

Aus der Abteilung  
für Hämatologie und Internistische Onkologie  
der Universität Regensburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen

**Aussagekraft zytologischer und serologischer Marker hinsichtlich  
Früherkennung, Diagnose und Prognose der akuten und chronischen  
*graft-versus-host disease***



Inauguraldissertation  
zur Erlangung des doctor medicinae  
der  
Medizinischen Fakultät Regensburg  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Verena Eva-Maria Blechschmidt**  
aus  
München  
2013

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ernst Holler

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin Fleck

Tag der mündlichen Prüfung:

17.01.2013

*In ewiger Liebe und Dankbarkeit*

*für*

*Mami und Papi*

### **Abkürzungsverzeichnis:**

AICD	activation-induced cell death
AID	autoimmune disease
ALAT	Alanin-Aminotransferase
APC	antigen-presenting cell
ATG	antithymocyte globulin
CsA	Cyclosporin A
DC	dendritic cell
DD	death domain
DED	death effector domain
EBV	Ebstein- Barr- Virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain
Fas	Fibroblast-associated
GCSF	granulocyte colony-stimulating factor
GDP	Guanosindiphosphat
GMCSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
GTRM	gvhd-related mortality
GvL	graft-versus –Leukämie
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	human leucocyte antigen
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry
ICAM	intercellular cell adhesion molecule



## Abkürzungsverzeichnis

IL	interleukin
INF	interferon
KDa	kilodalton
KM	Knochenmark
MIP	macrophage inflammatory protein
MMF	Mycophenolat Mofetil
NF	nuclear factor
NHL	Non-Hodgkin -Lymphom
NIH	National Institutes of Health
NK-Zelle	natural killer-Zelle
NO	Stickstoffmonoxid
PBSC	peripheral blood stem cells
TF	transplant failure
TGF	transforming growth factor
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	tumor necrosis factor
TR	tumor relaps
TRM	transplantation-related mortality
U	Units
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule
VOD	veno-occlusive disease

## **Inhaltsverzeichnis:**

1. Einleitung	7
1.1. Stammzelltransplantation	7
1.2. Graft-versus-host disease	9
1.3. Untersuchte Oberflächenantigene auf T-Lymphozyten	16
1.4. Der Epithelzellapoptosemarker Zytokeratin 18F	22
1.5. Aufgabenstellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Patientenkollektiv	25
2.2. Probengewinnung	28
2.3. Zählverfahren	29
2.4. Durchflusszytometrische Analysen	29
2.5. Bestimmung der CK18F-Werte im Serum	33
3. Ergebnisse	36
3.1. Schritte der Datenanalyse	36
3.2. Hinweise zur Darstellung der Ergebnisse	36
3.3. Anzahl der Leukozyten und PBMNCs	37
3.4. T-Helferzellen	40
3.5. CD4/CD95-positive T-Lymphozyten	43
3.6. CD4/CD25-positive T-Lymphozyten	46
3.7. CD4/FoxP3- und CD4/FoxP3/CD25-positive T-Lymphozyten	52
3.8. CD4/CCR10-positive T-Lymphozyten	56
3.9. Zytotoxische T-Zellen	61
3.10. CD8/CD25-positive T-Lymphozyten	64
3.11. CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positive T-Lymphozyten	66
3.12. CK18F-Werte im Serum	71
3.13. Unterschiede innerhalb der GvHD-Gruppe am vierten Tag der Steroidtherapie in Abhängigkeit vom Therapieansprechen	76
3.14. Unterschiede innerhalb der GvHD-Gruppe nach Reduktion der Immunsup- pression zwischen Patienten mit u. ohne Auftreten eines zweiten Schubs	77
3.15. Unterschiede zwischen Patienten mit erstmaliger GvHD-Manifestation und Patienten mit zweitem GvHD-Schub	79
3.16. Vergleich von Absolutwerten unter Verwendung laborchemisch und mikro- skopisch ermittelter Leukozytenzahlen	79
3.17. Untersuchung des Einflusses einer GvHD-Prophylaxe mit ATG oder MMF auf unterschiedliche Zellpopulationen nach Transplantation	79
4. Diskussion	87
4.1. Entwicklung der Leukozyten und der mononukleären Zellen	87
4.2. CD4-positive T-Lymphozyten	88
4.3. CD8-positive T-Lymphozyten u. aktivierte T-Killerzellen	96
4.4. CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positive T-Zellen	98
4.5. Fragmente des Zytokeratins18 im Serum	99

4.6. Einfluss des Therapieerfolgs am vierten Tag nach Beginn der Steroidgabe auf die verschiedenen Zellpopulationen	102
4.7. Einfluss durch das Auftreten eines zweiten GvHD-Schubes auf die unterschiedlichen Zellpopulationen	102
4.8. Einfluss der Methode der Leukozytenbestimmung auf die Absolutwerte	103
4.9. Einfluss der ATG- und MMF-Prophylaxe auf die Zellpopulationen	103
4.10. Ausblick	105
5. Zusammenfassung	108
6. Literaturverzeichnis	112
7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	123
8. Anhang	125
9. Danksagung	131
10. Lebenslauf	132

# **1. Einleitung**

## **1.1. Stammzelltransplantation**

Die Entdeckung des HLA-Systems in den 60-er Jahren stellte den Beginn der Ära der Stammzelltransplantation dar. 1968 erfolgte die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation eines HLA-identischen Geschwisterspenders bei einem fünf Monate alten Jungen mit kombinierter Immundefizienz [1].

### **1.1.1. Indikationen der Stammzelltransplantation**

Allogene Stammzelltransplantationen von HLA-identischen Geschwistern oder passenden Fremdspendern haben in den letzten 40 Jahren v.a. in der Behandlung verschiedener Leukämieformen und lebensbedrohlicher nichtmaligner Erkrankungen wie der aplastischen Anämie und der Sichelzellanämie große Bedeutung erlangt [2].

Eine weitere wichtige Indikation zur Stammzelltransplantation sind Autoimmunerkrankungen:

In 21 Fällen von Langzeitüberlebenden allogener Knochenmarktransplantationen nach hämatologischen malignen Erkrankungen und aplastischen Anämien, die zugleich an unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen litten, zeigte sich eine vollständige Remission der AIDs. Weitere klinische Studien zur Effektivität autologer und auch allogener Stammzelltransplantationen bei Patienten mit autoimmunologischen Erkrankungen sind notwendig [3].

Bei einigen malignen Erkrankungen wie z.B. Brust- und Ovarialtumoren sowie chemosensiblen hochgradigen NHLs trägt die chemo- bzw. strahlentherapeutische Behandlung entscheidend zur Verbesserung der Heilungschancen bei. Der mit dieser Therapie verbundene limitierende Faktor der Myelosuppression kann durch eine nachfolgende autologe Stammzelltransplantation kompensiert werden [2][4].

### **1.1.2. Unterschiedliche Stammzellquellen**

HSCs (*hematopoietic stem cells*) sind CD34/CD90-positiv. Bei CD34 handelt es sich vermutlich um ein Adhäsionsmolekül. CD90 hingegen ist an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt. Hämatopoietische Stammzellen liegen in vivo zu etwa 95% in der G0-Phase des Zellzyklus vor, nur etwa 5% sind teilungsaktiv. Diese Fähigkeit der Proliferation stellt zusammen mit der Multipotenz das Hauptmerkmal der HSCs dar [5][6][7].

Zur Gewinnung von Stammzellen dienen Knochenmark sowie peripheres und aus der Nabelschnur entnommenes Blut. Im KM machen die HSCs etwa 1–3% der Leukozyten aus. Im Falle eines *Missmatches* bezüglich des *ABO-major-Mismatch-Systems* müssen die Erythrozyten zuvor eliminiert werden.

Im peripheren Blut liegt die Konzentration hämatopoietischer Stammzellen bei etwa 0,1% der Leukozyten. Durch die Gabe von GCSF oder GMCSF werden die Neutrophilen aktiviert, deren Serin-Proteasen zur Entstehung von VCAM-1 führen. Dieses ermöglicht die Freisetzung von HSCs ins Blut, was am vierten oder fünften Tag in einem bis zu hundert- oder sogar tausendfachen Anstieg der zirkulierenden CD34/CD90-positiven Zellen resultiert [8]. Idealerweise sollte die Zahl der infundierten Stammzellen  $2\text{--}5 \times 10^6$  HSCs pro Kilogramm Körpergewicht betragen [9].

Aufgrund des geringen Gehalts an T-Zellen ist bei HSCs aus dem Knochenmark die Gefahr der Entwicklung einer GvHD im Vergleich zu peripheren Blutstammzellen (PBSCs) etwas vermindert. Da es sich bei den durch die Verabreichung von GCSF erhöhten peripheren T-Lymphozyten hauptsächlich um TH<sub>2</sub>-Zellen handelt, liegt das Risiko einer akuten GvHD nach Transfusion von PBSCs gemäß einer Metaanalyse von 15 prospektiven und retrospektiven Studien jedoch nur geringfügig höher als bei der Verwendung von Knochenmark (RR: 1,16). Die chronische GvHD hingegen kommt bei der Transplantation peripherer Blutstammzellen deutlich häufiger vor (RR: 1,53).

Der Nachteil der HSCs aus dem KM liegt in der bis zu sechs Tage längeren Dauer bis zum sog. Neutrophilenengraftment ( $> 0,5 \times 10^9/\text{L}$  an zwei konsekutiven Tagen) und der verzögerten Normalisierung der CD4/CD8-Ratio [8].

### 1.1.3. Ablauf der Stammzelltransplantation

Das Hauptkriterium eines geeigneten Donors bei allogener Stammzelltransplantation stellt die Identität des HLA-Systems von Spender und Empfänger dar. Die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung beträgt bei Geschwistern 25%. Kann innerhalb der Familie kein geeigneter Donor gefunden werden, erfolgt die Fremdspendersuche über nationale und internationale Datenbanken. Zunächst werden nur die HLA-Phänotypen HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 verglichen. HLA-A, -B und -C werden mit niedriger Auflösung sequenziert. Die jeweiligen Allele von DRB1 und DQB1 werden einer genaueren, hochauflösenden Sequenzierung zugeführt. Für ersteren Genort wurden bislang beispielsweise bis zu 750 verschiedene Allele und für HLA-DQB1 etwa 100 verschiedene serologische Allele gefunden. Die einzelnen Ausprägungen sind in der Bevölkerung unterschiedlich häufig verteilt. Da es viele Kombi-

nationsmöglichkeiten gibt, liegt die theoretische MHC-Übereinstimmung zweier Menschen in der Bevölkerung bei etwa 1:1000 bis 1:mehreren Millionen. Findet sich weltweit kein geeigneter Spender, muss auf einen Donor mit *HLA-mismatch* ausgewichen werden [10].

### **1.2. Graft-versus-host disease**

#### **1.2.1. Historische Entwicklung des Begriffes *graft-versus-host disease***

Bei der *graft-versus-host disease* greifen injizierte Spenderlymphozyten Organe des Empfängers, zumeist Haut, Darm oder Leber an, woraus sich für den Patienten lebensbedrohliche Folgen entwickeln können. Dieses Phänomen wurde jedoch bereits 1916 von James B. Murphy, einem Pionier der Transplantationsimmunologie am Rockefeller Institute in New York, beobachtet, wenngleich der eigentliche Mechanismus dem Wissenschaftler damals noch verborgen blieb, da sein Interesse hauptsächlich der Krebsforschung galt. Im *Journal of Experimental Medicine* berichtete er über ein Experiment, in dem Rattentumorfragmente allein oder in Kombination mit Milzfragmenten aus erwachsenen Hühnern in die Membran zwischen Chorion und Allantois von Hühnerembryonen injiziert wurden. Hierdurch sollte untersucht werden, ob Lymphozyten aus der Milz das Wachstum der Tumorfragmente eindämmen können. Überraschenderweise entwickelten Kontrollembryonen, die lediglich Milzanteile erhalten hatten, nach zehn Tagen eine Splenomegalie mit diffusen Knoten in Kutis und Subkutis. Erst 1957 veröffentlichte Simonsen seine Ergebnisse zahlreicher Experimente, in denen er zeigen konnte, dass verabreichte HSCs fremde Empfängerantigene erkennen und eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion auslösen [11].

#### **1.2.2. Einteilung der GvHD**

Bereits 1974 wurden von Glucksberg die sog. *Glucksberg-Seattle Kriterien* (GSC) zur Graduierung der akuten GvHD eingeführt. Hierbei unterscheidet man jeweils fünf Stadien (0–4) der häufigsten Manifestationsorgane Haut, Darm und Leber gemäß der Ausdehnung, des Stuhlvolumens bzw. des Bilirubingehalts im Blut [Tab. 1]. Basierend auf der Kombination der einzelnen Stadien der verschiedenen Organe ergibt sich der Gesamtgrad (I–IV) [Tab. 2].

Stadium	Haut	Darm	Leber
0	Kein Exanthem	Diarrhöen <500ml	Bilirubin <2mg/dL
1	Exanthem bis 25% der Körperoberfläche	Diarrhöen 500-1000mL	Bilirubin 2-3mg/dL
2	Exanthem 25-50% der Körperoberfläche	Diarrhöen 1,0-1,5L	Bilirubin 3-6mg/dL
3	Generalisiertes Exanthem	Diarrhöen >1,5L	Bilirubin 6–15mg/dL
4	Hautablösung mit Blasen	Zusätzlich Koliken, Ileus und Blutungen	Bilirubin >15mg/dL

Tab. 1: Organstadien der akuten GvHD nach Glucksberg.

Grad	Haut	Darm	Leber	Einschränkung des AZ
I (leicht)	1–2	0	0	keine
II (mäßig)	1–3	1	1	leicht
III (schwer)	2–3	2–3	2–3	mäßig
IV (lebensbedrohlich)	2–4	2–4	2–4	deutlich

Tab. 2: Gesamtgrad der akuten GvHD nach Glucksberg.

Der *IBMTR-Severity-Score* berücksichtigt hingegen, dass die Stadien 1 und 2 der Haut-GvHD durchaus unterschiedliche Auswirkungen auf das klinische Outcome der Patienten haben [Tab. 3]. Dennoch konnte er die GSC bislang nicht aus der Klinik verdrängen, da Studien seine Überlegenheit hinsichtlich TF, TR und GTRM nicht eindeutig belegen konnten [12].

<b>Haut</b>	0	1	2 0–2 0–2	3 3 0–3	0–4
<b>Darm</b>	0	0	0 1 2	0–1 2 3	4
<b>Leber</b>					
<b>Grad</b>	0	A	B	C	D

Tab. 3: *IBMTR-Severity-Score*.

Wesentlich ungenauer ist die Einteilung der sog. chronischen GvHD. Ursprünglich verstand man darunter das Auftreten von Symptomen nach Tag 100 nach Transplantation. Neuerdings

gehen jedoch noch andere Kriterien in die Unterscheidung zwischen akut und chronisch mit ein, so dass auch nach Tag 100 noch eine akute GvHD auftreten kann. Hierbei wird nach NIH-Konsens unterschieden zwischen Symptomen, die zur Diagnose einer cGvHD ausreichen, Symptomen, die häufig mit einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion assoziiert, jedoch nicht beweisend sind und Symptomen, die sowohl bei einer aGvHD und cGvHD auftreten können. Auch bei der chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion können Haut, Darm und Leber betroffen sein. Bisweilen besteht zusätzlich ein Befall von Lunge, Augen, Speicheldrüsen, Nägeln, Urogenitaltrakt oder Gelenken [13].

Die bisherige Einteilung in *limited disease* und *extended disease* ist nicht zur Prognoseabschätzung geeignet [13][14].

### 1.2.3. Prophylaxe und Therapie der GvHD

Zur Prophylaxe einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion werden vornehmlich Medikamente eingesetzt, die sich gegen die T-Lymphozyten richten. Das 1969 erstmals aus zwei Pilzstämmen isolierte CsA (Sandimmun®) bindet nach Eintritt in die T-Zelle an Cyclophillin, wodurch über die Hemmung von Calcineurin auch die IL-2-Produktion verringert wird. FK506(Prograf®) greift ebenfalls in diese Signalkaskade ein. Aufgrund der Schlüsselrolle der T-Zellen in der GvHD-Induktion liegt der Versuch der physikalischen T-Zell-Eliminierung aus dem Spendermaterial nahe. Dies geht jedoch mit einem erhöhten Risiko für Transplantatversagen, EBV-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen und Rezidive einher. Neben den erwähnten Immunsuppressiva leistet auch die Berücksichtigung einiger Spender-gegen-Wirts-Faktoren einen entscheidenden Beitrag zur Verminderung des GvHD-Risikos. *Missmatches* sowohl in *Major-* als auch in *Minor-Histokompatibilitätsantigenen* erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion. Einige der Letzteren werden bei Männern auf dem y-Chromosom kodiert, weshalb die Kombination männlicher Donor/weiblicher Rezipient negativen Einfluss auf das Outcome zu haben scheint. Ähnlich verhält es sich bei einem hohen Alter sowohl des Spenders als auch des Empfängers. Da anaerobe Mikroorganismen möglicherweise einen stimulierenden Effekt auf die Alloreaktivität der Donor-T-Zellen haben, werden auf einigen Stationen auch antibiotische Darmsanierungen z.B. mit Metronidazol vorgenommen [15]. Im August 2004 berichtete die medizinische Zeitschrift *Blood* erstmals über einen Zusammenhang zwischen NOD2/CARD15-Mutationen und dem Auftreten einer GvHD bzw. der TRM. Die in der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Universität Regensburg durchgeführte Studie schloss genetische Untersuchungen von 169 Patienten und deren Spendern hinsichtlich der SNPs



(*single nucleotide polymorphisms*) 8, 12 und 13 ein, die bereits als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Morbus Crohn bekannt waren. Das Gen NOD2/CARD15 kodiert für ein Protein, das auf dem Epithel des Ileums und auf Monozyten exprimiert wird und bei Bindung von Muramyldipeptid, einem Bestandteil der Bakterienwand, über die Aktivierung von NF $\kappa$ B eine Kaskade im Zytoplasma auslöst. Während innerhalb der Wildtyp-Gruppe 20% verstarben, stieg die TRM bei Vorliegen eines Empfängerpolymorphismus auf 49%, im Falle einer Mutation im Spendermaterial auf 59% und auf 83%, wenn sowohl Donor als auch Rezipient einen Polymorphismus aufwiesen [16]. Weitere Studien, an denen neben Regensburg Wien, Rostock, Newcastle und Paris teilnahmen, konzentrierten sich auf HLA-identische Geschwisterpaare und fanden ähnliche Ergebnisse [17].

Mittel der Wahl zur Behandlung der *graft-versus-host disease* ist das (Methyl-)Prednisolon, welches in den Lymphozyten eine direkte Apoptoseinduktion hervorruft. Bei der akuten GvHD stellt auch die Erhöhung der bereits mit Transplantation begonnenen Prophylaxe mit CsA oder FK506 (Tacrolimus) ein wichtiges Therapieelement dar. Als Zweitlinientherapie können MMF, ATG, IL-2-Antagonisten oder TNF-Antikörper wie das Infliximab versucht werden. Auch der Einsatz von Etanercept, einem Fusionsmolekül aus dem löslichen TNF-Rezeptor und IgG, stellt eine Therapiealternative dar [12]. Studien an der Klinik für Innere Medizin I der Medizinischen Universität Wien zufolge scheint die Anwendung der extrakorporalen Fotopherese bei Fällen einer akuten steroidrefraktären GvHD ohne intestinale Beteiligung erfolgversprechende Ergebnisse zu erzielen [18].

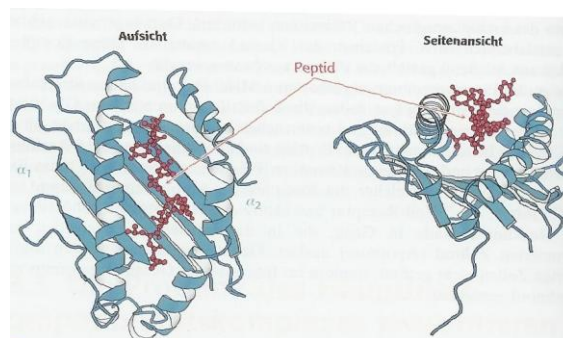
### 1.2.4. Immunologische Grundlagen

#### 1.2.4.1. Charakterisierung der HLAs

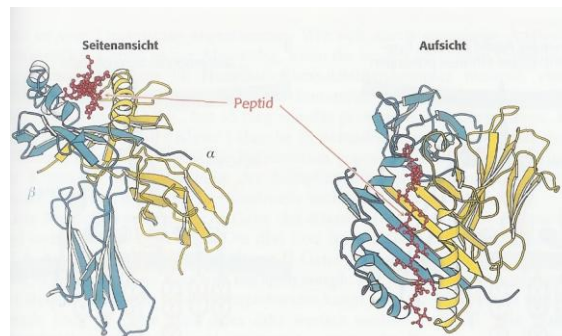
Die sog. MHCs (*major histocompatibility complexes*) oder auch HLAs (*human leucocyte antigens*) werden auf der Zelloberfläche exprimiert und sind von entscheidender Bedeutung sowohl bei der positiven und negativen Selektion im Thymus als auch bei der Erkennung von selbst und fremd durch die reifen T-Zellen.

Der Mensch kann bis zu sechs unterschiedliche MHCs der Klasse I besitzen, jeweils zwei verschiedene HLAs der Gruppe A, B und C. MHCs der Klasse I präsentieren intrazellulär synthetisierte Proteine und interagieren mit CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen. Ein MHC der Klasse I besteht aus je zwei Untereinheiten, einer schweren  $\alpha$ -Kette und einem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Die T-Zellrezeptoren interagieren sowohl spezifisch mit Teilen des HLA als auch mit dem daran gebundenen Peptid [Grafik 1][16].

Der kurze Arm des Chromosoms 6 kodiert beim Menschen für je einen HLA-DP- und HLA-DQ-Isotyp sowie für zwei HLA-DR-Moleküle. Somit kann der Mensch über bis zu acht unterschiedliche MCHs der Klasse II verfügen. Sie befinden sich auf Makrophagen und dendritischen Zellen und präsentieren meist endozytotisch aufgenommene extrazellulär synthetisierte Peptide. MHCs der Klasse II bestehen ebenfalls aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, wobei beide Untereinheiten je eine polymorphe Domäne für die spezifische Bindung des präsentierten Peptids sowie eine Region zur Interaktion mit dem CD4 der T-Helferzellen bereitstellen [Grafik 2]. Werden Stammzellen eines nicht HLA-identischen Spenders transplantiert, können die Donor-T-Zellen gegen fremde beladene HLA-Moleküle des Empfängers eine Immunantwort induzieren, was sich klinisch als GvHD äußert [19].



**Grafik 1:** MCH der Klasse I mit Peptidbeladung aus [182].



**Grafik 2:** MHC der Klasse II mit Peptidbeladung aus [182].

### 1.2.4.2. Selektionsprozesse im Thymus

Von den hämatopoietischen Stammzellen gelangen nur etwa 4–5% in den Thymus. Über mehrere Zwischenstufen reifen die aufgrund des Fehlens von CD3, CD4 und CD8 auch als TN (*triple negative*)-Lymphozyten bezeichneten Zellen zu DP(*double positive*)-Thymozyten heran, die nun sowohl CD4- als auch CD8-positiv sind. Erkennt ein Thymozyt spezifisch das körpereigene MCH-Molekül und das darauf präsentierte körperfremde Antigen, führt dies zu einem Überleben der Zelle (*positive Selektion*). Thymozyten, die an MCH-II-Moleküle

binden, werden CD4-positiv, solche, die mit MHC-I-Molekülen interagieren, exprimieren CD8. Die *negative Selektion* findet in der Medulla des Thymus statt und wird über verschiedene APCs, hauptsächlich dendritische Zellen, vermittelt. Über Mechanismen der Apoptose und der Anergie werden Zellen, deren T-Zell-Rezeptor auf körpereigene Antigene reagiert, getötet und von Makrophagen beseitigt. Etwa 95% der Zellen werden durch diesen Selektionsprozess eliminiert, nur etwa 5% gelangen in die sekundären lymphatischen Organe [20].

### 1.2.4.3. Pathomechanismus der akuten und chronischen GvHD

Während lange Zeit Spender-T-Zellen als die Hauptinduktoren der akuten GvHD galten, geht das heutige pathophysiologische Modell von einer Interaktion zwischen T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen aus. Die Konditionierung mittels Chemotherapie oder Bestrahlung führt zu einer ersten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 und IL-6 aus Makrophagen der Haut, des Darmes und des Blutes. Dadurch kommt es zur Aktivierung von APCs des Empfängers, die zu einem späteren Zeitpunkt T-Zellen des Spenders über IL-12 aktivieren können. Außerdem erfolgt durch direkte toxische Konditionierungsschäden eine zusätzliche Stimulierung der Makrophagen und der APCs. Diese wird durch bakterielle und virale Liganden, die an Toll- und NOD-Like-Rezeptoren binden, verstärkt. IL-1 und IL-6 sind für die Aktivierung der APCs entscheidend. IL-1 erhöht zudem die Expression von E-Selektin und ICAM-1 auf Endothelzellen der Hautgefäße.  $\text{TNF}\alpha$  ist an der Apoptoseinduktion und Förderung der Kollagensynthese beteiligt. Zusätzlich führt die Konditionierungs-assoziierte Inflammation zu einer gesteigerten Präsentation von Antigenen des MHC-Komplexes auf den Empfängerzellen, welche durch reife Spender-T-Zellen detektiert werden. In den ersten Wochen einer akuten GvHD steigt die Anzahl der Makrophagen an. Liegt ein MHC-II-Mismatch vor, werden die fremden Antigene von Spender-T-Helferzellen erkannt. Bei MHC-I-Inkompatibilität oder Unterschieden in den *minor histocompatibility antigens* werden CD8-positive Lymphozyten aktiviert. Es ließ sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Höhe und Geschwindigkeit der  $\text{TNF}\alpha$ - bzw.  $\text{INF}\gamma$ -Produktion und dem GvHD-Risiko bzw. deren Mortalität nachweisen.  $\text{INF}\gamma$  stimuliert wiederum Makrophagen und NK-Zellen und ermöglicht durch das Einwandern von Leukozyten in Haut und Darm.

In Phase 2 der Spender-gegen-Wirts-Reaktion erfolgt die Aktivierung und klonale Expansion von Donor-T-Zellen.

Die Phase 3, die auch als *efferende Phase* bezeichnet wird, führt über einen Zytokinsturm und über zytotoxische Mechanismen aktivierter Spender-T-Zellen wie Perforin, Granzym und Fas-Ligand zur Schädigung des Empfängerorgans.

Aus zahlreichen Mäuseversuchen konnte abgeleitet werden, dass zur Aufrechterhaltung einer chronischen GvHD Donor-T-Zellen nötig sind, die gegen Empfänger-Antigene reagieren, und, dass TH<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4 und IL-10 bei der Aktivierung Autoantikörper produzierender B-Lymphozyten eine Schlüsselrolle einnehmen. Ein weiteres Mäusemodell, bei dem sich aus einer akuten GvHD eine chronische Form entwickelt, legt die Vermutung nahe, dass es aufgrund der Zerstörung der Thymusstruktur zu einer fehlerhaften negativen Selektion während der T-Zell-Reifung im Thymus kommt, wodurch autoreaktive TH<sub>2</sub>-Zellen zur Aktivierung autoreaktiver B-Lymphozyten führen [21].

### 1.2.4.4. Besonderheiten der Haut- und Darm-GvHD

Die Klinik der akuten Haut-GvHD ist oft schwer von viralen oder Medikamenten-induzierten Exanthenen zu unterscheiden. Es handelt sich um lokal begrenzte Ausschläge mit Beteiligung der Handflächen und Fußsohlen, häufig begleitet von Pruritus. Die chronische Form ist anfangs meist ebenfalls noch lokal begrenzt und betrifft hauptsächlich die oberflächlichen Hautschichten. Die Papeln in Gesicht, Handflächen und Fußsohlen ähneln dem Krankheitsbild des Lichen Planus. In späteren Stadien sind auch andere Körperstellen und Schleimhäute in Mund, Konjunktiven, Trachea und Vagina befallen. Es kommt zu Fibrosierungen, Hypo- und Hyperpigmentierungen, Teleangiectasien und Alopezien. Die Indurationen können an Läsionen der progressiven systemischen Sklerose erinnern.

Die zelluläre Pathologie gliedert sich in drei Phasen: Die akute GvHD beginnt mit der *endothelialen Phase*: Mastzellen sezernieren Histamin und TNF $\alpha$ , wodurch die Diapedese der Lymphozyten ermöglicht wird. Danach folgt die *epidermotrophische Phase*: T-Zellen, Killerzellen und zytotoxische Zellen, nicht jedoch B-Zellen, exprimieren das  $\alpha_3\beta_1$ -Integrin, an welches das Epiligrin basaler Keratinozyten bindet und die Einwanderung der Leukozyten in die Epidermis bewirkt. Durch zusätzliche Interaktionen zwischen weißen Blutzellen und Keratinozyten gelangen die Effektorzellen in die oberen Epidermisschichten. Die sog. *Zielzellphase* ist von Keratinozyten geprägt, die sich in Nekrose und Apoptose befinden, eine eosinophile Färbung mit Kernfragmenten aufweisen und von Lymphozyten umgeben sind [22].

Das klinische Bild der Darm-GvHD ist oft sehr unspezifisch und nur schwer von Konditionierungsschäden oder Infektionen im Verdauungstrakt abzugrenzen, zumal sie oft in

Kombination auftreten. Häufige Symptome sind Gewichtsabnahme, Übelkeit, abdominale Beschwerden und Diarrhö. Hierbei können Wasserverluste von bis zu zwei Litern am Tag auftreten. Bisweilen kommt es zu Perforationen oder zum Ileus. Kennzeichen der intestinalen GvHD ist die Enterozytenapoptose, die bis hin zum kompletten Kryptenverlust führen kann: Die erhöhte Proliferationsrate der Stammzellen im Falle einer intestinalen GvHD führt zu Enterozyten, die sich schlechter ins Epithel eingliedern und schneller zugrunde gehen. Der erhöhte Anteil unreifer Enterozyten, der sich mit zunehmender Mitoserate ergibt, führt zu einer weiteren Reduktion der effektiven Resorptionsfläche im Darm. Durch die Schädigung subepithelialer Gefäße kommt es ebenfalls zu einem Zelluntergang.

Auch bei der Darm-GvHD lassen sich verschiedene zellpathologische Phasen unterscheiden: Die Rolle der T-Zellen tritt wohl hinter der lokaler Mediatoren zurück. T-Zellen sezernieren  $\text{INF}\gamma$ , welches die *Proliferationsphase* der Kryptenzellen einleitet, die Expression von MHC- und anderen Adhäsionsmolekülen erhöht und zusammen mit  $\text{TNF}\alpha$  zur Zottenatrophie führt. Makrophagen und NK-Zellen werden angelockt und produzieren  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{INF}\alpha$ ,  $\text{INF}\beta$ , IL-1 und NO. Somit wird durch die Zytokine der Makrophagen und NK-Zellen die Phase der *Epithelzelldestruktion* eingeleitet, in der die Enterozyten zerstört werden und die Zahl der Lymphoidzellen der Mukosa abnimmt. In der *Phase der Atrophie* wird die Schleimhaut zunehmend dünner und die Lymphozyten dieser Schicht verschwinden schließlich vollständig [23].

### **1.3. Untersuchte Oberflächenantigene auf T-Lymphozyten**

#### **1.3.1. Der Aktivierungsmarker CD25 und der Apoptosemarker CD95**

Bei dem CD25-Antigen handelt es sich um ein 55 kDa schweres Heterotrimer. Während CD122 und CD132 die  $\beta$ - bzw. die  $\gamma$ -Kette des IL-2-Rezeptors bilden, stellt CD25 die  $\alpha$ -Kette desselbigen dar. Es findet sich auf Progenitorzellen der T- und B-Zelllinie sowie auf reifen, aktivierten T- und B-Lymphozyten. Das Antigen ist entscheidend für die Differenzierung, Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten [24]. In vorherigen FACS-Analysen war der CD25-Anteil der T-Killerzellen bei GvHD-Patienten signifikant geringer [25].

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Bei der aktiven Form der Apoptose spielt das CD95, auch Apo1 oder Fas-Rezeptor genannt, als Todesrezeptor eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um ein 48 kDa transmembranöses Protein, welches über eine zysteinreiche extrazelluläre Rezeptordomäne und eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD)

verfügt. Der Fas-Ligand ist in der Lage, drei Fas-Moleküle zu binden, wodurch es zur Clusterbildung des Rezeptors und zur Assoziation der Todesdomänen kommt. Adaptermoleküle wie das FADD können an diese mit ihrer eigenen Todesdomäne andocken und über eine Todeseffektordomäne (DED) zur enzymatischen Selbstspaltung und Selbstaktivierung der Kaspase 8 führen [26][27]. Über eine Kaskade, an deren Ende die Effektorkaspasen stehen, kommt es zum Abbau von DNA, Lamin und Aktin sowie zur Unterdrückung der DNA-Reparatur [28]. CD95 wird von Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, CD34-positiven Stammzellen und zahlreichen Gewebezellen wie Fibroblasten, Keratinozyten, Hepatozyten, intestinalen Epithelzellen und Endothelzellen, aber auch von malignen oder virusinfizierten Zellen exprimiert. Der Großteil der Fas-positiven Zellen ist resistent gegenüber dem rezeptorvermittelten Zelltod. Durch vermehrte CD25-Expression wird auch CD95 hochreguliert. Jedoch haben T-Lymphozyten mit hoher CD25-Dichte eine geringere Sensitivität gegenüber dem AICD [29].

Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen wiesen Patienten, die an einer akuten Spender-gegen-Wirts-Reaktion erkrankten, einen signifikant niedrigeren Anteil von CD95-positiven Zellen an der T-Helferzellpopulation auf als Transplantierte ohne GvHD [25].

### 1.3.2. Die CD4/CD25/FoxP3 T-regulatorischen Zellen

Innerhalb der CD4/CD25-positiven T-Zellpopulation liegen die FoxP3 (*Fork head box protein*)-T-regulatorischen Zellen. Simon Sakaguchi et al. beschrieben diese Tregs (T-regulatorische Zellen) bereits 1985 als wichtige Vermittler bei der Aufrechterhaltung einer Toleranz gegenüber einer Reihe von Autoantigenen [30][31]. Bei FoxP3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor in CD4/CD25-positiven T-Zellen. Es besteht aus vier Hauptdomänen. Diese sind wichtig für eine Homo-Oligomerisierung, für die Bindung an andere Transkriptionsfaktoren, Korepressoren und Koaktivatoren sowie für die Wechselwirkungen mit der DNA. Die genauen molekularen Schritte sind bislang noch nicht erforscht. Vermutlich ist unter anderem die Interaktion von FoxP3 mit NF- $\kappa$ B und NFATc2 für die suppressiven Wirkungen auf die T-Zellen verantwortlich [32][33]. Man geht derzeit vom Modell einer Feedback-Regulation bei der Aktivierung und Vermehrung der Tregs aus. Vermutlich stimulieren die Effektorzellen über IL-2 die Proliferation der regulatorischen T-Zellen [34]. In vitro-Ansätze konnten nachweisen, dass reife DCs Tregs aus dem Thymus zur Expansion anregen können. Andere selektive DCs besitzen die Fähigkeit, aus CD25-negativen Zellen FoxP3-positive T-Zellen zu generieren [35][36][37]. Dies geschieht über einen Kynurenin-abhängigen Mechanismus [38]. Dendritische Zellen scheinen umgekehrt aber



auch der Beeinflussung durch regulatorische T-Zellen zu unterliegen [39][40]. Zudem werden B-Zellen durch Tregs getötet [41]. Die Bedeutung des Zellkontaktes bei der Wirkung auf die Effektorzellen scheint gesichert [42][43]. Hierbei spielen unterschiedliche Mechanismen eine Rolle wie beispielsweise der Granzym- und Perforin-induzierte Zelltod oder die Interaktion mit CD80 und CD86 auf den T-Zellen [44][45][46][47]. Read et al. konnten zeigen, dass CTLA-4 (*cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4*) nur von Tregs konstitutiv exprimiert wird und, dass es entscheidend an der Suppressorfunktion mitwirkt [48]. Daneben sind auch humorale Faktoren beteiligt. Zur Rolle der IL-10-Sekretion von Tregs bei der Suppression autoreaktiver Lymphozyten *in vivo* liegen unterschiedliche Ergebnisse vor [42][43][49][50][51]. Die Bedeutung von TGF $\beta$ , vornehmlich der auf der Oberfläche gebundenen Form, bei Vermittlung der Suppressorfunktion *in vivo* scheint gesichert [52]. IL-12 und andere Faktoren sind möglicherweise ebenfalls beteiligt [53][54][55].

Machteld et al. fanden heraus, dass Tregs nicht nur das adaptive Immunsystem beeinflussen, sondern auch die Differenzierung der Monozyten hin zu AAMs (*alternatively activated macrophages*) steuern. AAMs exprimieren vermehrt CD206, CD163, und CCL18, während HLA-DR herunterreguliert wird. Zudem ist das Gleichgewicht von einem proinflammatorischen (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 und MIP-1 $\alpha$ ) zu einem antiinflammatorischen Zytokinprofil verschoben. Die Fähigkeit der Phagozytose ist im Vergleich zu den klassisch aktivierten Makrophagen erhöht [56].

Lange Zeit nahm man an, dass es sich bei den Tregs um Zellen handelt, die ausschließlich innerhalb der CD4/CD25*high*-Population zu finden sind, eine erhöhte Expression von Memory-T-Zellmarkern wie CD45RO aufweisen und empfindlich gegenüber CD95L-vermittelter Apoptose sind. Es konnte gezeigt werden, dass 10–30% innerhalb der CD4/CD25-positiven Tregs apoptoseresistent sind, was ihnen den Namen rTregs (*resistant Tregs*) einbrachte. Interessanterweise haben diese Zellen eine verminderte Expressionsrate von Memory-T-Zellmarkern wie CTLA-4, verschiedenen HLAs, CD103 und CD45RO, während Oberflächenantigene naiver T-Zellen wie CCR7, CD127 und CD31 vermehrt gefunden werden. *Resistant Tregs* befinden sich hauptsächlich innerhalb der CD4/CD25*int.*-T-Zellen. Die Analyse von Nabelschnurblut ergab, dass diese Zellen dort den Hauptanteil der CD4/FoxP3-positiven Lymphozyten bilden, während in adultem peripherem Blut die CD25*high*-Tregs dominieren [57].

In zahlreichen Tiermodellen wurde die Verwendung von T-regulatorischen Zellen zur Verminderung des Auftretens einer akuten GvHD nach Stammzelltransplantation untersucht. Sowohl die gleichzeitige CD4/CD25-Infusion mit dem Transplantat als auch die spätere Gabe

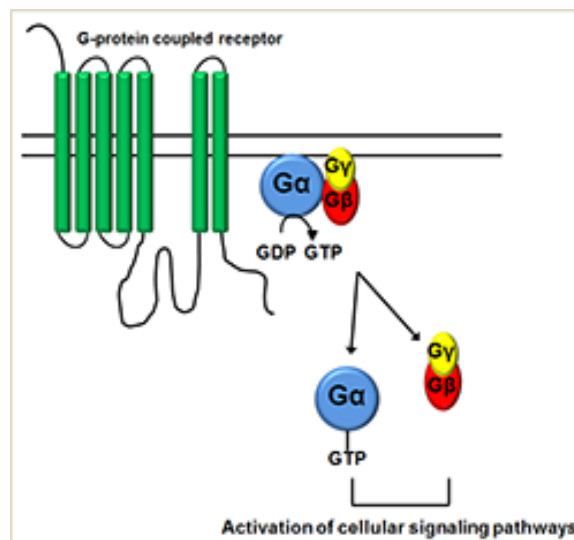
regulatorischer T-Zellen zum Zeitpunkt des Auftretens einer GvHD zeigten Erfolge [58][59]. Stammten die Tregs aus dem Spender, konnte in 100% der Fälle eine GvHD vermieden werden, bei Transfusion CD4/CD25-positiver Zellen aus dem Wirt zusammen mit CD25-negativen CD4-Donorzellen, starben jedoch 90% der Tiere innerhalb von 78 Tagen [60]. Die Befürchtung eines Verlustes des GvL-Effektes nach Gabe von Tregs konnte durch Hoffmann et al. widerlegt werden [61]. In einer Studie wurden Stammzellprodukte vor Infusion mit einem anti-CD25-Immunotoxin behandelt. Dieses als selektive Depletion bezeichnete Verfahren war mit einer deutlichen Reduktion schwerer GvHD-Fälle assoziiert, da sich die CD25-negativen Tregs schnell erholten, während aktivierte T-Zellen eliminiert wurden [62]. Zukünftige therapeutische Möglichkeiten zur Gewinnung von Tregs nach Stammzelltransplantationen umfassen neben der Expansion in vitro durch anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 bzw. IL-4 und IL-15 auch die Umwandlung CD25-negativer Lymphozyten durch TGF- $\beta$ , IL-2 oder IL-10 [63][64][65][66][67][68]. Vor allem in Kombination mit Cyclophosphamid zur Induktion einer Lymphopenie scheint IL-2 das GvHD-Risiko entscheidend zu senken [69][70]. Rapamycin, das wie CsA ebenfalls die Bildung von IL-2 hemmt, hatte jedoch weitaus geringerer Effekte auf die Funktion von Treg-Zellen als der Calcineurininhibitor. Somit könnte Rapamycin ebenfalls entscheidend zur Senkung des GvHD-Risikos beitragen [71][72]. Zahlreiche andere Studien untersuchten das Vorliegen einer Korrelation zwischen dem Anteil der Tregs im peripheren Blut von transplantierten Patienten und dem Auftreten einer chronischen GvHD. Zorn et al. stellten fest, dass Patienten mit aktiver chronischer GvHD einen verminderten Anteil CD4/CD25/FoxP3-positiver Zellen an der Population der CD4-Zellen aufweisen [73][74]. In einer neuen Publikation wurde eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer akuten GvHD und verminderten Anteilen CD4/FoxP3-positiver Lymphozyten gefunden [75]. Untersuchungen von Darmbiopsien ergaben eine Verminderung von Tregs im Gewebe bei GvHD-Patienten [76].

Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose, der aktiven rheumatoiden Arthritis, dem Typ1-Diabetes, der Psoriasis und der Myasthenia gravis konnte eine verminderte Funktion der Tregs festgestellt werden [77][78][79][80][81]. Hingegen fanden sich erhöhte Zahlen an T-regulatorischen Zellen bei verschiedenen Krebsarten wie dem Lungen-, Mamma-, Leber- und Pankreaskarzinom sowie bei Hautkrebs [82][83][84][85]. Ein ähnliches Verhalten zeigten die Tregs von Patienten mit chronischer Hepatitis B und C [86][87].



### 1.3.3. CCR10 auf CD4-positiven Zellen

CCR10 (*chemokine [CC-motif] receptor 10*) ist auch unter dem Namen GPR2 (*G-protein-coupled receptor 2*) bekannt und wird im Körper an verschiedensten Stellen wie dem Gehirn, dem Dünndarm, dem Hoden, der Plazenta und der Leber des Fetus exprimiert. In der Haut findet sich der Rezeptor vornehmlich auf Melanozyten, Fibroblasten, auf Endothelzellen der kleinen Blutgefäße, auf Langerhans-Zellen und den peripheren mononukleären Zellen wie den T-Lymphozyten, nicht jedoch auf Keratinozyten [88]. Die Bezeichnung GPR2 verrät bereits einiges über die Struktur des Moleküls. Es gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen spielen und entscheidend für Zellwachstum und –differenzierung, für Entzündungsprozesse sowie für Endo- und Exozytose sind. Zudem vermitteln GPRs die Wirkung von Hormonen. CCR10 ist für Prozesse der Chemotaxis verantwortlich. Wie die anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht es aus sieben helikalen Transmembrandomänen, die es in der Zellmembran verankern. Diese sind zusammen mit extrazellulären Domänen an der Bindung des Liganden beteiligt. Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zu einem Verlust der Salzbrücke zwischen der dritten und sechsten Transmembrandomäne und zum Austausch von GDP gegen GTP am G-Protein. Dieses wird nun instabil und dissoziiert in eine  $\alpha$ - und eine  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Ein Netz von Enzymen und Second Messengern führt schließlich zur Signaltransduktion [Grafik 3][89][90].



**Grafik 3:** G-Protein-gekoppelter Rezeptor aus [183].

CCR10 geht Bindungen mit unterschiedlichen Liganden ein. CCL28 (*Chemokine [C-C-motif] ligand 28*) wird beispielsweise von Epithelzellen des Darms, der Lunge, der Brust und der

Speicheldrüsen exprimiert und reguliert die Aufnahme von CCR10-positiven T- und B-Lymphozyten in diese Gewebe. Wang et al. entdeckten großen Ähnlichkeiten zwischen CCL28 und CCL27 [91]. CCL27 (*Chemokine [C-C-motif] ligand 27*), auch unter der Bezeichnung CTACK (*Cuntaneous T-cell-attracting Chemokine*) bekannt, hingegen findet sich auf den Gonaden, im Thymus, in der Plazenta und vornehmlich in den suprabasalen Keratinozyten der Haut [92]. Die Expression unterliegt der Regulation durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [93]. CCL27 spielt auch bei der Aufnahme CD34/CCR10-positiver Zellen aus dem Knochenmark eine Rolle. Es handelt sich hierbei um Keratinozyten, durch deren Migration in geschädigte Hautareale ein beschleunigter Wundheilungsprozess erreicht werden kann [94]. Melanozyten von malignen Melanomen sollen ebenfalls vermehrt CCR10 und CCL27 exprimieren [95]. Homey et al. konnten zeigen, dass die CCL27/CTACK-CCR10-Interaktion zwischen Keratinozyten und CD4-positiven T-Lymphozyten in der Epidermis an der Entstehung entzündlicher Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis, der Psoriasis und dem atopischen Ekzem beteiligt sind [96][97]. Bei Patienten, die nach Stammzelltransplantation eine Haut-GvHD aufwiesen, fanden Faaij et al. einen erhöhten Anteil CD4/CCR10-positiver Zellen innerhalb der CD4-positiven T-Lymphozyten, der im Median 21,7% betrug. Patienten ohne GvHD und gesunde Kontrollgruppen zeigten deutlich niedrigere Anteile im peripheren Blut [98].

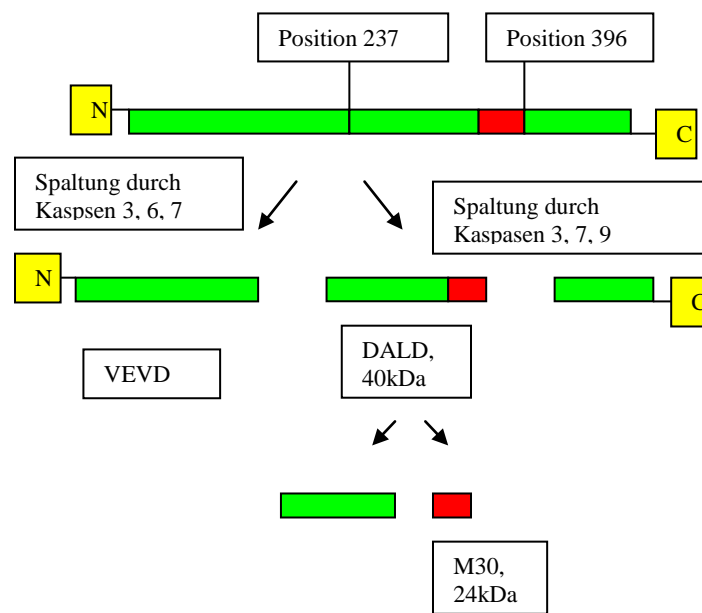
### 1.3.4. Das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf CD8-positiven T-Lymphozyten

Das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin wird auch LPAM-1 (*lymphocyte Peyer patch adhesion molecule*) genannt. Es besteht aus einer 154kDa- $\alpha$ -Kette und einer 130kDa- $\beta$ -Kette, die zusammen ein transmembranöses Heterodimer mit einem kurzen intrazellulären Anteil bilden. Das auf den hochendothelialen Venulen der Peyer Plaques und in der intestinalen Lamina propria gebildete MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) ist der spezifische Ligand des  $\alpha_4\beta_7$ -Integrins. Die Reste 46-386 der  $\beta_7$ -Untereinheit und der Rest 187 der  $\alpha_4$ -Untereinheit nehmen eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit MadCAM-1 ein [99][100][101][102]. Auch VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und Fibronektin können schwache Bindungen mit LPAM-1 eingehen. Das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin wird bei Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen vermehrt exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei deren Aufnahme ins Intestinum. Die vielversprechenden Resultate bei der Behandlung von Affen oder Mäusen, die unter entzündlichen Darmerkrankungen litten, mit monoklonalen Antikörpern gegen das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin oder gegen die  $\alpha_4$ - bzw.  $\beta_7$ -Untereinheit scheinen die

Hypothese zu bestätigen [103][104]. Natalizumab, ein monoklonaler  $\alpha_4$ -Antikörper, wurde auch schon erfolgreich zur Therapie der ulzerativen Kolitis und des Morbus Crohn beim Menschen eingesetzt [105][106][107]. Ähnliches gilt für den Einsatz von anti- $\alpha_4\beta_7$  [108]. Die Blockade von MadCAM-1 zeigte sich wirksam bei der Linderung einer induzierten chronischen Kolitis und bei der Reduktion von Fällen mit akuter Darm-GvHD in Mäusen [104][109]. Die Gabe von  $\alpha_4\beta_7^{-/-}$ -Donor T-Zellen verzögerte die Entwicklung einer akuten intestinalen Spender-gegen-Wirts-Reaktion. Wurden jedoch  $\beta_7^{-/-}$ -Spenderlymphozyten verabreicht, bei denen ein permanenter Verlust der  $\beta_7$ -Untereinheit vorlag, verringerten sich zusätzlich GvHD-assoziierte Morbidität und Mortalität. Nähere Untersuchungen der murinen  $\beta_7^{-/-}$ -T-Zellen ergaben, dass diese hinsichtlich Aktivierung, Proliferation und Zytotoxizität mit den Lymphozyten des Wildtyps vergleichbar sind und sogar eine verstärkte Spender-gegen-Tumor-Reaktivität besitzen [110]. Eine prospektive klinische Studie zeigte, dass eine erhöhte Absolutzahl CD8-positiver Lymphozyten und ein erniedrigter prozentualer Anteil CD8/CD45RA/ $\beta_7$ -positiver T-Zellen zum Zeitpunkt der hämatologischen Rekonstitution mit einem größeren Risiko einer akuten intestinalen Spender-gegen-Wirts-Reaktion einhergeht [111]. Auch  $\beta_7$ -Integrin-positive CD4-Lymphozyten schienen in Mausmodellen an der Induktion einer GvHD des Kolons beteiligt zu sein [112]. Jedoch liegen noch keine Publikationen hinsichtlich Analysen dieser Population im peripheren Blut von Menschen vor. Die Expression von  $\alpha_4\beta_7$  auf Stammzellen ist nach Transplantation entscheidend für deren Aufnahme ins Knochenmark. Zudem konnte das Integrin auch auf Eosinophilen gefunden werden, die im Falle einer allergischen Reaktion innerhalb des Gastrointestinaltrakts vermehrt ins Gewebe aufgenommen werden [113][114].

### **1.4. Der Epithelzellapoptosemarker Zytokeratin 18F**

Das Zytokeratin18 gehört zu den Intermediärfilamenten des Typs I und bildet als Mitglied der sauren TypB-Subfamilie ein Heterodimer mit dem basischen Zytokeratin8 der TypA-Subfamilie. Diese Komplexe finden sich hauptsächlich in Drüsenzellen sowie im einschichtigen und respiratorischen Epithel [115]. In sehr geringen Mengen wird Zytokeratin18 auch in Fibroblasten und in nichtepithelialen Zellen produziert [116]. Es schützt die Leber vor Schäden und Zelltod [117]. Im Zuge der Apoptose spalten die Kaspasen 3, 6 und 7 bzw. 3, 7 und 9 das Zytokeratin18 an den Stellen 237 bzw. 396. Bei Fragmentierung des Strukturproteins an letzterer Position entsteht das C-terminale Neoepitop C18-Asp396-NE, auch CK18F (*cytokeratine 18 fragment*) oder M30 genannt [Grafik 4].



**Grafik 4:** Die Spaltung des Zytokeratins 18 durch die Kaspasen 3, 6, 7, 9.

Dieses wird durch den monoklonalen M30-Antikörper der Firma Peviva sowohl in Gewebeschnitten mittels Immunfluoreszenz als auch im Plasma oder Serum mittels ELISA detektiert. Die Spaltung von Zytokeratin 18 findet in der frühen Phase des Zelltods statt und kann dementsprechend im Gewebe zu Beginn des Zellschadens, bereits ein bis sechs Stunden nach Zelltodinduktion, sichtbar gemacht werden. Zu späteren Zeitpunkten der Apoptose lässt sich CK18F im Serum oder Plasma nachweisen. Mittels Gelelektrophorese der Zelllysate ergeben sich zwei Proteinbanden mit etwa 40 kDa und 24 kDa, die beide den M30-Antikörper binden. Während das 40 kDa-Peptid in der frühen Apoptose vorherrscht, findet sich die 24 kDa-Bande überwiegend zu späteren Zeitpunkten. Dies deutet auf eine weitere Spaltung des DALD-Proteins hin, bei dem das kleinere Zytokeratin 18-Fragment mit erhaltenem Neoepitop entsteht. M30 stellt eine charakteristische Abfolge von zehn Aminosäuren am C-Ende der DALD-Struktur dar [118].

Seidel et al. stellten eine Korrelation zwischen CK18F-Werten in Leberbiopsien und dem jeweiligen Steatosegrad bei HCV-infizierten Patienten fest [119]. Da  $\text{INF}\alpha$ ,  $\text{INF}\beta$ , und  $\text{INF}\gamma$  die Expression von Todesrezeptoren, Todesrezeptorliganden und einiger Kaspasen induzieren und Interferone gleichzeitig eine wichtige Rolle in der Therapie der HCV-Infektion einnehmen, wurde auch das Vorliegen einer Korrelation zwischen dem Ansprechen auf eine Interferontherapie und der Höhe von Apoptosemarkern im Serum untersucht. HCV-Patienten, bei denen die Therapie erfolgreich war, hatten höhere CK18F-Werte vor und innerhalb der

ersten drei Tage nach Therapiebeginn [120]. Erhöhte M30-Konzentrationen bei Patienten mit nichtseminösem Hodenkarzinom vor Therapiebeginn und ein Fehlen des Peaks nach Verabreichung der Chemotherapeutika gehen mit einer schlechteren Prognose einher [121]. Das Mamma-, das Kolon-, das Mundhöhlen- und das Bronchialkarzinom sind mit dem Auftreten erhöhter CK18F-Serumspiegel assoziiert [122][123][124][125][126].

Die vorliegende Arbeit knüpft jedoch an eine Veröffentlichung von Thomas Luft et al. an, in der erhöhte CK18F-Serumwerte bei Patienten mit akuter oder chronischer GvHD des Darmes (347 U/L – 1276 U/L) und der Leber (480 U/L – 6880 U/L) im Vergleich zu Serumproben vor Konditionierung (114 U/L – 463 U/L) beschrieben wurden. Zudem zeigte die Heidelberger Studie ein Abfallen der CK18F-Werte bei Therapieansprechen, wenngleich zum Zeitpunkt des Absetzens der Immunsuppressiva die Serumspiegel des Apoptosemarkers noch deutlich über dem Ausgangsniveau lagen. Von großer klinischer Relevanz ist die Abgrenzung von Differentialdiagnosen wie der VOD, der unkomplizierten Enteritis und der toxischen Mukositis nach *low dose* Chemotherapie gegenüber der Spender-gegen-Wirts-Reaktion, bei der die CK18F-Spiegel deutlich höher lagen. Während bei früher GvHD-Manifestation sowohl die Bilirubin- als auch ALAT- und CK18F-Werte streng mit dem Schweregrad korrelierten, war bei spätem Auftreten im Gegensatz zu CK18F kein Zusammenhang zwischen Bilirubinanstieg und Stärke der Spender-gegen-Wirts-Reaktion erkennbar [127].

### **1.5. Aufgabenstellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung der unter 1.3 und 1.4 vorgestellten zellulären und serologischen Marker für die Vorhersage, die Frühdiagnose, die Ausprägung, das Therapieansprechen und die Rezidivwahrscheinlichkeit einer akuten GvHD zu klären.

## **2. Material und Methoden**

Der Einsatz aller in dieser Arbeit verwendeten Materialien erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

### **2.1. Patientenkollektiv**

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 75 Patienten mit hämatologischen Neoplasien eingeschlossen, die im Zeitraum zwischen März 2008 und August 2009 eine Stammzelltransplantation in der Abteilung für Hämatologie/Internistische Onkologie am Universitätsklinikum Regensburg erhielten. Nähere Angaben zu Geschlechterverteilung, Alter, Diagnose, Stammzellquelle, HLA-Kompatibilität und GvHD-Prophylaxe können Tabelle 4 entnommen werden.

Alle Patienten, die an der Studie teilnahmen, willigten zuvor schriftlich in die Verwendung ihrer Blutproben zur Erforschung von Markern der akuten *graft-versus-host disease* ein.

22 gesunde, nicht transplantierte Personen dienten als Kontrollkollektiv. Die älteste Person war zum Zeitpunkt der Blutentnahme 83 Jahre alt, die jüngste 21 Jahre. Zwölf der Kontrollen waren weiblich, zehn hingegen männlich.

Speziell für die Bestimmung der M30-Werte wurden zusätzlich alte Serumproben von 20 Patienten mit gesicherter Leber und/oder Darm-GvHD vermessen. Die Daten dieser Patienten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

<b>Patient:</b>	<b>Geschlecht:</b>	<b>Alter:</b>	<b>Diagnose:</b>	<b>Stammzell-Quelle:</b>	<b>HLA-Kompatibilität:</b>	<b>GvHD-Prophylaxe:</b>
1	female	67,30	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
2	female	47,30	MM	PBSC	Sibling/ident.	CsA/MTX
3	male	63,50	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
4	female	45,90	CML	PBSC	urd/missm.	CsA/MTX
5	male	24,60	AML	PBSC	mother/hapl.	CsA/MMF
6	male	45,80	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
7	male	57,00	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
8	female	34,60	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
9	male	44,30	MM	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
10	male	65,20	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
11	female	61,10	MM	PBSCkryo	urd/ident.	CsA/MTX
12	male	43,00	AML	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
13	male	44,40	MM	PBSCkryo	sibling/ident.	CsA/MTX
14	male	57,10	CLL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
15	male	61,80	CLL	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF

## 2 Material und Methoden

Patient:	Geschlecht:	Alter:	Diagnose:	Stammzell-Quelle:	HLA-Kompatibilität:	GvHD-Prophylaxe:
16	female	34,30	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
17	male	57,10	MDS	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
18	male	68,20	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
19	female	69,00	Mantelzell-L.	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
20	female	21,40	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
21	female	22,60	ALL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
22	male	36,40	MM	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
23	female	33,50	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
24	male	58,70	MDS	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
25	male	60,30	MM	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
26	male	60,60	MDS	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
27	female	64,90	MDS	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
28	male	49,90	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
29	male	59,80	MM	PBSC	urd/missm.	CsA/MMF
30	male	53,20	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
31	male	27,60	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
32	female	18,00	MPS(ET)	PBSC	urd./missm.	CsA/MTX
33	male	32,20	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
34	male	39,20	folL.-NHL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
35	female	64,30	MPS(PCV)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
36	male	61,60	AML	PBSC	urd./missm.	CsA/MTX
37	male	57,30	CML	PBSC	urd./missm.	CsA/MTX
38	male	56,70	T-Zell-L.	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
39	male	52,30	CMML(prim) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
40	female	65,30	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	FK506/MMF
41	female	55,30	AML	PBSC	sibling/ident.	CyA/MMF
42	female	51,40	AML	PBSC	urd/ident.	CyA/MMF
43	male	49,40	T-Zell-L.	PBSCkryo	urd/ident.	CsA/MTX
44	male	54,30	ALL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
45	male	26,00	CML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
46	female	39,60	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
47	male	56,00	T-Zell-L.	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
48	female	67,40	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
49	male	47,70	MM	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX

## 2 Material und Methoden

Patient:	Geschlecht:	Alter:	Diagnose:	Stammzell-Quelle:	HLA-Kompatibilität:	GvHD-Prophylaxe:
50	female	52,80	fol.-NHL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
51	male	34,30	T-Zell-L.	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
52	female	38,80	AML	PBSCkryo	urd/ident.	CsA/MMF
53	male	66,10	AML	PBSCkryo	urd/ident.	CsA/MTX
54	male	51,40	CML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
55	female	57,80	MPS(OMF)	PBSC	urd/missm.	CsA/MTX
56	female	21,90	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
57	male	59,50	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
58	female	53,10	CMML(prim) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
59	male	17,50	ALL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
60	male	31,90	T-Zell-L.	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
61	male	52,50	CLL	PBSC	urd/missm.	CsA/MTX
62	female	45,70	fol.-NHL	PBSC	urd/missm.	CsA/MTX
63	female	42,10	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
64	male	57,00	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/missm.	CsA/MTX
65	male	52,20	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
66	male	63,00	MM	PBSC	urd/ident.	MTX
67	male	33,10	T-Zell-L.	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
68	male	48,50	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
69	male	60,70	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
70	female	61,10	ALL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
71	male	50,30	MM	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
72	female	43,30	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
73	female	39,90	AML	PBSC	urd/missm.	CsA/MTX
74	male	58,60	CLL	PBSC	urd/ident.	CsA
75	female	62,90	AML	PBSC	urd/missm.	CsA/MMF

Tab .4: Patientenmerkmale.

Patient:	Geschlecht:	Alter:	Diagnose:	Stammzell-Quelle:	HLA-Kompatibilität:	GvHD-Prophylaxe:
76	female	53,2	CML	marrow	urd/missm.	CsA/MTX
77	male	56,2	OMF(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/missm.	CsA/MMF
78	male	56,7	AML	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF



Patient:	Geschlecht:	Alter:	Diagnose:	Stammzell-Quelle:	HLA-Kompatibilität:	GvHD-Prophylaxe:
79	male	20,5	ALL	PBSC	urd/ident.	FK506
80	male	29,2	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
81	female	47,2	CML	PBSCkryo	sibling/ident.	CsA/MTX
82	female	68,6	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
83	male	53,6	ET(prim.) OMF(sek.)	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
84	female	17,0	AML	marrow	urd/ident.	CsA/MTX
85	female	56,6	OMF	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
86	male	45,1	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
87	male	56,9	MM	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
88	male	39,0	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MTX
89	male	38,6	ALL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MTX
90	male	48,9	fol. NHL	PBSC	sibling/ident.	CsA/MMF
91	female	57,7	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
92	female	41,6	MDS(prim.) AML(sek.)	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
93	male	19,5	NHL	marrow	urd/ident.	CsA/MMF
94	male	40,1	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF
95	female	61,0	AML	PBSC	urd/ident.	CsA/MMF

**Tab. 5:** Patientenmerkmale der älteren GvHD-Proben.

### 2.2. Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte aus den Armvenen mithilfe gewöhnlicher Kanülen. Die Proben für die FACS-Analyse wurden in Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt. Die Aufarbeitung des Blutes fand meist binnen einiger Stunden, spätestens jedoch am folgenden Tag statt. Zur Gewinnung der Proben für Untersuchungen mittels ELISA dienten Serumröhrchen. Obwohl bei neuen Studien im Gegensatz zu Plasmaanalysen keine Veränderungen der M30-Werte nach zweistündiger Inkubation feststellbar waren [128], wurden die Serumproben im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglichst innerhalb von zwei Stunden bei 3000 rpm für zehn Minuten bei 18°C zentrifugiert und bei –20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die M30-Messung erfolgte, sobald genügend Samples zur Belegung einer ELISA-Platte gesammelt waren. Die längste Aufbewahrungszeit einer Probe betrug drei Monate und neun Tage. Hinsichtlich der Vermessung der alten Samplebestände des Labors, die nicht selbst gesammelt wurden, war die Möglichkeit der

frühen Analyse nicht gegeben. Die älteste Probe war zum Zeitpunkt der Vermessung sechs Jahre alt.

Sowohl das Serum als auch das Blut zur durchflusszytometrischen Analyse wurden nach Transplantation bei Erreichen eines Leukozytenwertes  $>1000/\mu\text{L}$ , bei einem CsA-Spiegel von  $<100\text{ng/mL}$ , nach Absetzen von CsA und vier, acht und zwölf Wochen nach Beendigung der Sandimmun<sup>®</sup>-Therapie abgenommen. Im Falle einer GvHD erfolgte die Blutentnahme vor Anfang oder Erhöhung einer Steroidtherapie, etwa vier Tage nach Therapiebeginn und nach Reduktion der Steroide  $<20\text{mg/d}$ .

Aufgrund der festgelegten Ambulanztermine der Patienten und der sehr schweren Diagnosesicherung einer GvHD konnten die Abnahmezeitpunkte nicht immer exakt eingehalten werden. So war beispielsweise die Blutentnahme bei GvHD bisweilen nur bereits am dritten Tag oder erst am fünften Tage nach Beginn der Steroidtherapie möglich.

### **2.3. Zählverfahren**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte gleichzeitig auch die Vergleichbarkeit der Leukozytenzählung unter dem Mikroskop und der Bestimmung der weißen Blutkörperchen im Labor untersucht werden. Daher sind im Anhang zusätzlich die Absolutwerte der einzelnen Zellpopulationen angegeben, die unter Berechnung auf Grundlage der in der Zählkammer selbst ermittelten Leukozytenzahlen entstanden sind. Die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl des im Verhältnis 1:4 mit Bromthymolblau verdünnten Blutes erfolgte in der Neubauer-Zell-Zählkammer. Die Summe der Zellen aller Quadranten wurde anschließend durch vier geteilt und zur Angabe des Leukozytengehalts in einem Nanoliter Blut mit 0,05 multipliziert.

### **2.4. Durchflusszytometrische Analysen**

#### **2.4.1. Isolierung der Leukozyten**

Zur Isolierung der Leukozytenpopulation mussten die roten Blutkörperchen lysiert werden. Im Falle der Oberflächenfärbungen erfolgte die Erythrozytenlyse durch Versetzen des Vollblutes mit 1:6 verdünntem ACK-Puffer. Pro *Tube* wurde zu 200  $\mu\text{L}$  Blut je 1 mL der ACK-Lösung hinzugegeben und danach mit der Pipette resuspendiert. Anschließend kam ein weiterer mL ACK-Lösung hinzu. Nach fünfminütiger Inkubation und Stoppen des Lysevorgangs mit PBS wurden die Röhrchen bei 1200 rpm für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände zur Isolation der Zellpellets abgesaugt. Die Lyseschritte

wurden wiederholt und die Leukozyten durch Waschen des Zellpellets mit je 2 mL PBS gereinigt.

Bei der intrazellulären Färbung mussten die Antikörper zur Detektion der Oberflächenantigene CD4 und CD25 vorab 20 Minuten inkubieren und mit je 2 mL FACS-Puffer ausgewaschen werden. Anschließend erfolgte durch Zugabe von Fix- und Perm-Puffer, der im Verhältnis 1:3 mit Diluent verdünnt wurde, die Erythrozytenlyse und die Steigerung der Membranpermeabilität. Nach 30 Minuten wurde die Lösung mit FACS-Puffer ausgewaschen. Durch zweimalige Zugabe von je 2 mL Permeabilization Buffer (im Verhältnis 1:9 mit Aqua destillata verdünnt) wurde die Zellmembran der Leukozyten noch durchgängiger gemacht.

### 2.4.2. Zugabe der Antikörper

Zunächst wurde das Zellpellet jedes Tubes in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert. Betrug die Leukozytenzahl eines Patienten weniger als 1000 Leukozyten/µL Blut oder war ein geringer Lymphozytenanteil bekannt, so mussten zur Färbung eines Ansatzes jeweils zwei bzw. drei Röhrchen angesetzt und vor der Zugabe der Antikörper vereint werden, um eine genügend hohe Zellausbeute zu erhalten. Die Inkubationszeit der Antikörper betrug 20 Minuten. Das Panel der Oberflächenfärbung ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Tube:	Antikörper gegen:	Konjugation des Antikörpers:	Antikörpermenge [µL]:
1	CD95 CD25 CD4	FITC PE APC	10 10 1
2	CD25 CD8	PE APC	10 1
3	CD8 β <sub>7</sub> -Integrin CD45RA	FITC PE APC	5 20 1,5
4	CD4 CCR10	APC PE	1 10

Tab. 6: Panel der Oberflächenfärbung.

Wie bereits erwähnt, wurden für die Detektion der Treg-Zellen vor der Lyse die Antikörper gegen CD4 und CD25 zugegeben. Nach Erhöhung der Zellmembranpermeabilität wurde das Zellpellet in 100 µL Permeabilization Buffer gelöst und 15 Minuten mit 2 µL Rattenserum versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Ohne

Zwischenschritt erfolgte die Inkubation mit dem FoxP3-Antikörper bzw. mit dessen Isotyp für 30 Minuten [Tab. 7].

Tube:	Antikörper gegen:	Konjugation des Antikörpers:	Antikörpermenge [µL]:
5	CD4	FITC	10
	CD25	APC	4
	FoxP3	PE	20
6	CD4	FITC	10
	CD25	APC	4
	IgG2a	PE	20

**Tab. 7:** Panel der intrazellulären Färbung.

Die verwendete Menge des jeweiligen Antikörpers wurde zuvor jeweils durch Titration ermittelt.

### 2.4.3. Messung mit dem Durchflusszytometer

Die Messungen wurden an einem *FACS-Calibur*-Gerät der Firma *Becton Dickinson* im Labor der Abteilung der Hämatologie/Onkologie der Klinik für Innere Medizin I am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Zellen aufgrund der Zellgröße, der Zellgranularität und aufgrund von Leukozytendifferenzierungsantigenen und intrazellulären Antigenstrukturen, die mit fluoreszierenden Antikörpern markiert werden. Bei der Messung werden die Zellen, die sich in einem Proberöhrchen befinden, angesaugt und von Trägerflüssigkeit erfasst, so dass nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ein Strom einzelner Zellen entsteht, der einen Laserstrahl passiert. Das in einem geringen Winkel (3– 10°) gestreute Licht wird Vorwärtsstreulicht (*FSC = forward scatter*) genannt und korreliert mit der Zellgröße. Das um 90° von den Zellen reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*SSC = side scatter*) bezeichnet und gibt die Granularität der Zelle wieder. Das verwendete *FACS-Calibur-Gerät* verfügt über einen Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm entsendet und damit die Fluorochrome *FITC* (*Fluoreszeinisothiocyant*), *PE* (*Phycoerythin*) und *PerCP* (*Peridin chlorophyll protein*) anregt. Über einen zweiten Diodenlaser der Wellenlänge 635 nm kommt es zur Anregung des Farbstoffes *APC* (*Allophycocyanin*). Das von den verschiedenen Fluorochromen emittierte Licht wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und von sog. Fotomultipliern, Sensoren unterschiedlicher Wellenlängen, in einzelnen Fluoreszenzkanälen bei 530 nm (F1), 585 nm

(F2), >650 nm (F3) und 670 nm (F4) detektiert. Durch Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben, fallen dann auf das Ausgangsniveau zurück und emittieren Licht höherer Wellenlänge. Dieses Phänomen bezeichnet man als Fluoreszenz. Das optische Signal wird zunächst verstärkt und in ein digitales Signal umgewandelt. Die Verstärkung der FSC- und SSC-Signale erfolgt linear, die der Fluoreszenzkanäle logarithmisch.

Mittels des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts lassen sich die Leukozytenpopulationen der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterscheiden. Letztere können hinsichtlich ihrer durch fluoreszierende Antikörper markierten Antigene näher klassifiziert werden.

Bevor mit dem Durchflusszytometer gemessen werden konnte, musste es kompensiert werden, um die durch das breite Emissionsspektrum der Fluorochrome bedingte überlappende Strahlung in verschiedene Fluoreszenzkanäle möglichst gering zu halten.

Vor der Messung der Proben wurden die gefärbten Zellen nach Auswaschen der Antikörper in jeweils 300 µL FACS-Puffer gelöst. Durch Zugabe von 30 µL *PI* (*Propidiumiodid*) in jedes *Tube* konnten bereits tote Leukozyten bei der Auswertung sichtbar gemacht werden. Dieser Farbstoff kann nur die perforierte Zellmembran von toten Zellen durchdringen und wirkt als Nukleinsäureinterkalator. Mit *PI* gefärbte, tote Leukozyten werden im FL3-Kanal detektiert.

Im Falle der intrazellulären Färbung konnte *PI* nicht zur Lebend-Tot-Diskriminierung verwendet werden, da die Zellmembran durch die zuvor verwendeten Reagenzien bereits permeabel gemacht worden war.

Für die FoxP3-Analyse wurde jeweils ein Röhrchen mit dem entsprechenden Isotyp IgG2a mitgefärbt, um eventuelle unspezifische Bindungsstellen des *PE*-konjugierten FoxP3-Antikörpers sichtbar zu machen.

Die Speicherung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software *Cellquest* von *Becton Dickinson*.

### 2.4.4. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Flow Jow* der Firma *Apple*. Durch Setzen sog. *Gates* wurden die untersuchten Lymphozytenpopulationen näher eingegrenzt. Die Prozentzahlen bezogen sich jeweils auf den Anteil am vorangehenden Gate. Durch Multiplikation der einzelnen Dezimalzahlen wurde der Anteil an der Gesamtheit der

mononukleären Zellen im peripheren Blut, den *PBMNCs* (*peripher blood mononuclear cells*), ermittelt.

Beim Setzen der einzelnen *Gates* war zunächst die Eliminierung sämtlicher Erythrozyten und sonstigen „Zellschrotts“ notwendig. Im Falle der Oberflächenfärbung erfolgte im zweiten Schritt die Ausgrenzung toter Zellen, bevor innerhalb der lebenden Leukozyten die *PBMNCs* eingegrenzt werden konnten. Ein Beispiel einer vollständigen Auswertung zeigt Grafik 5.

### 2.4.5. Statistik

Statistische Berechnungen erfolgten mit SPSS Version 17. Zur Signifikanzprüfung der Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurde der *Mann-Whithney-U-Test* verwendet.

## **2.5. Bestimmung der CK18F-Werte im Serum**

### **2.5.1. Prinzip des M30-Apoptosense ELISA**

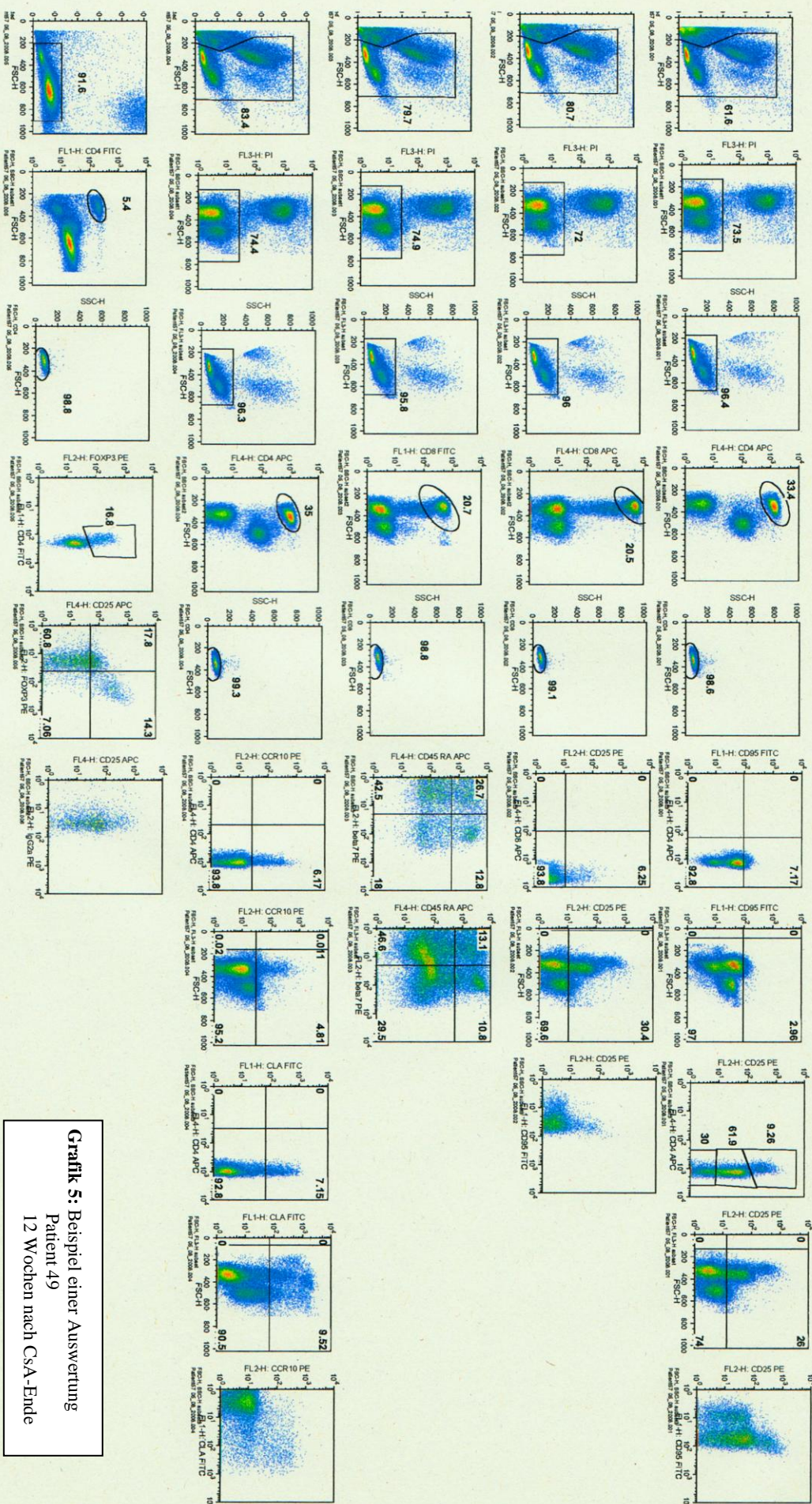
Zur Detektion des CK18F im Serum von Patienten und Kontrollen wurde der *M30-Apoptosense ELISA* der Firma *Peviva* verwendet.

Die 96 *Wells* der Platte sind mit dem M5-Antikörper „*gecoated*“, der gegen das CK18-Fragment gerichtet ist und dieses nach Zugabe des Serums bindet. Um das bei der Spaltung im Rahmen der Apoptose entstandene CK18F zu messen, wurde der spezifisch gegen das Neopepitop gerichtete, *HRP* (*horse radish peroxidase*)-konjugierte Antikörper M30 zugegeben. Durch mehrere Waschschrte erfolgte die Entfernung von ungebundenem Konjugat. Die Peroxidase des Antikörpers reagiert mit dem TBM (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrat. Die Reaktion wurde gestoppt und die Menge des durch Oxidation des Substrats entstandenen Produkts durch Absorption von Licht der Wellenlänge 450 nm gemessen. Über eine Standardkurve, in der bekannte Konzentrationen des Antigens gegen die gemessene Absorbanz aufgetragen waren, ließ sich der CK18F-Wert im jeweiligen Serum bestimmen.

### **2.5.2. Ansetzen des ELISAs**

Alle Reagenzien und Seren kamen erst nach Erreichen der Raumtemperatur ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) zum Einsatz und mussten vor Gebrauch gevortext werden. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter der Sterilbank statt.





Das M30-HRP-Konjugat wurde im Verhältnis 1:23 mit dem M30-Konjugat-Dilutionspuffer verdünnt. Zunächst wurden jeweils 25 µL der Standards A-G, der *Low*- und *High-Control* sowie der Proben in jedes *Well* gegeben, wobei stets Doppelbestimmungen erfolgten. Nach Zugabe von je 75 µL des verdünnten Konjugats wurde die Platte mit der beigefügten Klebefolie abgedeckt und bei 600 rpm für vier Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen *Wells* fünfmal mit jeweils 250 µL der im Verhältnis 1:9 mit Aqua destillata verdünnten Waschlösung gespült. Danach folgte die Inkubation für 20 Minuten mit je 200 µL TBM-Substrat im Dunkeln bei Raumtemperatur. Um die Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat zu beenden, wurden in jedes *Well* 50 µL der Stoplösung zugegeben.

### 2.5.3. Messung der CK18-Werte

Innerhalb von 30 Minuten erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im *Reader*. Die Auswertung wurde mit dem Programm *Softmax Pro* der Firma *Molecular Devices* vorgenommen. Nach Angabe der Standardwerte stellte das Programm die gemessenen Werte in einer logarithmischen Kurve dar und gab die Konzentrationen der Proben sowie der *Low*- und *High-Control* an, wobei sich aus den Doppelbestimmungen der jeweilige Mittelwert ergab. Waren die Kontrollen im angegebenen Bereich und lagen die gemessenen Punkte auf der Kurve, so wurden die Werte als verlässlich eingestuft.

Proben, deren Werte bei der Messung oberhalb des höchstens Standards von 1000 U/L lagen, wurden im Verhältnis 1:5 und 1:10 mit einem Kontrollserum der Konzentration 0 U/mL, das die Firma *Peviva*

bereitstellte, verdünnt. Nach Multiplikation der hierbei erhaltenen Spiegel mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor wurde der Mittelwert aus beiden Konzentrationen für die Analysen verwendet.

### 2.5.4. Statistik

Auch hier erfolgte die Berechnung statistischer Größen mit SPSS 17. Zur Prüfung der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz diente der *Mann-Whithney-U-Test*.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Schritte der Datenanalyse**

Bei den Patientenproben zu den Abnahmezeitpunkten Leukozyten  $>1000/\mu\text{L}$ , CsA  $<100\text{ ng/mL}$ , CsA-Ende und vier, acht, zwölf Wochen nach Absetzen von CsA wurde differenziert zwischen Patienten, die im weiteren Verlauf eine akute oder chronische GvHD entwickelten und solchen, bei denen nie eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion auftrat. Hierbei fand bei bestimmten Zellpopulationen bzw. dem CK18F auch eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Manifestationsorten bei Reaktion statt.

Werte von Transplantierten, die bei Probengewinnung bereits eine GvHD aufwiesen, wurden vor Steroidbeginn, vier Tage später und nach Reduktion der täglichen Prednisondosis unter 20 mg mit entsprechenden Zahlen von Transplantierten verglichen, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Spender-gegen-Wirts-Reaktion vorlag. Bei den Fällen mit einer *graft-versus-host disease* erfolgte die Einteilung in eine frühe und eine späte Form. Manifestationen vor Senkung des CsA-Spiegels unter  $100\text{ ng/mL}$  wurden als früh, alle anderen als spät klassifiziert. Als Vergleichskollektiv für Erstere dienten Patientenproben bei Take, CsA  $<100\text{ ng/mL}$  und Ende der CsA-Prophylaxe. Patienten mit später GvHD wurden mit den Proben nach Absetzen von CsA verglichen. Für die Analyse des Verhaltens von fraglich organspezifischen Markern wie den CD8/ $\beta_7$ /CD45RA- und CD4/CCR10-positiven Zellen sowie dem CK18F erfolgte die zusätzliche Einteilung in unterschiedliche Manifestationsorgane. Zu jedem Zeitpunkt bildeten die Werte hämatologisch Gesunder ein Vergleichskollektiv.

Als statistische Größen dienten sowohl der Mittelwert M als auch der Median. Zudem wurden jeweils die Standardabweichung s und das Signifikanzniveau p angegeben.

Durch anschließende Ermittlung der jeweiligen Werte unter Zusammenfassung der Abnahmezeitpunkte nach Take innerhalb der Nicht-GvHD-Proben bzw. der frühen und späten Spender-gegen-Wirts-Reaktion innerhalb der GvHD-Patienten konnten größere Gruppen gebildet werden.

#### **3.2. Hinweise zur Darstellung der Ergebnisse**

Im Folgenden werden die Gesamtzahl der Leukozyten und der PBMNCs (*peripheral blood mononuclear cells*) innerhalb der verschiedenen Gruppen analysiert. Zusätzlich sind die relativen Werte der einzelnen Subpopulationen bezogen auf die Gesamtheit der PBMNCs,

die Absolutzahlen der Zellgruppen sowie deren Anteile an den CD4- bzw. CD8-positiven Lymphozyten dargestellt. Aufgrund anderer Settings bei der FACS-Analyse der FoxP<sub>3</sub>-positiven Zellen ergibt sich im *Forward-/Sideward-Scatter* ein anderes Bild, welches sich nicht zur Eingrenzung der PBMNCs eignet. Hier wurde das erste Gate direkt auf die T-Helferzellen gesetzt. Relativwerte beziehen sich folglich auf die Population der Leukozyten und nicht auf die der PBMNCs.

Einige Ergebnisse sind nach den jeweiligen Ausführungen in einem Histogramm graphisch dargestellt. Es wurden hierin jeweils die Mittelwerte eingezeichnet. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte zwischen Patienten und hämatologisch gesunden Kontrollen sind gestrichelt umrahmt. Werte mit durchgezogener Umrahmung markieren die signifikanten Unterschiede zwischen GvHD- und Nicht-GvHD-Patienten.

### 3.3. Anzahl der Leukozyten und der PBMNCs

	n:	M Leukos:	Med. Leukos:	S Leukos:	M PBMNCs:	Med. PBMNCs:	s PBMNCs:
Take ges.:	31	<u>3119,36</u>	1900	559,16	<u>1334,94</u>	802	236,61
Take gvhd:	20	2699,50	1835	607,84	964,11	747,50	140,68
Take non gvhd:	11	3882,73	2080	235,13	2009,18	1604,00	578,36
CsA<100 ges.:	12	9744,17	5470,00	4580,41	2288,46	2375	326,46
CsA<100 gvhd:	11	9972,72	5290	5014,7	2194,46	2375	349,85
CsA<100 non gvhd:	1	5590	5590	/	1917	1917	/
CsA Ende ges.:	9	3724,17	3965	399,66	1964,92	1572,50	403,84
CsA Ende gvhd:	6	4561,67	4475	444,24	2149,33	2087,50	568,05
CsA Ende non gvhd:	3	3156,67	2770	831,09	2894,33	2318	815,03
+4Wo ges.:	6	3086,67	3165	385,80	<u>1003,50</u>	787,50	201,39
+4Wo gvhd:	4	2795	2795	460,66	709,00	698,00	50,63
+4Wo non gvhd:	2	3670	3670	670	1592,50	1592,50	269,50
+8Wo ges.:	7	3685,71	3670	488,18	1680	1064	511,41
+8Wo gvhd:	5	3522	2760	677,46	999,27	986,37	214,25
+8Wo non gvhd:	2	4095	4095	425	3382	3382	989
+12Wo ges.:	7	<u>3258,57</u>	3090,00	447,56	<u>1535,43</u>	1403	379,02
+12Wo gvhd:	5	3218	2950	641,81	1169,20	879,00	272,94
+12Wo non gvhd:	2	3360	3360	270	2451,00	2451,00	1048
Zusammenf. ges.:	41	5370,00	3805,00	1417,01	<u>1882,03</u>	1666,00	187,26
Zusammenf. gvhd:	31	5916,00	4050,00	1883,38	<u>1661,01</u>	1181,00	205,00
Zusammenf. non gvhd:	10	3731,00	3650	342,25	<u>2545,10</u>	2117,50	369,35
Kontrollen:	22	<u>4650,64</u>	4550,00	235,13	<u>2277,27</u>	2330	138,88

Tab. 8: Leukozyten- und PBMNC-Werte nach Transplantation

### 3.3.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

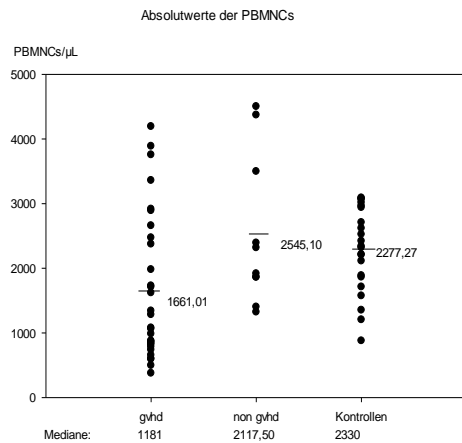
Während sich bei der Analyse der Leukozytenzahlen zu den verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen Transplantierten mit und ohne Entwicklung einer späteren akuten oder chronischen GvHD ergaben, zeigte die Gruppe der Patienten nach Stammzelltransplantation unabhängig vom Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion im Vergleich zu den Normalpersonen (M:4650,64/ $\mu$ L; s:235,13/ $\mu$ L; n=22) signifikant niedrigere Leukozytenwerte zum Zeitpunkt Leukozyten >1000/ $\mu$ L (M: 3119,36/ $\mu$ L; s:559,16; n:31) (p:0,00) und 12 Wochen nach Absetzen von CsA (M:3258,57/ $\mu$ L; s:447,56; n:7) (p:0,009).

Die PBMNCs umfassen die Gruppe der Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen. Da die Lymphozyten nach Transplantation hämatopoietischer Stammzellen bekanntermaßen lange Regenerationszeiten aufweisen und ihnen bei der Pathogenese der GvHD eine entscheidende Bedeutung zukommt, wurden in der vorliegenden Arbeit auch ihre Absolutzahlen innerhalb der verschiedenen Kollektive näher analysiert.

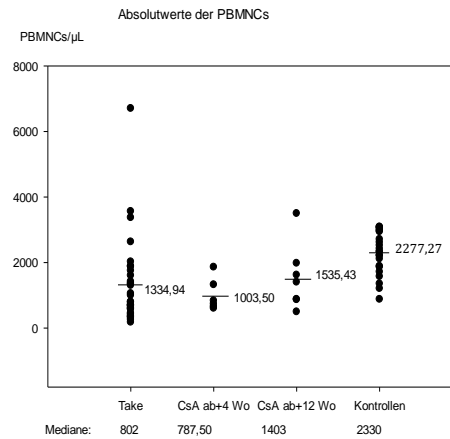
Sie schienen zu beinahe allen Zeitpunkten nach Transplantation bei Patienten mit späterer Entwicklung einer GvHD gegenüber der Gruppe ohne Reaktion niedriger zu sein, jedoch erreichten die Abweichungen keine statistische Signifikanz. Fasste man aber die Abnahmezeitpunkte nach CsA<100 ng/mL zusammen, ergaben sich signifikante Unterschiede bei Transplantierten mit und ohne Manifestationsentwicklung im Verlauf (siehe Abbildung 1).

Beim Vergleich der Werte der Normalpersonen mit denen aller Transplantierten unabhängig vom späteren Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion zeigten sich bei Take, vier Wochen, zwölf Wochen nach Ende der CsA-Prophylaxe und bei Zusammenfassung aller Abnahmezeitpunkte nach CsA<100 signifikant niedrigere PBMNC-Zahlen (siehe Abbildung 2).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 1:** Mittelwerte /Verteilung bei Zusammenf. aller Werte nach Red. von CsA unter 100 ng/mL.  
p(gvhd vs. non gvhd):0,023.



**Abb. 2:** Mittelwerte/Verteilung bei Take, 4 und 12 Wo nach CsA-Ende  
p(Take vs. Kont.): 0,00, p(CsA ab+4Wo vs. Kont.): 0,001,  
p(CsA ab+12Wo vs.Kont.):0,039.

### 3.3.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und mit Normalpersonen

	n:	M Leukos:	Med. Leukos	S Leukos:	M PBMNCs:	Med. PBMNCs:	S PBMNCs:
frühe GvHD vor IS:	22	3175,00	2500,00	626,04	1523,86	1100,00	488,39
frühe GvHD d+4:	21	4922,86	3890,00	844,18	1234,87	748,00	309,22
frühe GvHD IS<20	19	6042,63	5730,00	683,79	1728,14	1220,00	188,75
späte GvHD vor IS:	3	3113,33	4070,00	1257,86	733,33	749,00	219,82
späte GvHD d+4:	7	7265,71	1070,00	1803,27	2239,06	678,00	1009,29
späte GvHD IS<20:	9	5336,67	4950,00	600,82	1903,33	1520,00	344,67
non gvhd früh:	51	4791,57	3060,00	1164,49	1728,14	1342,00	188,75
non gvhd spät:	27	3534,44	3630,00	234,97	1717,79	1323,00	233,64
Kontrollen:	22	4650,64	4550,00	235,13	2277,27	2330,00	138,88

**Tab.9:** Leukozyten- und PBMNC-Werte von GvHD-Proben.

Im Falle der GvHD-Patienten waren die Leukozytenwerte nach Reduktion der Immunsuppressiva unter 20 mg am Tag sowohl bei einer frühen als auch bei einer späten Manifestation im Vergleich zu den Transplantierten ohne Spender-gegen-Wirts-Reaktion signifikant erhöht. Dies ist jedoch vermutlich auf die Prednisontherapie innerhalb der Personen mit einer *graft-versus-host disease* zurückzuführen (siehe Abbildung 3 und 4). Normalpersonen besaßen gegenüber Personen mit früher GvHD vor Therapiebeginn (n:22) signifikant höhere Leukozytenwerte (p:0,000).

### 3 Ergebnisse

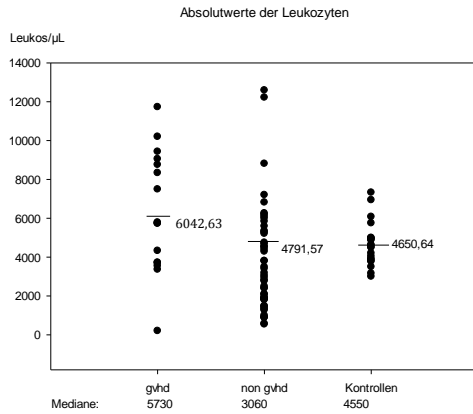


Abb. 3: Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,004.

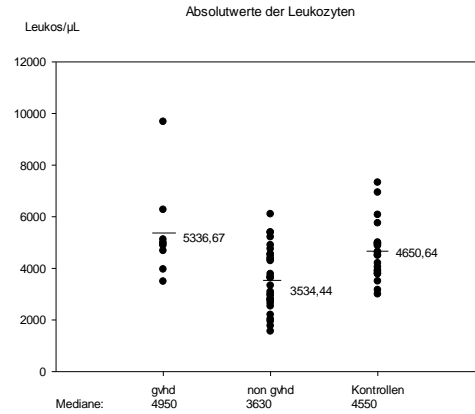


Abb. 4: Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,004.

Wurde die Gruppe der GvHD-Patienten mit dem Kollektiv der Transplantierten ohne Reaktion (M:1728,14/ $\mu$ L; s:188,75; n:51) hinsichtlich der PBMNC-Werte verglichen, so ergab sich lediglich zum Zeitpunkt Tag vier nach Prednisongabe im Falle einer frühen GvHD-Manifestation (M:1234,87/ $\mu$ L; s:309,22; n:21) eine deutliche Signifikanz (p:0,044). Unterschiede in den PBMNCs waren beim Vergleich des Kontrollkollektivs (M:2277,27/ $\mu$ L; s:138,88; n:22) mit den Patienten mit früher GvHD vor Prednisongabe (M:1523,86/ $\mu$ L; s:488,39; n:22) (p:0,00), vier Tage nach Prednisongabe (M:1234,87/ $\mu$ L; s:309,22; n:21) (p:0,00) und bei Reduktion der Therapie unter 20 mg am Tag (M:1728,14/ $\mu$ L; s:188,75; n:19) (p:0,026;) ebenfalls zu verzeichnen. Bei den späten GvHD-Patienten fanden sich jedoch nur vor Therapie (M:733,33/ $\mu$ L; s:219,82; n:3) (p:0,007) signifikant niedrigere PBMNC-Werte.

#### 3.4. T-Helferzellen

Die Zellpopulation der CD4-positiven Zellen innerhalb der Lymphozyten konnte stets gut abgegrenzt werden. Die jeweils im ersten und vierten Ansatz ermittelten Anteile an den PBMNCs zeigten keine großen Abweichungen. In beiden Fällen diente ein mit APC-konjugierter Antikörper zur Bestimmung der T-Helferzellen.

### 3.4.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

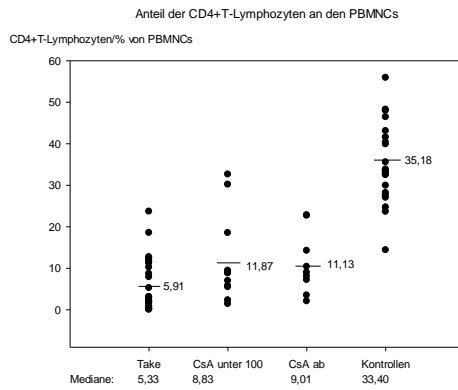
CD4	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:
Take ges.:	29	5,91	5,33	1,16	89,44	27,65	26,73
Take gvhd:	18	4,53	2,52	1,13	36,73	21,58	9,78
Take non gvhd:	11	8,17	5,29	2,36	175,68	87,37	61,71
CsA<100 ges.:	12	11,87	8,83	3,22	315,16	193,93	111,09
CsA<100 gvhd:	11	11,77	7,70	3,23	305,95	193,93	112,67
CsA<100 non gvhd:	1	8,83	8,83	/	169,32	169,32	/
CsA Ende ges.:	9	11,13	9,01	2,07	217,98	134,33	77,30
CsA Ende gvhd:	6	10,04	8,82	3,12	253,47	134,33	142,80
CsA Ende non gvhd:	3	13,31	9,01	4,76	333,01	365,39	64,35
+4Wo ges.:	6	8,40	7,83	2,08	90,18	90,04	26,96
+4Wo gvhd:	4	7,56	6,81	3,12	57,14	45,49	26,92
+4Wo non gvhd:	2	10,09	10,09	1,63	156,27	156,27	1,25
+8Wo ges.:	7	7,35	5,97	1,68	119,49	62,97	37,78
+8Wo gvhd:	5	7,77	5,97	2,38	86,63	58,89	44,64
+8Wo non gvhd:	2	6,29	6,29	1,12	201,64	201,64	24,50
+12Wo ges.:	7	13,26	11,18	3,39	273,01	139,32	149,08
+12Wo gvhd:	5	9,99	11,18	1,26	123,89	67,15	39,51
+12Wo non gvhd:	2	21,43	21,43	11,5	645,82	645,82	506,50
Zusammenf. ges.:	41	10,64	8,65	1,26	231,88	156,27	46,27
Zusammenf. gvhd:	31	10,03	7,49	1,43	203,31	80,53	52,37
Zusammenf. non gvhd:	10	12,44	8,92	2,73	317,58	193,04	97,54
Kontrollen:	22	35,18	33,40	2,05	824,99	880,97	62,63

Tab. 10: CD4-Werte nach Transplantation.

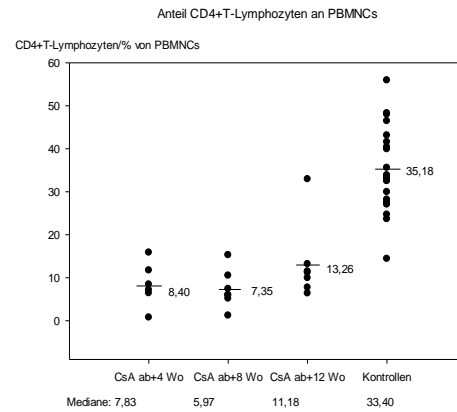
Betrachtete man in der Gruppe der Transplantierten die relativen und absoluten Zahlen der CD4-positiven Lymphozyten, ergaben sich lediglich bei Zusammenfassung der Abnahmezeitpunkte nach CsA<100 ng/mL signifikant niedrigere Absolutwerte bei Patienten, die im späteren Verlauf eine GvHD entwickelten (M:203,31/ $\mu$ L; s:52,37; n:31) (Patienten ohne gvhd: M:317,58/ $\mu$ L; s:97,54; n:10) (p:0,042). Die Relativwerte waren ebenfalls tendenziell niedriger, wenn es im weiteren Verlauf zu einer *graft-versus-host disease* kam, wenngleich keine Signifikanz bestand.

Unabhängig vom Auftreten einer GvHD zeigten Personen nach Transplantation zu allen Zeitpunkten signifikant erniedrigte relative (p:0,00 – 0,001) und absolute (p:0,00 – 0,004) Werte gegenüber dem Kontrollkollektiv (siehe Abbildung 5 und 6).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 5:** Mittelwerte/Verteilung bei Take, Red. und Absetzen von CsA  
p(Take vs. Kont.):0,00, p(CsA unter 100 vs. Kont.):0,00, p(CsA ab vs. Kont.):0,00.



**Abb. 6:** Mittelwerte/Verteilung 4, 8 und 12Wo nach CsA Ende  
p(CsA ab+4Wo vs. Kont.):0,00, p(CsA ab+8Wo vs. Kont.):0,00, p(CsA ab+12Wo vs. Kont.):0,001.

#### 3.4.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und mit Normalpersonen

CD4	n:	M rel.:	Median rel.:	S rel.:	M abs.:	Median abs.:	s abs.:
frühe GvHD vor IS:	22	10,90	7,51	2,43	183,23	84,10	78,91
frühe GvHD d+4:	21	11,83	8,72	2,24	153,92	57,40	51,34
frühe GvHD IS<20	19	7,56	8,13	1,18	157,38	82,74	43,96
späte GvHD vor IS:	3	17,16	22,88	6,46	360,05	269,23	220,36
späte GvHD d+4:	7	13,70	6,35	6,15	565,63	114,98	487,53
späte GvHD IS<20:	9	8,46	4,34	2,35	186,64	138,94	60,16
non gvhd früh:	49	8,21	6,99	1,14	175,11	75,41	36,39
non gvhd spät:	27	10,25	8,46	1,33	207,97	155,02	51,35
Kontrollen:	22	35,18	33,40	2,05	824,99	880,97	62,63

**Tab. 11:** CD4-Werte von GvHD-Proben.

Die Betrachtung der Population der T-Helferzellen früher und später GvHD-Patienten und der Werte von Transplantierten, die bei Blutabnahme keine Manifestation aufwiesen, lieferte weder vor noch nach Prednisongabe statistisch relevante Abweichungen.

Die relativen und absoluten CD4-Werte waren jedoch bei den GvHD-Patienten zum Zeitpunkt vor Steroidgabe, vier Tage nach Beginn der Therapie und nach Reduktion der Prednison dosis unter 20 mg am Tag bei früher und später Manifestation gegenüber den entsprechenden Zahlen der Normalpersonen signifikant erniedrigt (Relativwerte: p:0,00 – 0,012 bzw. Absolutwerte: p:0,000 – 0,037).

### 3.5. CD4/CD95-positive T-Lymphozyten

Die Population der CD95-positiven Zellen innerhalb der T-Helferzellen wies im Dot-Plot keine scharfen Grenzen auf, so dass sich die exakte Trennung zwischen positiv und negativ schwierig gestaltete. Als Vergleich wurde die Population aller CD95-positiven Leukozyten abgegrenzt und zur Orientierung für den Cut-off innerhalb der T-Helferzellen verwendet.

#### 3.5.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

CD4/CD95	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	25	1,56	0,61	0,47	25,31	6,54	9,49	23,43	20,09	3,53
Take gvhd:	15	1,15	0,61	0,35	9,30	4,06	2,76	23,49	20,90	5,11
Take non gvhd:	10	2,19	0,65	1,06	49,34	10,16	21,81	23,33	21,15	4,73
CsA<100 ges.:	12	1,95	1,71	0,5	44,15	42,12	10,53	23,69	25,70	4,83
CsA<100 gvhd:	11	2,41	1,99	0,57	47,81	48,55	9,90	29,73	28,50	6,09
CsA<100 non gvhd:	1	0,43	0,43	/	8,28	8,28	/	4,89	4,89	/
CsA Ende ges.:	9	1,42	1,14	0,33	35,20	15,74	14,76	21,40	11,70	4,58
CsA Ende gvhd:	6	1,61	1,50	0,37	33,38	20,85	13,35	22,30	16,05	6,63
CsA Ende non gvhd:	3	1,91	1,41	1,04	70,45	26,33	52,69	19,60	6,20	14,21
+4Wo ges.:	6	2,18	0,78	1,11	28,37	4,98	18,45	24,07	15,70	10,65
+4Wo gvhd:	4	1,70	0,78	1,16	13,39	4,98	9,89	17,59	17,59	5,35
+4Wo non gvhd:	2	3,16	3,16	3,01	58,33	58,33	56,35	37,04	37,04	35,76
+8Wo ges.:	7	1,00	0,57	0,28	14,72	13,85	4,77	14,72	15,20	2,95
+8Wo gvhd:	5	1,21	0,91	0,36	14,32	9,70	6,88	17,48	15,40	3,41
+8Wo non gvhd:	2	0,49	0,49	0,09	15,75	15,75	1,90	7,81	7,81	0,01
+12Wo ges.:	7	2,77	2,03	0,93	34,43	32,88	9,12	25,44	16,70	8,68
+12Wo gvhd:	5	3,25	2,03	1,25	29,43	32,88	5,04	32,58	26,40	10,66
+12Wo non gvhd:	2	1,58	1,58	0,78	46,91	46,91	35,71	7,61	7,61	0,44
Zusammenf. ges.:	40	1,91	1,55	0,29	35,29	20,41	6,03	21,97	15,70	2,84
Zusammenf. gvhd:	30	1,99	1,71	0,32	31,67	21,09	5,28	23,67	20,09	2,86
Zusammenf. non gvhd:	10	1,66	0,69	0,62	46,16	15,75	18,53	16,86	7,49	7,52
Kontrollen:	22	3,39	1,25	1,29	78,64	26,65	35,72	3,60	4,10	2,92

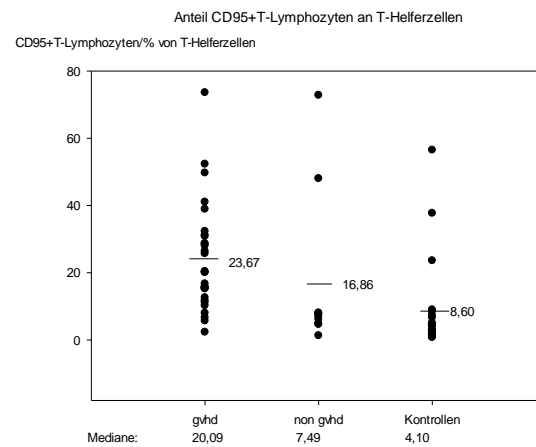
Tab. 12: CD4/CD95-Werte nach Transplantation.

Sowohl die relativen und absoluten Werte als auch die Anteile der CD95-positiven Zellen an den CD4-positiven Lymphozyten waren sehr inhomogen. Wurden jedoch alle Werte nach Absinken des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL zusammengefasst, ergaben sich bei Empfängern, die im weiteren Verlauf an einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion erkrankten,



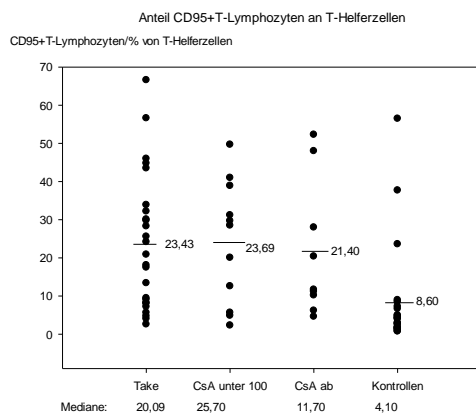
### 3 Ergebnisse

höhere Anteile CD4/CD95-positiver Zellen an T-Helferzellen als bei solchen ohne *graft-versus-host disease* (siehe Abbildung 7).

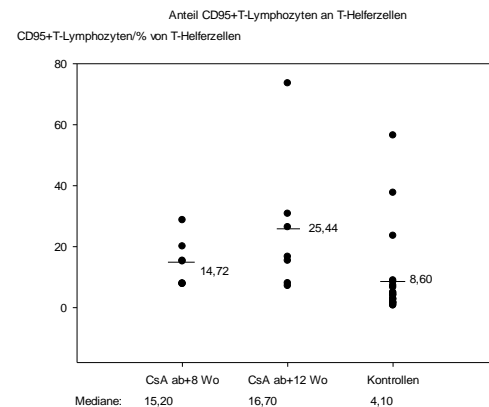


**Abb. 7:** Mittelwerte/Verteilung bei Zusammenf. der Werte nach Red. von CsA unter 100 ng/mL.  
p(gvhd vs. non gvhd):0,016.

Das Kollektiv der Patienten besaß gegenüber den Normalpersonen zu beinahe allen Zeitpunkten nach Transplantation (mit Ausnahme der Werte vier Wochen nach Ende der CsA-Prophylaxe) signifikant höhere Prozentsätze CD95-positiver Zellen an den T-Helferzellen (siehe Abbildung 8 und 9).



**Abb. 8:** Mittelwerte/Verteilung bei Take, Red. und Absetzen von CsA  
p(Take vs. Kont.):0,00, p(CsA unter 100 vs. Kont.):0,004, p(CsA ab vs. Kont.):0,007.



**Abb. 9:** Mittelwerte/Verteilung 8 und 12Wo nach CsA-Ende  
p(CsA ab+8Wo vs. Kont.):0,009, p(CsA ab+12Wo vs. Kont.):0,004.

Die Absolutwerte innerhalb der Gruppe der Transplantierten waren wiederum zum Zeitpunkt Take (M:25,31/ $\mu$ L; s:9,49; n:25) (p:0,001) und acht Wochen nach Absetzen von CsA (M:14,72/ $\mu$ L; s:4,77; n:7) (p:0,047) gegenüber denen der Kontrollen (M:78,64/ $\mu$ L; s:35,72; n:22) signifikant erniedrigt.

### 3.5.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und mit Normalpersonen

CD4/CD95	n:	M	Med.	s	M	Med.	s	M	Med.	S
		rel.:	rel.:	rel.:	abs.:	abs.:	abs.:	Ant.:	Ant.:	Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	2,16	0,92	0,63	31,31	11,15	14,02	24,33	18,70	4,15
frühe GvHD d+4:	21	1,89	1,72	0,37	18,07	14,52	4,18	23,44	12,20	4,77
frühe GvHD IS<20:	19	1,80	0,73	0,42	36,67	10,68	10,74	24,01	15,90	4,42
späte GvHD vor IS:	3	3,13	3,48	1,52	20,11	19,26	10,38	15,57	14,30	4,77
späte GvHD d+4:	7	1,65	1,37	0,52	32,99	15,03	21,19	15,43	4,54	6,66
späte GvHD IS<20	9	2,08	0,66	1,06	42,24	20,98	22,58	19,67	16,10	4,09
Zusammenf. vor IS:	25							23,28	17,90	3,72
Zusammenf. d+4:	28							21,44	11,70	3,94
Zusammenf. IS<20	28							22,62	16,00	3,25
non gvhd früh:	45	1,69	1,03	0,30	34,00	14,50	6,94	23,08	20,40	2,53
non gvhd spät:	27	1,82	1,41	0,35	32,08	16,90	7,83	20,66	15,40	3,73
non gvhd Zus.:	64							22,44	16,25	2,23
Kontrollen:	22	3,39	1,25	1,29	78,64	26,65	35,72	8,60	4,10	2,92

Tab. 13:CD4/CD95-Werte von GvHD-Proben.

Zwischen GvHD und Nicht-GvHD-Patienten waren kaum Unterschiede bezüglich der Population der CD4CD95-positiven Zellen feststellbar.

Vor Steroidgabe (M: 31,31/ $\mu$ L; s:14,02; n:22) (p:0,018) und vier Tage nach Beginn der Therapie (M:18,07/ $\mu$ L; s:4,18; n:21) (p:0,012) im Falle einer frühen GvHD lagen die absoluten Werte gegenüber denen der Kontrollgruppe (M:78,64/ $\mu$ L; s:35,72; n:22) signifikant niedriger. Was die Anteile der CD95-positiven Zellen an den T-Helferzellen betrifft, wiesen die Kontrollen auch gegenüber den GvHD-Patienten zu allen Zeitpunkten einer frühen Manifestation bzw. frühen und späten Manifestation (p:0,00 – p:0,00) und nach Reduktion der Immunsuppressiva unter 20 mg am Tag (p:0,002) im Falle eines späten Auftretens der Spender-gegenWirts-Reaktion signifikant geringere Prozentsätze auf.

### 3.6. CD4/CD25-positive T-Lymphozyten

In den Dot-Plots der FACS-Analysen konnten innerhalb der Gruppe der CD4/CD25-positiven T-Lymphozyten drei Subsets mit niedriger (CD4/CD25low), mittlerer (CD4/CD25intermediate) und hoher (CD4/CD25high) Expressionsdichte von CD25 differenziert werden. Der Großteil der Tregs liegt innerhalb der Gruppe der CD4/CD25high-T-Lymphozyten. Jedoch ergaben nähere Analysen, dass diese teilweise auch innerhalb der CD4-Zellen mit niedrigerer CD25-Expression anzutreffen sind [57].

In diesem Abschnitt der Arbeit soll auf die Effektorzellen eingegangen werden, weshalb in der Auswertung das Verhalten aller drei Subgruppen in den unterschiedlichen Kollektiven erfasst wurde. Die nähere Betrachtung der Tregs erfolgt in Abschnitt 3.7.

#### 3.6.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

CD4/CD25low	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	25	2,92	2,08	0,59	48,55	17,01	18,80	47,20	39,70	4,69
Take gvhd:	15	2,45	2,03	0,90	15,73	9,30	3,64	48,74	39,70	6,83
Take non gvhd:	10	3,63	3,81	0,77	97,79	52,96	43,31	44,90	38,50	6,08
CsA<100 ges.:	12	7,22	5,68	2,58	180,78	106,88	71,17	63,72	68,10	8,37
CsA<100 gvhd:	11	6,59	4,50	2,63	167,32	101,62	72,79	57,97	68,10	9,91
CsA<100 non gvhd:	1	8,42	8,42	/	161,36	161,36	/	68,00	68,00	/
CsA Ende ges.:	9	6,66	4,98	1,81	150,39	88,48	51,62	69,41	76,75	6,17
CsA Ende gvhd:	6	6,52	4,36	2,11	165,69	99,62	86,86	68,85	76,75	8,75
CsA Ende non gvhd:	3	10,81	5,68	5,64	250,82	209,73	83,25	72,40	63,00	12,31
+4Wo ges.:	6	4,43	5,11	1,01	49,53	44,01	15,90	60,22	60,95	9,14
+4Wo gvhd:	4	3,55	3,85	1,22	26,69	26,83	10,39	59,85	59,70	14,39
+4Wo non gvhd:	2	6,20	6,20	1,29	95,21	95,21	3,85	60,95	60,95	2,95
+8Wo ges.:	7	3,36	3,60	0,47	57,39	39,58	16,96	54,53	60,80	7,10
+8Wo gvhd:	5	3,22	3,60	0,59	34,23	38,29	11,56	53,22	60,80	10,09
+8Wo non gvhd:	2	3,69	3,69	0,97	115,28	115,28	3,68	57,80	57,80	5,20
+12Wo ges.:	7	5,54	4,30	1,21	104,82	66,59	44,14	46,36	45,90	8,34
+12Wo gvhd:	5	4,55	3,55	1,36	60,42	37,77	26,08	46,56	45,90	10,99
+12Wo non gvhd:	2	8,01	8,01	1,88	215,83	215,83	129,87	45,85	45,85	15,85
Zusammenf. ges.:	40	5,99	4,58	0,92	129,20	79,30	26,39	59,97	63,00	3,67
Zusammenf. gvhd:	30	5,44	3,97	1,07	113,38	47,06	32,88	59,48	67,35	4,63
Zusammenf. non gvhd:	10	7,66	5,91	1,73	176,64	125,29	35,90	61,44	62,35	5,16
Kontrollen:	22	19,45	17,40	1,21	441,19	425,44	37,47	53,44	52,60	1,98

Tab. 14: CD4/CD25low-Werte nach Transplantation.

### 3 Ergebnisse

CD4/CD25int.	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	25	3,27	1,35	0,79	47,44	13,27	13,43	44,59	48,50	4,13
Take gvhd:	15	2,50	1,07	0,74	23,09	11,38	8,01	43,11	44,80	6,18
Take non gvhd:	10	4,42	1,93	1,64	83,97	33,97	28,39	46,81	49,85	4,86
CsA<100 ges.:	12	4,19	1,16	4,19	119,56	19,84	76,08	31,60	26,20	7,71
CsA<100 gvhd:	11	7,90	2,00	3,99	124,58	49,39	75,50	29,13	21,20	8,18
CsA<100 non gvhd:	1	1,16	1,16	/	6,48	6,48	/	28,70	28,70	/
CsA Ende ges.:	9	2,40	1,67	0,69	54,27	25,24	23,08	25,27	19,00	6,07
CsA Ende gvhd:	6	2,94	1,67	1,22	69,38	32,72	42,84	26,48	19,00	8,12
CsA Ende non gvhd:	3	2,05	2,79	0,78	67,76	64,77	34,73	22,85	31,00	10,42
+4Wo ges.:	6	3,43	3,42	1,25	35,09	38,28	11,84	34,02	34,05	8,24
+4Wo gvhd:	4	3,43	3,43	1,96	26,02	15,58	16,36	34,00	33,35	13,02
+4Wo non gvhd:	2	3,42	3,42	0,45	53,23	53,23	2,07	34,05	34,05	1,05
+8Wo ges.:	7	3,14	1,86	1,11	48,65	21,64	19,25	36,11	31,40	5,32
+8Wo gvhd:	5	3,57	1,75	1,55	40,75	17,26	26,60	37,10	29,30	7,63
+8Wo non gvhd:	2	2,09	2,09	0,23	68,40	68,40	12,78	33,65	33,65	2,25
+12Wo ges.:	7	6,10	3,69	2,47	142,69	44,44	96,20	40,27	45,20	6,51
+12Wo gvhd:	5	3,83	3,69	0,93	48,22	32,03	20,97	37,62	45,20	7,77
+12Wo non gvhd:	2	11,78	11,78	8,61	378,86	378,86	334,42	46,90	46,90	15,00
Zusammenf. ges.:	40	3,88	2,29	0,78	87,11	36,20	27,39	33,86	31,40	2,14
Zusammenf. gvhd:	30	3,78	1,98	0,86	75,80	25,09	29,45	32,91	26,20	3,92
Zusammenf. non gvhd:	10	4,19	2,83	1,83	121,07	55,46	66,71	32,65	32,45	4,51
Kontrollen:	22	15,30	13,98	1,05	346,46	329,56	31,64	41,88	42,05	1,89

Tab. 15: CD4/CD25int.-Werte nach Transplantation.

CD4/CD25high	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	25	0,54	0,21	0,16	6,85	3,06	2,23	8,30	6,65	1,27
Take gvhd:	15	0,42	0,25	0,11	3,60	2,39	1,06	8,17	5,86	1,78
Take non gvhd:	10	0,73	0,18	0,36	11,72	5,16	5,12	8,48	6,94	1,80
CsA<100 ges.:	12	0,55	0,33	0,20	15,00	3,75	7,02	4,84	5,08	0,86
CsA<100 gvhd:	11	1,76	0,49	1,18	16,71	14,21	6,89	4,81	5,08	0,87
CsA<100 non gvhd:	1	0,15	0,15	/	0,85	0,85	/	3,77	3,77	/
CsA Ende ges.:	9	0,48	0,32	0,17	13,16	4,06	7,41	4,84	5,54	0,80
CsA Ende gvhd:	6	0,58	0,23	0,33	18,28	4,25	14,70	4,75	4,17	1,24
CsA Ende non gvhd:	3	0,44	0,54	0,11	14,01	12,45	6,09	4,63	5,96	1,83
+4Wo ges.:	6	0,55	0,46	0,19	5,51	3,98	1,91	5,69	6,02	1,14
+4Wo gvhd:	4	0,59	0,47	0,30	4,49	3,04	2,53	6,13	6,75	1,55
+4Wo non gvhd:	2	0,46	0,46	0,13	7,54	7,54	3,18	4,81	4,81	2,00

CD4/CD25high	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
+8Wo ges.:	7	0,85	0,57	0,32	13,24	7,93	5,71	9,40	11,00	2,05
+8Wo gvhd:	5	1,00	0,75	0,45	11,72	5,66	7,77	9,92	12,60	2,80
+8Wo non gvhd:	2	0,48	0,48	0,09	17,06	17,06	7,81	8,11	8,11	2,89
+12Wo ges.:	7	1,68	0,97	0,55	27,53	10,16	13,70	13,57	9,26	4,43
+12Wo gvhd:	5	1,61	0,97	0,70	15,42	10,16	5,17	15,86	14,40	6,04
+12Wo non gvhd:	2	1,85	1,85	1,21	57,82	57,82	48,89	7,84	7,84	1,43
Zusammenf. ges.:	40	0,80	0,55	0,15	15,88	6,80	3,86	7,26	6,12	1,03
Zusammenf. gvhd:	30	0,83	0,52	0,18	14,25	4,85	4,02	7,71	6,12	1,33
Zusammenf. non gvhd:	10	0,70	0,55	0,27	20,77	9,98	9,89	5,92	6,19	0,93
Kontrollen:	22	1,69	1,86	0,16	38,01	33,47	4,87	4,80	4,54	0,49

Tab. 16: CD4/CD25high-Werte nach Transplantation.

Bei Take lagen die Absolutwerte der CD4/C25low und der CD4/CD25int.-T-Lymphozyten bei Patienten mit späterer Entwicklung einer GvHD signifikant unterhalb der entsprechenden Zahlen von Transplantierten, bei denen im weiteren Verlauf keine *graft-versus-host disease* auftrat (p:0,046). In der Zusammenfassung aller Zeitpunkte nach CsA<100 ng/dL gingen geringere CD4/CD25low-Absolutwerte ebenfalls mit dem Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion im späteren Verlauf einher (p:0,010).

Das Kollektiv der Normalpersonen besaß gegenüber der Gruppe der Transplantierten zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Relativ- und Absolutwerte aller drei Subsets. Bei Ende der CsA-Prophylaxe (M:25,27%; s:6,07; n:9; p:0,008) und bei Zusammenfassen aller späten Blutabnahmen (M:33,86%; s:2,14; n:80; p:0,015) verfügte die Gruppe aller Transplantierten im Vergleich zu den Normalpersonen (M:41,88%; s:1,89; n:22) über deutlich niedrigere CD25int.-Anteile an der Gesamtheit der T-Helferzellen. Zwölf Wochen nach Absetzen von Cyclosporin A zeigten sich bei den Patienten (M:13,57; s:4,43; n:7; p:0,005) gegenüber der Kontrollgruppe (M:4,80; s:0,49; n:22) im Gegenzug höhere CD25high-Anteile.

### 3.6.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und mit Normalpersonen

CD4/CD25low	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	4,53	2,72	0,97	102,72	25,56	55,71	46,27	40,70	4,34
frühe GvHD d+4:	21	3,88	2,73	0,86	60,35	22,20	24,06	<b>36,05</b>	32,90	3,84
frühe GvHD IS<20:	19	2,94	2,49	0,52	68,36	39,90	21,96	46,36	45,30	5,83
späte GvHD vor IS:	3	9,20	9,20	4,17	58,74	56,68	24,27	51,93	46,20	10,23
späte GvHD d+4:	7	13,70	7,24	7,23	171,49	31,65	131,75	56,29	63,40	8,02
späte GvHD IS<20	9	2,96	1,67	1,08	76,17	29,75	36,06	43,77	43,20	8,60
Zusammenf. vor IS:	25							46,95	40,70	3,96
Zusammenf. d+4:	28							<b>41,11</b>	37,70	3,82
Zusammenf. IS<20	28							45,53	44,25	4,74
non gvhd früh:	45	4,98	3,29	0,88	109,98	38,53	25,27	<b>55,80</b>	60,90	3,79
non gvhd spät:	27	5,67	4,30	0,88	114,27	72,64	26,17	58,75	61,70	4,20
non gvhd Zus.:	64							<b>54,75</b>	59,40	3,00
Kontrollen:	22	19,45	17,40	1,21	441,19	425,44	37,47	<b>53,44</b>	52,60	1,98

Tab. 17: CD4/CD25low-Werte von GvHD-Proben.

CD4/CD25int.	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	S Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	5,40	1,76	1,45	68,56	22,56	22,41	45,45	48,45	3,92
frühe GvHD d+4:	21	6,95	4,84	1,50	82,56	34,13	26,05	<b>55,58</b>	56,50	3,59
frühe GvHD IS<20:	19	3,92	2,69	0,88	73,70	31,20	24,90	44,56	42,40	5,16
späte GvHD vor IS:	3	6,71	5,17	3,33	58,88	17,84	43,00	40,00	43,60	9,19
späte GvHD d+4:	7	6,19	2,97	3,71	320,38	23,36	296,67	35,86	30,30	6,38
späte GvHD IS<20	9	3,53	2,32	1,25	68,04	27,00	22,70	42,92	42,80	7,16
Zusammenf. vor IS:	25							44,79	47,90	4,58
Zusammenf. d+4:	28							<b>50,65</b>	52,80	3,48
Zusammenf. IS<20	28							44,03	42,40	4,12
non gvhd früh:	45	3,37	1,35	0,69	69,35	19,84	20,68	<b>37,54</b>	31,90	3,36
non gvhd spät:	27	3,70	2,81	0,78	77,24	40,36	27,04	33,07	31,40	3,37
non gvhd Zus.:	64							<b>37,65</b>	34,05	2,60
Kontrollen:	22	15,30	13,98	1,05	346,46	329,56	31,64	<b>41,88</b>	42,05	1,89

Tab. 18: CD4/CD25int.-Werte von GvHD-Proben.

### 3 Ergebnisse

CD4/CD25high	n:	M	Med.	s	M	Med.	s	M	Med.	S
		rel.:	rel.:	rel.:	abs.:	abs.:	abs.:	Ant.:	Ant.:	Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	1,00	0,38	0,34	12,37	3,77	4,74	8,51	7,24	1,06
frühe GvHD d+4:	21	0,91	0,70	0,18	10,38	6,34	3,20	<b>8,40</b>	7,91	0,84
frühe GvHD IS<20:	19	0,78	0,43	0,20	18,77	5,89	7,83	9,16	6,10	1,83
späte GvHD vor IS:	3	1,31	1,32	0,50	10,59	4,56	6,67	8,32	8,88	1,33
späte GvHD d+4:	7	1,41	0,77	0,83	72,25	3,44	67,05	8,05	6,90	1,71
späte GvHD IS<20	9	1,83	0,35	1,31	39,39	10,48	28,26	<b>13,36</b>	7,57	5,81
Zusammenf. vor IS:	25							8,49	7,63	0,94
Zusammenf. d+4:	28							<b>8,31</b>	7,91	0,74
Zusammenf. IS<20	28							<b>10,51</b>	7,51	2,21
non gvhd früh:	45	0,54	0,25	0,11	10,84	3,79	2,85	<b>6,73</b>	6,24	0,79
non gvhd spät:	27	0,90	0,57	0,20	16,84	7,93	5,00	8,23	6,33	1,44
non gvhd Zus.:	64							<b>7,68</b>	6,25	0,81
Kontrollen:	22	1,69	1,86	0,16	38,01	33,47	4,87	<b>4,80</b>	4,54	0,49

Tab. 19: CD4/CD25high-Werte von GvHD-Proben.

Nähere Analysen der Blutproben von GvHD-Patienten vier Tage nach Beginn der Therapie mit Steroiden im Falle einer frühen Manifestation und bei Zusammenfassung der frühen und späten Spender-gegen-Wirts-Reaktion ergaben eine Verschiebung des CD25low-Subsets hin zu höheren CD25int.- und CD25high-Subsets gegenüber Patienten ohne Symptome (siehe Abbildung 10-15).

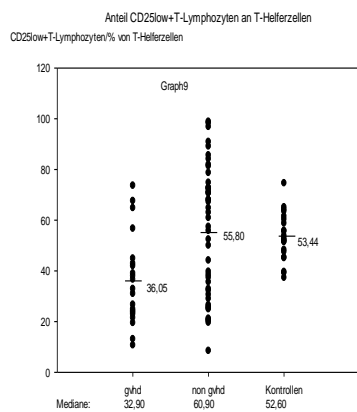


Abb. 10: Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD  
p(gvhhd vs. non gvhhd):0,004.

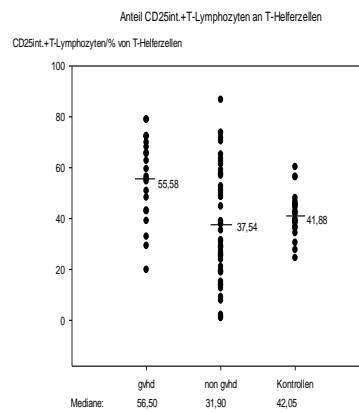


Abb. 11: Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD  
p(gvhhd vs. non gvhhd):0,002.

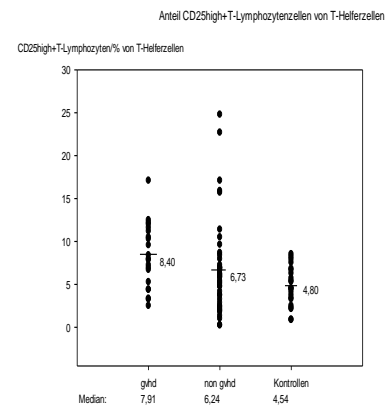
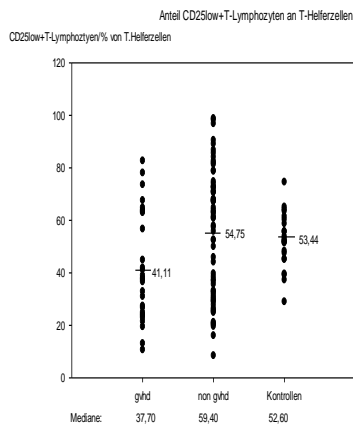
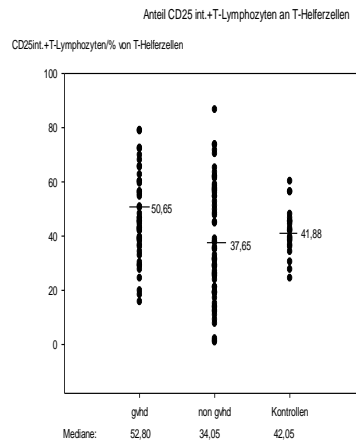


Abb. 12: Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD  
p(gvhhd vs. non gvhhd):0,024.

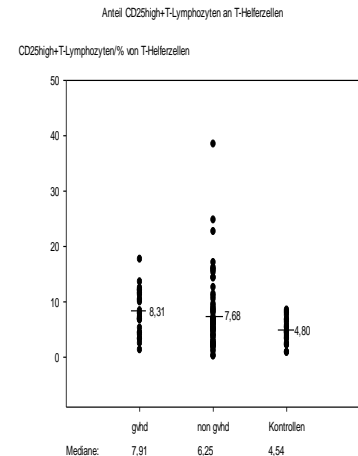
### 3 Ergebnisse



**Abb. 13:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,016.



**Abb. 14:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,006.



**Abb. 15:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,10 (nicht signifikant).

Im Vergleich der GvHD-Patienten mit den Normalpersonen fanden sich bei letzteren stets erhöhte relative und absolute Zahlen. Bei früher GvHD und bei Zusammenfassung der frühen und späten Form war am vierten Tag nach erster Steroidgabe gegenüber dem Kontrollkollektiv ein signifikant verschobenes Verhältnis der CD25low-Anteile zugunsten der CD25int.- und CD25high-Anteile zu verzeichnen. Nach Reduktion der Immunsuppressiva unter 20 mg am Tag bei später GvHD und bei Zusammenfassung beider Manifestationszeitpunkte waren in Bezug auf die Gruppe der Kontrollen die Anteile mit hoher CD25-Expression ebenfalls größer, wobei Signifikanzkriterien erfüllt wurden.



### 3.7. CD4/FoxP3- und CD4/FoxP3/CD25-positive T-Lymphozyten

Die Population der FoxP3-positiven Zellen war meist gut abgrenzbar.

#### 3.7.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

CD4/FoxP3	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	26	<b>0,28</b>	0,08	0,07	<b>5,68</b>	2,40	1,31	<b>14,99</b>	11,40	3,04
Take gvhd:	16	0,24	0,08	0,72	4,07	1,35	1,11	17,09	11,40	4,66
Take non gvhd:	10	0,33	0,11	0,13	8,26	4,03	2,81	11,62	10,32	2,63
CsA<100 ges.:	12	<b>0,16</b>	0,14	0,03	<b>7,95</b>	6,62	1,50	7,35	6,90	1,35
CsA<100 gvhd:	11	0,16	0,14	0,03	8,05	6,62	1,45	7,61	6,90	1,23
CsA<100 non gvhd:	1	0,01	0,01	/	0,26	0,26	/	0,11	0,11	/
CsA Ende ges.:	9	<b>0,10</b>	0,14	0,05	<b>7,32</b>	5,22	2,14	9,94	9,86	1,85
CsA Ende gvhd:	6	0,19	0,08	0,09	8,83	4,39	3,97	9,96	9,86	2,57
CsA Ende non gvhd:	3	0,29	0,29	0,06	8,76	7,36	2,55	9,59	4,54	6,40
+4Wo ges.:	6	<b>0,17</b>	0,15	0,05	<b>5,26</b>	4,12	1,88	10,05	9,16	1,65
+4Wo gvhd:	4	0,13	0,09	0,07	2,90	3,01	1,00	9,11	9,16	1,40
+4Wo non gvhd:	2	0,26	0,26	0,05	9,99	9,99	3,64	11,93	11,93	4,87
+8Wo ges.:	7	<b>0,21</b>	0,13	0,09	<b>6,43</b>	4,83	2,43	10,18	10,90	1,63
+8Wo gvhd:	5	0,23	0,11	0,13	6,46	3,24	3,49	10,18	10,90	1,52
+8Wo non gvhd:	2	0,15	0,15	0,02	6,34	6,34	1,50	10,20	10,20	5,71
+12Wo ges.:	7	<b>0,36</b>	0,24	0,11	<b>10,71</b>	7,03	4,04	<b>11,94</b>	12,20	1,56
+12Wo gvhd:	5	0,28	0,24	0,09	7,45	7,03	2,49	12,36	12,20	1,22
+12Wo non gvhd:	2	0,54	0,54	0,37	18,84	18,84	13,71	10,89	10,89	5,92
Zusammenf. ges.:	40	<b>0,22</b>	0,17	0,03	<b>7,96</b>	5,47	1,11	9,61	9,48	0,82
Zusammenf. gvhd:	30	0,20	0,13	0,03	7,38	5,12	1,15	9,65	9,86	0,76
Zusammenf. non gvhd:	10	0,28	0,20	0,08	9,69	6,86	2,84	9,49	6,02	2,43
Kontrollen:	22	<b>0,72</b>	0,65	0,08	<b>31,82</b>	26,79	3,41	<b>7,34</b>	6,54	0,85

Tab. 20: CD4/FoxP3-Werte nach Transplantation.

CD4/FoxP3/CD25	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	26	<b>0,16</b>	0,05	0,04	<b>3,47</b>	1,59	0,88	6,62	6,44	0,88
Take gvhd:	16	0,12	0,03	0,04	2,19	0,47	0,7	5,96	6,44	1,01
Take non gvhd:	10	0,22	0,07	0,96	5,53	2,33	1,87	7,66	7,06	1,63
CsA<100 ges.:	12	<b>0,11</b>	0,06	0,03	<b>5,44</b>	2,38	1,83	4,03	4,42	0,92
CsA<100 gvhd:	11	0,11	0,06	0,03	5,59	2,38	1,79	4,46	4,93	0,84
CsA<100 non gvhd:	1	0,01	0,01	/	0,52	0,52	/	0,22	0,22	/
CsA Ende ges.:	9	<b>0,15</b>	0,06	0,05	<b>5,62</b>	3,76	2,01	6,39	4,89	1,36
CsA Ende gvhd:	6	0,16	0,05	0,08	7,40	2,92	3,66	7,28	5,59	2,25
CsA Ende non gvhd:	3	0,14	0,16	0,39	3,73	3,76	0,41	3,24	3,85	1,17

CD4/FoxP3/CD25	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
<b>+4Wo ges.:</b>	5	<b>0,15</b>	0,15	0,04	<b>4,27</b>	4,02	1,00	7,37	7,31	1,03
<b>+4Wo gvhd:</b>	3	0,13	0,08	0,06	2,99	2,76	0,54	7,39	7,31	1,23
<b>+4Wo non gvhd:</b>	2	0,17	0,17	0,02	6,18	6,18	1,77	7,35	7,35	2,45
<b>+8Wo ges.:</b>	7	<b>0,17</b>	0,09	0,09	<b>4,96</b>	3,12	2,35	7,23	6,27	1,46
<b>+8Wo gvhd:</b>	5	0,20	0,09	0,12	5,44	2,32	3,37	7,73	6,27	1,82
<b>+8Wo non gvhd:</b>	2	0,10	0,10	0,01	3,79	3,79	0,67	5,96	5,96	3,07
<b>+12Wo ges.:</b>	7	<b>0,27</b>	0,20	0,09	<b>8,30</b>	4,37	3,42	<b>8,97</b>	7,56	1,43
<b>+12Wo gvhd:</b>	5	0,20	0,20	0,07	5,23	4,37	1,62	8,87	7,56	1,32
<b>+12Wo non gvhd:</b>	2	0,45	0,45	0,31	15,97	15,97	11,73	9,21	9,21	5,10
<b>Zusammenf. ges.:</b>	39	<b>0,16</b>	0,10	0,03	<b>5,89</b>	3,97	1,04	6,36	6,23	0,64
<b>Zusammenf. gvhd:</b>	29	0,16	0,08	0,03	5,72	3,91	1,15	6,65	6,58	0,72
<b>Zusammenf. non gvhd:</b>	10	0,18	0,15	0,07	6,36	4,33	2,44	5,50	4,00	1,37
<b>Kontrollen:</b>	22	<b>0,82</b>	0,59	0,25	<b>26,10</b>	22,80	2,42	<b>5,95</b>	5,45	0,57

Tab. 21: CD4/FoxP3/CD25-Werte nach Transplantation.

Nach Transplantation ließen sich hinsichtlich der CD4/FoxP3-positiven T-Lymphozyten keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Entwicklung einer GvHD im weiteren Verlauf feststellen.

Jedoch ergaben sich zu allen Zeitpunkten signifikant differente Relativ- und Absolutwerte beim Vergleich der Normalpersonen mit der Gruppe aller Transplantierten (Relativwerte: p:0,000-0,019 Absolutwerte: p:0,000-0002), wobei Gesunde stets höhere Zahlen boten. Hingegen schienen die Anteile der CD4FoxP3-positiven Lymphozyten an den T-Helferzellen im Kontrollkollektiv stets niedriger zu sein, wobei nur zum Zeitpunkt Take und 12 Wochen nach Absetzen der CsA-Prophylaxe statistische Signifikanz erreicht wurde (siehe Abbildung 16).

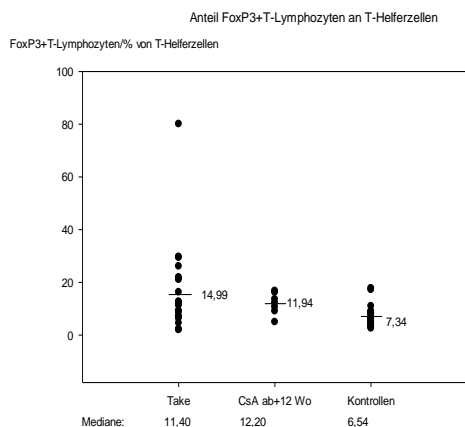


Abb.16: Mittelwerte /Verteilung bei Take, 12Wo nach CsA-Ende p(Take vs. Kont.):0,008, p(CsAab+12Wo vs. Kont.):0,018.

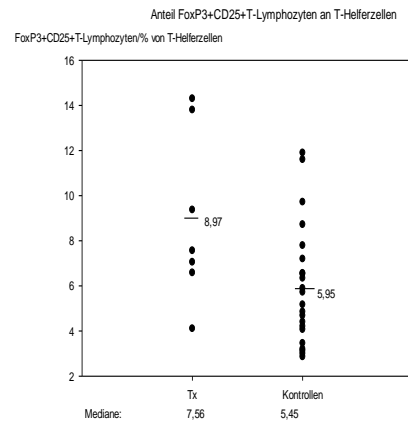


Abb. 17: Mittelwerte/Verteilung 12Wo nach CsA-Ende p(CsA ab+12Wo vs. Kont.):0,037.

Analysen zeigten, dass die Gruppe der Treg-Zellen nicht nur innerhalb der CD4-positiven Lymphozyten mit hoher CD25-Expression zu finden sind. Vielmehr gibt es auch Subgruppen mit einer niedrigeren CD25-Dichte [57]. Erstere gelten als die aktivere Form. Daher stellte sich die Frage, ob die Gesamtheit der Tregs, bestimmt durch die Anfärbung von FoxP3, ein anderes Verhalten nach Transplantation und bei Auftreten einer GvHD zeigt als die aktivierten T-regulatorischen Zellen.

Die spätere Entwicklung einer GvHD schien auch die Population der CD4/FoxP3/CD25-positiven Zellen nicht zu beeinflussen.

Jedoch unterschieden sich sowohl die relativen als auch die absoluten Werte der Normalpersonen stets von der Gruppe der Transplantierten (Relativwerte:  $p:0,000-0,007$ , Absolutwerte:  $p:0,000-0,002$ ). Statistisch signifikant höhere Anteile an den T-Helferzellen fanden sich nur 12 Wochen nach Beendigung der GvHD-Prophylaxe gegenüber den Kontrollen (siehe Abbildung 17).

### 3.7.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und mit Normalpersonen

CD4/FoxP3	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	<u>0,41</u>	0,14	0,21	<u>7,46</u>	2,61	2,85	12,60	10,50	2,56
frühe GvHD d+4:	21	<u>0,20</u>	0,14	0,04	<u>7,10</u>	3,94	2,00	9,68	10,10	1,26
frühe GvHD IS<20:	18	<u>0,10</u>	0,07	0,02	<u>5,03</u>	3,26	1,08	10,19	6,52	2,06
späte GvHD vor IS:	3	0,40	0,26	0,27	<u>6,12</u>	5,67	3,20	7,57	7,26	0,57
späte GvHD d+4:	7	<u>0,65</u>	0,11	0,47	<u>62,61</u>	6,75	57,49	9,09	8,19	1,62
späte GvHD IS<20	9	<u>0,18</u>	0,09	0,08	<u>9,97</u>	5,29	5,25	9,86	8,99	1,84
Zusammenf. vor IS:	25							12,00	9,30	2,27
Zusammenf. d+4:	28							9,53	8,43	1,01
Zusammenf. IS<20	27							10,08	7,59	1,50
non gvhd früh:	46	0,24	0,13	0,04	6,84	5,26	0,97	12,15	9,17	1,86
non gvhd spät:	27	0,25	0,20	0,04	8,32	5,22	1,52	10,80	10,00	1,01
non gvhd Zus.:	65							11,82	9,88	1,34
Kontrollen:	22	<u>0,72</u>	0,65	0,08	<u>31,82</u>	26,79	3,41	7,34	6,54	0,85

Tab. 22: CD4/FoxP3-Werte von GvHD-Proben.

CD4/FoxP3/CD25	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	<u>0,31</u>	0,06	0,20	<u>3,95</u>	1,62	1,34	6,36	3,64	1,33
frühe GvHD d+4:	21	<u>0,12</u>	0,06	0,03	<u>4,61</u>	2,41	1,76	5,42	5,56	0,76
frühe GvHD IS<20:	19	<u>0,07</u>	0,05	0,02	<u>3,80</u>	2,54	0,96	6,60	3,36	1,67
späte GvHD vor IS:	3	0,35	0,20	0,25	<u>5,07</u>	5,18	2,53	6,32	5,74	0,81
späte GvHD d+4:	7	<u>0,44</u>	0,05	0,32	<u>43,07</u>	5,56	39,13	5,41	4,28	1,18
späte GvHD IS<20	9	<u>0,10</u>	0,07	0,04	<u>5,39</u>	3,84	2,31	6,93	6,40	0,84
Zusammenf. vor IS:	25							6,36	4,50	1,17
Zusammenf. d+4:	28							5,42	4,84	0,63
Zusammenf. IS<20	28							6,72	5,46	1,12
non gvhd früh:	46	0,15	0,06	0,03	4,47	2,35	0,81	5,86	5,10	0,64
non gvhd spät:	26	0,20	0,15	0,04	6,35	4,05	1,36	7,48	6,91	0,79
non gvhd Zus.:	64							6,50	6,29	0,52
Kontrollen:	22	<u>0,82</u>	0,59	0,25	<u>26,10</u>	22,80	2,42	5,95	5,45	0,57

Tab. 23: CD4/FoxP3/CD25-Werte von GvHD-Proben.

Die Proben von Patienten, die bei Blutentnahme an einer *graft-versus-host disease* litten, zeigten gegenüber Transplantierten ohne Manifestation zum Zeitpunkt der Proben-gewinnung keine großen Abweichungen.

Normalpersonen hingegen wiesen auch hier gegenüber der Gruppe der GvHD-Patienten stets signifikant höhere Relativ- und Absolutwerte auf (Relativwerte: p:0,000-0,041, Absolutwerte: p:0,000-0,006). Nur im Falle einer späten Manifestation vor Steroidgabe war keine Signifikanz hinsichtlich der relativen Werte gegeben.

Die Population der aktivierten Tregs wurde durch das Vorliegen einer GvHD ebenfalls nicht beeinflusst.

Da bisherige Publikationen stets auf Veränderungen innerhalb der Patienten mit chronischer Spender-gegen-Wirts-Reaktion eingingen, wurde zwischen akuter und chronischer Form differenziert. Um ein Vergleichskollektiv zu erhalten, musste zusätzlich noch die Klassifizierung in früh und spät berücksichtigt werden. Folglich war die Gruppe der Personen mit chronischer GvHD vor Steroidgabe bei Auftreten der Symptome vor Sinken des CsA-Spiegels sehr klein mit n:2. Der Anteil CD4/FoxP3-positiver T-Helferzellen betrug 6,68% (s:3,43; n:2). Transplantierte ohne Manifestation hatten höhere Werte von 12,15% (s:1,86; n:46). Signifikanz lag aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nicht vor.

### 3.8. CD4/CCR10-positive T-Lymphozyten

Da bei dieser Zellpopulation die klare Trennung zwischen CCR10-positiv und CCR10-negativ innerhalb der T-Helferzellen schwer möglich war, diente die Gruppe aller CCR10-positiven Leukozyten als Orientierung.

#### 3.8.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

CD4/CCR10	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	27	<b>0,45</b>	0,11	0,17	<b>6,50</b>	1,34	2,35	8,31	6,19	1,91
Take gvhd:	17	0,44	0,07	0,25	5,15	0,85	3,29	8,79	7,27	2,53
Take non gvhd:	10	0,47	0,21	0,21	8,78	7,48	3,08	7,50	4,58	2,99
Take gvhd skin:	13	0,52	0,11	0,32	6,33	0,85	4,28	9,46	7,27	3,19
Take other gvhd:	4	0,18	0,05	0,14	1,34	0,90	0,72	6,60	4,84	3,16
CsA<100 ges.:	11	<b>0,48</b>	0,27	0,19	<b>13,96</b>	7,12	6,98	3,57	3,57	0,84
CsA<100 gvhd:	10	0,52	0,31	0,21	15,25	7,92	7,48	3,87	3,65	0,87
CsA<100 non gvhd:	1	0,06	0,06	/	1,08	1,08	/	0,64	0,64	/
CsA<100 gvhd skin:	8	0,67	0,48	0,24	17,98	7,92	9,24	4,84	5,23	1,07
CsA<100 other gvhd:	3	0,18	0,15	0,12	4,96	1,57	4,18	3,05	2,08	1,97
CsA Ende ges.:	9	<b>0,59</b>	0,53	0,14	<b>13,52</b>	6,87	5,15	6,89	5,83	1,19
CsA Ende gvhd:	6	0,66	0,56	0,22	15,93	8,85	8,52	6,37	5,56	1,30
CsA Ende non gvhd:	3	0,52	0,51	0,24	18,76	11,80	12,15	5,91	5,65	3,21
CsA Ende gvhd skin:	4	0,62	0,56	0,24	9,38	8,85	2,63	7,22	6,38	1,80
CsA Ende other gvhd:	2	0,74	0,74	0,62	29,04	29,04	28,11	4,69	4,69	1,32
+4Wo ges.:	6	<b>0,82</b>	0,86	0,21	<b>9,13</b>	7,58	3,50	<b>9,38</b>	8,01	1,96
+4Wo gvhd:	4	0,72	0,79	0,22	5,29	5,07	1,50	8,70	8,02	1,21
+4Wo non gvhd:	2	1,00	1,00	0,34	16,83	16,83	8,07	10,73	10,73	2,23
+4Wo gvhd skin:	3	0,95	1,06	0,23	6,98	6,39	2,06	10,24	8,15	2,23
+4Wo other gvhd:	1	0,03	0,03	/	0,20	0,20	/	4,08	4,08	/
+8Wo ges.:	7	<b>0,60</b>	0,41	0,26	<b>7,91</b>	7,36	2,61	6,64	6,72	2,27
+8Wo gvhd:	5	0,67	0,41	0,37	5,65	4,02	3,09	6,60	6,40	3,30
+8Wo non gvhd:	2	0,43	0,43	0,08	13,57	13,57	1,67	6,73	6,73	0,01
+8Wo gvhd skin:	3	0,98	0,98	0,56	8,04	7,36	4,83	8,35	6,40	5,45
+8Wo other gvhd:	2	0,21	0,21	0,20	2,07	2,07	1,95	3,98	3,98	2,86
+12Wo ges.:	7	<b>1,23</b>	0,52	0,53	<b>17,57</b>	7,86	9,18	10,12	5,19	4,57
+12Wo gvhd:	5	1,21	0,47	0,73	8,93	7,86	3,10	11,89	4,94	6,41
+12Wo non gvhd:	2	1,28	1,28	0,80	39,17	39,17	31,94	5,68	5,68	0,49
+12Wo gvhd skin:	4	1,29	0,39	0,94	9,20	6,82	3,99	11,94	4,54	8,28
+12Wo other gvhd:	1	0,91	0,91	/	7,86	7,86	/	11,70	11,70	/

CD4/CCR10	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Zusammenf. ges.:	40	<b>0,71</b>	0,51	0,13	<b>13,47</b>	7,61	2,91	6,72	5,83	1,02
Zusammenf. gvhd:	30	0,72	0,44	0,16	11,40	7,23	3,11	6,81	5,56	1,29
Zusammenf. non gvhd:	10	0,70	0,52	0,19	19,65	11,85	6,88	6,47	5,91	1,44
Zusammenf. gvhd skin:	21	0,86	0,55	0,21	12,24	7,36	3,67	7,71	6,40	1,75
Zusammenf. other gvhd:	9	0,38	0,15	0,16	9,46	1,57	6,14	4,69	4,08	1,19
Kontrollen:	22	<b>2,07</b>	2,13	0,17	<b>47,04</b>	35,83	5,48	<b>5,90</b>	5,14	0,60

Tab. 24: CD4/CCR10-Werte nach Transplantation.

Die Werte der Personen, die im Verlauf an einer GvHD erkrankten, wiesen gegenüber den Transplantierten ohne spätere Entwicklung einer Reaktion keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob die Population der CD4/CCR10-positiven T-Lymphozyten einen Marker zur frühzeitigen Diagnose einer Haut-GvHD darstellt. Deshalb wurde hier innerhalb der Patienten mit GvHD-Manifestation im späteren Verlauf zwischen der Gruppe mit und ohne Hautbefall differenziert. Die Anteile der CD4/CCR10-positiven T-Helferzellen schienen bei Hautmanifestation leicht erhöht zu sein, jedoch waren aufgrund geringer Fallzahlen und großer Streubreite keine definitiven Aussagen möglich (Anteile bei Zusammenfassung aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL: Mittelwert bei Hautmanifestation: 7,71%; s: 1,75; n: 21; Mittelwert ohne Hautbefall: 4,69%; s: 1,19; n: 9).

Das Kollektiv der Normalpersonen besaß gegenüber der Gesamtheit der transplantierten Patienten zu allen Zeitpunkten signifikant erhöhte Relativ- (p: 0,000-0,022) und Absolutwerte (p: 0,000-0,007). Die Anteile CCR10-positiver Zellen waren bei Kontrollen gegenüber den Werten von Patienten vier Wochen nach Absetzen der CsA-Prophylaxe signifikant niedriger (p: 0,033).

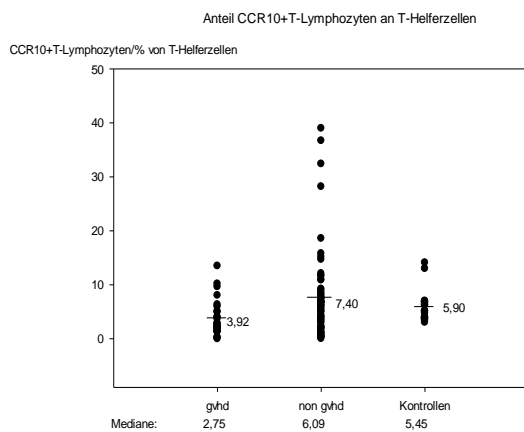
### 3.8.2. Einteilung der GvHD-Patienten nach Manifestationsorgan und Vergleich mit Transplantierten ohne Reaktion sowie mit Normalpersonen

CD4/CCR10	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
frühe GvHD vor IS:	22	0,46	0,18	0,14	6,56	2,68	2,48	3,99	2,85	0,73
frühe GvHD skin vor IS:	19	0,50	0,25	0,16	7,05	2,68	2,71	4,17	3,25	0,79
frühe GvHD other vor IS:	3	0,08	0,08	0,06	1,66	1,66	1,11	2,22	2,22	0,70
frühe GvHD d+4:	20	0,61	0,29	0,14	7,50	3,90	2,34	4,18	2,51	0,88
frühe GvHD skin d+4:	19	0,63	0,37	0,14	7,74	4,90	2,45	3,57	1,99	0,67
frühe GvHD other d+4:	1	0,11	0,11	/	2,90	2,90	/	15,70	15,70	/
frühe GvHD IS<20:	19	0,74	0,59	0,13	16,34	8,68	4,95	11,86	7,79	2,38
frühe GvHD skin IS<20:	18	0,75	0,63	0,14	16,76	8,77	5,21	11,96	7,43	2,51
frühe GvHD other IS<20:	1	0,19	0,19	/	6,16	6,16	/	4,43	4,43	/
späte GvHD vor IS:	3	0,29	0,34	0,13	1,56	1,64	0,61	3,43	2,08	1,21
späte GvHD skin vor IS:	1	0,48	0,48	/	1,64	1,64	/	2,08	2,08	/
späte GvHD other vor IS:	2	0,20	0,20	0,15	1,52	1,52	1,10	4,11	4,11	3,94
späte GvHD d+4:	7	0,85	0,27	0,58	48,85	1,14	45,89	5,06	2,67	1,46
späte GvHD skin d+4:	3	0,38	0,55	0,18	5,11	2,79	3,30	3,90	2,43	2,43
späte GvHD other d+4:	4	1,21	0,25	1,03	81,65	1,12	80,80	5,93	5,98	1,99
späte GvHD IS<20:	9	1,38	0,19	1,04	29,26	5,47	22,46	10,04	4,96	4,80
späte GvHD skin IS<20:	4	2,84	0,80	2,28	62,14	18,77	48,74	14,62	5,11	10,87
späte GvHD other IS<20:	5	0,22	0,17	0,11	2,95	2,05	1,21	6,37	4,96	2,10
Zusammenf. vor IS:	25							3,92	2,75	0,68
Zusammenf. skin vor IS:	22							3,95	2,60	0,73
Zusammenf. other vor IS:	3							3,71	2,92	2,31
Zusammenf. d+4:	27							4,41	2,67	0,74
Zusammenf. skin d+4:	22							3,62	2,21	0,64
Zusammenf. other d+4:	5							7,88	9,29	2,49
Zusammenf. IS<20	28							11,27	6,50	2,19
Zusammenf. skin IS<20:	23							12,34	7,06	2,59
Zusammenf. other IS<20:	5							6,37	4,96	2,10
non gvhd früh:	47	0,49	0,19	0,11	10,23	3,39	2,48	6,80	5,12	1,16
non gvhd spät:	27	0,81	0,52	0,16	13,72	7,86	3,32	8,01	6,17	1,41
non gvhd Zus.:	66							7,40	6,09	0,99
Kontrollen:	22	2,07	2,13	0,17	47,04	35,83	5,48	5,90	5,14	0,60

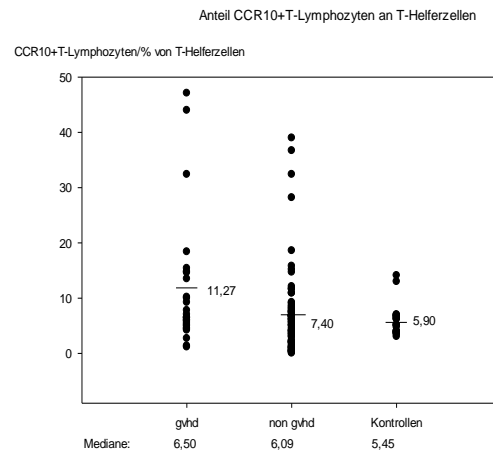
Tab. 25: CD4/CCR10-Werte von GvHD-Proben.

### 3 Ergebnisse

Bei Zusammenfassung der frühen und späten GvHD-Form betrugen die Mittelwerte der Anteile CCR10-positiver Zellen vor Therapiebeginn 3,92% (s:0,68; n:25). Der entsprechende Wert für Patienten ohne Klinik zum Zeitpunkt der Probengewinnung lag bei 7,40% (s:0,99; n:66; p:0,031) (siehe Abbildung 18). Jedoch war der Anteil CCR10-positiver Zellen innerhalb der erkrankten Transplantierten während des Ausschleichens der Steroide hingegen mit 11,27% (s:2,19; n:28; p:0,055) höher als die Werte von Personen ohne Befall bei Blutentnahme. Die Streubreite war hierbei jedoch sehr groß, so dass keine eindeutige Signifikanz vorlag (siehe Abbildung 19).



**Abb. 18:** Mittelwerte/Verteilung vor Steroidbeginn bei früher u. später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,031.

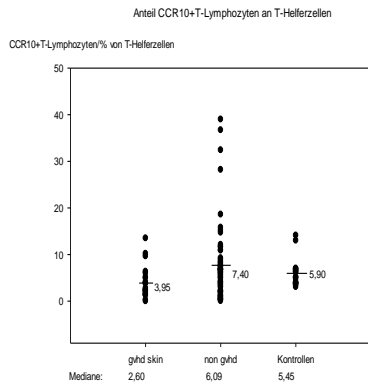


**Abb. 19:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
p (gvhd vs. non gvhd):0,055 (nicht signifikant).

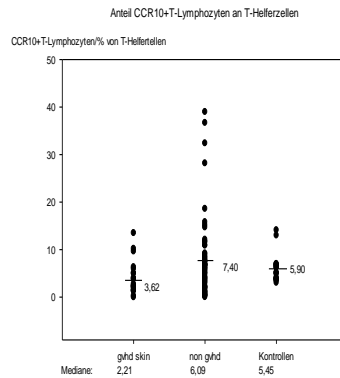
Bei der Einteilung in unterschiedliche Manifestationsorgane innerhalb der GvHD-Patienten ergab sich ebenfalls erst nach Reduktion der Immunsuppressiva unter 20 mg am Tag ein höherer Anteil CD4/CCR10-positiver Zellen an den T-Helferzellen bei Auftreten einer Haut-GvHD verglichen mit den Anteilen der Transplantierten ohne Vorliegen einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion (siehe Abbildung 22). Zu den Zeitpunkten vor Therapiebeginn und am vierten Tag nach erster Steroidgabe waren die Anteile jedoch bei den Patienten mit Haut-GvHD sogar signifikant geringer gegenüber den Anteilen bei Patienten ohne Befall (siehe Abbildung 20 und 21).



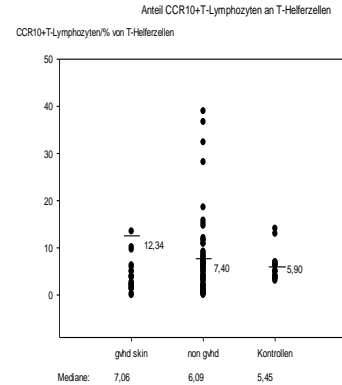
### 3 Ergebnisse



**Abb. 20:** Mittelwerte/Verteilung vor Steroidbeginn bei früher u. später GvHD der Haut  
p(gvhd skin vs. non gvhd):0,042.



**Abb. 21:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher u. später GvHD der Haut  
p(gvhd skin vs. non gvhd):0,026.



**Abb.22:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD der Haut  
p(gvhd skin vs. non gvhd):0,027.

Die Gruppe der Normalpersonen hatte im Vergleich zu den GvHD-Personen mit früher Manifestation zu allen Zeitpunkten deutlich höhere Relativ- (p:0,000) und Absolutwerte (p:0,000). Die Anteile an den T-Helferzellen lagen bei den Kontrollen(M:5,90%; s:0,60; n:22) im Vergleich zu Patienten mit früher GvHD vor Therapiebeginn (M:3,99%; s:0,73; n:22; p:0,005) und vier Tage danach (M:4,18%; s:0,88; n:20; p:0,025) ebenfalls deutlich höher. Auch hier drehte sich das Verhältnis jedoch bei Reduktion der Steroide unter 20mg am Tag um. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Wert der GvHD-Patienten 11,86% (s:2,38; n:19). Diese Unterschiede wiesen Signifikanz auf (p:0,004). Wurden frühe und späte Form zusammengefasst, waren die Signifikanzniveaus ähnlich.

### 3.9. Zytotoxische T-Zellen

Die Population der CD8-positiven-Lymphozyten zeichnete sich bei der Auswertung der FACS-Analysen deutlich von den restlichen PBMNCs ab. Die T-Killerzellen wurden sowohl bei der Bestimmung der CD8/CD25- als auch der CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positiven Zellen eingegrenzt. Bei ersterem Ansatz wurden ihre Werte durch Färbung mit APC ermittelt. Im zweiten Ansatz diente ein FITC-konjugierter Antikörper zur Markierung der T-Killerzellen. Ihre Anteile an den PBMNCs waren in beiden Messungen vergleichbar. Für die Berechnungen wurden analog zu den T-Helferzellen die Werte herangezogen, die sich bei der Färbung mit APC ergaben.

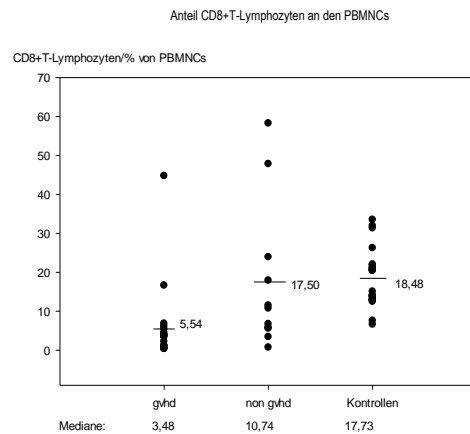
#### 3.9.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

CD8	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:
Take ges.:	31	9,78	4,07	2,64	161,63	34,56	56,93
Take gvhd:	20	5,54	3,48	2,22	51,46	19,46	27,86
Take non gvhd:	11	17,50	10,74	5,70	361,94	122,19	136,01
CsA<100 ges.:	12	25,67	23,48	3,63	543,32	566,80	87,57
CsA<100 gvhd:	11	21,62	23,44	2,42	457,04	475,01	80,02
CsA<100 non gvhd:	1	54,65	54,65	/	1047,93	1047,93	/
CsA Ende ges.:	9	32,80	34,23	5,70	750,92	523,10	206,45
CsA Ende gvhd:	6	37,49	40,34	8,46	985,06	854,18	356,06
CsA Ende non gvhd:	3	34,46	29,00	11,77	881,20	781,89	231,11
+4Wo ges.:	6	28,46	22,47	8,26	313,65	249,47	115,63
+4Wo gvhd:	4	21,51	18,49	8,21	157,54	135,70	62,98
+4Wo non gvhd:	2	42,37	42,37	18,14	625,86	625,86	174,71
+8Wo ges.:	7	33,88	34,07	7,73	678,52	501,01	264,86
+8Wo gvhd:	5	26,10	23,30	7,20	285,75	229,85	110,34
+8Wo non gvhd:	2	53,32	53,32	14,44	1660,45	1660,45	39,28
+12Wo ges.:	7	36,93	35,94	4,78	513,44	582,54	93,76
+12Wo gvhd:	5	35,43	35,94	2,16	405,49	360,81	87,97
+12Wo non gvhd:	2	40,66	40,66	20,34	783,31	783,31	72,47
Zusammenf. ges.:	40	31,90	29,20	2,64	618,90	523,10	81,73
Zusammenf. gvhd:	30	28,18	24,63	2,60	497,51	343,32	89,49
Zusammenf. non gvhd:	10	43,07	46,77	6,07	983,08	828,18	136,75
Kontrollen:	22	18,48	17,73	1,59	439,38	372,60	52,76

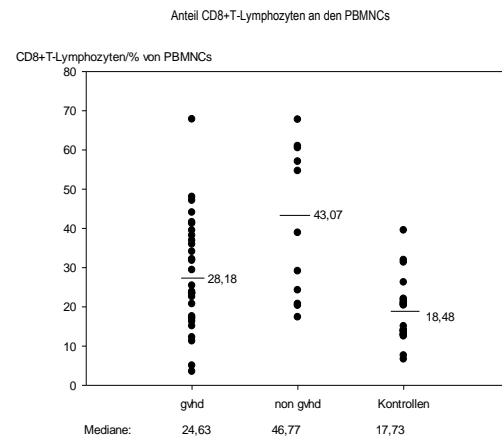
Tab. 26: CD8-Werte nach Transplantation.

### 3 Ergebnisse

Sowohl bei Take als auch bei Zusammenfassung der Zeitpunkte nach Abfall des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL hatten Patienten, die im späteren Verlauf an einer GvHD erkrankten, signifikant erniedrigte relative CD8-Werte gegenüber Patienten ohne Spender-gegen-Wirts-Reaktion (siehe Abbildung 23 und 24). Die Absolutwerte zeigten ein analoges Verhalten bei Take ( $p:0,005$ ) und bei Zusammenfassung aller Zeitpunkte nach Reduktion des CsA-Gehaltes unter 100 ng/mL ( $p:0,002$ ).



**Abb. 23:** Mittelwerte/Verteilung bei Take  
p(gvhd vs. non gvhd):0,006.



**Abb. 24:** Mittelwerte/Verteilung bei Zusammenfassung nach Red.  
von CsA unter 100ng/mL  
p (gvhd vs. non gvhd):0,006.

Die Anteile der T-Killerzellen an den PBMNCs waren bei den Normalpersonen im Vergleich zu den Patienten unabhängig vom Auftreten einer GvHD direkt nach Transplantation signifikant erhöht ( $p:0,000$ ). Nach Absetzen der CsA-Prophylaxe und allen darauffolgenden Zeitpunkten hingegen ergaben sich im Kollektiv der Gesunden deutlich geringere relative Werte ( $p:0,001-0,044$ ). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Absolutwerte zeigten sich nur bei Take mit höheren Zahlen an CD8-positiven Lymphozyten innerhalb der Kontrollen ( $p:0,000$ ).

### 3.9.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und mit Normalpersonen

CD8	n:	M rel.:	Median rel.:	S rel.:	M abs.:	Median abs.:	s abs.:
frühe GvHD vor IS:	21	11,85	5,44	2,98	225,47	50,34	89,23
frühe GvHD d+4:	20	12,33	8,74	2,31	182,63	47,71	66,76
frühe GvHD IS<20	18	22,65	11,24	5,81	672,79	151,29	267,86
späte GvHD vor IS:	3	22,30	13,11	9,30	127,37	141,12	14,59
späte GvHD d+4:	7	12,15	8,19	4,40	238,97	82,26	129,23
späte GvHD IS<20:	9	20,42	14,47	6,33	506,87	185,70	223,01
non gvhd früh:	51	17,90	11,50	2,56	383,16	122,19	70,58
non gvhd spät:	27	33,56	34,07	3,27	616,51	506,30	103,46
Kontrollen:	22	18,48	17,73	1,59	439,38	372,60	52,76

Tab. 27: CD8-Werte von GvHD-Proben.

Sowohl bei früher als auch bei später Manifestation waren die Anteile der CD8-positiven T-Lymphozyten meist erniedrigt im Vergleich zur Gruppe der Transplantierten, die bei Blutabnahme noch keine Manifestation zeigten oder nie eine GvHD entwickelten. Signifikanz lag allerdings nur am vierten Tag nach Therapiebeginn sowie nach Reduktion der Steroide unter 20 mg am Tag im Falle eines späten Auftretens vor (siehe Abbildung 25 und 26). Ähnlich verhielten sich auch die absoluten Zahlen mit statistischer Signifikanz vier Tage nach Beginn der Steroidtherapie bei später Manifestation (M: 238,97/ $\mu$ L; s: 129,23; n: 7) gegenüber Personen ohne Spender-gegen-Wirtsreaktion (M: 616,51/ $\mu$ L; s: 103,46; n: 27) ( $p=0,028$ ).

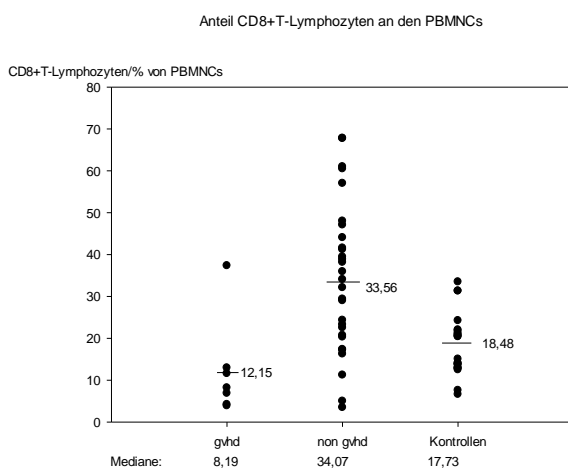


Abb. 25: Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei später GvHD  
p (gvhd vs. non gvhd):0,004.

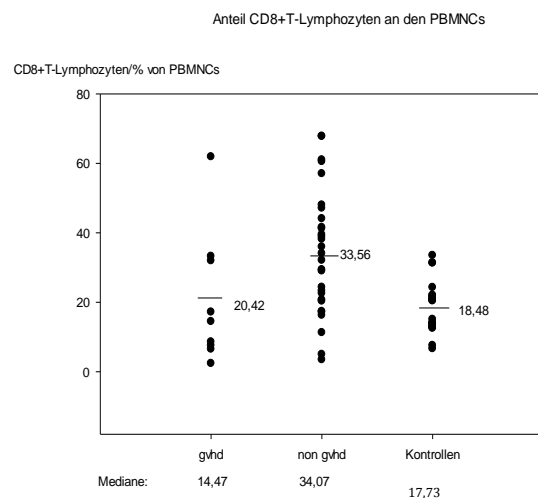


Abb. 26: Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei später GvHD  
p (gvhd vs. non gvhd):0,036.

Verglichen mit den Werten Gesunder ergaben sich innerhalb der GvHD-Gruppe nur vor (p:0,005) und vier Tage nach Therapiebeginn (p:0,032) im Falle eines frühen Auftretens und am vierten Tag nach Erhalt der ersten Steroiddosis (p:0,022) bei später GvHD-Manifestation deutlich niedrigere Anteile.

### **3.10. CD8/CD25-positive T- Lymphozyten**

Die exakte Grenze zwischen CD25-positiven und -negativen CD8-Lymphozyten war in den Dot-Plots bisweilen nur schwer zu erkennen. Deshalb wurden bei der Auswertung zunächst alle Leukozyten mit hoher CD25-Expression eingegrenzt, um einen Orientierungswert zu erhalten.

#### **3.10.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen**

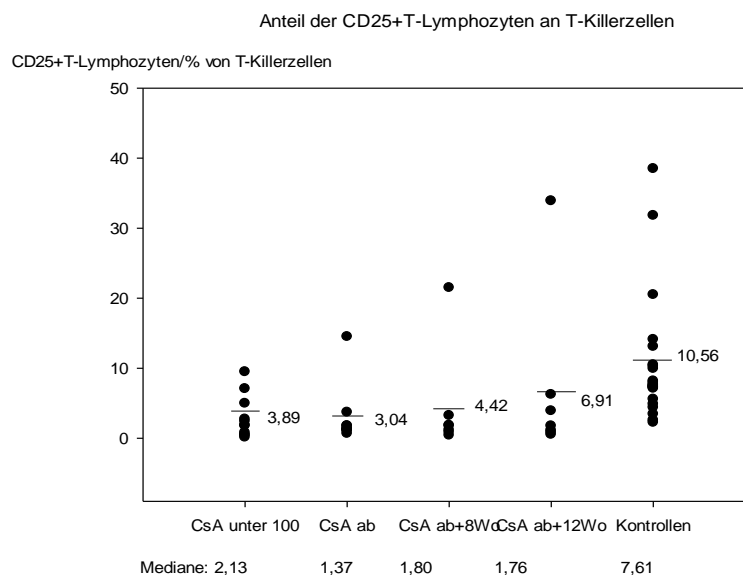
CD8/CD25	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	31	<b>0,46</b>	0,39	0,84	<b>4,97</b>	3,63	0,94	11,30	8,71	1,88
Take gvhd:	20	0,45	0,20	0,12	<b>3,45</b>	1,41	0,86	13,76	10,43	2,61
Take non gvhd:	11	0,48	0,56	0,83	<b>7,73</b>	8,44	1,94	6,83	5,40	1,84
CsA<100 ges.:	12	<b>0,48</b>	0,41	0,14	<b>9,38</b>	6,19	2,56	<b>3,89</b>	2,13	0,91
CsA<100 gvhd:	11	3,26	0,41	2,79	11,95	7,02	3,16	2,40	1,81	0,82
CsA<100 non gvhd:	1	0,58	0,58	/	3,25	3,25	/	7,07	7,07	/
CsA Ende ges.:	9	<b>0,70</b>	0,51	0,16	<b>12,38</b>	12,47	2,60	<b>3,04</b>	1,37	1,32
CsA Ende gvhd:	6	0,66	0,50	0,21	<b>11,97</b>	13,66	2,85	3,35	1,23	2,23
CsA Ende non gvhd:	3	0,72	0,64	0,15	<b>20,72</b>	23,66	5,82	2,42	1,79	0,65
+4Wo ges.:	6	1,06	1,28	0,28	<b>11,35</b>	12,04	3,63	5,00	4,16	1,66
+4Wo gvhd:	4	0,96	0,90	0,44	6,79	6,83	3,05	5,62	5,06	2,45
+4Wo non gvhd:	2	1,28	1,28	0,05	20,46	20,46	4,13	3,75	3,75	1,71
+8Wo ges.:	7	<b>1,09</b>	0,61	0,64	<b>12,30</b>	10,49	4,30	<b>4,42</b>	1,80	2,87
+8Wo gvhd:	5	1,22	0,42	0,91	7,04	7,04	3,30	5,57	1,80	4,01
+8Wo non gvhd:	2	0,77	0,77	0,05	25,45	25,45	6,00	1,53	1,53	0,33
+12Wo ges.:	7	2,53	1,07	1,75	21,50	14,14	8,95	<b>6,91</b>	1,76	4,56
+12Wo gvhd:	5	3,10	0,37	2,48	18,21	7,25	11,71	8,07	1,14	6,49
+12Wo non gvhd:	2	1,17	1,17	0,10	29,75	29,75	14,69	4,01	4,01	2,25
Zusammenf. ges.:	40	<b>1,08</b>	0,55	0,33	<b>13,55</b>	12,04	2,05	<b>3,11</b>	1,88	0,55
Zusammenf. gvhd:	30	1,13	0,42	0,44	<b>10,84</b>	7,14	2,25	4,53	1,59	1,35
Zusammenf. non gvhd:	10	0,92	0,92	0,10	<b>21,67</b>	21,56	3,72	3,29	1,95	0,69
Kontrollen:	22	<b>2,19</b>	1,13	0,64	<b>53,37</b>	26,17	17,11	<b>10,56</b>	7,61	1,92

Tab. 28: CD8/CD25-Werte nach Transplantation.

### 3 Ergebnisse

Wenngleich keine Signifikanz bestand, waren die Anteile der CD25-positiven Zellen an den CD8-Lymphozyten tendenziell größer, wenn es später zur Manifestation einer GvHD kam. Die mittleren Absolutwerte betrugen innerhalb der Transplantierten mit späterer GvHD-Entwicklung bei Take 3,45/ $\mu\text{L}$  (s:0,86; n:20), bei Absetzen von CsA 11,97/ $\mu\text{L}$  (s:2,85; n:6) und bei Zusammenfassung aller Werte nach Reduktion von CsA 10,84/ $\mu\text{L}$  (s:2,25; n:30). Ohne Auftreten einer GvHD waren die entsprechenden Zahlen hingegen mit 7,73/ $\mu\text{L}$  (s:1,94; n:11), 20,72/ $\mu\text{L}$  (s:5,82; n:3) bzw. mit 21,67/ $\mu\text{L}$  (s:3,72; n:10) (p:0,003 – 0,027) signifikant größer.

Normalpersonen zeigten stets tendenziell höhere relative Mittelwerte im Vergleich zu den Patienten. Die Unterschiede vier und zwölf Wochen nach Absetzen von CsA waren allerdings nicht statistisch signifikant. Das Signifikanzniveau p lag bei den übrigen Zeitpunkten zwischen 0,000 und 0,017. Mit Ausnahme der Blutabnahmen zwölf Wochen nach Ende der CsA-Prophylaxe waren auch die absoluten Zahlen deutlich erhöht (p:0,000 – 0,017). Der Anteil der aktivierten Zellen an den CD8-positiven Lymphozyten war bei Gesunden ebenfalls eher größer. Abgesehen von den Werten kurz nach Transplantation und vier Wochen nach Absetzen von CsA erfüllten die Unterschiede jeweils die Signifikanzkriterien (siehe Abbildung 27).



**Abb. 27:** Mittelwerte/Verteilung nach Red., Absetzen von CsA, 8 und 12Wo nach CsA-Ende  
p(CsA unter 100 vs. Kont.):0,002, p(CsA ab vs. Kont.):0,001, p(CsA ab+8Wo vs. Kont.):0,005, p(CsA ab+12Wo vs. Kont.):0,017.

### 3.10.2. Vergleich von GvHD-Patienten mit Transplantierten ohne Manifestation bei Blutentnahme und Normalpersonen

CD8/CD25	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	S Ant.:
frühe GvHD vor IS:	18	<b>1,04</b>	0,50	0,52	<b>17,62</b>	4,73	9,54	11,19	4,26	3,60
frühe GvHD d+4:	19	<b>1,40</b>	0,49	0,55	<b>10,27</b>	4,23	3,24	14,42	8,23	3,26
frühe GvHD IS<20:	18	<b>0,96</b>	0,63	0,26	<b>22,90</b>	5,52	10,75	8,44	5,52	2,34
späte GvHD vor IS:	3	<b>0,54</b>	0,39	0,18	<b>4,67</b>	2,94	2,69	3,58	2,99	1,80
späte GvHD d+4:	6	<b>0,47</b>	0,27	0,25	<b>22,47</b>	1,65	20,92	<b>4,18</b>	3,12	1,87
späte GvHD IS<20	9	<b>1,00</b>	0,40	0,45	<b>18,14</b>	5,75	8,29	9,38	2,79	5,10
Zusammenf. vor IS:	21							<b>10,10</b>	3,21	3,14
Zusammenf. d+4:	25							11,96	4,48	2,65
Zusammenf. IS<20	27							8,76	5,19	2,25
non gvhd früh:	51	0,51	0,46	0,06	7,67	4,99	1,06	8,04	4,10	1,31
non gvhd spät:	27	1,32	0,61	0,48	14,98	13,43	2,80	4,75	1,79	1,46
non gvhd Zus.:	70							7,40	3,48	1,09
Kontrollen:	22	<b>2,19</b>	1,13	0,64	<b>53,37</b>	26,17	17,11	<b>10,56</b>	7,61	1,92

Tab. 29: CD8/CD25-Werte von GvHD-Proben.

Das Vorliegen einer GvHD schien die Population der aktivierten T-Killer-Zellen nicht zu beeinflussen.

Jedoch ergab sich beim Vergleich der GvHD-Patienten mit den Normalpersonen stets ein signifikanter Unterschied sowohl der relativen ( $p:0,001 - 0,024$ ) als auch der absoluten ( $p:0,000 - 0,010$ ) Zahlen. Der Prozentsatz CD25-positiver Zellen innerhalb der CD8-Lymphozyten zeigte nur gegenüber den Patienten, die eine späte GvHD erlitten, am vierten Tag der Steroidtherapie sowie bei Zusammenfassung der frühen und späten Manifestationen vor Behandlungsbeginn relevante Abweichungen ( $p:0,023 - 0,041$ ) mit höheren Anteilen im Kontrollkollektiv.

### 3.11. CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positive T-Lymphozyten

Zur exakten Eingrenzung der Population der CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positiven Lymphozyten wurden auch hier zunächst alle Leukozyten mit hoher  $\beta_7$ -Integrin- und CD45RA-Expression bestimmt. Die Cut-offs für die entsprechende Population innerhalb der zytotoxischen T-Zellen hatten ein ähnliches Niveau.

### 3.11.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

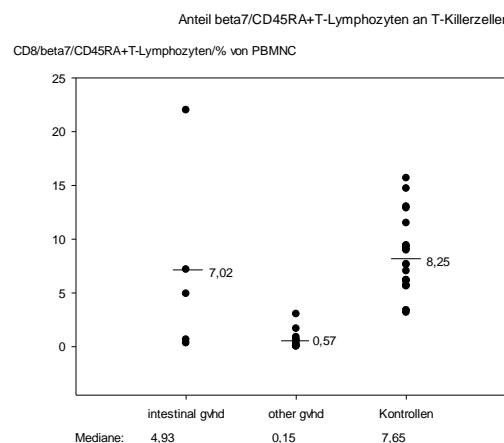
CD8/beta7/CD45RA	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Take ges.:	31	1,95	0,66	0,73	19,33	3,12	6,40	19,39	15,10	3,20
Take gvhd:	20	2,18	0,46	1,12	7,61	2,81	2,27	22,35	14,40	4,59
Take non gvhd:	11	1,54	1,28	0,37	40,63	21,63	16,05	14,02	15,20	3,06
Take gvhd int./liv.:	5	7,02	4,93	3,96	15,03	12,35	6,12	38,93	43,20	13,80
Take other gvhd:	15	0,57	0,15	0,21	5,14	2,13	2,01	16,82	13,70	3,36
CsA<100 ges.:	11	5,60	4,41	1,87	113,31	116,44	29,10	23,91	15,00	8,11
CsA<100 gvhd:	10	5,34	3,55	2,04	108,92	94,12	31,81	24,80	15,80	8,91
CsA<100 non gvhd:	1	8,20	8,20	/	157,20	157,20	/	15,00	15,00	/
CsA<100 gvhd int./liv.:	4	7,73	4,73	4,95	93,42	71,32	52,07	35,98	27,01	4,90
CsA<100 other gvhd:	6	4,82	4,41	1,47	103,81	71,81	39,92	16,49	11,40	21,08
CsA Ende ges.:	9	3,64	3,18	0,96	97,22	48,00	42,44	11,05	8,13	2,29
CsA Ende gvhd:	6	3,99	2,40	1,85	123,90	47,19	81,96	8,91	5,98	2,80
CsA Ende non gvhd:	3	4,22	4,45	0,33	124,68	107,46	39,56	15,34	112,30	5,28
CsA Ende gvhd int./liv.:	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/
CsA Ende other gvhd:	6	3,99	2,40	1,85	123,90	47,20	81,96	8,91	5,98	3,68
+4Wo ges.:	6	4,10	5,20	1,03	46,86	44,27	15,77	14,74	10,85	3,73
+4Wo gvhd:	4	3,27	3,37	0,10	25,06	23,75	7,30	14,06	10,85	4,44
+4Wo non gvhd:	2	5,75	5,75	0,42	90,46	90,46	8,80	16,10	16,10	5,90
+4Wo gvhd int./liv.:	2	3,18	3,18	1,71	26,36	26,36	24,70	17,28	17,28	12,23
+4Wo other gvhd:	2	3,37	3,37	2,93	23,75	23,75	13,72	10,85	10,85	0,65
+8Wo ges.:	7	3,89	2,74	1,28	77,56	46,93	32,70	9,93	8,11	2,31
+8Wo gvhd:	5	3,27	2,20	1,76	35,04	11,79	19,71	9,50	8,05	3,19
+8Wo non gvhd:	2	5,45	5,45	0,04	183,87	183,87	52,39	11,01	11,01	2,90
+8Wo gvhd int./liv.:	1	0,11	0,11	/	0,95	0,95	/	3,16	3,16	/
+8Wo other gvhd:	4	4,06	2,47	2,03	43,56	29,36	22,94	11,08	8,90	3,57
+12Wo ges.:	7	95,79	2,60	91,88	73,45	33,79	32,21	12,51	10,60	4,73
+12Wo gvhd:	5	4,19	2,08	2,16	66,49	32,55	46,22	12,83	5,80	6,84
+12Wo non gvhd:	2	4,54	4,54	1,94	90,85	90,85	0,14	11,70	11,70	1,10
+12Wo gvhd int./liv.:	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/
+12Wo other gvhd:	5	4,19	2,08	1,90	66,48	32,55	46,22	12,83	5,80	6,84
Zusammenf. ges.:	40	20,52	3,64	16,08	92,55	62,48	16,61	15,20	10,35	2,62
Zusammenf. gvhd:	30	4,26	2,45	0,88	81,34	34,82	21,11	15,65	8,90	3,45
Zusammenf. non gvhd:	10	5,23	5,37	0,49	126,15	103,35	17,55	13,86	12,55	1,82
Zusammenf. gvhd int./liv.:	6	4,78	0,52	3,45	51,82	13,93	36,69	22,04	4,84	14,21
Zusammenf. other gvhd:	24	4,13	2,72	0,76	88,73	36,66	24,84	14,05	9,98	2,70
Kontrollen:	22	8,25	7,65	0,76	186,96	160,61	20,28	46,56	44,40	3,08

Tab. 30: CD8/beta7/CD45RA-Werte nach Transplantation.



Signifikante Abweichungen zwischen Personen mit und ohne Auftreten einer GvHD in der Zeit nach Stammzellgabe hinsichtlich der Anteile an den T-Killerzellen und den relativen Zahlen waren nicht zu verzeichnen. Jedoch schienen die Absolutwerte zu jedem Zeitpunkt nach Transplantation bei Patienten mit GvHD-Entwicklung im Verlauf niedriger zu sein. Nach Zusammenfassung aller absoluten Zahlen nach Abfall des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL erreichten die Unterschiede ein Signifikanzniveau von  $p:0,015$ . Hierbei ergaben sich Zahlen von  $126,15/\mu\text{L}$  (s:17,55; n:10) ohne Manifestation bzw.  $81,34/\mu\text{L}$  (s:21,11; n:30) mit Entwicklung einer Reaktion.

Bei Erreichen eines Leukozytenwertes über  $1000/\mu\text{L}$  waren die mittleren relativen Werte der Empfänger mit Darmbefall im späteren Verlauf (M:7,02%; s:3,96; n:5) gegenüber entsprechenden Zahlen von GvHD-Patienten mit anderen Manifestationsorten (M:0,57%; s:0,21; n:15) signifikant höher ( $p:0,021$ ) (siehe Abbildung 28). Auch gegenüber Transplantierten ohne GvHD waren die Werte im Falle einer intestinalen Manifestation tendenziell größer, wenngleich keine Signifikanz bestand.



**Abb. 28:** Mittelwerte/Verteilung bei Take  
 $p(\text{intestinal gvhd vs. other gvhd}):0,021$ .

Die Gruppe der Normalpersonen wies zu allen Zeitpunkten deutlich größere Relativ- und Absolutwerte auf (Relativwerte:  $p:0,000 - 0,051$ , Absolutwerte:  $p:0,000 - 0,035$ ). Auffällig war, dass die Anteile der CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positiven Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Transplantierten ebenfalls stets höher lagen (siehe Abbildung 29 und 30).

### 3 Ergebnisse

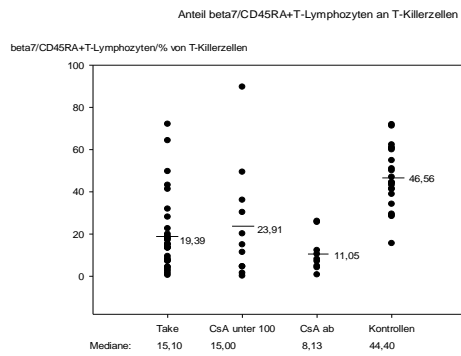


Abb. 29: Mittelwerte/Verteilung bei Take, Red. und CsA-Ende  
p(Take vs. Kont.):0,00, p(CsA unter 100 vs. Kont.):0,004, p(CsA ab vs. Kont.):0,00.

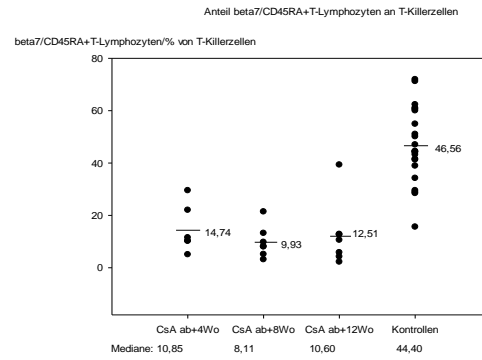


Abb. 30: Mittelwerte/Verteilung 4, 8 u. 12Wo nach CsA-Ende  
p(CsA ab +4Wo vs. Kont.):0,001, p(CsA ab +8Wo vs. Kont.):0,00, p(CsA ab +12Wo vs. Kont.):0,002.

#### 3.11.2. Einteilung der GvHD-Patienten nach Manifestationsorgan und Vergleich mit mit Transplantierten ohne Reaktion sowie mit Normalpersonen

CD8/beta7/CD45RA	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
frühe GvHD vor IS:	21	<b>2,91</b>	1,46	0,83	<b>47,95</b>	7,76	16,90	<b>22,55</b>	20,60	3,40
frühe GvHD int./liv. vor IS:	3	6,49	4,29	4,49	114,44	46,98	91,40	24,50	25,40	5,01
frühe GvHD other vor IS:	18	2,31	1,46	0,64	36,87	6,82	13,37	22,23	16,65	3,92
frühe GvHD d+4:	20	<b>2,61</b>	1,25	0,75	<b>37,18</b>	9,22	14,01	<b>22,27</b>	16,35	3,68
frühe GvHD int./liv. d+4:	2	0,98	0,98	0,94	5,14	5,14	4,20	23,35	23,35	7,55
frühe GvHD other d+4:	18	2,79	1,25	0,82	40,74	9,22	15,37	22,15	16,35	4,01
frühe GvHD IS<20:	18	<b>3,24</b>	2,62	0,62	<b>90,24</b>	35,43	32,29	<b>20,19</b>	20,55	3,08
frühe GvHD int./liv. IS<20:	1	0,98	0,98	/	31,21	31,21	/	5,67	5,67	/
frühe GvHD other IS<20:	17	3,06	2,57	0,63	83,12	28,78	33,40	18,59	20,20	2,80
späte GvHD vor IS:	3	<b>1,62</b>	1,48	0,74	<b>12,92</b>	16,42	4,96	<b>7,30</b>	7,24	2,40
späte GvHD int./liv. vor IS:	2	0,95	0,95	0,53	9,76	9,76	6,66	7,34	7,34	4,17
späte GvHD other vor IS:	1	2,96	2,96	/	19,22	19,22	/	7,24	7,24	/
späte GvHD d+4:	7	<b>1,52</b>	0,74	0,81	<b>20,97</b>	7,29	9,97	<b>9,73</b>	8,86	1,72
späte GvHD int./liv. d+4:	4	0,87	0,87	0,31	21,89	5,40	18,03	8,91	9,28	2,29
späte GvHD other d+4:	3	2,40	0,56	1,94	19,74	21,89	6,66	10,83	8,86	3,04
späte GvHD IS<20	9	<b>3,59</b>	1,48	1,90	<b>65,70</b>	31,21	28,06	<b>14,68</b>	5,85	5,76
späte GvHD int./liv. IS<20:	5	1,11	0,98	0,53	16,63	12,91	7,63	9,91	5,67	4,14
späte GvHD other IS<20:	4	6,69	4,11	3,93	127,03	127,05	48,68	20,64	10,08	12,22
Zusammenf. vor IS:	24							<b>20,65</b>	14,05	3,16
Zusammenf. int./liv. vor IS:	4							15,69	13,44	6,22
Zusammenf. other vor IS:	20							21,64	16,65	3,60

CD8/beta7/CD45RA	n:	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med. Ant.:	s Ant.:
Zusammenf. d+4:	27							<b>19,02</b>	15,80	2,94
Zusammenf. int./liv. d+4:	6							13,72	12,35	3,89
Zusammenf. other d+4:	21							20,53	16,20	3,59
Zusammenf. IS<20	27							<b>18,35</b>	18,30	2,80
Zusammenf. int./liv. IS<20:	6							16,16	12,64	7,10
Zusammenf. other IS<20:	21							18,98	18,30	3,06
non gvhd früh:	51	3,11	1,18	0,66	58,10	21,63	13,45	18,90	13,60	2,68
non gvhd spät:	27	<b>27,69</b>	2,79	23,83	<b>84,88</b>	46,93	21,64	11,53	10,20	1,67
non gvhd Zus.:	70							17,22	12,45	2,05
Kontrollen:	22	<b>8,25</b>	7,65	0,76	<b>186,96</b>	160,61	20,28	<b>46,56</b>	44,40	3,08

Tab. 31: CD8/beta7/CD45RA-Werte von GvHD-Proben.

Die Patienten, die bei Blutentnahme bereits an einer GvHD litten, hatten vier Tage nach erster Steroidgabe bei spätem Auftreten einen mittleren relativen Wert von 1,52% (s:0,81; n:7). Das entsprechende Mittel innerhalb der Patienten ohne GvHD-Manifestation lag mit 27,69% (s:23,83; n:27) signifikant höher (p:0,031). Die absoluten Zahlen zeigten mit 20,97/ $\mu$ L (s:9,97; n:7) und 84,88/ $\mu$ L (s:21,64; n:27) ein ähnliches Verhalten (p:0,028). Patienten mit einer Darm-GvHD hatten im Vergleich zu solchen mit anderen Manifestationsorten im Falle eines frühen Auftretens vor Therapiebeginn erhöhte Relativ- und Absolutwerte sowie größere Anteile von CD8/ $\beta$ 7/CD45RA-positiven Zellen. Vor allem bei später Manifestation nach Reduktion der Steroidtherapie schien sich das Verhältnis eher umzukehren. Signifikanz bestand jedoch nicht.

Innerhalb der Normalpersonen waren zu allen Zeitpunkten höhere Werte gegenüber den GvHD-Patienten zu verzeichnen. Auffällig waren auch hier die stets größeren Anteile der Zellen an der Gesamtheit der T-Killerzellen (p:0,000 – 0,006).

### 3.12. CK18F-Werte im Serum

CK18F entsteht durch Kaspasen-induzierte Spaltung von Zytokeratin18 im Rahmen von Apoptoseprozessen. Wie bereits unter 2.5 beschrieben, erfolgte die Quantifizierung der Konzentration im Serum durch Detektion der neu entstandenen Epitope.

#### 3.12.1. Betrachtung der Patienten nach Transplantation und Vergleich mit gesunden Kontrollen

CK18F	n:	M:	Med.:	s:
Take ges.:	28	<b>143,44</b>	128,43	23,39
Take gvhd:	18	136,16	117,68	31,97
Take non gvhd:	10	156,55	132,15	33,06
Take gvhd int./liv.	5	149,60	105,90	75,29
Take other gvhd	13	130,99	129,45	35,64
CsA<100 ges.:	10	105,78	71,34	37,31
CsA<100 gvhd:	9	117,53	93,35	39,59
CsA<100 non gvhd:	1	0,00	0,00	/
CsA<100 gvhd int./liv.:	3	84,91	93,35	33,70
CsA<100 other gvhd:	6	133,84	113,77	58,09
CsA Ende ges.:	7	82,38	40,75	29,95
CsA Ende gvhd:	5	82,51	77,88	36,57
CsA Ende non gvhd:	2	101,38	101,38	60,63
CsA Ende gvhd int./liv.:	0	/	/	/
CsA Ende other gvhd:	5	82,51	77,88	36,57
+4Wo ges.:	6	10,05	9,16	1,65
+4Wo gvhd:	4	29,93	0,00	18,12
+4Wo non gvhd:	2	80,25	80,25	55,76
+4Wo gvhd int./liv.:	2	59,85	59,85	/
+4Wo other gvhd:	2	0,00	0,00	/
+8Wo ges.:	7	76,04	75,88	20,77
+8Wo gvhd:	5	64,77	75,88	24,35
+8Wo non gvhd:	2	104,23	104,23	44,88
+8Wo gvhd int./liv.:	1	16,82	16,82	/
+8Wo other gvhd:	4	76,76	92,54	27,37
+12Wo ges.:	7	<b>206,29</b>	192,80	41,66
+12Wo gvhd:	5	212,34	192,80	57,31
+12Wo non gvhd:	2	191,15	191,15	57,25
+12Wo gvhd int./liv.:	0	/	/	/
+12Wo other gvhd:	5	212,34	192,80	57,31
Zusammenf. ges.	38	111,06	111,95	16,96
Zusammenf. gvhd:	29	112,63	109,20	20,85
Zusammenf. non gvhd:	9	105,99	133,90	26,68
Zusammenf. gvhd int./liv.:	6	65,20	58,06	24,18
Zusammenf. other gvhd:	23	125,01	114,70	25,08

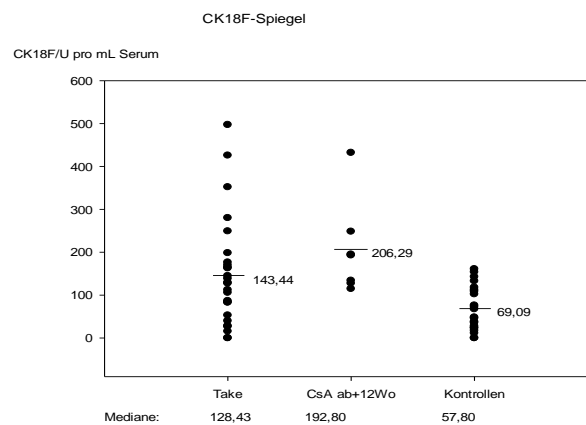
### 3 Ergebnisse

CK18F	n:	M:	Med.:	s:
Kontrollen:	22	69,09	57,80	11,07

**Tab. 32:** CK18F-Werte nach Transplantation.

Bei der Analyse der Werte von Patienten, die im weiteren Verlauf an einer GvHD erkrankten, und der CK18F-Spiegel der übrigen Empfänger ergaben sich zu keinem der Zeitpunkte deutliche Tendenzen oder gar statistisch signifikante Unterschiede.

Auch die Proben von Personen mit späterem Darm- oder Leberbefall zeigten keine relevanten Abweichungen gegenüber Seren von Transplantierten, die in Folge eine andere GvHD-Manifestation entwickelten.



**Abb. 31:** Mittelwerte/Verteilung bei Take u. 12Wo nach CsA-Ende  
p(Take vs. Kont.):0,015, p(CsA ab+12Wo vs. Kont.):0,001.

Jedoch lagen die CK18F-Werte der Normalpersonen stets unterhalb entsprechender Patientenspiegel. Bei Take und zwölf Wochen nach Absetzen der CsA-Prophylaxe bestand hinsichtlich der Unterschiede Signifikanz (siehe Abbildung 31).

### 3.12.2. Einteilung der GvHD-Patienten nach Manifestationsorgan und Vergleich mit Transplantierten ohne Reaktion sowie mit Normalpersonen

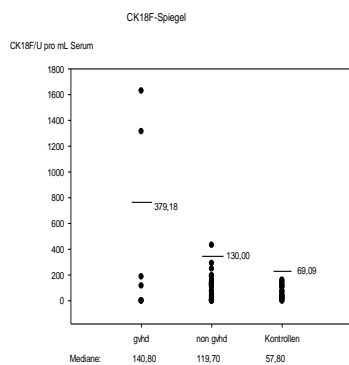
CK18F	n:	M:	Med.:	s:
frühe GvHD vor IS:	33	<u>265,01</u>	151,10	104,70
frühe GvHD int./liv. vor IS:	10	<u>564,12</u>	148,75	334,31
frühe GvHD other vor IS:	23	134,96	151,90	21,51
frühe GvHD d+4:	25	<u>379,18</u>	140,80	180,56
frühe GvHD int./liv. d+4	8	789,74	146,40	549,78
frühe GvHD other d+4:	17	185,97	140,80	48,93
frühe GvHD IS<20:	33	174,78	73,66	43,90
frühe GvHD int./liv. IS<20:	7	196,51	124,10	73,60
frühe GvHD other IS<20:	26	168,93	72,34	52,67
späte GvHD vor IS:	4	155,10	140,71	71,78
späte GvHD int./liv. vor IS:	4	155,10	140,71	71,78
späte GvHD other IS<20;	0	/	/	/
späte GvHD d+4:	7	463,74	116,60	263,82
späte GvHD int./liv. d+4:	5	649,24	186,60	340,66
späte GvHD other d+4:	2	0,00	0,00	19,45
späte GvHD IS<20:	13	188,87	91,50	122,73
späte GvHD int./liv. IS<20:	8	252,07	79,85	166,46
späte GvHD other IS<20:	5	87,74	91,50	38,06
Zusammenf. vor IS:	37	<u>253,12</u>	151,10	93,65
Zusammenf. int./liv. vor IS:	15	<u>440,67</u>	151,10	224,75
Zusammenf. other vor IS:	22	125,25	148,50	20,09
Zusammenf. d+4:	32	397,68	140,10	150,68
Zusammenf. int./liv. d+4:	13	735,70	153,40	351,81
Zusammenf. other d+4:	19	166,40	121,90	45,66
Zusammenf. IS<20:	39	178,55	78,68	48,35
Zusammenf. int./liv. IS<20:	15	226,14	94,59	92,34
Zusammenf. other IS<20:	24	148,80	76,17	54,16
non gvhd früh:	46	<u>130,00</u>	119,70	17,35
non gvhd spät:	28	112,85	117,20	19,21
non gvhd Zus.:	66	124,80	117,20	13,95
Kontrollen:	22	<u>69,09</u>	57,80	11,07

Tab. 33: CK18F-Werte von GvHD-Proben.

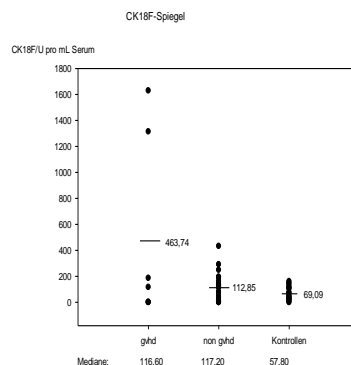
### 3 Ergebnisse

Patienten, bei denen zum Abnahmezeitpunkt bereits eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion vorlag, schienen stets höhere Mittelwerte gegenüber den Empfängern ohne GvHD aufzuweisen. Vor allem am vierten Tag nach Therapiebeginn ergaben sich unterschiedliche CK18F-Spiegel (siehe Abbildung 32, 33, 34).

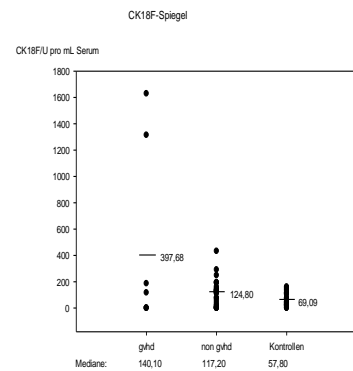
Ein ähnliches Verhalten war zu den gleichen Zeitpunkten innerhalb des GvHD-Kollektivs erkennbar. Während Patienten ohne Befall des Intestinaltraktes oder der Leber am vierten Tag der Therapie mittlere Spiegel von 185,97 U/mL (s:48,93; n:17) bei früher, 0,0 U/mL (s:19,45; n:2) bei später und 166,40 U/mL (s:45,66; n:19) bei Zusammenfassung der frühen und späten Form besaßen, lagen entsprechende Werte bei Darm- oder Leber-GvHD-Proben mit 789,74 U/mL (s:549,78; n:8), 649,24 U/mL (s:340,66; n:5) und 735,70 U/mL (s:351,81; n:13) höher. In Bezug auf die Mediane waren die Abweichungen zwischen den einzelnen Kollektiven allerdings deutlich geringer, was auf eine große Streubreite innerhalb der Darm- und Leber-GvHD-Patienten hinweist. Nur bei früher *graft-versus-host-disease* bestand Signifikanz.



**Abb. 32:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,047



**Abb. 33:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,95 (nicht signifikant).

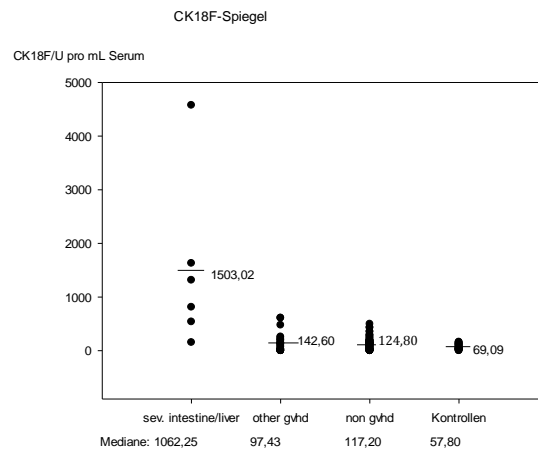


**Abb. 34:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher u. später GvHD  
p(gvhd vs. non gvhd):0,28 (nicht signifikant).

Fassten wir jedoch alle Patienten mit hepatischem *und* intestinalem Befall, wobei ein Organ mindestens den Ausprägungsgrad 3 besaß, und alle Patienten mit einer Darm-GvHD Grad 4 zusammen, ergaben sich signifikante Abweichungen gegenüber der Gruppe mit leichter intestinaler *graft-versus-host disease* oder anderen Organbeteiligungen am vierten Tag der Steroidtherapie bei Zusammenfassung der frühen und späten Manifestationsform. Das erste Kollektiv besaß hierbei mit 1503,02 U/mL (Median: 1062,25 U/mL; s:651,06; n:6) einen deutlich höheren Mittelwert als Personen mit anderen GvHD-Manifestationen, die eine durchschnittliche Konzentration von 142,60 U/mL (Median: 97,43 U/mL; s: 34,75; n:26) (p:0,001) präsentierten. Ähnlich verhielt sich die Gruppe mit

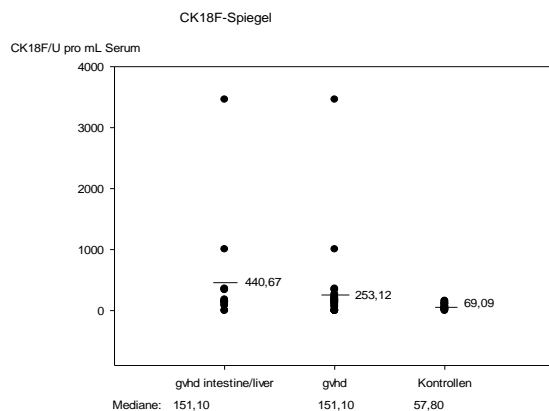
### 3 Ergebnisse

einer schweren Spender-gegen-Wirts-Reaktion gegenüber symptomlosen Transplantierten ( $p:0,00$ ) (siehe Abbildung 35).

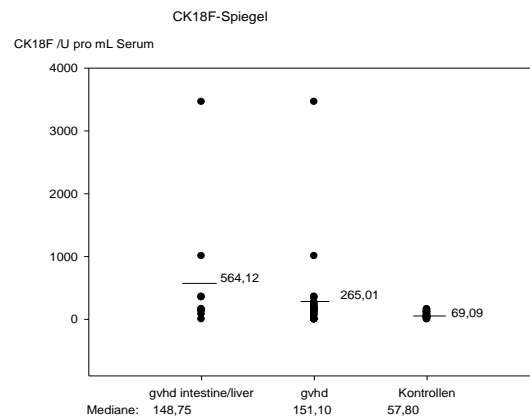


**Abb. 35:** Mittelwerte/Verteilung Tag4 nach Steroidbeginn bei früher u. später GvHD  
 $p(\text{sev. intestine/liver vs. other gvhd}):0,001$ ,  $p(\text{sev. intestine/liver vs. non gvhd}):0,00$ .

Signifikanz bot auch der Vergleich der Kontrollwerte mit den Serumspiegeln aller GvHD-Patienten vor Beginn einer Steroidtherapie. Ähnlich verhielt es sich bei den Unterschieden zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten, die an einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion des Darmes oder Leber litten (siehe Abbildung 36 und 37).



**Abb. 36:** Mittelwerte/Verteilung vor Steroidbeginn bei früher u. später GvHD  
 $p(\text{gvhd int./liv. vs. Kont.}):0,003$ ,  $p(\text{gvhd vs. Kont.}):0,005$ .



**Abb. 37:** Mittelwerte/Verteilung vor Steroidbeginn bei früher GvHD  
 $p(\text{gvhd int./liv. vs. Kont.}):0,004$ ,  $p(\text{gvhd vs. Kont.}):0,005$ .



### 3.13. Unterschiede innerhalb der GvHD-Gruppe am vierten Tag der Steroidtherapie in Abhängigkeit vom Therapieansprechen

Die Analyse der einzelnen Zellpopulationen vier Tage nach Beginn einer Steroidmedikation sollte klären, inwieweit frühzeitig der Erfolg einer GvHD-Therapie abgeschätzt werden kann. Als Endpunkte für ein fehlendes Ansprechen auf die Prednisongabe diente der GvHD-assoziierte Tod. Um genügend große Gruppen zu erhalten, wurden frühe und späte Form zusammengefasst.

Wenngleich keine Signifikanz vorlag, besaßen GvHD-Patienten, die an den Folgen der Spender-gegen-Wirts-Reaktion verstarben, am vierten Tag der Steroidtherapie tendenziell höhere Anteile FoxP3- bzw. FoxP3/CD25-positiver T-Helferzellen.

Die CK18F-Spiegel waren innerhalb der Gruppe der Transplantierten mit *graft-versus-host disease* stark erhöht, wenn es im Verlauf zu einem GvHD-assoziiertem Tod kam. Hierbei bestand Signifikanz (p: 0,047) (siehe Tabelle 34).

GvHD-ass. Mortalität	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	M ed	s Ant.:
Leukos ohne GvHD-ass. Tod (n:20)				4953,50	4365	712,40			
Leukos mit GvHD-ass. Tod (n:9)				8138,89	11100	1906			
PBMNC ohne GvHD-ass. Tod (n:20)				1134,30	786,50	222,52			
PBMNC mit GvHD-ass. Tod (n:9)				2207,40	646,28	937,19			
CD4 ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	11,89	7,79	2,18	174,89	73,79	60,16			
CD4 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	12,13	8,48	5,14	480,38	24,17	380,69			
CD4/CD95 ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	1,88	1,41	0,38	19,32	14,29	4,50	18,76	11,70	3,74
CD4/CD95 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	1,50	1,04	0,41	29,88	14,52	16,83	26,13	12,20	8,74
CD4/CD25low ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	7,25	3,27	2,76	83,25	19,89	40,69	40,11	37,80	4,74
CD4/CD25low mit GvHD-ass. Tod (n:9)	4,10	2,11	1,44	152,65	8,30	106,03	40,00	38,00	4,44
CD4/CD25int. ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	6,26	3,35	1,44	76,93	47,02	26,16	51,41	53,20	4,44
CD4/CD25int. mit GvHD-ass. Tod (n:9)	6,92	3,46	3,27	274,83	15,13	229,39	49,92	50,50	4,18
CD4/CD25high ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	0,93	0,67	0,18	11,41	7,05	3,33	8,58	8,24	0,87
CD4/CD25high mit GvHD-ass. Tod (n:9)	1,16	0,39	0,66	57,56	2,90	52,16	9,99	11,50	1,50
CD4/CCR10 ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	0,59	0,43	0,12	8,21	4,90	2,46	4,13	4,00	0,68
CD4/CCR10 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	0,82	0,18	0,48	39,14	1,23	35,64	6,73	7,10	1,82
CD4/FoxP3/CD25 ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	0,12	0,06	0,03	4,73	2,03	1,84	<b>4,46</b>	4,12	0,65
CD4/FoxP3/CD25 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	0,30	0,04	0,25	33,77	3,82	30,51	<b>7,27</b>	7,29	1,34
CD4/FoxP3 ohne GvHD-ass. Tod (n:20)	0,18	0,13	0,04	7,76	5,97	2,07	9,25	9,01	1,25
CD4/FoxP3 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	0,50	0,13	0,36	49,70	2,24	44,75	11,47	10,1	1,63
CD8 ohne GvHD-ass. Tod (n:19)	13,71	9,43	2,88	230,41	52,63	230,41			
CD8 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	9,77	8,05	2,47	263,32	50,70	263,32			
CD8/CD25 ohne GvHD-ass. Tod (n:17)	1,18	0,46	0,60	8,78	4,01	3,39	10,92	4,48	2,96
CD8/CD25 mit GvHD-ass. Tod (n:9)	1,13	0,45	0,38	21,89	5,42	13,56	13,58	8,23	4,98
CD8/beta7/CD45RA ohne GvHD-ass. Tod (n:19)	2,60	1,12	0,80	41,15	7,29	15,60	19,50	16,00	3,78
CD8/beta7/CD45RA mit GvHD-ass. Tod (n:9)	1,30	1,30	0,32	23,25	7,05	10,84	17,58	13,90	17,58

GvHD-ass. Mortalität	M rel.:	Med. rel.:	s rel.:	M abs.:	Med. abs.:	s abs.:	M Ant.:	Med Ant.	s Ant.:
CK18F ohne GvHD-ass. Tod (n:23)				182,29	126,80	46,06			
CK18F mit GvHD-ass. Tod (n:6)				703,63	538,70	260,80			

Tab. 34: Zellpopulationen und CK18F-Spiegel bei GvHD-Patienten mit und ohne GvHD-assoziiertem Tod

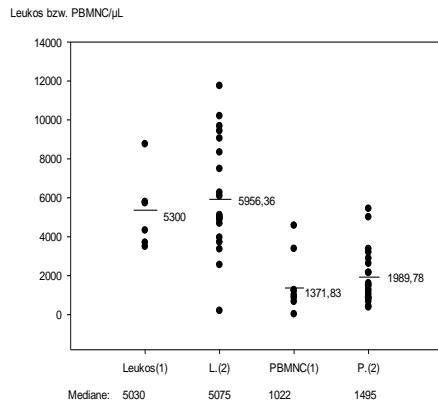
In einigen Fällen ging die akute GvHD in die chronische Form über oder es kam nach Abklingen der akuten Spender-gegen-Wirts-Reaktion zu einer chronischen *graft-versus-host disease*. Zur Klärung der Frage, inwieweit die spätere Entwicklung einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion frühzeitig erkannt werden kann, wurden GvHD-Patienten am vierten Tag nach Beginn der Steroidbeginn eingeteilt in solche, bei denen die akute in die chronische Form überging bzw. nach Abheilung der akuten Spender-gegen-Wirts-Reaktion eine chronische auftrat und solche, bei denen es im weiteren Verlauf nicht zu einer chronischen GvHD kam. Der Anteil CD95-positiver T-Helferzellen war bei späterer Entwicklung einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion mit 35,83% (s: 9,65; n:7) signifikant höher als bei GvHD-Patienten ohne chronische Form im weiteren Verlauf (M: 16,35%; s:3,37; n: 22) (p: 0,021).

#### **3.14. Unterschiede innerhalb der GvHD-Gruppe nach Reduktion der Immunsuppression zwischen Patienten mit und ohne Auftreten eines zweiten Schubes**

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem auch, herauszufinden, ob sich bei Patienten mit einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion während des Ausschleichens der Steroide bestimmte Zellpopulationen anders verhalten, wenn es in Folge zu einem weiteren Schub kommt. Deshalb wurde innerhalb der GvHD-Gruppe zum Zeitpunkt der Reduktion der Prednisolondosis unter 20 mg am Tag unterschieden zwischen Personen mit einer einmaligen Manifestation und solchen mit rezidivierenden Symptomen. Hierbei waren keine signifikanten Abweichungen zu verzeichnen. Die einzelnen Mittelwerte und Mediane sind in Graph 38 wiedergegeben.

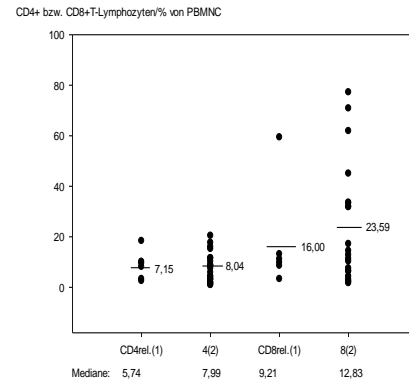
### 3 Ergebnisse

Zellpopulationen nach Steroidreduktion



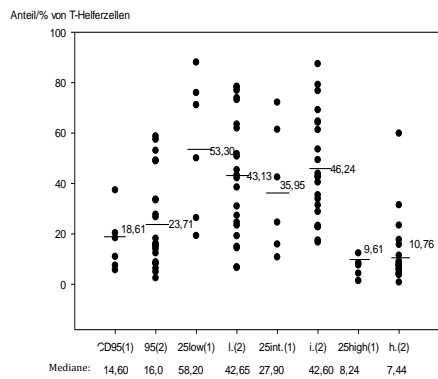
**Abb. 38.1:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
(1)GvHD-Patienten mit 2. Schub  
(2)GvHD-Patienten ohne 2. Schub.

Zellpopulationen nach Steroidreduktion



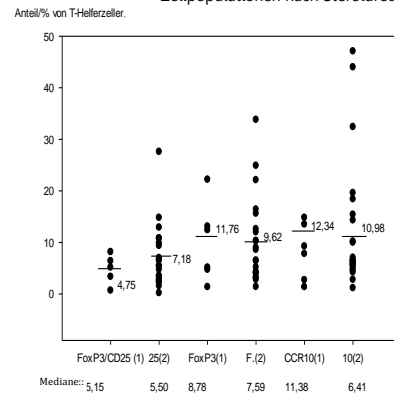
**Abb. 38.2:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
(1)GvHD-Patienten mit 2. Schub  
(2)GvHD-Patienten ohne 2. Schub.

Zellpopulationen nach Steroidreduktion



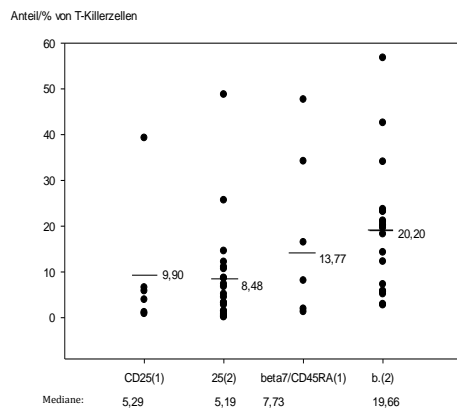
**Abb. 38.3:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
(1)GvHD-Patienten mit 2. Schub  
(2)GvHD-Patienten ohne 2. Schub.

Zellpopulationen nach Steroidreduktion



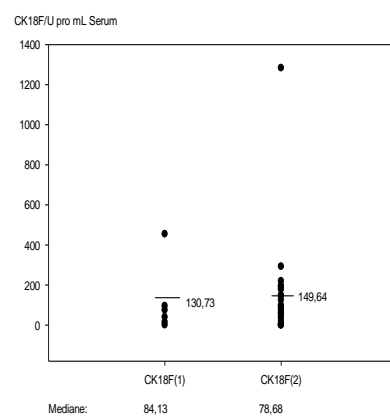
**Abb. 38.4:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
(1)GvHD-Patienten mit 2. Schub  
(2)GvHD-Patienten ohne 2. Schub.

Zellpopulationen nach Steroidreduktion



**Abb. 38.5:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
(1)GvHD-Patienten mit 2. Schub  
(2)GvHD-Patienten ohne 2. Schub.

CK18F nach Steroidreduktion



**Abb. 38.6:** Mittelwerte/Verteilung nach Red. der Steroide bei früher u. später GvHD  
(1)GvHD-Patienten mit 2. Schub  
(2)GvHD-Patienten ohne 2. Schub.

### **3.15. Unterschiede zwischen Patienten mit erstmaliger GvHD-Manifestation und Patienten mit zweitem GvHD-Schub**

Wenngleich keine Signifikanz bestand, waren die Anteile CCR10-positiver Zellen an den CD4-Lymphozyten innerhalb der Patienten, die bereits an einem zweiten GvHD-Schub litten, sowohl vor, vier Tage nach erster Steroidgabe und nach Reduktion der Steroiddosis tendenziell höher im Vergleich zu Transplantierten, bei denen die erste Manifestation einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion vorlag. Patienten mit wiederholter Symptomatik besaßen zu den jeweiligen Zeitpunkten Mittelwerte von 7,38% (s:5,94; n:7), 6,45% (s:4,60; n:4) und 13,64% (s:194,84; n:7). Bei Transplantierten mit erstem GvHD-Schub lagen die Anteile mit 3,92% (s:3,41; n:25), 4,47% (s:3,92; n:26) und 11,5% (s:11,73; n:27) niedriger.

### **3.16. Vergleich von Absolutwerten unter Verwendung laborchemisch und mikroskopisch ermittelter Leukozytenzahlen**

Die vorangehenden Ausführungen zu absoluten Werten bezogen sich stets auf diejenigen Zahlen, die unter Verwendung der im Labor ermittelten Leukozytenwerte entstanden. Zusätzlich wurden die weißen Blutkörperchen jedoch auch unter dem Mikroskop in der Zählkammer bestimmt und für die Ermittlung der Absolutwerte herangezogen. Die Ergebnisse waren stets vergleichbar und zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede. Dennoch war in einigen Fällen hinsichtlich der absoluten Zahlen nur Signifikanz gegeben, wenn sie aus den laborchemischen Leukozytenwerten berechnet wurden.

So war die Zahl der T-Helferzellen bei Transplantierten mit einer GvHD-Entwicklung im späteren Verlauf nur unter Berücksichtigung der Absolutwerte, die aus den maschinellen Leukozytenzahlen errechnet wurden, deutlich erniedrigt gegenüber Patienten, die in Folge keine Symptome zeigten.

CD8-positive T-Lymphozyten zeigten am vierten Tag nach Steroidbeginn bei später GvHD nur dann signifikant geringere Werte, wenn die Berechnung aus den laborchemischen Leukozytenzahlen erfolgte.

Ähnlich verhielt es sich zum gleichen Zeitpunkt für die absoluten beta7/CD45RA-positiven T-Killerzellen.

### **3.17. Untersuchung des Einflusses einer GvHD-Prophylaxe mit ATG oder MMF auf unterschiedliche Zellpopulation nach Transplantation**

ATG (Antithymozytenglobulin) ist eine Substanz, die sowohl auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten wirkt. Erstere

### 3 Ergebnisse

werden durch Binden des Antikörpers an Zielantigenen lysiert, opsoniert oder vermehrt in Apoptose geschickt. B-Zellen unterliegen ebenfalls nach ATG-Gabe vermehrt dem programmierten Zelltod. Die übrigen Populationen werden hauptsächlich durch Hemmung der Kostimulation und durch Verminderung der Leukozyten-Endothelinteraktion über strukturelle Veränderungen von Antigenen beeinflusst [129].

MMF (Mycophenolatmofetil) inhibiert die Inosinmonophosphatdehydrogenase, ein Enzym, das für die de novo Purinbiosynthese der Lymphozyten von Bedeutung ist und daher auch verstärkt auf diese Zellpopulation wirkt [130].

Die Gabe von ATG schien, einzelne Werte nach Stammzellgabe signifikant zu beeinflussen. Im Folgenden sind die einzelnen Zellpopulationen von Patienten mit und ohne ATG-Prophylaxe aufgeführt (siehe Tabelle 35). Untersucht wurde hierbei jeweils der Einfluss der Prophylaxe nach Take, nach Reduktion von CsA und bei Zusammenfassung aller Zeitpunkte nach Reduktion von CsA. Wertepaare mit signifikanten Unterschieden sind jeweils mit der gleichen Umrahmung versehen.

<b>Einfluss von ATG</b>	<b>Take ohne ATG:</b>	<b>Take mit ATG:</b>	<b>CsA&lt;100 ohne ATG:</b>	<b>CsA&lt;100 mit ATG:</b>	<b>Zus. ohne ATG:</b>	<b>Zus. mit ATG:</b>
<b>n:</b>	6	25	2	9	7	33
<b>M Leukos:</b>	3360,00	3061,60	3310,00	4958,89	12014,29	3870,30
<b>s Leukos:</b>	1859,87	557,63	2690,00	404,87	8008,29	237,50
<b>n:</b>	6	25	2	9	7	33
<b>M PBMNCs:</b>	1523,83	1289,61	2809,00	2172,78	2548,29	1709,10
<b>s PBMNCs:</b>	423,42	278,16	1079,00	348,25	488,64	193,36
<b>n:</b>	6	23	2	9	7	33
<b>M CD4rel.:</b>	<b>14,71</b>	<b>3,61</b>	15,81	11,00	<b>18,55</b>	<b>9,16</b>
<b>s CD4rel.:</b>	2,16	0,85	14,39	3,09	4,14	1,10
<b>M CD4abs.:</b>	<b>228,01</b>	<b>53,29</b>	599,27	252,02	<b>560,64</b>	<b>161,93</b>
<b>s CD4abs.:</b>	62,95	24,98	574,72	83,30	192,18	28,61
<b>n:</b>	6	19	2	9	7	33
<b>M CD4/CD95 rel.:</b>	3,40	0,98	1,00	2,16	2,29	2,11
<b>s CD4/CD95 rel.:</b>	1,61	0,29	0,71	0,58	0,55	0,36
<b>M CD4/CD95 abs.:</b>	50,18	17,46	35,77	46,01	53,12	35,24
<b>s CD4/CD95 abs.:</b>	23,76	9,70	30,69	11,86	11,76	7,17
<b>M CD4/CD95 Ant.:</b>	18,81	24,88	12,87	26,09	15,33	25,87
<b>S CD4/CD95 Ant.:</b>	6,30	4,24	7,21	5,49	3,45	3,60
<b>n:</b>	6	19	2	9	7	33
<b>M CD4/CD25low rel.:</b>	<b>5,57</b>	<b>2,09</b>	3,24	8,10	6,23	6,01
<b>s CD4/CD25low rel.:</b>	1,31	0,54	2,69	3,06	1,66	1,06
<b>M CD4/CD25low abs.:</b>	<b>85,30</b>	<b>36,95</b>	119,78	194,33	193,33	114,05
<b>s CD4/CD25low abs.:</b>	39,00	21,34	110,33	85,29	78,60	27,29

### 3 Ergebnisse

Einfluss von ATG	Take ohne ATG:	Take mit ATG:	CsA<100 ohne ATG:	CsA<100 mit ATG:	Zus. ohne ATG:	Zus. mit ATG:
M CD4/CD25low Ant.:	40,95	49,18	29,05	71,42	<b>34,70</b>	<b>64,94</b>
s CD4/CD25low Ant.:	11,84	5,04	9,45	7,98	4,96	3,64
n:	6	19	2	9	7	33
M CD4/CD25int. rel.:	<b>7,88</b>	<b>1,81</b>	11,52	2,57	<b>10,54</b>	<b>2,57</b>
s CD4/CD25int. rel.:	2,08	0,49	10,70	1,34	2,96	0,46
M CD4/CD25int. abs.:	<b>123,84</b>	<b>23,31</b>	439,01	48,57	<b>316,99</b>	<b>39,31</b>
s CD4/CD25int. abs.:	34,37	8,84	425,04	18,99	126,67	6,82
M CD4/CD25int. Ant.:	51,47	42,42	65,25	24,12	<b>55,59</b>	<b>28,19</b>
s CD4/CD25int. Ant.:	10,48	4,38	8,35	7,10	5,01	2,93
n:	6	19	2	9	7	33
M CD4/CD25high rel.:	<b>1,29</b>	<b>0,30</b>	1,07	0,44	<b>1,84</b>	<b>0,61</b>
s CD4/CD25high rel.:	0,52	0,077	1,00	0,16	0,36	0,14
M CD4/CD25high abs.:	<b>19,17</b>	<b>2,96</b>	40,95	9,23	<b>52,45</b>	<b>8,51</b>
s CD4/CD25high abs.:	7,42	0,64	39,70	2,95	15,47	1,30
M CD4/CD25high Ant.:	7,76	8,47	5,98	4,58	<b>10,05</b>	<b>6,90</b>
s CD4/CD25high Ant.:	2,08	1,56	0,90	1,04	1,49	1,18
n:	6	20	2	9	7	32
M CD4/FoxP3/CD25 rel.:	<b>0,37</b>	<b>0,10</b>	0,21	0,08	<b>0,38</b>	<b>0,11</b>
s CD4/FoxP3/CD25 rel.:	0,14	0,03	0,14	0,03	0,10	0,02
M CD4/FoxP3/CD25 abs.:	<b>7,59</b>	<b>2,24</b>	12,49	3,87	<b>14,95</b>	<b>3,58</b>
s CD4/FoxP3/CD25 abs.:	2,50	0,69	7,98	1,28	3,51	0,47
M CD4/FoxP3/CD25 Ant.:	6,02	6,79	5,30	7,81	8,98	5,51
s CD4/FoxP3/CD25 Ant.:	1,26	1,09	0,38	1,62	1,39	0,59
n:	6	20	2	9	7	33
M CD4/FoxP3 rel.:	<b>0,52</b>	<b>0,20</b>	0,15	0,16	0,41	0,17
s CD4/FoxP3 rel.:	0,18	0,06	0,07	0,03	0,12	0,02
M CD4/FoxP3 abs.:	9,94	4,40	8,79	7,77	<b>15,63</b>	<b>6,00</b>
s CD4/FoxP3 abs.:	3,26	1,32	3,77	1,73	3,82	0,77
M CD4/FoxP3 Ant.:	8,33	16,98	5,30	7,81	9,65	9,35
s CD4/FoxP3 Ant.:	1,81	3,83	0,38	1,62	1,71	0,89
n:	6	21	2	9	7	33
M CD4/CCR10 rel.:	<b>1,41</b>	<b>0,18</b>	1,06	0,35	1,18	0,64
s CD4/CCR10 rel.:	0,64	0,05	1,01	0,13	0,28	0,14
M CD4/CCR10 abs.:	<b>20,51</b>	<b>2,49</b>	40,42	8,08	<b>35,14</b>	<b>9,15</b>
s CD4/CCR10 abs.:	8,50	0,68	39,54	2,69	12,49	1,64
M CD4/CCR10 Ant.:	5,29	9,17	5,19	3,21	5,89	7,02
s CD4/CCR10 Ant.:	1,34	2,40	1,62	1,00	0,59	1,26
n:	6	25	2	9	7	33
M CD8 rel.:	8,88	10,00	<b>13,66</b>	<b>28,21</b>	26,08	32,91
s CD8 rel.:	3,24	3,20	1,44	3,91	4,77	2,97

<b>Einfluss von ATG</b>	<b>Take ohne ATG:</b>	<b>Take mit ATG:</b>	<b>CsA&lt;100 ohne ATG:</b>	<b>CsA&lt;100 mit ATG:</b>	<b>Zus. ohne ATG:</b>	<b>Zus. mit ATG:</b>
<b>M CD8 abs.</b>	196,74	153,20	368,14	582,24	693,21	582,82
<b>s CD8 abs.:</b>	123,89	65,12	106,87	101,75	232,11	85,31
<b>n:</b>	6	25	2	9	7	33
<b>M CD8/CD25 rel.:</b>	0,52	0,44	0,44	0,48	0,71	1,18
<b>s CD8/CD25 rel.:</b>	0,14	0,10	0,17	0,16	0,18	0,40
<b>M CD8/CD25 abs:</b>	8,19	4,20	14,20	8,31	16,72	13,14
<b>s CD8/CD25 abs.:</b>	2,40	0,98	9,47	2,59	5,15	2,28
<b>M CD8/CD25 Ant.:</b>	9,05	11,84	3,40	2,83	3,42	4,30
<b>s CD8/CD25 Ant.:</b>	3,12	2,23	1,59	1,09	1,01	1,19
<b>n:</b>	6	25	2	9	7	33
<b>M CD8/beta7/CD45RA rel.:</b>	1,92	1,96	2,32	6,33	21,92	14,87
<b>s CD8/beta7/CD45RA rel.:</b>	0,57	0,90	2,09	2,20	5,50	2,96
<b>M CD8/beta7/CD45RA abs:</b>	38,85	14,64	87,77	118,99	162,85	80,13
<b>s CD8/beta7/CD45RA abs:</b>	18,15	6,50	83,72	32,82	68,22	13,38
<b>M CD8/beta7/CD45RA Ant:</b>	23,48	18,41	18,83	25,04	21,92	14,87
<b>s CD8/beta7/CD45RA Ant:</b>	5,34	3,78	17,28	9,55	5,50	2,96
<b>n:</b>	5	23	2	8	7	31
<b>M CK18F:</b>	148,86	142,27	110,50	104,59	154,54	109,21
<b>s CK18F:</b>	8,15	28,54	110,50	42,42	32,05	18,72

**Tab. 35:** Werte der einzelnen Zellopopulationen mit und ohne ATG-Prophylaxe.

Das Antithymozytenglobulin schien primär den Anteil der T-Helferzellen an der Gesamtheit der PBMCs zu vermindern. Hieraus resultieren schließlich auch geringere absolute CD4-Werte sowie geringere CD4/FoxP3/CD25- und CD4/CCR10-Relativ- und Absolutwerte bei Take und unter Berücksichtigung aller Zahlen nach Reduktion von CsA. Bei Zusammenfassung aller Zahlen nach Sinken des CsA-Spiegels verschob sich zudem nach ATG-Gabe der Anteil der CD4/CD25int.- und CD4/CD25high-Subsets zugunsten der CD4/CD25low-Fraktion. Hieraus und aus den erniedrigten CD4-Anteilen nach Einnahme von ATG ergeben sich die geringeren relativen und absoluten CD4/CD25int.- und CD4/CD25high-Werte innerhalb der Gruppe mit ATG-Prophylaxe.

Die Zeitpunkte, zu denen ein deutlicher Effekt der ATG-Prophylaxe bestand und, die zugleich durch das Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion im Verlauf eine signifikante Beeinflussung erfuhren, wurden weiter untersucht. Ziel war es, herauszufinden, ob hier auch unter Berücksichtigung der ATG-Medikation noch statistisch relevante Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne GvHD-Entwicklung im weiteren Verlauf zu verzeichnen sind.

### 3 Ergebnisse

Wurden alle Werte nach Sinken des CsA-Spiegels zusammengefasst, blieb der signifikante Unterschied beim Vergleich der CD4-Absolutwerte von Patienten mit und ohne Entwicklung einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion innerhalb des Kollektivs von Transplantierten *mit* ATG-Prophylaxe bestehen (CD4absolut mit GvHD:138,35/ $\mu$ L, s:36,22, n:24, CD4absolut ohne GvHD: 224,83/ $\mu$ L, s:33,74, n:9) (p:0,02).

Bei gleichem Vorgehen für die absoluten Werte der CD4/CD25-Subsets bei Take war die Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne GvHD-Entwicklung weder innerhalb der Gruppe *mit* noch innerhalb der Gruppe *ohne* ATG-Gabe signifikant. Die Tendenz zu niedrigeren Werte bei Transplantierten, die im Verlauf eine GvHD entwickelten, blieb jedoch weiterhin sichtbar.

Die Werte mit und ohne MMF-Prophylaxe sind in Tabelle 36 dargestellt.

<b>Einfluss von MMF</b>	<b>Take ohne MMF:</b>	<b>Take mit MMF:</b>	<b>CsA&lt;100 ohne MMF:</b>	<b>CsA&lt;100 mit MMF:</b>	<b>Zus. ohne MMF:</b>	<b>Zus. mit MMF:</b>
<b>n:</b>	25	6	9	2	22	18
<b>M Leukos:</b>	3024,40	3515,00	5293,33	31595,00	4564,55	6188,89
<b>s Leukos:</b>	641,46	1193,41	357,59	28405,00	255,42	3172,54
<b>n:</b>	25	6	9	2	22	18
<b>M PBMNCs:</b>	1140,69	2144,33	2299,11	2240,50	<b>2221,24</b>	<b>1409,50</b>
<b>s PBMNCs:</b>	184,94	942,86	295,54	1647,50	272,64	203,83
<b>n:</b>	24	5	9	2	22	18
<b>M CD4 rel.:</b>	5,94	5,76	10,89	16,27	11,17	10,36
<b>s CD4 rel.:</b>	1,35	2,03	3,12	13,94	1,85	1,74
<b>M CD4 abs.</b>	72,24	171,98	253,21	593,90	270,92	183,78
<b>s CD4 abs.:</b>	24,01	105,01	82,88	580,08	66,57	62,90
<b>n:</b>	21	4	9	2	22	18
<b>M CD4/CD95 rel.:</b>	1,53	1,75	2,13	1,16	2,33	1,92
<b>s CD4/CD95 rel.:</b>	0,56	0,54	0,60	0,56	0,40	0,50
<b>M CD4/CD95 abs.:</b>	18,44	61,42	46,18	35,00	46,37	28,59
<b>s CD4/CD95 abs.:</b>	7,90	42,43	11,79	31,45	8,90	8,52
<b>M CD4/CD95 Ant.:</b>	22,84	26,50	25,46	15,68	26,53	20,96
<b>S CD4/CD95 Ant.:</b>	3,40	7,84	5,53	10,02	3,88	4,98



### 3 Ergebnisse

<b>Einfluss von MMF</b>	<b>Take ohne MMF:</b>	<b>Take mit MMF:</b>	<b>CsA&lt;100 ohne MMF:</b>	<b>CsA&lt;100 mit MMF:</b>	<b>Zus. ohne MMF:</b>	<b>Zus. mit MMF:</b>
<b>n:</b>	21	4	9	2	22	18
<b>M CD4/CD25low rel.:</b>	2,76	3,78	7,90	4,11	6,28	5,76
<b>s CD4/CD25low rel.:</b>	0,68	0,85	3,12	1,81	1,42	1,09
<b>M CD4/CD25low abs.:</b>	31,32	139,01	193,87	121,88	148,68	93,32
<b>s CD4/CD25low abs.:</b>	13,08	91,80	85,41	108,22	38,67	27,64
<b>M CD4/CD25low Ant.:</b>	44,79	59,88	64,72	59,20	56,70	63,24
<b>s CD4/CD25low Ant.:</b>	5,07	11,67	7,92	39,60	5,05	5,14
<b>n:</b>	21	4	9	2	22	18
<b>M CD4/CD25int. rel.:</b>	3,32	2,96	2,65	11,12	4,01	3,91
<b>s CD4/CD25int. rel.:</b>	0,91	1,52	1,32	11,10	1,03	1,24
<b>M CD4/CD25int. abs.:</b>	43,19	69,75	50,10	432,09	94,08	80,35
<b>s CD4/CD25int. abs.:</b>	14,71	35,44	18,55	431,96	33,05	46,51
<b>M CD4/CD25int. Ant.:</b>	46,54	34,35	30,34	37,27	35,19	30,28
<b>s CD4/CD25int. Ant.:</b>	4,51	9,91	7,28	36,33	4,09	4,60
<b>n:</b>	21	4	9	2	22	18
<b>M CD4/CD25high rel.:</b>	0,56	0,47	0,45	1,04	0,94	0,69
<b>s CD4/CD25high rel.:</b>	0,18	0,29	0,16	1,03	0,24	0,14
<b>M CD4/CD25high abs.:</b>	6,77	7,27	9,36	40,35	20,35	11,12
<b>s CD4/CD25high abs.:</b>	2,64	2,20	2,90	40,31	6,02	4,21
<b>M CD4/CD25high Ant.:</b>	8,74	6,00	5,12	3,57	8,25	6,48
<b>s CD4/CD25high Ant.:</b>	1,44	2,27	0,89	3,30	1,66	1,01
<b>n:</b>	21	5	9	2	22	17
<b>M CD4/FoxP3/CD25 rel.:</b>	0,17	0,15	0,09	0,15	0,16	0,16
<b>S CD4/FoxP3/CD25 rel.:</b>	0,05	0,06	0,03	0,17	0,05	0,03
<b>M CD4/FoxP3/CD25 abs.:</b>	3,05	5,25	4,36	10,26	6,10	4,76
<b>s CD4/FoxP3/CD25 abs.:</b>	0,97	2,05	1,19	10,21	1,39	1,30
<b>M CD4/FoxP3/CD25 Ant.:</b>	6,64	6,49	3,87	4,73	6,09	6,19
<b>s CD4/FoxP3/CD25 Ant.:</b>	0,99	2,16	0,84	4,54	0,85	0,78
<b>n:</b>	21	5	9	2	22	18
<b>M CD4/FoxP3 rel.:</b>	0,28	0,26	0,16	0,15	0,22	0,21
<b>s CD4/FoxP3 rel.:</b>	0,08	0,11	0,03	0,06	0,05	0,03
<b>M CD4/FoxP3 abs.:</b>	4,73	9,70	8,00	7,73	9,03	6,05
<b>s CD4/FoxP3 abs.:</b>	1,27	4,12	1,67	4,84	1,75	0,95
<b>M CD4/FoxP3 Ant.:</b>	15,49	12,87	7,24	7,84	9,76	8,96
<b>s CD4/FoxP3 Ant.:</b>	3,68	3,89	1,62	2,16	1,15	1,07
<b>n:</b>	23	4	9	2	22	18
<b>M CD4/CCR10 rel.:</b>	0,48	0,28	0,36	1,03	0,76	0,71
<b>s CD4/CCR10 rel.:</b>	0,20	0,11	0,13	1,03	0,19	0,16
<b>M CD4/CCR10 abs.:</b>	6,69	5,38	8,17	39,99	15,28	11,76
<b>s CD4/CCR10 abs.:</b>	2,76	1,46	2,66	39,96	3,97	4,39
<b>M CD4/CCR10 Ant.:</b>	9,08	3,89	3,59	3,52	7,08	6,52
<b>s CD4/CCR10 Ant.:</b>	2,19	1,40	0,88	3,30	1,60	1,28

<b>Einfluss von MMF</b>	<b>Take ohne MMF:</b>	<b>Take mit MMF:</b>	<b>CsA&lt;100 ohne MMF:</b>	<b>CsA&lt;100 mit MMF:</b>	<b>Zus. ohne MMF:</b>	<b>Zus. mit MMF:</b>
<b>n:</b>	25	6	9	2	22	18
<b>M CD8 rel.:</b>	7,07	21,08	25,79	24,56	30,30	33,43
<b>s CD8 rel.:</b>	2,02	10,12	3,99	12,34	2,98	4,55
<b>M CD8 abs.:</b>	83,33	487,88	586,95	346,98	690,38	494,30
<b>s CD8 abs.:</b>	33,32	227,76	99,74	128,04	118,45	101,55
<b>n:</b>	25	6	9	2	22	18
<b>M CD8/CD25rel.:</b>	0,51	0,24	0,50	0,39	1,20	0,96
<b>s CD8/CD25rel.:</b>	0,10	0,07	0,16	0,23	0,57	0,26
<b>M CD8/CD25abs.:</b>	5,23	3,90	8,73	12,31	15,26	11,27
<b>S CD8/CD25abs.:</b>	1,13	1,29	2,48	11,35	3,00	2,32
<b>M CD8/CD25 Ant.:</b>	11,93	8,66	2,98	2,71	4,36	3,89
<b>s CD8/CD25 Ant.:</b>	2,13	4,20	1,06	2,27	1,55	1,17
<b>n:</b>	25	6	9	2	22	18
<b>M CD8/beta7/CD45RA rel.:</b>	2,17	1,05	6,35	2,24	5,05	39,87
<b>s CD8/beta7/CD45RA rel.:</b>	0,90	0,38	2,19	2,17	1,11	35,72
<b>M CD8/beta7/CD45RA abs.:</b>	15,15	36,73	119,39	85,94	118,72	65,12
<b>s CD8/beta7/CD45RA abs.:</b>	5,23	25,42	32,64	85,56	27,69	11,62
<b>M CD8/beta7/CD45RA Ant.:</b>	19,66	18,28	25,19	18,14	17,56	14,33
<b>s CD8/beta7/CD45RA Ant.:</b>	3,35	9,62	9,50	17,96	4,40	2,38
<b>n:</b>	22	6	8	2	21	17
<b>M CK18F:</b>	130,63	190,41	101,75	121,89	124,39	109,12
<b>s CK18F:</b>	25,29	58,11	43,29	99,12	21,65	25,85

**Tab. 36:** Werte der einzelnen Zellopopulationen mit und ohne MMF-Prophylaxe.

MMF senkte bei Zusammenfassung aller Werte nach Abfall des CsA-Spiegels die Gesamtheit der PBMNCs signifikant.

Da die Anzahl der PBMNCs in alle Absolutwerte eingeht, wurden alle absoluten Zahlen, die nach Sinken des CsA-Spiegels durch das Auftreten einer GvHD im weiteren Verlauf eine signifikante Beeinflussung erfuhren, weiter untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion auch unter Berücksichtigung der Gabe von MMF noch einen statistisch relevanten Einflussfaktor darstellt.

Innerhalb des Kollektivs *mit* MMF-Prophylaxe blieben die Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Entwicklung einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion bezüglich der PBMNCs, der CD4-, der CD4/CD25low- und der CD8-Absolutwerte signifikant.

Innerhalb der Patienten *ohne* MMF-Gabe hatte das Auftreten einer GvHD weiterhin signifikanten Einfluss auf die PBMNC-, sowie auf die CD8/CD25-Absolutwerte (siehe Tabelle 37 und 38).

### 3 Ergebnisse

Unterschiede innerhalb der CD8/beta7/CD45RA-Absolutwerte entbehrten nach Berücksichtigung der MMF-Prophylaxe der Signifikanz, wenngleich eine Tendenz hin zu niedrigeren Werten bei Patienten mit späterer GvHD-Entwicklung weiterhin zu verzeichnen war.

mit MMF nach Abfall von CsA	mit GvHD- Entwicklung: n: 10	ohne GvHD- Entwicklung: n: 5	ohne MMF nach Abfall von CsA	mit GvHD- Entw.: n: 20	ohne GvHD- Entw.: n: 5
M PBMNCs/μL:	1221,20	1859,80	M PBMNC/μL:	1828,77	3230,40
s PBMNCs/μL:	316,90	222,61	s PBMNC/μL:	248,52	574,05
M CD4abs./μL:	179,23	221,02	CD8/CD25abs./μL:	12,44	26,54
s CD4abs./μL:	111,88	52,24	s CD8/CD25abs./μL:	3,12	6,70
M CD4/CD25abs./μL:	56,05	167,87			
S CD4/CD25abs./μL:	20,91	61,27			
M CD8abs./μL:	263,94	1027,85			
s CD8abs. /μL:	54,40	194,65			

**Tab. 37:** absolute Zahlen innerhalb der Gruppe mit MMF in Abhängigkeit von der Entwicklung einer GvHD (signifikante Unterschiede).

**Tab. 38:** absolute Zahlen innerhalb der Gruppe ohne MMF in Abhängigkeit von der Entwicklung einer GvHD (signifikante Unterschiede).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Entwicklung der Leukozyten und der mononukleären Zellen**

Wenngleich nicht zu allen Zeitpunkten eine deutliche Signifikanz nachzuweisen war, so bestand dennoch stets ein Trend zu höheren Leukozytenzahlen innerhalb der Kontrollgruppe verglichen mit dem Kollektiv aller Patienten. Grund hierfür ist vermutlich die veränderte Regenerationsdauer der weißen Blutkörperchen nach Transplantation. Diese ist verlängert, da eine geringere Menge an Stammzellen infundiert wird als sie bei hämatologisch Gesunden vorliegt. Zudem wird die Proliferation im Knochenmark durch die myelotoxische Wirkung der im Rahmen der Stammzelltransplantation verabreichten Medikamente gehemmt.

Nach Reduktion der Prednisondosis unter 20 mg am Tag waren sowohl im Falle einer frühen als auch im Falle einer späten GvHD die Leukozytenzahlen gegenüber Transplantierten ohne Manifestation erhöht. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine Folge der Prednisontherapie. Typischerweise kommt es hier nach einiger Zeit zu einer Vermehrung der Granulozyten, die den größten Teil der weißen Blutkörperchen bilden [133].

Aufgrund der langsamen Lymphozytenrekonstitution nach Transplantation und CsA-Prophylaxe wird verständlich, dass Normalpersonen im Vergleich zu Patienten auch höhere PBMNC-Werte besaßen. Bekanntermaßen zeigen die B-Zellen erst nach ein bis zwei Jahren wieder Level, die mit Gesunden vergleichbar sind. T-Zellen entstehen nach Transplantation und Suppression der Thymusfunktion durch IL7-induzierte Proliferation peripherer CD4- und CD8-positiver naiver T-Lymphozyten. IL-15 stimuliert die Vermehrung CD8-positiver Memoryzellen. Folge dieser ektopen Lymphozytenregeneration ist eine Restriktion der T-Zell-Rezeptorvielfalt und eine inverse CD4:CD8-Ratio. Die CD4-Rekonstitution dauert mindestens zwei Jahre [131].

Die Unterschiede hinsichtlich der PBMNCs bei der Einteilung der Patienten nach Transplantation in solche, die im weiteren Verlauf eine GvHD bekamen, und solche ohne *graft-versus-host disease* erreichten bei Zusammenfassung aller Zeitpunkte nach Sinken des CsA-Spiegels Signifikanz. Die Werte waren bei späterer Erkrankung an einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion erniedrigt. Hierfür gibt es folgende mögliche Erklärung: Eine sich entwickelnde GvHD führt durch zusätzliche Schädigung des Thymus und sekundärer lymphatischer Organe zu einer Lymphopenie mit erniedrigten PBMNC-Werten. Dieser

Ansatz wird in einem Experiment nahegelegt, in dem T-Zellen aus Mäusen mit einer akuten GvHD in Tiere ohne Spender-gegen-Wirts-Reaktion infundiert wurden. Die T-Zellen zeigten hier eine deutlich höhere Proliferationsrate sowie eine gesteigerte T-Zell-Rezeptorvielfalt. Dies deutet darauf hin, dass eine GvHD-induzierte Lymphopenie weniger auf intrinsischen Effekten der T-Lymphozyten als vielmehr auf einem veränderten Milieu des Wirtes basiert [132]. Möglich ist auch eine vermehrte Aufnahme von Lymphozyten ins Gewebe im Falle einer GvHD-Entwicklung.

Die PBMNC-Werte der Patienten, die bei Blutentnahme bereits eine GvHD aufwiesen, besaßen vier Tage nach Beginn der Steroidtherapie im Falle einer frühen Manifestation signifikant erniedrigte Werte gegenüber Transplantierten ohne Befall, was durch die Prednison-induzierte Hemmung der Lymphozytenproliferation erklärt werden kann.

#### **4.2. CD4-positive T-Lymphozyten**

Die CD4-positiven T-Lymphozyten lassen sich in die Population der naiven T-Lymphozyten, der aktivierten T-Helferzellen und der Memory-Zellen einteilen. Erstere hatten noch keinen Antigenkontakt und sind durch den Oberflächenmarker CD45RA gekennzeichnet. Studien ergaben allerdings, dass auch Gedächtniszellen zu CD45RA-positiven Zellen rückkonvertieren können, weshalb die Bestimmung der naiven T-Lymphozyten durch andere Moleküle wie dem CD31 genauer erscheint [134]. Aktivierte T-Helferzellen exprimieren typischerweise CD25, HLA-DR und CD95 und stimulieren als Effektorzellen Makrophagen, T-Killer-Zellen sowie B-Lymphozyten. CD45RO stellt das spezifische Oberflächenantigen der Gedächtniszellen dar. Diese befinden sich im Ruhezustand und können nach erneutem Antigenkontakt wieder zu aktivierten T-Helferzellen werden [135]. Nach Stammzelltransplantation liegen überwiegend CD45RO-positive Memory-T-Zellen und reife T-Lymphozyten vor. Nach etwa zwei Jahren erreichen die naiven CD45RA<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> T-Helferzellen wieder ihre Normalwerte [136].

Zu allen Zeitpunkten deutlich höhere relative und absolute Zahlen der Normalpersonen gegenüber der Gesamtheit der Patienten sind Folge der verzögerten Immunrekonstitution nach Transplantation. Monozyten und NK-Zellen erholen sich rascher als die Population der Lymphozyten, was zu den niedrigeren T-Helferzell-Anteilen innerhalb des Patientenkollektivs führt [25]. Unterschiede zwischen Kontrollen und GvHD-Patienten unterliegen ebenfalls dieser Erklärung.

Die relativen CD4-Werte unterschieden sich innerhalb der Transplantierten mit einer GvHD im späteren Verlauf gegenüber Patienten ohne Manifestation nicht wesentlich. Die

Absolutwerte zeigten signifikante Unterschiede mit verminderten CD4-positiven T-Zellen innerhalb der GvHD-Patienten bei Zusammenfassung aller Abnahmezeitpunkte nach Sinken des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL. Diese Beobachtung spiegelt allerdings lediglich die in dieser Gruppe ebenfalls erniedrigten PBMNC-Werte wieder.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit GvHD-Befall und solchen, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Manifestation vorlag, waren nicht erkennbar. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen, bei denen ebenfalls kein Einfluss einer GvHD auf die Zahl der T-Helferzellen nachgewiesen werden konnte [25].

#### 4.2.1. Aktivierte CD4-positive Lymphozyten und regulatorische T-Zellen

CD95, auch Fas-Rezeptor genannt, ist ein Marker, der bei Aktivierung hochreguliert wird und vor allem auf Effektor- und Gedächtniszellen vorkommt. Während die Interaktion mit dem CD95-Liganden bei aktivierten Zellen zum *AICD* (*activation induced cell death*) führt, sind die Memory-Zellen weitgehend apoptoseresistent. Naive CD4-positive Lymphozyten werden nach Binden des Fas-Liganden in ihrer immunologischen Funktion gehemmt [137].

Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der CD95-positiven T-Helferzellen zwischen dem Kollektiv aller Transplantierten und den Kontrollen decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien. In einer Veröffentlichung wurde ein Anteil von 90% bei Patienten gegenüber 40% in der Gruppe der Normalpersonen beschrieben [136]. Brugnioni et al. fanden erhöhte CD95-positive Anteile nach Transplantation in Fällen kombinierter Immundefekte [138]. In einer Dissertation lagen die Werte der Kontrollen mit etwa 38% ebenfalls weit unter denen der frisch Transplantierten (97%) [25]. Wie bereits erwähnt, bestehen die peripheren T-Lymphozyten nach Stammzellgabe hauptsächlich aus reifen Zellen, die eine höhere CD95-Expression aufweisen als naive Zellen. Auch die Unterschiede hinsichtlich des CD95-Anteils zwischen GvHD-Patienten und der Kontrollgruppe lassen sich hierdurch erklären.

Zu den Zeitpunkten post transplantationem ergaben sich unter Zusammenfassung der Zahlen nach Sinken des CsA-Spiegels signifikant höhere CD4/CD95-Anteile an den T-Helferzellen, wenn sich im späteren Verlauf eine GvHD entwickelte im Vergleich zu Patienten, bei denen einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion ausblieb. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den in einer vorangehenden Dissertation beschriebenen geringeren CD95-positiven Anteilen an T-Helfer-Zellen bei Personen, die in der Zeit nach Stammzellgabe an einer *graft-versus-host disease* erkrankten [25]. Wie bereits erwähnt, ist

CD95 hauptsächlich auf CD45RO<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> -Memory-Zellen bzw. aktivierten T-Lymphozyten zu finden. Reife T-Zellen bilden nach Konditionierung und anschließender Stammzellgabe bei Erwachsenen zunächst den einzigen Pool für eine Regeneration der T-Lymphozyten [136]. Eine erhöhte Apoptoserate mit konsekutiver Lymphopenie und verminderter T-Zell-Rezeptorvielfalt könnte das Auftreten einer GvHD begünstigen, da sich klonale, gegen Empfänger-Antigene gerichtete Zellen verstärkt vermehren. Zudem kommt es umgekehrt durch Entwicklung einer *graft-versus-host disease* zu einer vermehrten Aktivierung der T-Helferzellen und somit zu einer Hochregulation von CD95. Dies stützt die in unserer Studie gefundene positive Korrelation erhöhter CD95-Anteile mit der Entwicklung einer akuten GvHD. Eine Erklärung für eine herunterregulierte CD95-Expression nach Engraftment ist die Möglichkeit, dass durch eine verminderte Apoptose aktivierter klonaler CD4-Lymphozyten, die gegen Empfängerantigene gerichtet sind, das Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion begünstigt wird [25]. Da beide Ergebnisse logisch begründet werden können, sind weitere Analysen notwendig, um definitive Aussagen treffen zu können.

Einen Unterschied zwischen Patienten mit Symptomen einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion und Empfängern ohne Manifestation konnten wir nicht feststellen.

Es liegt die Vermutung nahe, dass die Population CD95-positiver T-Helferzellen innerhalb der Patienten, die bei Blutabnahme bereits an einer *graft-versus-host disease* erkrankt sind, niedriger liegen, da bereits bekannt ist, dass T-Killerzellen aus der Milz und dem Darm von GvHD-Mäusen vermehrt CD95-Liganden ins Gewebe entlassen und somit zur Entstehung der mit der Reaktion einhergehenden Organschäden beitragen [139]. Die Anzahl der CD4/CD95-T-Helferzellen müsste hierdurch reduziert werden. Auch wurde durch Verabreichung von zytotoxischen Spenderzellen mit defektem Fas-Liganden die Anzahl der GvHD-assoziierten Todesfälle in Mäusen reduziert, ohne dabei den erwünschten *graft-versus-leukemia effect* zu gefährden [140][141][142].

CD25 stellt einen weiteren Aktivierungsmarker dar. Der CD4/CD25<sup>high</sup>-subset setzt sich hauptsächlich aus regulatorischen T-Zellen zusammen, während CD4-positive Lymphozyten mit mittlerer CD25-Expressionsdichte die aktivierten Effektorzellen beinhalten. Die Gruppe der Memory-T-Zellen sowie der naiven T-Helferzellen sind aufgrund ihres geringen Aktivierungsstatus überwiegend innerhalb des CD4/CD25<sup>low</sup>-Subsets zu finden.



Unabhängig von einer GvHD-Manifestation verfügten Normalpersonen gegenüber Patienten über höhere CD4/CD25int.-Anteile mit signifikanten Unterschieden bei Absetzen der Prophylaxe und unter Einbeziehen aller Ergebnisse nach Sinken des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL. Das Subset der CD4/CD25high-Zellen zeigte ein umgekehrtes Verhalten. Die Werte Gesunder lagen zwölf Wochen nach Absetzen der Prophylaxe deutlich unterhalb entsprechender Anteile der Patientengruppe. In einer vorangehenden Dissertation wurden bei Transplantierten ebenfalls erhöhte Subsets der CD4/CD25high-T-Helferzellen an der CD4-Population gefunden [25]. Nach Stammzellgabe überwiegen zunächst aktivierte T-Helferzellen (CD25int.) gegenüber den naiven CD4-Lymphozyten (CD25low). Aktivierte Zellen führen wiederum über Ausschüttung bestimmter Interleukine wie dem IL2 zu einer gesteigerten Proliferation der Tregs [34]. Die Folge ist eine Abnahme der CD25int.-Fraktion zugunsten des CD25high-Subsets im späteren Verlauf nach Stammzellgabe. T-regulatorische Zellen besitzen zudem gegenüber aktivierten T-Helferzellen eine geringere Sensitivität gegenüber dem Fas-induzierten Zelltod. Bei einem Verhältnis der Effektorzellen zu den regulatorischen T-Zellen von 10:1 gehen die Tregs vermehrt in Apoptose, während eine Ratio von 1:1 eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Zelltod zur Folge hat. Möglicherweise wird dadurch erreicht, dass eine Immunantwort nicht durch eine übermäßige Treg-Kontrolle verhindert wird [143]. Das aufgrund der gesteigerten Proliferation der Tregs verminderte Verhältnis von Effektorzellen zu T-regulatorischen Zellen nach Transplantation innerhalb des Patientenkollektivs könnte somit zu einer reduzierten Apoptose-Empfindlichkeit der CD4/CD25high-Zellen führen und die Verschiebung des CD25int.-Anteils hin zu einer höheren CD25high-Fraktion noch verstärken. Insgesamt weist ein höherer Prozentsatz an CD4/CD25high-positiven Zellen post transplantationem auf eine stärkere Rolle dieses peripheren Toleranzmechanismus nach Stammzellgabe hin. Hintergrund der Erklärung ist die Annahme, dass es sich bei der Gruppe der CD4/CD25high-Zellen überwiegend um Tregs handelt. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie sowohl bei Erreichen einer Leukozytenzahl von 1000/ $\mu$ L als auch zwölf Wochen nach Beendigung der CsA-Gabe die FoxP3-Anteile innerhalb der CD4-positiven Lymphozyten höher als entsprechende Kontrollwerte lagen. Bei letzterem Zeitpunkt konnte für die aktivierten CD4/CD25high/FoxP3-Zellen die gleiche Beobachtung gemacht werden. Die Unterschiede erfüllten hierbei stets die Signifikanzkriterien.

Bei Vorliegen einer GvHD waren die Prozentsätze CD4/CD25 int.- und CD4/CD25high-positiver T-Helferzellen am vierten Tag nach Therapiebeginn bei Patienten mit früher



Manifestation und bei Zusammenfassung der frühen und späten Form größer als entsprechende Anteile der Kontrollgruppe. Die Populationen mit geringer CD25-Expression waren zu den gleichen Zeitpunkten dagegen deutlich niedriger. Hierzu tragen möglicherweise zwei unterschiedliche Phänomene bei: Erstens kommt es bei Patienten mit einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion zu einer vermehrten Aktivierung der T-Helferzellen mit Ansteigen der CD25int.-Fraktion und erhöhten Proliferation der Tregs (CD25high-Fraktion). Zweitens werden T-regulatorische Zellen vermutlich durch die Prednisontherapie zur Vermehrung angeregt (siehe unten).

Die Prozentsätze der einzelnen CD25-Populationen an den CD4-positiven Lymphozyten waren weitgehend unabhängig vom Auftreten einer GvHD im weiteren Verlauf. Dies deutet daraufhin, dass die Entwicklung einer *graft-versus-host disease* nicht auf eine Verschiebung des Verhältnisses von Effektorzellen zu regulatorischen T-Zellen zurückzuführen ist. Die Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Dissertation, in welcher ebenfalls kein direkter Einfluss auf den CD25-Anteil durch das Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion erkennbar war [25]. In anderen Untersuchungen zur HLA-identischen Stammzelltransplantation dagegen konnte eine erhöhte Inzidenz einer GvHD in Abhängigkeit von der Menge der infundierten CD25-positiven T-Zellen nachgewiesen werden [144]. Zudem identifizierte eine weitere Arbeitsgruppe einen einzelnen autoreaktiven CD25-positiven T-Zellklon, der für die letale graft-versus-host-Reaktion verantwortlich gemacht wurde [145]. Der Grund für einen fehlenden Zusammenhang in unseren Analysen liegt möglicherweise in der Schwierigkeit der Abgrenzung der Treg-Zellen gegenüber den aktivierten T-Helferzellen. Eine Korrelation zwischen der Anzahl der FoxP3-positiven Tregs und dem Risiko einer späteren *graft-versus-host disease* konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht gefunden werden.

War bei Blutabnahme bereits eine GvHD vorhanden, so zeigte sich im Vergleich zu Patienten ohne Manifestation vier Tage nach Beginn einer Steroidtherapie im Falle eines frühen Auftretens und bei Zusammenfassung der frühen und späten Form ein deutlich höherer Anteil der CD4/CD25int.- und CD4/CD25high-Lymphozyten. Die größeren CD25int.-Subsets spiegeln den höheren Anteil an aktivierten Effektorzellen bei einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion wieder. Zudem werden bei erhöhtem Aktivierungsstatus der T-Helferzellen die Treg-Zellen zur Proliferation angeregt. Auch eine Vermehrung der regulatorischen T-Zellen durch die Prednisongabe ist denkbar. In einer Studie, die die Reaktion der regulatorischen T-Zellen auf Gabe von intravenösem Methylprednisolon

untersuchte, wurden bereits 48 Stunden nach Injektion vermehrte CD25<sup>high</sup>- und FoxP3-Expressionen sowie erhöhte IL-10-Spiegel beobachtet [146]. Eine andere Arbeitsgruppe erhielt ähnliche Ergebnisse, jedoch waren hier die Anteile der regulatorischen T-Zellen bereits vor Verabreichung der Steroide erhöht und stiegen nach Beginn der Therapie weiter an [147]. Unsere Analysen der FoxP3-positiven Lymphozyten vier Tage nach Beginn der Immunsuppression konnte diese Vermutung allerdings nicht bestätigen. Eine mögliche Erklärung liegt jedoch ebenfalls in der schlechten Abgrenzbarkeit der T-regulatorischen Zellen. Früher wurde die Population der CD4/CD25<sup>high</sup>-Lymphozyten mit den regulatorischen Zellen gleichgesetzt. Nähere Analysen ergaben, dass durchaus auch CD25<sup>low/int.</sup>-Lymphozyten Treg-Funktion übernehmen können. Hierbei kommt es zu einer FoxP3-gesteuerten Transformation von CD4/CD25<sup>low</sup>-Lymphozyten zu regulatorischen Zellen [74]. Diese Population ist apoptoseresistent, weshalb sie auch als Gruppe der rTregs bezeichnet wird [57]. Hingegen scheinen manche menschliche CD4-Zellen nach Aktivierung FoxP3 hochzuregulieren. Bislang ist nicht geklärt, ob diese Zellen die gleichen Suppressoreigenschaften *in vivo* besitzen [68] [69] [70] [71] [148] [149]. Die Bestimmung der CD4/FoxP3-positiven Zellen liefert somit möglicherweise zu hohe Treg-Werte, da geringe Anteile aktivierten T-Helferzellen zuzuschreiben sind. Die Bestimmung der regulatorischen T-Zellen durch Analysen der CD4/FoxP3/CD25<sup>high</sup>-Population hingegen könnte aufgrund der zirkulierenden CD25-negativen FoxP3-positiven Lymphozyten unterhalb des tatsächlichen Wertes liegen. Zudem bezogen sich die erwähnten Veröffentlichungen, in denen nach Methylprednisolongabe erhöhte Treg-Anteile gefunden wurden, auf Beobachtungen an Patienten mit Multipler Sklerose. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die gleiche Zellpopulation in Fällen einer akuten GvHD nach Steroidtherapie gänzlich anders verhält.

Bereits Sanchez et al. beschrieben eine höhere Ratio an Effektor-/Treg-Zellen bei Patienten mit chronischer GvHD gegenüber Patienten ohne Erkrankung [150]. Eine weitere Studie fand durch quantitative PCR-Analysen einiger Treg-Marker eine negative Korrelation zwischen der FoxP3-Expression und dem Auftreten einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion [151]. Vor allem unter Einbeziehung aller CD4-positiven Lymphozyten konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von CD4/FoxP3-positiven Lymphozyten zu Effektorzellen und dem Vorliegen einer chronischen GvHD bestätigt werden [73]. Ein spätes Auftreten erster klinischer Symptome korreliert nicht zwangsläufig mit dem Pathomechanismus einer chronischen GvHD. Jedoch wurden vier der insgesamt

zwölf Patienten, die nach Absetzen der CsA-Prophylaxe erkrankten, als chronisch klassifiziert. Auch wenn aufgrund der niedrigen Fallzahlen zu keinem Zeitpunkt hinreichende Signifikanz erzielt wurde, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse mit den niedrigeren Treg-Anteilen vor Beginn der Steroidtherapie das in vorherigen Studien beschriebene Verhalten der T-regulatorischen Zellen im Falle einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion.

In einer aktuellen Publikation von Magenau et al. wurden erstmals auch erniedrigte CD4/FoxP3-positive Zellen bei Patienten mit *akuter* GvHD beschrieben [75]. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sind jedoch weitere Studien nötig.

Mukosabiopsien von Transplantierten ohne intestinale Manifestationen zeigten eine erhöhte FoxP3- zu CD8-Ratio, während im Gewebe von Patienten, die an einer Darm-GvHD litten, keine erhöhten Treg-Zahlen gefunden wurden. Dies deutet daraufhin, dass eine Hochregulation von FoxP3-Zellen in der Schleimhaut vor einer akuten und chronischen Spender-gegen-Wirts Reaktion des Verdauungstraktes schützt [76][152]. Möglicherweise sind bestimmte Polymorphismen des NOD2/CARD15-Rezeptors für eine geringere Aufnahme von CD4-positiven Lymphozyten in die Mukosa verantwortlich [152]. Bei Hautbiopsien wurden ähnliche Beobachtungen gemacht [153]. Auch scheinen organspezifische Homingrezeptoren wie CLA oder  $\alpha_4\beta_7$  auf den regulatorischen Zellen eine Rolle zu spielen [154].

.

### 4.2.2. CD4/CCR10-positive T-Lymphozyten

Bei den CD4/CCR10-positiven T-Lymphozyten handelt es sich um reife T-Helferzellen, die nach Interaktion mit CTACK vermehrt in die Epidermis aufgenommen werden. Anlass zur Untersuchung dieser Zellpopulation war eine Arbeit von Faaij et al., in der bei Patienten mit Haut-GvHD erhöhte Anteile CD4/CCR10- positiver T-Zellen im peripheren Blut gefunden wurden [98].

Vier Wochen nach Ende der CsA-Gabe verfügten Normalpersonen über signifikant geringere CCR10-Anteile im Vergleich zum Patientenkollektiv. Dieses Ergebnis spiegelt möglicherweise eine nach Transplantation einsetzende allgemeine Aktivierung und Rekrutierung von T-Helferzellen in der Haut wieder, unabhängig davon, ob dieser Prozess zu einer manifesten GvHD führt oder nicht.

Lag bei Blutentnahme bereits eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion vor, so fanden sich bei diesen Proben vor und kurz nach Beginn der Steroidtherapie niedrigere Anteile von T-Helferzellen mit CCR10-Expression in Bezug auf die Transplantierten ohne Symptome.

Bei Zusammenfassung der frühen und späten Form wurde Signifikanz erreicht. Nach Reduktion der Immunsuppression kehrte sich dieses Verhältnis jedoch um. Die Prozentsätze CD4/CCR10-positiver Zellen lagen dann bei GvHD-Patienten höher.

Der Vergleich entsprechender Werte von Patienten, die speziell an einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion der Haut litten, und solchen ohne GvHD, brachte noch signifikantere Unterschiede. Als Marker zur Unterscheidung zwischen einem kutanen und intestinalen/hepatischen Befall kann CCR10 gemäß unserer Analysen allerdings nicht verwendet werden.

Bislang liegt nur eine Publikation vor, die sich mit dem Verhalten der Anteile CD4/CCR10-positiver Zellen an den T-Helferzellen beschäftigt. Hier zeigte sich bei Kindern mit Haut-GvHD eine deutliche Erhöhung dieser Zellpopulation im Vergleich zu Transplantierten der gleichen Altersgruppe, bei denen keine Symptome auftraten. Die Mediane lagen bei 21,7% innerhalb der Gruppe mit Hautbefall bzw. bei 7,0%, wenn keine *graft-versus-host disease* vorlag. Die Dauer erhöhter peripherer Anteile dieser Zellpopulation schien mit dem Ansprechen der Patienten auf die Steroidtherapie zu korrelieren [98]. Betrachtet man die der Publikation beigefügten Graphen zweier Patienten, in denen jeweils die Wochen nach Transplantation und Anteile CCR10-positiver Zellen an den CD4-Lymphozyten aufgetragen sind, wird deutlich, dass die Werte auch dort erst kurze Zeit nach erstmaliger GvHD-Manifestation deutlich anstiegen. Direkt beim Auftreten erster Symptome schienen sie vielmehr leicht zu sinken. Dies deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine mögliche Erklärung für die zunächst erniedrigten Anteile dieser Zellpopulation ist die Hypothese, dass CCR10-positive Lymphozyten anfangs schneller ins Zielorgan gelangen als sie durch Proliferation gebildet werden. Zudem ist denkbar, dass die Vermehrung der CD4/CCR10-Zellen durch die Reduktion der Steroide zu späteren Zeitpunkten einen zusätzlichen Stimulus erfährt. Der von Faaij et al. ermittelte Median der Patienten mit Haut-GvHD liegt mit 21,7% oberhalb unserer Zahlen und der Median der gesunden Kontrollen mit 2,8% deutlich unterhalb der Werte unseres Kontrollkollektivs. Zu bedenken ist hierbei, dass sich das Patientenkollektiv der erwähnten Publikation ausschließlich aus Kindern zusammensetzte, die zwischen einem und 17 Jahre alt waren, während unsere Arbeit nur Erwachsene einschloss. Es ist nicht auszuschließen, dass jüngere Patienten aufgrund der erhaltenen Thymusfunktion rascher naive Zellen nachbilden, die schneller proliferieren. Zudem ist in der erwähnten Publikation der Median der Peakwerte angegeben. In unserer Analyse erfolgten die Blutentnahmen zu festen Zeitpunkten.

### **4.3. CD8-positive T-Lymphozyten und aktivierte T-Killerzellen**

Ähnlich wie die CD4-positiven Lymphozyten können auch die T-Killerzellen in verschiedene Subgruppen unterteilt werden. Die naiven CD8-positiven Lymphozyten exprimieren CD45RA und CD27. Nach Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen durch APCs werden sie zu zytolytisch-effektorischen T-Zellen. Sie weisen neben CD25, CD95 und HLA-DR auch CD56 und CD94 auf ihrer Oberfläche auf. Zudem enthalten sie Granula mit großen Mengen an Perforin und Granzym B. Im Gegensatz zu den CD4-positiven Lymphozyten konnte innerhalb der T-Killerzellen keine Differenzierung einzelner CD25-Expressionslevel vorgenommen werden, da die Grenzen stets fließend verliefen. Folglich enthielt die Population der CD8/CD25-positiven Zellen auch Tregs, die jedoch nur einen sehr geringen Prozentsatz ausmachen und je nach Alter 1 – 10% aller CD8-Lymphozyten darstellen [155]. Ein Teil der aktivierten Zellpopulation geht in den Ruhezustand über und wird als Gedächtniszellen bezeichnet [156].

In den ersten Tagen regenerieren sich zunächst die NK-Zellen (, die nur in etwa 30% CD8 exprimieren), weshalb bei Take die zytotoxischen T-Zellen noch niedrigere Anteile an den PBMNCs zeigen als die Normalpersonen. Jedoch weisen CD8-positive Lymphozyten eine schnellere Regeneration auf als die Population der T-Helferzellen. Folglich steigt ihr Anteil an den PBMNCs nach Absetzen der CsA-Prophylaxe rasch an. Diese umgekehrte CD4/CD8-Ratio kann bis zu zwei Jahre nach Transplantation nachweisbar sein [25].

Es wurde ein gehäuftes Auftreten einer GvHD bei geringerem Anteil zytotoxischer Zellen sowie verminderten T-Killerabsolutzahlen kurz nach Transplantation und bei Berechnungen, in denen alle Werte nach Abfall des Cyclosporin-A-Spiegels berücksichtigt wurden, beobachtet. Möglicherweise sind auch hier, ähnlich wie bei den CD4/CCR10-positiven Zellen, periphere CD8-positive Lymphozyten aufgrund der vermehrten Aufnahme der Zellen ins Gewebe im Falle einer GvHD zunächst vermindert. Bislang liegen Untersuchungen von Darm-Biopsien vor, in denen ein erhöhter Anteil CD8-positiver Lymphozyten innerhalb der Patienten mit Darm-GvHD gefunden wurden [152]. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Infiltration von CD8-positiven Zellen in Hautbiopsien einen positiven prädiktiven Wert hinsichtlich der Entwicklung einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion hat [157]. Auch die Schädigung des Thymus durch eine beginnende Spender-gegen-Wirts-Reaktion trägt vermutlich zu der Korrelation verminderter zytotoxischer T-Zellen mit dem gehäuftem Auftreten einer GvHD im weiteren Verlauf bei.

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten Absolutzahlen an zytotoxischen Zellen und dem Auftreten einer intestinalen *graft-versus-host disease* konnte nicht nachgewiesen werden [111].

In unserer Arbeit wurden signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Spender-gegen-Wirts-Reaktion nur innerhalb der späten GvHD-Form vier Tage nach Therapiebeginn und nach Reduktion der Steroide nachgewiesen. Personen mit einer *graft-versus-host disease* verfügten zu diesen Zeitpunkten über geringere relative Werte an CD8-Lymphozyten. In der bereits erwähnten Dissertation über die Entwicklung der einzelnen Leukozytenpopulationen nach Stammzelltransplantation zeigte das Vorliegen einer akuten GvHD gegenüber Patienten ohne Symptome keinen Einfluss auf die Regeneration der T-Killerzellen. Jedoch wurde diese durch das Auftreten der chronischen Form verzögert. Hierzu zählten alle Manifestationen hundert Tage und später nach Transplantation [25]. Die Suppression der T-Killerzellen beruht möglicherweise auf der Wirkung von Tregs, die durch Hemmung des zytolytischen Effektes die Konversion einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion in die akute Form verhindern [159].

Interessanterweise zeigten gesunde Kontrollen verglichen mit der Gesamtheit der Transplantierten einen höheren Anteil an aktivierten T-Killerzellen. Auch in der erwähnten Dissertation zur Untersuchung der Entwicklung unterschiedlicher Populationen nach Stammzelltransplantation wurde dieses Verhalten beschrieben [25]. Es ist zu vermuten, dass aktivierte T-Killerzellen nach Transplantation im Vergleich zu den CD4-Lymphozyten vermehrt sowohl dem spontanen Zelltod als auch dem AICD unterliegen [136][138].

Wenngleich ohne Signifikanz lagen die CD25-positiven Anteile an T-Killerzellen tendenziell höher, wenn im weiteren Verlauf eine GvHD auftrat. Dies spiegelt den erhöhten Aktivierungsstatus der Lymphozyten während der Entwicklung einer *graft-versus-host disease* wieder. Signifikant erniedrigte Absolutwerte bei Take und Absetzten von CsA innerhalb der Patienten, die im Verlauf an einer GvHD erkrankten, sind auf die in dieser Gruppe erniedrigten PBMNCs zurückzuführen.

In unseren Analysen konnte keine erhöhte CD25-Expression bei Patienten mit bestehender GvHD-Manifestation gegenüber den übrigen Transplantierten gezeigt werden. Jedoch wurde in einer Veröffentlichung eine positive Korrelation einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion mit den aktivierten zytotoxischen T-Zellen beobachtet. Auch zeigte sich ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Patienten, die DLIs mit erhöhten Anteilen aktivierter T-

Zellen erhalten hatten [158][143][160]. Daclizumab, ein Antikörper gegen CD25 konnte erfolgreich zur Therapie einer therapieresistenten GvHD eingesetzt werden [161]. Warum wir keine Korrelation finden konnten, bleibt unklar. Es ist jedoch bekannt, dass T-Killerzellen eine Reihe anderer Marker wie beispielsweise CD134 und CD154 exprimieren können [162] [163]. Morante et al. erhielten bei Auftreten einer akuten GvHD erhöhte Anteile CD134- und CD154-positiver CD8-Lymphozyten [158]. Möglicherweise ist im Falle einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion der erhöhte Aktivierungsstatus der T-Killerzellen weniger an der CD25-Expression als vielmehr an der höheren Dichte anderer kostimulatorischer Moleküle sichtbar.

#### 4.4. CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positive T-Zellen

Avanzini et al. beschrieben 2006 in einer Publikation, dass ein geringerer Prozentsatz  $\beta_7$ /CD45RA-positiver zytotoxischer T-Zellen nach Stammzelltransplantation mit einer erhöhten Inzidenz akuter Darm-GvHDs assoziiert ist [111].

Kontrollen zeigten in unserer Studie stets höhere Anteile CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positiver Lymphozyten gegenüber der Gesamtheit der Patienten. Dies liegt am vermehrten Vorkommen naiver Zellen innerhalb der Normalpersonen.

Bei Zusammenfassung aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels ergaben sich bei GvHD-Entwicklung im späteren Verlauf deutlich niedrigere Absolutwerte gegenüber Patienten ohne Reaktion. Dies ist auf die geringeren CD8-Relativ- und PBMNC-Werte innerhalb der Transplantierten, die später eine Spender-gegen-Wirts Reaktion entwickeln, zurückzuführen.

Die oben genannte Beobachtung von Avanzini et al. konnte in der vorliegenden Studie nicht gemacht werden. Vielmehr waren die relativen Werte kurz nach Engraftment gegenüber Patienten mit anderem Befallsmuster deutlich erhöht, wenn im weiteren Verlauf eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion des Darmes auftrat. Um zu zeigen, dass die von uns gefundenen höheren relativen Werte innerhalb der Patienten mit Darm-GvHD nicht nur auf einer vermehrten CD45RA-Expression beruhen, wurden die Prozentsätze aller CD8/ $\beta_7$ -positiven Lymphozyten kurz nach Engraftment analysiert. Bei Befall des Intestinaltraktes im weiteren Verlauf nach Transplantation lagen diese bei 66,93% (s:8,29; n:5) gegenüber 37,87% (s:6,25; n:15) ( $p=0,026$ ) bei späterer Entwicklung einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion anderer Art bzw. gegenüber 43,74% (s:5,53; n:11) ( $p=0,036$ ), wenn keinerlei Symptome vorlagen. Hier waren die Unterschiede zwischen der Gruppe mit Darm-GvHD



und den beiden anderen Kollektiven jeweils signifikant. Die relative Zahl an CD8/beta7/CD45RA-positiven Zahlen scheint somit, als Marker zur Unterscheidung zwischen Darmbefall und Lokalisationen geeignet zu sein. Diese Zellpopulation wird möglicherweise durch den Zytokinsturm zur Vermehrung angeregt und gelangt über die Interaktion mit MadCam auf den hochendothelialen Venulen der Peyer Plaques schließlich in die Mukosa. Bei Übersteigen der Aufnahme in die Mukosa könnte diese Proliferation zu den erhöhten Anteilen von  $\alpha_4\beta_7$ -positiven Lymphozyten im peripheren Blut führen.

Wenngleich auch ohne Signifikanz, schienen die Prozentsätze auch bei früher GvHD des Darmes oder der Leber noch erhöht zu sein gegenüber GvHD-Patienten mit anderem Befallsmuster. Erst nach Reduktion der Prednison dosis unter 20 mg am Tag bei später Spender-gegen-Wirts-Reaktion waren die Anteile bei Befall des Intestinaltraktes erniedrigt, was auf die vermehrte Aufnahme der Zellen in die Lamina propria hinweisen könnte. Zu klären bleibt jedoch, warum unsere Ergebnisse konträr zu den Aussagen von Avanzini et al. stehen. Deren Patientenkollektiv umfasste allerdings ausschließlich Personen im Alter von 0,7 bis 24 Jahren, während unsere Blutproben von Erwachsenen stammten. Um definitive Aussagen treffen zu können, sind weitere Analysen notwendig. Wir haben uns hier auf die Bestimmung des  $\beta_7$ -Integrins beschränkt. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass auch Zellen angefärbt wurden, die eigentlich das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin exprimieren. Dieses befindet sich jedoch hauptsächlich auf Lymphozyten innerhalb der Mukosa und wird wahrscheinlich durch die TGF $\beta_1$ -Sekretion epithelialer Zellen erst nach der Migration ins Gewebe hochreguliert [164]. Niedrigere CD8/beta7/CD45RA-Relativ- und Absolutwerte am vierten Tag der Steroidtherapie bei später GvHD sind Folge der erniedrigten CD8-Relativ- und Absolutwerten zu diesen Zeitpunkten.

### **4.5. Fragmente des Zytokeratins18 im Serum**

Luft et al. beschrieben eine Korrelation zwischen erhöhten Spiegeln von Zytokeratin18-Fragmenten, die bei apoptotischen Prozessen von einschichtigen Epithelien und Drüsenepithelien entstehen, und dem Vorliegen einer GvHD des Darmes und/oder der Leber. Als Vergleichsgruppe dienten jeweils die Werte der Personen kurz vor Konditionierung [127].

Da die Heidelberger Studie nicht zwischen akuter und chronischer Form differenzierte, wurden auch in der vorliegenden Arbeit frühe und späte Manifestationen zusammengefasst.



Normalpersonen wiesen im Vergleich zu allen Patienten unabhängig von Auftreten und Manifestationsort einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion signifikant erniedrigte CK18F-Spiegel auf. Es liegt die Vermutung nahe, dass nach Stammzellgabe auch bei Empfängern ohne klinische Symptome Schäden an Leber und Darm entstehen.

Auffällig war die große Streubreite innerhalb der Gruppe mit Darm- und/oder Leberbefall. Deshalb führten wir weitere Berechnungen unter Berücksichtigung der jeweiligen Grade durch. Betrachtet wurden die Fälle, bei denen eine GvHD der Leber *und* des Darmes mit Ausprägung Grad 3 oder höher an mindestens einer der Lokalisationen vorlag oder bei denen eines der Organe isoliert betroffen war und den Ausprägungsgrad 4 aufwies. Deren Konzentrationen wurde mit denen von Patienten mit leichteren Darm- und/oder Leber-Manifestationen oder isoliertem Befall der Haut, Schleimhaut oder der Augen verglichen. Tatsächlich besaßen Patienten mit höheren Ausprägungsgraden einen Mittelwert von 1503,02 U/mL (Median: 1062,15 U/mL; s:651,06; n=6). Patienten mit geringerer Schwere oder Befall von anderen Organen präsentierten hingegen eine durchschnittliche Konzentration von 142,60 U/mL (Median: 97,43 U/mL; s:34,75; n=26). Hier befand sich das Signifikanzniveau mit  $p=0,001$  deutlich unterhalb der Schwelle von 0,05. Dies gilt auch für die Unterschiede beim Vergleich der Werte mit Patienten ohne GvHD ( $p=0,00$ ) bzw. mit den Normalpersonen ( $p=0,00$ ). In der erwähnten Publikation waren die Werte ebenfalls besonders hoch, wenn es sich um eine histologisch gesicherte Darm-GvHD mit zusätzlich erhöhten Leberenzymen handelte. Zudem schien im Falle des intestinalen Befalls der Grad des histologischen Gradings entscheidend. Bei uns lagen die CK18F-Konzentrationen dreier Patienten über 1000 U/mL (4574 U/mL, 1314 U/mL, 1629 U/mL). Hierbei handelte es sich ebenfalls stets um Personen, die einen Befall von Leber und/oder Darm zeigten, wobei mindestens ein Organ den Ausprägungsgrad 4 aufwies. Dies unterstützt die Aussage von Luft et al., dass zumindest im Falle der akuten Form die Höhe des Spiegels auch mit der Schwere der Spender-gegen-Wirts-Reaktion korreliert [127].

Jedoch konnten wir keine frühzeitige CK18F-Erhöhung feststellen. Zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation waren keine Unterschiede zwischen Patienten mit einer intestinalen oder hepatischen GvHD im weiteren Verlauf und solchen mit einer Hautmanifestation oder ohne Erkrankung erkennbar. Hierzu ist allerdings zu sagen, dass bei den Messungen von Luft et al. die Werte oftmals erst 10 oder zwanzig Tage vor Therapiebeginn anstiegen. In unserer Studie waren die Zeitspannen der Blutabnahmen vor allem für das Erkennen einer frühen *graft-versus-host disease* vermutlich zu lang. Die erste Probengewinnung erfolgte direkt nach Transplantation, die zweite allerdings erst wieder

nach Sinken des CsA-Spiegels unter 100 ng/mL. Die Länge dieses Intervalls variierte je nach Patient, jedoch vergingen meist mehrere Monate. Ein weiterer denkbarer Grund ergibt sich aus der Tatsache, dass im Gegensatz zu der Publikation aus Heidelberg kein Längs- sondern ein Querschnitt analysiert wurde. Während Luft et al. die erhaltenen Medianwerte stets in Relation zu den Konzentrationen derselben Personen vor Beginn der Konditionierung setzten, enthielten unsere Vergleichsgruppen oftmals andere Patienten bzw. Normalpersonen. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass CK18F von einer Reihe von Erkrankungen beeinflusst werden kann. So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem Grad eines Leberzellschadens im Rahmen einer chronischen HCV-Infektion und CK18F-Serumwerten beschrieben. Auch die Ausprägung einer HCV-assoziierten Steatose scheint mit den M30-Konzentrationen zu korrelieren [119] [165]. Bei der Differenzierung zwischen einer fettigen Leber, einer Steatose und einer schweren NASH innerhalb eines Kollektivs mit starker Obesitas erwies sich der Marker ebenfalls als sinnvoll [166] [167]. Der durch Alkoholkonsum induzierte akute Zellschaden ist durch apoptotische Prozesse gekennzeichnet und beeinflusst folglich auch die Höhe der CK18F-Serumwerte [168] [169]. Zudem ist das Auftreten eines akuten Myokardinfarktes mit einem M30-Peak 24h nach Beginn der Symptomatik assoziiert, wobei sowohl die stabile als auch die instabile Angina pectoris wohl keinen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen nehmen [170]. Derartige Erkrankungen müssen vor allem im Modell einer Querschnittsstudie berücksichtigt werden.

Auch sollten sie in die Interpretation der CK18F-Werte innerhalb der Gruppe mit einer intestinalen GvHD eingehen. Zwei der Transplantierten mit erhöhten M30-Spiegeln zeigten Komorbiditäten, die sich möglicherweise auf die erhaltenen Ergebnisse auswirken. Patient 53 besaß am vierten Tag nach Steroidbeginn eine Serumkonzentration von 1629 U/mL. Hier war auch eine GvHD des Darmes Grad 4 und der Leber Grad 4 diagnostiziert worden, die den erhaltenen CK18F-Wert erklären. Inwieweit jedoch die bei der Patientin bekannte Colitis ulcerosa mitbeteiligt ist, bleibt unklar. Bislang existieren noch keine Publikationen zu diesem Thema. Patient 91 litt neben einer intestinalen *graft-versus-host disease* Grad 3 zusätzlich an einer Hepatitis C-induzierten Fibrose. Er entwickelte eine extensive chronische GvHD, die mit stark erhöhten M30-Werten (1410 U/mL) nach Reduktion der Steroidtherapie unter 20 mg am Tag einherging. Möglicherweise wurde der Übergang in eine chronische Form durch die Vorerkrankung getriggert, möglicherweise wurde die Hepatitis aber auch durch die Spender-gegen-Wirts-Reaktion reaktiviert und ist die eigentliche Ursache des CK18F-Anstiegs [165]. Ungenauigkeiten bei der Messung

ergeben sich eventuell auch aus der Tatsache, dass zusätzlich ältere Darm-GvHD-Proben vermessen wurden, die bisweilen zwei bis drei Jahre, im Höchstfall sogar 6 Jahre bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren. Greystroke et al. beschrieben eine mögliche Erhöhung der M30-Werte bei langfristiger Aufbewahrung [128].

### **4.6. Einfluss des Therapieerfolgs am vierten Tag nach Beginn der Steroidgabe auf die verschiedenen Zellpopulationen**

Am vierten Tag nach Beginn der Steroidtherapie bei GvHD-Patienten bestand eine Tendenz zu höheren Treg-Anteilen, wenn es im Verlauf zu einem GvHD-bedingten Tod kam. Eine Erklärung hierfür ist die vermehrte Produktion von Zytokinen im Falle einer schweren Spender-gegen-Wirts-Reaktion, die wiederum die Proliferation der FoxP3-positiven CD4-Lymphozyten anregen.

Zudem waren am vierten Tag nach erster Prednisongabe die CK18F-Werte bei Patienten mit tödlichem Verlauf der *graft-versus-host-disease* signifikant erhöht gegenüber Erkrankten, bei denen die GvHD einen milden Verlauf zeigte. Wie bereits unter 4.5 beschrieben, korreliert der CK18F-Spiegel mit der Schwere einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion. Da besonders ausgeprägte Formen gehäuft zum Tode führen, gehen erhöhte Werte am vierten Tag nach Steroidbeginn auch mit einem erhöhten Risiko einher, an der vorliegenden GvHD zu versterben.

Zudem waren die Anteile CD95-positiver T-Helferzellen kurz nach Beginn der Steroidtherapie signifikant größer, wenn es zu einem Übergang der akuten in eine chronische GvHD bzw. zu einem Auftreten einer chronischen GvHD im späteren Verlauf kam. Wie bereits erwähnt, fördert eine gesteigerte Apoptose die Proliferation klonaler, gegen eigene Antigene gerichtete Lymphozyten. Über Zytokine wird die Vermehrung bestimmter B-Lymphozyten angeregt, die durch Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Antigene eine chronische Spender-gegen-Wirts-Reaktion aufrecht erhalten.

### **4.7. Einfluss durch das Auftreten eines zweiten GvHD-Schubes auf die unterschiedlichen Zellpopulationen**

Da während des Ausschleichens der Steroide keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der einzelnen Zellpopulationen zwischen GvHD-Patienten mit und ohne Entwicklung eines zweiten Schubs im weiteren Verlauf gefunden werden konnten, ist eine Vorhersage und

eine entsprechende Modulation der Prophylaxe anhand vorliegender Werte nach Reduktion der Steroiddosis unter 20 mg am Tag nicht möglich.

Beim Vergleich der verschiedenen untersuchten Marker zwischen Patienten mit erstem GvHD-Schub und den entsprechenden Werten von Transplantierten mit vorliegendem zweiten Schub fielen bei letzteren vor Steroidbeginn, vier Tage nach erster Prednisongabe und nach Reduktion der Steroiddosis tendenziell höhere Anteile CCR10-positiver CD4-Lymphozyten auf. Im Rahmen der ersten Manifestation findet bereits eine Proliferation der CD4/CCR10-positiven Zellen statt. Kommt es im Verlauf zu einem weiteren Schub, ist die Ausgangspopulation der CD4/CCR10-Lymphozyten, die nun erneut proliferiert, größer.

### **4.8. Einfluss der Methode zur Leukozytenbestimmung auf die Absolutwerte**

Beim Vergleich der absoluten Zahlen verschiedener Kollektive konnte in einigen Fällen nur bei der Bestimmung der Werte mittels laborchemischer Leukozytenzahlen ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Da jedoch beide Absolutwerte stets den gleichen Trend zeigten und beim Vergleich untereinander keine großen Abweichungen aufwiesen, sind statistisch relevante Ergebnisse hinsichtlich der absoluten Werte nicht der jeweiligen Zählmethode zuzuschreiben. Beide Formen der Leukozytenbestimmung sind somit als gleichwertig einzustufen.

### **4.9. Einfluss der ATG- und MMF-Prophylaxe auf die Zellpopulationen**

Bei Take und auch unter Zusammenfassung aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels waren relative und absolute CD4-Zahlen deutlich niedriger, wenn die Patienten eine ATG-Prophylaxe erhalten hatten. Dies ist durch die schnellere Regeneration der CD8-Population nach ATG-Gabe bedingt. In einer Studie, in der Patienten nach Nierentransplantation mit Antithymozytenglobulin behandelt wurden, erholten sich die CD8-positiven Lymphozyten bereits innerhalb der ersten 20 Tage postoperativ, während eine Umkehr der CD4/CD8-Ratio bis zu 66 Monate nach Transplantation beobachtet werden konnte [171]. Hieraus resultieren auch die geringeren relativen und absoluten Werte der CD4/CD25Subsets, der CD4/FoxP3/CD25- und CD4/CCR10-positiven T-Helferzellen bei Take bzw. bei Zusammenfassung aller Werte nach Abfall des CsA-Spiegels.

Die Verschiebung der 25int.- und CD25high-Fraktion zugunsten des CD25low-Subsets nach Einnahme von ATG ist auf die verminderte Ausschüttung von Interleukinen nach Suppression der Lymphozyten zurückzuführen.

In einigen Publikationen wurde postuliert, dass ATG die regulatorischen T-Zellen schont bzw. sogar zu einer vermehrten Expression von FoxP3 führt. Hier wiesen Patienten mit diversen Autoimmunerkrankungen bzw. Typ-1-Diabetiker, denen Langerhanssche Inseln implantiert worden waren, nach ATG-Gabe einen höheren Prozentsatz an FoxP3-positiven T-Zellen auf [172][173]. In Mausmodellen wurde durch die Kombination von ATG und TGF-beta1 ebenfalls eine Steigerung der Anteile an CD4/FoxP3/CD25-positiven Zellen erreicht [174]. Diverse Mechanismen der Wirkung von ATG auf die Treg-Zellen wurden diskutiert [175]. In der vorliegenden Studie blieb der Prozentsatz der FoxP3-positiven T-Lymphozyten durch die Gabe von ATG unbeeinflusst. Dies deckt sich mit einer Publikation von Broady et al. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass es sich bei den durch ATG induzierten FoxP3/CD25-positiven T-Lymphozyten lediglich um aktivierte Zellen ohne suppressive Eigenschaften handelt, die bereits nach spätestens zehn Tagen kein Foxp3 mehr exprimieren [176].

Der unter Berücksichtigung der ATG-Prophylaxe weiterhin bestehende signifikante Unterschied zwischen Normalpersonen und Transplantierten hinsichtlich der relativen T-Helferzellen weist darauf hin, dass nicht allein das Antithymozytenglobulin, sondern auch die verwendeten anderen Immunsuppressiva an der Unterdrückung der CD4-positiven Lymphozyten beteiligt sind.

Wurde die Gruppe aller Patienten *mit* ATG-Prophylaxe betrachtet, zeigte sich bei Zusammenfassung aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen den CD4-Absolutwerten von Patienten mit GvHD-Entwicklung im Verlauf nach Transplantation und Patienten ohne Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion. Innerhalb der Gruppe der Patienten *ohne* ATG-Prophylaxe waren die Differenzen hinsichtlich des Auftretens einer *graft-versus-host disease* zwar nicht mehr signifikant, jedoch sichtbar. Ähnlich verhielt es sich sowohl mit als auch ohne ATG-Gabe für die CD4/CD25<sup>low</sup>- und CD4/CD25<sup>int.</sup>-Absolutwerte bei Take. Dies bestätigt unsere Vermutung, dass die Unterschiede durch die Entwicklung einer GvHD im weiteren Verlauf und weniger durch die Art der GvHD-Prophylaxe bedingt sind.

MMF zeigte eine deutliche Wirkung sowohl auf die Gesamtheit der Leukozyten als auch auf die PBMNCs. Da Letztere in die Absolutzahlen mit eingehen, wurden alle absoluten Werte, die durch Entwicklung einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion signifikant beeinflusst wurden, weiter untersucht. Meist lag unter Berücksichtigung der MMF-Prophylaxe ebenfalls noch ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne GvHD im weiteren Verlauf vor. Auch in Fällen, in denen keine eindeutige Signifikanz erreicht

wurde, war ein Einfluss durch Auftreten einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion erkennbar. Die MMF-Prophylaxe scheint somit nicht für die erhaltenen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne GvHD-Entwicklung verantwortlich zu sein.

#### **4.10. Ausblick**

Zu klären bleibt, ob ein erhöhter Anteil CD95-positiver T-Helferzellen mit einem höheren Risiko einer GvHD im späteren Verlauf korreliert. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen könnten diese Frage klären. Zudem wäre ein Tiermodell denkbar, in dem beispielsweise Mäusen HLA-identische T-Lymphozyten mit erhöhtem CD95-Anteil infundiert werden. Eine vermehrte Inzidenz von GvHD-Fällen hierdurch würde unsere These stützen, dass ein erhöhter Anteil CD95-positiver T-Helferzellen zu einem gehäuftem Auftreten von Spender-gegen-Wirts-Reaktionen im weiteren Verlauf führt. Inwieweit erhöhte Prozentsätze CD95-positiver Zellen an den T-Helferzellen am vierten Tag nach Therapiebeginn und dem späteren Auftreten einer chronischen bzw. und dem Übergang in eine chronische Spender-gegen-Wirts-Reaktion korrelieren, muss in weiteren Analysen mit größeren Fallzahlen geklärt werden.

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Absinken von FoxP3-positiven Tregs und dem Auftreten einer akuten bzw. chronischen *graft-versus-host disease* herstellen. Möglicherweise ist die Analyse von Treg-Gruppen mit bestimmten Homingrezeptoren wie CLA oder  $\alpha_4\beta_7$  sinnvoller. Zudem sind größerer Fallzahlen notwendig. In weiteren Analysen bleibt zu klären, ob eine Korrelation zwischen erhöhten Anteilen an FoxP3-positiven CD4-Lymphozyten vier Tage nach Beginn einer Steroidtherapie und einer erhöhten GvHD-bedingten Mortalität besteht.

Wir fanden vor und kurz nach erster Prednisongabe bei bereits vorliegender GvHD erniedrigte Anteile CCR10-positiver T-Helferzellen. Erst im Verlauf nahmen die Anteile im peripheren Blut durch vermehrte Proliferation zu. Die zu Beginn der GvHD vorliegenden geringeren Prozentsätze im peripheren sind vermutlich auf eine vermehrte Aufnahme in die Epidermis zurückzuführen. Hier könnte die parallele histologische Untersuchung der entsprechenden Hautbiopsien auf den Gehalt von CCR10-positiven CD4-Lymphozyten zur Bestätigung unserer Vermutung beitragen.

Nach Take waren die relativen Werte an CD8/beta7/CD45RA-positiven Lymphozyten zunächst erhöht, wenn es im weiteren Verlauf zu einer GvHD des Darmes kam. Später schienen diese aufgrund der vermehrten Aufnahme in die Darmmukosa abzusinken. Eine gleichzeitige histologische Untersuchung der entsprechenden Darmbiopsien hinsichtlich

des Gehalts an CD8/beta7/CD45RA-positiven Lymphozyten könnte auch hier unsere Ergebnisse stützen.

Wir konnten keine Assoziation erhöhter CD8/CD25-Werte mit dem Vorliegen einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion feststellen. Hier ist möglicherweise die Analyse anderer Aktivierungsmarker wie dem CD134 oder dem CD154 auf den CD8-Lymphozyten von Interesse.

Da in der Publikation von Luft et al. die CK18F-Werte erst etwa zehn Tage vor Beginn einer Steroidtherapie anstiegen, scheinen in zukünftigen Untersuchungen von CK18F-Werten in der Zeit nach Transplantation hinsichtlich der Vorhersagemöglichkeit einer GvHD kleinere Intervalle, wie beispielsweise eine wöchentliche Spiegelbestimmung, vorteilhaft. Vor allem für die Analysen der CK18F-Werte, die durch zahlreiche Komorbiditäten beeinflusst werden können, ist die Durchführung von Längsschnittstudien mit Angabe der Zunahme im Vergleich zum Ausgangswert vor Transplantation sinnvoller. Zudem sollten Serumproben sofort verarbeitet werden, um falsch hohe Werte durch lange Lagerung zu vermeiden.

In unserer Studie gingen erniedrigte PBMNC- und CD8-Werte sowie erhöhte Anteile CD95-positiver Helferzellen und erhöhte CD8/beta7/CD45RA-Relativwerte mit einem gesteigerten Risiko für eine GvHD-Entwicklung einher. Zur frühzeitigen Diagnose einer drohenden Spender-gegen-Wirts-Reaktion sind Cut-off-Werte als Orientierung von Interesse, ober- bzw. unterhalb derer das Risiko, an einer *graft-versus-host disease* zu erkranken, besonders hoch ist. Mehrere Publikationen weisen daraufhin, dass ein früher Beginn einer GvHD-Therapie mit einem deutlich besseren Ansprechen und mit einer geringeren Inzidenz von GvHD-bedingten Todesfällen assoziiert ist [177]. Erhöhte CK18F-Werte kurz nach Beginn einer Steroidtherapie erleichtern die Diagnosestellung. Auch hier scheinen Cut-off-Werte sinnvoll. Hinsichtlich der CK18F-Werte ist die Ermittlung eines weiteren Grenzwertes von Interesse, oberhalb dessen die GvHD-assoziierte Mortalität ansteigt.

Die Analyse weiterer Marker wie dem löslichen IL2-Rezeptor sollte in zukünftigen Studien eingeschlossen werden [178]. Elastin, ein von Keratinozyten produzierter Elastase-inhibitor, erwies sich in bisherigen Studien als sensibler und spezifischer Biomarker für Diagnose und Prognose der Haut-GvHD [179]. Reg3a, welches von den Panethzellen produziert wird, scheint ein spezifischer Indikator der Darm-GvHD zu sein [180]. Tryptophanmetaboliten wie die Quinolin-Säure und das Kynurenin korrelieren

möglicherweise ebenfalls mit dem Auftreten und dem Schweregrad einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion [181].



## **5. Zusammenfassung**

Die *graft-versus-host disease* tritt bei etwa 30-60% aller Patienten in den ersten Monaten nach allogener Stammzelltransplantation auf. Die Frühmortalität ist durch sie deutlich erhöht.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, durch Analyse zytologischer Marker sowie des Zytokeratins 18 Parameter zu erarbeiten, die eine frühzeitige Diagnose einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion sowie Aussagen hinsichtlich des Therapieansprechens und des Risikos eines weiteren GvHD-Schubes ermöglichen. Es wurden 75 Patienten mit hämatologischen Neoplasien eingeschlossen, die sich im Zeitraum zwischen März 2008 und August 2009 einer allogenen Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Regensburg unterzogen. Untersucht wurden neben dem CK18F allgemeine Marker wie Leukozytenzahlen, PBMNC-, CD4- und CD8-Werte sowie die Aktivierungsmarker CD25 auf CD4- und CD8-Lymphozyten und CD95 auf den T-Helferzellen. Zudem fand eine Analyse der FoxP3-positiven Tregs sowie der organspezifischen Marker CCR10 auf den CD4-Lymphozyten und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den naiven zytotoxischen T-Zellen statt. Wir ermittelten zusätzlich in Serumproben von 20 Patienten mit gesicherter Darm- und Leber-GvHD, die bereits innerhalb der zwei Jahre vor Beginn der Dissertation gesammelt worden waren, den CK18F-Spiegel. Es wurde eine Einteilung vorgenommen in Patienten, die im weiteren Verlauf an einer *graft-versus-host disease* erkrankten, und in Patienten, die keine Manifestation entwickelten. Die Werte 22 hämatologisch gesunder Personen dienten als Kontrollen. Zellpopulationen und CK18F-Spiegel wurden jeweils bei Take, bei Erreichen eines CsA-Spiegels unter 100ng/mL, nach Absetzen von CsA und vier, acht und zwölf Wochen nach Ende der CsA-Prophylaxe untersucht. Lag bei Blutabnahme bereits eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion vor, fanden entsprechende Analysen vor Steroidtherapie, vier Tage nach erster Kortisongabe und nach Reduktion der Prednison dosis unter 20 mg am Tag statt. Diese Werte wurden jeweils mit denen entsprechender Patienten ohne GvHD bei Abnahme verglichen. Es erfolgte eine Unterscheidung zwischen früher und später *graft-versus-host disease*.

Hinsichtlich der allgemeinen Parameter ergaben sich signifikant erniedrigte PBMNC-Werte bei Zusammenfassen aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels, wenn im weiteren Verlauf eine GvHD auftrat (M:1661,01/ $\mu$ L; s:205,00; n:31) gegenüber Transplantierten ohne Manifestation (M:2545,10/ $\mu$ L, s:369,35; n:10) (p:0,023). Zum gleichen Zeitpunkt waren bei Transplantierten mit späterer Spender-gegen-Wirts-Reaktion deutlich geringere CD4-Absolutwerte zu verzeichnen. Sowohl bei Zusammenfassung aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels als auch bei Take lagen relative und absolute Werte an zytotoxischen Zellen bei

Patienten mit Entwicklung einer *graft-versus-host disease* im weiteren Verlauf signifikant unterhalb entsprechender Werte von Transplantierten, die nach Stammzellgabe nicht an einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion erkrankten. Eine beginnende GvHD führt zur Schädigung des Thymus und sekundärer lymphatischer Organe mit konsekutiver Lymphopenie. Zudem werden Lymphozyten bei Entwicklung einer *graft-versus-host disease* vermehrt ins Gewebe aufgenommen. Signifikant erhöhte Leukozytenzahlen bei Patienten mit GvHD nach Reduktion der Steroidtherapie im Vergleich zu Transplantierten ohne Spender-gegen-Wirts-Reaktion waren auf die Prednisongabe zurückzuführen.

Der Anteil CD95-positiver Zellen an den CD4-Lymphozyten war bei Zusammenfassung aller Werte nach Sinken des CsA-Spiegels signifikant höher, wenn sich später eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion entwickelte. Analysen im Rahmen einer vorangehenden Dissertation hatten nach Engraftment hingegen niedrigere Prozentsätze bei Transplantierten mit Auftreten einer GvHD im weiteren Verlauf gezeigt [25]. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um definitive Aussagen treffen zu können. Bei Patienten, die bereits aufgrund einer akuten *graft-versus-host disease* mit Prednison behandelt wurden, wurden frühe und späte akute GvHD-Formen zusammengefasst und am vierten Tag nach erster Steroidgabe hinsichtlich des Auftretens oder des Überganges in eine chronische GvHD im weiteren Verlauf untersucht. Der Anteil CD95-positiver T-Helferzellen lag bei späterer Entwicklung einer chronischen Spender-gegen-Wirts-Reaktion mit 35,83% (s: 9,65; n:7) signifikant höher als bei GvHD-Patienten ohne spätere chronische Form (M: 16,35%; s:3,37; n: 22) (p: 0,021). Lag bereits eine Spender-gegen-Wirts-Reaktion vor, kam es vier Tage nach Beginn der Prednisontherapie bei Zusammenfassen der frühen und späten Form zu einer Verschiebung des CD25<sup>low</sup>-Anteils hin zu höheren CD25<sup>int.</sup>- und CD25<sup>high</sup>-Subsets verglichen mit Patienten ohne Vorliegen von Symptomen einer GvHD. Dies ist auf eine verstärkte Aktivierung der Zellen im Rahmen der *graft-versus-host disease* zurückzuführen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war unter anderem, die Bedeutung von CCR10 auf den CD4-positiven T-Zellen als Marker für die Haut-GvHD zu klären. Wurden frühe und späte Spender-gegen-Wirts-Reaktion zusammengefasst, waren die CCR10-positiven Anteile vor Steroidtherapie und am vierten Tag nach der ersten Prednisongabe bei Haut-GvHD-Patienten mit 3,95% (s:0,73; n:22) (p:0,042) bzw. 3,62% (s:0,64; n:22) (p:0,026) signifikant geringer als bei Transplantierten ohne Vorliegen einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion (M:7,40%; s:0,99; n:66). Nach Reduktion der Steroiddosis unter 20mg am Tag drehte sich das Verhältnis allerdings um. Patienten mit Hautbefall besaßen hier einen CCR10-Anteil von 12,34%

(s:2,59; n:23) gegenüber Transplantierten ohne GvHD-Symptome (M:7,40%; s:0,99; n:66) (p:0,027). Ein Vergleich aller GvHD-Patienten unabhängig vom Manifestationsorgan mit Transplantierten, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Spender-gegen-Wirts-Reaktion vorlag, brachte ähnliche Ergebnisse, weshalb CCR10 nicht spezifisch für einen Befall der Haut zu sein scheint. Das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den CD8-positiven T-Lymphozyten war in einer Publikation als möglicher Prädiktor einer Darm-GvHD vorgestellt worden [111]. Hier war ein erniedrigter Anteil  $\alpha_4\beta_7$ -positiver Zellen an den CD8-Lymphozyten kurz nach Engraftment mit dem gehäuften Auftreten einer Darm-GvHD im weiteren Verlauf einhergegangen. In unserer Studie waren hingegen bei Erreichen eines Leukozytenwertes über 1000/ $\mu$ L die mittleren relativen Werte der Empfänger mit Darmbefall im späteren Verlauf (M:7,02%; s:3,96; n:5) gegenüber entsprechenden Zahlen von GvHD-Patienten mit anderen Manifestationsorten (M:0,57%; s:0,21; n:15) signifikant höher (p:0,021). Zudem hatten Patienten mit einer Darm-GvHD im Vergleich zu solchen mit anderen Manifestationsorten im Falle eines frühen Auftretens vor Therapiebeginn erhöhte Relativ- und Absolutwerte sowie größere Anteile von CD8/ $\beta_7$ /CD45RA-positiven Zellen. Vor allem bei später Manifestation nach Reduktion der Steroidtherapie schien sich das Verhältnis eher umzukehren. Das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin war spezifisch für den Befall des Intestinaltraktes.

Hinsichtlich des CK18F-Spiegels bestanden signifikante Unterschiede, wenn schwere Formen eines intestinalen oder hepatischen Befalls (M:1503,02 U/ml; Median: 1062,25 U/mL; s:651,06; n:6) mit den Werten von Patienten mit leichter intestinaler GvHD oder mit Befall eines anderen Organs (M:142,60 U/mL; Median: 97,43 U/mL; s: 34,75; n:26) am vierten Tag nach Beginn einer Steroidtherapie verglichen wurden (p:0,001). Zudem korrelierte zum gleichen Zeitpunkt bei Zusammenfassung der frühen und späten *graft-versus-host disease* die Höhe des CK18F-Spiegels mit der GvHD-assoziierten Mortalität. CK18F spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung des Schweregrades einer Spender-gegen-Wirts-Reaktion.

Ein signifikanter Einfluss durch die Methode der Leukozytenbestimmung auf die Absolutzahlen konnte nicht nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Gabe von ATG oder MMF war nicht Ursache der gefundenen signifikanten Unterschiede. Allerdings beeinflusste ATG signifikant den Anteil der T-Helferzellen an den PBMNCs sowie die Verteilung der einzelnen CD25- Subsets innerhalb der CD4-Lymphozyten. Ein Effekt auf die Tregs war nicht erkennbar.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Basis für weitere Studien geschaffen, die möglicherweise zur Ermittlung von Parametern führen, anhand derer eine beginnende GvHD frühzeitig erkannt und hinsichtlich ihres Schweregrades eingestuft werden kann. Durch rechtzeitigen Beginn bzw. rechtzeitige Eskalation oder Änderung der bestehenden Therapie könnte die GvHD-assoziierte Mortalität gesenkt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Möller G (ed.): Immunological Reviews. Munksgaard Copenhagen 1985: 5 – 23.
- [2] Priv.-Doz. Dr. Kröger N, Prof. Dr. Dr. h.c. Zander AR et al.: Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. Uni-Med 2004: 38 – 64.
- [3] Van Bekkum DW: Stem Cell Transplantation in Experimental Models of Autoimmune Disease. Journal of Clinical Immunology 2000: 20: 10 – 16.
- [4] Bezwoda WR, Seymour I et al.: High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial. Journal of Clinical Oncology 1995: 13: 2483 – 2489.
- [5] Kaffanke J: Serielle Untersuchungen zur Hämatopoese an c-mpl<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dissertation Hannover 2007.
- [6] [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/human/live/web\\_enabled/560710.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/human/live/web_enabled/560710.pdf)
- [7] [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/human/live/web\\_enabled/33089A\\_559869.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/human/live/web_enabled/33089A_559869.pdf)
- [8] Priv.-Doz. Dr. Kröger N, Prof. Dr. Dr. h.c. Zander AR et al.: Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. Uni-Med 2004: 30 – 35.
- [9] [http://pathology.columbia.edu/education/residency/apheresis\\_2.pdf](http://pathology.columbia.edu/education/residency/apheresis_2.pdf)
- [10] <http://transfusionsmedizin.uk-wuerzburg.de/studenten/hauptvorlesung/hla/hla-und-transplantation.html>
- [11] Ferrara JLM, Deeg HJ et al.: Graft-vs.-Host Disease. Marcel Dekker 1997: 1 – 40.
- [12] Priv.-Doz. Dr. Kröger N, Prof. Dr. h.c. Zander AR et al.: Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. Uni-Med 2004: 90 – 110.
- [13] <http://www.uniklinikum-regensburg.de/imperia/md/content/kliniken-institute/haematologie-onkologie/gvhd/deutsch/cgvhddiagnosekriterien.pdf>
- [14] [http://www.im-focus-onkologie.de/archiv/2002/07/ifo0207\\_42.pdf](http://www.im-focus-onkologie.de/archiv/2002/07/ifo0207_42.pdf)
- [15] Priv.-Doz. Dr. Kröger N, Prof. Dr. h.c. Zander AR et al.: Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. Uni-Med 2004: 80 – 88.
- [16] Holler E, Rogler G et al.: Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. Blood 2004; 104(3): 889 – 894.
- [17] Holler E, Rogler G et al.: Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on longer term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by type of gastrointestinal decontamination. Blood 2006; 107(10): 4189 – 4193.
- [18] Greinix HT, Volc-Platzer B et al.: Extracorporeal photochemotherapy in treatment of severe steroidrefractory acute graft-versus-host disease: a pilote study. Blood 2000; 96(7): 2426 – 2431.
- [19] Ferrara J L M, Deeg H J et al.: Graft-vs.Host Disease. Marcel Deckker 1997: 40 – 62.
- [20] Ferrara J L M, Deeg H J et al.: Graft-vs.Host Disease. Marcel Deckker 1997: 63 – 82.

- [21] Möller G (ed): Immunological Reviews. Munksgaard Copenhagen 1985: 257 – 282.
- [22] Möller G (ed): Immunological Reviews. Munksgaard Copenhagen 1985: 291 – 312.
- [23] Möller G (ed): Immunological Reviews. Munksgaard Copenhagen 1985: 337 – 379.
- [24] [http://www.ebioscience.com/ebioscience/specs/pdf/antibody\\_12/12-0259.pdf](http://www.ebioscience.com/ebioscience/specs/pdf/antibody_12/12-0259.pdf)
- [25] Gaßner M: Untersuchung des Immunsystems nach allogener Stammzelltransplantation anhand durchflusszytometrisch gewonnener Daten. Dissertation Regensburg 2006.
- [26] <http://www.abcam.com/CD95-antibody-ab2437.html>
- [27] <http://www.antikoerper-online.de/antibody/97060/anti-CD95+Fas/>
- [28] <http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>
- [29] Male D K, Brostoff J et al.: Immunology. Elsevier 2006: 343 – 363.
- [30] Sakaguchi S, Fukuma K et al.: Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. Journal of Experimental Medicine 1985: 161(1):72 – 87.
- [31] Sakaguchi S, Sakaguchi N et al.: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. Journal of Immunology 1995: 155(3):1151 – 11564.
- [32] Li B, Samanta A et al.: FoxP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. International Immunology 2007: 19(7): 825 – 835.
- [33] [http://www.rndsystems.com/molecule\\_detail.aspx?m=3029](http://www.rndsystems.com/molecule_detail.aspx?m=3029)
- [34] Jung Y, Seoh J et al.: Feedback loop of immune regulation by CD4+CD25+ Treg. Immunobiology 2009: 214(4):291 – 302.
- [35] Yamazaki S, Iyoda T et al.: Direct expansion of functional CD25+CD4+regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. Journal of Experimental Medicine 2003: 198:235 – 247.
- [36] Ziegler SF: FoxP3: of mice and men. Annual Review of Immunology 2006: 24: 209 – 226.
- [37] Dipl.-Biol. Moharreh-Khiabani D.: Regulation der Expression von FoxP3 in humanen CD4+T-Zellen. Dissertation Hannover 2008
- [38] Nguyen NT, Kimura A et al.: Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 2010:107(46):19961 – 19966.
- [39] Oderup C, Cederborn L et al.: Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. Immunology 2006: 118:240 – 249.
- [40] Grohmann U, Orabona C et al.: CTLA-4Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nature Immunology 2002: 3:1097 – 1101.
- [41] Zhao DM, Thornton AM et al.: Activated CD4+CD25+T cells selectively kill B lymphocytes. Blood 2006: 107(10):3925 – 3932.
- [42] Takahashi T, Kuniyasu Y et al.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally energetic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. International Immunology 1998: 10:1969 – 1980.

- [43] Thornton AM, Shevach EM et al.: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *Journal of Experimental Medicine* 1988: 188 – 287.
- [44] Gondek DC, Lu LF et al.: Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology* 2005: 174(4): 1783 – 1786.
- [45] Cao X, Cai SF et al.: Granzyme B und perforin are important for regulatory T cell mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007: 27(4):635 – 646.
- [46] Bopp T, Becker C et al.: Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *Journal of Experimental Medicine* 2007: 204(6):1303 – 1310.
- [47] Paust S, Lu LF et al.: Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004: 101(28):10398 – 10403.
- [48] Read S, Malmström V et al.: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role on the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 2000: 192(2): 295 – 302.
- [49] Asseman C, Mauze S et al.: An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 1999:190:995 – 1004.
- [50] Kingsley CI, Karim M et al.: CD25(+) CD4(+) regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *Journal of Immunology* 2002: 168:1080 – 1086.
- [51] Suri-Payer E, Cantor H: Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+) CD25(+) T cells. *Journal of Autoimmunology* 2001:16(2):115 – 123.
- [52] Nakamura K, Kitani A et al.: Cell contact dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *Journal of Experimental Medicine* 2001: 194(5):629 – 644.
- [53] Collison LW, Workman CJ et al.: The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007: 450:566 – 569.
- [54] Pandiyan P, Zheng L et al.: CD4+CD25+FoxP3 regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*: 8: 1353 – 1362.
- [55] Sakaguchi S, Wing K et al.: Regulatory T cells: How do they suppress immune responses? *International Immunology* 2009: 21(10): 1105 – 1111.
- [56] Thiemessen MM, Jagger AL et al.: CD4+CD25+FoxP3 regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 2007: 104(49): 19446 – 19451.
- [57] Fritzsching B, Oberle N et al.: A novel subpopulation defined by resistance towards CD95L-mediated cell death. *Blood* 2006: 108(10): 3371 – 3378.
- [58] Cohen JL, Trenado A. et al.: CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine* 2002: 196(3): 401 – 406.
- [59] Jones SC, Murphy GF: Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD4CD25 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biologic Blood Marrow Transplantation* 2003: 9(4): 243 – 256.



- [60] Hoffmann P, Edinger M et al.: Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196(3): 389 – 399.
- [61] Edinger M, Hoffmann P et al.: CD4+CD25+regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nature Medicine* 2003; 9(9): 1144 – 1150.
- [62] Mielke S, Rezvani K et al.: Reconstitution of FoxP3 regulatory T cells (Tregs) after CD25-depleted allotransplantation in elderly patients and association with acute graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 110(5):1689 – 1697.
- [63] Hoffmann P, Eder R. et al.: Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004; 104(3): 895 – 903.
- [64] Jonuleit H, Schmitt E et al.: Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 193(11):1285 – 1294.
- [65] Dieckmann D, Plottner H et al.: Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 193: 1303 – 1310.
- [66] Chen W, Jin W et al.: Conversion of peripheral CD4+CD25+-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198(12): 1875 – 1886.
- [67] Walker MR, Kaspirowicz DJ et al.: Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25+ T-cells. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112(9): 1310 – 1312.
- [68] Yamagiwa S, Gray JD et al.: A role of TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *Journal of immunology* 2001; 166:7282 – 7289.
- [69] Setaguchi R, Hori S et al.: Homeostatic maintenance of natural FoxP3(+)CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 201(5): 723 –735.
- [70] Zhang H, Chua KS et al.: Lymphopenia and interleukin-2 therapy after homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Medicine* 2005; 11(11): 1238 – 1243.
- [71] Coenen JJA, Koenen HJ et al.: Rapamycin, not Cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+CD25+FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39(9): 537 – 545.
- [72] Bocian K, Borysowski J et al.: Rapamycin, unlike Cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010; 25(3):710 – 717.
- [73] Zorn E, Kim HT et al.: Reduced frequency of FoxP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106(8): 2903 – 2911.
- [74] Zorn E: CD4+CD25+ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation. *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16: 150 – 159.
- [75] Magenau JM, Qin X et al.: Frequency of CD4+CD25highFoxP3 regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2010; 16(7):907 – 914.



- [76] Rieger K, Loddenkemper C et al.: Mucosal FoxP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107: 1717 – 1723.
- [77] Viglietta V, Boecher-Allan C et al.: Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 2004; 199(7): 971 – 979.
- [78] Ehrenstein MR, Evans JG et al.: Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *Journal of Experimental Medicine* 2004; 200(3): 277 – 285.
- [79] Lindley S, Dayan CM et al.: Defective suppressor function in CD4+CD25+ T cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(1): 92 – 99.
- [80] Sugiyama H, Gyulai R et al.: Dysfunctional blood and target tissue CD25+CD4+high regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *Journal of Immunology* 2005; 174(1): 164 – 173.
- [81] Balandina A, Lécart S, Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005; 105(2): 735 – 741.
- [82] Wolf AM, Wolf D et al.: Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical Cancer Research* 9(2):606 – 612.
- [83] Liyanage UK, Moore TT et al.: Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunology* 2002; 169(5): 27565 – 2761.
- [84] Viguier M, Lemaître F et al.: FoxP3 expressing CD4+CD25high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *Journal of Immunology* 2004; 173: 1444 – 1453.
- [85] Ormandy LA, Hillemann T et al.: Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 2005; 65(6): 2457 – 2464.
- [86] Cabrera R, Tu Z et al.: An immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C Virus infection. *Hepatology* 40(5):1062 – 1071.
- [87] Stoop JN, Van der Molen R G et al.: Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41(4):771 – 778.
- [88] <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=CCR10>
- [89] [http://www.chemgapedia.de/vsengine/tra/vsc/de/ch/8/bc/tra/signaltransduktion\\_intrazellulaer.tra/Vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/botenstoffe/signaltransduktion.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/botenstoffe/gpcr.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/tra/vsc/de/ch/8/bc/tra/signaltransduktion_intrazellulaer.tra/Vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/botenstoffe/signaltransduktion.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/botenstoffe/gpcr.vscml.html)
- [90] Kroeze KW, Douglas J et al.: G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 4867 – 4869.
- [91] Wang W, Soto H et al.: Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(29):22313 – 22323.
- [92] <http://reference.findtarget.com/search/CCL27/>
- [93] Reiss Y, Proudfoot AE et al.: CC Chemokine Receptor (CCR)4 and the CCR10 Ligand Cutaneous T Cell-attracting Chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(10):1541 – 1547.

- [94] Inokuma D, Abe R et al.: CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem Cells* 2006; 24(12):2810 – 2816.
- [95] Simonetti O, Goteri G et al.: Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. *European Journal of Cancer* 2006; 42(8):1181 – 1187.
- [96] Homey B, Wang W et al.: Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *Journal of Immunology* 2000; 164(7):3465 – 3470.
- [97] Homey B, Alenius H et al.: CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature Medicine* 2002; 8(2):157 – 165.
- [98] Faaij CM JM, Lankester AC et al.: A possible role for CCL27/CTACK-CCR10 interaction in recruiting CD4<sup>+</sup> T cells to skin in human graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology* 2006; 133: 538 – 549.
- [99] Tidswell M, Pachynski R et al.: Structure-function analysis of the integrin beta7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1. *Journal of Immunology* 1997;159(3): 1497 – 1509.
- [100] Ruiz-Velasco N, Guerrero-Esteo M et al.: The alpha(4) integrin subunit Tyr (187) has a key role in alpha(4)beta(7)-dependent cell adhesion. *Journal of Biologic Chemistry* 2000;275:7052 – 7059.
- [101] Murata S, Tanaka T et al.: Lymphocyte binding to MAdCAM-1 via  $\alpha_4\beta_7$  integrin activates a signal transduction pathway involving tyrosine phosphorylation of paxillin and p105<sup>Cas-L</sup>. *Immunology Letters* 2002; 81(3):223 – 228.
- [102] Zeller Y, Mechttersheimer S et al.: Critical amino acid residues of the  $\alpha_4$  subunit for  $\alpha_4\beta_7$  integrin function. *Journal of Cellular Biochemistry* 2001; 83:304 – 319.
- [103] Hesterberg PE, Winsor-Hines D et al.: Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin alpha4beta7. *Gastroenterology* 1996;111:1373 – 1380.
- [104] Picarella D, Hurlbut P et al.: Monoclonal antibodies specific for beta7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB high CD4<sup>+</sup>T cells. *Journal of Immunology* 1997; 158: 2099 – 2106.
- [105] Ghosh S: Therapeutic value of alpha-4 integrin blockade in inflammatory bowel disease: the role of natalizumab. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2003; 3: 995 – 1000.
- [106] Gosh S, Goldin E et al.: Natalizumab for active Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348: 24 – 32.
- [107] Gosh S: Alpha 4 integrin blockade in inflammatory bowel disease. *Annual Rheumatologic Discussion* 2003; 62(2): 70 – 72.
- [108] Feagan B G, Greenberg G R et al.: Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the  $\alpha_4\beta_7$  integrin. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 2499 – 2507.
- [109] Murai M, Yoneyama H et al.: Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nature Immunology* 2003; 4: 154 – 160.
- [110] Waldman E, Lu S X et al.: Absence of  $\beta_7$  integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood* 2006; 107(4): 1703 – 1711.
- [111] Avanzini M A, Maccario R et al.: Low percentages of circulating CD8<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> human T lymphocytes expressing  $\beta_7$  integrin correlate with the occurrence of intestinal acute graft-versus-host

disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 2006; 34: 1429 – 1434.

[112] Dutt S., Ermann J et al.: L-selectin and  $\beta_7$  integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106(12): 4009 – 4015.

[113] Katayama Y, Hidalgo A et al.: Integrin  $\alpha_4\beta_7$  and its counterreceptor MadCAM-1 contribute to hematopoietic progenitor recruitment into bone marrow following transplantation. *Blood* 2004; 104: 2020 – 2026.

[114] Brandt E B, Zimmermann N et al.: The  $\alpha_4\beta_7$ -integrin is dynamically expressed on murine eosinophils and involved in eosinophil trafficking to the intestine. *Clinical and Experimental Allergy* 2006; 36: 543 – 553.

[115] <http://www.antikoerper-online.de/productsheets/de/ABIN98166.pdf>

[116] Schaafsma HE, Ramaekers FCS et al.: Cytokeratin subtyping in normal and neoplastic epithelium: basic principles and diagnostic applications. *Pathology annual* 1994; 29: 21 – 62.

[117] Ku NO, Michie SA et al.: Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 1034 – 1046.

[118] Leers M, Kölgen W et al.: Immunocytochemical detection and mapping of cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *Journal of Pathology* 1999; 187: 567 – 572.

[119] Seidel N, Volkmann X et al.: The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *Hepatology* 2005; 42(1): 113 – 120.

[120] Volkmann X, Cornberg M et al.: Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006; 43: 1311 – 1316.

[121] De Haas EC, Di Pietro A et al.: Clinical evolution of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer. *Neoplasia* 2008; 10(10): 1041 – 1048.

[122] Ueno T, Toi M et al.: Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *European Journal of Cancer* 2003; 39(6): 769 – 774.

[123] Ausch C, Buxhofer-Ausch V et al.: Circulating Cytokeratin 18 fragment M65- a potential marker of malignancy in colorectal cancer patients. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2009; 13(11): 2020 – 2026.

[124] Ausch C, Buxhofer-Ausch V et al.: Caspase-cleaved cytokeratin 18 fragment (M30) as marker of postoperative residual tumor load in colon cancer patients. *European Journal of Oncology* 2009; 35(11): 1164 – 1168.

[125] Ozturk B, Coskun U et al.: Elevated serum levels of M30 and M65 in patients with locally advanced head and neck tumors. *International Immunopharmacology* 2009; 9: 645 – 648.

[126] Ulukaya E, Yilmaztepe A et al.: The levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer* 2007; 56(3): 399 – 404.

[127] Luft T, Conzelmann M et al.: Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 110: 4535 – 4542.

[128] Greystoke A, Cummings J et al.: Optimisation of circulating biomarkers of cell death for routine clinical use. *Annals of Oncology* 2008; 19(5): 990 – 995.

- [129] [http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS\\_derivate\\_000000001213/01\\_Einleitung.pdf;jsessionid=0A4960C058628F064198C999F5CD4320?hosts](http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000001213/01_Einleitung.pdf;jsessionid=0A4960C058628F064198C999F5CD4320?hosts)
- [130] <http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch?praep>
- [131] Williams KM, Gress RE et al.: Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2008; 21(3): 579 – 596.
- [132] Gorski J, Chen X et al.: Homeostatic expansion and repertoire regeneration of donor T cells during graft versus host disease is constrained by the host environment. *Blood* 2007; 109(12): 5502 – 5510.
- [133] <http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch?wirkstoff>
- [134] Kimming S, Przybylski GK et al.: Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195(6): 789 – 794.
- [135] Unutmaz D, Pileri P et al.: Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 180(3): 1159 – 1164.
- [136] Heib NC, Déas O et al.: Peripheral blood T cells generated after allogeneic bone marrow transplantation: lower levels of bcl-2 protein and enhanced sensitivity to spontaneous and CD95-mediated apoptosis in vitro. Abrogation of the apoptotic phenotype coincides with the recovery of normal naive/primed T-cell profiles. *Blood* 1999; 94(5): 1803 – 1813.
- [137] Strauss G, Lindquist JA et al.: CD95 co-stimulation blocks activation of naive T cells by inhibiting T cell receptor signaling. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206(6): 1379 – 1393.
- [138] Brugnani D, Ariò P et al.: Immune reconstitution after bone marrow transplantation for combined immunodeficiencies: down-modulation of bcl-2 and high expression of CD95/Fas account for increased susceptibility to spontaneous and activation-induced lymphocyte cell death. *Bone marrow transplantation* 1999; 23(5): 451 – 457.
- [139] Wasem C, Fruttschi C et al.: Accumulation and activation –induced release of preformed Fas (CD95) ligand during the pathogenesis of experimental graft-versus-host-disease. *Journal of Immunology* 2001; 167: 2936 – 2941.
- [140] Baker MB, Altmann NH et al.: The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183(6): 2654 – 2656.
- [141] Braun MY, Lowin B et al.: Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183(2): 657 – 661.
- [142] Tsukada N, Kobata T et al.: Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1999; 93(8): 2738 – 2747.
- [143] Banz A, Pantoux C et al.: Modulation of Fas-dependent apoptosis: A dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector cells. *Journal of Immunology* 2002; 169(2): 750 – 757.
- [144] Stanzani M, Martins SLR et al.: CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood* 2004; 103(3): 1140 – 1146.

- [145] Jarsolav M, Collins RH et al.: Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *The Lancet* 2003; 361(9364): 1183 – 1185.
- [146] Braitch M, Harikrishnan S et al.: Glucocorticoids increase CD4+CD25high cell percentage and FoxP3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 2009; 119(4): 239 – 245.
- [147] Navarro J, Aristimuno C et al.: Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: Differential short-term changes on corticosteroids therapy. *Journal of Neuroimmunology* 2006; 176(1): 153 – 161.
- [148] Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y et al.: Human CD4+ CD25high FoxP3 regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 2006;116: 2423 – 2433.
- [149] Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M et al.: The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nature Reviews Immunology* 2007;7: 231 – 237.
- [150] Sanchez J, Casano J et al.: Kinetic of regulatory CD25high and activated CD134+ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Haematology* 2004; 126(5): 697 – 703.
- [151] Miura Y, Thoburn CJ et al.: Association of FoxP3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104(7): 2187 – 2193.
- [152] Andreesen R, Holler E, Edinger M, Hoffmann P et al.: Recipient NOD2/CARD15 status affects cellular infiltrates in human intestinal graft-versus-host disease. *Clinical & Experimental Immunology* 2010; 159(1): 87 – 92.
- [153] Fondi C, Nozzoli C et al.: Increase in FoxP3+Regulatory T cells in GVHD Skin Biopsies is associated with lower disease severity and treatment response. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009; 15(8): 938 – 947.
- [154] Engelhardt BG, Jagasia M et al.: Regulatory T cell expression of CLA or  $\alpha_4\beta_7$  and skin or gut acute GvHD outcomes. *Bone Marrow Transplantation* 2010; 10: 1038 – 1049.
- [155] Simone R, Zicca A et al.: The frequency of regulatory CD3+CD8+CD28-CD25+ T lymphocytes in human peripheral blood increases with age. *Journal of Leucocyte Biology* 2008; 84(6): 1454 – 1461.
- [156] Hamann D, Baars PA et al.: Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186(9): 1407 – 1418.
- [157] Heldal D, Brinch L et al.: Skin biopsies for early diagnosis and prognosis of graft-versus-host disease in recipients of allogeneic stem cells from blood or bone marrow. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 34(4): 345 – 350.
- [158] Morante MP, Briones J et al.: Activation-associated phenotype of CD3 T cells in acute graft-versus-host disease. *Clinical& Experimental Immunology* 2006; 145(1): 36 – 43.
- [159] Kim J, Kim HJ et al.: Maintenance of CD8+ T-cell anergy by CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic graft-versus-host disease. *Experimental and Molecular Medicine* 2006; 38(5): 494 – 501.
- [160] Mutis T, Aarts-Riemens T et al.: The association of CD25 expression on donor CD8+ and CD4+ T cells with graft-versus-host disease after bone lymphocyte infusions. *Haematologica* 2005; 90(10): 1389 – 1395.
- [161] Przepiorka D, Kernan NA et al.: Daclizumab, a humanized anti-IL-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood* 2000; 95: 83 – 89.

- [162] [http://www.biolegend.com/pop\\_pdf.php?id=2609](http://www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=2609)
- [163] [http://www.biolegend.com/pop\\_pdf.php?id=3150](http://www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=3150)
- [164] Cepek KL, Parker CM et al.: Integrin alpha E beta7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *Journal of Immunology* 1993; 150: 3459 – 3470.
- [165] Bantel H, Lügering A et al: Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004; 40: 1078 – 1087.
- [166] Diab DL, Yerian L et al.: Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clinic of Gastroenterology and Hepatology* 2008; 6(11): 1249 – 1254.
- [167] Feldstein AE, Wieckowska A et al.: Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009; 50(4): 1072 – 1078.
- [168] Ramskogler K, Brunner M et al.: CDT values are not influenced by epithelial cell apoptosis in chronic alcoholic patients-preliminary results. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 2004; 28(9): 1396 – 1398.
- [169] Gonzalez-Quintela A, Abdulkader I et al.: Serum levels of keratin-18 fragments [tissue polypeptide- specific antigen (TPS) are correlated with hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 54(3): 648 – 653.
- [170] Senturk T, Aydinlar A et al.: Serial changes in circulating M30 antigen, a biomarker of apoptosis, in patients with acute coronary syndromes: relationship with the severity of coronary artery disease. *Coronary Artery Disease* 2009; 20(8): 494 – 498.
- [171] <http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch?praep>
- [172] Lytton SD, Denton CP et al.: Treatment of autoimmune disease with rabbit anti-T lymphocyte globulin: clinical efficacy and potential mechanisms of action. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1110: 285-296.
- [173] Hire K, Ngo DK et al.: FoxP3+, and not CD25+ Tcells increase post-transplant in islet allotransplant recipients following anti-CD25+ rATG immunotherapy. *Cellular Immunology* 2012; 274(1-2): 83-88.
- [174] Kaplan J, Woodworth L et al.: Therapeutic benefit of treatment with anti-thymocyte globulin and latent TGF-beta1 in the MRL/Lpr lupus mouse model. *Lupus* 2008; 17(9): 822-831.
- [175] Boenisch O, Lopez M et al.: Ex vivo expansion of human Tregs by rabbit ATG is dependent on intact STAT3-signaling in CD4(+) T cells and requires the presence of monocytes. *American Journal of Transplantation* 2012; 12(4):856-866.
- [176] Broady R, Yu J et al.: ATG-induced expression of FoxP3 in human CD4(+) T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FoxP3(+) T regulatory cells. *Blood* 2009; 114(24) 5003-5006.
- [177] Silvia Ruhm: GVHD (graft-versus-host disease) prediction and diagnosis through molecular methods in HSCT (hematopoietic stem cell transplantation). *Diplomarbeit Universität Wien* 2010.
- [178] Nakamura H, Komatsu K et al.: Serum levels of soluble IL2-receptor, IL-12, IL-18, and INF- $\gamma$  in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000; 106: 45-50.
- [179] Paczesny S, Braun TM et al.: Elafin is a biomarker of graft versus host disease of the skin. *Science Translational Medicine* 2010; 2(13):13.



- [180] Ferrara JL: Biomarker may detect GvHD of the gastrointestinal tract after HSCT. *Blood* 2011;10:1182.
- [181] Langfried K, Zhu W et al.: Tryptophan catabolism is associated with acute GvHD after human allogeneic stem cell transplantation and indicates activation of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Blood* 2011; 118(26): 6971-6974.
- [182] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag 2003.
- [183] <http://www.vicc.org/mycancergenome/images/heterotrimeric-g-protein.png>

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abbildung 1:	Mittelwerte und Verteilung der PBMNCs bei Zusammenfassung aller Werte nach Reduktion von CsA unter 100	39
Abbildung 2:	Mittelwerte und Verteilung der PBMNCs bei Take, 4 und 12 Wochen nach CsA Ende	39
Abbildung 3:	Mittelwerte und Verteilung der Leukozyten nach Reduktion der Steroide bei früher GvHD	40
Abbildung 4:	Mittelwerte und Verteilung der Leukozyten nach Reduktion der Steroide bei später GvHD	40
Abbildung 5:	Mittelwerte und Verteilung der CD4-Relativwerte bei Take, Reduktion und Absetzen von CsA	42
Abbildung 6:	Mittelwerte und Verteilung der CD4-Relativwerte 4, 8 und 12 Wochen nach CsA-Ende	42
Abbildung 7:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD95-positiver T-Helferzellen bei Zusammenfassung der Werte nach Reduktion von CsA unter 100ng/mL	44
Abbildung 8:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD95-positiver T-Helferzellen bei Take, Reduktion und Absetzen von CsA	44
Abbildung 9:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD95-positiver T-Helferzellen 8 und 12 Wochen nach CsA-Ende	44
Abbildung 10:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25low-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD	50
Abbildung 11:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25int.-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD	50
Abbildung 12:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25high-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD	50
Abbildung 13:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25low-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD	51
Abbildung 14:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25int.-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD	51
Abbildung 15:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25high-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD	51
Abbildung 16:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile FoxP3-positiver T-Helferzellen bei Take und 12 Wochen nach CsA-Ende	53
Abbildung 17:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile FoxP3/CD25-positiver T-Helferzellen 12 Wochen nach CsA-Ende	53
Abbildung 18:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CCR10-positiver T-Helferzellen vor Steroidbeginn bei früher und später GvHD	59
Abbildung 19:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CCR10-positiver T-Helferzellen nach Reduktion der Steroide bei früher und später GvHD	59
Abbildung 20:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CCR10-positiver T-Helferzellen vor Steroidbeginn bei früher und später GvHD der Haut	60
Abbildung 21:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CCR10-positiver T-Helferzellen am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD der Haut	60
Abbildung 22:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CCR10-positiver T-Helferzellen nach Reduktion der Steroide bei früher und später GvHD der Haut	60
Abbildung 23:	Mittelwerte und Verteilung der CD8-Relativwerte bei Take	62
Abbildung 24:	Mittelwerte und Verteilung der CD8-Relativwerte bei Zusammenfassung aller Werte nach Reduktion von CsA unter 100 ng/mL	62
Abbildung 25:	Mittelwerte und Verteilung der CD8-Relativwerte am Tag 4 nach Steroidbeginn bei später GvHD	63
Abbildung 26:	Mittelwerte und Verteilung der CD8-Relativwerte nach Reduktion der Steroide bei später GvHD	63
Abbildung 27:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile CD25-positiver T-Killerzellen nach Reduktion, Absetzen von CsA, 5 und 12 Wochen nach CsA-Ende	65
Abbildung 28:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile beta7/CD45RA-positiver T-Killerzellen bei Take	68
Abbildung 29:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile beta7/CD45RA-positiver T-Killerzellen bei Take, Reduktion und Absetzen von CsA	69
Abbildung 30:	Mittelwerte und Verteilung der Anteile beta7/CD45RA-positiver T-Killerzellen 4,8 und 12 Wochen nach Absetzen von CsA	69
Abbildung 31:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte bei Take und 12 Wochen nach CsA-Ende	72
Abbildung 32:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher GvHD	74
Abbildung 33:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte am Tag 4 nach Steroidbeginn bei später GvHD	74
Abbildung 34:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD	74
Abbildung 35:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte am Tag 4 nach Steroidbeginn bei früher und später GvHD mit schwerem Darm-/Leberbefall	75
Abbildung 36:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte vor Steroidbeginn bei früher und später GvHD Darm/Leber	75
Abbildung 37:	Mittelwerte und Verteilung der CK18F-Werte vor Steroidbeginn bei früher GvHD Darm/Leber	75
Abb. 38.1-38.6:	Mittelwerte und Verteilung der Zellpopulationen/CK18F-Werte nach Reduktion der Steroide bei früher und später GvHD	78



### Tabellen

Tabelle 1:	Organstadien der akuten GvHD nach Glucksberg	10
Tabelle 2:	Gesamt-Grad der akuten GvHD nach Glucksberg	10
Tabelle 3:	<i>IBMTR-Severity-Score</i>	10
Tabelle 4:	Patientenmerkmale	27
Tabelle 5:	Patientenmerkmale der älteren GvHD-Proben	28
Tabelle 6:	Panel der Oberflächenfärbung	30
Tabelle 7:	Panel der intrazellulären Färbung	31
Tabelle 8:	Leukozyten- und PBMNC-Werte nach Transplantation	37
Tabelle 9:	Leukozyten- und PBMNC-Werte von GvHD-Proben	39
Tabelle 10:	CD4-Werte nach Transplantation	41
Tabelle 11:	CD4-Werte von GvHD-Proben	42
Tabelle 12:	CD4/CD95-Werte nach Transplantation	43
Tabelle 13:	CD4/CD95-Werte von GvHD-Proben	45
Tabelle 14:	CD4/CD25 <sup>low</sup> -Werte nach Transplantation	46
Tabelle 15:	CD4/CD25 <sup>int.</sup> -Werte nach Transplantation	47
Tabelle 16:	CD4/CD25 <sup>high</sup> -Werte nach Transplantation	48
Tabelle 17:	CD4/CD25 <sup>low</sup> -Werte von GvHD-Proben	49
Tabelle 18:	CD4/CD25 <sup>int.</sup> -Werte von GvHD-Proben	49
Tabelle 19:	CD4/CD25 <sup>high</sup> -Werte von GvHD-Proben	50
Tabelle 20:	CD4/FoxP3-Werte nach Transplantation	52
Tabelle 21:	CD4/FoxP3/CD25-Werte nach Transplantation	53
Tabelle 22:	CD4/FoxP3-Werte von GvHD-Proben	54
Tabelle 23:	CD4/FoxP3/CD25-Werte von GvHD-Proben	55
Tabelle 24:	CD4/CCR10-Werte nach Transplantation	57
Tabelle 25:	CD4/CCR10-Werte von GvHD-Proben	58
Tabelle 26:	CD8-Werte nach Transplantation	61
Tabelle 27:	CD8-Werte von GvHD-Proben	63
Tabelle 28:	CD8/CD25-Werte nach Transplantation	64
Tabelle 29:	CD8/CD25-Werte von GvHD-Proben	66
Tabelle 30:	CD8/beta7/CD45RA-Werte nach Transplantation	67
Tabelle 31:	CD8/beta7/CD45RA-Werte von GvHD-Proben	70
Tabelle 32:	CK18F nach Transplantation	72
Tabelle 33:	CK18F von GvHD-Proben	73
Tabelle 34:	Zellpopulationen und CK18F-Spiegel bei GvHD –Pat. mit und ohne GvHD-ass. Tod	77
Tabelle 35:	Werte der einzelnen Zellpopulationen mit und ohne ATG-Prophylaxe	82
Tabelle 36:	Werte der einzelnen Zellpopulationen mit und ohne MMF-Prophylaxe	85
Tabelle 37:	absolute Zahlen innerhalb der Gruppe mit MMF in Abh. von der Entw. einer GvHD	86
Tabelle 38:	absolute Zahlen innerhalb der Gruppe ohne MMF in Abh. von der Entw. einer GvHD	86
Tabelle 39:	Absolutwerte unter Berechnung mit mikroskopisch ermittelten Leukozytenzahlen	122

### Grafiken

Grafik 1:	MHC der Klasse I mit Peptidbeladung	13
Grafik 2:	MHC der Klasse II mit Peptidbeladung	13
Grafik 3:	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	20
Grafik 4:	Die Spaltung des Zytokeratins 18 durch die Kaspasen 3, 6, 7, 9	23
Grafik 5:	Beispiel einer Auswertung von Patient 49	34

## 8. Anhang

Im Folgenden sind tabellarisch die Absolutwerte aufgeführt, die durch Verwendung der in der Zählkammer ermittelten Leukozytenzahlen entstanden sind. Bei den Werten vor dem Schrägstrich handelt es sich um den Mittelwert, dahinter findet sich der Median.

Zeitpunkt:	Patientenzahl:	Leukos H.	Standarderror:	PBMNC H.	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4absolut H.	Standarderror:
<b>Take:</b>								
Patienten gesamt	31	2695,32/2088,00	405,61	1157,71/1009	170,309	29	73,89/26,83	19,99
keine GvHD	11	3490,55/2400	942,72	1722,36/1581,00	408,3	11	139,16/59,39	44,88
spätere GvHD	20	2257,95/1954	342,04	847,15/753,50	91,71	18	34,01/16,57	9,45
Kontrollen	22	4650,64/4550	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA&lt;100ng/dl:</b>								
Patienten gesamt	12	6422,00/4613,00	1347,12	2848,18/1726,00	925,41	12	320,33/219,42	87,71
keine GvHD	1	4613/4613	/	1199/1199	/	1	105,91/105,91	/
spätere GvHD	11	6602,900/4767,50	1475,81	3013/2188	1006,71	11	341,78/269,62	94,03
Kontrollen	22	4650,64/4550	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab:</b>								
Patienten gesamt	9	3460,63/3324,00	264,33	2066,88/2055,50	399,75	9	301,15/204,32	107,87
keine GvHD	3	3025/3025	125	2881/2749	190,76	3	401,19/237,65	170,89
spätere GvHD	6	3645/3775	408,01	1578,40/1301	526,74	6	241,12/106,81	146,34
Kontrollen	22	4650/4550	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab+4Wo:</b>								
Patienten gesamt	6	3178/2621,50	597,59	1091,67/1174,50	269,87	6	105,19/110,70	33,67
keine GvHD	2	3961,50/3961,50	1051,5	1717/1717	434	2	166,16/166,16	15,79
spätere GvHD	4	2786,25/2329,00	745,02	779/746	230,05	4	74,71/49,40	43,17
Kontrollen	22	4650/4550	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab+8Wo:</b>								
Patienten gesamt	7	3292,71/3375,00	243,24	1495,57/1290,00	412,05	7	108,11/76,37	32,05
keine GvHD	2	3532,50/3532,50	157,5	2884,50/2884,50	683,5	2	173,75/173,75	10,85
spätere GvHD	5	3198,80/3137	337,22	940,00/709,00	199,4	5	81,85/49,06	39,27
Kontrollen	22	4650/4550	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab+12Wo:</b>								
Patienten gesamt	7	3273,14/3000,00	378,25	1531,86/1356,00	331,21	7	254,43/134,66	121
keine GvHD	2	2993,50/2993,50	6,5	2124/2124	768	2	543,54/543,54	406,88
spätere GvHD	5	3385/3275	538,05	1295/976	349,72	5	138,79/64,09	48,23
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA&lt;100ng/dl</b>								
<b>CsAab</b>								
<b>CsAab+4Wo</b>								
<b>CsAab+8Wo</b>								
<b>CsAab+12Wo:</b>								
Patienten gesamt	40	4188,62/3690,00	449,52	1938,64/1301,00	299,73	40	233,38/152,72	41,25
keine GvHD	10	3504,80/3262,50	234,08	2329,30/2419	265,63	10	307,64/183,27	92,16
spätere GvHD	30	4424,41/3988	595,8	1803,93/1243,00	391,95	30	207,77/106,81	45,52
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>Frühe GvHD vor IS:</b>								
keine GvHD	51	3663,57/3150	429,91	1696,22/1199	247,28	49	169,43/61,72	33,02
Frühe GvHD	22	2990,77/2194,00	577,45	1381,63/959	415,01	22	167,49/63,94	68,43
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Frühe GvHD d+4n.IS:</b>								
keine GvHD	51	3663,57/3150	429,91	1696,22/1199	247,28	49	169,43/61,72	33,02
Frühe GvHD	21	4826,19/3375	795,21	1194,33/835,00	289,09	21	153,88/61,62	53,83
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keine Darm		2/18						
Haut/keine Haut		19/1						
<b>Frühe GvHD IS&lt;20mg:</b>								
keine GvHD	51	3663,57/3150	429,91	1696,22/1199	247,28	49	169,43/61,72	33,02
Frühe GvHD	19	5248,37/4700	599,667	1529,42/1047,00	294,63	19	130,68/90,90	33,82
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Späte GvHD vorIS:</b>								
keine GvHD	27	3311,21/3194,00	176	1593,85/1301,00	192,99	27	199,29/134,66	47,13
späte GvHD	3	3238,33/4275,00	1228,94	778,00/787,00	192,6	3	134,50/100,68	70,09
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Späte GvHD d+4n.IS:</b>								
keine GvHD	27	3250,52/3150,00	171,44	1593,85/1301,00	192,99	27	199,29/134,66	47,13
späte GvHD	7	7270/7800	2310,7	3866,29/1636	1784,28	7	836,23/104,01	741,05
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Späte GvHD IS&lt;20mg:</b>								
keine GvHD	27	3250,52/3150,00	171,44	1593,85/1301,00	192,99	27	199,29/134,66	47,13
späte GvHD	9	5172,00/4063,00	563,18	1809,54/2058	304,61	9	167,04/119,50	53,62
Kontrollen	22	4650,64/4550,00	235,13	2277,27/2330	138,88	22	824,99/880,97	62,63
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								

## 8. Anhang

Zeitpunkt:	Patientenzahl:	CD4CD95abs.H.	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4CD25i.abs.H.	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4CD25i.abs.H.
<b>Take:</b>								
Patienten gesamt	25	20,02/5,57	6,53	25	39,06/18,26	13,11	25	40,06/14,14
keine GvHD	10	37,06/10,59	14,66	10	75,23/43,48	29,58	10	68,06/28,84
spätere GvHD	15	8,65/3,28	2,62	15	14,95/10,75	3,46	15	21,39/8,33
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA&lt;100ng/dl:</b>								
Patienten gesamt	12	109,08/40,30	49,11	12	187,39/100,94	56,99	12	117,97/73,89
keine GvHD	1	5,18/5,18	/	1	100,94/100,94	/	1	7,15/7,15
spätere GvHD	11	119,47/54,38	53,06	11	196,04/134,41	62,27	11	129,05/78,84
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab:</b>								
Patienten gesamt	9	173,96/41,96	132,38	9	222,57/138,88	88,63	9	62,50/33,59
keine GvHD	3	416,38/107,07	340,27	3	332,29/149,72	193,51	3	56,03/73,67
spätere GvHD	6	28,51/12,50	15,05	6	156,74/84,06	88,73	6	66,38/25,42
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab+4Wo:</b>								
Patienten gesamt	6	34,60/4,53	21,96	6	57,43/85,61	17,68	6	41,04/32,92
keine GvHD	2	67,19/67,19	65,27	2	100,81/100,81	4,72	2	56,70/56,70
spätere GvHD	4	18,30/18,30	15,16	4	35,73/33,94	17,53	4	33,19/12,41
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab+8Wo:</b>								
Patienten gesamt	7	13,16/12,15	4,13	7	51,65/46,44	14,41	7	44,11/26,84
keine GvHD	2	13,57/13,57	0,83	2	99,86/99,86	2,77	2	58,71/58,71
spätere GvHD	5	12,99/11,76	5,97	5	32,36/28,45	10,5	5	38,27/20,00
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA ab+12Wo:</b>								
Patienten gesamt	7	34,64/35,76	7,91	7	100,09/81,68	36,89	7	129,54/42,96
keine GvHD	2	39,56/39,56	28,73	2	184,41/184,41	101,31	2	316,25/316,25
spätere GvHD	5	32,67/35,76	6,74	5	66,36/41,94	28,92	5	54,85/28,97
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>CsA&lt;100ng/dl</b>								
<b>CsAab</b>								
<b>CsAab+4Wo</b>								
<b>CsAab+8Wo</b>								
<b>CsAab+12Wo:</b>								
Patienten gesamt	40	80,35/22,77	30,76	40	134,58/81,68	26,71	40	83,57/42,96
keine GvHD	10	149,50/30,23	106,15	10	186,80/104,08	62	10	103,87/57,51
spätere GvHD	30	56,50/37,40	19,98	30	116,58/58,60	28,82	30	76,58/27,05
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keineDarm								
Haut/keine Haut								
<b>Frühe GvHD vor IS:</b>								
keine GvHD	45	69,07/15,05	26,98	45	108,03/32,53	24,59	45	62,44/20,40
Frühe GvHD	22	29,20/9,26	12,27	22	93,22/25,26	47,75	22	64,87/24,97
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Frühe GvHD d+4n.IS:</b>								
keine GvHD	45	69,07/15,05	26,98	45	108,03/32,53	24,59	45	62,44/20,40
Frühe GvHD	21	19,21/11,74	4,72	21	61,21/16,30	25,1	21	82,55/38,20
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Frühe GvHD IS&lt;20mg:</b>								
keine GvHD	45	69,07/15,05	26,98	45	108,03/32,53	24,59	45	62,44/20,40
Frühe GvHD	19	34,54/10,56	10,95	19	52,94/46,02	14,01	19	62,47/36,72
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Späte GvHD vor IS:</b>								
keine GvHD	27	69,27/14,40	40,02	27	115,36/81,68	30,56	27	68,67/28,97
späte GvHD	3	21,85/24,56	10,37	3	63,19/72,28	25,31	3	60,75/22,75
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Späte GvHD d+4n.IS:</b>								
keine GvHD	27	69,27/14,40	40,02	27	115,36/81,68	30,56	27	68,67/28,97
späte GvHD	7	44,54/12,89	32,61	7	250,31/58,44	199,71	7	485,20/26,61
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								
<b>Späte GvHD IS&lt;20mg:</b>								
keine GvHD	27	69,27/14,40	40,02	27	115,36/81,68	30,56	27	68,67/28,97
späte GvHD	9	39,29/18,04	22,31	9	67,28/25,90	30,81	9	79,77/48,75
Kontrollen	22	78,64/26,65	35,72	22	441,19/425,44	37,47	22	346,46/329,56
Darm/keine Darm								
Haut/keine Haut								

## 8. Anhang

Zeitpunkt:	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4CD25h.abs.H.	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4CCR10abs.H.
<b>Take:</b>						
Patienten gesamt	11,08	25	5,92/3,40	1,79	27	5,91/1,78
keine GvHD	23,09	10	9,70/4,34	4,03	10	7,63/6,45
spätere GvHD	7,74	15	3,39/2,48	1,01	17	4,89/0,92
Kontrollen	31,64	22	38,00/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					13//4	5,97/0,92//1,40/0,63
<b>CsA&lt;100ng/dl:</b>						
Patienten gesamt	60,79	12	15,00/12,84	5,15	11	135,08/46,20
keine GvHD	/	1	0,77/0,77	/	1	0,68/0,68
spätere GvHD	66,08	11	16,42/15,48	5,47	10	14,73/8,53
Kontrollen	31,64	22	38,00/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					8//3	18,84/13,03//5,13/4,90
<b>CsA ab:</b>						
Patienten gesamt	27,13	9	15,79/5,54	9,2	9	13,82/7,67
keine GvHD	20,34	3	12,28/14,16	2,53	3	12,37/7,58
spätere GvHD	43,9	6	17,90/3,73	15,23	6	14,69/7,75
Kontrollen	31,64	22	38,00/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					4//2	7,78/7,75//25,06/25,06
<b>CsA ab+4Wo:</b>						
Patienten gesamt	16,69	6	6,70/3,98	2,75	6	10,93/8,28
keine GvHD	7,12	2	8,30/8,30	4,07	2	19,85/19,85
spätere GvHD	25,03	4	5,90/3,01	3,94	4	6,47/4,84
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					3//1	8,58/5,8//0,12/0,12
<b>CsA ab+8Wo:</b>						
Patienten gesamt	16,67	7	12,16/8,50	4,92	7	6,64/6,99
keine GvHD	7,56	2	14,41/14,41	5,91	2	9,72/9,72
spätere GvHD	23,42	5	11,26/7,02	6,83	5	5,41/2,89
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					3//2	8,02/9,13//1,50/1,50
<b>CsA ab+12Wo:</b>						
Patienten gesamt	78,84	7	26,54/11,05	11,3	7	16,30/8,64
keine GvHD	273,29	2	48,41/48,41	39,78	2	32,38/32,38
spätere GvHD	26,54	5	17,79/11,05	6,57	5	9,87/6,64
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					4//1	10,68/8,07//6,64/6,64
<b>CsA&lt;100ng/dl</b>						
<b>CsAab</b>						
<b>CsAab+4Wo</b>						
<b>CsAab+8Wo</b>						
<b>CsAab+12Wo:</b>						
Patienten gesamt	22,97	40	15,45/8,63	3,25	40	12,43/7,44
keine GvHD	54,47	10	17,99/10,50	8	10	16,17/14,66
spätere GvHD	25,05	30	14,57/7,73	3,48	30	11,14/6,64
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keineDarm						
Haut/keine Haut					21//9	12,39/7,95//8,36/2,89
<b>Zeitpunkt:</b>	<b>Standarderror:</b>	<b>Patientenzahl:</b>	<b>CD4CD25h.abs.H.</b>	<b>Standarderror:</b>	<b>Patientenzahl:</b>	<b>CD4CCR10abs.H.</b>
<b>Frühe GvHD vor IS:</b>						
keine GvHD	16,97	45	9,84/3,80	2,31	47	8,96/4,62
Frühe GvHD	20,44	22	11,53/3,69	4,23	22	42,00/2,41
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keine Darm						
Haut/keine Haut					19//3	46,07/2,68//1,32/1,32
<b>Frühe GvHD d+4n.IS:</b>						
keine GvHD	16,97	45	9,84/3,80	2,31	47	8,96/4,62
Frühe GvHD	26,83	21	10,13/4,11	3,49	20	7,15/2,21
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keine Darm						
Haut/keine Haut					19//1	7,41/2,35//
<b>Frühe GvHD IS&lt;20mg:</b>						
keine GvHD	16,97	45	9,84/3,80	2,31	47	8,96/4,62
Frühe GvHD	21,53	19	15,32/3,35	6,15	19	12,81/6,93
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keine Darm						
Haut/keine Haut					18//1	12,81/6,93//
<b>Späte GvHD vorIS:</b>						
keine GvHD	22,51	27	15,55/8,50	4,26	27	11,88/7,44
späte GvHD	42,11	3	11,06/5,82	6,46	3	1,54/2,08
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keine Darm						
Haut/keine Haut					1//2	2,09/2,09//1,27/1,27
<b>Späte GvHD d+4n.IS:</b>						
keine GvHD	22,51	27	15,55/8,50	4,26	27	11,88/7,44
späte GvHD	449,1	7	109,57/6,27	101,47	7	74,95/2,22
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keine Darm						
Haut/keine Haut					3//4	120,68/0,94//3,96/2,22
<b>Späte GvHD IS&lt;20mg:</b>						
keine GvHD	22,52	27	15,55/8,50	4,26	27	11,88/7,44
späte GvHD	25,72	9	37,64/9,01	28,1	9	28,12/5,29
Kontrollen	31,64	22	38,01/33,47	4,87	22	47,04/35,83
Darm/keine Darm						
Haut/keine Haut					4//5	59,62/14,66//2,93/1,67



## 9. Anhang

Zeitpunkt:	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4FoxCD25abs.H.	Standarderror:	Patientenzahl:	CD4Foxabs.H.	Standarderror:
<b>Take:</b>							
Patienten gesamt	2,24	26	2,89/1,38	0,71	26	4,69/2,55	0,99
keine GvHD	2,5	10	4,37/1,96	1,53	10	6,45/3,71	2,02
spätere GvHD	3,28	16	1,96/0,52	0,58	16	3,58/1,19	0,94
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	4,28//0,90						
<b>CsA&lt;100ng/dl:</b>							
Patienten gesamt	64,77	12	6,89/3,35	3,12	12	11,54/6,05	4,29
keine GvHD	/	1	0,43/0,43	/	1	0,22/0,22	/
spätere GvHD	5,99	11	7,54/3,46	3,38	11	12,67/7,39	4,58
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	8,13//3,01						
<b>CsA ab:</b>							
Patienten gesamt	5,67	9	5,36/3,60	2	9	7,77/7,15	2,08
keine GvHD	6,85	3	4,23/4,28	1,37	3	9,06/8,14	1,99
spätere GvHD	8,69	6	6,04/2,92	3,22	6	6,99/4,27	3,25
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	0,21//23,99						
<b>CsA ab+4Wo:</b>							
Patienten gesamt	4,23	5	4,21/4,10	1,59	6	5,76/4,45	2,26
keine GvHD	8,9	2	4,77/4,77	4,43	2	10,10/10,10	5,85
spätere GvHD	3,4	3	3,84/4,10	1,33	4	3,60/3,19	1,65
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	3,77//						
<b>CsA ab+8Wo:</b>							
Patienten gesamt	2,23	7	4,82/3,64	2,07	7	5,60/4,96	2,13
keine GvHD	2,73	2	3,87/3,87	0,23	2	5,68/5,68	0,72
spätere GvHD	2,89	5	5,21/2,88	2,97	5	6,13/6,13	3,08
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	4,33//1,40						
<b>CsA ab+12Wo:</b>							
Patienten gesamt	7,54	7	8,09/5,04	2,84	7	10,73/7,81	3,29
keine GvHD	26,38	2	13,27/13,27	9,62	2	16,09/16,09	9,63
spätere GvHD	3,7	5	6,02/5,04	1,99	5	8,59/7,81	3,06
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	4,66//						
<b>CsA&lt;100ng/dl</b>							
<b>CsAab</b>							
<b>CsAab+4Wo</b>							
<b>CsAab+8Wo</b>							
<b>CsAab+12Wo:</b>							
Patienten gesamt	2,43	39	6,06/3,88	1,17	40	8,74/6,05	1,49
keine GvHD	5,54	10	5,69/3,88	2,09	10	9,11/6,43	2,3
spätere GvHD	2,66	29	6,19/3,84	1,43	30	8,61/5,21	1,86
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keineDarm							
Haut/keine Haut	3,12//5,22						
<b>Zeitpunkt:</b>	<b>Standarderror:</b>	<b>Patientenzahl:</b>	<b>CD4FoxCD25abs.H.</b>	<b>Standarderror:</b>	<b>Patientenzahl:</b>	<b>CD4Foxabs.H.</b>	<b>Standarderror:</b>
<b>Frühe GvHD vor IS:</b>							
keine GvHD	2,09	46	4,25/1,96	0,92	46	6,83/4,44	1,26
Frühe GvHD	35,7	22	4,30/1,29	1,4	22	7,62/2,79	2,57
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keine Darm							
Haut/keine Haut	39,25//0,97						
<b>Frühe GvHD d+4n.IS:</b>							
keine GvHD	2,09	46	4,25/1,96	0,92	46	6,83/4,44	1,26
Frühe GvHD	2,34	21	4,70/1,24	1,89	21	7,26/3,53	2,13
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keine Darm							
Haut/keine Haut	2,45//						
<b>Frühe GvHD IS&lt;20mg:</b>							
keine GvHD	2,09	46	4,25/1,96	0,92	46	6,83/4,44	1,26
Frühe GvHD	3,94	19	2,94/3,06	0,6	18	4,62/4,47	0,87
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keine Darm							
Haut/keine Haut	4,16//						
<b>Späte GvHD vorIS:</b>							
keine GvHD	2,74	23	6,00/4,28	1,17	27	7,75/6,16	1,27
späte GvHD	0,54	3	5,55/6,60	2,57	3	6,65/7,22	3,19
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keine Darm							
Haut/keine Haut	//0,81						
<b>Späte GvHD d+4n.IS:</b>							
keine GvHD	2,74	26	6,00/4,28	1,17	27	7,75/6,16	1,27
späte GvHD	69,31	7	61,84/1,27	59,77	7	91,40/5,23	87,54
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keine Darm							
Haut/keine Haut	119,94//2,56						
<b>Späte GvHD IS&lt;20mg:</b>							
keine GvHD	2,74	26	6,00/4,28	1,17	27	7,75/6,16	1,27
späte GvHD	22,3	9	5,16/3,79	2,23	9	8,99/4,13	5,22
Kontrollen	5,48	22	26,10/22,80	2,42	22	31,82/26,79	3,41
Darm/keine Darm							
Haut/keine Haut	48,86//1,19						

## 8. Anhang

Zeitpunkt:	Patientenzahl:	CD8absolut H.	Standarderror:	Patientenzahl:	CD8CD25abs.H.	Standarderror:	Patientenzahl:
<b>Take:</b>							
Patienten gesamt	31	144,08/33,93	51,02	31	4,75/2,48	0,97	31
keine GvHD	11	310,22/120,89	121,23	11	7,31/6,53	2	11
spätere GvHD	20	52,71/15,19	29,64	20	3,35/1,65	0	20
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							5//15
Haut/keine Haut							
<b>CsA&lt;100ng/dl:</b>							
Patienten gesamt	12	4237,69/446,34	3486,6	12	10,86/10,01	2,87	11
keine GvHD	1	655,52/655,52	/	1	3,58/3,58	/	1
spätere GvHD	11	4595,90/425,82	3834,19	11	11,59/10,41	3,07	10
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							4//7
Haut/keine Haut							
<b>CsA ab:</b>							
Patienten gesamt	9	749,81/560,52	212,49	9	12,38/10,98	2,77	9
keine GvHD	3	975,07/944,39	296,63	3	20,41/17,71	3,26	3
spätere GvHD	6	614,65/513,40	296,4	6	7,57/7,53	1,68	6
Kontrollen	22	439,38/372,36	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							0//6
Haut/keine Haut							
<b>CsA ab+4Wo:</b>							
Patienten gesamt	6	354,03/372,33	119,8	6	12,34/11,60	4,31	6
keine GvHD	2	648,83/648,83	127,72	2	22,12/22,12	6,28	2
spätere GvHD	4	206,64/160,08	106,93	4	7,45/5,29	4	4
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							2//2
Haut/keine Haut							
<b>CsA ab+8Wo:</b>							
Patienten gesamt	7	614,47/519,57	228,03	7	11,78/9,35	3,9	7
keine GvHD	2	1439,33/1439,33	51,86	2	21,78/21,78	3,9	2
spätere GvHD	5	284,53/284,53	116,93	5	7,79/5,41	4,05	5
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							1//4
Haut/keine Haut							
<b>CsA ab+12Wo:</b>							
Patienten gesamt	7	520,13/587,52	93,83	7	21,74/11,94	9,75	7
keine GvHD	2	707,35/707,35	119,83	2	25,64/25,64	11,08	2
spätere GvHD	5	445,24/304,69	110,21	5	20,17/8,9	13,61	5
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							0//5
Haut/keine Haut							
<b>CsA&lt;100ng/dl</b>							
<b>CsAab</b>							
<b>CsAab+4Wo</b>							
<b>CsAab+8Wo</b>							
<b>CsAab+12Wo:</b>							
Patienten gesamt	40	1607,16/513,40	988,91	40	13,52/10,04	2,19	40
keine GvHD	10	917,18/801,87	126,95	10	20,39/17,80	2,92	10
spätere GvHD	30	1845,09/304,69	1332,36	30	11,15/7,53	2,65	30
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keineDarm							6//24
Haut/keine Haut							
<b>Zeitpunkt:</b>	<b>Patientenzahl:</b>	<b>CD8absolut H.</b>	<b>Standarderror:</b>	<b>Patientenzahl:</b>	<b>CD8CD25abs.H.</b>	<b>Standarderror:</b>	<b>Patientenzahl:</b>
<b>Frühe GvHD vor IS:</b>							
keine GvHD	51	1155,80/113,37	761,88	51	7,58/4,34	1,07	51
Frühe GvHD	21	201,95/40,05	75,83	18	17,54/10,64	9,2	21
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keine Darm							3//18
Haut/keine Haut							
<b>Frühe GvHD d+4n.IS:</b>							
keine GvHD	51	1155,80/113,37	761,88	51	7,58/4,34	1,07	51
Frühe GvHD	20	178,07/52,65	62,22	19	10,15/2,00	3,49	20
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keine Darm							2//18
Haut/keine Haut							
<b>Frühe GvHD IS&lt;20mg:</b>							
keine GvHD	51	1155,80/113,37	761,88	51	7,58/4,34	1,07	51
Frühe GvHD	18	537,63/136,89	220,9	18	17,57/4,96	8,34	18
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keine Darm							1//17
Haut/keine Haut							
<b>Späte GvHD vorIS:</b>							
keine GvHD	27	6050,31/519,57	5500	27	14,41/10,04	2,94	27
späte GvHD	3	141,97/142,78	22,18	3	4,82/3,09	2,6	3
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keine Darm							2//1
Haut/keine Haut							
<b>Späte GvHD d+4n.IS:</b>							
keine GvHD	27	6050,31/519,57	5500	27	14,41/10,04	2,94	27
späte GvHD	7	379,48/142,34	202,22	6	37,83/1,55	31,26	7
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keine Darm							4//3
Haut/keine Haut							
<b>Späte GvHD IS&lt;20mg:</b>							
keine GvHD	27	6050,31/519,57	5500,34	27	14,41/10,04	2,94	27
späte GvHD	9	471,27/297,76	212,62	9	16,68/7,15	7,59	9
Kontrollen	22	439,38/372,60	52,76	22	53,37/26,17	17,11	22
Darm/keine Darm							5//4
Haut/keine Haut							

## 8. Anhang

Zeitpunkt:	CD8bet.7CD45abs.H.	Standarderror:
<b>Take:</b>		
Patienten gesamt	16,52/3,20	4,75
keine GvHD	32,80/23,10	11,33
spätere GvHD	7,57/207	2,49
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	16,47/8,94//4,60/1,27	7,72//1,74
Haut/keine Haut		
<b>CsA&lt;100ng/dl:</b>		
Patienten gesamt	135,08/46,20	64,77
keine GvHD	98,33/98,33	/
spätere GvHD	138,75/42,82	71,49
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	14,39/20,62//192,05/102,74	7,03//96,78
Haut/keine Haut		
<b>CsA ab:</b>		
Patienten gesamt	105,36/57,78	52
keine GvHD	105,85/116,16	13,44
spätere GvHD	105,06/29,60	86,71
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	//105,06/29,60	//86,71
Haut/keine Haut		
<b>CsA ab+4Wo:</b>		
Patienten gesamt	62,48/65,98	21,04
keine GvHD	117,77/117,77	3,13
spätere GvHD	34,83/31,22	18,47
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	38,44/38,44//31,22/31,22	37,48//24,82
Haut/keine Haut		
<b>CsA ab+8Wo:</b>		
Patienten gesamt	67,42/41,82	27,56
keine GvHD	140,27/140,27	52,59
spätere GvHD	38,28/10,28	23,99
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	0,78/0,78//47,65/26,05	//28,50
Haut/keine Haut		
<b>CsA ab+12Wo:</b>		
Patienten gesamt	79,40/36,75	39,51
keine GvHD	80,10/80,10	4,9
spätere GvHD	79,13/36,14	57,24
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	//79,13/36,14	//57,24
Haut/keine Haut		
<b>CsA&lt;100ng/dl</b>		
<b>CsAab</b>		
<b>CsAab+4Wo</b>		
<b>CsAab+8Wo</b>		
<b>CsAab+12Wo:</b>		
Patienten gesamt	95,68/46,20	22,58
keine GvHD	109,21/106,48	10,86
spätere GvHD	91,00/36,14	30,24
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keineDarm	20,13/10,79//109,49/36,75	11,90/37,20
Haut/keine Haut		
<b>Zeitpunkt:</b>	<b>CD8bet.7CD45abs.H.</b>	<b>Standarderror:</b>
<b>Frühe GvHD vor IS:</b>		
keine GvHD	58,57/20,62	17,47
Frühe GvHD	44,02/6,65	14,87
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keine Darm	92,13/32,36//36,00/6,28	75,95//12,81
Haut/keine Haut		
<b>Frühe GvHD d+4n.IS:</b>		
keine GvHD	58,57/20,62	17,78
Frühe GvHD	37,52/8,16	14,6
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keine Darm	8,35/8,35//40,76/8,16	7,68//16,07
Haut/keine Haut		
<b>Frühe GvHD IS&lt;20mg:</b>		
keine GvHD	58,57/20,62	17,47
Frühe GvHD	74,54/34,48	24,06
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keine Darm	//67,87/27,95	//24,52
Haut/keine Haut		
<b>Späte GvHD vorIS:</b>		
keine GvHD	80,35/41,82	19,62
späte GvHD	10,87/12,92	3,93
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keine Darm	9,84/9,84//12,92/12,92	6,58//
Haut/keine Haut		
<b>Späte GvHD d+4n.IS:</b>		
keine GvHD	80,35/41,82	19,62
späte GvHD	27,9/16,00	14,91
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keine Darm	31,05/4,27//15,19/16,00	27,93//5,29
Haut/keine Haut		
<b>Späte GvHD IS&lt;20mg:</b>		
keine GvHD	80,35/41,82	19,62
späte GvHD	60,95/28,84	24,22
Kontrollen	186,96/160,61	20,28
Darm/keine Darm	20,63/14,81//111,35/110,95	11,03//42,34
Haut/keine Haut		

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. med. Ernst Holler**, meinem Doktorvater, für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, für die vertrauensvolle Bereitstellung der finanziellen Mittel und Geräte und für die gute Betreuung während der Durchführung.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an **Frau PD Dr. rer.nat. Petra Hoffmann**. Sie gab mir Hilfestellungen bei der Kalibrierung des Durchflusszytometers sowie beim Setzen der Gates zur optimalen Auswertung der Daten und opferte dabei viel Zeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Frau Constanze Winter**, die mir beim Sammeln der Serumproben half und mir zudem alte Proben von Patienten mit Darm- oder Leber-GvHD für meine Arbeit zur Verfügung stellte. Sie und auch **Frau Heike Bremm** nahmen mich herzlich im Team auf und leisteten immer wieder auch psychologische Hilfe und Motivationsarbeit.

**Frau Jasmin Stahl** und **Herrn Rüdiger Eder** danke ich ganz herzlich für die Einweisung in den Umgang mit dem Durchflusszytometer und ihre stete kompetente Hilfe bei Problemen und Fragen.

Natürlich gilt mein Dank auch dem **gesamten Laborteam** der Hämatologie/Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg sowie **allen Patienten**, die in die Blutentnahmen einwilligten und mir damit diese Arbeit erst ermöglichten.

Meiner **Omi** danke ich für ihre Unterstützung, durch die mir vieles im Studium ermöglicht wurde, und für ihre intensive Anteilnahme an meinem Leben.



## **10. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name:	Blehschmidt
Vorname:	Verena Eva-Maria
Geburtsdatum:	15.06.1984
Geburtsort:	München
Eltern:	Dr. Dietmar Blehschmidt Doris Blehschmidt, geb. Philippi
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### **Schulbildung**

09/1991-07/1995:	Besuch der Grundschule Schillerschule in Nördlingen
09/1995-07/2004:	Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums in Nördlingen

### **Studium**

10/2004-11/2010:	Studium der Humanmedizin in Regensburg
08/2006:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2010:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Famulaturen und Praktisches Jahr**

#### *Famulaturen*

02-03/2007:	Innere Medizin (Donau-Ries-Klinikum Donauwörth)
03-04/2007:	Gynäkologie u. Geburtshilfe (Donau-Ries-Klinikum Donauwörth)
08-09/2007:	Allgemeinmedizin (Praxis Wallerstein)
09-10/2007:	Neurologie (Bezirksklinikum Regensburg)
02-04/2009:	Pädiatrie (Royal Victoria Teaching Hospital Banjul/Gambia)

#### *PJ-Tertiale*

08-12/2009:	Innere Medizin (Barmherzige Brüder Regensburg)
12/2009-02/2010:	Viszeralchirurgie (Klinikum Passau)
02-04/2010:	Unfallchirurgie (Tulane University Hospital New Orleans)
04-07/2010:	Gynäkologie u. Geburtshilfe (St. Hedwigs-Klinikum Regensburg)

### **Beruflicher Werdegang**

02/2011-07/2012	Assistenzärztin der Inneren Medizin I (Kardiologie/Pulmologie) am Caritas-Krankenhaus in Bad Mergentheim
seit 07/2012	Assistenzärztin der Inneren Medizin III (Gastroenterologie/Infektiol.) am Klinikum Augsburg

