gemessenen CMV-CTLs signifikant niedriger liegt, ist nicht vollständig geklärt. Giest *et al.* vermuten, dass bereits niedrige CMV-CTL Levels spezifisch für HLA-A*2402 eine schützende Wirkung haben¹¹⁸. Morita *et al.* hingegen nehmen an, dass die Antwort von HLA-A*2402 von anderen Epitopen dominiert wird¹¹⁹.

6.4.2. Wie viele CMV-CTLs braucht ein Patient zum Schutz vor einer CMV-Reaktivierung?

Die Regeneration von CMV-CTLs kann einen Patienten vor einer CMV-Reaktivierung und den damit verbundenen Komplikationen schützen^{84,120–123}. Abbildung 6.3 zeigt Beispielverläufe von zwei Patienten, die eine CMV-Reaktivierung nach SZT hatten, aber durch die Rekonstitution von CMV-CTLs die CMV-Last sehr schnell reduzieren konnten. Beide Patienten wurden in Hannover transplantiert und erhielten keinerlei antivirale Therapie. Antivirale Medikamente wie z.B. Ganciclovir haben oft eine myelotoxische Wir-

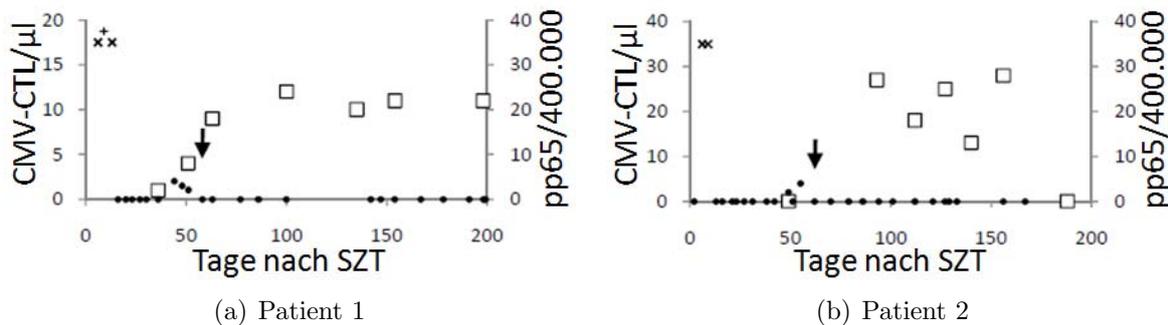


Abbildung 6.3.: Beispiel: CMV-Clearance ohne Medikamente. Gezeigt sind zwei Patienten aus Hannover mit CMV-Reaktivierung (\downarrow). Beide Patienten konnten durch die Rekonstitution von CMV-CTLs (\square) das Auftreten von CMV-bedingten Komplikationen verhindern. Die CMV-Last wurde mit Hilfe von PCR (positiv: +; negativ: \times) oder als pp65-positive Events pro 400.000 Leukozyten bestimmt (\bullet).

kung²⁵. Am Beispiel dieser Patienten ist zu erkennen, dass unter bestimmten Umständen möglicherweise auf die Gabe antiviraler Medikamente verzichtet werden kann. Nun stellt sich aber die Frage, wie viele CMV-CTLs ein Patient benötigt, um einen Schutz vor einer CMV-Reaktivierung bzw. CMV bedingten Komplikationen zu haben? Basierend auf Messungen mit dem CMV-spezifischen Tetramer HLA-A*0201 wurde beschrieben, dass 10 CMV-CTLs/ μl einen Schutz vor einer CMV-Reaktivierung gewährleisten können^{120,122}. 2010 beschrieben Gratama *et al.* in einer prospektiven Studie mit fünf Tetrameren, dass

6. Diskussion

eine Rekonstitution von weniger als 7 CMV-CTLs/ μ l bis 65 Tage nach SZT mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von CMV-bedingten Komplikationen einhergeht¹²¹. In unserer Studie gab es deutliche Unterschiede zwischen den Medianen der bestimmten CMV-CTLs für die verschiedenen Tetramere. Allerdings zeigte sich, dass Patienten die zwischen Tag 50 und 75 nach SZT 1 CMV-CTL/ μ l regeneriert hatten, signifikant seltener reaktivierten als Patienten, die keine CMV-CTLs rekonstituierten ($p < 0,05$). Je höher wir den Schwellenwert der zu erreichenden CMV-CTL Menge setzten, desto schlechter wurde die Trennung zwischen Patienten mit und ohne Reaktivierung. Daher vermuten wir, dass der Nachweis von CMV-CTLs bereits Hinweise auf einen Schutz gibt. Findet trotzdem eine Reaktivierung statt, so muss es zu einer Proliferation der CMV-CTLs kommen, um weitere Komplikationen zu verhindern. Ein niedriger Schwellenwert von 3 CMV-CTL/ μ l zur Identifikation von Patienten, die CMV auch ohne Medikamente langfristig unter Kontrolle halten, wurde von Lilleri *et al.* vorgeschlagen¹²³. Allerdings wurden hier funktionale Assays zur CMV-CTL Bestimmung verwendet. Der Tetrameransatz hat demgegenüber den Vorteil, dass er schneller durchgeführt werden kann und somit auch bei größeren Patientengruppen anwendbar ist.

6.4.3. Dominanz von HLA-Merkmalen/ CMV-Epitopen

Im Hinblick auf die Dominanz einzelner HLA-Merkmale/ CMV-Epitope wurde gezeigt, dass HLA-B*0702 dominant über HLA-A*0201 ist¹²⁴. Dies konnten wir anhand unserer Auswertungen bestätigen. Außerdem konnten wir zeigen, dass HLA-B*0702 auch dominant über HLA-A*0101 ist und HLA-A*0101 eine dominante Antwort gegenüber HLA-A*0201 liefert. Ob es sich hierbei um eine Immundominanz bestimmter HLA-Merkmale über andere HLA-Merkmale handelt oder ob bestimmte CMV-Epitope dominant über andere Epitope sind, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Um festzustellen, ob es eine Epitopendominanz gibt, bräuchte man zwei Tetramere vom gleichen HLA-Typ, die verschiedene CMV-Epitope gebunden haben. Zur Überprüfung einer HLA-Dominanz könnte man einen Pool von Tetrameren verwenden, die alle das gleiche Peptid tragen, sich aber in den HLA-Merkmalen unterscheiden. Momentan gibt es mehrere Tetramere, die mit pp65-Peptiden beladen sind, allerdings sind die Sequenzen leicht unterschiedlich, wodurch die Auswertung möglicherweise beeinträchtigt würde.

Im Zuge unserer Dominanzauswertungen identifizierten wir auch zwölf Patienten mit 21 Änderungen in der Dominanz verschiedener Tetramere. Interessanterweise zeigte sich in 52% der Fälle ein Wechsel zu HLA-B*0801 (IE-1) als dominantes Merkmal. Bei HLA-B*0801 handelt es sich um das einzige von uns eingesetzte Tetramer, das mit einem Peptid des CMV-IE-1-Proteins beladen ist. Dieses Protein wird sehr früh während der viralen

Replikation gebildet, was einen Zusammenhang zwischen Reaktivierung und *Switch* zur IE-1 Antwort vermuten ließ. Allerdings konnten wir diese Vermutung in unserer kleinen Gruppe von zwölf Patienten nicht bestätigen.

6.4.4. Faktoren, welche die CMV-CTL Regeneration beeinflussen

Es ist beschrieben, dass die T-Zelldepletion von Stammzellpräparaten zu einer verlangsamten T-Zell-Rekonstitution und dem vermehrten Auftreten von Infektionen führen kann¹²⁵⁻¹²⁷. In unserer tri-zentischen Studie konnten wir zeigen, dass nur 20% der mit T-Zelldepletierten PBSC transplantierten Patienten an Tag 100 nach SZT CMV-CTLs gebildet hatten. Von den Patienten, die unmanipulierte Stammzellen erhielten, hatten zu diesem Zeitpunkt bereits 50% CMV-CTLs rekonstituiert. Das lässt vermuten, dass Patienten, die mit T-Zelldepletierten Präparaten transplantiert werden, von einer frühen adoptiven Immuntherapie mit CMV-CTLs profitieren könnten.

Ein weiterer Faktor, der die Rekonstitution von CMV-CTLs nach SZT beeinflusst, ist die Spender/Empfänger Serologie. So konnte ich deutlich zeigen, dass Patienten, die vor SZT CMV-positiv waren und von einem CMV-positiven Spender transplantiert wurden (R⁺D⁺ Untergruppe; n=98), die schnellste Rekonstitution von CMV-CTLs aufwiesen. Dies korreliert sehr gut mit den Ergebnissen von Borchers *et al.*, wodurch gezeigt werden konnte, dass Patienten der R⁺D⁺ Untergruppe an Tag 100 nach SZT fünffach höhere CMV-CTL Absolutwerte aufwiesen als Patienten der R⁻D⁺ und R⁺D⁻ Kohorten⁹⁸.

Zusammenfassend ist es entscheidend für eine erfolgreiche Immunantwort gegen CMV, dass der Patient nach SZT CMV-CTLs entwickelt und diese in ihrer Anzahl bei einer CMV-Reaktivierung ansteigen.

In der präemptiven Therapiesteuerung wird zur Erkennung einer CMV-Reaktivierung oder *de novo* CMV-Infektion hauptsächlich die Messung der CMV-DNA-Last eingesetzt. Durch die Kombination von Tetramertechnologie, Messung der CMV-DNA-Last und Funktionsassays könnte diese Strategie aber evtl. optimiert werden. Abbildung 6.4 zeigt einen Vorschlag, wie man die Tetramertechnologie mit CMV-PCR und Funktionsassays kombinieren könnte.

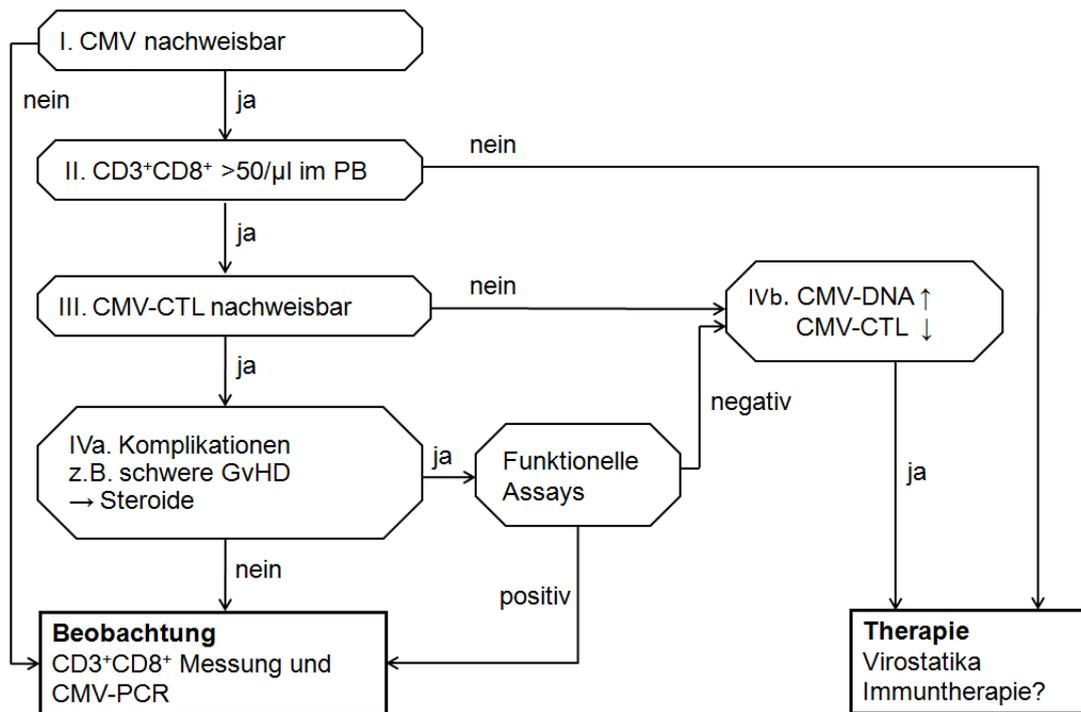


Abbildung 6.4.: **Quantitative Bestimmung von CMV-CTLs zur Therapiesteuerung.** Durch die Kombination von Tetramertechnologie, Messung der CMV-DNA-Last und Funktionsassays könnte die präemptive CMV-Therapiesteuerung evtl. optimiert werden.

6.5. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT

Bislang gibt es sehr wenig Daten über die Immunrekonstitution von Tregs nach SZT. Aus diesem Grund haben wir in einer Longitudinalanalyse die Treg-Absolut- und Treg-Prozentwerte von 16 Patienten in 239 Messungen durchflusszytometrisch ermittelt. Im Anschluß haben wir diese Daten im Hinblick auf Unterschiede in der Treg-Entwicklung von Patienten mit und ohne GvHD und Rezidivpatienten ausgewertet.

6.5.1. Durchflusszytometrische Bestimmung von Tregs

Tregs können über ihre Oberflächenexpression als $CD25^{bright}$ bzw. $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Zellen detektiert oder durch die intrazelluläre Färbung mit FoxP3 bestimmt werden. Die Vergleichbarkeit dieser drei Strategien wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Studien analysiert^{47,48}. Liu *et al.* erzielten mit 7-8% der T-Helferzellen die höchsten Treg-Werte durch die Oberflächenfärbung mit CD25 und CD127⁴⁸. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit unseren Messungen bei gesunden Individuen und Patienten ohne GvHD (ab 6 Monate nach SZT) und leichter GvHD (ab 9 Monate nach SZT) überein. Hartigan-O'Connor *et al.* erzielten mit 5-12% der T-Helferzellen ebenfalls die höchsten Treg-Werte mit dem $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Verfahren. Im Vergleich hierzu waren die Ergebnisse für $CD25^{bright}$ Tregs um das Zwei- bis Dreifache geringer⁴⁷. Auch wir haben mit dem $CD25^{bright}$ Verfahren etwas niedrigere Treg-Werte erzielt als mit dem $CD25^+CD127^{neg/dim}$ Ansatz. Eine mögliche Erklärung für diese Disprepanz könnte eine Überlappung zwischen aktivierten $CD25^+$ T-Zellen und $CD25^{bright}$ Tregs sein. Durch die zusätzliche Verwendung von CD127 kann evtl. eine bessere Trennung von aktivierten T-Zellen und Tregs erzielt werden^{47,48}. Bei unseren zehn gesunden Spendern erleichterte uns der Einsatz von CD127 die Treg-Auswertung. Bei den 16 Patienten zeigte sich allerdings innerhalb der ersten Monate nach SZT eine Reduktion der CD127-Expression auf allen T-Zellen. Aus diesem Grund bringt der Einsatz von CD127 zur Treg-Bestimmung erst einige Monate nach SZT einen Benefit. Eine Runterregulation von CD127 (α Kette des IL-7 Rezeptors) auf Naiven T-Zellen bei 7/10 Patienten nach SZT wurde bereits von Poulin *et al.* beschrieben¹²⁸. Wir vermuten, dass diese Runterregulation von CD127 mit dem Zytokinmilieu nach SZT zusammenhängt. Bolotin *et al.* beobachteten hohe IL-7 Levels in Patienten nach einer Knochenmarkstransplantation¹²⁹. Diese hohen IL-7 Konzentrationen können für eine Runterregulation von CD127 (α Kette des IL-7 Rezeptors) verantwortlich sein. T-Zellen, die durch die Bindung von IL-7 bereits ein Signal erhalten haben, sind in der Lage, die Expression von CD127 zu reduzieren. Das verbleibende IL-7 wird hierdurch den T-Zellen

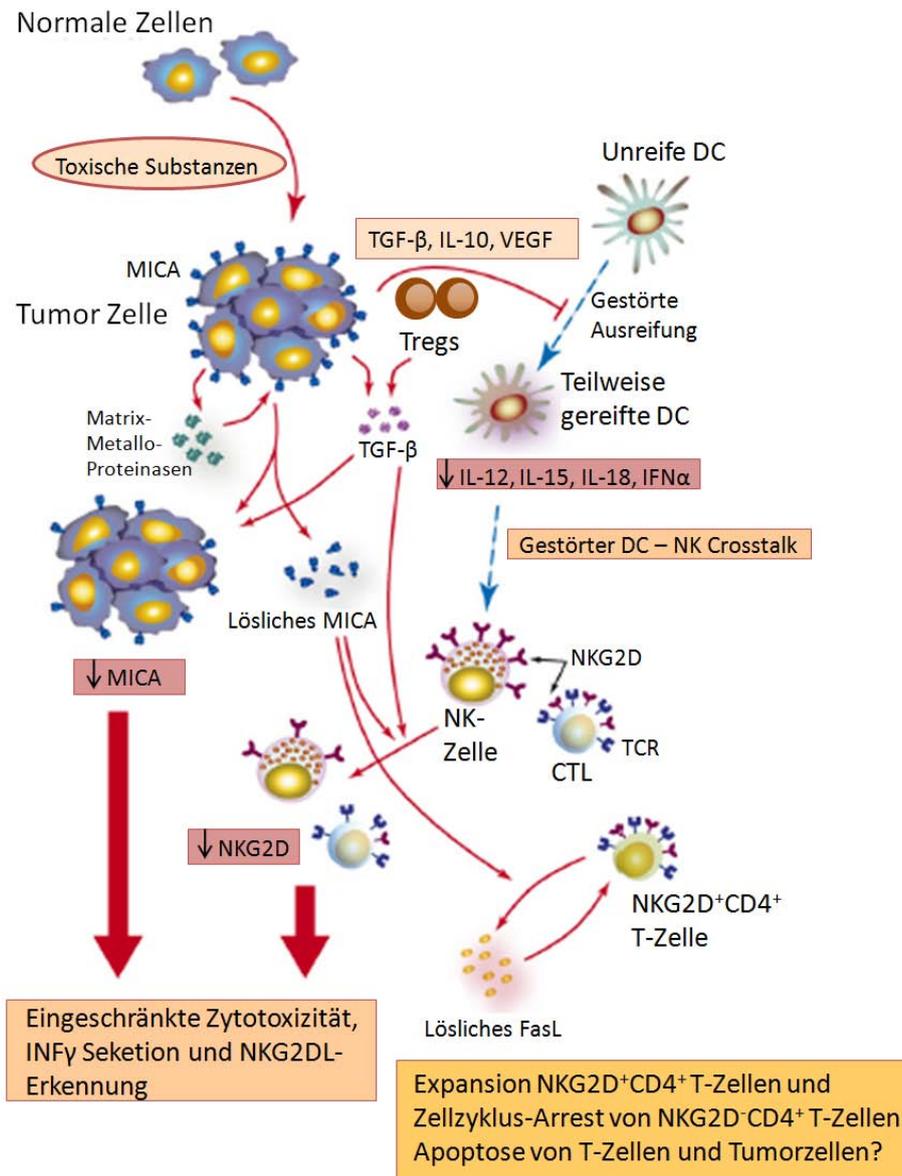
zur Verfügung gestellt, die noch kein Überlebenssignal erhalten haben^{130,131}. Nach SZT existieren wenig T-Zellen und hohe IL-7 Levels. Somit könnten alle T-Zellen ein Signal erhalten und die IL-7 Expression reduzieren.

6.5.2. Faktoren, die Einfluss auf die Rekonstitution von Tregs nehmen

In der Literatur ist beschrieben, dass Tregs eine GvHD unterdrücken können^{31,45,100}. Keine dieser Studien hat aber bisher Treg-Absolut- und Treg-Prozentwerte als Untergruppe der T-Helferzellen bei GvHD Patienten betrachtet. Bei unserer Auswertung der Absolutwerte zeigte sich, dass Patienten mit GvHD Grad II-IV im Vergleich zu Patienten ohne GvHD eine verlangsamte Immunrekonstitution von Tregs zeigten ($p < 0,05$). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Zhai *et al.*. Sie konnten zeigen, dass Patienten mit geringen Treg-Absolutwerten häufiger eine GvHD Grad II-IV entwickelten¹³². Li *et al.* werteten bei Patienten nach SZT Treg-Prozente als Untergruppe der T-Helferzellen aus. Sie zeigten, dass Patienten mit einer schweren akuten GvHD Grad II-IV oder einer chronischen GvHD niedrigere prozentuale Treg-Werte aufwiesen als gesunde Individuen¹³³. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu unseren Auswertungen, da wir erhöhte Treg-Prozente bei Patienten mit GvHD Grad II-IV nachweisen konnten. Möglicherweise hängt dieses veränderte Treg/CD3⁺CD4⁺ Verhältnis mit der extensiven Behandlung der GvHD Patienten z.B. mit immunsuppressiver Therapie zusammen (vgl. Coenen *et al.*¹³⁴ und Lim *et al.*¹³⁵). Erhöhte Treg-Prozente könnten eine Reaktion des Immunsystems zur GvHD-Bekämpfung anzeigen. Solange aber die Absolutzahlen der Tregs gering sind, kann leider in der Regel keine Besserung der GvHD erreicht werden.

Neben den positiven Effekten von Tregs nach SZT (z.B. GvHD Linderung und Transplantattoleranz) spielen Tregs auch eine Rolle in *Tumor-Escape-Mechanismen*. Hierbei wird die Antwort des Immunsystems gegen den Tumor unterdrückt^{55,56,136}. Wolf *et al.* konnten erhöhte Treg-Absolutwerte bei Patienten mit Tumorprogression nachweisen³⁰. Brinkrolf *et al.* zeigten erhöhte Treg-Prozentwerte bei Ewing Sarkom Patienten mit Metastasierung im Vergleich zu Patienten mit lokal begrenzten Tumoren⁵⁶. Patienten in unserer Kohorte die ein Rezidiv nach SZT entwickelten, zeigten ebenfalls sehr hohe Treg-Prozentwerte. Ein Mechanismus in dem Tumorzellen der Immunantwort von NK-Zellen ausweichen, wurde von Zwirner *et al.* beschrieben. Tumorzellen bilden hierzu lösliches MICA, welches die für die Tumorzelllyse notwendigen Rezeptoren auf NK-Zellen blockiert. Einen wichtigen Aspekt spielt hierbei auch die Zytokinproduktion durch Tregs (Abb. 6.5).

6.5. Rekonstitution regulatorischer T-Zellen (Tregs) nach allogener SZT



Entnommen aus: Zwirner *et al.*, Cytokine and Growth Factor Reviews, Feb.-Apr. 2007.

Abbildung 6.5.: Tumor Escape-Mechanismus. Der Tumor schüttet lösliches MICA aus, welches von NK-Zellen gebunden wird und diese daran hindert, Tumorzellen anzugreifen. Außerdem behindert der Tumor durch die Sekretion von Zytokinen die Ausreifung von DCs. Dadurch kann nur eine eingeschränkte Interaktion (*Crosstalk*) zwischen NK-Zellen und DCs stattfinden. Tregs stellen TGFβ zur Verfügung. Des Weiteren wird durch die Ausschüttung von löslichem FasL die Expansion von $NKG2D^+CD4^+$ T-Zellen gefördert, welche immunsuppressive Eigenschaften besitzen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Immunrekonstitution von Tregs nach SZT eine wichtige Rolle im Bezug auf die GvHD-Entwicklung spielt, aber sich evtl. auch negativ auf den GvT/GvL-Effekt auswirken kann.

7. Ausblick

Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die schnelle Regeneration der Immunität nach SZT ein entscheidender prognostischer Faktor im Hinblick auf das Überleben des Patienten ist. Allerdings wurden die meisten dieser Analysen nur an sehr kleinen Patientengruppen durchgeführt. Weitere Studien müssen deshalb in einer deutlich größeren Patientenkohorte die Güte der Konzepte zeigen.

Um Immunrekonstitutionsstudien an großen Patientengruppen zeitnah durchführen zu können, haben wir uns bereits mit anderen Transplantationszentren vernetzt. Dazu zählen die Universitäts-Kinderkliniken Ulm und Würzburg sowie das „Leiden University Medical Center“ in den Niederlanden. Wir haben einige Daten der einzelnen Zentren bereits zusammengeführt und folgende Konzepte zur Auswertung der gemeinsamen Daten festgelegt:

1. Überprüfung des im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten multivariaten Modells anhand der größeren Patientengruppe.
2. Erweiterung der univariaten Modelle. Hierbei möchten wir den Einfluss der Transplantataufreinigung auf die Immunrekonstitution bei Patienten mit ALL und AML untersuchen. Einen Schwerpunkt soll hierbei der Vergleich zwischen den Transplantatquellen PBSC mit CD34-Selektion und PBSC mit CD3/19-Depletion darstellen.
3. Integration weiterer Faktoren in die Modellierung wie z.B. die Trennung zwischen immunregulatorischen und zytotoxischen NK-Zellen und die Unterscheidung zwischen Naiven-, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen sowie Tregs.
4. Verwendung alternativer Machine-Learning-Algorithmen zur Generierung neuer Modelle wie z.B. „Cox Proportional-Hazards Regression“ und „Lineare Diskriminanzanalyse (LDA)“. Die Cox Proportional-Hazards Regression kann zum Vergleich der Effekte verschiedener Einflussfaktoren auf die Überlebenszeit eingesetzt werden¹³⁷. Durch die LDA wird bei der Dimensionsreduktion die Kombination der einzelnen Faktoren so gewählt, dass die Unterscheidbarkeit der Klassen maximiert wird^{138,139}.
5. Unser Fernziel ist es, basierend auf Immunrekonstitutionsdaten Langzeitüberlebender ein multivariates Modell zu entwickeln, welches zur Klassifikation der Rekonstitution von Patienten nach SZT eingesetzt werden kann.

8. Literaturverzeichnis

- [1] M. Koenig, S. Huenecke, E. Salzmänn-Mannrique, R. Esser, R. Quaritsch, D. Steinhilber, H. H. Radeke, H. Martin, P. Bader, T. Klingebiel, D. Schwabe, G. Schneider, T. Lehrnbecher, A. Orth, and U. Koehl, “Multivariate analyses of immune reconstitution in children after allo-sct: risk-estimation based on age-matched leukocyte sub-populations.,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 45, pp. 613–621, Apr 2010.
- [2] J. Larsson and S. Karlsson, “The role of smad signaling in hematopoiesis.,” *Oncogene*, vol. 24, pp. 5676–5692, Aug 2005.
- [3] E. Ladi, X. Yin, T. Chtanova, and E. A. Robey, “Thymic microenvironments for t cell differentiation and selection.,” *Nat Immunol*, vol. 7, pp. 338–343, Apr 2006.
- [4] Y. Takahama, “Journey through the thymus: stromal guides for t-cell development and selection.,” *Nat Rev Immunol*, vol. 6, pp. 127–135, Feb 2006.
- [5] G. Anderson, P. J. L. Lane, and E. J. Jenkinson, “Generating intrathymic microenvironments to establish t-cell tolerance.,” *Nat Rev Immunol*, vol. 7, pp. 954–963, Dec 2007.
- [6] A. Pezzutto, T. Ulrichs, and G.-R. Burmester, *Taschenatlas der Immunologie, Grundlagen - Labor - Klinik, 2. Aufl., vollst. überarbeitete Auflage (Unter Mitarbeit von A. Aicher)*. Thieme Verlag, 2006.
- [7] L. Lefrançois and A. L. Marzo, “The descent of memory t-cell subsets.,” *Nat Rev Immunol*, vol. 6, pp. 618–623, Aug 2006.
- [8] D. Gray, “A role for antigen in the maintenance of immunological memory.,” *Nat Rev Immunol*, vol. 2, pp. 60–65, Jan 2002.
- [9] I.-A. Beckmann, “Die blauen Ratgeber: Krebs im Kindesalter.” Deutsche Krebshilfe, Buschstraße 32, 53113 Bonn, 05 2009.
- [10] H. Leischner, *Onkologie*. Elsevier GmbH, 2007.
- [11] J. Neumann, *Immunbiologie - Eine Einführung*. Springer, 2008.
- [12] R. A. Nash and R. Storb, “Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Gvhd and gvl.,” *Curr Opin Immunol*, vol. 8, pp. 674–680, Oct 1996.
- [13] Marlies Michel, *Basics Hämatologie*. Elsevier GmbH, München, 2005.
- [14] G. A. Holländer, *Immunologie Grundlagen für Klinik und Praxis*. Elsevier GmbH, 2006.
- [15] DKMS, “<http://www.dkms.de>.”

8. Literaturverzeichnis

- [16] W. A. Bethge, C. Faul, M. Bornhäuser, G. Stuhler, D. W. Beelen, P. Lang, M. Stelljes, W. Vogel, M. Hägele, R. Handgretinger, and L. Kanz, “Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using cd3/cd19 depletion and reduced intensity conditioning: an update.,” *Blood Cells Mol Dis*, vol. 40, no. 1, pp. 13–19, 2008.
- [17] P. Lang and R. Handgretinger, “Haploidentical sct in children: an update and future perspectives.,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 42 Suppl 2, pp. S54–S59, Oct 2008.
- [18] C. A. Dykewicz, C. for Disease Control, P. (U.S.), I. D. S. of America, A. S. of Blood, and M. Transplantation, “Summary of the guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients.,” *Clin Infect Dis*, vol. 33, pp. 139–144, Jul 2001.
- [19] C. Hulo, E. de Castro, P. Masson, L. Bougueleret, A. Bairoch, I. Xenarios, and P. L. Mercier, “Viralzone: a knowledge resource to understand virus diversity.,” *Nucleic Acids Res*, vol. 39, pp. D576–D582, Jan 2011.
- [20] Susanne Modrow, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl, *Molekulare Virologie, 3. Auflage*. Springer, 2010.
- [21] www.Expasy.org, “www.expasy.org.”
- [22] H. A. Torres, E. Aguilera, A. Safdar, N. Rohatgi, I. I. Raad, C. Sepulveda, M. Luna, D. P. Kontoyiannis, and R. F. Chemaly, “Fatal cytomegalovirus pneumonia in patients with haematological malignancies: an autopsy-based case-control study.,” *Clin Microbiol Infect*, vol. 14, pp. 1160–1166, Dec 2008.
- [23] P. Ljungman, P. Griffiths, and C. Paya, “Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients.,” *Clin Infect Dis*, vol. 34, pp. 1094–1097, Apr 2002.
- [24] H. A. Olkinuora, M. H. Taskinen, U. M. Saarinen-Pihkala, and K. K. Vettenranta, “Multiple viral infections post-hematopoietic stem cell transplantation are linked to the appearance of chronic gvhd among pediatric recipients of allogeneic grafts.,” *Pediatr Transplant*, vol. 14, pp. 242–248, Mar 2010.
- [25] M. Battiwalla, Y. Wu, R. P. S. Bajwa, M. Radovic, N. G. Almyroudis, B. H. Segal, P. K. Wallace, R. Nakamura, S. Padmanabhan, T. Hahn, and P. L. McCarthy, “Ganciclovir inhibits lymphocyte proliferation by impairing dna synthesis.,” *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 13, pp. 765–770, Jul 2007.
- [26] J. L. M. Ferrara, J. E. Levine, P. Reddy, and E. Holler, “Graft-versus-host disease.,” *Lancet*, vol. 373, pp. 1550–1561, May 2009.
- [27] H. J. Deeg and R. Storb, “Graft-versus-host disease: pathophysiological and clinical aspects.,” *Annu Rev Med*, vol. 35, pp. 11–24, 1984.
- [28] L. M. Ball, R. M. Egeler, and E. B. M. T. P. W. Party, “Acute gvhd: pathogenesis and classification.,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 41 Suppl 2, pp. S58–S64, Jun 2008.

- [29] J. Bolaños-Meade and G. B. Vogelsang, "Acute graft-versus-host disease.," *Clin Adv Hematol Oncol*, vol. 2, pp. 672–682, Oct 2004.
- [30] A. M. Wolf, D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein, "Increase of regulatory t cells in the peripheral blood of cancer patients.," *Clin Cancer Res*, vol. 9, pp. 606–612, Feb 2003.
- [31] J. Ermann, P. Hoffmann, M. Edinger, S. Dutt, F. G. Blankenberg, J. P. Higgins, R. S. Negrin, C. G. Fathman, and S. Strober, "Only the cd62l+ subpopulation of cd4+cd25+ regulatory t cells protects from lethal acute gvhd.," *Blood*, vol. 105, pp. 2220–2226, Mar 2005.
- [32] M. Bleakley and S. R. Riddell, "Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect.," *Nat Rev Cancer*, vol. 4, pp. 371–380, May 2004.
- [33] A. Velardi, L. Ruggeri, Alessandro, Moretta, and L. Moretta, "Nk cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation.," *Trends Immunol*, vol. 23, pp. 438–444, Sep 2002.
- [34] U. Koehl, K. Bochennek, S. Y. Zimmermann, T. Lehrnbecher, J. Sörensen, R. Esser, C. Andreas, C. Kramm, H. P. Grüttner, E. Falkenberg, A. Orth, P. Bader, D. Schwabe, and T. Klingebiel, "Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute cd8+ cd3+ count reconstitution is associated with survival.," *Bone Marrow Transplant*, vol. 39, pp. 269–278, Mar 2007.
- [35] K. Kalwak, E. Gorczynska, J. Toporski, D. Turkiewicz, M. Slociak, M. Ussowicz, E. Latos-Grazynska, M. Król, J. Boguslawska-Jaworska, and A. Chybicka, "Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery.," *Br J Haematol*, vol. 118, pp. 74–89, Jul 2002.
- [36] L. M. Ball, A. C. Lankester, R. G. M. Bredius, W. E. Fibbe, M. J. D. van Tol, and R. M. Egeler, "Graft dysfunction and delayed immune reconstitution following haploidentical peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation.," *Bone Marrow Transplant*, vol. 35 Suppl 1, pp. S35–S38, Mar 2005.
- [37] H. Kook, F. Goldman, D. Padley, R. Giller, S. Rumelhart, M. Holida, N. Lee, C. Peters, M. Comito, D. Huling, and M. Trigg, "Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched t-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery.," *Blood*, vol. 88, pp. 1089–1097, Aug 1996.
- [38] E. Klyuchnikov, S. Asenova, W. Kern, G. Kilinc, F. Ayuk, B. Wiedemann, M. Lioznov, P. Freiburger, Y. Zalyalov, A. R. Zander, N. Kröger, and U. Bacher, "Post-transplant immune reconstitution after unrelated allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia.," *Leuk Lymphoma*, vol. 51, pp. 1450–1463, Aug 2010.

8. Literaturverzeichnis

- [39] J. Storek, M. A. Dawson, B. Storer, T. Stevens-Ayers, D. G. Maloney, K. A. Marr, R. P. Witherspoon, W. Bensinger, M. E. Flowers, P. Martin, R. Storb, F. R. Appelbaum, and M. Boeckh, "Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation.," *Blood*, vol. 97, pp. 3380–3389, Jun 2001.
- [40] J. Storek, T. Gooley, R. P. Witherspoon, K. M. Sullivan, and R. Storb, "Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low cd4 t cell counts.," *Am J Hematol*, vol. 54, pp. 131–138, Feb 1997.
- [41] H. E. Lynch, G. L. Goldberg, A. Chidgey, M. R. M. V. den Brink, R. Boyd, and G. D. Sempowski, "Thymic involution and immune reconstitution.," *Trends Immunol*, vol. 30, pp. 366–373, Jul 2009.
- [42] R. Parkman and K. I. Weinberg, "Immunological reconstitution following bone marrow transplantation.," *Immunol Rev*, vol. 157, pp. 73–78, Jun 1997.
- [43] K. A. Hogquist, T. A. Baldwin, and S. C. Jameson, "Central tolerance: learning self-control in the thymus.," *Nat Rev Immunol*, vol. 5, pp. 772–782, Oct 2005.
- [44] G. Zhou and H. I. Levitsky, "Natural regulatory t cells and de novo-induced regulatory t cells contribute independently to tumor-specific tolerance.," *J Immunol*, vol. 178, pp. 2155–2162, Feb 2007.
- [45] M. Miyara and S. Sakaguchi, "Natural regulatory t cells: mechanisms of suppression.," *Trends Mol Med*, vol. 13, pp. 108–116, Mar 2007.
- [46] Y. M. Wang and S. I. Alexander, "Cd8 regulatory t cells: what's old is now new.," *Immunol Cell Biol*, vol. 87, no. 3, pp. 192–193, 2009.
- [47] D. J. Hartigan-O'Connor, C. Poon, E. Sinclair, and J. M. McCune, "Human cd4+ regulatory t cells express lower levels of the il-7 receptor alpha chain (cd127), allowing consistent identification and sorting of live cells.," *J Immunol Methods*, vol. 319, pp. 41–52, Jan 2007.
- [48] W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. F. de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, and J. A. Bluestone, "Cd127 expression inversely correlates with foxp3 and suppressive function of human cd4+ t reg cells.," *J Exp Med*, vol. 203, pp. 1701–1711, Jul 2006.
- [49] N. Seddiki, B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. F. de St Groth, "Expression of interleukin (il)-2 and il-7 receptors discriminates between human regulatory and activated t cells.," *J Exp Med*, vol. 203, pp. 1693–1700, Jul 2006.
- [50] L. Strauss, C. Bergmann, and T. L. Whiteside, "Human circulating cd4+cd25highfoxp3+ regulatory t cells kill autologous cd8+ but not cd4+

- responder cells by fas-mediated apoptosis.," *J Immunol*, vol. 182, pp. 1469–1480, Feb 2009.
- [51] S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler, "Foxp3+ regulatory t cells in the human immune system.," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, pp. 490–500, Jul 2010.
- [52] M. G. Roncarolo, S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings, "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory t cells in rodents and humans.," *Immunol Rev*, vol. 212, pp. 28–50, Aug 2006.
- [53] E. Bardel, F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Herminé, and O. Devergne, "Human cd4+ cd25+ foxp3+ regulatory t cells do not constitutively express il-35.," *J Immunol*, vol. 181, pp. 6898–6905, Nov 2008.
- [54] L. Codarri, L. Vallotton, D. Ciuffreda, J.-P. Venetz, M. Garcia, K. Hadaya, L. Bühler, S. Rotman, M. Pascual, and G. Pantaleo, "Expansion and tissue infiltration of an allospecific cd4+cd25+cd45ro+il-7ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients.," *J Exp Med*, vol. 204, pp. 1533–1541, Jul 2007.
- [55] M. Beyer and J. L. Schultze, "Regulatory t cells in cancer.," *Blood*, vol. 108, pp. 804–811, Aug 2006.
- [56] P. Brinkrolf, S. Landmeier, B. Altvater, C. Chen, S. Pscherer, A. Rosemann, A. Ranft, U. Dirksen, H. Juergens, and C. Rossig, "A high proportion of bone marrow t cells with regulatory phenotype (cd4+cd25hifoxp3+) in ewing sarcoma patients is associated with metastatic disease.," *Int J Cancer*, vol. 125, pp. 879–886, Aug 2009.
- [57] D. R. Green and T. A. Ferguson, "The role of fas ligand in immune privilege.," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 2, pp. 917–924, Dec 2001.
- [58] J. A. Trapani and M. J. Smyth, "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.," *Nat Rev Immunol*, vol. 2, pp. 735–747, Oct 2002.
- [59] J. E. Radford, E. Chen, R. Hromas, and G. D. Ginder, "Cell-type specificity of interferon-gamma-mediated hla class i gene transcription in human hematopoietic tumor cells.," *Blood*, vol. 77, pp. 2008–2015, May 1991.
- [60] S. M. Kaech, E. J. Wherry, and R. Ahmed, "Effector and memory t-cell differentiation: implications for vaccine development.," *Nat Rev Immunol*, vol. 2, pp. 251–262, Apr 2002.
- [61] S. K. Pierce, "Lipid rafts and b-cell activation.," *Nat Rev Immunol*, vol. 2, pp. 96–105, Feb 2002.
- [62] V. Kumar and M. E. McNerney, "A new self: Mhc-class-i-independent natural-killer-cell self-tolerance.," *Nat Rev Immunol*, vol. 5, pp. 363–374, May 2005.

8. Literaturverzeichnis

- [63] S. S. Farag, T. A. Fehniger, L. Ruggeri, A. Velardi, and M. A. Caligiuri, "Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.," *Blood*, vol. 100, pp. 1935–1947, Sep 2002.
- [64] L. Vago, B. Forno, M. P. Sormani, R. Crocchiolo, E. Zino, S. D. Terlizzi, M. T. L. Stanghellini, B. Mazzi, S. K. Perna, A. Bondanza, D. Middleton, A. Palini, M. Bernardi, R. Bacchetta, J. Peccatori, S. Rossini, M. G. Roncarolo, C. Bordignon, C. Bonini, F. Ciceri, and K. Fleischhauer, "Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-kir-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation.," *Blood*, vol. 112, pp. 3488–3499, Oct 2008.
- [65] L. L. Lanier, "Activating and inhibitory nk cell receptors.," *Adv Exp Med Biol*, vol. 452, pp. 13–18, 1998.
- [66] H.-G. Ljunggren and K.-J. Malmberg, "Prospects for the use of nk cells in immunotherapy of human cancer.," *Nat Rev Immunol*, vol. 7, pp. 329–339, May 2007.
- [67] K. Kärre, "Natural killer cell recognition of missing self.," *Nat Immunol*, vol. 9, pp. 477–480, May 2008.
- [68] E. P. von Strandmann, V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen, A. Rothe, B. Böll, V. L. Simhadri, P. Borchmann, P. J. McKinnon, M. Hallek, and A. Engert, "Human leukocyte antigen-b-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the nkp30 receptor on natural killer cells.," *Immunity*, vol. 27, pp. 965–974, Dec 2007.
- [69] S. Huenecke, S. Y. Zimmermann, S. Kloess, R. Esser, A. Brinkmann, L. Tramsen, M. Koenig, S. Erben, C. Seidl, T. Tonn, A. Eggert, A. Schramm, P. Bader, T. Klingebiel, T. Lehrnbecher, J. R. Passweg, J. Soerensen, D. Schwabe, and U. Koehl, "Il-2-driven regulation of nk cell receptors with regard to the distribution of cd16+ and cd16- subpopulations and in vivo influence after haploidentical nk cell infusion.," *J Immunother*, vol. 33, no. 2, pp. 200–210, 2010.
- [70] U. Koehl, J. Sörensen, R. Esser, S. Zimmermann, H. P. Grüttner, T. Tonn, C. Seidl, E. Seifried, T. Klingebiel, and D. Schwabe, "Il-2 activated nk cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation.," *Blood Cells Mol Dis*, vol. 33, no. 3, pp. 261–266, 2004.
- [71] U. Koehl, R. Esser, S. Zimmermann, T. Tonn, R. Kotchetkov, T. Bartling, J. Sörensen, H.-P. Grüttner, P. Bader, E. Seifried, H. Martin, P. Lang, J. R. Passweg, T. Klingebiel, and D. Schwabe, "Ex vivo expansion of highly purified nk cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children.," *Klin Padiatr*, vol. 217, no. 6, pp. 345–350, 2005.
- [72] P. Bader, A. Willasch, and T. Klingebiel, "Monitoring of post-transplant remission of childhood malignancies: is there a standard?," *Bone Marrow Transplant*, vol. 42 Suppl 2, pp. S31–S34, Oct 2008.

- [73] P. Bader, D. Niethammer, A. Willasch, H. Kreyenberg, and T. Klingebiel, “How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 35, pp. 107–119, Jan 2005.
- [74] P. Bader, H. Kreyenberg, G. H. R. Henze, C. Eckert, M. Reising, A. Willasch, A. Barth, A. Borkhardt, C. Peters, R. Handgretinger, K.-W. Sykora, W. Holter, H. Kabisch, T. Klingebiel, A. von Stackelberg, and A. L. L.-R. E. Z. B. S. Group, “Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the all-rez bfm study group,” *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 377–384, Jan 2009.
- [75] L. Tramsen, O. Beck, F. R. Schuster, K.-P. Hunfeld, J.-P. Latgé, J. Sarfati, F. Röger, T. Klingebiel, U. Koehl, and T. Lehrnbecher, “Generation and characterization of anti-candida t cells as potential immunotherapy in patients with candida infection after allogeneic hematopoietic stem-cell transplant.,” *J Infect Dis*, vol. 196, pp. 485–492, Aug 2007.
- [76] L. Tramsen, U. Koehl, T. Tonn, J.-P. Latgé, F. R. Schuster, A. Borkhardt, L. Uharek, R. Quaritsch, O. Beck, E. Seifried, T. Klingebiel, and T. Lehrnbecher, “Clinical-scale generation of human anti-aspergillus t cells for adoptive immunotherapy.,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 43, pp. 13–19, Jan 2009.
- [77] M. Cobbold, N. Khan, B. Pourgheysari, S. Tauro, D. McDonald, H. Osman, M. Asenmacher, L. Billingham, C. Steward, C. Crawley, E. Olavarria, J. Goldman, R. Chakraverty, P. Mahendra, C. Craddock, and P. A. H. Moss, “Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific ctl to stem cell transplant patients after selection by hla-peptide tetramers.,” *J Exp Med*, vol. 202, pp. 379–386, Aug 2005.
- [78] H. Einsele, E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, J. Löffler, U. Grigoleit, A. Moris, H.-G. Rammensee, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank, G. Jahn, and H. Hebart, “Infusion of cytomegalovirus (cmv)-specific t cells for the treatment of cmv infection not responding to antiviral chemotherapy,” *Blood*, vol. 99, pp. 3916–3922, Jun 2002.
- [79] S. Huenecke, M. Behl, C. Fadler, S. Y. Zimmermann, K. Bochennek, L. Tramsen, R. Esser, D. Klarmann, M. Kamper, A. Sattler, D. von Laer, T. Klingebiel, T. Lehrnbecher, and U. Koehl, “Age-matched lymphocyte subpopulation reference values in childhood and adolescence: application of exponential regression analysis.,” *Eur J Haematol*, vol. 80, pp. 532–539, Jun 2008.
- [80] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, and D. Myrtek, *Der Experimentator Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [81] U. Sack, A. Tarnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger, 2006.
- [82] “Salk institute: <http://flowcyt.salk.edu/fluo.html>.”

8. Literaturverzeichnis

- [83] J. Yao, C. Bechter, M. Wiesneth, G. Härter, M. Götz, L. Germeroth, P. Guillaume, F. Hasan, S. von Harsdorf, T. Mertens, D. Michel, H. Döhner, D. Bunjes, M. Schmitt, and A. Schmitt, “Multimer staining of cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific t cells for diagnosis and therapeutic purposes: a comparative study.,” *Clin Infect Dis*, vol. 46, pp. e96–105, May 2008.
- [84] U. Koehl, E. Dirkwinkel, M. Koenig, S. Erben, J. Soerensen, P. Bader, H. W. Doerr, W. Preiser, E. Weissinger, T. Klingebiel, H. Martin, and T. Lehrnbecher, “Reconstitution of cytomegalovirus specific t cells after pediatric allogeneic stem cell transplantation: results from a pilot study using a multi-allele cmv tetramer group.,” *Klin Padiatr*, vol. 220, no. 6, pp. 348–352, 2008.
- [85] E. McLaughlin-Taylor, H. Pande, S. J. Forman, B. Tanamachi, C. R. Li, J. A. Zaia, P. D. Greenberg, and S. R. Riddell, “Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for cd8+ virus-specific cytotoxic t lymphocytes.,” *J Med Virol*, vol. 43, pp. 103–110, May 1994.
- [86] B. L. Strang, E. Sinigalia, L. A. Silva, D. M. Coen, and A. Loregian, “Analysis of the association of the human cytomegalovirus dna polymerase subunit ul44 with the viral dna replication factor ul84.,” *J Virol*, vol. 83, pp. 7581–7589, Aug 2009.
- [87] M. Hummel, Z. Zhang, S. Yan, I. DePlaen, P. Golia, T. Varghese, G. Thomas, and M. I. Abecassis, “Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency.,” *J Virol*, vol. 75, pp. 4814–4822, May 2001.
- [88] G. M. Fitzmaurice, Nan M. Laird, and James H. Ware, *Applied Longitudinal Analysis*. Wiley & Sons, 2004.
- [89] F. E. Harrell, *Regression Modeling Strategies with Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis*. Springer, 2001.
- [90] I. T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*. Springer, 2002.
- [91] C. Boehm, “Skript zur Vorlesung: Knowledge Discovery in Databases.” Winter Semester 2006/2007.
- [92] Pokropp, *Lineare Regression und Varianzanalyse*. Oldenbourg, 1994.
- [93] K. Pearson, “On lines and planes of closest fit to a system of points in space,” *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 6, pp. 559–572, 1901.
- [94] H. Hotelling, “Analysis of a complex of statistical variables into principal components,” *Journal of Educational Psychology*, vol. 24, pp. 498–520, 1933.
- [95] P. Geladi and B. R. Kowalski, “Partial least-squares regression: a tutorial,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 185, pp. 1–17, 1985.

- [96] W. M. Comans-Bitter, R. de Groot, R. van den Beemd, H. J. Neijens, W. C. Hop, K. Groeneveld, H. Hooijkaas, and J. J. van Dongen, "Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. reference values for lymphocyte subpopulations.," *J Pediatr*, vol. 130, pp. 388–393, Mar 1997.
- [97] T. Lehrnbecher, R. Schubert, M. Behl, M. Koenig, M. A. Rose, U. Koehl, R. Meisel, and H.-J. Laws, "Impaired pneumococcal immunity in children after treatment for acute lymphoblastic leukaemia.," *Br J Haematol*, vol. 147, pp. 700–705, Dec 2009.
- [98] S. Borchers, S. Luther, U. Lips, N. Hahn, J. Kontsendorn, M. Stadler, S. Buchholz, H. Diedrich, M. Eder, U. Koehl, A. Ganser, and E. M. Weissinger, "Tetramer monitoring to assess risk factors for recurrent cmv-reactivation and reconstitution of antiviral immunity post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.," *Transpl Infect Dis*, vol. epub ahead of print, 2010.
- [99] S. Borchers, M. Bremm, T. Lehrnbecher, E. Dammann, J. Schmidtke, B. Wölk, R. Esser, M. Yildiz, M. Eder, M. S. Michael, P. Bader, H. Martin, A. Jarisch, G. Schneider, T. Klingebiel, A. Ganser, E. Mischak-Weissinger*, and U. Koehl*, "Sequential monitoring of anti-cmv response with cmv-multimers may allow guidance of antiviral therapy in patients post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.," *Ha*, vol. in revision, 2011.
- [100] P. Hoffmann, R. Eder, L. A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, and M. Edinger, "Large-scale in vitro expansion of polyclonal human cd4(+)cd25high regulatory t cells.," *Blood*, vol. 104, pp. 895–903, Aug 2004.
- [101] N. K. Crellin, R. V. Garcia, and M. K. Levings, "Flow cytometry-based methods for studying signaling in human cd4+cd25+foxp3+ t regulatory cells.," *J Immunol Methods*, vol. 324, pp. 92–104, Jul 2007.
- [102] M. Terme, N. Chaput, B. Combadiere, A. Ma, T. Ohteki, and L. Zitvogel, "Regulatory t cells control dendritic cell/nk cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting cd4+ self-reactive t cells.," *J Immunol*, vol. 180, pp. 4679–4686, Apr 2008.
- [103] F. J. Clark, R. Gregg, K. Piper, D. Dunnion, L. Freeman, M. Griffiths, G. Begum, P. Mahendra, C. Craddock, P. Moss, and R. Chakraverty, "Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood cd4+cd25high regulatory t cells.," *Blood*, vol. 103, pp. 2410–2416, Mar 2004.
- [104] A. H. Banham, "Cell-surface il-7 receptor expression facilitates the purification of foxp3(+) regulatory t cells.," *Trends Immunol*, vol. 27, pp. 541–544, Dec 2006.
- [105] M. Edinger, P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober, and R. S. Negrin, "Cd4+cd25+ regulatory t cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.," *Nat Med*, vol. 9, pp. 1144–1150, Sep 2003.

8. Literaturverzeichnis

- [106] M. Bremm, S. Huenecke, T. Lehrnbecher, E. Ponstingl, R. Mueller, A. Heinze, G. Bug, A. Quaiser, M. Kapinsky, C. Brehm, P. Bader, G. Schneider, T. Klingebiel, and U. Koehl, “Advanced flowcytometric analysis of regulatory t cells: Cd127 downregulation early post stem cell transplantation and altered treg/cd3+cd4+-ratio in severe gvhd or relapse,” *J Immunol Methods*, vol. Epub ahead of print, 2011.
- [107] T. Klingebiel, R. Handgretinger, P. Lang, P. Bader, and D. Niethammer, “Haploidentical transplantation for acute lymphoblastic leukemia in childhood.,” *Blood Rev*, vol. 18, pp. 181–192, Sep 2004.
- [108] S. Kloess, S. Huenecke, D. Piechulek, R. Esser, J. Koch, C. Brehm, J. Soerensen, T. Gardlowski, A. Brinkmann, P. Bader, J. Passweg, T. Klingebiel, D. Schwabe, and U. Koehl, “Il-2-activated haploidentical nk cells restore nkg2d-mediated nk-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma mica.,” *Eur J Immunol*, vol. 40, pp. 3255–3267, Nov 2010.
- [109] H. R. Salih, S. Holdenrieder, and A. Steinle, “Soluble nkg2d ligands: prevalence, release, and functional impact.,” *Front Biosci*, vol. 13, pp. 3448–3456, 2008.
- [110] S. Kumar, M. G. Chen, D. A. Gastineau, M. A. Gertz, D. J. Inwards, M. Q. Lacy, A. Tefferi, and M. R. Litzow, “Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia.,” *Leukemia*, vol. 17, pp. 1865–1870, Sep 2003.
- [111] D. H. Kim, J. G. Kim, S. K. Sohn, W. J. Sung, J. S. Suh, K. S. Lee, and K. B. Lee, “Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation.,” *Br J Haematol*, vol. 125, pp. 217–224, Apr 2004.
- [112] D. H. Kim, S. K. Sohn, D. I. Won, N. Y. Lee, J. S. Suh, and K. B. Lee, “Rapid helper t-cell recovery above $200 \times 10^6/l$ at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation.,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 37, pp. 1119–1128, Jun 2006.
- [113] S. Afzal, M. K. Ishaqi, A. Dupuis, J. Doyle, and A. Gassas, “Early lymphocyte recovery after allogeneic hematopoietic sct is associated with significant gvl effect in pediatric all but not acute myelogenous leukemia-update study.,” *Bone Marrow Transplant*, vol. 44, pp. 799–804, Dec 2009.
- [114] I. Yakoub-Agha, P. Saule, L. Magro, P. Cracco, A. Duhamel, V. Coiteux, B. Bruno, F. Dufossé, J.-P. Jouet, J.-P. Dessaint, and M. Labalette, “Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding cd28negative cd8+ t cells on relapse.,” *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 15, pp. 496–504, Apr 2009.
- [115] D. Middleton, “<http://www.allelefreqencies.net/>.”
- [116] T. Widmann, U. Sester, B. C. Gärtner, J. Schubert, M. Pfreundschuh, H. Köhler, and M. Sester, “Levels of cmv specific cd4 t cells are dynamic and correlate with cmv viremia after allogeneic stem cell transplantation.,” *PLoS One*, vol. 3, no. 11, p. e3634, 2008.

- [117] R. Nakamura, M. Battiwalla, S. Solomon, D. Follmann, S. Chakrabarti, K. Cortez, N. Hensel, R. Childs, and A. J. Barrett, "Persisting posttransplantation cytomegalovirus antigenemia correlates with poor lymphocyte proliferation to cytomegalovirus antigen and predicts for increased late relapse and treatment failure.," *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 10, pp. 49–57, Jan 2004.
- [118] S. Giest, S. Grace, A. C. Senegaglia, R. Pasquini, R. M. Gonzalo-Daganzo, M. N. Fernández, S. Mackinnon, J. A. Madrigal, and P. J. Travers, "Cytomegalovirus-specific cd8(+) t cells targeting different hla/peptide combinations correlate with protection but at different threshold frequencies.," *Br J Haematol*, vol. 148, pp. 311–322, Jan 2010.
- [119] Y. Morita, M. Hosokawa, M. Ebisawa, T. Sugita, O. Miura, Y. Takaue, and Y. Heike, "Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic t-lymphocytes in patients with the hla-a*02 or hla-a*24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation.," *Bone Marrow Transplant*, vol. 36, pp. 803–811, Nov 2005.
- [120] J. W. Gratama, J. W. van Esser, C. H. Lamers, C. Tournay, B. Löwenberg, R. L. Bolhuis, and J. J. Cornelissen, "Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (cmv)-specific cd8+ t lymphocytes in t-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive cmv infection.," *Blood*, vol. 98, pp. 1358–1364, Sep 2001.
- [121] J. W. Gratama, M. Boeckh, R. Nakamura, J. J. Cornelissen, R. A. Brooimans, J. A. Zaia, S. J. Forman, K. Gaal, K. R. Bray, G. H. Gasior, C. S. Boyce, L. A. Sullivan, and P. C. Southwick, "Immune monitoring with itag mhc tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study.," *Blood*, vol. 116, pp. 1655–1662, Sep 2010.
- [122] G. Aubert, A. F. Hassan-Walker, J. A. Madrigal, V. C. Emery, C. Morte, S. Grace, M. B. Koh, M. Potter, H. G. Prentice, I. A. Dodi, and P. J. Travers, "Cytomegalovirus-specific cellular immune responses and viremia in recipients of allogeneic stem cell transplants.," *J Infect Dis*, vol. 184, pp. 955–963, Oct 2001.
- [123] D. Lilleri, C. Fornara, A. Chiesa, D. Caldera, E. P. Alessandrino, and G. Gerna, "Human cytomegalovirus-specific cd4+ and cd8+ t-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection.," *Haematologica*, vol. 93, pp. 248–256, Feb 2008.
- [124] S. F. Lacey, M. C. Villacres, C. L. Rosa, Z. Wang, J. Longmate, J. Martinez, J. C. Brewer, S. Mekhoubad, R. Maas, J. M. Leedom, S. J. Forman, J. A. Zaia, and D. J. Diamond, "Relative dominance of hla-b*07 restricted cd8+ t-lymphocyte immune responses to human cytomegalovirus pp65 in persons sharing hla-a*02 and hla-b*07 alleles.," *Hum Immunol*, vol. 64, pp. 440–452, Apr 2003.
- [125] R. Handgretinger, X. Chen, M. Pfeiffer, M. Schumm, I. Mueller, T. Feuchtinger, G. Hale, and P. Lang, "Cellular immune reconstitution after haploidentical trans-

8. Literaturverzeichnis

- plantation in children.," *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 14, pp. 59–65, Jan 2008.
- [126] J.-A. H. van Burik, S. L. Carter, A. G. Freifeld, K. P. High, K. T. Godder, G. A. Papanicolaou, A. M. Mendizabal, J. E. Wagner, S. Yanovich, and N. A. Kernan, "Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of t cell-depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with t cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease.," *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 13, pp. 1487–1498, Dec 2007.
- [127] M. Boeckh, W. G. Nichols, G. Papanicolaou, R. Rubin, J. R. Wingard, and J. Zaia, "Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies.," *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 9, pp. 543–558, Sep 2003.
- [128] J.-F. Poulin, M. Sylvestre, P. Champagne, M.-L. Dion, N. Kettaf, A. Dumont, M. Lainesse, P. Fontaine, D.-C. Roy, C. Perreault, R.-P. Sékaly, and R. Cheynier, "Evidence for adequate thymic function but impaired naive t-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease.," *Blood*, vol. 102, pp. 4600–4607, Dec 2003.
- [129] E. Bolotin, G. Annett, R. Parkman, and K. Weinberg, "Serum levels of il-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count.," *Bone Marrow Transplant*, vol. 23, pp. 783–788, Apr 1999.
- [130] R. Mazzucchelli and S. K. Durum, "Interleukin-7 receptor expression: intelligent design.," *Nat Rev Immunol*, vol. 7, pp. 144–154, Feb 2007.
- [131] J.-H. Park, Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer, "Suppression of il7 α transcription by il-7 and other pro-survival cytokines: a novel mechanism for maximizing il-7-dependent t cell survival.," *Immunity*, vol. 21, pp. 289–302, Aug 2004.
- [132] Z. Zhai, Z. Sun, Q. Li, A. Zhang, H. Liu, J. Xu, X. Xu, L. Geng, D. Harris, S. Hu, and Y. Wang, "Correlation of the cd4+cd25^{high} t-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute gvhd.," *Transpl Int*, vol. 20, pp. 440–446, May 2007.
- [133] Q. Li, Z. Zhai, X. Xu, Y. Shen, A. Zhang, Z. Sun, H. Liu, L. Geng, and Y. Wang, "Decrease of cd4(+)^{cd25(+)} regulatory t cells and tgf-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation.," *Leuk Res*, vol. 34, pp. 1158–1168, Sep 2010.
- [134] J. J. A. Coenen, H. J. P. M. Koenen, E. van Rijssen, A. Kasran, L. Boon, L. B. Hilbrands, and I. Joosten, "Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of cd4+ cd25+ foxp3+ t cells.," *Bone Marrow Transplant*, vol. 39, pp. 537–545, May 2007.

- [135] D.-G. Lim, S.-K. Koo, Y.-H. Park, Y. Kim, H.-M. Kim, C.-S. Park, S.-C. Kim, and D.-J. Han, “Impact of immunosuppressants on the therapeutic efficacy of in vitro-expanded cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells in allotransplantation.,” *Transplantation*, vol. 89, pp. 928–936, Apr 2010.
- [136] N. W. Zwirner, M. B. Fuertes, M. V. Girart, C. I. Domaica, and L. E. Rossi, “Cytokine-driven regulation of nk cell functions in tumor immunity: role of the mica-nkg2d system.,” *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 18, no. 1-2, pp. 159–170, 2007.
- [137] R. Bender, T. Augustin, and M. Blettner, “Generating survival times to simulate cox proportional hazards models.,” *Stat Med*, vol. 24, pp. 1713–1723, Jun 2005.
- [138] W. Highleyman, “Linear decision functions, with application to pattern recognition.,” *Proceedings of the IRE*, vol. 50, no. 6, pp. 1501–1514, 2007.
- [139] R. Duda, P. Hart, and D. Stork, *Pattern classification*, vol. 2. Citeseer, 2001.

9. Abbildungsverzeichnis

2.1. Hämatopoese.	12
2.2. Allogene Stammzelltransplantation.	14
2.3. Infektionen nach SZT.	17
2.4. Schematische Darstellung eines Herpesvirus.	18
2.5. Entwicklung einer GvHD.	20
2.6. Auftreten von GvT/GvL-Effekt nach SZT und Risiko für GvHD, Abstoßung und Rezidiv im Bezug auf HLA-Matching.	21
2.7. Immunrekonstitution.	22
2.8. T-Zellrezeptor (TCR).	24
2.9. Entwicklung von T-Zellen.	25
2.10. Mechanismen der Zielzellyse.	27
2.11. NK-Zellen: Missing Self Hypothese.	30
2.12. Monitoring der Immunrekonstitution.	31
4.1. Prinzip der durchflusszytometrischen Messung.	44
4.2. Emissionsspektren.	46
4.3. Immunstatus 1: Bestimmung von T-Zellen und Monozyten.	49
4.4. Immunstatus 2: Bestimmung von NK- und B-Zellen.	50
4.5. Gating Strategie für regulatorische T-Zellen (Tregs).	51
4.6. Gating-Strategie: Messung von Tregs und Treg-Untergruppen mit Hilfe von 10-Farb-Durchflusszytometrie.	53
4.7. Bestimmung von Tregs.	54
4.8. Tetramertechnologie.	55
4.9. Absolutzellzahlbestimmung.	59
4.10. Bestimmung von CMV-CTLs via Tetramertechnologie.	59
4.11. Lineare Regression.	61
4.12. Beispiel: Dimensionsreduktion durch PCA.	63
5.1. <i>Screenshots</i> der Datenbank Benutzeroberfläche zur Immunrekonstitutionsstudie.	65
5.2. Entity-Relationship-Diagramm der Immunrekonstitutions-Datenbank.	66
5.3. Entity-Relationship-Diagramm der CMV-CTL Datenbank.	67
5.4. <i>Screenshots</i> der CMV-Datenbank Benutzeroberfläche.	68
5.5. Multivariate Modellierung - Transformation der $CD3^+CD4^+$ Werte.	70
5.6. Multivariate Modellierung - Modellgenerierung.	71
5.7. Multivariate Modellierung: Beispielverläufe.	72
5.8. Multivariate Auswertung zur Klassifikation an Tag 200 und 300 nach SZT.	73
5.9. Messung von CMV-CTL Absolutwerten mit verschiedenen Tetrameren.	76
5.10. Tetramerspezifische CMV-CTL Rekonstitution.	77
5.11. Einfluss einer CMV-Reaktivierung auf das Überleben nach SZT.	78
5.12. CMV-CTL Rekonstitution bei Patienten mit und ohne CMV-Reaktivierung.	79

5.13. Immunrekonstitution von CMV-CTLs (Unmanipuliertes vs. T-Zelldepletiertes Stammzellpräparat).	81
5.14. Endpunkte der Tetramer- <i>Switches</i>	82
5.15. Immunantwort gegen Epitope von CMV-Source Proteinen.	82
5.16. Beispiel: Patient mit <i>Switch</i> zu HLA-B*0801 (IE-1).	83
5.17. Bland-Altman Diagramm zum Vergleich von CD25 ^{bright} und CD25 ⁺ CD127 ^{neg/dim} Tregs.	86
5.18. Messung der CD127 Expression bei einem Patienten zu drei Zeitpunkten nach SZT.	87
5.19. Immunrekonstitution von Tregs nach SZT.	88
5.20. Treg Entwicklung zu Zeitpunkten akuter GvHD oder im Rezidiv.	89
6.1. Beispiel: Verlassen des Normwertbereichs.	94
6.2. Immunrekonstitution: Beispiele von Patientenverläufen.	96
6.3. Beispiel: CMV-Clearance ohne Medikamente.	99
6.4. Quantitative Bestimmung von CMV-CTLs zur Therapiesteuerung.	102
6.5. <i>Tumor Escape-Mechanismus</i>	105

10. Tabellenverzeichnis

2.1. Spenderauswahl.	15
2.2. Einteilung der GvHD Schweregrade.	19
4.1. Laborgeräte.	35
4.2. Verbrauchsmaterialien.	35
4.3. Chemikalien, Reagenzien, Zellmedien und Puffer.	36
4.4. Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie.	37
4.5. Übersicht der verwendeten HLA-spezifischen CMV Tetramere.	38
4.6. Software.	38
4.7. Normwertstudie: Spenderalter.	39
4.8. Patienten der multivariaten Immunrekonstitutionsanalyse.	41
4.9. Patienten der multi-zentrischen CMV-CTL Studie.	42
4.10. Patienten der Treg Studie.	43
4.11. Fluoreszenzfarbstoffe.	45
4.12. CMV-Tetramere und daran gekoppelte Virus-Peptide.	56
4.13. Ansatzschema - Bestimmung von CMV-CTLs.	58
5.1. Messung von Tregs und Treg-Untergruppen mit Hilfe von 10-Farb-Durchflusszytometrie.	85
5.2. Treg-Bestimmung: Vergleichsmessungen.	86
B.1. Erstautorenschaften in Peer-Reviewed Journals.	135
B.2. Co-Autorenschaften in Peer-Reviewed Journals.	136
B.3. Kongressbeiträge.	136

8. Abkürzungsverzeichnis

<i>ADCC</i>	Antikörper abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität; Engl.: <u>A</u> ntibody- <u>D</u> ependent <u>C</u> ell- <u>M</u> ediated <u>C</u> ytotoxicity
<i>aGvHD</i>	akute Graft-versus-Host Erkrankung; Engl.: <u>A</u> cute <u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>H</u> ost- <u>D</u> isease
<i>ALL</i>	<u>A</u> kute <u>L</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
<i>AML</i>	<u>A</u> kute <u>M</u> yeloische <u>L</u> eukämie
<i>APCA – 700</i>	<u>A</u> llophycocyanin- <u>A</u> lexa Fluor [®] <u>700</u>
<i>APCA – 750</i>	<u>A</u> llophycocyanin- <u>A</u> lexa Fluor [®] <u>750</u>
<i>APC</i>	<u>A</u> llophycocyanin
<i>APZ</i>	antigenpräsentierende Zelle; Engl.: <u>A</u> ntigen <u>P</u> resenting <u>C</u> ell
<i>Ara – C</i>	<u>A</u> rabinosyl- <u>C</u> ytosin
<i>ATG</i>	<u>A</u> nti- <u>T</u> hymocyte <u>G</u> lobuline
<i>BCR</i>	B-Zellrezeptor; Engl: <u>B</u> <u>C</u> ell <u>R</u> eceptor
<i>BFM</i>	<u>B</u> erlin <u>F</u> rankfurt <u>M</u> ünster, kooperative multizentrische Studie
<i>Bu</i>	<u>B</u> usulfan
<i>CD</i>	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
<i>cGvHD</i>	chronische Graft-versus-Host Erkrankung; Engl.: <u>C</u> hronic <u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>H</u> ost- <u>D</u> isease
<i>CML</i>	<u>C</u> hronische <u>M</u> yeloische <u>L</u> eukämie
<i>CMV</i>	<u>C</u> ytomegalievirus
<i>CMV – CTL</i> ...	CMV-spezifische zytotoxische T-Zelle
<i>CR</i>	Komplette Remission; Engl: <u>C</u> omplete <u>R</u> emission
<i>CsA</i>	<u>C</u> yclosporin <u>A</u>
<i>CTL</i>	Zytotoxische T-Zelle; Engl.: <u>C</u> ytotoxic <u>T</u> <u>C</u> ell
<i>Cy</i>	<u>C</u> yclophosphamid
<i>D</i>	Spender; Engl. <u>D</u> onor
<i>DC</i>	Dendritische Zelle; Engl.: <u>D</u> entritic <u>C</u> ell
<i>DLI</i>	Spender-Lymphozyten Infusion; Engl.: <u>D</u> onor <u>L</u> ymphocyte <u>I</u> nfusion
<i>DN – T – Zelle</i> .	<u>D</u> oppelt <u>N</u> egative <u>T</u> - <u>Z</u> elle
<i>DP – T – Zelle</i> .	<u>D</u> oppelt <u>P</u> ositive <u>T</u> - <u>Z</u> elle
<i>EBV</i>	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
<i>ECD</i>	Phycoerythrin-Texas Red
<i>EDTA</i>	<u>E</u> thylenediaminetetraacetic <u>a</u> cid
<i>FACS</i>	<u>F</u> luorescence- <u>a</u> ctivated- <u>c</u> ell- <u>s</u> orter

8. Abkürzungsverzeichnis

<i>FITC</i>	<u>F</u> luorescein <u>I</u> sothiocyanate
<i>FS</i>	Vorwärtsstreulicht; Engl.: <u>F</u> orward <u>S</u> catter
<i>G – CSF</i>	Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor; Engl.: <u>G</u> ranulocyte- <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
<i>GvHD</i>	Graft-versus-Host-Erkrankung; Engl.: <u>G</u> raft-versus- <u>H</u> ost- <u>D</u> isease
<i>GvL</i>	<u>G</u> raft-versus- <u>L</u> eukämie
<i>GvT</i>	<u>G</u> raft-versus- <u>T</u> umor
<i>HLA</i>	<u>H</u> umanes <u>L</u> eukozyten <u>A</u> ntigen
<i>HSV</i>	<u>H</u> erpes- <u>S</u> implex- <u>V</u> irus
<i>IE – 1</i>	Engl.: <u>I</u> mmEDIATE- <u>E</u> arly <u>1</u>
<i>Ig</i>	<u>I</u> mmunglobulin
<i>IL</i>	<u>I</u> nterleukin
<i>JMML</i>	<u>J</u> uvenile <u>M</u> yelomonozytäre <u>L</u> eukämie
<i>kgKG</i>	pro <u>K</u> ilogramm <u>K</u> örpergewicht
<i>KIR</i>	<u>K</u> iller- <u>I</u> mmunglobulin-ähnlicher <u>R</u> ezeptor
<i>LDA</i>	<u>L</u> ineare <u>D</u> iskriminanzanalyse
<i>MDS</i>	<u>M</u> yelodysplastisches <u>S</u> yndrom
<i>Mel</i>	<u>M</u> elpahlan
<i>MFD</i>	Passender Familienspender; Engl.: <u>M</u> atched <u>F</u> amily <u>D</u> onor
<i>MFI</i>	<u>M</u> ittlere <u>F</u> luoreszenz <u>I</u> ntensität
<i>MHC</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex; Engl.: <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex
<i>MIC</i>	Engl.: <u>M</u> HC- <u>C</u> lass- <u>I</u> - <u>C</u> hain related
<i>MMF</i>	<u>M</u> ycophenolat- <u>M</u> ofetil
<i>MMFD</i>	Familienspender mit HLA-Mismatches; Engl.: <u>M</u> ismatched <u>F</u> amily <u>D</u> onor
<i>MMUD</i>	Fremdspender mit HLA-Mismatches; Engl.: <u>M</u> ismatched <u>U</u> nrelated <u>D</u> onor
<i>MTX</i>	<u>M</u> ethotrexat
<i>MUD</i>	Passender Fremdspender; Engl.: <u>M</u> atched <u>U</u> nrelated <u>D</u> onor
<i>NB</i>	<u>N</u> eurolblastom
<i>NCR</i>	Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor; Engl.: <u>N</u> atural <u>C</u> ytotoxicity <u>R</u> eceptor
<i>NK</i>	<u>N</u> atürliche <u>K</u> iller
<i>NK – DLI</i>	Spender-NK-Zell Infusion
<i>nm</i>	<u>N</u> anometer
<i>NR</i>	Keine Remission; Engl: <u>N</u> on <u>R</u> emission
<i>PacB</i>	<u>P</u> acific- <u>B</u> lue TM

<i>PacO</i>	<u>Pacific-Orange</u> TM
<i>PBS</i>	Phosphatgepufferte Salzlösung; Engl.: <u>Phosphate</u> <u>Buffered</u> <u>Saline</u>
<i>PBSC</i>	Periphere Blutstammzellen; Engl.: <u>Peripheral</u> <u>Blood</u> <u>Stem</u> <u>Cells</u>
<i>PC5</i>	<u>Phycoerythrin-cyanine 5</u>
<i>PC7</i>	<u>Phycoerythrin-cyanine 7</u>
<i>PCA</i>	Hauptkomponentenanalyse; Engl.: <u>Principal</u> <u>Component</u> <u>Analysis</u>
<i>PCR</i>	Polymerase Ketten Reaktion; Engl: <u>Polymerase</u> <u>Chain</u> <u>Reaction</u>
<i>PE</i>	<u>Phycoerythrin</u>
<i>PR</i>	Prednisolone <u>Poor</u> <u>Response</u>
<i>R</i>	Empfänger; Engl. <u>R</u> ecipient
<i>SP – T – Zelle</i> .	Einfach (Engl: <u>S</u> ingle) <u>P</u> ositive <u>T</u> -Zelle
<i>SS</i>	Seitwärtsstreulicht; Engl.: <u>S</u> ide <u>S</u> catter
<i>SZT</i>	<u>Stammzell</u> transplantation
<i>T_{CM}</i>	Zentrale-Gedächtnis-T-Zelle; Engl.: <u>T</u> <u>C</u> entral <u>M</u> emory Cell
<i>T_{EM}</i>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle; Engl: <u>T</u> <u>E</u> ffector <u>M</u> emory Cell
<i>TCR</i>	T-Zellrezeptor; Engl.: <u>T</u> <u>C</u> ell <u>R</u> eceptor
<i>Thio</i>	<u>Thiotepa</u>
<i>TRD</i>	Transplantat bedingter Tod; Engl: <u>T</u> ransplant <u>R</u> elated <u>D</u> eath
<i>Treg</i>	regulatorische T-Zelle; Engl.: <u>T</u> <u>r</u> egulatory Cell
<i>VZV</i>	<u>Varizella-Zoster-Virus</u>

Anhang

A. Cluster of Differentiation (CD)-Marker

Die folgende Tabelle enthält eine Erläuterung der CD-Marker, die in dieser Arbeit genannt werden^{6,14}.

CD-Marker	Zelluläre Expression	Beschreibung des Rezeptors
CD3	T-Zellen	Signaltransduktion, assoziiert mit dem T-Zellrezeptor
CD4	T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen	HLA-Klasse-II Rezeptor
CD8	Zytotoxische T-Zellen, wenige Tregs, NK-Zellen	HLA-Klasse-I Rezeptor
CD14	Monozyten, Makrophagen	Rezeptor für Lipopolysaccharid-Komplex (LPS) und Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
CD16	NK-Zellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen	Fc-Rezeptor, vermittelt ADCC und Phagozytose
CD19	B-Zellen	Korezeptor für B-Zellen, bildet einen Komplex mit CD21 und CD81, bindet Tyrosinkinasen
CD21	reife B-Zellen, DC	Korezeptor für B-Zellen, bildet einen Komplex mit CD19 und CD81
CD25	aktivierte T-Zellen, Tregs, B-Zellen, Monozyten, reife DC	α Kette des IL-2 Rezeptors
CD28	Einige T-Zellsubgruppen	Bindet CD80 und CD86, Rezeptor für kostimulierendes Signal, beteiligt an der Aktivierung naiver T-Zellen
CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen	Adhäsion, Ligand für CD62L

A. Cluster of Differentiation (CD)-Marker

CD45	Leukozyten	Tyrosin-Phosphatase
CD45RA	Naive T-Zellen, B-Zellen, Monozyten	CD45 Isoform
CD45RO	Gedächtnis T-Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	CD45 Isoform
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD62L	T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten	CD62L = L-Selektin: Vermittelt Leukozyten-Ädhäsion, bindet CD34
CD69	Aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	Frühes Aktivations-Antigen
CD80	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, DC	Kostimulator, Ligand für CD28 und CD152
CD81	Lymphozyten	Korezeptor für B-Zellen, bildet einen Komplex mit CD19 und CD21
CD86	Aktivierte B-Zellen, Monozyten, DC	Ligand für CD28 und CD152, Immunregulation, Kostimulation
CD94	T-Zellsubgruppen, NK-Zellen	Funktion weitgehend unbekannt
CD95	Diverse Zellpopulationen	Bindet Fas-Ligand, induziert Apoptose
CD95L	Diverse Zellpopulationen	Fas-Ligand
CD127	Reife T-Zellen (ohne Treg), lymphoide Vorläuferzellen, Monozyten	α Kette des IL-7 Rezeptors
CD133	Hämatopoetische Vorläuferzellen	Funktion weitgehend unbekannt
CD152	Aktivierte T-Zellen, Tregs	CD152 = CTLA4, Ligand von CD80 und CD86

B. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Die folgenden Tabellen B.1 und B.2 beinhalten eine Übersicht der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Publikationen. Für jede Publikation sind Autoren, Titel, Journal und Impact Faktor des jeweiligen Journals angegeben.

B.1. Erstautorenschaften in Peer-Reviewed Journals

Autoren	Titel	Journal	Impact Factor
M. Koenig, S. Huenecke, ..., U. Koehl	Multivariate analyses of immune reconstitution in children after allo-SCT: risk-estimation based on age-matched leukocyte sub-populations	<i>Bone Marrow Transplant</i> (2010) 45, 613-621	2,998
M. Bremm, S. Huenecke, ..., U. Koehl	Advanced flowcytometric analysis of regulatory T cells: CD127 downregulation early post stem cell transplantation and altered Treg/CD3 ⁺ CD4 ⁺ -ratio in patients with severe GvHD or relapse	<i>J Immunol Methods</i> Epub ahead of print	2,347
S. Borchers* und M. Bremm*, ..., E. Mischak-Weissinger ⁺ und U. Koehl ⁺	Diversity and kinetics of anti-Cytomegalovirus response post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: lessons from a multi-center study	<i>Haematologica</i> In revision	

* Geteilte Erstautorenschaft; ⁺ Geteilte Letztautorenschaft

Tabelle B.1.: Erstautorenschaften in Peer-Reviewed Journals.

B.2. Co-Autorenschaften in Peer-Reviewed Journals

Autoren	Titel	Journal	Impact Factor
U. Koehl* and E. Dirkwinkel*, M. Koenig , ..., T. Lehrnbecher	Reconstitution of Cytomegalovirus Specific T Cells after Pediatric Allogeneic Stem Cell Transplantation: Results from a Pilot Study Using a Multi-Allele CMV Tetramer Group	<i>Klin Pädiatr</i> (2008) 220 , 348–352	1,862
T. Lehrnbecher, R. Schubert, ..., M. Koenig , ..., H. J. Laws	Impaired pneumococcal immunity in children after treatment for acute lymphoblastic leukaemia	<i>British J Haematol</i> (2009) 147 , 700-705	4,597
S. Huenecke, S. Y. Zimmermann, ..., M. Koenig , ..., U. Koehl	IL-2-driven Regulation of NK Cell Receptors With Regard to the Distribution of CD16 ⁺ and CD16 ⁻ Subpopulations and In Vivo Influence After Haploidentical NK Cell Infusion	<i>J Immunother</i> (2010) 33 , 200-210	3,203

* Geteilte Erstautorenschaft;

Tabelle B.2.: Co-Autorenschaften in Peer-Reviewed Journals.

B.3. Kongressbeiträge

Autoren	Titel	Kongress	Jahr
M. Koenig , S. Huenecke, ..., U. Koehl	Multivariate Analyses of Immune Reconstitution in Children following Allogeneic SCT	<i>ISCT, San Diego</i>	Mai 2009

Tabelle B.3.: Kongressbeiträge.

C. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 1172 „Biologicals“ in der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik II/III der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Leitung von PD Dr. Ulrike Köhl angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen und mich während meiner Promotionszeit begleitet haben:

PD Dr. Ulrike Köhl für ihre ausgezeichnete Betreuung, ihre ständige Hilfsbereitschaft, ihren ansteckenden Optimismus und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ich möchte mich bedanken, dass ich meine Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte; es waren drei wunderschöne Jahre!

Prof. Dr. Gisbert Schneider für die Bereitschaft, diese Arbeit vor dem Fachbereich Biowissenschaften zu betreuen, die fachliche Diskussion und seine Beiträge zu den im Rahmen dieser Promotion entstandenen Publikationen.

Prof. Dr. Thomas Klingebiel für die Möglichkeit der Erstellung meiner Dissertation in der Abteilung pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik II/III der Johann Wolfgang Goethe-Universität und *Prof. Dr. Dieter Steinhilber* für die Betreuung meiner Arbeit als „Supervisor“ im GRK 1172.

Prof. Dr. Thomas Lehrnbecher für die Überarbeitung meiner Publikationen und seine Diskussionsbereitschaft und *Prof. Dr. Andreas Orth* für die gute Betreuung und Zusammenarbeit im Rahmen der multivariaten Modellgenerierung.

Dr. Sabine Hünecke für die gewissenhafte Einarbeitung, die Weitergabe ihrer detaillierten Kenntnisse, die Überarbeitung vieler Texte und Grafiken und eine wundervolle Zusammenarbeit.

Den Doktorandinnen des Labor für SZT und Immuntherapien *Claudia Brehm* und *Emilia Salzmann-Manrique* für stundenlange Diskussionen und ihre Unterstützung, ohne die ein so gutes Vorankommen undenkbar gewesen wäre.

Regine Müller für die engagierte Hilfe und ihr Fachwissen bei der experimentellen Versuchsplanung, Durchführung und Auswertung.

Andrea Quaiser für die Weitergabe ihres Fachwissens und ihre Hilfe bezüglich Durchflussszytometrie und die Lösung vieler technischer Probleme.

Sibylle Wehner für ihre freundliche und kompetente Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit und *Sibille Betz* für die vielen lieben Worte und ihre überdurchschnittliche

C. Danksagung

Hilfsbereitschaft.

Stephanie Erben, Frauke Röger, Rabiá El Kalaäoui und Tanja Gardlowski für die technische Hilfestellung, das gute Arbeitsklima und die netten Gespräche beim gemeinsamen Frühstück.

Roswitha Lehne, Sabine Schmid, Silvia Koob und Dr. Brigitte Held für die Lösung aller administrativen und logistischen Probleme.

Dr. Ruth Esser für ihre gewissenhafte Unterstützung und ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft und *Dr. Stephan Klöß* für seine Diskussionsbereitschaft.

Allen Ärzten und Schwestern der Stationen 32-9, 32-8 und 32-4. Vor allem *Jan Sörensen, Dr. Andrea Jarisch* und *Dr. Eva Ponstingl*, die immer ein offenes Ohr für meine vielen klinischen Fragen hatten und mir sehr bei der Verfassung meiner Publikationen geholfen haben.

Unseren Kooperationspartnern an der Medizinischen Hochschule Hannover *Dr. Sylvia Borchers* und *Prof. Dr. Eva Mischak-Weissinger*.

Außerdem danke ich *Anna Bischof* für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch der „*Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, GRK1172)*“ und der Stiftung „*Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e. V.*“, ohne deren finanzielle Unterstützung dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Schwiegereltern *Angelika Borgmeyer-Bremm* und *Peter Bremm* für unzählige Anregungen und ihre Unterstützung. Ihr habt immer die richtigen Worte gefunden, um mir die nötige Kraft und Motivation zu geben.

Meinen Eltern *Ulrike und Matthias König* sowie meiner Großmutter *Maria König*, die mich auf meinem Weg begleitet und mir immer zur Seite gestanden haben.

Meinem Mann *Sebastian Bremm*, der alle Höhen und Tiefen meiner Dissertation mit durchlebt hat, zu jedem Zeitpunkt für mich da war und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

D. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den 15.02.2011

Melanie Bremm

E. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Melanie Bremm (geb. König)
Email: mail@melaniebremm.de
Geburstag: 22.12.1982
Geburtsort: Frankfurt
Familienstand: Verheiratet



Promotion

seit 10/2007 Doktorandin im Labor für Stammzelltransplantation und Immuntherapien des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

- 10/2007-2/2010 Stipendium des GRK1172 (DFG)
- 3/2010-8/2010 Stipendium der Goethe-Universität Frankfurt
- seit 9/2010 Finanzierung durch den „Verein Hilfe für Krebskranke Kinder Frankfurt e. V.“

Studium

10/2002-07/2007 Technische Universität und Ludwig Maximilians Universität München
Bioinformatik
Abschluss: Diplom (Durchschnittsnote: 1,1)

11/2006-05/2007 Merck KGaA, Diplomandin
Thema der Diplomarbeit: Analysis and Management of Phage Display Data

Schulbildung

1993-2002 Gymnasialstufe der Philipp-Reis-Schule Friedrichsdorf
Schulabschluss: Abitur (Durchschnittsnote: 1,5)

E. Lebenslauf

Sprachkenntnisse:

- Französisch (9 Jahre)
- Englisch (7 Jahre)
- Spanisch (3 Jahre)

1989-1993 Grundschule Friedrichsdorf

Praktika

03/2006-04/2006 Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Werkstudentin

07/2002-09/2002 Hochtaunus-Kliniken gGmbH - Bad Homburg, Krankenpflegepraktikum

Frankfurt, 23. September 2011