

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ANALYSE DER B-ZELL-REKONSTITUTION IM KNOCHENMARK UND PERIPHEREN BLUT NACH
ALLOGENER BLUTSTAMMZELLTRANSPLANTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Weigert

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ANALYSE DER B-ZELL-REKONSTITUTION IM KNOCHENMARK UND PERIPHEREN BLUT NACH
ALLOGENER BLUTSTAMMZELLTRANSPLANTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Weigert

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniel Wolff

2. Berichterstatter: PD Dr. Klemens Angstwurm

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das adaptive Immunsystem	3
1.2 Lymphopoese	4
1.2.1 B-Zellen.....	8
1.2.2 Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit verwendete Definitionen der B-Zellen und ihrer Vorläuferzellen	14
1.2.3 T-Zellen	15
1.2.4 Regulatorische T-Zellen	16
1.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation	16
1.4 GvHD.....	17
1.4.1 Akute GvHD	18
1.4.2 Chronische GvHD.....	22
1.5 Immunrestitution	24
1.6 Zielsetzung.....	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.2 Antikörper für die FACS-Analyse	28
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4 Geräte.....	29
2.1.5 Puffer und Lösungen	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Durchflusszytometrische Messungen	30
2.2.2 Statistik.....	32
2.2.3 Gatingstrategie.....	33
2.2.4 Darstellung im Ergebnisteil.....	38
2.2.5 Patienteneinteilung.....	38
2.2.6 Patienteneigenschaften	38
3 Ergebnisse	42
3.1 Auswertungen an Tag 28.....	42
3.1.1 Einfluss der aGvHD an Tag 28.....	42
3.1.2 Einfluss der cGvHD an Tag 28.....	48
3.2 Auswertungen an Tag 90.....	54
3.2.1 Einfluss der aGvHD an Tag 90.....	54
3.2.2 Einfluss der cGvHD an Tag 90.....	60
3.3 Auswertungen an Tag 180.....	68
3.3.1 Einfluss der aGvHD an Tag 180.....	68
3.3.2 Einfluss der cGvHD an Tag 180.....	74
3.4 Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse	82

3.4.1	Vorläuferzellen im Knochenmark.....	82
3.4.2	B-Zellen im peripheren Blut	84
3.4.3	T-Zellen im Knochenmark.....	87
4	Diskussion.....	91
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	91
4.2	Diskussion der Methoden	91
4.3	Diskussion der Ergebnisse	92
4.3.1	Diskussion der Ergebnisse an Tag 28: Einfluss aGvHD	92
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse an Tag 28: Einfluss cGvHD.....	94
4.3.3	Diskussion der Ergebnisse an Tag 90: Einfluss aGvHD	95
4.3.4	Diskussion der Ergebnisse an Tag 90: Einfluss cGvHD.....	97
4.3.5	Diskussion der Ergebnisse an Tag 180: Einfluss aGvHD	100
4.3.6	Diskussion der Ergebnisse an Tag 180: Einfluss cGvHD.....	101
4.3.7	Diskussion der Ergebnisse tagesunabhängig: Einfluss aGvHD	103
4.3.8	Diskussion der Ergebnisse tagesunabhängig: Einfluss cGvHD.....	105
5	Zusammenfassung.....	108
6	Literatur	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Hämatopoese nach Müller et al. [2].....	2
Abbildung 2: Entwicklung der CLP und GMP nach Blom et al.	7
Abbildung 3: Die Pathogenese der aGvHD [48]	20
Abbildung 4: Verlauf der Rekonstitution	24
Abbildung 5: Gatingstrategie B-Zellen im peripheren Blut.....	34
Abbildung 6: Auswertungsstrategie der HSC, MPP und CLP.....	35
Abbildung 7: Auswertungsstrategie der immaturen und transitionellen B-Zellen, der Pro B-Zellen, sowie der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen.	36
Abbildung 8: Auswertestrategie der T-Zellen in der intrazellulären Färbung im Knochenmark	38
Abbildung 9: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	43
Abbildung 10: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	45
Abbildung 11: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	46
Abbildung 12: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	48
Abbildung 13: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	50
Abbildung 14: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	52
Abbildung 15: Einfluss der aGvHD an Tag 90 im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	55
Abbildung 16: Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	57
Abbildung 17: Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	59
Abbildung 18: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im peripheren Blut auf die CD19+ und CD19+CD27- B-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	61
Abbildung 19: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im peripheren Blut auf die CD19+CD27+ B-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	61
Abbildung 20: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	63
Abbildung 21: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	66
Abbildung 22: Einfluss der aGvHD an Tag 180 auf die CD19+ und CD19+CD27- B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	68
Abbildung 23: Einfluss der aGvHD an Tag 180 auf die CD19+CD27+ B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM.....	69

Abbildung 24: Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	71
Abbildung 25: Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	73
Abbildung 26: Einfluss der cGvHD an Tag 180 auf die CD19+ und CD19+CD27- B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	75
Abbildung 27: Einfluss der cGvHD an Tag 180 auf die CD19+CD27+ B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	75
Abbildung 28: Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM	77
Abbildung 29: Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	79
Abbildung 30: Vorläuferzellen im Knochenmark; ME in Prozent bezogen auf die LM	83
Abbildung 31: B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM	86
Abbildung 32: T-Zellen im Knochenmark; ME in Prozent bezogen auf die CD3+CD4+ Zellen bzw. einmalig auf die die CD3+Zellen (%CD3) und einmalig auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die Antikörperklassifikation der HSC.....	4
Tabelle 2:	Die Antikörperklassifikation der MPP.....	5
Tabelle 3:	Die Antikörperklassifikation der CLP	7
Tabelle 4:	Die Antikörperklassifikation der CLP Teil 2.....	8
Tabelle 5:	Die Antikörperklassifikation der Frühen B-Zelle, der Pro-B-Zelle, der Pre-B-I-Zelle und Pre-B-II-Zelle	11
Tabelle 6:	Die Antikörperklassifikation der immaturren B-Zelle	13
Tabelle 7:	Die Antikörperklassifikation der transitionellen B-Zellen.....	13
Tabelle 8:	Zusammenfassung in der Arbeit verwendete Definitionen im Knochenmark	14
Tabelle 9:	Zusammenfassung in der Arbeit verwendete Definitionen im peripheren Blut	14
Tabelle 10:	Chemikalien und Reagenzien.....	28
Tabelle 11:	Antikörper für die FACS-Analyse	29
Tabelle 12:	Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 13:	Geräte	29
Tabelle 14:	Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 15:	Populationen im peripheren Blut	33
Tabelle 16:	Populationen im oberflächlich gefärbten Knochenmark.....	34
Tabelle 17:	Populationen der intrazellulären Färbung.....	37
Tabelle 18:	klinische Daten der Patienten bei Einteilung nach Kriterium aGvHD.....	40
Tabelle 19:	klinische Daten der Patienten bei Einteilung nach Kriterium cGvHD	41
Tabelle 20:	Einfluss der aGvHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	44
Tabelle 21:	Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	45
Tabelle 22:	Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	47
Tabelle 23:	Einfluss der cGvHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	49
Tabelle 24:	Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	51
Tabelle 25:	Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	53
Tabelle 26:	Einfluss der aGvHD an Tag 90 im peripheren Blut, ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	56
Tabelle 27:	Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen, ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	58
Tabelle 28:	Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	60
Tabelle 29:	Einfluss der cGvHD an Tag 90 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	62

Tabelle 30:	Einfluss der cGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	64
Tabelle 31:	Einfluss der cGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	67
Tabelle 32:	Einfluss der aGvHD an Tag 180 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	69
Tabelle 33:	Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	72
Tabelle 34:	Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	74
Tabelle 35:	Einfluss der cGvHD an Tag 180 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	76
Tabelle 36:	Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM	78
Tabelle 37:	Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3).....	80

Abkürzungsverzeichnis

%	Bezieht sich auf nachfolgende Population
aGvHD	Akute Graft-versus-Host Disease
APC	Antigenpräsentierende Zelle/n
ATG	Antithymozytenglobulin
BAFF	B cell activating factor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BOS	Bronchiolitis Obliterans Syndrom
CD	Cluster of differentiation
cGvHD	Chronische Graft-versus-Host Disease
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CLP	Common lymphoid progenitor, gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle
DC	Dendritische Zelle
EBV	Epstein–Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukämie-Effekt
HCl	Salzsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen-System, Histokompatibilitätsantigen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle/n
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ig	Immunglobulin/e
IL-1	Interleukin-1
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LM	Lymphozyten und Monozyten
MALT	Mukosa-assoziierte lymphatische Organe
ME	Median/e

MHC	Major histocompatibility complex, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPP	Multipotente Vorläuferzelle
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin, Ziel des Rapamycins im Säugetier
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert/e
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PTLD	Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder, Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
SSC	Side scatter, Seitwärtsstreulicht
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
vs	Versus

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Abwehrmechanismen, das dazu beiträgt den Körper vor potenziellen Schäden durch krankheitserregende Stoffe zu schützen. Einteilen lässt sich das Immunsystem in das angeborene und in das adaptive Immunsystem. [1]. Das angeborene Immunsystem erkennt körperfremde Strukturen und reagiert sofort, wenn auch unspezifisch auf Krankheitserreger [1]. Kommt der Körper in Kontakt mit einem Krankheitserreger braucht das erworbene Immunsystem Tage, um reagieren zu können, macht das dafür zielgerichteter und folglich wirksamer [1].

Die zellulären Bestandteile des Immunsystems kommen ursprünglich aus dem Knochenmark. Nach dem Austritt aus dem Knochenmark findet man sie im Gewebe, Blut oder lymphatischen System. Die Zellen des Immunsystems haben zusammen mit allen zellulären Bestandteilen des Blutes gemeinsame Vorläuferzellen im Knochenmark. Die allen Zellen gemeinsame, erste Vorläuferzelle ist die sogenannte hämatopoetische Stammzelle (HSC). Aus ihr entwickeln sich die anderen Zellen im Rahmen der sogenannten Hämatopoese [1].

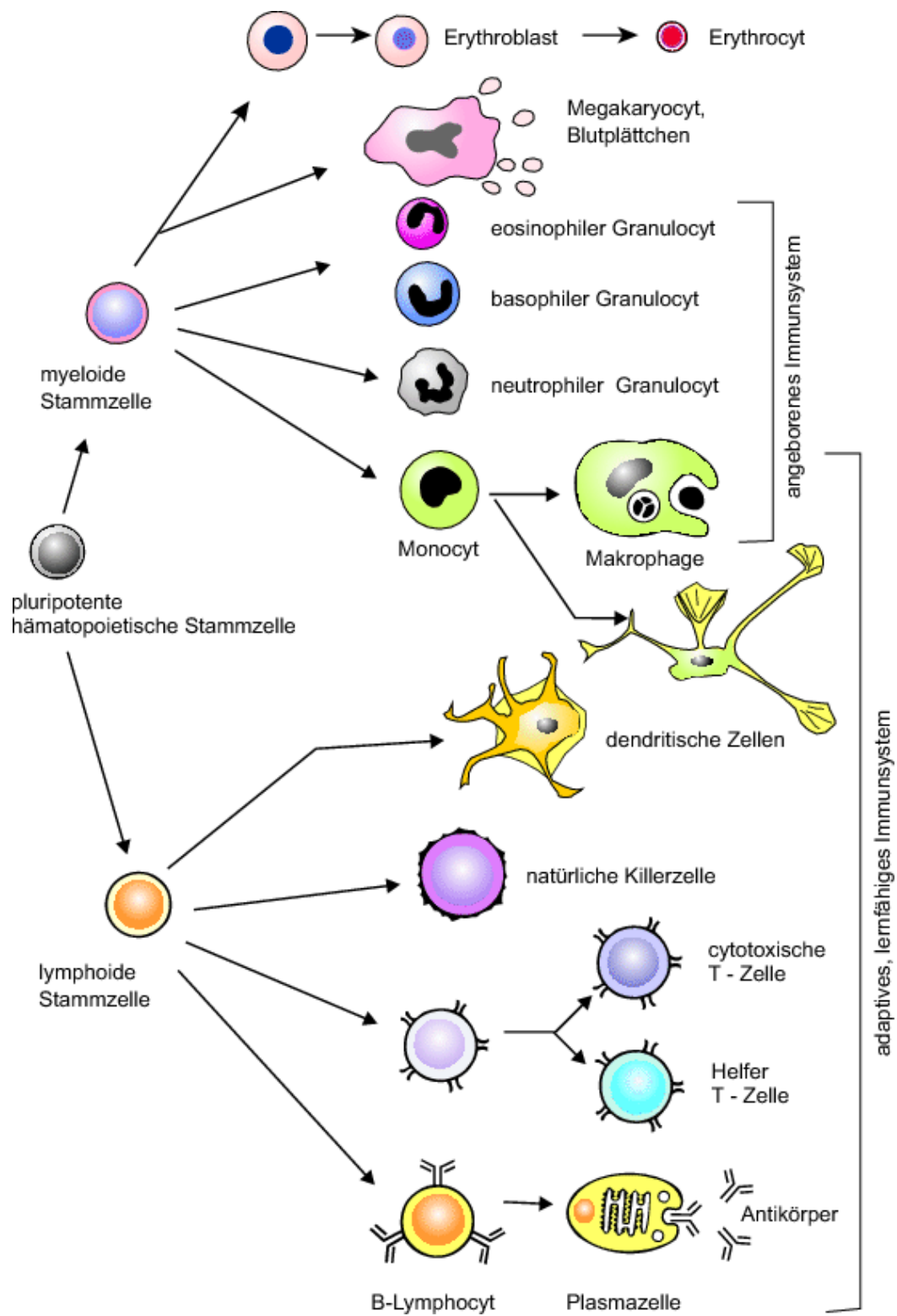


Abbildung 1: Die Hämatopoese nach Müller et al. [2]

1.1.1 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive oder auch erworbene Immunsystem zeichnet sich durch eine enorme Variabilität an Rezeptoren aus. Erreicht wird das durch eine Verschlüsselung der Rezeptoren in Gensegmenten und die damit verbundene somatische Rekombination [3]. Über diesen einzigartigen Rekombinationsprozess, der Schneiden, Spleißen und Verändern der variablen Genregionen beinhaltet, entsteht diese Rezeptoren-Vielfalt [4]. Das adaptive Immunsystem erreicht eine genaue „Passform“ der Rezeptoren und gebildeten Proteine. Darüber hinaus hat das erworbene Immunsystem im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem eine Gedächtnis-Funktion. Das adaptive Immunsystem ist daneben verantwortlich für weniger wünschenswerte Reaktionen des Körpers, wie Autoimmunerkrankungen, Allergien oder Abstoßungsreaktionen, bei denen sich die Immunantwort gegen nicht-pathogene Antigene richtet [3]. Wichtige Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems sind die B- und die T-Lymphozyten. Werden einem Lymphozyten zusätzlich costimulierende Faktoren präsentiert wird er aktiviert und kann proliferieren und anschließend Effektor-Funktionen wahrnehmen [1].

B-Lymphozyten sind verantwortlich für die sogenannte humoral vermittelte Immunantwort. Sie differenzieren nach Aktivierung u.a. zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen. Die Immunglobuline (Ig), auch Antikörper genannt, werden bei dem spezifischen Antigen-Kontakt sekretiert. Die Zellen besitzen die Fähigkeit über den Antikörper an das Antigen zu binden und wirken damit über mehrere Mechanismen dem Krankheitserreger entgegen. Zum einen neutralisieren sie ihn, indem sie dessen Bindungsstellen oder aktiven Zentren blockieren und das Komplement-System aktivieren. Zum anderen wird der Erreger durch ihre Bindung markiert und ermöglicht damit Makrophagen und Monozyten den Erreger zu erkennen und zu eliminieren [5]. Darüber hinaus gehören aktivierte B-Lymphozyten zu den Antigenpräsentierenden Zellen (APC), weil sie entgegen den ruhenden B-Zellen CD80/86 (CD cluster of differentiation) als costimulierende Faktoren produzieren können [5]. Die B-Lymphozyten besitzen im reifen Zustand einen B-Zell-Rezeptor (BCR). Dieser Rezeptor besteht aus einer Antigen-bindenden Untereinheit, dem membrangebundenen Ig und einer Signalgebenden Untereinheit. Ein Immunglobulin besteht aus 2 schweren und 2 leichten Ketten und kann neben der gebundenen Form auch in löslicher Form im Körper existieren. Das Ig setzt sich aus einer konstanten Region und einer variablen Region (die auch das Antigen bindet) zusammen. Die Aminosäuren-Reihenfolge der konstanten Region teilt die BCR in 5 Klassen:

IgG, IgA, IgM, IgD und IgE ein. Jede Klasse hat dabei unterschiedliche Funktionen und ein Klassenwechsel ist im Laufe der B-Zell-Reifung in eine Richtung möglich [5, 6].

Die T-Lymphozyten sind verantwortlich für die zellvermittelte Immunantwort. Sie besitzen einen Komplex aus dem CD3-Antigen und einem CD4 oder einem CD8-Antigen. Nur wenn ein Antigen auf einem MHC-Komplex (MHC major histocompatibility complex, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex) präsentiert wird, ist die T-Zelle in der Lage das Antigen zu erkennen. Dabei benötigen CD4+T-Zellen einen MHC-II und die CD8+T-Zellen einen MHC-I-Komplex [7]. CD4+T-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt und aktivieren u.a. auch andere Zellen, vor allem B-Zellen. CD8+T-Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen genannt und eliminieren intrazelluläre Erreger, indem sie zum einen Makrophagen aktivieren und zum anderen virus-infizierte Zellen attackieren [1, 4]. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt meist über die Kombination aus einem Antigen und einer aktivierten DC (dendritische Zelle) als Costimulus [1].

1.2 Lymphopoese

Die allen Zellen gemeinsame Vorläuferzelle, die HSC ist pluripotent, das heißt sie hat noch die Fähigkeit sich in die verschiedenen Zelllinien zu differenzieren [8]. Die HSC kann durch folgende Oberflächenmarker charakterisiert werden:

Quelle	Ichii et al. [9]	Payne et Crooks [10]	Payne et Crooks [11]	Doulatov et al. [12]	Chao et al. [13]	Pang et al. [14]
HSC	Lin- CD34+ CD38- CD45RA- CD90+ CD49f+ Flt3+	CD34+ CD38-	CD34+ CD38- c-kit ^{high}	Lin- CD34+ CD38- CD45RA- CD90+ CD49f+	Lin- CD34+ CD38- CD45RA- CD90+	Lin- CD34+ CD38- CD45RA- CD90+

Tabelle 1: Die Antikörperklassifikation der HSC

Der Reifungsprozess ist sehr wirkungsvoll, so bringt er beim Erwachsenen in jeder Stunde circa eine Milliarde rote Blutkörperchen und 100 Millionen weiße Blutkörperchen hervor [15]. Die HSC ist entscheidend für eine lebenslange Blutproduktion und ist definiert "durch ihre Fähigkeit zur dauerhaften Selbsterneuerung oder Erzeugung von Tochter-Stammzellen während sie einen Beitrag zum Pool von sich differenzierenden Zellen beiträgt."S.1 [12]. Um ihrer Aufgabe nachkommen zu können, benötigt sie eine besondere Umgebung, eine sogenannte „Nische/Mikro-Umwelt“, die räumlich und zeitlich koordinierte Signale gewährleistet, um die Stammzelle zu unterstützen [15].

Die erste Zelle, die sich aus der HSC entwickelt ist die multipotente Vorläuferzelle (MPP). Sie hat noch die Fähigkeit sich in Zellen der myeloischen Zellreihe sowie der lymphatischen Zellreihe zu differenzieren, besitzt allerdings kein Selbsterneuerungspotential mehr. Folgende Antikörper werden zur Charakterisierung in der Literatur verwendet:

Quelle	Ichii et al. [9]	Doulatov et al. [12]	Chao et al. [13]
MPP	Lin- CD34+ CD38- CD90- CD45RA- CD49f- Flt3+	Lin- CD34+ CD38- CD90- CD45RA- CD49f-	Lin- CD34+ CD38- CD90- CD45RA-

Tabelle 2: Die Antikörperklassifikation der MPP

In unserer Auswertung war ursprünglich in den ersten Auswertungen für die HSC CD38-CD34+CD45RA-CD90+ und die MPP CD38-CD34+CD45RA-CD90- angedacht, nach Umstellung auf ein neues Panel, wurde der Antikörper CD90 ersetzt, so dass keine Unterscheidung mehr zwischen HSC und MPP gemacht werden konnte und die beiden Populationen mit (CD45+)CD38-CD34+CD45RA-CD7- definiert wurden bzw. (CD45+)CD38-CD34+CD45RA-CD7-CD22-. Da in den ersten erhobenen Messungen CD45 noch nicht vorhanden war, sind nicht in allen Proben die HSC+MPP CD45 positiv, weshalb dieser Marker in Klammern steht. In der vorliegenden Arbeit ist die Definition damit für HSC+MPP (CD45+)CD38-CD34+CD45RA-CD7-CD22-.

Ab der nächsten Reifungsstufe besitzen die Zellen nicht mehr die Möglichkeit sich in verschiedene Linien weiter zu differenzieren. Aus der MPP entwickelt sich in Richtung der lymphatischen Zelllinie die sogenannte gemeinsame lymphatische Vorläufer-Zelle (common lymphoid progenitor (CLP)). Diese Vorläuferzelle hat nur noch das Potential sich in lymphatische Zellen zu entwickeln. Verglichen mit den Forschungserkenntnissen bei der Maus ist die menschliche Hämatopoese und Immunologie sehr viel weniger genau und gut erforscht. Gründe sind dafür unter anderem die technischen und logistischen Herausforderungen beim Menschen, sowie bei Forschungsversuchen der ethischen Dimension gerecht zu werden [11]. Die CLP-Zellen wurden in der Maus als Zellen definiert, die noch alle lymphatischen Differenzierungsmöglichkeiten haben, sich also zu T- oder B-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK) entwickeln können, nicht jedoch zu Zellen der myeloischen Zellreihe [16]. 1995 beschrieb Galy et al. eine Zellpopulation im menschlichen Knochenmark, die den Kriterien der CLP entsprachen. Diese Zelle wurde mit folgendem Phänotyp charakterisiert: CD34+CD38+lin-CD10+ [17]. Demgegenüber wurde im menschlichen Nabelschnurblut auch eine multilymphoide Vorläuferzelle entdeckt, die CD34+CD38-CD7+ ist (Hao et al., 2001; Hoebeke et al., 2007). Im Knochenmark sind allerdings alle potentiellen CLP CD38+, so dass Payne et al. den Phänotyp der CLP als CD34+Lin-CD7+CD10+ definierte, was unterstreicht, dass der Phänotyp aktuell noch kontrovers diskutiert wird [11].

Ein Review von Blom und Spits [18] kommt zu dem Schluss, dass es 2 verschiedene Zellpopulationen gibt, die CLP Eigenschaften haben. Eine Population hat den Phänotyp CD34+lin-CD45RA+CD7+, die sich vor allem, aber nicht ausschließlich in T-Lymphozyten weiterentwickeln kann, während die zweite Population aus CD34+lin-CD45RA+CD10+IL7R α + Zellen besteht, die vor allem in die B-Zellrichtung weiter differenzieren. Es scheint von diesen beiden Zellpopulationen noch eine Vorläuferzelle zu geben, die der Definition der CLP am ehesten entsprechen würde. Auch über diesen Phänotyp gibt es unterschiedliche Meinungen. Konsens besteht darüber, dass die Population CD34+CD45RA+ exprimiert. Ob bereits CD10+ und/oder CD7+ exprimiert wird, ist Gegenstand der Kontroverse.

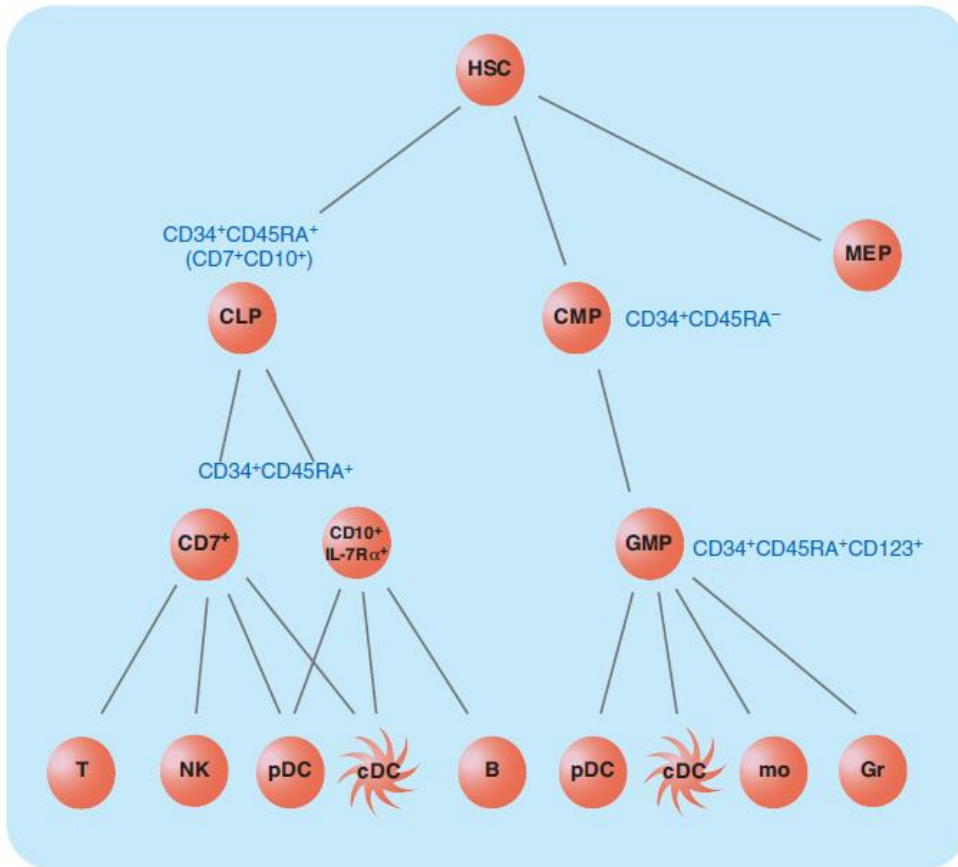


Abbildung 2: Entwicklung der CLP und GMP nach Blom et al.

Quelle	Blom et Spits [18]	Le Bien et al. [19]		Payne et Crooks [10]	Payne et Crooks [11]	
CLP	CD34+ CD45R A+ CD7+ und/o der CD10+	CD34+ CD45RA+ CD7+ CD10+ Entwicklung in T/NK/DC	CD34+ CD45RA+ CD10+ Entwicklung in B-Zellen	CD34+ CD38+ CD7+ Nabel- schnurblut	CD34+ CD38+ Lin- CD7+ CD10+ Knochen- Mark	CD34+ (CD38+) Lin- CD7+ CD10+ Nabel- schnurblut

Tabelle 3: Die Antikörperklassifikation der CLP

Quelle	Ichii et al. [9]	Chicha et al. [20]	Chao et al. [13]	Doulatov et al. [12]		
CLP	CD34+ CD38+	CD34+ CD38+ Lin- CD7+ und/oder CD10+	CD34+ CD38+ Lin- CD10+	CD34+ CD38- CD7+ In B/NK	CD34+ CD10+ B/T/NK	CD34+ CD38+ CD7+ oder CD10+ B/T

Tabelle 4: Die Antikörperklassifikation der CLP Teil 2

In der vorliegenden Arbeit wurde CLP wie folgt definiert: CLP (CD45+) CD38+CD34+CD45RA+CD22-CD7+.

1.2.1 B-Zellen

Die B-Zellen reifen in ihrer Entwicklung im Knochenmark [4]. Als naive B-Zellen verlassen sie das Knochenmark und können dann mit Hilfe eines Antigens und einer aktivierten T-Helferzelle aktiviert werden, um sich weiter zu B-Effektorzellen, B-Memoryzellen und Plasmazellen zu entwickeln [1].

1.2.1.1 Reifung der B-Zellen im Knochenmark

Wie in der Maus reifen die B-Zellen beim Menschen zunächst im Knochenmark, wobei die Charakterisierung der Reifungsstufen der B-Zellen beim Menschen bisher noch nicht in dem Maße detailliert wie im murinen System erfolgte [11].

Die B-Zellentwicklung erfolgt in 2 großen Phasen, die an verschiedenen Orten stattfinden. In der ersten Phase entwickeln sich aus der HSC die naiven, reifen B-Lymphozyten, wobei dieser Prozess hauptsächlich im Knochenmark und der Milz stattfindet. In der zweiten Phase reifen sie dann zu Memory-B-Zellen heran. Das geschieht in sekundären lymphatischen Organen (den Lymphknoten und den Mukosa-assoziierten lymphatischen Organen: MALT), sowie im Knochenmark und in der Milz [21].

Auch die B-Lymphopoese ist auf eine Nische angewiesen, eine Umgebung im Knochenmark, die sie mit verschiedenen Faktoren in der Reifung unterstützt [22].

Die B-Lymphopoese im Knochenmark ermöglicht die Reifung von der CLP zur immatures B-Zelle inklusive der Entwicklung eines funktionsfähigen BCR, durch stufenweise Rekombination der Gene des Ig [1]. Der BCR besteht aus einer schweren IgH und einer leichten IgL Kette. Vor dem Eintreten in die spezifische B-Zell-Linie, liegen beiden Ketten-Loci in der Keimbahn, das Rearrangement und die nachfolgende Expression auf der Zelloberfläche erfolgt aber ausschließlich in B-Zellen [1]. Die Differenzierung von der CLP zur ersten B-Linien-spezifischen Zelle, der Pro-B-Zelle geschieht durch Aktivierung von Rekombinase-Enzymen (u.a. RAG-1 und RAG-2) und der terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (tdt), die zu einem D-zu-J und V-zu-DJ-Rearrangement im Locus der schweren Kette führen [9]. Hauptverantwortlich sind die Transkriptionsfaktoren E2A und EBF, die dabei nicht nur die Enzyme, sondern auch den Transkriptionsfaktor Pax-5 induzieren. Pax-5 aktiviert u.a. die Expression von CD19, dem Corezeptor des B-Zell-Rezeptors [1]. Manche Autoren benutzen als Zwischenstadium zusätzlich die „early“ B-Zelle, die dem Zeitpunkt der ersten Umlagerung entspricht und definieren die Zelle erst ab der zweiten Umlagerung als Pro-B-Zelle. Im Gegensatz zum murinen Modell ist im humane Bereich für die Umlagerungen Interleukin-7 (II Interleukin) nicht nötig [9, 18, 23].

Nach diesen Umlagerungen im Stadium der Pro-B-Zelle sollte die Zelle eine vollständige schwere μ -Kette aufweisen, um in das nächste Reifungsstadium eintreten zu können. Um zu überprüfen, ob das zutrifft, produziert die Pro-B-Zelle eine sogenannte Ersatz-Leichtkette [24]. 2 Ersatz-Leichtketten können sich zusammen mit 2 schweren Ketten zu einem sogenannten Prä-B-Rezeptor zusammenlagern und signalisieren der Pro-B-Zelle damit, dass die Umlagerung erfolgreich war und die Zelle in das nächste Reifungsstadium, das der Pre-B-I-Zelle übergehen kann [1]. Sobald Pax-5 exprimiert wird und somit auch CD19 exprimiert wird, handelt es sich Perez-Andres et al. zufolge um eine Pre-B- I-Zellen [21].

Im nächsten Stadium, dem Stadium der Pre-B-II Zellen liegt die μ -Ketten intrazellulär und nicht mehr auf der Oberfläche als Pre-B-Rezeptor. Nach vorheriger positiver Selektion mit dem Pre-BCR erfolgt die Induktion zur Rekombination der leichten Kette, für die es nur zu V-J-Verknüpfungen kommt, weil dort kein D-Segment vorhanden ist [1, 21].

Um eine immature B-Zelle handelt es sich, sobald sowohl VDJ der schweren Kette als auch VJ, der leichten Kette erfolgreich umgelagert wurden und damit ein vollständiger BCR, in diesem Fall aus IgM auf der Oberfläche der Zelle exprimiert wird [21].

Die Zellen durchlaufen anschließend einen negativen Selektionsprozess, bei dem alle Zellen eliminiert werden, die eine zu hohe Affinität gegen körpereigene Strukturen aufweisen. Durchlaufen sie diesen Prozess erfolgreich, reifen sie über den Reifungsschritt einer transitionellen B-Zelle zu reifen naiven B-Zellen heran, die dann das Knochenmark verlassen [21].

Die erfolgten Umlagerungen in den Immunglobulin-Gensegmenten ermöglichen ein B-Zell-Repertoire, das in der Lage ist mehr als $5 \cdot 10^{13}$ verschiedene Antigene zu erkennen [25].

In der Literatur herrscht keine einheitliche Antikörperklassifikation.

Die nachfolgenden Tabelle verdeutlicht die differente Charakterisierung der Vorläuferzellen B-Zellen in der Literatur im humanen Bereich:

Quelle	Frühe B Zelle	Pro B Zelle	Pre-B-I Zelle		Pre-B-II-Zelle
Blom et Spits [18]	CD34+ CD19- CD10+	CD34+ CD19+ CD10+	Im Text CD34+ CD19+ CD10+	in der Tabelle CD34- CD19+ CD10+	CD34- CD19+ CD10+
LeBien et al. [19]	CD34+ CD19- CD10+ II7R+	CD34+ CD19+ CD10+ II7R+CD24+	CD34- CD19+ CD10+ CD24+		CD34- CD19+ CD10+ CD24+
Ghia et al. [24]		CD34+ CD19- CD10-	CD34+ CD19+ CD10+		CD34- CD19+ CD10+
Ichii et al. [9]		CD34- CD38+			

		CD19+ CD10+ CD20+/ ^{low}		
Van Lochem et al [26]		CD34+ CD19- CD22+ TdT+	CD34+ CD19+ CD10+ CD22+ TdT+CD45 ^{dim}	CD34- CD19+ CD10 ^{dim} CD22+ CD20+CD45+
Galy et al. [17]		Most of pro b cells lack CD19 → 19-		
Perez-Andres et al. [21]		CD34+ CD38+ CD19- CD22+ CD45 ^{dim}	CD34+ CD38 ^{high} CD19+ CD10 ^{high} CD79a+	

Tabelle 5: Die Antikörperklassifikation der Frühen B-Zelle, der Pro-B-Zelle, der Pre-B-I-Zelle und Pre-B-II-Zelle

Für manche Autoren folgen nach der CLP Zelle die weiteren Stufen Pro-B-Zelle, Pre-B-I-Zelle und Pre-B-II-Zelle. Andere Autoren setzen zwischen die Stufe der CLP und der Pro-B-Zelle noch eine frühe B-Zelle [10, 18]. In Zusammenschau der verschiedenen Quellen lässt sich zusammenfassen, dass die B-Zelllinie in ihrer Entwicklung zunächst CD34+ ist und beim Übergang zur Pro-B-Zellen CD19 hochreguliert, bevor sie dann CD34 verliert. Zusammengefasst durchlaufen B-Zellen folgende Reifungsstadien: CD34+CD19-, dann CD34+CD19+ und schließlich CD34-CD19+. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Definitionen verwendet: Pro-B-Zelle ((CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM) und Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM); (LM: Lymphozyten und Monozyten; %LM: Anteil bezogen auf die Lymphozyten und Monozyten).

1.2.1.2 Reifung außerhalb des Knochenmarks

Naive B-Zellen, die einen vollfunktionsfähigen BCR haben, also IgM+ sind und einen muren Phänotyp (CD19+CD27-CD10-) aufweisen, verlassen das Knochenmark über die Blutgefäße und bewegen sich im peripheren Blut zwischen den sekundären lymphatischen Organen.

Es verlassen aber beim Menschen auch bereits immature B-Zellen das Knochenmark. Für den Fall, dass den ausgetretenen Zellen in den nächsten Tagen kein Antigen präsentiert wird sterben sie ab. Wird ihnen in Lymphknoten, der Milz oder MALT ein Antigen präsentiert, beginnt ihre Aktivierung und sie entwickeln sich mit Hilfe follikulärer T-Helferzellen zu Memory (CD19+CD27+CD21+) oder Pre-Effektor-Zellen (Plasmablasten CD19+CD27+CD38++) [21].

In diesem Schritt bewegen sie sich mehrmals zwischen den hellen und dunklen Zonen eines Keimzentrums, um zu proliferieren und eine möglichst hohe Affinität zu dem präsentierten Antigen zu erreichen. Die Plasmablasten können anschließend im Knochenmark oder MALT zu Plasmazellen ausreifen [21].

Es gibt noch eine weitere Reifungsstufe der B-Zellen: die transitionellen B-Zellen. Sie sind ein Zwischenstadium zwischen immaturren und muren naiven B-Zellen, sofern die B-Zellen das Knochenmark bereits als immature B-Zellen verlassen. Sie sind im humanen Bereich noch nicht vollständig phänotypisiert [27]. Es gibt beim Menschen wohl auch transitionelle B-Zellen, allerdings gibt es bisher unterschiedliche Vermutungen, ob 2 oder 3 solcher transitionellen Subpopulationen beim Menschen existieren [28–32]. In der Maus müssen die Zellen in der Milz zu muren B-Zellen heranreifen. Beim Menschen scheint die Ausreifung nicht nur in der Milz stattzufinden, denn auch splenektomierte Patienten weisen eine normale Anzahl an muren naiven B-Zellen auf, wenn auch nicht an Memory-B-Zellen [28, 30].

Die Phänotypisierung der immaturren Zelle ist in der Literatur ist recht einheitlich:

	LeBien et al. [19]	Ghia et al. [24]	Ichii et al. [9]	Van Lochem et al. [26]	Perez-Andres et al. [21]	Blom et Spits [18]
Immature B-Zelle	CD22+ CD19+ CD10+ CD20+ CD21+ CD24+ CD40+	CD19+ CD10+ IgM+ IgD-	CD19+ CD10+ IgM+ IgD ^{low} CD20+	CD22+ CD19+ CD10+ CD20+ CD45 ^{high}	CD22+ CD19+ IgM+ CD20+ CD45+ CD21+ CD5+ CD53+	CD34- CD19+ CD10+ IgM+ IgD-

Tabelle 6: Die Antikörperklassifikation der immaturren B-Zelle

Mögliche Charakterisierungen der transitionellen Zellen, wenn man von 2 Stadien ausgeht:

Quelle	Transitional T1	Transitional T2
Sims et al. [30] T1 und T2 oder alternativ 3 Typen	CD24 ^{hi} CD21 ^{lo} CD23 ^{lo} IgM ^{high} IgD ^{low}	CD24 ^{hi} CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} IgM ^{high} IgD ^{high}
Vossenkämper et al. [32]	CD20+ CD27- CD10+ CD21 ^{low}	CD20+ CD27- CD10+ CD21 ^{high}

Tabelle 7: Die Antikörperklassifikation der transitionellen B-Zellen

In der Arbeit wurde im peripheren Blut CD19+CD21-CD10+CD38++ für die immature B-Zelle verwendet. Im Knochenmark wurde mit (CD45+)CD22+CD34-CD19+CD10+IgM+ die Klassifikation für die immaturren und transitionellen B-Zellen verwendet.

1.2.2 Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit verwendete Definitionen der B-Zellen und ihrer Vorläuferzellen

HSC+MPP	CLP	Pro-B-Zelle	Pre-B-I und Pre-B-II B-Zellen	immature + transitionelle B-Zellen
(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
CD38-	CD38+			
CD34+	CD34+	CD34+	CD34-	CD34-
CD22-	CD22-	CD22+	CD22+	CD22+
		CD19+	CD19+	CD19+
CD45RA-	CD45RA+	CD10+	CD10+	CD10+
CD7-	CD7+	IgM-	IgM-	IgM+

Tabelle 8: Zusammenfassung in der Arbeit verwendete Definitionen im Knochenmark

naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-klassenge wechselte Memory B-Zellen	klassenge wechselte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21-Memory B-Zellen	IgM CD21-Memory B-Zellen
CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+
CD27-	CD27+	CD27+	CD27+	CD27all	CD27+		
CD21+	CD21+	CD21+	CD21+	CD21-	CD21-	CD21-	CD21-
				CD38++	CD38++	CD38 ^{low}	CD38 ^{low}
				CD10+	CD10-	CD10-	CD10-
		IgM+	IgM-				IgM+
		IgD+	IgD-				IgD+

Tabelle 9: Zusammenfassung in der Arbeit verwendete Definitionen im peripheren Blut

1.2.3 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich wie die B-Zellen aus der HSC. Auch bei ihnen erfolgt die Reifung über den MPP und die CLP. Ab dieser Stufe entwickeln sich die T-Zellen in einer spezifischen Linie weiter. Im Gegensatz zu den B-Zellen müssen die T-Vorläufer das Knochenmark als Early-T-Zell-Precursor verlassen, um im Thymus weiter zu reifen. Sie besitzen zu diesem Zeitpunkt noch keine T-Zellrezeptor und exprimieren weder CD4 noch CD8. Im Thymus proliferieren sie, entwickeln den T-Zellrezeptor und exprimieren kurzzeitig CD4 und CD8. Die Zellen, die auf den epithelialen Zellen der Thymusrinde einen MHC I oder MHC II Komplex erkennen überleben, die anderen werden apoptotisch. Erkennt eine Zelle einen MHC I Komplex wird die Synthese des CD4-Antigens eingestellt und das CD8-Antigen bleibt bestehen. Erkennt eine Zelle hingegen einen MHC II Komplex geschieht das Gegenteil. Bevor die Zellen den Thymus verlassen können, durchlaufen sie einen Prozess der negativen Selektion, bei der diejenigen Zellen apoptotisch werden, die eine zu hohe Affinität für körpereigene Antigene haben [1, 4, 33].

Wie bereits oben erwähnt kann man die T-Zellen allgemein in 2 große Subklasse einteilen: in die CD4+, auch T-Helferzellen genannt und CD8+(zytotoxische) T-Zellen. Allen T-Zellen ist gemeinsam, dass sie CD3 positiv sind [34].

Beide Gruppen lassen sich mit weiteren Markern unterteilen. So sind die Zellen naiv, wenn sie CCR7+CD45RA+ sind (also z.B. naive T-Helferzellen bzw. naive CD4-T-Zellen: CD3+CD4+CCR7+CD45RA+). Es handelt sich um zentrale Memory T-Zellen, wenn sie CCR7 positiv sind, aber nicht CD45RA exprimieren (also CCR7+CD45RA-), um periphere Effektor-Memory-T-Zellen, wenn sie CCR7-CD45RA- sind. Terminale differenzierte Effektor T-Zellen exprimieren kein CCR7 aber wieder CD45RA+ [34]. CD38 und HLA-DR (HLA: humane Leukozytenantigen-System, Histokompatibilitätsantigen) sind darüber hinaus Marker für eine Aktivierung [34].

Eine Unterform der CD4+ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird [34].

1.2.4 Regulatorische T-Zellen

Die CD4+T-Zellen kann man in T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) unterteilen. Dabei besteht die Aufgabe der Tregs darin eine potenziell schädigende Wirkung der T-Zellen zu unterdrücken. Die aktuell benutzen Treg-Marker wie z.B. TLA-4, CD25 und CD127 zur Isotyp-Einteilung sind eigentlich Aktivierungsmarker der T-Zellen und meist nicht Treg-spezifisch [35]. Ein Hauptvertreter der regulatorischen T-Zellen sind die natürlichen Tregs, die CD4 und FoxP3 positiv sind und im Thymus heranreifen. Bei naiven (CD45RA+) Tregs handelt es sich um natürliche Tregs sind, während bei Memory Tregs eine Differenzierung induzierter versus natürlicher Tregs auf der Basis von Oberflächenmarkern nicht sicher möglich ist [36]. Ihre Aufgabe ist eine periphere Toleranz im Körper zu ermöglichen. Dabei können sie Immunantworten verhindern oder beenden und sorgen damit für eine Regulation, die einen anhaltenden Zustand der peripheren Toleranz gewährleistet.

Pathophysiologisch gelingt ihnen das über 3 Mechanismen. Als erste Regulationsmöglichkeit können sie andere T-Zellen beeinflussen und dabei die Proliferation oder die Zytokinausschüttung von Effektor-T-Zellen verhindern. Ein zweiter Mechanismus zielt auf Veränderungen der DC ab. Die regulatorischen T-Zellen können verhindern, dass die DC bestimmte Antigene präsentieren. Sie können die DC aber auch dahingehend beeinflussen, verstärkt schützende Faktoren auszuschütten. Als dritten Angriffspunkt können die Tregs über die Sekretion bestimmte Moleküle wie IL-10 TGF- β , die unterdrückend auf das Immunsystem wirken, agieren [37].

1.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Als hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) wird die Transplantation von blutbildenden (hämatopoetischen) Stammzellen eines Spenders in einen Empfänger verstanden. Bei einer autologen HSZT handelt es sich dabei bei Spender und Empfänger um dieselbe Person, bei einer allogenen HSZT hingegen um 2 verschiedene Personen. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der allogenen HSZT.

Die allogene HSZT stellt eine kurative Therapieoption für eine Vielzahl von verschiedenen Krankheiten dar. Dabei ist die HSZT für die Mehrzahl der vom Knochenmark ausgehenden

Krebsarten, onkologischen Malignitäten, metabolischen oder immunologischen Störungen die Therapie der Wahl und dabei oft die einzige kurative Option.

Um eine HSZT durchführen zu können wird der Patient zunächst bestrahlt oder/und erhält eine Chemotherapie, um sein eigenes Immunsystem und die Hämatopoese zu zerstören. Als nächstes werden HSC eines HLA-kompatiblen Spenders transplantiert, die im Körper des Patienten die Hämatopoese ersetzen und das Immunsystem dort neu aufbauen [38]. Die Auswahl des Spenders erfolgt hauptsächlich auf der Basis der HLA-Antigene, da eine möglichst vollständige Übereinstimmung eine wichtige Voraussetzung für den Transplantationserfolg ist [39].

Die Divergenz zwischen Spender- und Empfängerimmunsystem kann nach Transplantation in Host-versus-Graft-Richtung zu einer Abstoßung des Transplantates und in Graft-versus-Host-Richtung zu einer „Graft-versus-host-Erkrankung“ (Graft-versus-Host Disease; GvHD) führen [40]. Ein wünschenswerter Effekt der Divergenz ist der „Graft-versus-Leukämie-Effekt“- (GvL-Effekt), eine Fähigkeit des neuen, vom Spender abstammenden Immunsystems verbliebene maligne Zellen zu beseitigen [39]. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter, je unterschiedlicher die HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger ist. Die Maximierung dieses Effektes wird jedoch durch die 2 vorausgehenden Effekte (der GvHD und Abstoßung des Transplantats) limitiert, deren Risiken ebenfalls bei steigendem HLA-Mismatch zunehmen.

1.4 GvHD

Die GvHD, ist eine immunologisch vermittelte Abstoßungsreaktion des Spenders gegen Gewebe des Empfängers und stellt die Hauptkomplikation der HSZT dar. Die Tatsache, dass die GvHD mit einer signifikant erhöhten Mortalität assoziiert ist, begrenzt den Einsatz der allogenen HSZT.

1966 formulierte Billingham 3 Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, die zur Entstehung einer GvHD erfüllt sein müssen. Erstens muss das Transplantat immunologisch-kompetente Zellen enthalten. Zweitens muss der Empfänger Antigene im Gewebe aufweisen, die im Spender nicht vorkommen. Drittens darf der Empfänger nicht in der Lage sein eine wirksame Antwort zu bilden, die die transplantierten Zellen eliminieren würde.

Heute weiß man, dass es sich bei den immunologisch-kompetenten Zellen um T-Zellen handelt. Eine GvHD kann folglich auftreten, wenn Spender-T-Zellen im Transplantat enthalten sind, wie das z.B. bei Blutprodukten, Knochenmark, aber auch soliden Organen der Fall ist [41].

Die T-Lymphozyten antworten im Rahmen einer GvHD auf genetisch definierte Proteine, die sich auf den Zellen des Empfängers befinden und die im Rahmen eines genetischen Polymorphismus Struktur-Differenzen zwischen dem Empfänger und Spender aufweisen. Die wichtigste Rolle spielen dabei die HLA. HLA-Proteine der Klasse I (HLA A, B, C) werden nahezu auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. HLA-Proteine der Klasse II (DR, DQ und DP) werden auf den APC, B-Zellen aber auch Epithelzellen in einer proinflammatorischen Umgebung exprimiert [41]. Das Auftreten der GvHD hängt direkt vom HLA-Mismatch ab. Deshalb wird eine größtmögliche Übereinstimmung der HLA-Antigene angestrebt [41].

Die GvHD wurde zunächst nach ihrem Auftreten in 2 Formen unterteilt. Die akute Form (aGvHD), die in den ersten Monaten nach der Transplantation und in eine chronische Form (cGvHD: chronische GvHD), die in der Regel erst nach Ablauf von 3 Monaten auftritt. Beide Verlaufsformen werden auf der Basis klinischer Symptome und Laborparameter sowie histologischer Bilder differenziert [42]. Die aktuell gültige Einteilung des National Institutes of Health unterteilt die aGvHD in eine klassische aGvHD (Auftreten bis Tag 100) und eine sogenannte „late-onset“ aGvHD (nach 100 Tagen). Die cGvHD wird in eine klassische Verlaufsform und das Overlap-Syndrom mit Anteilen einer akuten und chronischen GvHD unterteilt [43].

1.4.1 Akute GvHD

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrifft die aGvHD bei 81% aller Patienten die Haut, bei 54% den Gastrointestinaltrakt und seltenerer die Leber [41]. An der Haut manifestiert sich die aGvHD mit einem makulopapulösen Exanthem und an der Leber mit einer cholestatischen Hyperbilirubinämie. Symptome einer gastrointestinalen GvHD sind Übelkeit, Anorexie, wässrige oder auch hämorrhagische Diarrhö, Ileus sowie starke abdominelle Schmerzen.

Bei der Betrachtung der Pathophysiologie ist die aGvHD letztlich als physiologische Aktivierung der T-Zellen des Spenders in Reaktion auf fremde Antigene des Empfängers zu beurteilen. Eine weitere wichtige Rolle spielen entzündliche Reaktionen von Empfängergewebe, im Rahmen

der Chemotherapie vor Transplantation oder Infektionen, sowie eine Dysbiose von intestinalen Bakterien was zu einer Aktivierung von APC führt [41].

Das Alter des Empfängers, die zugrundeliegende Erkrankung, der HLA-Mismatch, der Einsatz einer Ganzkörperbestrahlung und eine weibliche Spenderin für einen männlichen Empfänger gelten als Risikofaktoren für eine GvHD [44].

Die aGvHD läuft in 3 Phasen ab. Die Merkmale der ersten Phase resultieren aus der Konditionierung, die vor der Transplantation durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Konditionierung findet eine intensive Chemotherapie (gegebenenfalls in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung) statt. Zusätzlich zu der zugrundeliegenden Krankheit werden dabei Gewebe des Empfängers zerstört, was zu einer Ausschüttung proinflammatorische Zytokine führt. Als Resultat kommt es zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, costimulierenden Faktoren und HLA-Antigenen, was die Immunantwort verstärkt und über APC die Aktivierung von alloreaktiven T-Lymphozyten des Spenders bewirkt. Zellen, die ausgelöst durch die Ganzkörperbestrahlung in Apoptose gehen führen darüber hinaus zu einem Epithelschaden, der mikrobiellen Produkten wie LPS (Lipopolysaccharide) den Eintritt ermöglicht und die Aktivierung von APC noch verstärkt [45].

In der zweiten Phase folgen die Aktivierung und Expansion der T-Lymphozyten. In dieser Phase spielen vor allem die APC des Empfängers eine wichtige Rolle, die den T-Lymphozyten fremde Major- oder Minor-Histokompatibilitätsantigene präsentieren. Hauptvertreter der APC sind die DC, die selbst durch proinflammatorische Zytokine, mikrobielle Produkte und nekrotische Zellen aktiviert wurden [45].

Die dritte Phase wird auch als efferente Phase bezeichnet, in der es zur immunologisch vermittelten Schädigung von Gewebe kommt. Die Antwort enthält dabei eine zelluläre, sowie eine Zytokin-vermittelte Komponente. Für die zelluläre Reaktion sind die zytotoxischen T-Lymphozyten und die NK verantwortlich. Ihr Schädigungspotential vermitteln sie über den Fas/FasLigand oder eine Ausschüttung von Perforinen und Granzymen [45]. Der Fas-Ligand der toxischen T-Zelle bindet Fas(CD95) auf der Zielzelle neben der Bindung über den T-Zell-Rezeptorkomplex (CD3+TCR- MHC1) und gibt dabei ein Signal zur Apoptose. Die andere Signalmöglichkeit der zytotoxischen T-Zelle ist die Ausschüttung von Mediatoren bestehend aus Granula, Perforinen und toxischen Enzymen (Granzymen), welche die Zielzelle zerstören.

NK-Zellen schütten ebenfalls Granzyme aus, wenn eine Zielzelle keinen MHC I Rezeptor hat, der den inhibierenden Rezeptor der NK aktivieren kann und dadurch eine Antwort verhindert, bzw., wenn die aktivierenden Liganden auf der Zielzelle hochreguliert wurden [46]. Der Weg über die Ausschüttung von Perforin und Granzym scheint sehr entscheidend bei der kutanen und gastrointestinalen aGvHD zu sein. Der Mechanismus über Fas/FasLigand hingegen scheint vor allem bei der hepatischen GvHD und der Schädigung lymphatischer Organe (Thymus, Milz) sowie der Haut von Bedeutung zu sein [45].

Bei der Zytokin-vermittelten Komponente spielen nach derzeitigem Wissen, Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Il-1, und Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle [45]. TNF- α , von aktivierten Makrophagen und Monozyten sekretiert, aktiviert APC und verstärkt die Antigenpräsentation. Ein zweiter Effekt von TNF- α ist die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, die dann Effektorzellen an den Ort des Geschehens rekrutieren. Als dritten Effekt des TNF- α schädigt er das Gewebe direkt [47].

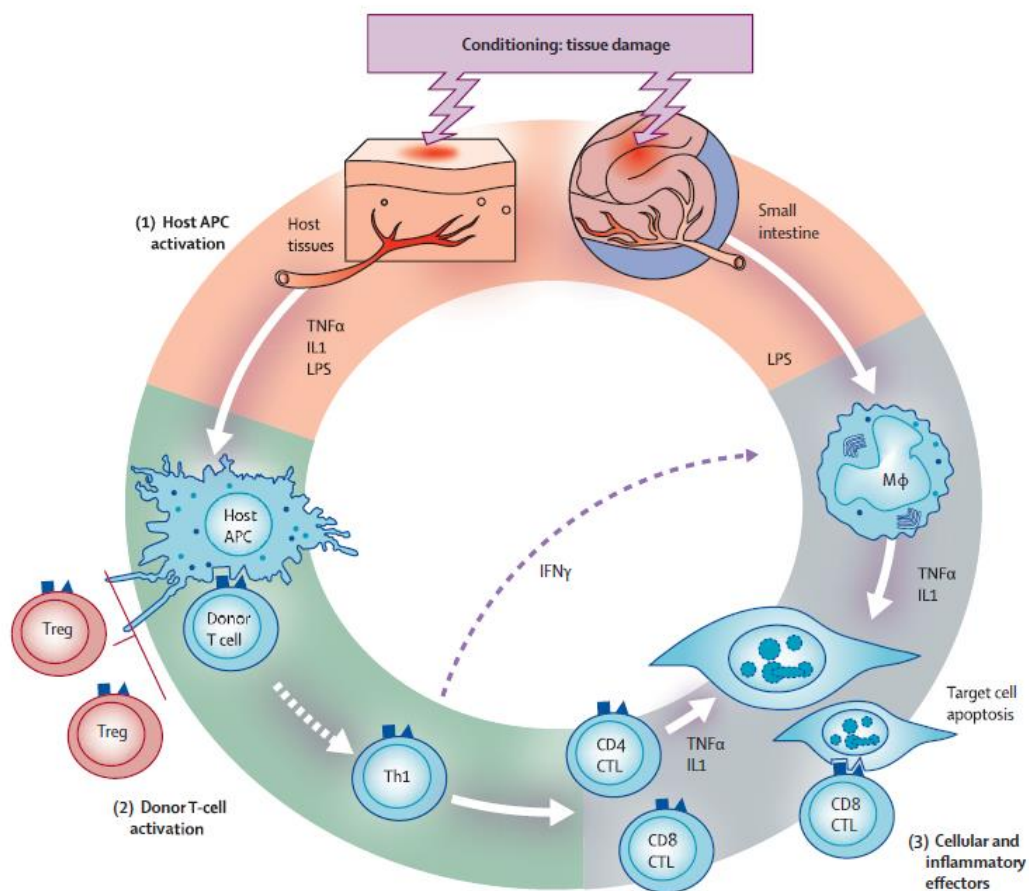


Abbildung 3: Die Pathogenese der aGvHD [48]

Das häufigste zur Prophylaxe einer aGvHD verwendete Medikamente ist Cyclosporin, (ein Calcineurin-Inhibitor), wobei es trotz des Einsatzes von Cyclosporin bei bis zu 60% der transplantierten Patienten zu einer aGvHD kommt [47]. Ergänzend wird Methotrexat (MTX) eingesetzt, das in der Kombination wirksamer ist, als in einer Monotherapie [49]. Eine, wenn auch nicht zugelassene, Alternative zu Cyclosporin ist Tacrolimus, welches ebenfalls ein Calcineurin-Inhibitor ist. In Kombination mit MTX konnte gezeigt werden, dass es das Auftreten einer aGvHD vermindert, die Gesamt-Überlebensrate jedoch unverändert bleibt [50]. Darüber hinaus werden auch weitere Immunsuppressiva (Sirolimus, Mycophenolat-Mofetil (MMF)) eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit der Prophylaxe ist eine T-Zell-Depletion, wahlweise in-vivo oder ex-vivo, die das Auftreten einer aGvHD reduziert, die jedoch mit einem erhöhten Risiko für lebensbedrohliche Infektionen oder Rezidive der Grunderkrankung einhergeht [51].

Die Standardtherapie der aGvHD ist nach wie vor eine Hochdosis-Steroidgabe [52]. In Studien zeigte sich allerdings kein Überlebensvorteil für die Stadien 1 und 2 der aGvHD mit einer Hochdosissteroidtherapie (Prednisolon 2mg/kg/d) im Vergleich zu einer niedrig-dosierten (Prednisolon 1mg/kg/d) Steroidtherapie [53]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Dosisescalation der Steroide über 2mg/kg/d mehr Infektionskomplikationen und einen längeren Krankenhausaufenthalt verursachte ohne das Gesamtansprechen zu beeinflussen [54].

Allgemein kann man die aGvHD nach dem Organbefall und Schwere des Befalls in 4 Schweregrade einteilen, wobei ab einem Gesamtschweregrad 2 eine Indikation zu systemischen Immunsuppression besteht [51].

Aufgrund einer Ansprechrate der initialen Therapie mit Steroiden von unter 50% der Patienten im Stadium 2-4 ist bei der Hälfte der Patienten eine Zweitlinien-Therapie nötig [47]. Bei Steroid-refraktären Patienten gibt es zahlreiche Therapieoptionen, wobei keine davon einen hohen Evidenzgrad besitzt, so dass die Therapie hauptsächlich auf Basis der lokalen Erfahrungen und dem Nebenwirkungsspektrum ausgewählt wird. Folgende Therapieoptionen stehen zur Verfügung: MMF, Ruxolitinib, Extrakorporale Photopherese, Pentostatin, Etanercept, Infliximab, Sirolimus und Everolimus, Antithymozytenglobulin (ATG), mesenchymale Stammzellen, Alemtuzumab, und anti-IL-2-Antikörper. Eine Limitation erfahren sie alle durch die Gefahr einer zum Teil lebensbedrohlichen Infektion [51]. Als

Ansätze für Therapien der Zukunft erfolgen derzeit Versuche u.a. mit Tregs, sowie eine Modulation von DC [51].

1.4.2 Chronische GvHD

Die Inzidenz der cGvHD schwankt je nach Studie zwischen 25 und 80% [42]. Die Einteilung der Schwere der cGvHD basiert auf der Zahl und der Schwere des Befalls betroffener Organe nach internationalen Konsensus-Kriterien [42]. Die Einteilung ist entscheidend für die Prognose. So weisen Patienten mit maligner Grunderkrankung mit milder cGvHD einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten ohne GvHD auf, da die cGvHD auch einen als positiv zu bewertenden GvL-Effekt aufweist. Patienten mit moderater cGvHD haben eine Prognose, die etwa der von Patienten ohne cGvHD entspricht. Patienten mit schwerer cGvHD weisen jedoch ein kürzeres Überleben auf [55].

Um die Definition einer milden cGvHD zu erfüllen müssen 1-2 Organsysteme betroffen, die Ausprägung darf dabei nur leicht und die Lunge nicht mit betroffen sein. Bei einer moderaten cGvHD sind mehr als 2 Organe mild bis moderat betroffen, die Lunge dabei jedoch maximal mild. Eine schwere cGvHD liegt bei mehr als 2 schwer betroffenen Organsysteme vor, die Lunge muss dabei zumindest moderat betroffen sein [43].

Der Pathomechanismus ist nicht so gut charakterisiert wie bei der aGvHD. Diskutiert wird, dass sowohl alloreaktive als auch autoreaktive T-Zellen eine Rolle spielen, aber auch Host-reaktiven B-Zellen eine wichtige Rolle zukommt [56–59]. Das Erscheinungsbild der cGvHD kann dem einer Autoimmunkrankheit entsprechen. Die cGvHD hat sehr unterschiedliche klinische Erscheinungsformen, und kann neben der Haut, Leber und Darm auch weitere Organe wie die Lunge, Schleimhäute und Faszien betreffen. Prinzipiell ist die cGvHD Ausdruck einer gestörten zentralen und peripheren Toleranz [55].

Die cGvHD ist potenziell lebensbedrohlich und Patienten mit einem Hochrisikoprofil (niedrige Thrombozyten bei Diagnose der cGvHD und einem direkten Übergang aus einer aGvHD), haben ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko, das mit einem deutlich reduzierten 5-Jahres-Überleben von 40% einhergeht. Die cGvHD lässt sich mit 4 Hauptmerkmalen charakterisieren: Dysregulation des Immunsystems, Immunschwäche, geschädigte Organfunktion und vermindertes Überleben [42].

Einzelne Bestandteile, die bei der Erkrankung eine Rolle spielen sind u.a. Tregs, die protektiv einer cGvHD entgegenwirken. Erhöhte Serumspiegel von TNF- α und Interferon- γ können das Auftreten einer cGvHD voraussagen. Die absolute Zahl zirkulierender B-Lymphozyten ist bei einem Teil der Patienten erhöht und häufig können auch Autoantikörper bei cGvHD nachgewiesen werden, was erklärt, warum Therapie-refraktäre Patienten bis zu 70% auf Rituximab, einen B-Zell-Antikörper ansprechen [42].

Weiterhin war bei Patienten mit aktiver cGvHD eine verminderte Frequenz von transitionellen, klassen-gewechselten B-Zellen nachweisbar und IgM+ Memory Zellen waren bei Patienten mit aktiver cGvHD nicht vorhanden (Hilgendorf et al. 2012). Patienten mit Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), einer typischen Manifestation der cGvHD hatten besonders hohe Werte der CD19+CD21^{low} B-Zellen und hohe BAFF-Spiegel (BAFF: B cell activating factor) im Vergleich zu Patienten ohne cGvHD [60]. Glauzy et al. konnten in ihren Studien bestätigen, dass der BAFF-Spiegel bei Patienten mit cGvHD erhöht ist. Die daraus von ihnen berechnete Ratio aus BAFF-Spiegel im Verhältnis zu CD19+ B-Zellen war bei Patienten mit cGvHD ebenfalls erhöht. Zudem entdeckten sie eine Korrelation dieser Ratio mit einer erhöhten B-Zell-Proliferation [61].

Als Therapiestandard gilt wie bei cGvHD eine Steroidgabe, ggf. kombiniert mit einem Calcineurin-Inhibitor. Eine ausschließlich topische Therapie stellt bei milder cGvHD eine Alternative dar. Aufgrund eines langsamen Ansprechens ist es erforderlich die Therapie über längere Zeit durchzuführen. Erfolgt eine Verschlechterung der Symptome in den ersten 4 Wochen oder keine Verbesserung innerhalb von 8- 12 Wochen ist eine Zweitlinien-Therapie indiziert [62].

Als Zweitlinien-Therapie stehen bisher nur Ergebnisse aus Studien in Phase 2 oder retrospektiver Art zur Verfügung. Steroide, mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) - Inhibitoren (Sirolimus, Everolimus), Ruxolitinib, Rituximab, MMF, MTX, Ibrutinib und extrakorporale Photopherese sind einsetzbare Möglichkeiten. Allgemein sollten nicht mehr als 3 Medikamente kombiniert werden und nach Symptomkontrolle eine Reduktion der Immunsuppression erfolgen, um die schädlichen Folgen der Langzeitbehandlung zu begrenzen (Wolff et al. 2011). Darüber hinaus stellen unterstützende Therapien wie Infektionsprophylaxe, Impfungen, Hormongabe, das Vorbeugen von Osteoporose oder psychologische Unterstützung eine wichtige Ergänzung dar [62].

Unterschieden wird auch der Beginn der cGvHD in Beziehung zu einer vorherigen aGvHD. Die quiescent onset cGvHD beschreibt das Auftreten einer cGvHD nach erfolgreicher Therapie einer aGvHD während die de novo cGvHD ohne vorherige aGvHD auftritt.

1.5 Immunrekonstitution

Wie bereits erwähnt werden vor einer HSZT große Teile der zellulären und humoralen Immunität durch die Konditionierung zerstört. Infolgedessen muss das Immunsystem nach einer Stammzelltransplantation wieder neu aufgebaut werden. Diese Rekonstitution läuft unterschiedlich schnell ab, wobei die verschiedenen Komponenten des Immunsystems unterschiedlich schnell regenerieren. Die Grafik von Bosch et al. fasst den Verlauf der Rekonstitution für die einzelnen Bereiche zusammen:

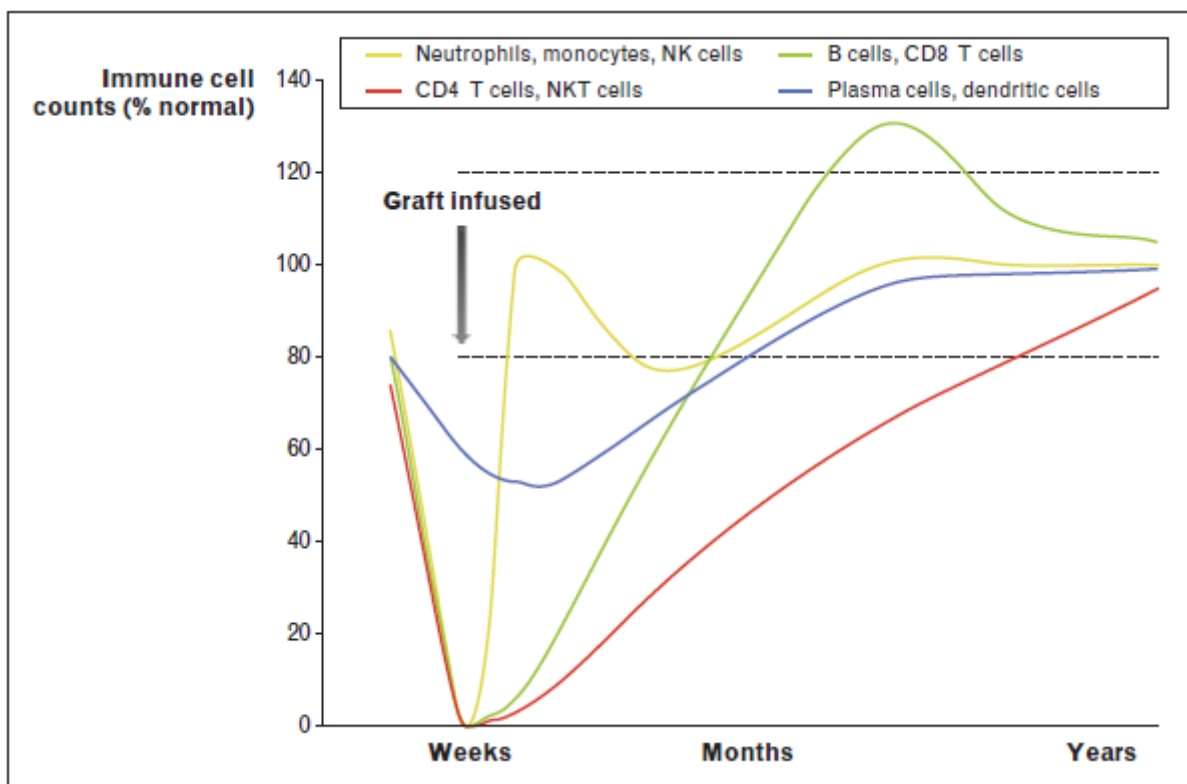


Abbildung 4: Verlauf der Rekonstitution

Allgemein hängt die Rekonstitution von Faktoren ab, die man in die 3 großen Bereiche vor, während bzw. nach der Transplantation einteilen kann. Zu den Faktoren vor der Transplantation zählen z.B. das Alter des Empfängers, die zugrundeliegende Erkrankung oder auch die initiale Chemotherapie und/ oder Bestrahlung. Relevante Faktoren während der

Transplantation sind u.a. die HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, die Konditionierung und auch die Stammzellquelle. Die GvHD-Prophylaxe und -Therapie nehmen neben antibiotischen Therapien, Infusionen mit Spenderlymphozyten ebenfalls Einfluss auf die Regeneration [63].

Das angeborene Immunsystem, also die NK, Monozyten und DC regenerieren am schnellsten und normalisieren sich innerhalb weniger Wochen [63].

B-Lymphozyten sind in den ersten 2 Monaten im Blut kaum nachweisbar und brauchen Monate bis Jahre, um wieder Normwerte zu erreichen [64]. Vor allem ihre Funktion, gemessen an ihrer Antikörper-Produktion benötigt bis zu einer Normalisierung bis zu 2 Jahre [65]. Dabei ist das Auftreten einer aGvHD und cGvHD der wichtigste Risikofaktor für eine verminderte B-Zell-Zahl [66].

Die Rekonstitution läuft wie in der normalen Ontogenie ab. D.h. als erstes regenerieren naive B-Zellen, die dann mit Verzögerung zu Memory-Zellen oder Plasmazellen differenzieren. Das gilt sowohl für Erwachsene als auch für Kinder [63, 67].

Neben der Produktion von B-Zellen durch das Knochenmark können auch mature B-Zellen über eine homöostatische Vermehrung zur Regeneration der B-Zellen beitragen, jedoch in sehr geringem Maße [68].

Im Bereich des T-Zell-Kompartiments spielt dagegen die periphere Expansion reifer T-Zellen eine größere Rolle. So zeigt sich eine Dominanz der Memory- und Effektor-T-Zellen, die sich aus den reifen T-Zellen entwickeln [63].

Der Effekt des Mangels an naiven T-Zellen wird bei älteren Patienten, deren Thymus nicht mehr so funktionsfähig ist noch verstärkt [63]. Die weitere Erholung der T-Zellen erfolgt neben der Expansion und Differenzierung von reifen Spender-T-Zellen über eine de-novo Entwicklung aus dem Knochenmark und Thymus [64, 69]. Abgesehen vom erhöhten Alter spielen für einen funktionierenden Thymus und damit funktionierenden Thymus-abhängigen Reifungsweg die zytotoxische Therapie vor der Transplantation und die Schädigung des Thymus im Rahmen einer aGvHD nach Transplantation eine Rolle [70].

Bei aktiver cGvHD ist die Anzahl der B-Vorläuferzellen und reifen B-Lymphozyten reduziert, was mit einer erhöhten Infektionsrate einhergeht [71–75]. Corre et al. konnten im

Zusammenhang mit einer cGvHD vor allem eine verminderte Anzahl an Memory-B-Zellen nachweisen [76].

Sanchez-Garcia et al. weisen eine unspezifische Hemmung der B-Vorläuferzellen nach, die bei aGvHD Grad II-IV und bei extensiver cGvHD stark ausgeprägt ist [77]. In einem Mausmodell konnten Shono et al. demonstrieren, dass die aGvHD über eine CD4+T-Zellen vermittelte Zerstörung der Nische incl. der Osteoblasten das Knochenmark schädigt und dies zu einer reduzierten Hämatopoese und verspäteten Immunrekonstitution inklusive der Produktion von B-Zellen führt [78]. Aus einer Osteoblasten-Zerstörung resultierte in Versuchen eine verminderte B-Zell-Zahl, was die darüber hinaus verzögerte B-Lymphozyten-Zahl nach aGvHD erklären würde [79, 80].

1.6 Zielsetzung

Die aGvHD und cGvHD nach akuter GvHD ist mit einer verminderten Anzahl an B-Lymphozyten assoziiert. Im peripheren Blut sind fast ausschließlich reife naive und Memory B-Zellen nachweisbar, so dass eine Aussage über die Ursache der reduzierten B-Zell-Zahlen nur durch eine Kombination der Analyse von peripheren Blut und Knochenmark möglich ist, da die B-Zell-Produktion und ihre Ausreifung primär im Knochenmark stattfinden. Aus diesem Grund wurde im Verlauf nach Transplantation zu 3 Zeitpunkten (1, 3 und 6 Monate nach Transplantation) die Immunrekonstitution im Knochenmark und peripheren Blut mit den im nächsten Abschnitt folgenden Fragestellungen gemessen und analysiert.

Generell kann ein Problem der Hämatopoese im Knochenmark verschiedene Ursachen haben. Erstens kann sie aus einem Reifungsarrest von B-Vorläuferzellen resultieren, zweitens kann die Knochenmarkregeneration durch eine immunsuppressive Therapie oder Infektion supprimiert werden. Drittens kann die Dysplasie einer Zellreihe, viertens ein erhöhter Umsatz der hämatopoetischen Zellen bei depletierten peripheren Zellen oder fünftens eine unkontrollierte Expansion neoplastischer Blutzellen zugrunde liegen [26].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Untersuchung der B-Zell-Rekonstitution nach allogener Blutstammzelltransplantation mit dem Ziel

1. der Identifikation des mit der aGvHD assoziierten Differenzierungsstopps der B-Zell-Vorläufer im Knochenmark

2. der vergleichenden Analyse der B-Zell-Regeneration bei Abwesenheit einer GvHD im Vergleich zur primären cGvHD (de novo cGvHD) und sekundären cGvHD (quiescent onset cGvHD) sowie Patienten mit alleiniger aGvHD

3. der Analyse der B-Zell-Regeneration als Biomarker der cGvHD.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in den Blutabnahme-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Bleach Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Storage Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Calibration Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fixierungs- und Permeabilisierungskit	eBioscience, San Diego, USA
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, San Diego, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Rattenserum	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz (0,1mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien

2.1.2 Antikörper für die FACS-Analyse

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
CD3	IgG ₁ , κ	UCHT1	Maus	Horizon V450	BD, Heidelberg, Deutschland
CD4	IgG ₁ , κ	SK3 RPA-T4	Maus	PerCP Horizon V450	BD, Heidelberg, Deutschland
CD7	IgG1, κ	eBio124-1D1	Maus	APCeFluor 780	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD10	IgG1	SN5c	Maus	FITC	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD19	IgG ₁ , κ	HIB19	Maus	PerCP-Cy5.5	BD, Heidelberg, Deutschland
CD21	IgG ₁ , κ IgG1, κ	B-ly4 B-ly4	Maus	PE APC	BD, Heidelberg, Deutschland
CD22	IgG ₁ , κ	HIB22	Maus	PE	BD, Heidelberg, Deutschland

CD27	IgG1, κ	M-T271	Maus	Horizon V450	BD, Heidelberg, Deutschland
CD34	IgG ₁ , κ	4H11	Maus	eFluor450	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD38	IgG1, κ IgG ₁ , κ	HIT2	Maus	PECy7 FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
CD45	IgG ₁ , κ	HI30	Maus	APC PECy7	BD, Heidelberg, Deutschland
CD45RA	IgG2b, κ	L48HI100	Maus	PECy7	BD, Heidelberg, Deutschland
IgD	IgG2a, κ	IA6-2	Maus	PE	BD, Heidelberg, Deutschland
IgM	IgG1, κ	MHM-88	Maus	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CCR7	IgG _{2A}	150503	Maus	FITC	R&D, Minneapolis, USA
FoxP3	IgG2a, κ	PCH101	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

Tabelle 11: Antikörper für die FACS-Analyse

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
5 ml FACS Röhrchen unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
Stripetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning/Costar, NY, USA
50 ml Falcon Tube	Falcon, Corning Science, Mexico
Zellsieb 70 µm	Falcon, Corning, NY, USA

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller
Durchflußzytometer MACS Quant	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Sterilbank Biohazard Clean Air	Telstar Laboratory Equipment, Woerden, Niederlande
Tischzentrifuge	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland

Tabelle 13: Geräte

2.1.5 Puffer und Lösungen

FACS-Puffer	PBS 2% FCS
ACK-Puffer (6x)	0,155 M NH ₄ CL 0,1 M KHCO ₃ 0,1 mM EDTA-Dinatriumsalz pH 7,3, ad 500ml Aqua bidest, 0,2 µm steril filtriert

Tabelle 14: Puffer und Lösungen

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrische Messungen

2.2.1.1 Messungen mit dem Durchflußzytometer

Die Durchflusszytometrie ermöglicht sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Messung von Zellen. Qualitativ werden dabei physikalische und molekulare Eigenschaften der Zelle erfasst. Die Zellen werden hydrodynamisch transportiert und dann optisch vermessen. Dafür müssen die Zellen in einer Suspension vorliegen, die mit Hilfe eines sogenannten Hüllstroms so stark verdünnt wird, dass die Zellen einzeln hintereinander an der Lichtquelle vorbeigeführt werden. Am Messpunkt trifft die Zelle auf monochromatisches Licht, das sie je nach ihren Eigenschaften unterschiedlich stark streut. Das gestreute Licht wird mittels eines Photomultipliers detektiert und in elektrische Signale übersetzt. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist dabei ein Maß für die Größe der Zelle. Das im 90° dazu gestreute Licht, das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SCC), das durch komplexe Mehrfachstreuung der intrazellulären Kompartimente entsteht, ist ein Maß für die Granularität und Binnenstruktur der Zelle. Weiterhin können Antigene einer Zelle mittels einer Antikörperfärbung erfasst werden. Dazu werden Antikörper-konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe, die nach entsprechender Färbung an den zugehörigen Antigenen der Zelle binden, eingesetzt. Je nach Farbstoff wird dieser bei der Messung von einem bestimmten Laser des Durchflusszytometers angeregt und emittiert Licht, das dann mittels eines Detektors erfasst wird und somit die Aussage ermöglicht, ob eine bestimmte Zelle ein bestimmtes Antigen besitzt [81]. Als Durchflußzytometer diente der MACSQuant® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

2.2.1.2 Auswertungen

Die Quantifizierung der Lichtsignale und die multiparametrische Messung jeder Zelle wurden in einem Datenspeicher festgehalten und dann getrennt von der Messung ausgewertet [81].

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programms FlowJo® (FlowJo LLC, Ashland, USA).

2.2.1.3 Antikörperfärbungen

Oberflächenfärbung für FACS Analyse

1. Als erster Schritt der Oberflächenfärbung wurden bei Blut als Ausgangsmaterial 5-7 ml davon mit 25-35ml ACK LysePuffer lysiert. Lag Knochenmark als Ausgangssubstanz vor, wurden davon 3 ml durch 70 µm-Filter filtriert und anschließend in 12ml ACK-Lösung lysiert. Die Lyse erfolgte dabei jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
2. Als zweiter Schritt wurde die Lösung mit 1300 Umdrehungen pro Minuten für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt.
3. Im dritten Schritt wurde die Probe erneut in 25-35ml (für Blut als Ausgangssubstanz) bzw. 12ml (bei Knochenmark zu Beginn) ACK-Lösung 5 Minuten lang bei Raumtemperatur lysiert.
4. Im vierten Schritt wurde die Lösung mit 25ml PBS aufgefüllt und dann erneut mit 1300 Umdrehungen pro Minute, für 10 Minuten bei 4°C, abzentrifugiert.
5. Im fünften Schritt wurde die Zellsuspension mit 10 ml PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und in FACS-Waschpuffer resuspendiert.
6. Im sechsten Schritt wurden von dieser Zellsuspension je 100µl (mind. 1×10^6 Zellen) in ein FACS-Röhrchen gegeben und die Antikörper für das jeweilige Röhrchen hinzugefügt. Dabei wurde die aus Vorversuchen ermittelte bzw. vom Hersteller angegebene Antikörpermenge verwendet.
7. Im siebten Schritt erfolgte die Färbung der Zellen (30 Minuten im Dunkeln bei 4°C).
8. Im achten Schritt wurden die Lösungen mit 2ml FACS-Waschpuffer bei 1600 Umdrehungen pro Minute, 10 Minuten lang bei 4°C, abzentrifugiert.
9. Im neunten Schritt wurden sie in 200-400 µl FACS-Waschpuffer, je nach Größe des Zellpellets, resuspendiert. Die Lösung mit Blut als Ausgangssubstanz konnte so direkt gemessen werden. Die Knochenmarksproben wurden direkt vor der Messung noch einmal mit einem 70 µm Filter gefiltert und anschließend gemessen.

Oberflächenfärbung kombiniert mit einer Intrazellulärfärbung

1. Erfolgte eine Oberflächen- und eine Intrazellulärfärbung für ein Röhrchen wurden erstens die Oberflächenantikörper direkt in 400µl Blut bzw. 300 µl Knochenmark für 20 Minuten bei 4°C gefärbt.
2. Anschließend wurde diese Lösung mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1400 Umdrehungen pro Minute 7 Minuten lang bei 4°C abzentrifugiert.
3. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1ml FixPerm Buffer für 30 Minuten bei 4°C fixiert.
4. Folgend wurden die Zellen zweimal mit je 2ml Permeabilization Puffer gewaschen und bei 1400 Umdrehungen pro Minute, 5 Minuten lang, abzentrifugiert und mit 100µl Permeabilization Puffer resuspendiert.
5. Weiterhin wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 2µl Rattenserum, für 15 Minuten bei 4°C, geblockt.
6. Danach wurde der intrazelluläre Antikörper mit konjugiertem Farbstoff zu der Zellsuspension hinzugegeben und konnte in einer Inkubationszeit von 30 Minuten färben.
7. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Permeabilization Puffer gewaschen, bei 1400 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert, genau abgesaugt und anschließend in ca. 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben mit Blut als Ausgangssubstanz standen direkt zur Messung bereit. Die Proben mit Knochenmark wurden direkt vor dem Messen durch einen 70 µm Filter gefiltert.

2.2.2 Statistik

Die Ergebnisse wurden in den Tabellen jeweils mit ihrem Mittelwert (MW) und Median (ME) angegeben. Für die Ermittlung der Signifikanz wurde zunächst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests geprüft, ob eine Normalverteilung der Werte vorlag. Im Falle einer Normalverteilung wurde der Student's t-Test mit SPSS durchgeführt und die MW der verschiedenen Gruppen verglichen. Lag keine Normalverteilung vor, wurden stattdessen die ME mit Hilfe des U-Tests nach Mann & Whitney auf signifikante Unterschiede geprüft. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

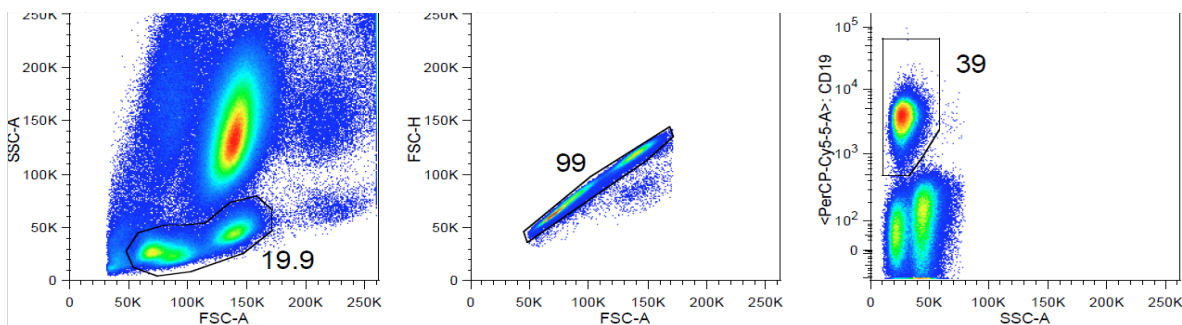
2.2.3 Gatingstrategie

2.2.3.1 Gatingstrategie Peripheres Blut

Populationen für die Auswertung:

B-Zellen	CD19+ %LM
naive und transitionelle B-Zellen	CD19+ CD21+ CD27- %LM
Memory B-Zellen	CD19+ CD21+ CD27+ %LM
nicht-klassengewechselte Memory B-Zellen	CD19+ CD21+ CD27+ IgM+ IgD+ %LM
klassengewechselte Memory B-Zellen	CD19+ CD21+ CD27+ IgM- IgD- %LM
immature B-Zellen	CD19+ CD21- CD38++ CD10+ CD27all %LM
Plasmablasten	CD19+ CD21- CD38++ CD10- CD27+ %LM
CD21- Memory B-Zellen	CD19+ CD21- CD38 ^{low} CD10- %LM
CD21- IgM Memory B-Zellen	CD19+ CD21- CD38 ^{low} CD10- IgM+ IgD+ %LM

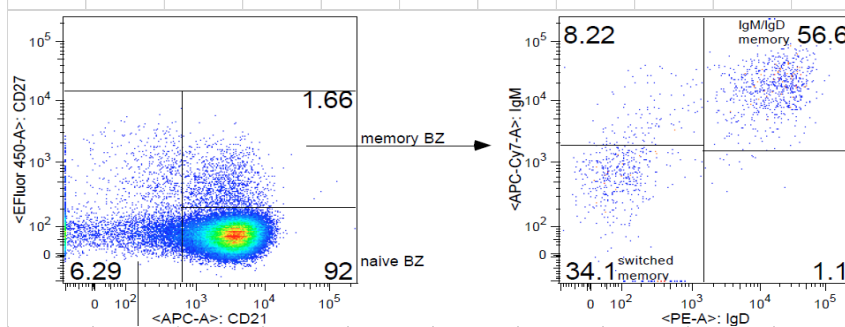
Tabelle 15: Populationen im peripheren Blut



Im ersten Schritt werden die Lymphozyten und Monozyten im Vorwärtsscatter FSC-A und der Granularität SSC-A ausgewählt.

Es erfolgt ein Zwischenschritt, um Dubletten auszuschließen in der Ansicht FSC-A gegen FSC-H.

Dann werden alle Zellen, die CD19 positiv sind ausgewählt.



Die bereits CD19 positiven Zellen werden anhand der Marker CD27 auf der y-Achse und CD21 auf der x-Achse aufgeteilt. Daraus resultiert die Gruppe CD19+CD21+CD27-, sowie CD19+CD21+CD27+.

Die CD19+CD27+CD21+ Zellen werden mit IgM und IgD weiter aufgeteilt in switched Memory bzw. non switched Memory B-Zellen.

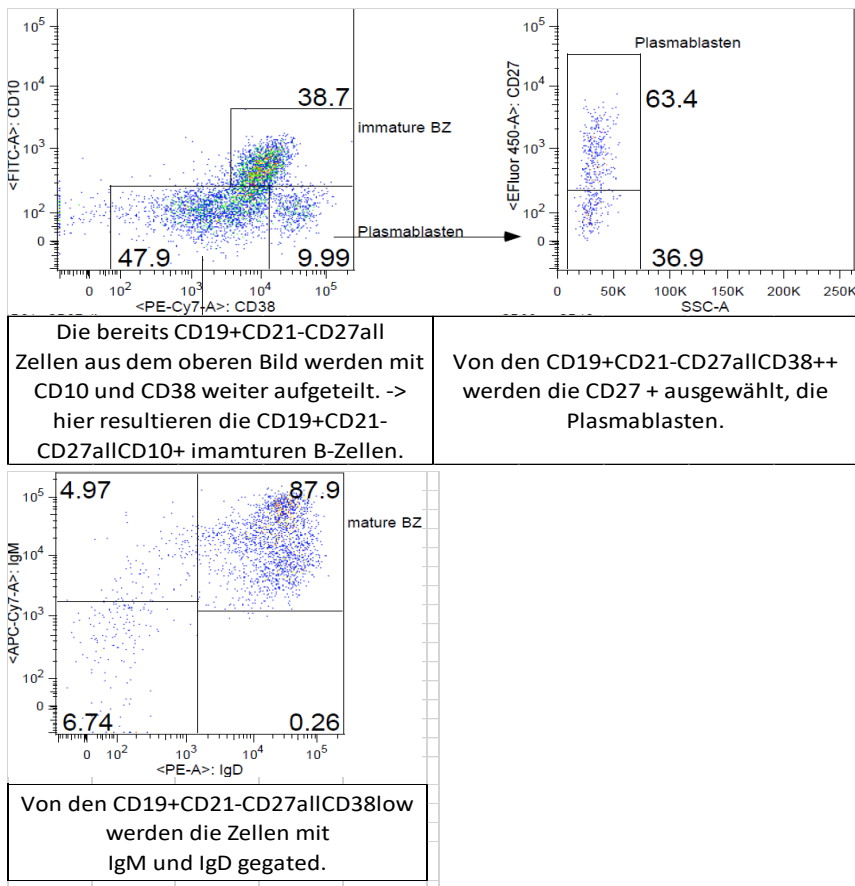


Abbildung 5: Gatingstrategie B-Zellen im peripheren Blut

Bei den Werten handelt es sich um Relativwerte, die sich immer auf die im ersten Schritt ausgewählte Lymphozyten und Monozyten, die somit 100% entsprechen, beziehen (%LM bedeutet: Anteil bezogen auf die Lymphozyten und Monozyten (LM)).

2.2.3.2 Gatingstrategie Knochenmark

2.2.3.2.1 Gatingstrategie Knochenmark Oberflächliche Färbung

Populationen für die Auswertung:

HSC und MPP	(CD45+) CD22- CD34+ CD38- CD45RA- CD7- %LM
CLP	(CD45+) CD22- CD34+ CD38+ CD45RA+ CD7+ %LM
Pro-B-Zelle	(CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM
Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen	(CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM
immature und transitionelle B-Zellen	(CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM

Tabelle 16: Populationen im oberflächlich gefärbten Knochenmark

Für die ersten Monate der Messung wurde noch kein CD45 in dem Panel der ersten beiden Populationen eingesetzt. In den neueren Messungen konnte mit einem Zwischenschritt beim Gaten auf CD45 noch einige zusätzliche nicht benötigte Zellen eliminiert werden (diese

betragen in der Regel unter 5%). In der finalen Analyse wurden die Subpopulationen dennoch auf das ursprüngliche LM-Gate bezogen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Für künftige Studien könnte man das CD45 Gate als 100% der LM verwenden, um genauere Ergebnisse zu erzielen.

HSC, MPP und CLP:

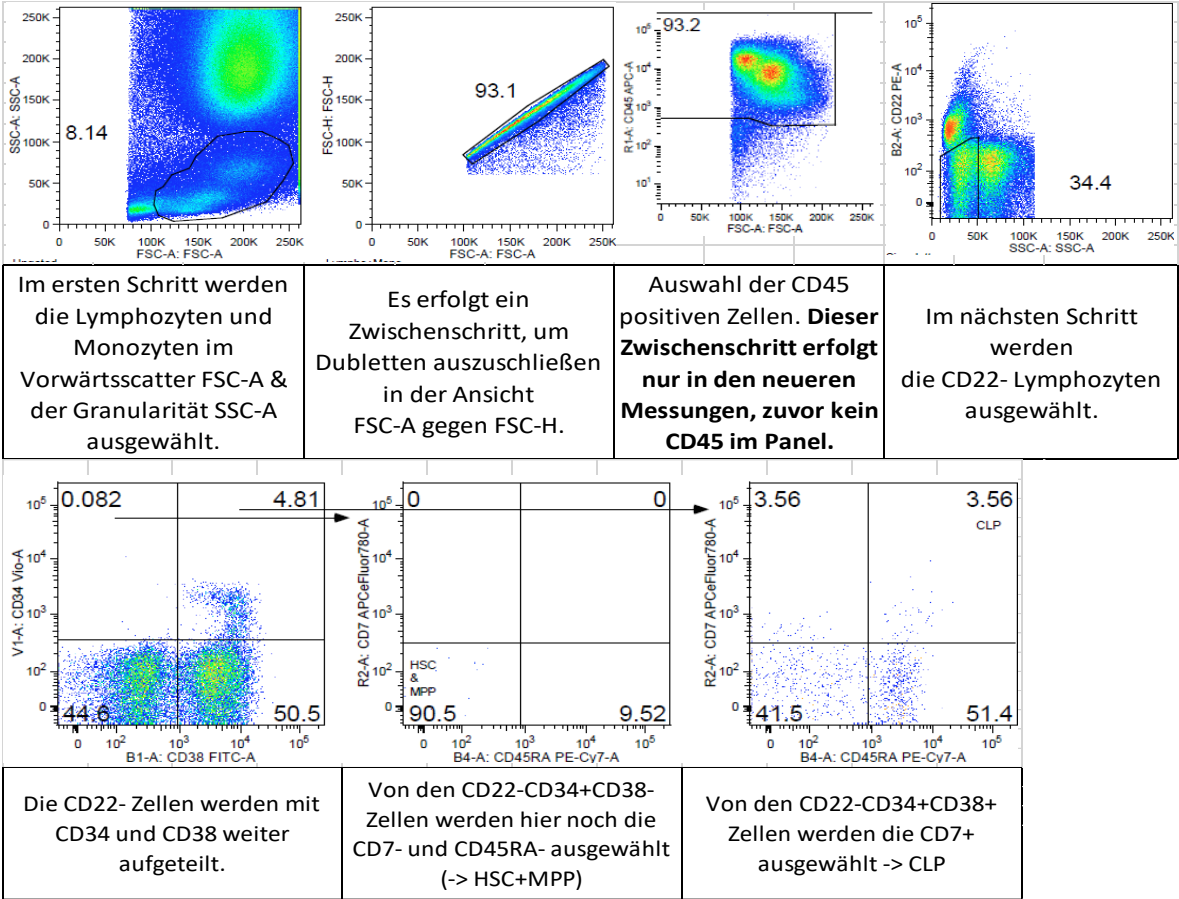


Abbildung 6: Auswertungsstrategie der HSC, MPP und CLP.

Auswertung immature und transitionelle B-Zellen, Pro B-Zellen, sowie Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen:

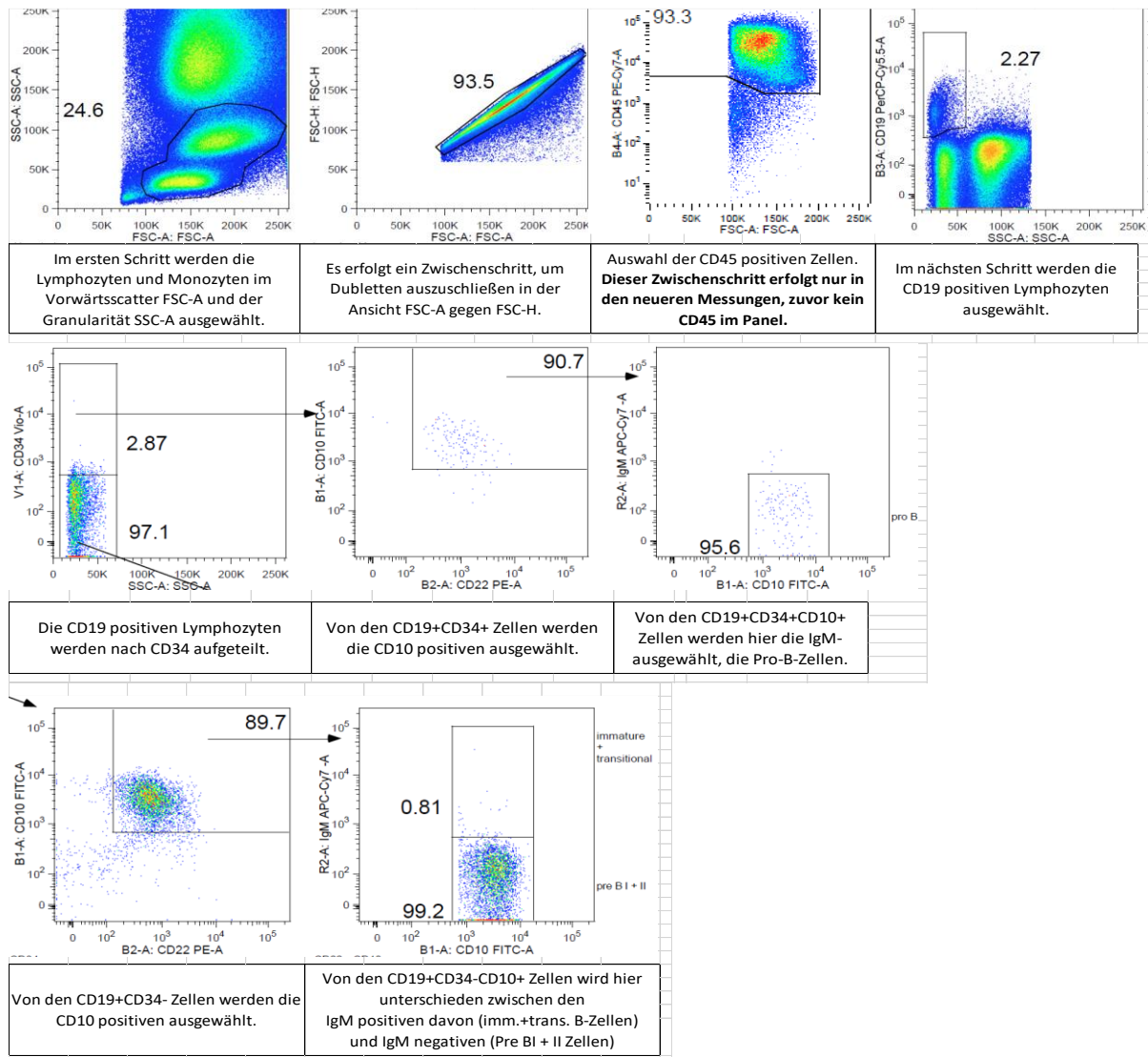


Abbildung 7: Auswertungsstrategie der immaturren und transitionellen B-Zellen, der Pro B-Zellen, sowie der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen.

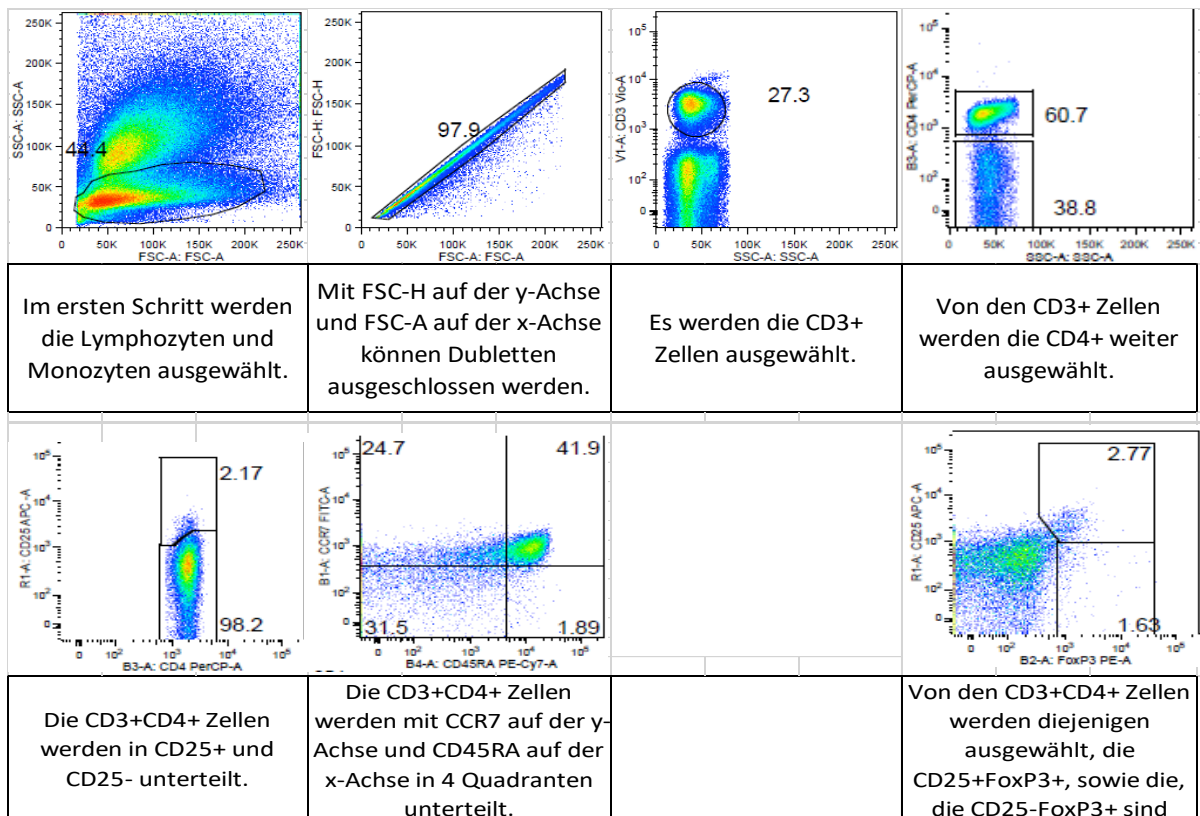
2.2.3.2 Gatingstrategie Knochenmark Intrazelluläre Färbung

Populationen für die Auswertung:

T-Zellen	CD3+ %LM
naïve CD4-T-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7+ %CD3+ CD4+
zentrale Memory CD4-T-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7+ %CD3+ CD4+
terminale Effektor CD4-T-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- %CD3+ CD4+
periphere Effektor CD4-T-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- %CD3+ CD4+
FoxP3-T-Zellen	CD3+ CD4+ FoxP3+ %CD3+ CD4+
CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD3+ CD4+ FoxP3+ CD45RA+ %CD3+ CD4+
CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD3+ CD4+ FoxP3+ CD45RA+ %CD3+ CD4+ FoxP3+
CD25niedrige FoxP3-T-Zellen	CD3+ CD4+ FoxP3+ CD25 ^{low} %CD3+ CD4+
CD25++ FoxP3-T-Zellen	CD3+ CD4+ FoxP3+ CD25++ %CD3+ CD4+

Tabelle 17: Populationen der intrazellulären Färbung

Bei den Werten handelt es sich um Relativwerte. Die Populationen beziehen sich meist auf die CD4+ T-Zellen (CD3+CD4+), somit ist das obere Gate in Schritt 4 die Ausgangspopulation und damit 100%. (%CD3CD4 bedeutet: Anteil bezogen auf die CD4+ T-Zellen). Zu Beginn beziehen sich die CD4+-T-Zellen auf das Gate der CD3+Zellen. (%CD3). Die Population der CD45RA FoxP3-T-Zellen wird zudem einmal auf die FoxP3-T-Zellen bezogen. In diesem Fall entspricht 100% den FoxP3-T-Zellen (%CD3+CD4+FoxP3 bedeutet: Anteil von den FoxP3-T-Zellen T-Zellen).



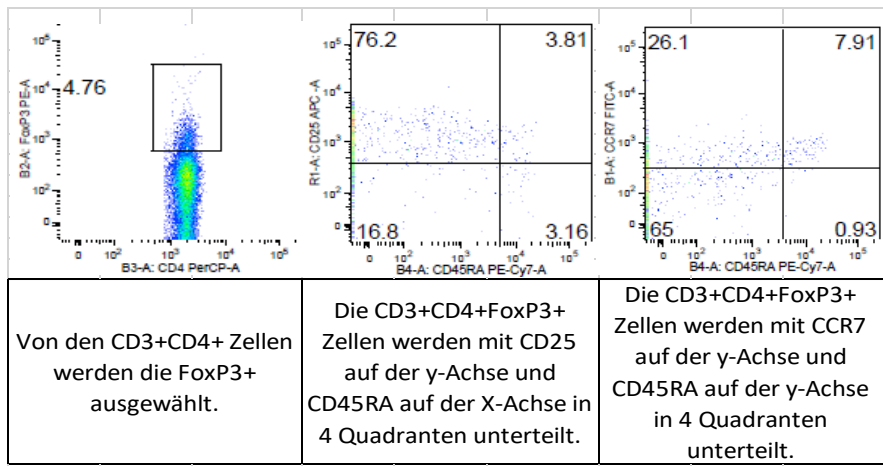


Abbildung 8: Auswertestrategie der T-Zellen in der intrazellulären Färbung im Knochenmark

2.2.4 Darstellung im Ergebnisteil

Im Ergebnisteil wurden Relativwerte einer Zellpopulation zwischen verschiedenen Patientengruppen miteinander verglichen. In den zum Überblick der Ergebnisse dargestellten Schaubildern handelt es sich stets um die Medianwerte.

2.2.5 Patienteneinteilung

Die Patienten wurden nach klinischen Merkmalen in verschiedene Gruppen eingeteilt und miteinander verglichen. Ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden diese im Text beschrieben.

2.2.6 Patienteneigenschaften

Über den Beobachtungszeitraum wurden 96 Patienten für die Studienteilnahme rekrutiert. Von diesen 96 Patienten mussten 18 Patienten aus der Analyse ausgeschlossen werden. Von diesen 18 Patienten hatten 3 ein frühes Rezidiv, 1 Patient bekam Interferon auf Grund einer Infektion und einer gleichzeitigen Epstein-Bar-Virus (EBV) -Reaktivierung, 3 Patienten entwickelten eine isolierte EBV-Reaktivierung, 2 Patienten wurden haplo-identisch transplantiert, 3 Patienten entwickelten ein Rezidiv einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), 1 Patient entwickelte eine atypische aGvHD, 1 Patient hatte eine unklare Hepatitis, 1 Patient hatte eine sekundäre Abstoßungsreaktion mit Transplantat-Verlust, 2 Patienten hatten ein schlechtes Engraftment und von einem Patienten lag lediglich eine Blutprobe vor.

Patienten mit unklarer GvHD ähnlicher Symptomatik ohne diagnostische Kriterien einer GvHD wurden ausgeschlossen, da sie keiner der o.g. Gruppen zugeordnet werden konnten. Patienten mit EBV-Reaktivierung bzw. PTLD (Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation) wurden ausgeschlossen, da eine EBV-Reaktivierung die T- und B-Zell-Regeneration nachhaltig beeinflusst.

Nach dem Ausschluss verblieben für die Auswertung 78 Patienten.

An Tag 28 lagen Proben von 51 Patienten vor. Für diese Patienten konnte der Einfluss der aGvHD untersucht werden. Für die Analyse, ob es zu diesem Zeitpunkt schon eine Assoziation zu der später auftretenden cGvHD gibt, konnten nur 41 Patienten in die Analyse eingeschlossen werden. Für 10 Patienten war diese Analyse eines prädiktiven Effektes bezüglich einer cGvHD nicht möglich, da sie innerhalb der ersten 3 Monate verstarben (n=6), einen Transplantverlust erlitten (n=2) oder ein Rezidiv entwickelten (n=2).

An Tag 90 lagen Proben von 47 Patienten vor, für die ein Einfluss der aGvHD untersucht werden konnte. Für 43 dieser Patienten konnte suffizient beurteilt werden, ob sie eine cGvHD entwickeln würden. Für die anderen 4 war eine Beurteilung nicht möglich, weil sie innerhalb der ersten 100 Tage verstarben (n=3) oder ein Transplantatverlust entwickelten (n=1). Es erfolgte daher für die verbleibenden 43 Patienten eine Analyse zum Einfluss der cGvHD erfolgte.

An Tag 180 lagen Proben von 48 Patienten vor, für die der Einfluss der aGvHD analysiert wurde. Für 3 Patienten war es nicht sicher beurteilbar, ob sie eine cGvHD entwickelten (fehlende diagnostische Symptome bzw. unspezifische Symptome, die eine cGvHD weder ausschließen noch bestätigen), so dass in die Analyse an Tag 180 für den Einfluss der cGvHD 45 Patienten eingeschlossen wurden.

In den 2 nachfolgenden Tabellen sind die klinischen Eigenschaften aller 78 Patienten aufgelistet. In Tabelle 20 finden sich die Informationen zu den Subgruppen unterteilt in: Patienten ohne aGvHD, Patienten mit einer aGvHD Grad 1 und Patienten mit einer aGvHD Grad 2 - 4. In der Tabelle 21 sind dann die klinischen Eigenschaften der Patienten aufgelistet, unterteilt in folgende Gruppen: Patienten ohne GvHD, mit de novo cGvHD, mit quiescent onset cGvHD, mit nur aGvHD Grad 1 oder nur aGvHD Grad 2 - 4. Von den insgesamt 78 Patienten konnte für 12 Patienten aus den o.g. Gründen (da sie frühzeitig verstarben (n=6),

ein Rezidiv entwickelten (n=2), eine Abstoßungsreaktion hatten (n=2) oder aus fehlenden diagnostischen Symptomen (n=3)) nicht beurteilt werden, ob sie eine cGvHD entwickelt hätten, so dass sie in dieser zweiten Tabelle nicht mit aufgelistet sind.

	keine aGVHD	aGVHD Grad 1	aGVHD Grad 2-4
Anzahl	43	7	28
Durchschnittsalter Empfänger	51,74	51,57	55,29
Durchschnittsalter Spender	37,65	32,43	38,86
Geschlecht			
weiblich	13	3	15
männlich	30	4	13
Diagnose			
akute Leukämie	19	4	19
MPS (CML, OMF, CMML)	3	0	0
malignes Lymphom	16	3	6
AA	1	0	0
MDS (inkl RAEB)	4	0	3
Krankheitsrisiko			
niedrig (CR, CP, nicht maligne)	13	1	9
mittel (1.PR, 2.CR, AP)	12	2	13
hoch (kein Ansprechen, 2.PR, >2.CR)	18	4	6
Konditionsregime			
myeloablativ	6	0	1
reduzierte Intensität	37	7	27
Beziehung zum Spender			
vewandt	15	1	7
nicht verwandt	28	6	21
HLA -Kompartibilität			
HLA-identisch	36	6	22
HLA-Diskrepanz	7	1	6
Stammzellquelle			
Knochenmark	7	0	2
Peripheres Blut	36	7	26
Immunsuppression nach HSZT			
(CyA oder FK) + MTX	35	6	18
(CyA oder FK) + MMF	5	1	8
anderes	3	0	2
ATG als Teil der Immunsuppression?			
ja	29	5	22
nein	14	2	6

Tabelle 18: klinische Daten der Patienten bei Einteilung nach Kriterium aGvHD

	keine GVHD	de novo cGVHD	quiescent onset cGVHD	nur aGVHD Grad 2-4	nur aGVHD Grad 1
Anzahl	21	16	15	11	3
Durchschnittsalter Empfänger	50,67	53,00	51,87	55,27	53,67
Durchschnittsalter Spender	37,52	38,63	37,80	38,27	29,33
Geschlecht					
weiblich	3	8	9	6	1
männlich	18	8	6	5	2
Diagnose					
akute Leukämie	10	6	10	6	2
MPS (CML, OMF, CMML)	3	7	0	0	0
malignes Lymphom	8	2	4	3	1
AA	0	1	0	0	0
MDS (inkl RAEB)	0	0	1	2	0
Krankheitsrisiko					
niedrig (CR, CP, nicht maligne)	6	5	5	4	0
mittel (1.PR, 2.CR, AP)	7	4	6	6	1
hoch (kein Ansprechen, 2.PR, >2.CR)	8	7	4	1	2
Konditionsregime					
myeloablativ	4	2	1	0	0
reduzierte Intensität	17	14	14	11	3
Beziehung zum Spender					
vewandt	5	6	5	2	0
nicht verwandt	16	10	10	9	3
HLA -Kompartibilität					
HLA-identisch	19	15	14	8	2
HLA-Diskrepanz	2	1	1	3	1
Stammzellquelle					
Knochenmark	1	2	1	1	0
Peripheres Blut	20	14	14	10	3
Immunsuppression nach HSZT					
(CyA oder FK) + MTX	18	14	12	6	3
(CyA oder FK) + MMF	2	2	1	4	0
anderes	1	0	2	1	0
ATG als Teil der Immunsuppression?					
ja	18	9	9	9	3
nein	3	7	6	2	0

Tabelle 19: klinische Daten der Patienten bei Einteilung nach Kriterium cGvHD

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse werden im nachfolgenden zunächst für jeden einzelnen Zeitpunkt dargestellt. Dabei wurde für jeden einzelnen Untersuchungszeitpunkt der Einfluss der aGvHD und cGvHD analysiert. In den Tabellen sind jeweils die MW, die Anzahl der untersuchten Patienten und die Medianwerte für alle untersuchten Populationen abgebildet.

Im Anschluss an die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungszeitpunkte gibt es unter 3.4 noch eine graphische Zusammenfassung der einzelnen Populationen und deren Entwicklung im zeitlichen Verlauf anhand ihrer ME.

Bei den dargestellten Schaubildern handelt es sich jeweils um die ME.

Alle angegebenen Werte (MW und ME) sind Relativwerte und beziehen sich auf entweder auf die LM (%LM), auf die T-Zellen (%CD3), auf die CD4+ T-Zellen (%CD3CD4) oder auf die FoxP3-T-Zellen (%CD3CD4FoxP3); (% bedeutet: bezieht sich auf die nachfolgende Population).

3.1 Auswertungen an Tag 28

An Tag 28 lagen von insgesamt 53 Patienten auswertbare Proben vor. Bei 3 Patienten lag lediglich eine Blutprobe vor (nicht erfolgte Knochenmarkpunktion bzw. Punctio sicca).

Bei mess- und auswertungstechnischen Problemen wurde zeitweise auf die Oberflächlichen - Färbung und Messung des Knochenmarks verzichtet, was die geringere Fallzahl dort erklärt. (Bei 6 Patienten lagen keine auswertbaren Messergebnisse vor.)

In der T-Zellanalyse waren die Subanalysen der CD4+ T-Zellen zum Teil aufgrund einer zu geringen Zellzahl im Knochenmark nicht möglich, so dass hier teilweise weniger Patienten (n=4) zur Auswertung zur Verfügung standen.

3.1.1 Einfluss der aGvHD an Tag 28

In einer ersten Analyse wurde der Einfluss der aGvHD auf die Zell-Populationen überprüft. Dabei wurde unterschieden, ob die Patienten bis zum Tag 35 eine aGvHD entwickelt hatten oder nicht. Falls eine aGvHD im genannten Zeitraum auftrat, erfolgte noch eine weitere

Unterscheidung, ob es sich lediglich um eine aGvHD Grad 1 gehandelt hatte oder um eine aGvHD Grad 2 - 4. Die Unterscheidung erfolgte, da bei einer aGvHD in der Regel keine histologische Sicherung erfolgte und häufig unspezifische Hautsymptome bestanden. In diesen 3 Gruppen wurden die Populationen im Blut und Knochenmark in den nachfolgenden 2 Kapiteln verglichen.

3.1.1.1 Einfluss der aGvHD an Tag 28 im peripheren Blut

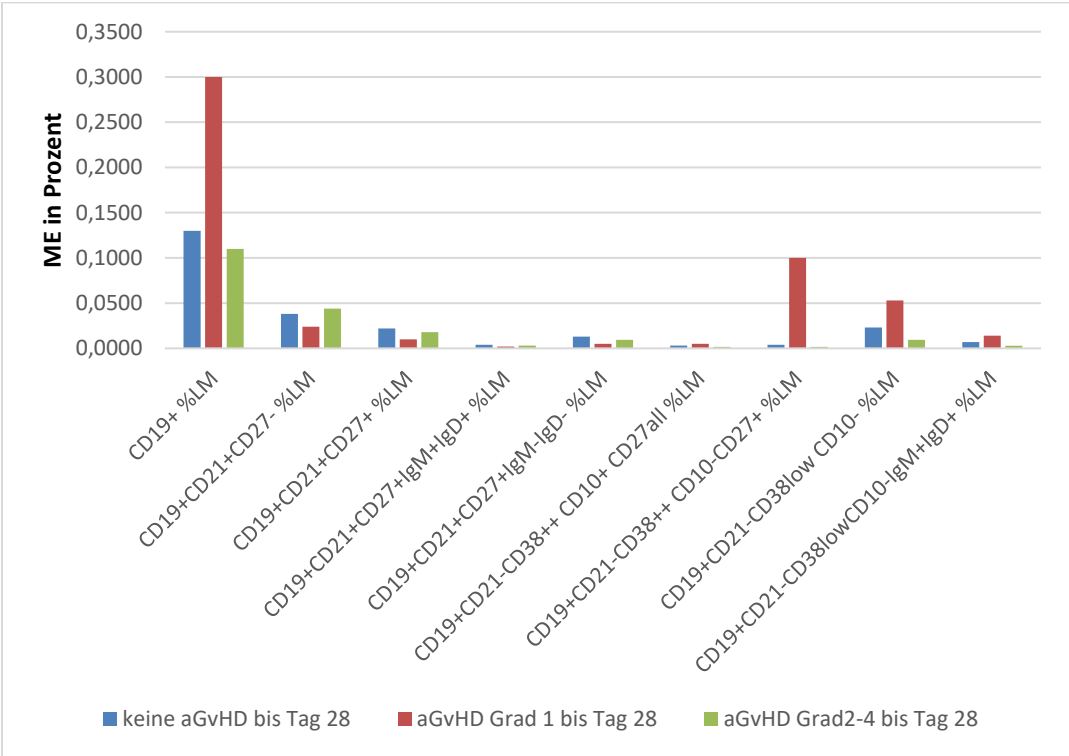


Abbildung 9: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

		B-Zellen	naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-Klassengewechselte Memory B-Zellen	Klassengewechselte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21- memory B-Zellen	CD21- IgM Memory B-Zellen
		CD19+	CD19+ CD21+ CD27-	CD19+ CD21+ CD27+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM+ IgD+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM- IgD-	CD19+ CD27 ^{alle} CD38 ⁺⁺ CD10+	CD19+ CD21- CD27+ CD38 ⁺⁺ CD10-	CD19+ CD21- CD27+ CD38 ^{low} CD10-	CD19+ CD21- CD27+ IgM+ IgD+ CD38 ^{low} CD10-
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine aGVHD bis d28	Mittelwert	0,203	0,094	0,034	0,007	0,021	0,010	0,016	0,033	0,012
	N	33	33	33	33	33	33	33	33	33
	SD	0,283	0,173	0,039	0,009	0,030	0,023	0,033	0,036	0,020
	Median	0,130	0,038	0,022	0,004	0,013	0,003	0,004	0,023	0,007
aGVHD Grad 1 bis d28	Mittelwert	0,224	0,042	0,012	0,002	0,005	0,005	0,077	0,037	0,012
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	SD	0,176	0,051	0,009	0,003	0,004	0,003	0,068	0,028	0,012
	Median	0,300	0,024	0,010	0,002	0,005	0,005	0,100	0,053	0,014
aGVHD Grad 2-4 bis d28	Mittelwert	0,285	0,133	0,049	0,009	0,032	0,004	0,021	0,049	0,020
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	SD	0,433	0,236	0,104	0,022	0,075	0,004	0,059	0,075	0,036
	Median	0,110	0,044	0,018	0,003	0,009	0,002	0,002	0,009	0,003

Tabelle 20: Einfluss der aGVHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

An Tag 28 wurden im peripheren Blut Proben von 33 Patienten ohne aGVHD, 3 Proben von Patienten mit aGVHD Grad 1 und 15 Proben von Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 untersucht.

Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen. Die Patienten mit aGVHD Grad 1 hatten einen höheren Relativwert der CD19+ B-Zellen, sowie der Plasmablasten und CD21⁻ Memory-B-Zellen bezogen auf die LM-Population.

3.1.1.2 Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark

B-Vorläuferzellen

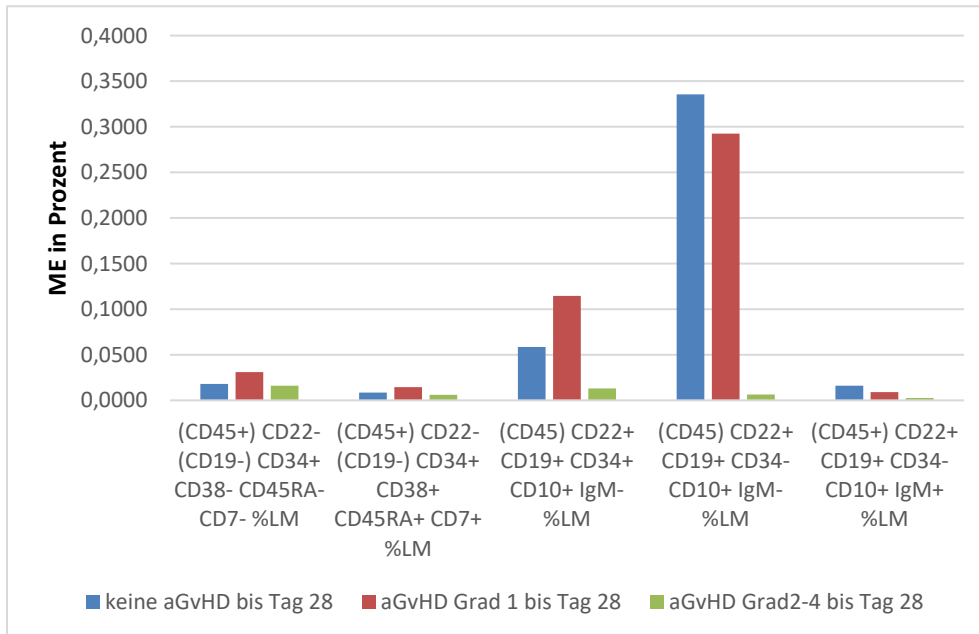


Abbildung 10: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		HSC und MPP	CLP	Pro B-Zelle	Pre-B-I- und Pre-B-II-Zellen	Immature und transitionelle B-Zellen
		(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
		CD22- CD34+ CD38- CD45RA- CD7- %LM	CD22- CD34+ CD38+ CD45RA+ CD7+ %LM	CD22+ CD34+ CD19+ CD10+ IgM- %LM	CD22+ CD34- CD19+ CD10+ IgM- %LM	CD22+ CD34- CD19+ CD10+ IgM+ %LM
keine aGvHD bis d28	Mittelwert	0,027	0,013	0,744	1,133	0,037
	N	26	26	28	28	28
	SD	0,026	0,015	1,659	2,165	0,084
	Median	0,018	0,009	0,059	0,336	0,016
aGvHD Grad 1 bis d28	Mittelwert	0,031	0,015	0,115	0,293	0,009
	N	2	2	2	2	2
	SD	0,033	0,018	0,161	0,118	0,003
	Median	0,031	0,015	0,115	0,293	0,009
aGvHD Grad 2-4 bis d28	Mittelwert	0,022	0,011	1,128	1,204	0,021
	N	13	13	12	12	12
	SD	0,020	0,015	3,474	3,541	0,054
	Median	0,016	0,006	0,013	0,006	0,003

Tabelle 21: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Für die Auswertung lagen 43 auswertbare Messungen vor, davon hatten 28 Patienten keine aGvHD, 2 Patienten eine aGvHD Grad 1 und 13 Patienten eine aGvHD Grad 2 - 4.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, die bis zum Tag 28 bereits eine aGvHD Grad 2 - 4 entwickelt hatten und Patienten ohne aGvHD. Für die Population der HSC und MPP ((CD45+)CD22-CD34+CD38-CD45RA-CD7- %LM) war der MW der Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (MW 0,022 mit p=0,00513) signifikant niedriger als bei Patienten ohne aGvHD (MW 0,027).

Der Medianwert der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45+)CD22+CD19+CD34-CD10+IgM-%LM) war signifikant niedriger bei Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,006) verglichen mit Patienten ohne aGvHD (ME 0,336 mit p=0,003).

Für die Gruppe der immaturen und transitionellen B-Zellen ((CD45+)CD22+CD19+CD34-CD10+IgM+ %LM) war der Medianwert der Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,003) signifikant vermindert im Vergleich zu Patienten ohne aGvHD (ME 0,016 mit p=0,045).

T-Zellen

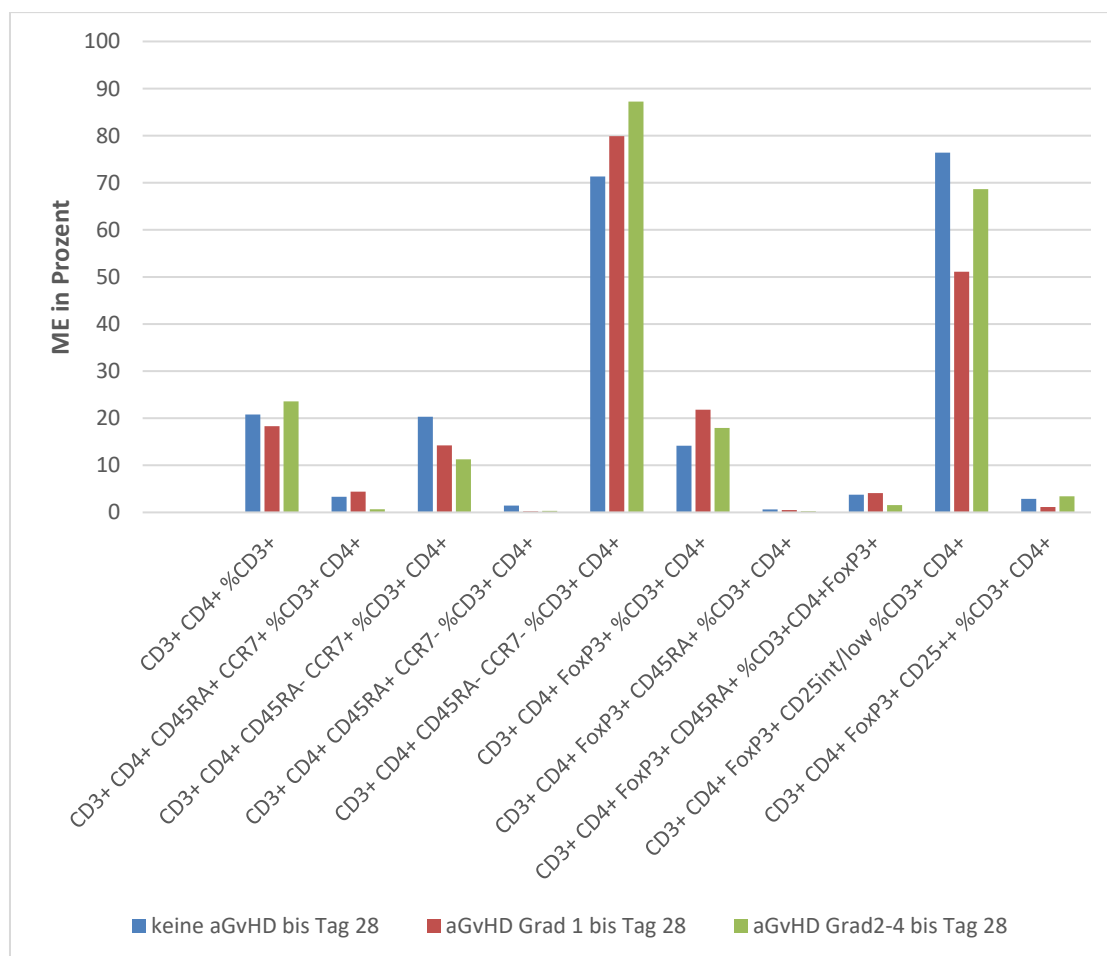


Abbildung 11: Einfluss der aGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

		CD4-T-Zellen	naive CD4-T-Zellen	zentrale Memory CD4-T-Zellen	terminale Effektor CD4-T-Zellen	periphere Effektor CD4-T-Zellen	FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD25low FoxP3-T-Zellen	CD25++ FoxP3-T-Zellen
		CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+
							FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
			CD45RA+ CCR7+	CD45RA- CCR7+	CD45RA+ CCR7-	CD45RA- CCR7-		CD45RA+ CCR7-	CD45RA+ CCR7-		CD25low
		%CD3	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4 FoxP3	%CD3 CD4	%CD3 CD4
keine aGVHD bis d28	Mittelwert	27,723	12,950	22,068	2,272	62,685	21,346	2,896	9,607	60,071	3,912
	N	30	28	28	28	28	30	30	31	28	28
	SD	22,928	16,763	15,738	2,765	28,130	20,421	9,123	14,032	33,262	3,586
	Median	20,800	3,315	20,316	1,445	71,315	14,150	0,645	3,769	76,400	2,876
aGVHD Grad 1 bis d28	Mittelwert	16,319	4,657	25,177	0,667	69,583	27,289	1,412	4,089	43,987	3,547
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	SD	4,195	4,365	19,169	0,835	22,708	18,295	1,895	3,442	36,492	4,379
	Median	18,300	4,410	14,220	0,231	79,900	21,800	0,507	4,100	51,100	1,140
aGVHD Grad 2-4 bis d28	Mittelwert	29,007	7,682	13,359	0,540	78,331	18,965	0,339	3,960	50,489	6,172
	N	16	14	14	14	14	16	16	16	16	16
	SD	20,881	17,256	8,987	0,548	22,381	15,981	0,349	6,887	38,604	7,094
	Median	23,561	0,665	11,266	0,318	87,250	17,926	0,265	1,546	68,650	3,415

Tabelle 22: Einfluss der aGVHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

Für die T-Zell-Analyse im Knochenmark lagen Proben von 30 Patienten ohne aGVHD vor, 3 Proben von Patienten mit aGVHD Grad 1 und 16 Proben von Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4.

Für Analysen der Subpopulationen war gelegentlich die Anzahl der Events zu gering, so dass keine weitere Analyse stattfand und auch hier die Fallzahl geringer wurde.

In der Betrachtung des Einflusses der aGVHD auf die T-Zellen im Knochenmark ergaben sich einige signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 bis Tag 28 und den Patienten ohne aGVHD bis dahin.

So war der Medianwert der terminalen Effektor CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- %CD3+ CD4+) für die Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,318) signifikant niedriger als für Patienten ohne aGVHD (ME 1,445 mit p=0,002).

Der Medianwert der peripheren Effektor CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- %CD3+ CD4+) war signifikant höher für Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 87,250) gegenüber den Patienten ohne aGVHD (ME 71,315 mit p=0,030).

Der Medianwert für die CD45RA FoxP3-T-Zellen (CD3+ CD4+ FoxP3+ CD45RA+ %CD3+ CD4+) war signifikant vermindert für Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,265) gegenüber Patienten ohne aGvHD (ME 0,645 mit p=0,024). Auch bezogen auf die CD3CD4FoxP3 positiven Zellen war diese Population (CD3+ CD4+ FoxP3+ CD45RA+ %CD3+ CD4+ FoxP3+) signifikant vermindert bei Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 1,546) gegenüber Patienten ohne aGvHD (ME 3,769 mit p=0,043).

3.1.2 Einfluss der cGvHD an Tag 28

In den nachfolgenden 2 Kapiteln wurden die Analysen einer möglichen Assoziation einer späteren cGvHD an Tag 28 auf die einzelnen Populationen untersucht. Die Patienten wurden dazu in folgende Gruppen eingeteilt: keine GvHD, de novo cGvHD, quiescent onset cGvHD, nur aGvHD Grad 1 und nur aGvHD Grad 2 - 4.

3.1.2.1 Einfluss der cGvHD an Tag 28 im peripheren Blut

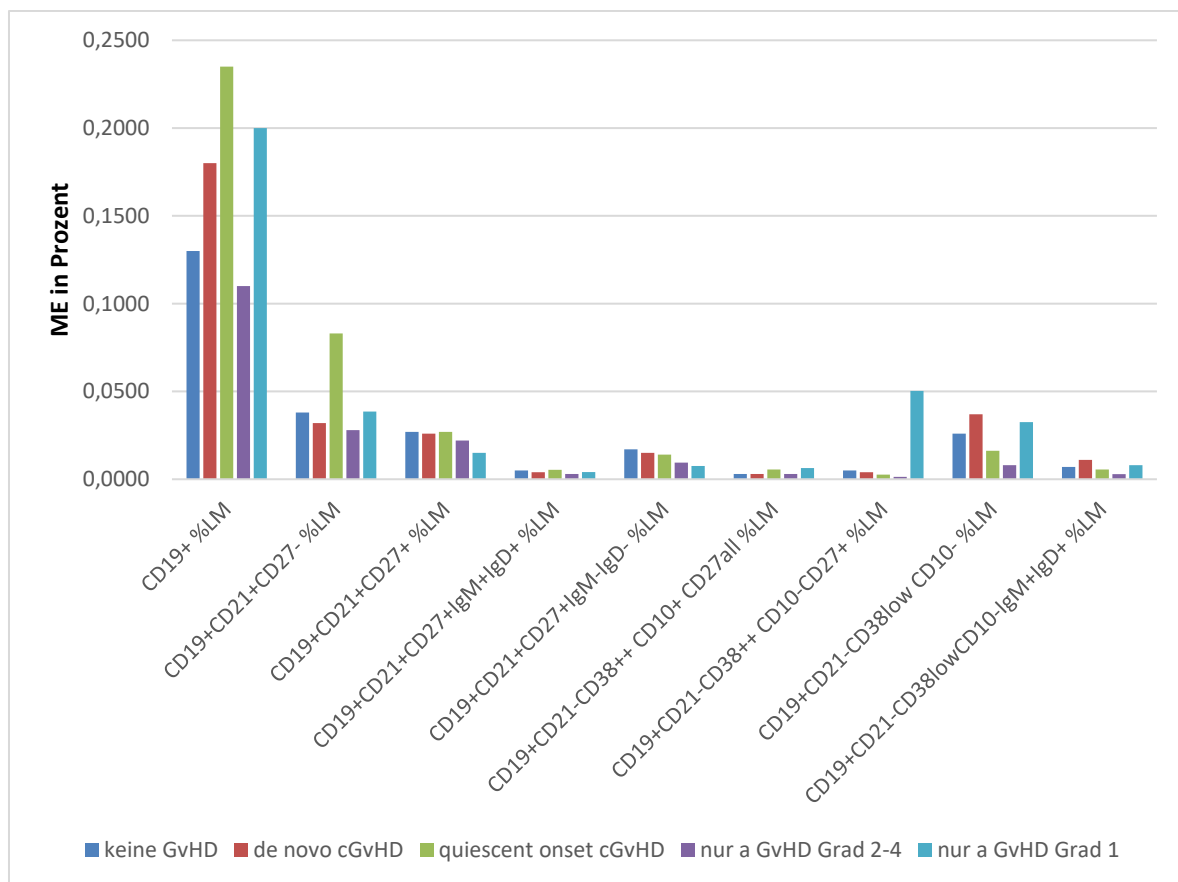


Abbildung 12: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

		B-Zellen	naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-klassengewechselte Memory B-Zellen	Klassengewechselte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21 ^{low} memory B-Zellen	CD21 ^{low} IgM Memory B-Zellen
		CD19+	CD19+ CD21+ CD27-	CD19+ CD21+ CD27+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM+ IgD+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM- IgD-	CD19+ CD21- CD27 ^{alle} CD38++ CD10+	CD19+ CD21- CD27+ CD38++ CD10-	CD19+ CD21- CD27+ CD38 ^{low} CD10-	CD19+ CD21- CD27+ IgM+ IgD+ CD38 ^{low} CD10-
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine GVHD	Mittelwert	0,204	0,095	0,043	0,007	0,030	0,006	0,015	0,032	0,011
	N	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	SD	0,229	0,143	0,052	0,008	0,045	0,008	0,025	0,034	0,016
	Median	0,130	0,038	0,027	0,005	0,017	0,003	0,005	0,026	0,007
de novo cGVHD	Mittelwert	0,293	0,140	0,033	0,009	0,018	0,019	0,027	0,052	0,022
	N	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	SD	0,413	0,255	0,026	0,011	0,013	0,039	0,051	0,045	0,027
	Median	0,180	0,032	0,026	0,004	0,015	0,003	0,004	0,037	0,011
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	0,357	0,184	0,080	0,017	0,051	0,006	0,023	0,043	0,019
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	SD	0,515	0,298	0,140	0,029	0,102	0,004	0,045	0,069	0,037
	Median	0,235	0,083	0,027	0,005	0,014	0,006	0,003	0,016	0,006
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	0,186	0,049	0,021	0,004	0,010	0,003	0,035	0,046	0,020
	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	SD	0,288	0,058	0,014	0,003	0,007	0,004	0,086	0,084	0,037
	Median	0,110	0,028	0,022	0,003	0,009	0,003	0,001	0,008	0,003
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	0,200	0,039	0,015	0,004	0,008	0,006	0,050	0,033	0,008
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	SD	0,141	0,021	0,007	0,003	0,004	0,002	0,070	0,030	0,008
	Median	0,200	0,039	0,015	0,004	0,008	0,006	0,050	0,033	0,008

Tabelle 23: Einfluss der cGVHD an Tag 28 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Im peripheren Blut lagen wie oben erwähnt Proben von 53 Patienten vor. Für eine mögliche Assoziation der cGVHD konnten jedoch nur 41 davon analysiert werden, da für die anderen 12 Patienten nicht beurteilt werden konnte, ob sie eine cGVHD entwickelt hätten, beispielsweise weil sie zuvor verstarben. In der Analyse für die Assoziation der cGVHD lagen keine signifikanten Unterschiede am Tag 28 vor. Es zeigten sich weniger CD19+ B-Zellen für die Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,110) bezogen auf die LM im Vergleich zu den anderen Gruppen (keine aGVHD ME 0,130; de novo cGVHD ME 0,180; quiescent onset cGVHD ME 0,235; aGVHD Grad 1 ME 0,200). Für die naiven und transitionellen B-Zellen (CD19+ CD21+ CD27- %LM) zeigten sich höhere Relativwerte für die Patienten mit quiescent onset cGVHD (ME 0,083) im Vergleich zu den anderen Patientengruppen (keine aGVHD ME 0,038; de novo

cGvHD ME 0,032; nur aGvHD Grad 2 - 4 ME 0,028; aGvHD Grad 1 ME 0,039). Für die Zellpopulation der Plasmablasten (CD19+ CD21- CD38++ CD10- CD27+ %LM) lagen die Relativwerte der Patienten mit nur aGvHD Grad 1 (ME 0,050) höher als in den anderen Gruppen (keine aGvHD ME 0,003; de novo cGvHD ME 0,004; quiescent onset cGvHD ME 0,003; aGvHD Grad 2 - 4 ME 0,001). Die CD21- Memory B-Zellen (CD19+ CD21- CD38low CD10- %LM) zeigten verminderte Werte für die Patientengruppen der Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,003), sowie die Patienten mit quiescent onset cGvHD (ME 0,006; keine aGvHD ME 0,007; de novo cGvHD ME 0,011; aGvHD Grad 1 ME 0,008).

3.1.2.2 Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark

B-Vorläuferzellen

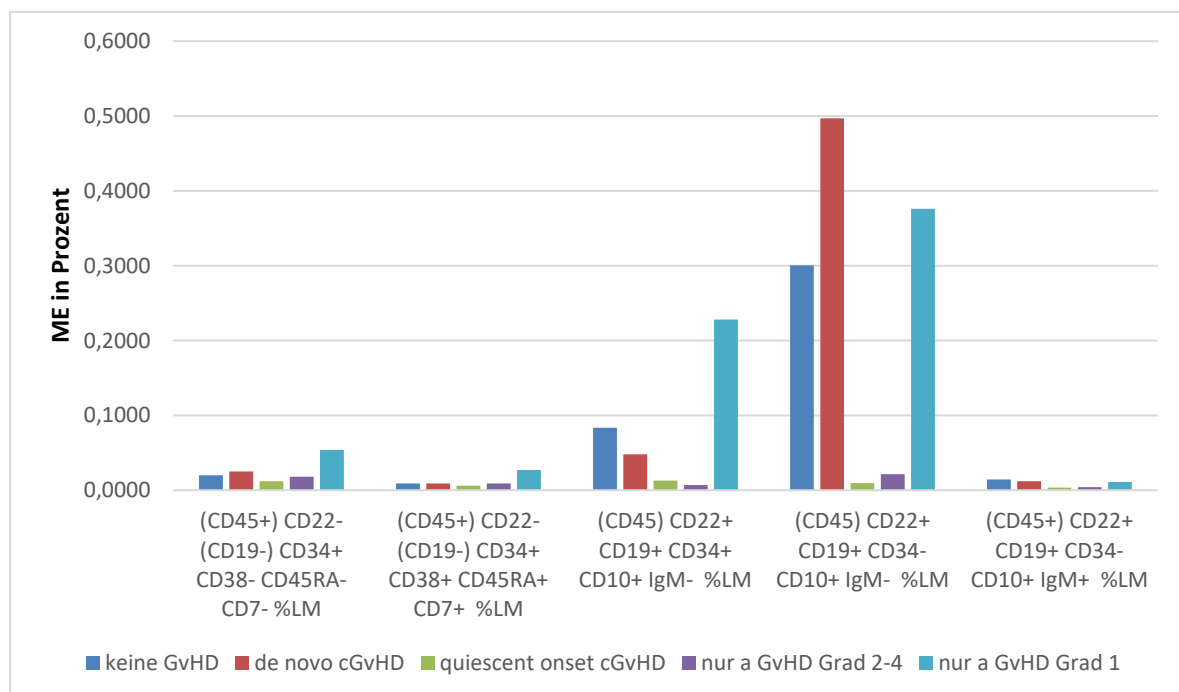


Abbildung 13: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		HSC und MPP	CLP	Pro B-Zelle	Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen	Immature und transitionelle B-Zellen
		(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
		CD22-	CD22-	CD22+	CD22+	CD22+
		CD34+	CD34+	CD34+	CD34-	CD34-
		CD38-	CD38+	CD19+	CD19+	CD19+
		CD45RA-	CD45RA+	CD10+	CD10+	CD10+
		CD7-	CD7+	IgM-	IgM-	IgM+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine GVHD	Mittelwert	0,030	0,014	0,715	0,398	0,023
	N	11	11	12	12	12
	SD	0,025	0,018	1,245	0,398	0,024
	Median	0,020	0,009	0,084	0,301	0,015
de novo cGVHD	Mittelwert	0,025	0,014	0,451	1,889	0,068
	N	9	9	9	9	9
	SD	0,015	0,011	0,905	3,072	0,145
	Median	0,025	0,009	0,048	0,497	0,012
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	0,033	0,011	1,281	1,141	0,016
	N	6	6	6	6	6
	SD	0,042	0,016	3,107	2,683	0,033
	Median	0,012	0,006	0,013	0,010	0,004
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	0,025	0,016	1,681	1,807	0,030
	N	7	7	8	8	8
	SD	0,020	0,018	4,232	4,297	0,065
	Median	0,018	0,009	0,007	0,022	0,004
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	0,054	0,027	0,228	0,376	0,011
	N	1	1	1	1	1
	SD					
	Median	0,054	0,027	0,228	0,376	0,011

Tabelle 24: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Auch für die Vorläufer-Zellen im Knochenmark lagen in der Analyse für eine mögliche Assoziation der cGvHD keine signifikanten Unterschiede an Tag 28 vor. Es zeigten sich jedoch durchgehend verminderte Werte für die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4, sowie Patienten mit quiescent onset cGvHD im Vergleich zu den anderen Patientengruppen.

T-Zellen

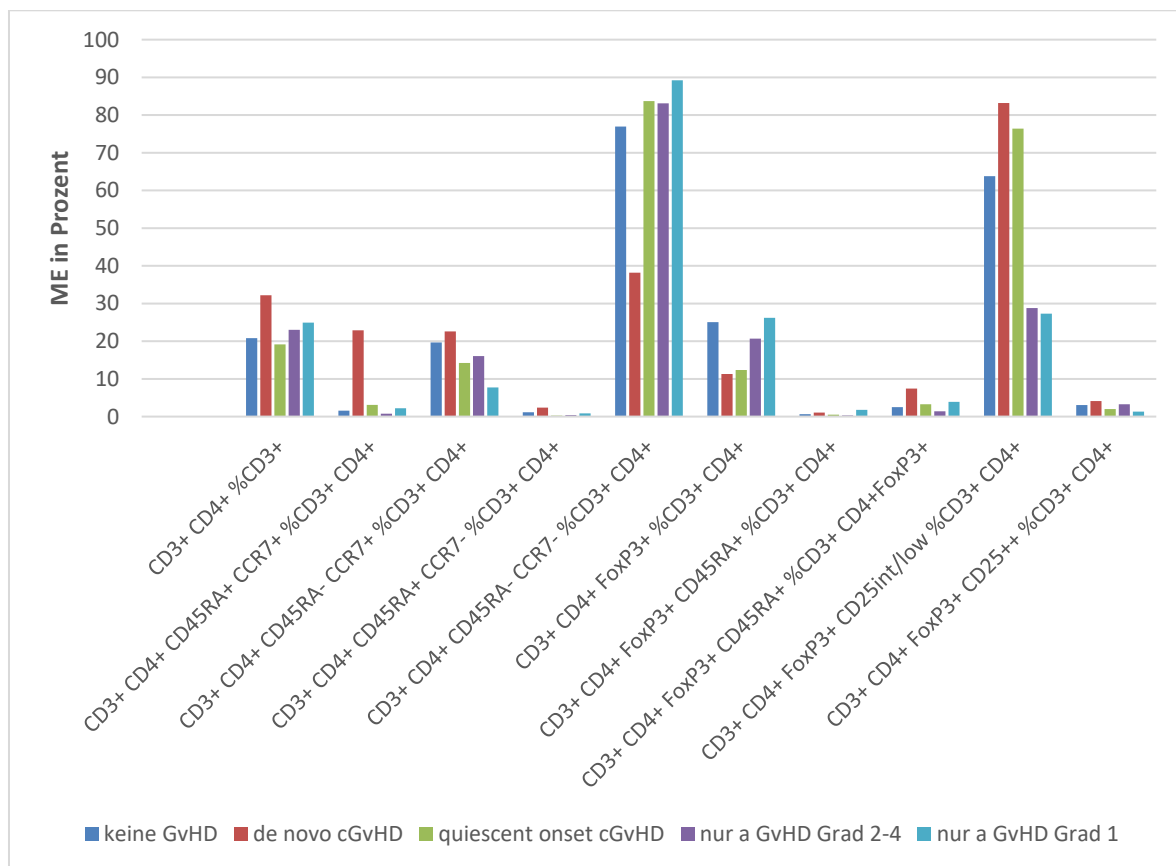


Abbildung 14: Einfluss der cGvHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

		CD4-T-Zellen	naive CD4-T-Zellen	zentrale Memory CD4-T-Zellen	terminale Effektor CD4-T-Zellen	periphere Effektor CD4-T-Zellen	FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD25 ^{low} FoxP3-T-Zellen	CD25 ⁺⁺ FoxP3-T-Zellen
		CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+
		CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+
							FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
			CD45RA+ CCR7+	CD45RA- CCR7+	CD45RA+ CCR7-	CD45RA- CCR7-		CD45RA+	CD45RA+	CD25 ^{low}	CD25 ⁺⁺
		%CD3	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4 FoxP3	%CD3 CD4	%CD3 CD4
keine GVHD	Mittelwert	24,253	7,482	22,629	2,435	67,449	25,521	5,092	11,652	58,902	4,150
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	SD	20,343	11,819	19,506	3,845	28,492	19,725	14,199	18,639	30,688	4,231
	Median	20,800	1,565	19,670	1,155	76,957	25,055	0,650	2,520	63,800	3,040
de novo cGVHD	Mittelwert	35,651	22,306	23,194	2,814	51,670	20,795	2,212	10,954	73,588	4,747
	N	9	7	7	7	7	9	9	10	7	7
	SD	24,405	19,767	12,705	1,946	25,086	26,642	3,199	13,249	31,273	3,883
	Median	32,200	22,885	22,580	2,370	38,170	11,300	1,062	7,437	83,200	4,140
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	28,737	11,256	17,107	0,912	70,803	15,732	0,541	6,854	70,323	3,065
	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	SD	21,294	22,196	14,514	1,226	29,162	10,519	0,425	9,658	30,473	2,799
	Median	19,156	3,090	14,220	0,255	83,700	12,366	0,507	3,285	76,400	2,010
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	32,509	7,640	15,763	0,669	75,837	22,354	0,306	2,377	42,024	7,346
	N	9	7	7	7	7	9	9	9	9	9
	SD	25,408	12,097	8,767	0,796	18,130	18,995	0,286	2,796	40,408	8,878
	Median	23,022	0,770	16,050	0,380	83,100	20,700	0,290	1,388	28,800	3,280
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	24,937	2,205	7,723	0,849	89,202	26,219	1,802	3,906	27,296	1,306
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	SD	9,387	3,118	8,877	1,105	13,155	30,379	2,529	5,120	33,664	0,234
	Median	24,937	2,205	7,723	0,849	89,202	26,219	1,802	3,906	27,296	1,306

Tabelle 25: Einfluss der cGVHD an Tag 28 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

In der Analyse des Einflusses der cGVHD auf die T-Zellen im Knochenmark zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Werten der Patienten mit de novo cGVHD.

So lag der MW der terminalen Effektor CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- %CD3+ CD4+) für die Patienten mit de novo cGVHD (MW 2,814) signifikant höher sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGVHD (MW 0,912 mit p=0,049), als auch gegenüber Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 (MW 0,669 mit p=0,019).

Der Medianwert für die CD45RA FoxP3-T-Zellen (CD3+ CD4+ FoxP3+ CD45RA+ %CD3+ CD4+) war signifikant vermindert für Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,290) im Vergleich zu Patienten mit de novo cGVHD (ME 1,062 mit p=0,031). Auch bezogen auf die CD3CD4FoxP3

positiven Zellen war diese Population (CD3+ CD4+ FoxP3+ CD45RA+ %CD3+ CD4+ FoxP3+) signifikant vermindert für die die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 1,388) im Vergleich zu den Patienten mit de novo cGvHD (ME 7,437 mit $p=0,028$).

3.2 Auswertungen an Tag 90

An Tag 90 lagen von insgesamt 47 Patienten auswertbare Proben vor. Bei 5 Patienten lag lediglich eine Blutprobe vor (nicht erfolgte Knochenmarkspunktion).

3.2.1 Einfluss der aGvHD an Tag 90

In einer ersten Analyse wurde der Einfluss der aGvHD auf die Zell-Populationen überprüft. Dabei wurde unterschieden, ob die Patienten bis zum Tag 97 eine aGvHD entwickelt hatten oder nicht. Falls sie eine aGvHD entwickelt hatten wurde noch unterschieden, ob es sich lediglich um eine aGvHD Grad 1 gehandelt hatte oder um eine aGvHD Grad 2 - 4. In diesen 3 Gruppen wurden die Populationen im Blut und Knochenmark in den nachfolgenden 2 Kapiteln verglichen.

3.2.1.1 Einfluss der aGvHD an Tag 90 im peripheren Blut

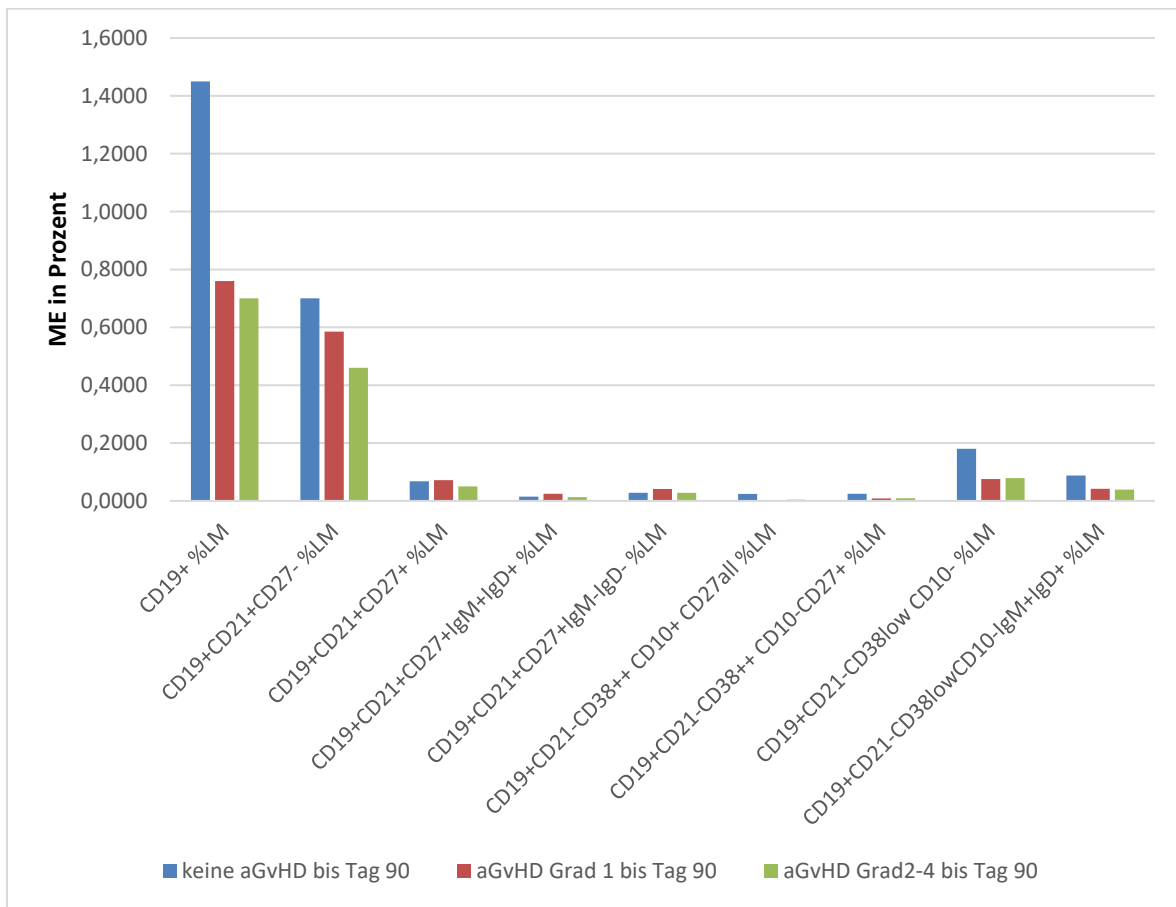


Abbildung 15: Einfluss der aGvHD an Tag 90 im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

		B-Zellen	naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-klassengewechselte Memory B-Zellen	Klassengewechselte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21- Memory B-Zellen	CD21- IgM Memory B-Zellen
		CD19+	CD19+ CD21+ CD27-	CD19+ CD21+ CD27+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM+ IgD+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM- IgD-	CD19+ CD21- CD27 ^{alle}	CD19+ CD21- CD27+	CD19+ CD21- CD27+	CD19+ CD21- CD27+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine aGVHD bis d90	Mittelwert	3,767	1,657	0,123	0,028	0,076	0,226	0,062	1,082	0,763
	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	SD	7,286	2,472	0,138	0,035	0,090	0,501	0,101	4,077	2,955
	Median	1,450	0,700	0,068	0,015	0,028	0,024	0,025	0,180	0,088
aGVHD Grad 1 bis d90	Mittelwert	0,760	0,585	0,072	0,025	0,042	0,000	0,009	0,076	0,042
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	SD	0,212	0,177	0,034	0,021	0,012	0,000	0,002	0,005	0,016
	Median	0,760	0,585	0,072	0,025	0,042	0,000	0,009	0,076	0,042
aGVHD Grad 2-4 bis d90	Mittelwert	2,239	1,710	0,115	0,044	0,056	0,021	0,025	0,314	0,201
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	SD	5,242	4,763	0,168	0,099	0,092	0,045	0,049	0,705	0,634
	Median	0,370	0,190	0,049	0,011	0,020	0,002	0,003	0,063	0,023

Tabelle 26: Einfluss der aGVHD an Tag 90 im peripheren Blut, ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Für die B-Zellen im peripheren Blut waren die Werte in der Regel am höchsten bei Patienten ohne aGVHD, gefolgt von Patienten mit aGVHD Grad 1 und schließlich von Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4.

Für die Population der immaturren B-Zellen (CD19+CD21-CD38⁺⁺CD10+CD27^{all}) war dieser Unterschied signifikant höher für Patienten ohne aGVHD (ME 0,024), sowohl im Vergleich zu Patienten mit aGVHD Grad 1 (ME 0,000 mit p=0,011), als auch im Vergleich zu Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,002 mit p=0,004).

3.2.1.2 Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark

B-Vorläuferzellen

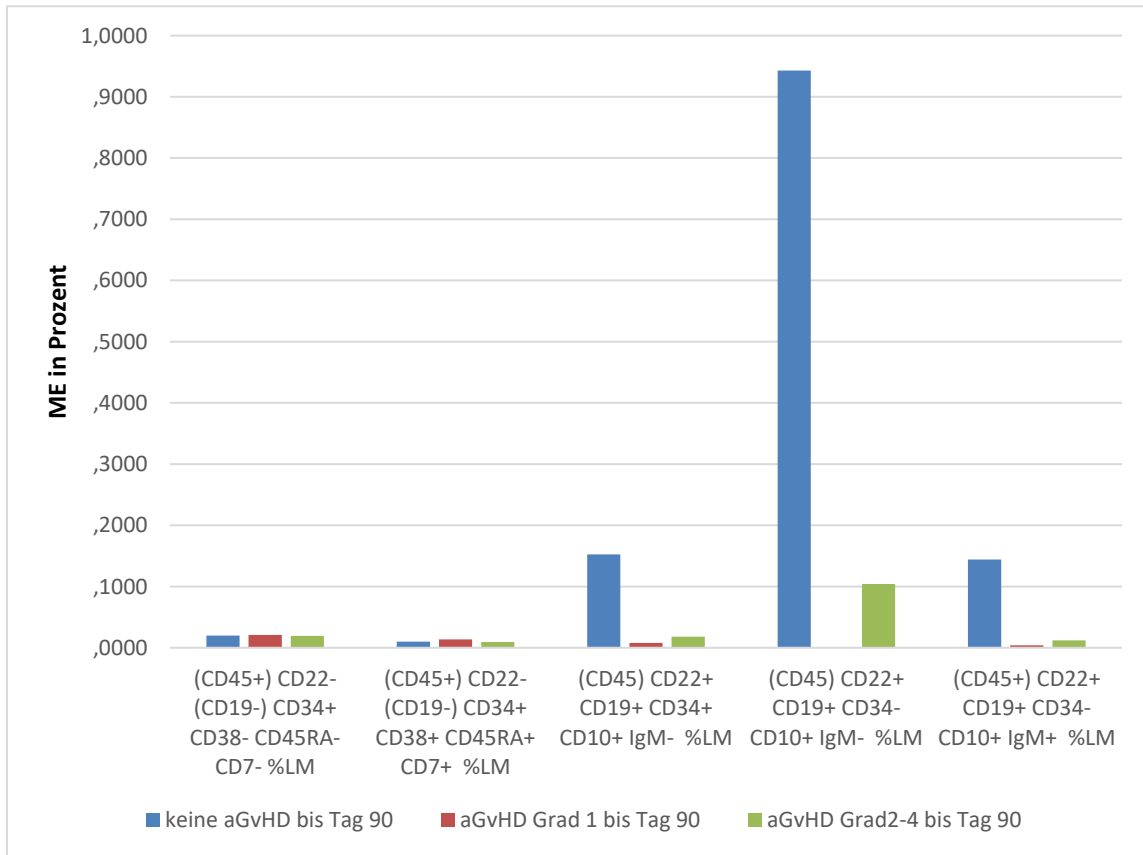


Abbildung 16: Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		HSC und MPP	CLP	Pro B-Zelle	Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen	Immature und transitionelle B-Zellen
		(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
		CD22-	CD22-	CD22+	CD22+	CD22+
		CD34+	CD34+	CD34+	CD34-	CD34-
		CD38-	CD38+	CD19+	CD19+	CD19+
		CD45RA-	CD45RA+	CD10+	CD10+	CD10+
		CD7-	CD7+	IgM-	IgM-	IgM+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine aGVHD bis d90	Mittelwert	0,021	0,014	0,699	3,432	0,861
	N	23	23	24	24	24
	SD	0,016	0,012	1,420	5,380	1,661
	Median	0,020	0,010	0,153	0,943	0,144
aGVHD Grad 1 bis d90	Mittelwert	0,021	0,014	0,008	0,001	0,004
	N	2	2	1	1	1
	SD	0,017	0,012			
	Median	0,021	0,014	0,008	0,001	0,004
aGVHD Grad 2-4 bis d90	Mittelwert	0,042	0,014	0,008	0,054	0,005
	N	15	15	14	14	14
	SD	0,057	0,012	0,009	0,137	0,005
	Median	0,019	0,009	0,005	0,003	0,003

Tabelle 27: Einfluss der aGVHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen, ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Im Knochenmark lagen an Tag 90 für die ersten Vorläuferzellen, die Populationen der HSC und MPP, sowie der CLP ähnliche Werte für Patienten mit oder ohne aGVHD bis Tag 90 vor.

Für die nächste Reifungsstufe, die Population der Pro-B-Zelle ((CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM) lagen die Werte bei Patienten mit aGVHD deutlich niedriger. Für die Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,005) waren die Medianwerte signifikant vermindert im Vergleich zu Patienten ohne aGVHD (ME 0,153 mit $p < 0,000$); (aGVHD Grad 1 ME 0,008).

Die anschließende Übergruppe der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM) zeigte ebenfalls deutlich verminderte Medianwerte für Patienten mit aGVHD. Die Werte der Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,003) waren signifikant vermindert im Vergleich zu Patienten ohne aGVHD (ME 0,943 mit $p = 0,000$); (aGVHD Grad 1 ME 0,001).

Auch in der nachfolgend gemessenen Reifungsstufe, der Population aus immaturren und transitionellen B-Zellen ((CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM) waren die Medianwerte der Patienten mit aGvHD vermindert. Für die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,003) waren die Medianwerte signifikant vermindert im Vergleich zu Patienten ohne aGvHD (ME 0,144 mit p=0,000); (aGvHD Grad 1 ME 0,004).

T-Zellen

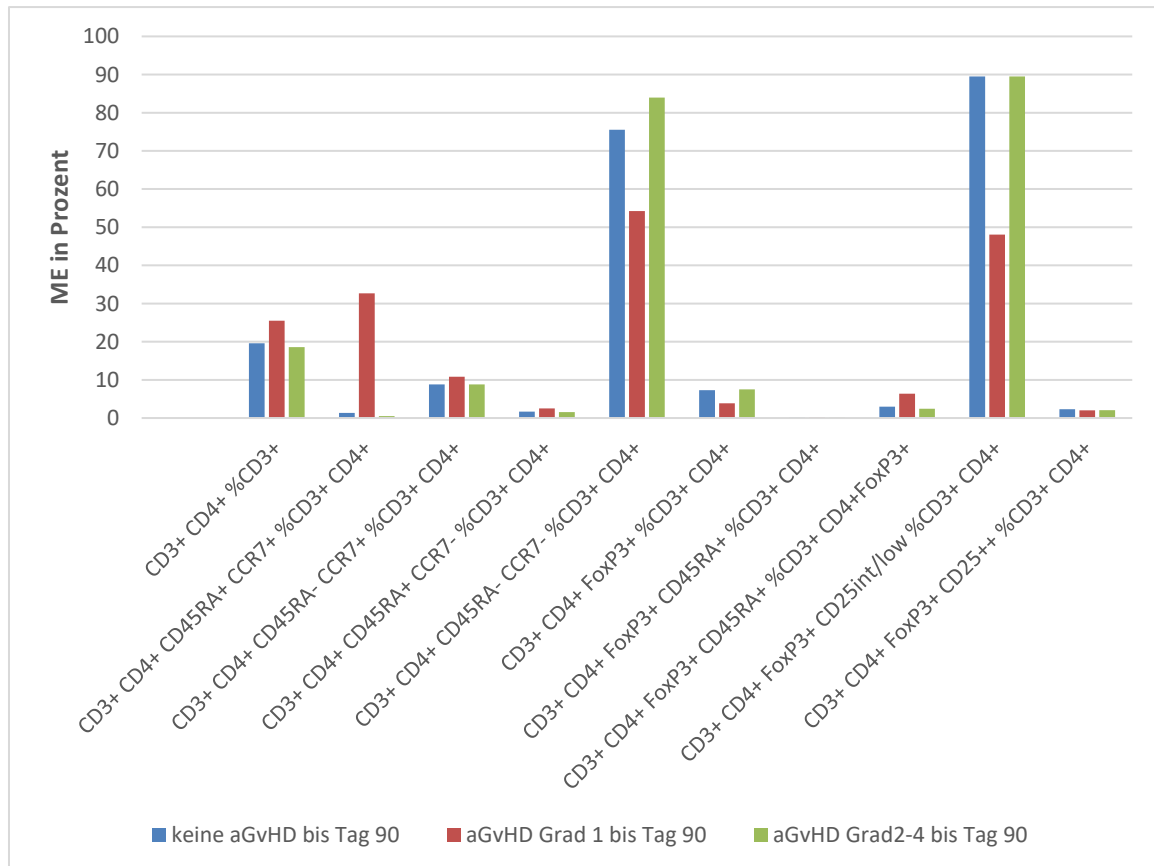


Abbildung 17: Einfluss der aGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

		CD4- T-Zellen	naive CD4- T-Zellen	zentrale Memory CD4- T-Zellen	terminale Effektor CD4- T-Zellen	periphere Effektor CD4- T-Zellen	FoxP3- T-Zellen	CD45RA FoxP3- T-Zellen	CD45RA FoxP3- T-Zellen	CD25low FoxP3- T-Zellen	CD25++ FoxP3- T-Zellen
		CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+
		CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+
							FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
			CD45RA+ CCR7+	CD45RA- CCR7+	CD45RA+ CCR7-	CD45RA- CCR7-		CD45RA+	CD45RA+	CD25low	CD25++
		%CD3	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4 FoxP3	%CD3 CD4	%CD3 CD4
keine aGVHD bis d90	Mittelwert	26,758	11,400	12,272	8,857	67,470	8,532	2,052	13,787	71,919	2,429
	N	25	24	24	24	24	24	25	25	24	24
	SD	19,904	17,601	11,052	22,033	30,791	5,606	5,311	22,469	35,712	2,002
	Median	19,600	1,325	8,819	1,670	75,530	7,287	0,190	2,981	89,500	2,285
aGVHD Grad 1 bis d90	Mittelwert	25,501	32,665	10,812	2,530	54,213	3,859	0,242	6,356	48,065	2,006
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	SD	20,649	45,997	6,013	1,166	52,859	0,087	0,277	7,329	66,094	1,281
	Median	25,501	32,665	10,812	2,530	54,213	3,859	0,242	6,356	48,065	2,006
aGVHD Grad 2-4 bis d90	Mittelwert	20,424	8,341	8,946	1,745	80,820	12,904	0,323	3,232	70,622	4,897
	N	15	14	14	14	14	15	15	15	15	15
	SD	17,424	18,984	7,112	1,529	24,718	8,157	0,437	3,587	35,295	7,027
	Median	15,071	0,456	8,415	0,896	89,440	10,400	0,100	1,375	88,000	1,430

Tabelle 28: Einfluss der aGVHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

Für die Analyse der T-Zellen lagen an Tag 90 keine signifikanten Unterschiede vor.

3.2.2 Einfluss der cGVHD an Tag 90

Von den 47 an Tag 90 vorliegenden Proben konnten 4 Proben für den Einfluss der cGVHD nicht mit ausgewertet werden, weil 3 Patienten verstarben und 1 Patient einen Transplantverlust entwickelte, bevor beurteilt werden konnte, ob diese Patienten eine cGVHD entwickelt hätten.

3.2.2.1 Einfluss der cGvHD an Tag 90 im peripheren Blut

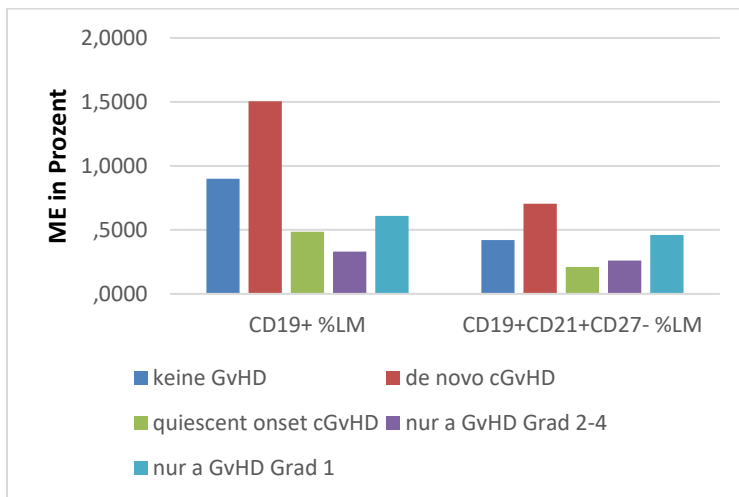


Abbildung 18: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im peripheren Blut auf die CD19+ und CD19+CD27- B-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

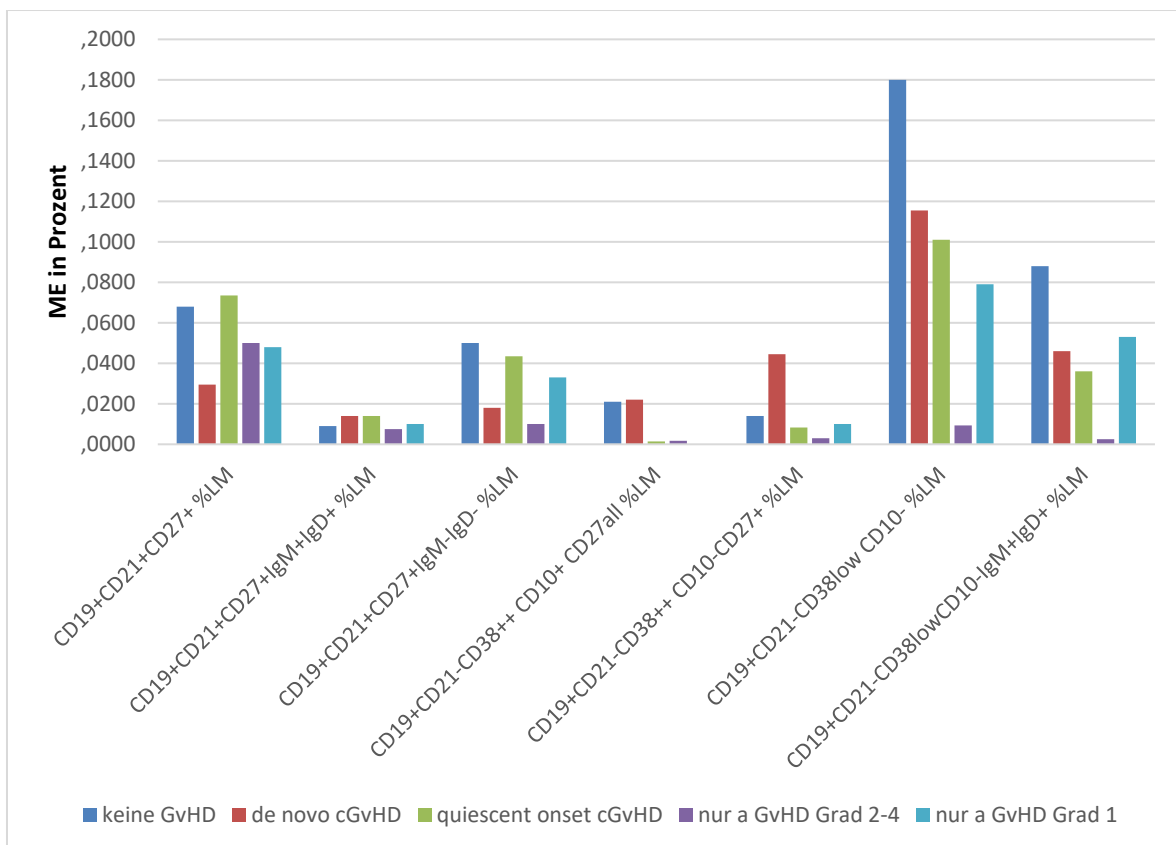


Abbildung 19: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im peripheren Blut auf die CD19+CD27+ B-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		B-Zellen	naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-klassengewechelte Memory B-Zellen	klassengewechelte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21- Memory B-Zellen	CD21- IgM Memory B-Zellen
		CD19+	CD19+ CD21+ CD27-	CD19+ CD21+ CD27+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM+ IgD+	CD19+ CD21+ CD27+ IgM- IgD-	CD19+ CD21- CD27 _{alle}	CD19+ CD21- CD27+	CD19+ CD21- CD27+	CD19+ CD21- CD27+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine GVHD	Mittelwert	4,517	1,848	0,127	0,027	0,083	0,170	0,048	1,453	1,019
	N	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	SD	8,721	2,869	0,138	0,033	0,093	0,430	0,070	4,943	3,584
	Median	0,900	0,420	0,068	0,009	0,050	0,021	0,014	0,180	0,088
de novo cGVHD	Mittelwert	1,323	0,696	0,102	0,028	0,058	0,111	0,091	0,252	0,189
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	SD	0,835	0,534	0,152	0,043	0,091	0,179	0,149	0,340	0,294
	Median	1,505	0,705	0,030	0,014	0,018	0,022	0,045	0,116	0,046
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	0,920	0,320	0,097	0,020	0,066	0,003	0,026	0,437	0,345
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	SD	1,245	0,279	0,088	0,019	0,068	0,006	0,052	0,946	0,890
	Median	0,485	0,210	0,074	0,014	0,044	0,001	0,008	0,101	0,036
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	1,846	1,533	0,109	0,081	0,017	0,034	0,012	0,111	0,070
	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	SD	2,953	2,557	0,183	0,162	0,019	0,063	0,021	0,167	0,115
	Median	0,330	0,260	0,050	0,008	0,010	0,002	0,003	0,009	0,003
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	0,610	0,460	0,048	0,010	0,033	0,000	0,010	0,079	0,053
	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	SD									
	Median	0,610	0,460	0,048	0,010	0,033	0,000	0,010	0,079	0,053

Tabelle 29: Einfluss der cGVHD an Tag 90 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Für die Einflussnahme der cGVHD an Tag 90 zeigte die Analyse aus dem peripheren Blut die höchsten Werte für die Gruppe der Patienten mit de novo cGVHD bei den naiven und transitionellen B-Zellen (CD19+CD27-CD21+). Es lagen für diese Population aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor (keine GvHD ME 0,420; de novo cGVHD ME 0,705; quiescent onset cGVHD ME 0,210; nur aGVHD Grad 2 - 4 ME 0,260; nur aGVHD Grad 1 ME 0,460).

In den Subpopulationen der CD27+ B-Zellen (also CD19+CD27+ und Subgruppen) zeigten die Gruppen mit aGVHD niedrigere Werte.

Die Medianwerte der Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 zeigten für die CD21-Memory B-Zellen (CD19+ CD21- CD38^{low} CD10- %LM) (ME 0,009; keine GvHD ME 0,180; de novo cGVHD ME 0,116; quiescent onset cGVHD ME 0,101; aGVHD Grad 1 ME 0,079) und die CD21⁻ IgM Memory B-Zellen (CD19+ CD21- CD38^{low} CD10- IgM+ IgD+ %LM) (ME 0,003; keine GvHD ME 0,088; de

novo cGvHD ME 0,046; quiescent onset cGvHD ME 0,036; aGvHD Grad 1 ME 0,053) sehr viel niedrigere Werte als in den anderen Gruppen, der Unterschied war aber zu keiner der anderen Gruppen signifikant.

Für die Population der unreifen B-Zellen (CD19+ CD21- CD38++ CD10+ CD27all %LM) zeigte die Gruppen mit aGvHD deutlich niedrigere Werte. Signifikant war dieser Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten mit de novo cGvHD (ME 0,022) und Patienten der Gruppe quiescent onset cGvHD (0,001 mit $p=0,001$) (keine GvHD ME 0,021; aGvHD Grad 2 - 4 ME 0,002; aGvHD Grad 1 ME 0,000).

3.2.2.2 Einfluss der cGvHD an Tag 90 im Knochenmark

B-Vorläuferzellen

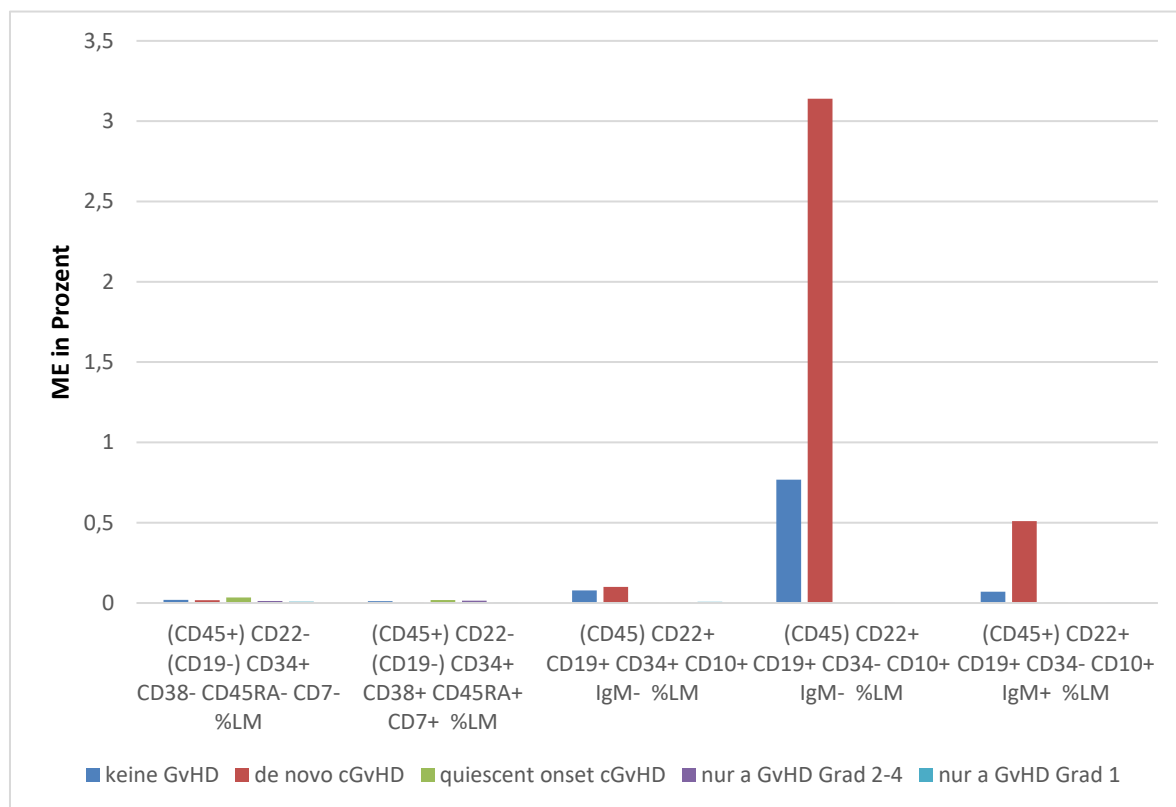


Abbildung 20: Einfluss der cGvHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		HSC und MPP	CLP	Pro B-Zelle	Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen	Immature und transitionelle B-Zellen
		(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
		CD22-	CD22-	CD22+	CD22+	CD22+
		CD34+	CD34+	CD34+	CD34-	CD34-
		CD38-	CD38+	CD19+	CD19+	CD19+
		CD45RA-	CD45RA+	CD10+	CD10+	CD10+
		CD7-	CD7+	IgM-	IgM-	IgM+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine GVHD	Mittelwert	0,021	0,016	0,833	3,221	0,907
	N	17	17	17	17	17
	SD	0,017	0,013	1,664	6,069	1,956
	Median	0,020	0,012	0,078	0,768	0,070
de novo cGVHD	Mittelwert	0,019	0,006	0,328	3,413	0,645
	N	6	6	7	7	7
	SD	0,012	0,005	0,440	3,807	0,660
	Median	0,018	0,005	0,100	3,140	0,510
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	0,045	0,018	0,008	0,089	0,006
	N	9	9	8	8	8
	SD	0,051	0,013	0,010	0,178	0,005
	Median	0,035	0,019	0,005	0,002	0,006
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	0,014	0,013	0,007	0,008	0,002
	N	5	5	4	4	4
	SD	0,009	0,008	0,009	0,009	0,002
	Median	0,013	0,015	0,004	0,005	0,002
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	0,009	0,005	0,008	0,001	0,004
	N	1	1	1	1	1
	SD					
	Median	0,009	0,005	0,008	0,001	0,004

Tabelle 30: Einfluss der cGVHD an Tag 90 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Für die erste Population, die HSC und MPP ((CD45+) CD22- CD34+ CD38- CD45RA- CD7- %LM) lagen zwischen den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede vor (keine GvHD ME 0,021; de novo cGVHD ME 0,018; quiescent onset cGVHD ME 0,035; aGVHD Grad 2 - 4 ME 0,013; aGVHD Grad 1 ME 0,009).

Für die Population der CLP ((CD45+) CD22- CD34+ CD38+ CD45RA+ CD7+ %LM) lagen die Werte für Patienten mit de novo cGVHD niedriger bei Patienten ohne GvHD. Da in beiden Gruppen eine Normalverteilung vorliegt wurden sie mit ihren MW verglichen, wobei der MW der Patienten ohne GvHD (MW 0,016) signifikant höher war als bei Patienten mit de novo cGVHD (MW 0,006 mit p=0,017).

Für die nächste Reifungsstufe, die Population der Pro-B-Zelle ((CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM) war der Medianwert der Patienten mit de novo cGvHD (ME 0,100) am höchsten, gefolgt vom Medianwert der Patienten ohne GvHD (ME 0,078), dann von Patienten mit quiescent cGvHD (ME 0,005) und schließlich den Patienten mit nur aGvHD (Grad 2 - 4 ME 0,004; Grad 1 ME 0,008). Signifikant war dieser Unterschied zwischen den Patienten mit de novo cGvHD und den Patienten mit quiescent cGvHD (mit $p=0,029$). Signifikant höher war der Medianwert der Patienten ohne GvHD sowohl gegenüber Patienten mit quiescent cGvHD (mit $p=0,005$), als auch gegenüber Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (mit $p=0,024$).

Bei der anschließenden Übergruppe der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen (CD22+CD34-CD19+CD10+IgM-) war der Medianwert am höchsten für Patienten mit de novo cGvHD (ME 3,140), gefolgt von Patienten ohne GvHD (ME 0,768), dann von Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,005), dann von Patienten mit quiescent cGvHD (ME 0,002) und schließlich von Patienten mit nur aGvHD Grad 1 (ME 0,001). Signifikant höher war der Medianwert der Patienten mit de novo cGvHD sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD (mit $p=0,021$), als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (mit $p=0,042$). Der Medianwert der Patienten ohne GvHD war signifikant höher sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD (mit $p=0,003$), als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (mit $p=0,018$).

In der nachfolgend gemessenen Stufe, der Population aus immaturren und transitionellen B-Zellen ((CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM) war der Medianwert der Patienten mit de novo cGvHD (ME 0,510) am höchsten, gefolgt von Patienten ohne GvHD (ME 0,070), dann von Patienten mit quiescent cGvHD (ME 0,006) und schließlich den Patienten mit nur aGvHD (Grad 1 ME 0,004; Grad 2 ME 0,002). Signifikant höher war der MW der Patienten mit de novo cGvHD gegenüber den Patienten mit quiescent onset cGvHD (mit $p=0,043$). Der Medianwert der Patienten mit de novo cGvHD war signifikant höher als der Medianwert der Patienten mit aGvHD Grad 2 – 4 (mit $p=0,012$). Der Medianwert der Patienten ohne GvHD war signifikant höher sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD (mit $p=0,023$), als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (mit $p=0,024$).

T-Zellen

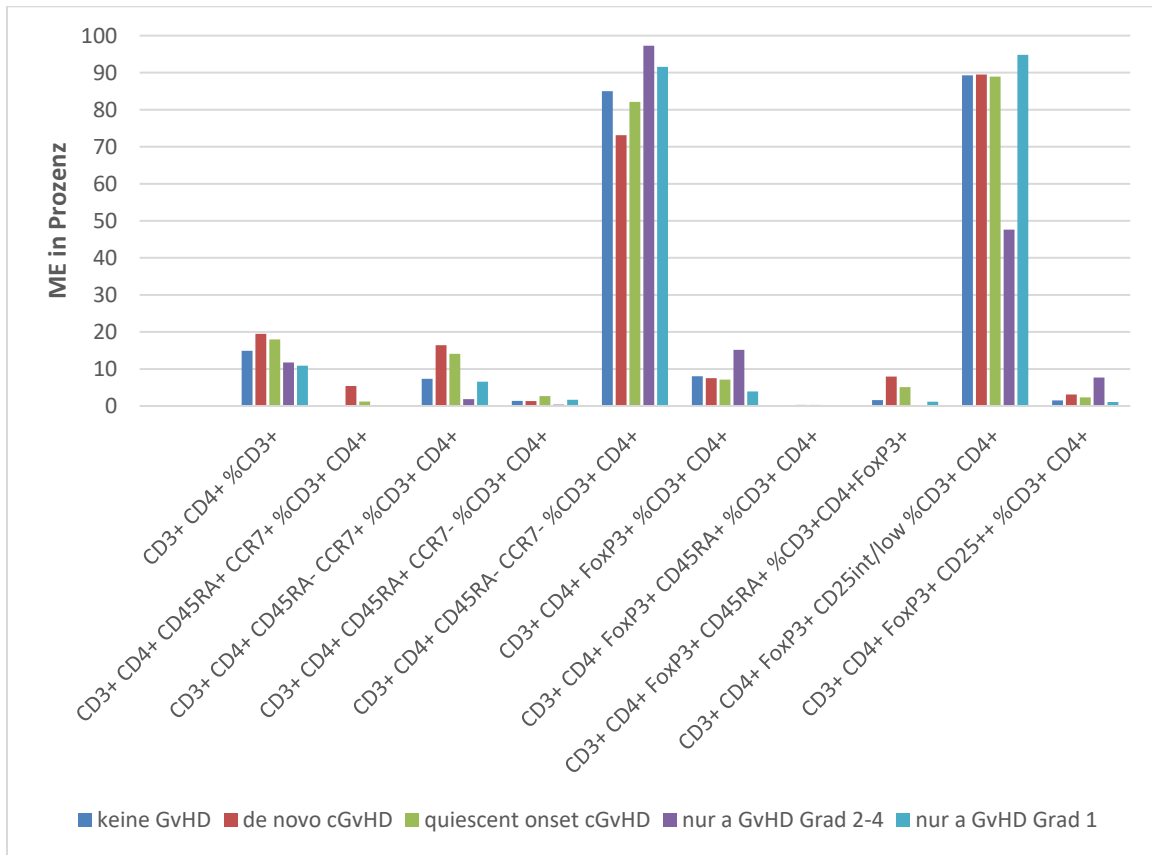


Abbildung 21: Einfluss der cGVHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

		CD4-T-Zellen	naive CD4-T-Zellen	zentrale Memory CD4-T-Zellen	terminale Effektor CD4-T-Zellen	periphere Effektor CD4-T-Zellen	FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD25low FoxP3-T-Zellen	CD25++ FoxP3-T-Zellen
		CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+	CD3+ CD4+
							FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
			CD45RA+ CCR7+	CD45RA- CCR7+	CD45RA+ CCR7-	CD45RA- CCR7-		CD45RA+	CD45RA+	CD25low	CD25++
		%CD3	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4 FoxP3	%CD3 CD4	%CD3 CD4
keine GVHD	Mittelwert	25,587	7,688	9,786	11,628	70,895	9,429	1,238	13,921	74,852	2,265
	N	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	SD	20,264	14,437	9,522	25,861	31,313	6,237	2,769	25,983	33,052	2,083
	Median	14,900	0,190	7,340	1,380	85,000	8,060	0,126	1,583	89,300	1,510
de novo cGVHD	Mittelwert	26,384	18,004	16,657	2,026	63,307	9,015	3,785	13,237	61,737	3,229
	N	8	7	7	7	7	7	8	8	7	7
	SD	20,194	23,514	12,730	1,738	31,533	7,856	8,610	13,948	42,045	1,903
	Median	19,472	5,420	16,437	1,350	73,140	7,510	0,320	7,975	89,500	3,107
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	24,530	18,081	12,582	2,493	66,702	9,115	0,392	5,101	71,281	3,433
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	SD	20,831	27,160	6,304	1,484	31,314	4,778	0,464	4,498	36,591	3,732
	Median	18,000	1,219	14,102	2,680	82,090	7,145	0,319	5,081	88,950	2,320
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	14,013	0,074	1,894	0,363	97,600	15,754	0,049	1,044	48,336	9,964
	N	4	3	3	3	3	4	4	4	4	4
	SD	10,718	0,065	1,171	0,351	1,569	11,818	0,057	1,779	51,797	11,787
	Median	11,736	0,097	1,860	0,388	97,290	15,153	0,048	0,243	47,644	7,706
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	10,900	0,141	6,560	1,705	91,590	3,920	0,046	1,173	94,800	1,100
	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	SD										
	Median	10,900	0,141	6,560	1,705	91,590	3,920	0,046	1,173	94,800	1,100

Tabelle 31: Einfluss der cGVHD an Tag 90 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

Bei der Analyse der T-Zellen in Bezug auf die cGVHD gab es nur zwischen der Gruppe der Patienten mit quiescent onset cGVHD und den Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 signifikante Unterschiede.

Signifikant höher war der Medianwert der Patienten mit quiescent onset cGVHD (ME 1,219) im Vergleich zu Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,097 mit p=0,028) für die Population der naiven CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7+ %CD3+ CD4+). Das galt auch für die Population der zentralen Memory CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7+ %CD3+ CD4+) (quiescent onset cGVHD ME 14,102; nur aGVHD Grad 2 - 4 ME 1,860 mit p=0,049) , sowie für

die Population der terminalen Effektor CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- %CD3+ CD4+) (quiescent onset cGvHD ME 2,680; nur aGvHD Grad 2 - 4 ME 0,388 mit p=0,049).

Der Medianwert der peripheren Effektor CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- %CD3+ CD4+) war hingegen signifikant höher für die Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (ME 97,290) im Vergleich zu den Patienten mit quiescent onset cGvHD (ME 82,090 mit p=0,007).

3.3 Auswertungen an Tag 180

3.3.1 Einfluss der aGvHD an Tag 180

An Tag 180 lagen von insgesamt 48 Patienten auswertbare Proben vor. Bei 3 Patienten lag lediglich eine Blutprobe vor (nicht erfolgte Knochenmarksmessung).

3.3.1.1 Einfluss der aGvHD an Tag 180 im peripheren Blut

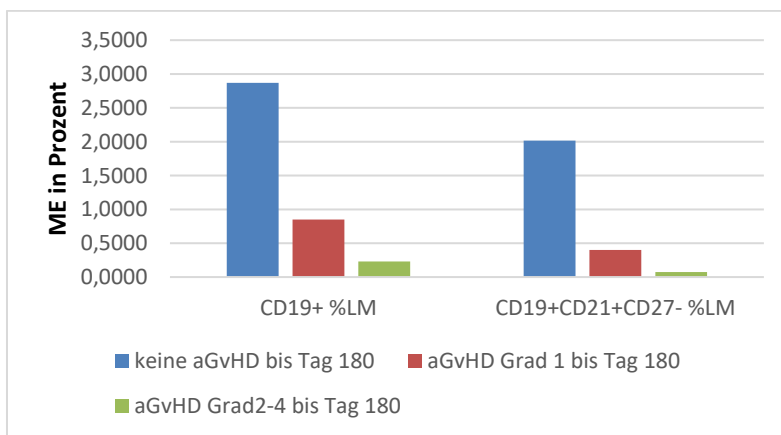


Abbildung 22: Einfluss der aGvHD an Tag 180 auf die CD19+ und CD19+CD27- B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

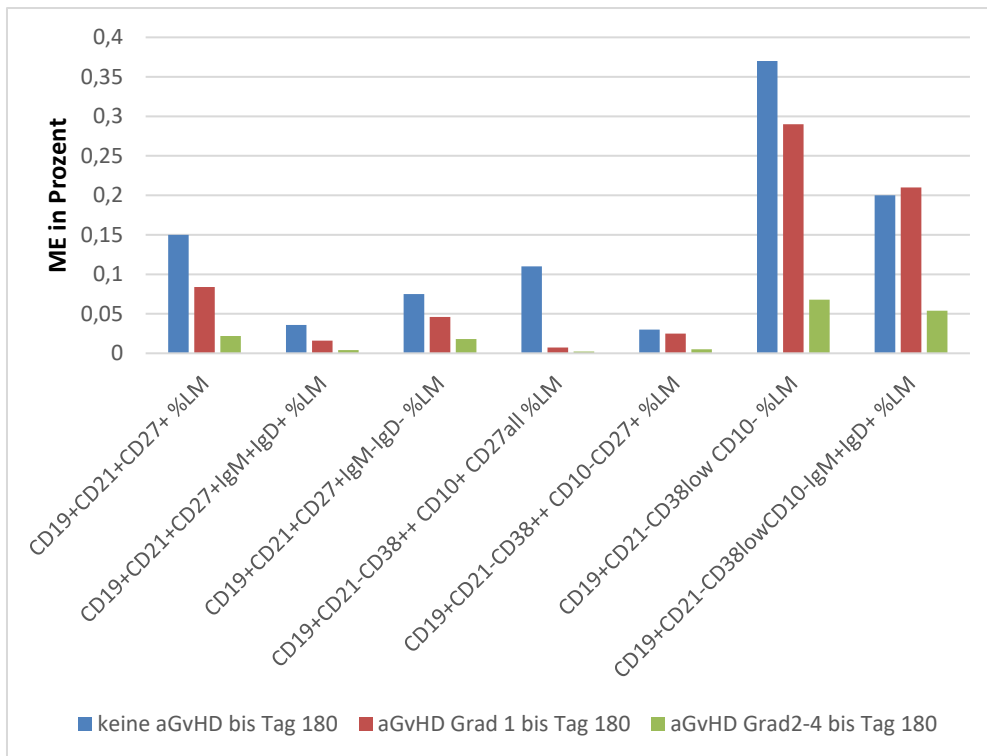


Abbildung 23: Einfluss der aGVHD an Tag 180 auf die CD19+CD27+ B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

		B-Zellen	naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-klassengewechselte Memory B-Zellen	klassengewechselte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21- Memory B-Zellen	CD21- IgM Memory B-Zellen
		CD19+	CD19+ CD21+	CD19+ CD21+	CD19+ CD21+ CD27+	CD19+ CD21+ CD27+	CD19+ CD21- CD27alle	CD19+ CD21- CD27+	CD19+ CD21- CD27+	CD19+ CD21- CD27+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine aGVHD bis d180	Mittelwert	4,529	3,382	0,174	0,051	0,088	0,287	0,114	0,466	0,228
	N	26	26	26	25	25	26	26	26	25
	SD	4,781	4,095	0,159	0,057	0,093	0,510	0,188	0,423	0,248
	Median	2,870	2,015	0,150	0,036	0,075	0,110	0,030	0,370	0,200
aGVHD Grad 1 bis d180	Mittelwert	0,877	0,405	0,087	0,021	0,056	0,010	0,027	0,312	0,187
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	SD	0,618	0,348	0,052	0,023	0,047	0,012	0,029	0,210	0,150
	Median	0,850	0,400	0,084	0,016	0,046	0,007	0,025	0,290	0,210
aGVHD Grad 2-4 bis d180	Mittelwert	1,695	1,143	0,137	0,048	0,066	0,010	0,022	0,343	0,284
	N	17	17	17	17	17	17	17	17	16
	SD	3,971	3,595	0,222	0,134	0,103	0,016	0,035	0,603	0,565
	Median	0,230	0,075	0,022	0,004	0,018	0,002	0,005	0,068	0,054

Tabelle 32: Einfluss der aGVHD an Tag 180 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Im peripheren Blut gab es an Tag 180 in der Prüfung des Einflusses der aGvHD signifikant niedrigere Werte für die Patienten die bis dahin eine aGvHD Grad 2 - 4 entwickelt hatten im Vergleich zu den Patienten ohne aGvHD.

Der Medianwert der B-Zellen (CD19+ %LM) war für die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,230) signifikant vermindert im Vergleich zu Patienten ohne aGvHD (ME 2,870 mit $p=0,011$); (aGvHD Grad 1 ME 0,850).

Der Medianwert der naiven und transitionellen B-Zellen (CD19+ CD21+ CD27- %LM) war signifikant niedriger für die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,075) im Vergleich zu Patienten ohne aGvHD (ME 2,015 mit $p=0,009$); (aGvHD Grad 1 ME 0,400).

Der Medianwert der immaturen B-Zellen (CD19+ CD21- CD38++ CD10+ CD27all %LM) war signifikant niedriger für die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,002) im Vergleich zu Patienten ohne aGvHD (ME 0,110 mit $p=0,003$); (aGvHD Grad 1 ME 0,007).

Auch der Medianwert der Plasmablasten (CD19+ CD21- CD38++ CD10- CD27+ %LM) war signifikant niedriger für die Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,005) verglichen mit Patienten ohne aGvHD (ME 0,030 mit $p=0,044$); (aGvHD Grad 1 ME 0,025).

3.3.1.2 Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark

B-Vorläuferzellen

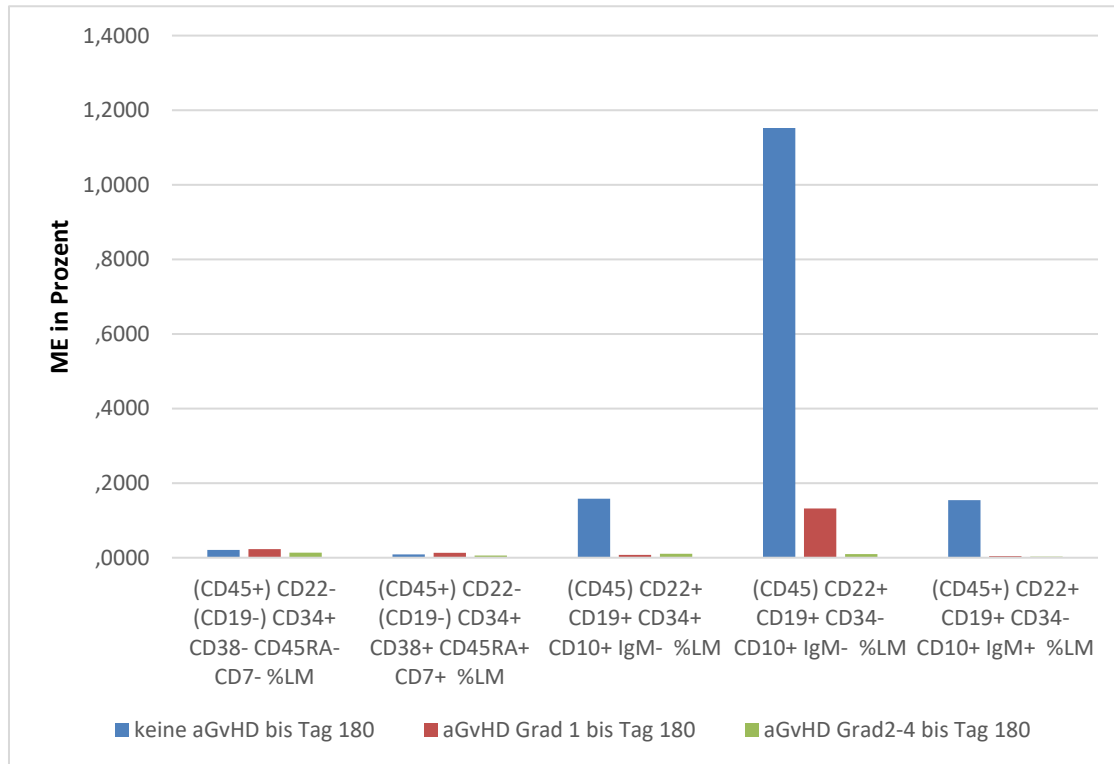


Abbildung 24: Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		HSC und MPP	CLP	Pro B-Zelle	Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen	Immature und transitionelle B-Zellen
		(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
		CD22-	CD22-	CD22+	CD22+	CD22+
		CD34+	CD34+	CD34+	CD34-	CD34-
		CD38-	CD38+	CD19+	CD19+	CD19+
		CD45RA-	CD45RA+	CD10+	CD10+	CD10+
		CD7-	CD7+	IgM-	IgM-	IgM+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine aGVHD bis d180	Mittelwert	0,031	0,026	0,452	2,488	0,538
	N	21	21	23	23	22
	SD	0,036	0,069	0,740	3,481	0,847
	Median	0,021	0,009	0,158	1,152	0,155
aGVHD Grad 1 bis d180	Mittelwert	0,028	0,012	0,010	0,335	0,029
	N	5	5	4	4	4
	SD	0,021	0,006	0,005	0,503	0,049
	Median	0,023	0,013	0,008	0,132	0,004
aGVHD Grad 2-4 bis d180	Mittelwert	0,026	0,011	0,019	0,012	0,004
	N	12	12	12	12	12
	SD	0,023	0,010	0,024	0,011	0,004
	Median	0,014	0,006	0,011	0,010	0,003

Tabelle 33: Einfluss der aGVHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Bei der Analyse des Einflusses der aGVHD auf die Vorläuferzellen zeigten sich geringere Werte für Patienten mit aGVHD Grad 2 – 4.

Für die HSC, MPP und CLP war dieser Unterschied nicht signifikant.

Für die Pro-B-Zelle ((CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM) lag der Medianwert signifikant niedriger für die Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,011) im Vergleich zu den Patienten ohne aGVHD (ME 0,158 mit $p < 0,000$); (aGVHD Grad 1 ME 0,008).

Der Medianwert der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM) war ebenfalls signifikant geringer für die Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,010) im Vergleich zu den Patienten ohne aGVHD (ME 1,152 mit $p < 0,000$); (aGVHD Grad 1 ME 0,132).

Für die immaturen und transitionellen B-Zellen ((CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM) war der Medianwert der Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,003) signifikant

vermindert verglichen mit Patienten ohne aGvHD (ME 0,155 mit $p < 0,000$); (aGvHD Grad 1 ME 0,004).

T-Zellen

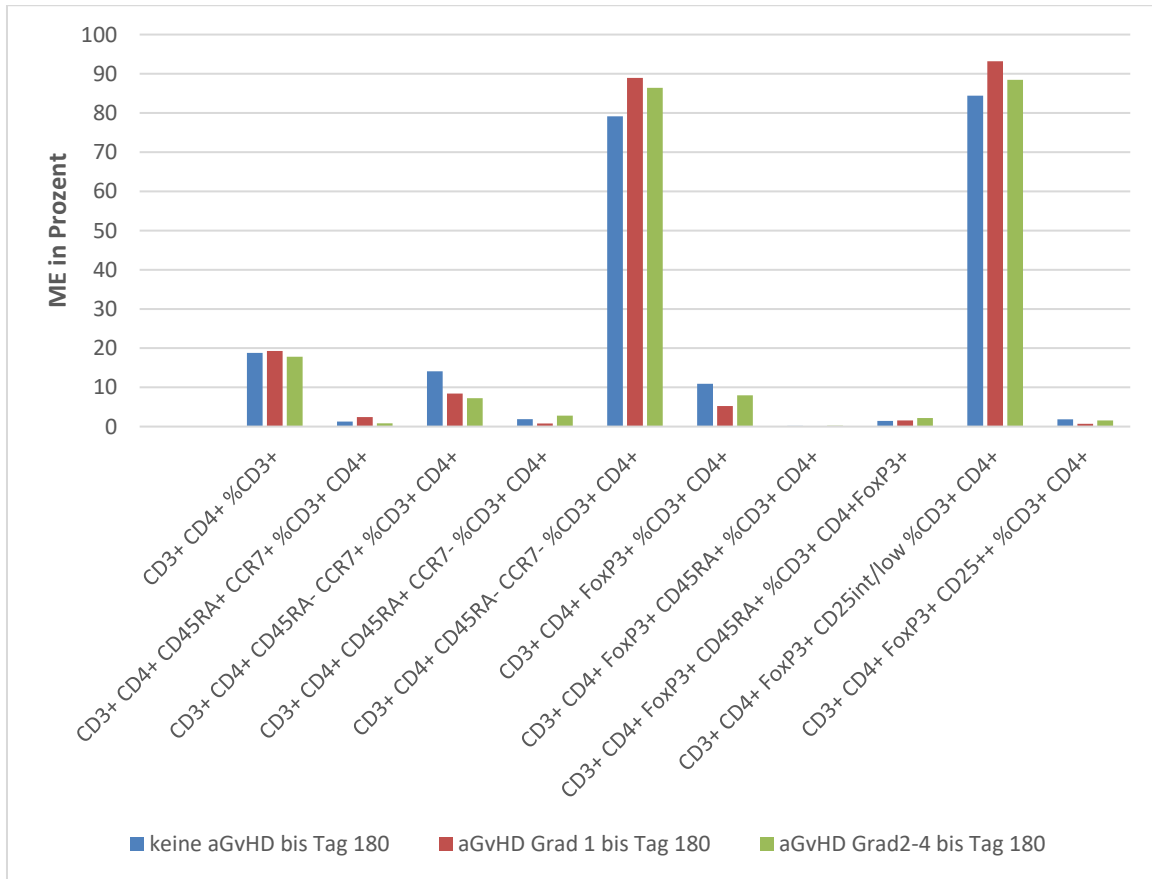


Abbildung 25: Einfluss der aGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

		CD4-T-Zellen	naive CD4-T-Zellen	zentrale Memory CD4-T-Zellen	terminale Effektor CD4-T-Zellen	periphere Effektor CD4-T-Zellen	FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD25low FoxP3-T-Zellen	CD25++ FoxP3-T-Zellen
		CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+
		CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+
							FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
			CD45RA+ CCR7+	CD45RA- CCR7+	CD45RA+ CCR7-	CD45RA- CCR7-		CD45RA+	CD45RA+	CD25low	CD25++
		%CD3	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4 FoxP3	%CD3 CD4	%CD3 CD4
keine aGVHD bis d180	Mittelwert	26,391	9,574	15,192	5,711	69,568	12,995	0,802	7,175	65,784	3,387
	N	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
	SD	18,117	13,535	10,487	14,773	24,145	9,044	1,756	16,930	35,785	3,783
	Median	18,800	1,286	14,093	1,897	79,140	10,914	0,195	1,422	84,400	1,860
aGVHD Grad 1 bis d180	Mittelwert	20,311	15,588	12,730	1,051	70,639	5,739	0,590	11,906	74,480	1,463
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	SD	13,834	27,758	9,876	1,054	32,789	2,533	1,043	21,458	41,186	1,704
	Median	19,300	2,440	8,410	0,776	88,930	5,220	0,086	1,555	93,200	0,710
aGVHD Grad 2-4 bis d180	Mittelwert	20,725	10,824	10,926	2,356	75,894	11,217	0,420	3,823	75,096	1,784
	N	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
	SD	14,573	17,766	9,017	1,387	25,044	8,374	0,424	4,157	31,189	1,512
	Median	17,800	0,835	7,237	2,785	86,406	7,960	0,205	2,180	88,450	1,550

Tabelle 34: Einfluss der aGVHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

Für den Einfluss der aGVHD auf die T-Zellen im Knochenmark an Tag 180 lag nur ein signifikant niedriger Medianwert für die FoxP3-T-Zellen (CD3+ CD4+ FoxP3+ %CD3+ CD4+) für die Patienten mit aGVHD Grad 1 (ME 5,220) im Vergleich zu den Patienten mit aGVHD Grad 2 - 4 (ME 7,960 mit p=0,044) vor. Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.3.2 Einfluss der cGVHD an Tag 180

Es wurden 2 Patienten für die Analyse einer möglichen Assoziation der cGVHD an Tag 180 ausgeschlossen, 1 Patient, weil er verstarb, ohne dass sicher zu beurteilen war, ob er noch eine cGVHD entwickelt hätte und 1 Patient entwickelte ein Rezidiv, so dass auch hier nicht beurteilt werden konnte, ob der Patient eine cGVHD entwickelt hätte.

3.3.2.1 Einfluss der cGvHD an Tag 180 im peripheren Blut

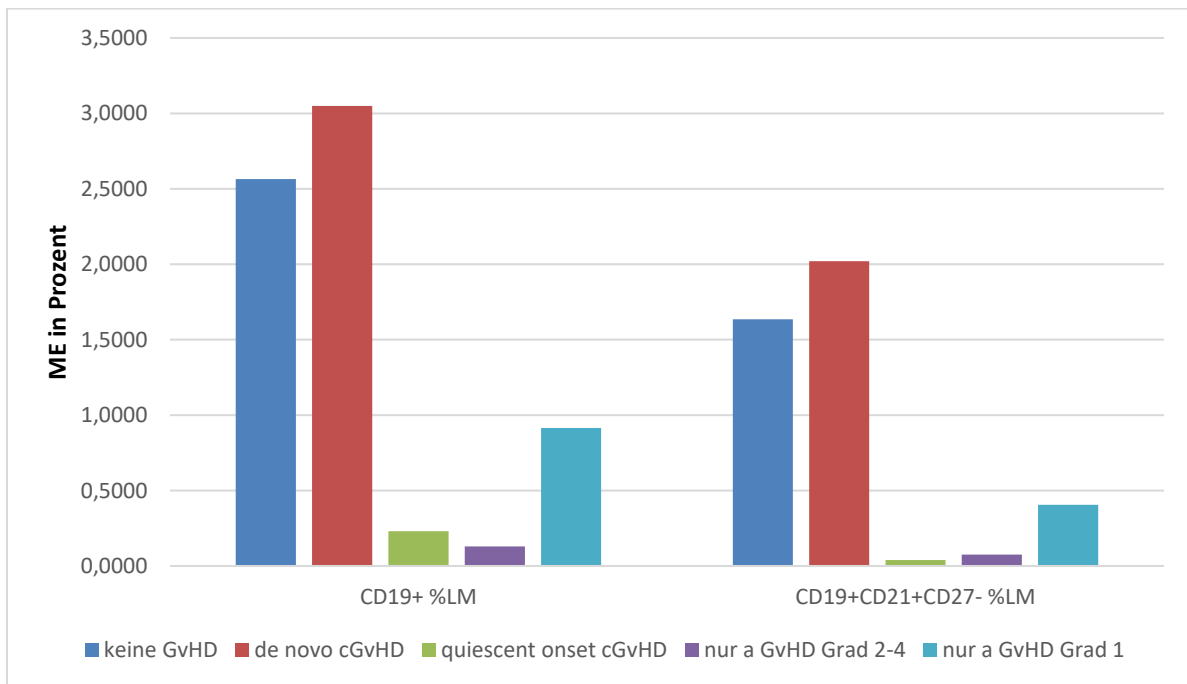


Abbildung 26: Einfluss der cGvHD an Tag 180 auf die CD19+ und CD19+CD27- B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

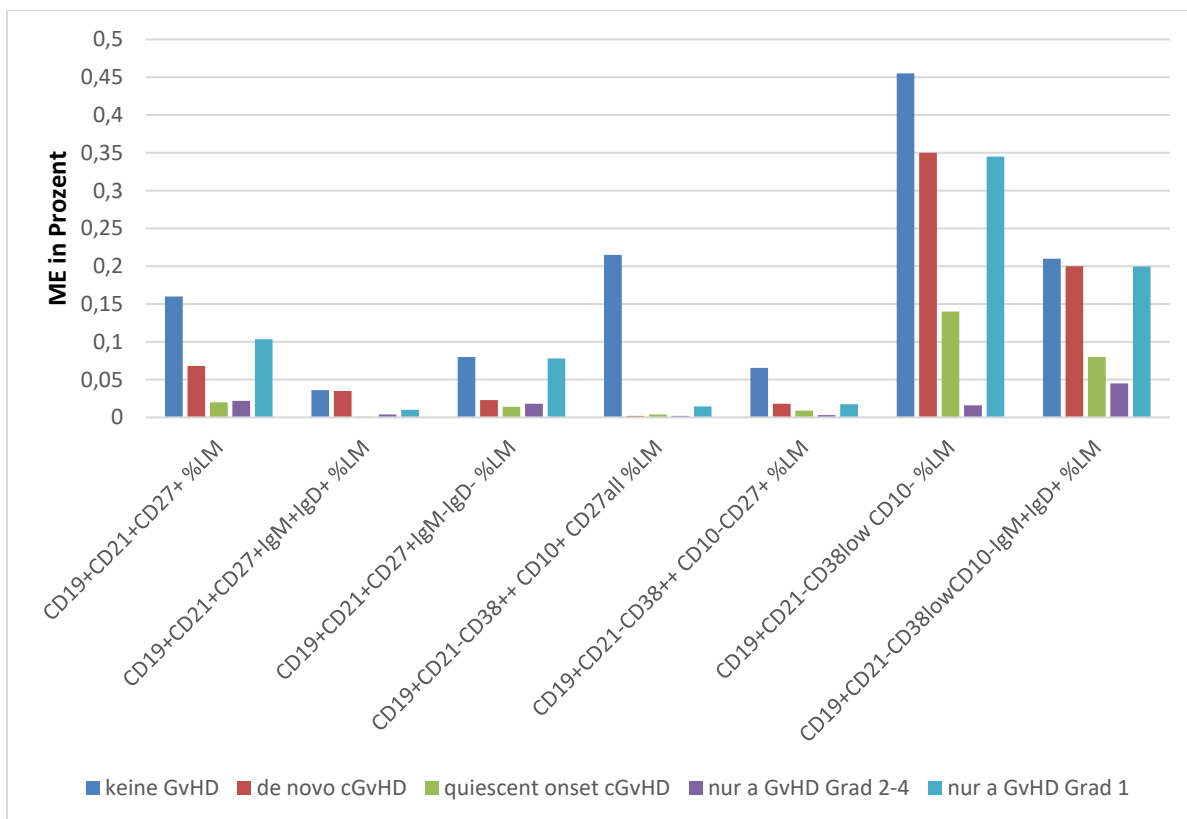


Abbildung 27: Einfluss der cGvHD an Tag 180 auf die CD19+CD27+ B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

		B-Zellen	naive und transitionelle B-Zellen	Memory B-Zellen	nicht-klassengewechsellte Memory B-Zellen	klassengewechsellte Memory B-Zellen	immature B-Zellen	Plasmablasten	CD21- Memory B-Zellen	CD21- IgM Memory B-Zellen
		CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+	CD19+
			CD21+	CD21+	CD21+	CD21+	CD21-	CD21-	CD21-	CD21-
			CD27-	CD27+	CD27+	CD27+	CD27 _{alle}	CD27+	CD27+	CD27+
					IgM+	IgM-				IgM+
					IgD+	IgD-				IgD+
							CD38 ⁺⁺	CD38 ⁺⁺	CD38 ^{low}	CD38 ^{low}
							CD10+	CD10-	CD10-	CD10-
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine GVHD	Mittelwert	5,207	3,832	0,192	0,042	0,110	0,404	0,130	0,533	0,234
	N	16	16	16	15	15	16	16	16	15
	SD	5,562	4,856	0,148	0,039	0,089	0,608	0,176	0,440	0,241
	Median	2,565	1,635	0,160	0,036	0,080	0,215	0,066	0,455	0,210
de novo cGVHD	Mittelwert	3,305	2,493	0,142	0,065	0,052	0,106	0,094	0,373	0,231
	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	SD	3,288	2,609	0,189	0,082	0,097	0,223	0,225	0,413	0,284
	Median	3,050	2,020	0,068	0,035	0,023	0,002	0,018	0,350	0,200
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	0,804	0,274	0,065	0,018	0,038	0,011	0,031	0,394	0,319
	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	SD	1,052	0,341	0,073	0,023	0,046	0,016	0,040	0,726	0,677
	Median	0,230	0,039	0,020	0,001	0,014	0,004	0,009	0,140	0,080
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	2,321	1,852	0,203	0,078	0,091	0,008	0,010	0,200	0,131
	N	9	9	9	9	9	9	9	9	8
	SD	5,398	4,942	0,290	0,182	0,134	0,015	0,017	0,263	0,176
	Median	0,130	0,075	0,022	0,004	0,018	0,002	0,003	0,016	0,045
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	0,915	0,405	0,104	0,010	0,078	0,015	0,018	0,345	0,200
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	SD	0,559	0,403	0,052	0,008	0,045	0,019	0,011	0,219	0,199
	Median	0,915	0,405	0,104	0,010	0,078	0,015	0,018	0,345	0,200

Tabelle 35: Einfluss der cGVHD an Tag 180 im peripheren Blut; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Bei dem Einfluss der cGVHD an Tag 180 zeigten sich im peripheren Blut deutlich reduzierte B-Zellen für die Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 und quiescent onset cGVHD im Vergleich zu den Patienten ohne GvHD oder de novo cGVHD.

Für die B-Zellen (CD19+ %LM) lag der Medianwert für die Patienten mit de novo cGVHD (ME 3,050) am höchsten, gefolgt von den Patienten ohne GvHD (ME 2,565), dann von den Patienten mit nur aGVHD Grad 1 (ME 0,915), dann von den Patienten mit quiescent onset cGVHD (ME 0,230) und schließlich von den Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 (ME 0,130). Signifikant verschieden war dieser Unterschied zwischen den Patienten ohne GvHD sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGVHD (mit p=0,017), als auch gegenüber Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 (mit p=0,037).

Für die naiven und transitionellen B-Zellen (CD19+ CD21+ CD27- %LM) war der Medianwert bei Patienten mit quiescent onset cGvHD (ME 0,039) signifikant niedriger gegenüber Patienten ohne GvHD (ME 1,635 mit p=0,010); (de novo cGvHD ME 2,020; aGvHD Grad 1 ME 0,405; aGvHD Grad 2 - 4 0,075).

Für die Population der immaturen B-Zellen (CD19+ CD21- CD38++ CD10+ CD27all %LM) lag der Medianwert am höchsten für die Patienten ohne GvHD (ME 0,215), gefolgt von den Patienten mit nur aGvHD Grad 1 (ME 0,015), quiescent onset cGvHD (ME 0,004) und mit dem gleichen Wert von de novo cGvHD (ME 0,002) und nur aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,002). Signifikant war dieser Unterschied zwischen den Patienten ohne GvHD sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD (mit p=0,001), gegenüber Patienten mit de novo cGvHD (mit p=0,043), sowie gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (mit p=0,002).

Für die Population der Plasmablasten (CD19+ CD21- CD38++ CD10- CD27+ %LM) war der Medianwert der Patienten ohne GvHD (ME 0,066) signifikant höher gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,003 mit p=0,017); (de novo cGvHD ME 0,018; quiescent onset cGvHD ME 0,009; aGvHD Grad 1 ME 0,018).

3.3.2.2 Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark

B-Vorläuferzellen

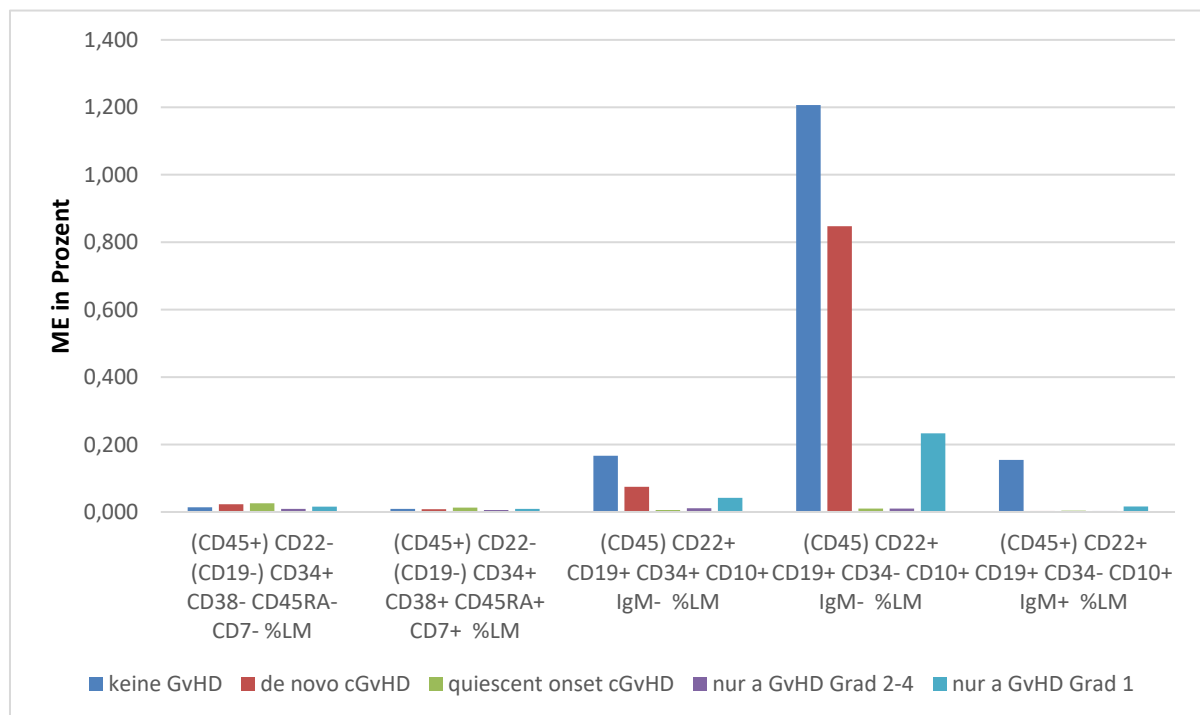


Abbildung 28: Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME in Prozent bezogen auf die LM

		HSC und MPP	CLP	Pro B-Zelle	Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen	Immature und transitionelle B-Zellen
		(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)	(CD45+)
		CD22-	CD22-	CD22+	CD22+	CD22+
		CD34+	CD34+	CD34+	CD34-	CD34-
		CD38-	CD38+	CD19+	CD19+	CD19+
		CD45RA-	CD45RA+	CD10+	CD10+	CD10+
		CD7-	CD7+	IgM-	IgM-	IgM+
		%LM	%LM	%LM	%LM	%LM
keine GVHD	Mittelwert	0,032	0,033	0,432	2,412	0,498
	N	15	15	16	16	16
	SD	0,042	0,081	0,528	2,334	0,694
	Median	0,014	0,009	0,167	1,207	0,155
de novo cGVHD	Mittelwert	0,029	0,009	0,576	3,100	0,688
	N	5	5	6	6	5
	SD	0,021	0,007	1,230	5,941	1,387
	Median	0,023	0,008	0,075	0,848	0,003
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	0,035	0,012	0,008	0,050	0,005
	N	7	7	6	6	6
	SD	0,027	0,007	0,007	0,090	0,005
	Median	0,026	0,013	0,006	0,010	0,004
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	0,018	0,011	0,025	0,013	0,003
	N	7	7	7	7	7
	SD	0,018	0,012	0,029	0,014	0,002
	Median	0,009	0,006	0,011	0,010	0,003
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	0,018	0,007	0,007	0,538	0,053
	N	2	2	2	2	2
	SD	0,008	0,004	0,001	0,758	0,069
	Median	0,018	0,007	0,007	0,538	0,053

Tabelle 36: Einfluss der cGVHD an Tag 180 im Knochenmark auf die Vorläuferzellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die LM

Für den Einfluss der cGVHD auf die Vorläuferzellen im Knochenmark lagen zwischen den Gruppen für die Populationen der HSC, MPP und CLP keine signifikanten Unterschiede vor.

Für die Population der Pro B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM) lag der Medianwert für Patienten ohne GvHD am höchsten (ME 0,167), gefolgt von den Patienten mit de novo cGvHD (ME 0,075), den Patienten mit aGvHD Grad 1 (ME 0,007), den Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,011) und schließlich von den Patienten mit quiescent onset cGvHD (ME 0,006). Signifikant höher war dabei der Medianwert der Patienten ohne GvHD sowohl gegenüber den Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (mit $p=0,001$), als auch gegenüber Patienten mit quiescent cGvHD (mit $p<0,000$).

Für die Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM) war der Medianwert der Patienten ohne GvHD (ME 1,207) sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD (ME 0,010 mit $p < 0,000$), als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,010 mit $p < 0,000$) signifikant erhöht (de novo cGvHD ME 0,848; aGvHD Grad 1 ME 0,538).

Für die Population der immaturen und transitionellen B-Zellen ((CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM) war der Medianwert der Patienten ohne GvHD (ME 0,155) signifikant höher sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD (ME 0,004 mit $p < 0,000$), als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 (ME 0,003 mit $p < 0,000$); (de novo GvHD ME 0,003; aGvHD Grad 1 ME 0,53).

T-Zellen

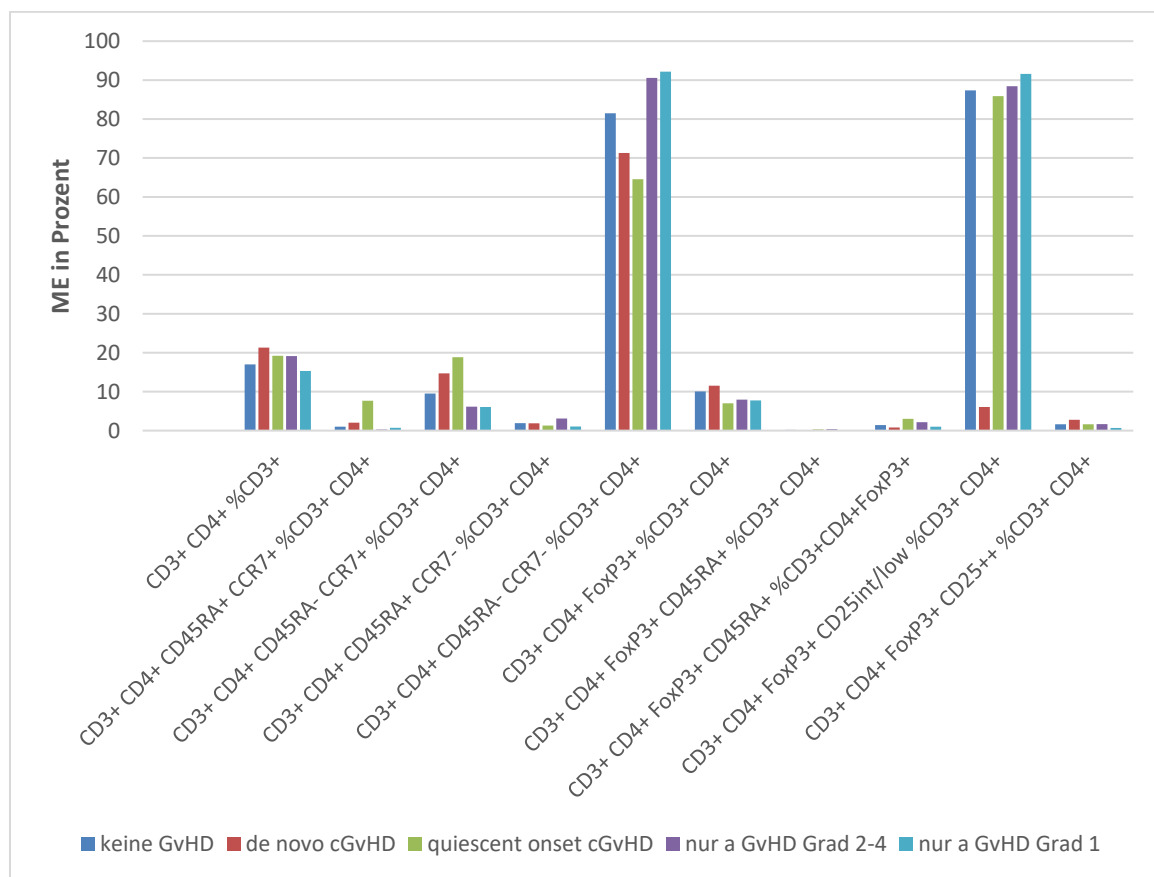


Abbildung 29: Einfluss der cGvHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

		CD4-T-Zellen	naive CD4-T-Zellen	zentrale Memory CD4-T-Zellen	terminale Effektor CD4-T-Zellen	periphere Effektor CD4-T-Zellen	FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD45RA FoxP3-T-Zellen	CD25 ^{low} FoxP3-T-Zellen	CD25 ⁺⁺ FoxP3-T-Zellen
		CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+
		CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+
							FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
			CD45RA+ CCR7+	CD45RA- CCR7+	CD45RA+ CCR7-	CD45RA- CCR7-		CD45RA+ CD45RA+	CD45RA+ CD45RA+	CD25 ^{low}	CD25 ⁺⁺
		%CD3	%CD3	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4	%CD3 CD4 FoxP3	%CD3 CD4	%CD3 CD4
keine GVHD	Mittelwert	21,625	4,978	14,283	8,045	72,709	13,567	0,755	7,117	79,698	2,887
	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	SD	13,113	7,467	11,930	18,643	23,987	10,848	2,058	20,415	22,638	3,593
	Median	17,000	1,001	9,510	1,899	81,505	10,050	0,195	1,422	87,350	1,635
de novo cGVHD	Mittelwert	30,273	14,666	15,510	1,808	68,111	11,822	0,646	5,793	38,915	4,591
	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	SD	20,679	17,342	7,615	1,292	23,415	5,700	1,043	9,475	42,372	4,168
	Median	21,300	2,045	14,690	1,860	71,300	11,529	0,085	0,807	6,061	2,778
quiescent onset cGVHD	Mittelwert	23,195	20,230	17,831	1,749	60,185	10,150	0,669	10,055	66,555	1,911
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	SD	18,144	26,605	8,742	1,583	30,251	7,742	0,817	16,748	39,539	1,677
	Median	19,200	7,660	18,866	1,305	64,570	7,005	0,305	3,038	85,900	1,645
nur aGVHD Grad 2-4	Mittelwert	19,606	8,277	7,529	2,666	81,534	10,475	0,413	3,708	76,787	1,829
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	SD	12,359	13,424	6,648	1,240	20,476	9,141	0,428	3,667	31,575	1,647
	Median	19,150	0,287	6,145	3,120	90,581	7,960	0,355	2,180	88,450	1,670
nur aGVHD Grad 1	Mittelwert	15,300	0,711	6,085	1,075	92,165	7,740	0,066	1,009	91,600	0,700
	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	SD	5,657	0,865	3,288	0,422	4,575	3,125	0,028	0,773	3,111	0,014
	Median	15,300	0,711	6,085	1,075	92,165	7,740	0,066	1,009	91,600	0,700

Tabelle 37: Einfluss der cGVHD an Tag 180 im Knochenmark auf die T-Zellen; ME und MW in Prozent bezogen auf die CD3+Zellen (%CD3) bzw. auf die CD3+CD4+ Zellen (%CD3CD4) bzw. auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

Bei den T-Zellen im Knochenmark fanden sich signifikante Unterschiede für die Population der zentralen Memory CD4-T-Zellen (CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7+ %CD3+ CD4+). Dort war der MW der Patienten mit nur aGVHD Grad 2 - 4 (MW 7,529) signifikant niedriger sowohl gegenüber Patienten mit de novo cGVHD (MW 15,510 mit p=0,037), als auch gegenüber Patienten mit quiescent onset cGVHD (MW 17,831 mit p=0,019); (keine GvHD MW 14,283; aGVHD Grad 1 MW 6,085).

Für die Population der CD25^{low} FoxP3-T-Zellen (CD3+ CD4+ FoxP3+ CD25^{low} %CD3+ CD4+) war der Medianwert der Patienten mit de novo cGVHD (ME 6,061) signifikant niedriger, sowohl gegenüber Patienten ohne GvHD (ME 87,350 mit p=0,005), gegenüber Patienten mit aGVHD

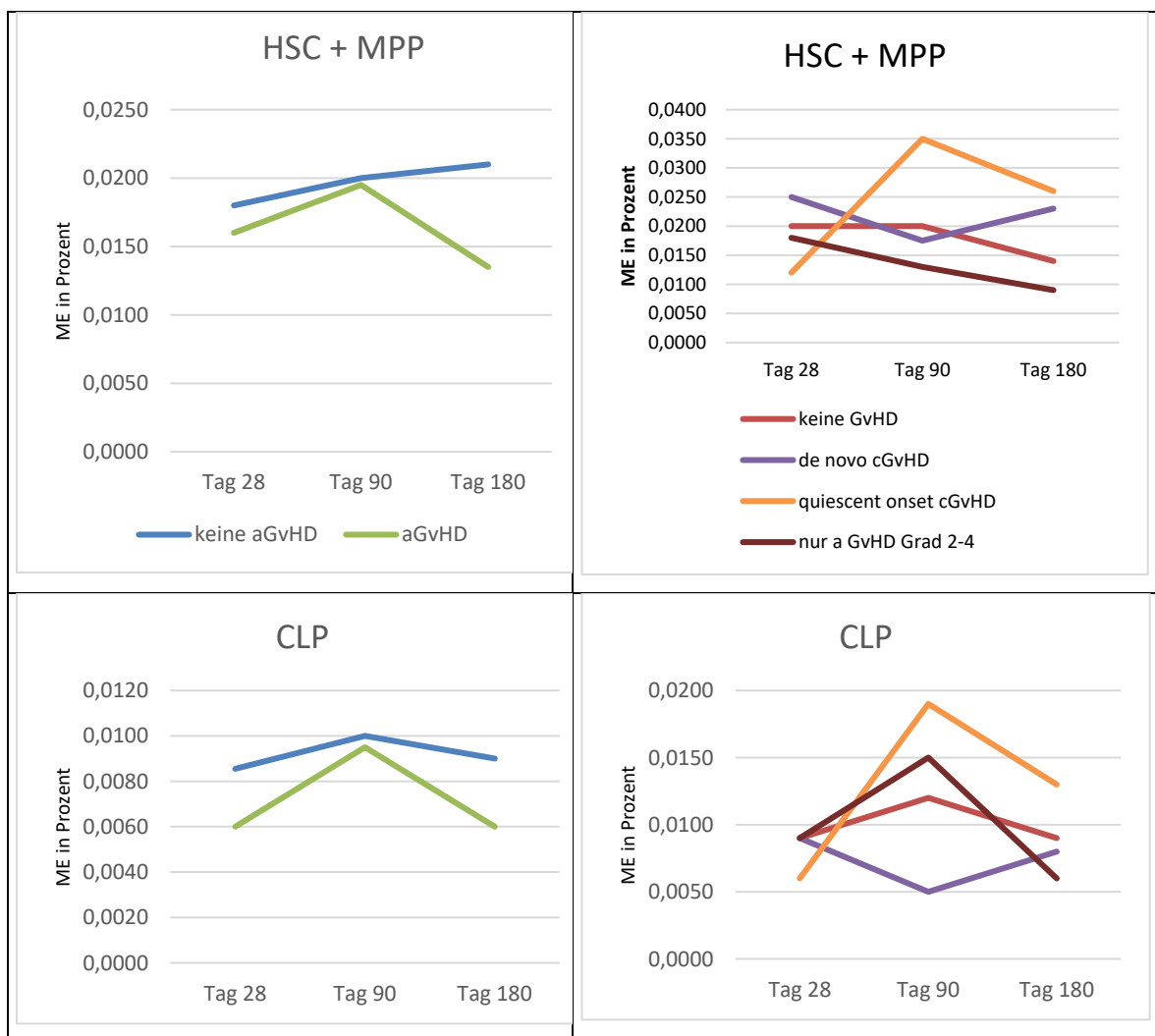
Grad 2 - 4 (ME 88,450 mit $p=0,027$), als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 1 (ME 91,600 mit $p=0,036$); (quiescent onset cGvHD ME 85,900).

Für die Population der CD25++ FoxP3-T-Zellen ($CD3+ CD4+ FoxP3+ CD25++ \%CD3+ CD4+$) war der Medianwert der Patienten mit de novo cGvHD (ME 2,778) signifikant höher verglichen mit dem Medianwert der Patienten mit nur aGvHD Grad 1 (ME 0,700 mit $p=0,036$); (keine GvHD ME 1,635; quiescent onset cGvHD ME 1,645; aGvHD Grad 2 - 4 ME 1,670).

3.4 Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse

Im nachfolgenden Teil sind die Medianwerte im Verlauf aller 3 Untersuchungszeitpunkte für die einzelnen untersuchten Populationen graphisch dargestellt. Dabei beinhaltet die linke Spalte die Assoziation der aGvHD durch Gegenüberstellung der Patienten ohne aGvHD bis zum Untersuchungszeitpunkt gegenüber den Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 bis zu diesem Zeitpunkt. Die rechte Spalte soll eine mögliche cGvHD Assoziation darstellen. Hierfür wurden Patienten ohne GvHD, Patienten mit nur aGvHD Grad 2 – 4, Patienten mit de novo cGvHD, sowie Patienten mit quiescent onset cGvHD verglichen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in beiden Spalten auf die Gruppe der Patienten mit ausschließlicher aGvHD Grad 1 verzichtet.

3.4.1 Vorläuferzellen im Knochenmark



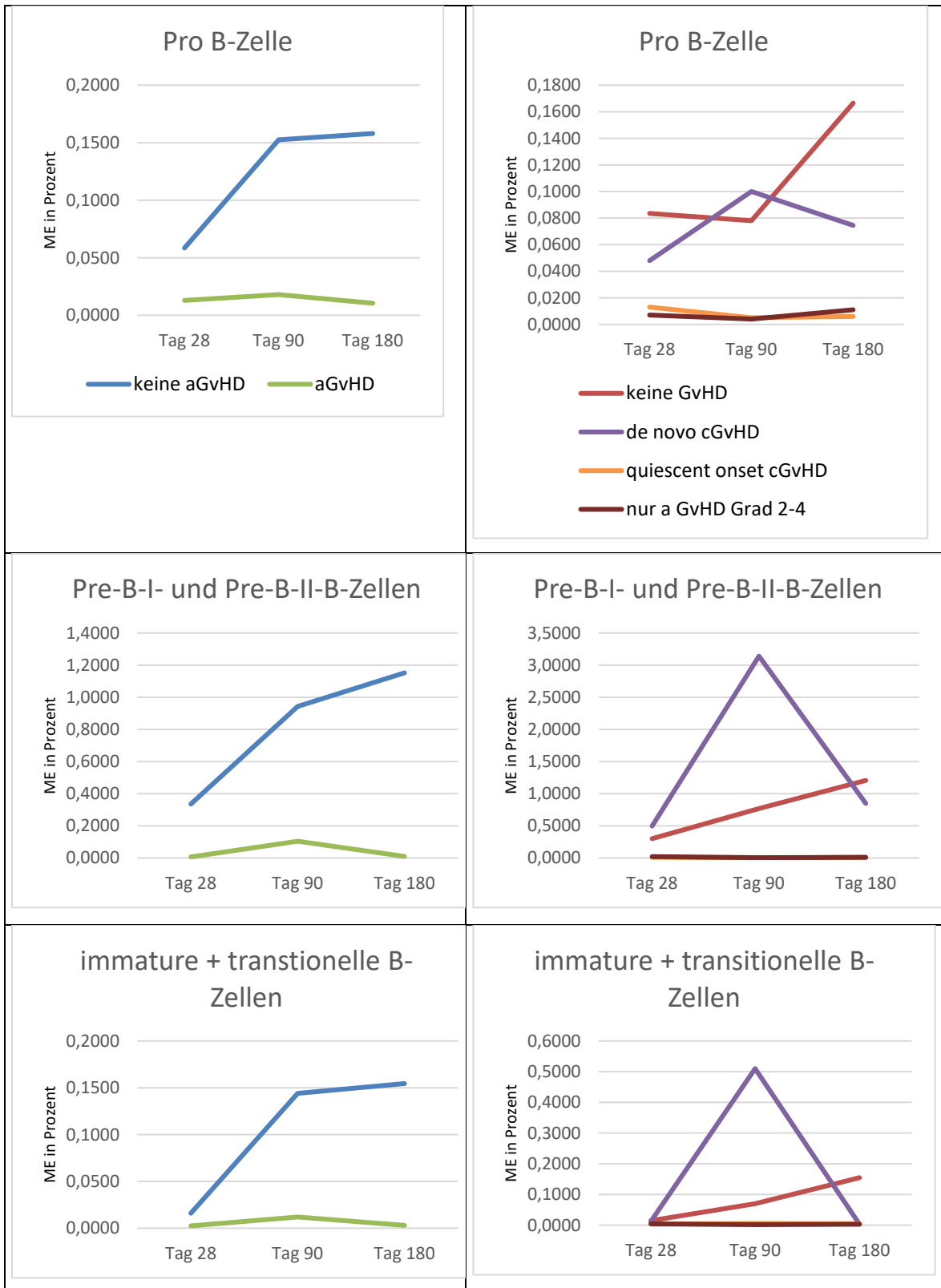
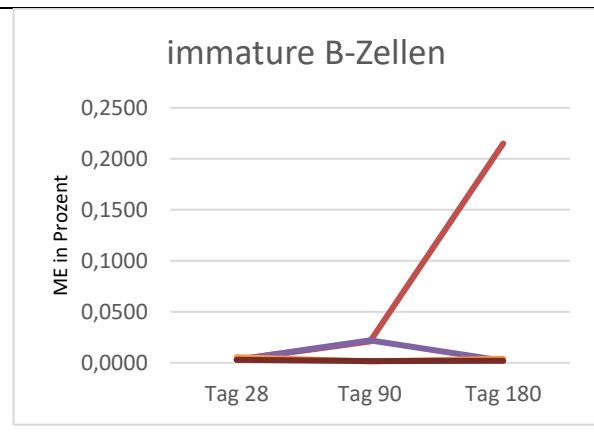
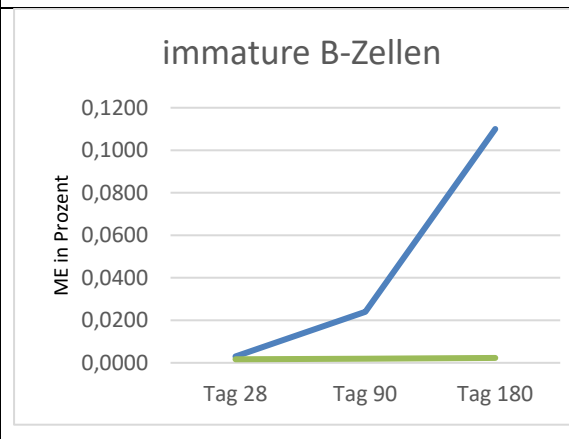
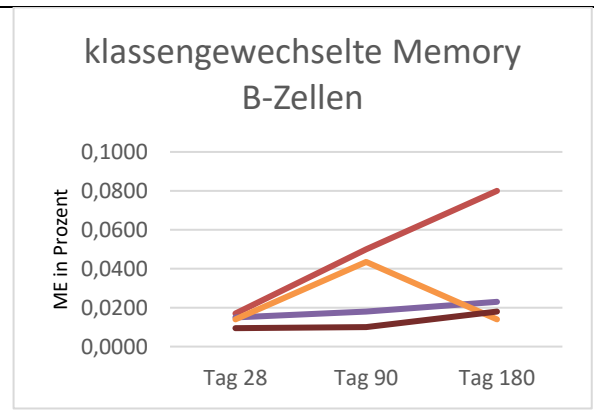
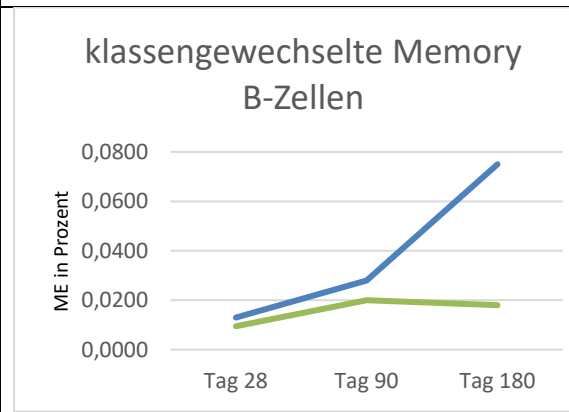
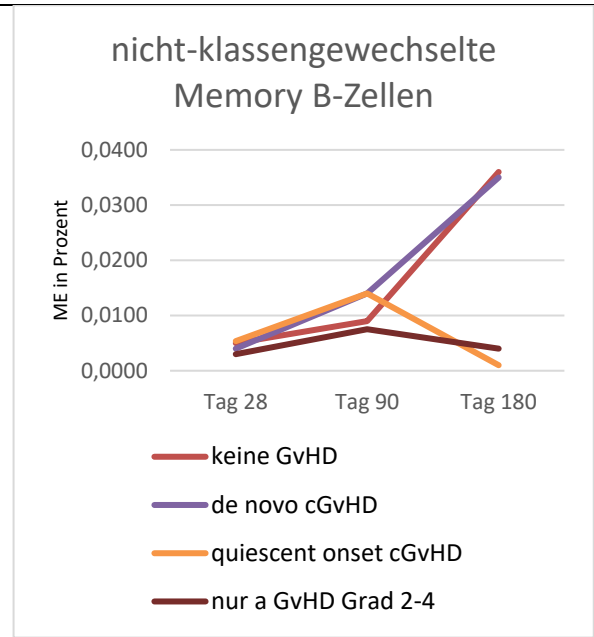
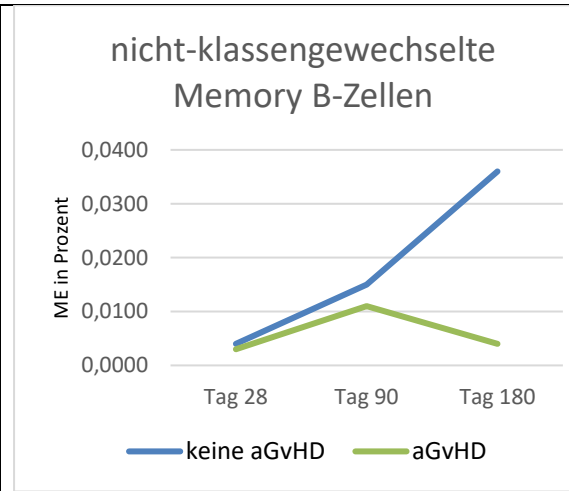


Abbildung 30: Vorläuferzellen im Knochenmark; ME in Prozent bezogen auf die LM

3.4.2 B-Zellen im peripheren Blut





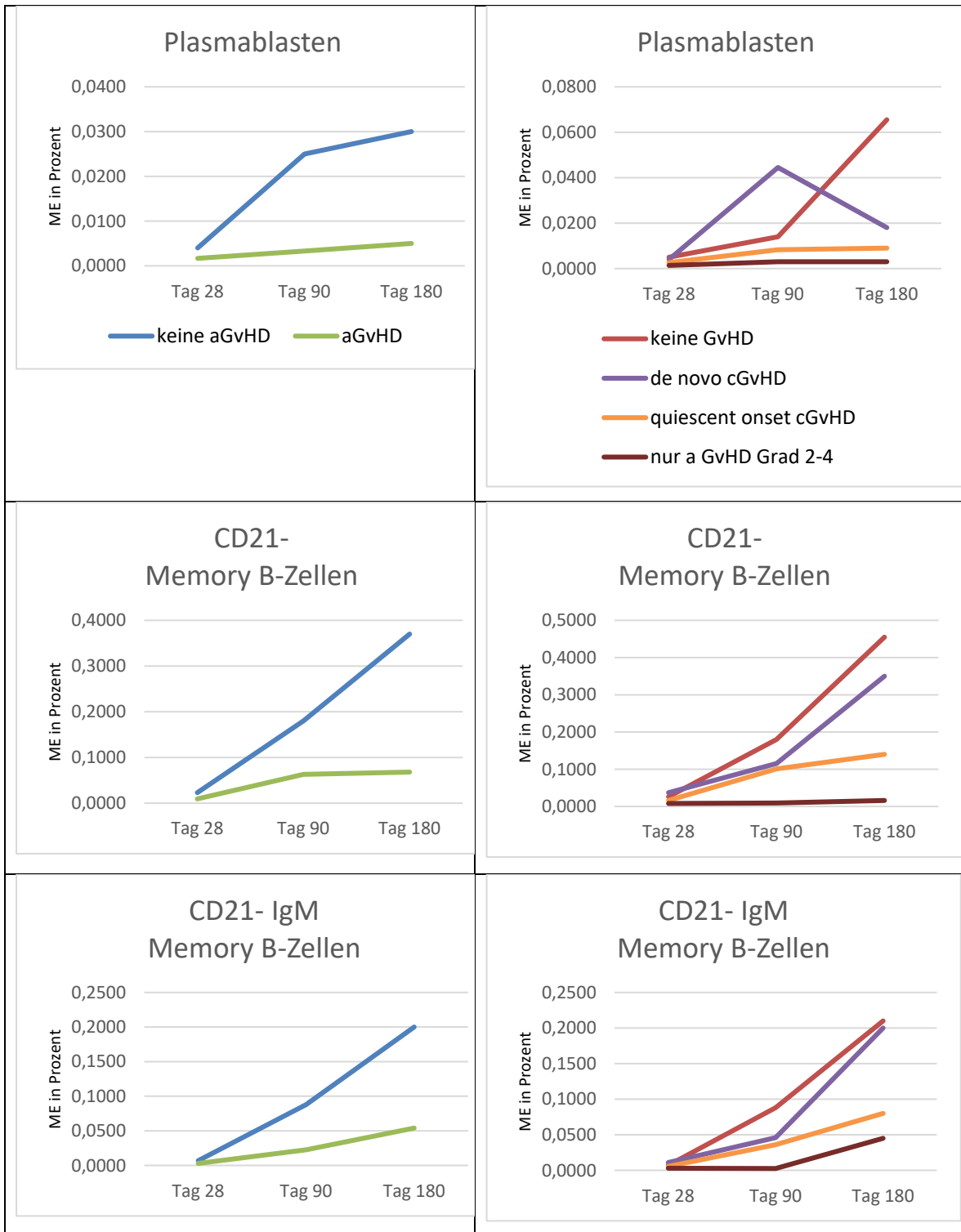
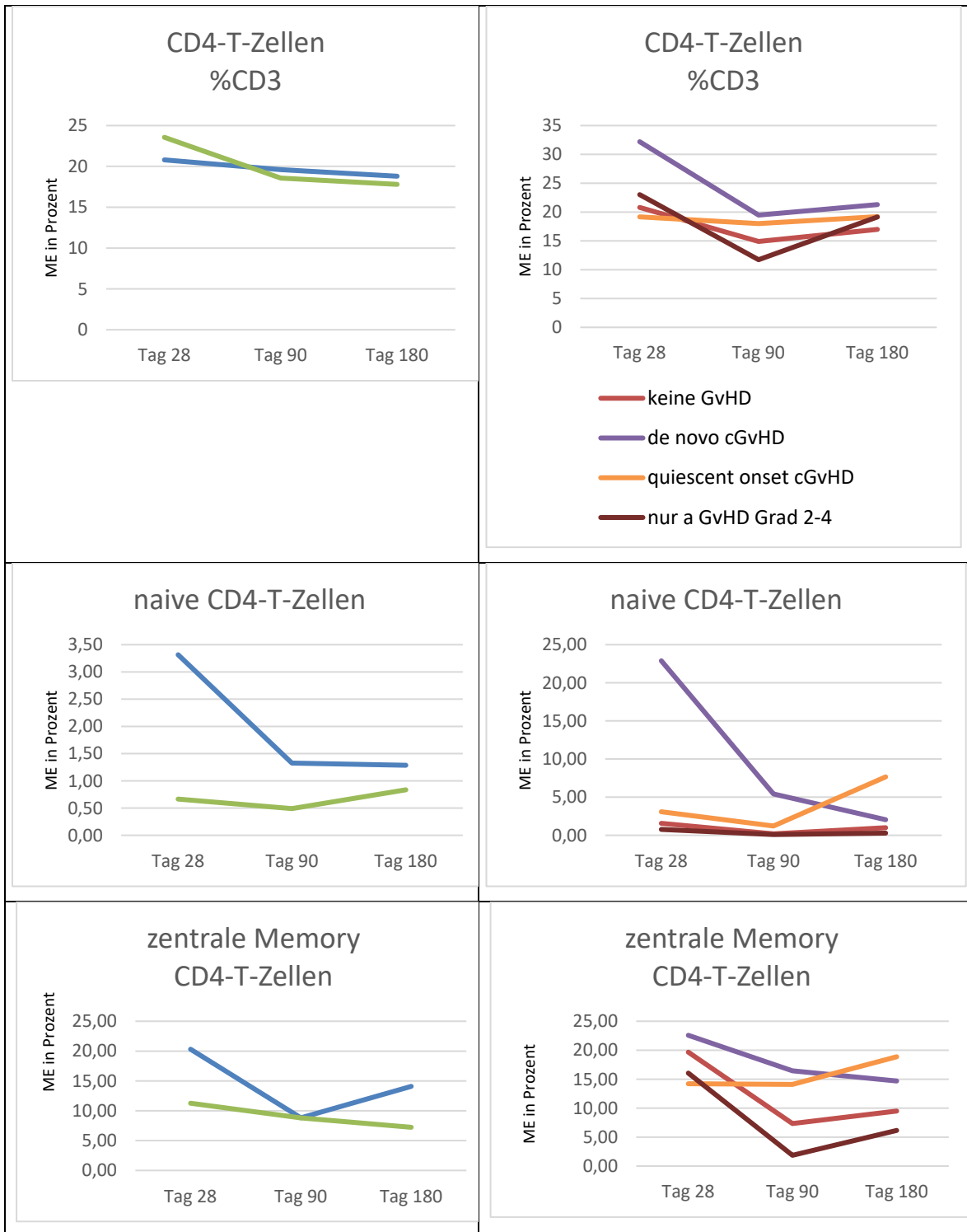
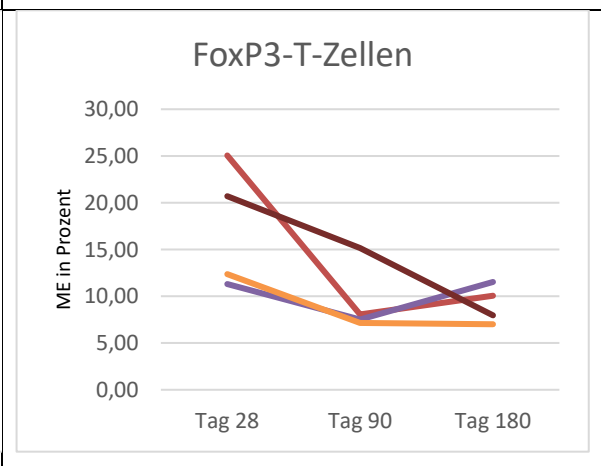
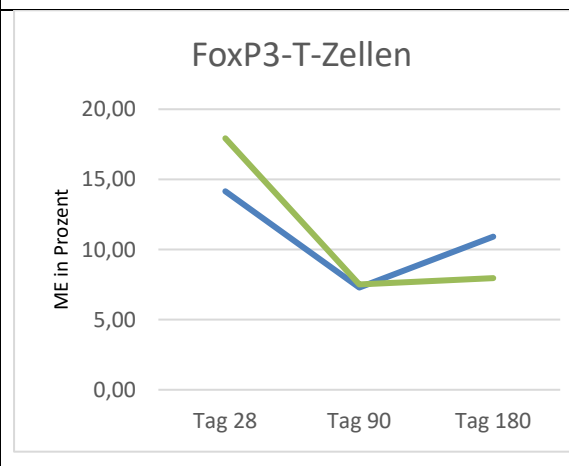
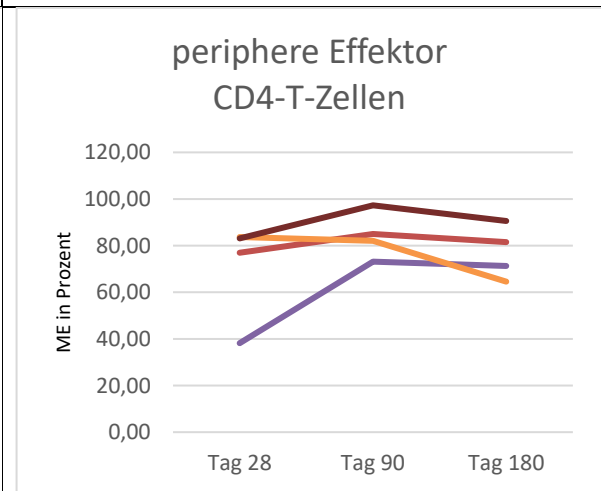
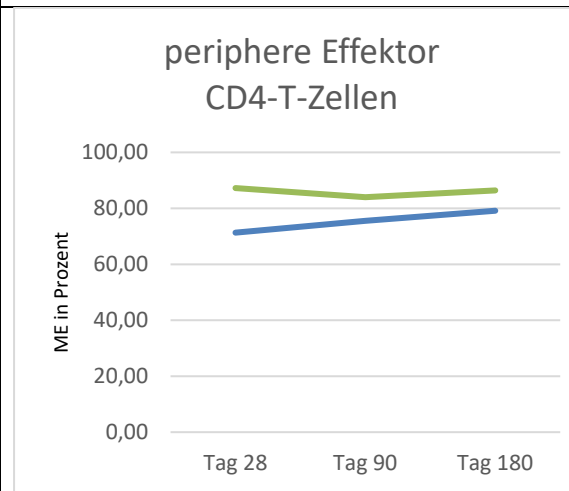
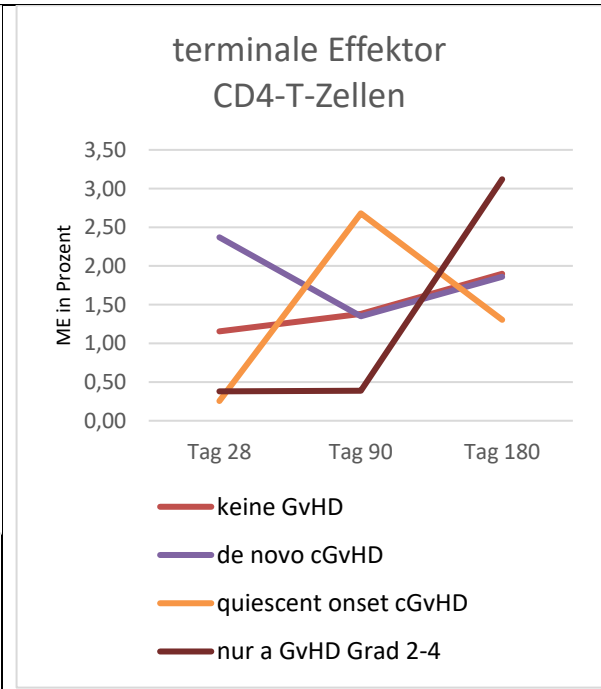
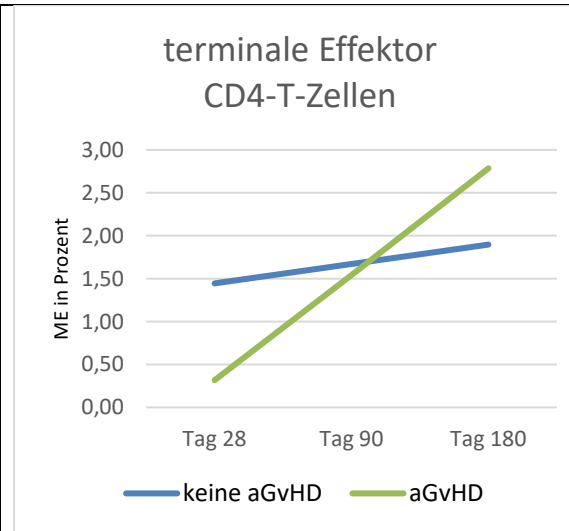
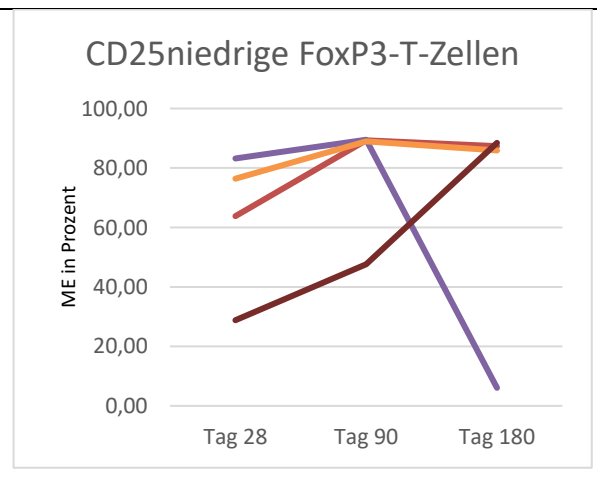
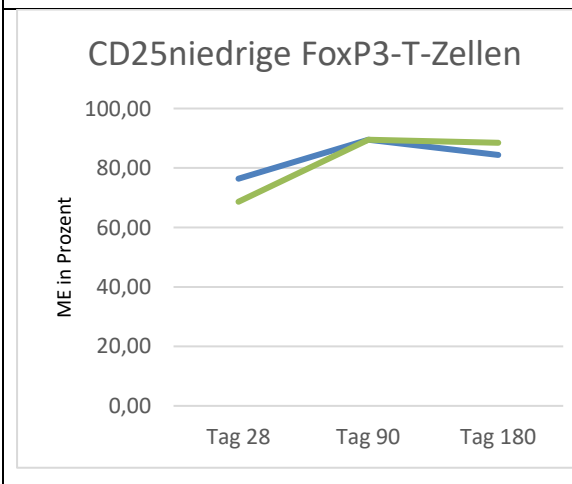
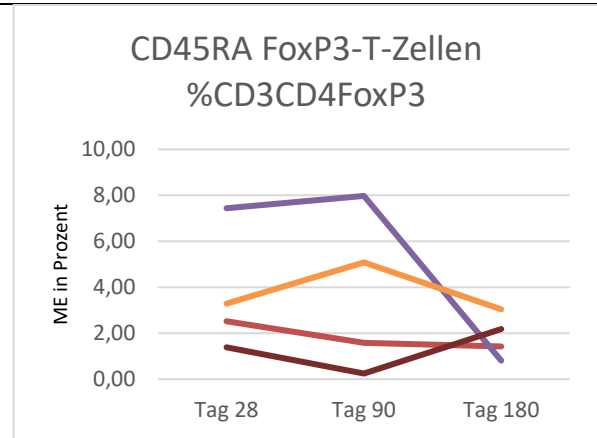
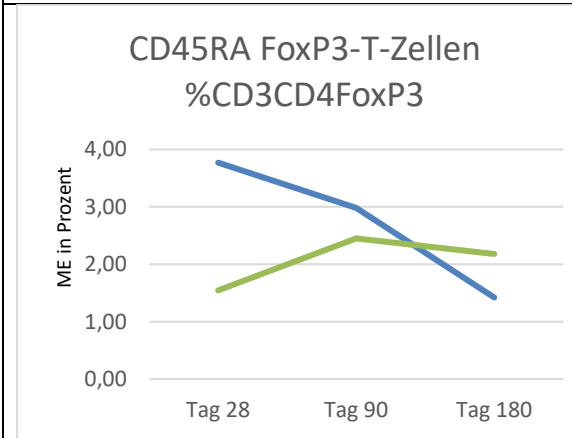
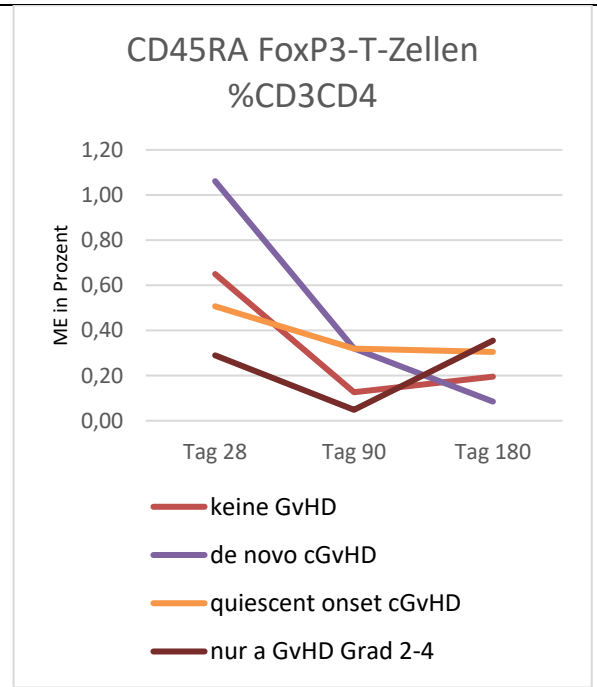
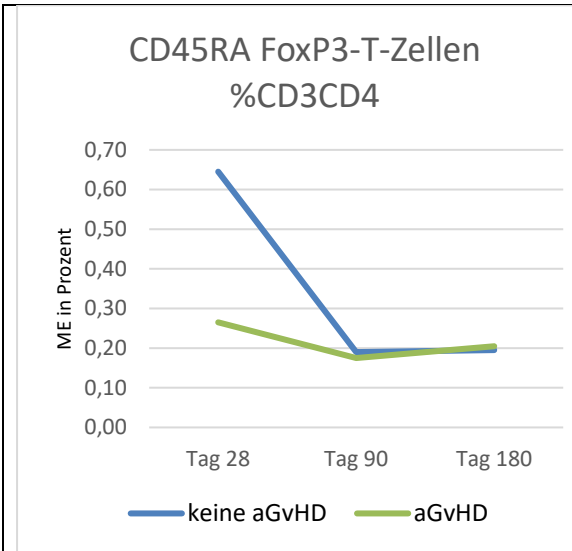


Abbildung 31: B-Zellen im peripheren Blut; ME in Prozent bezogen auf die LM

3.4.3 T-Zellen im Knochenmark







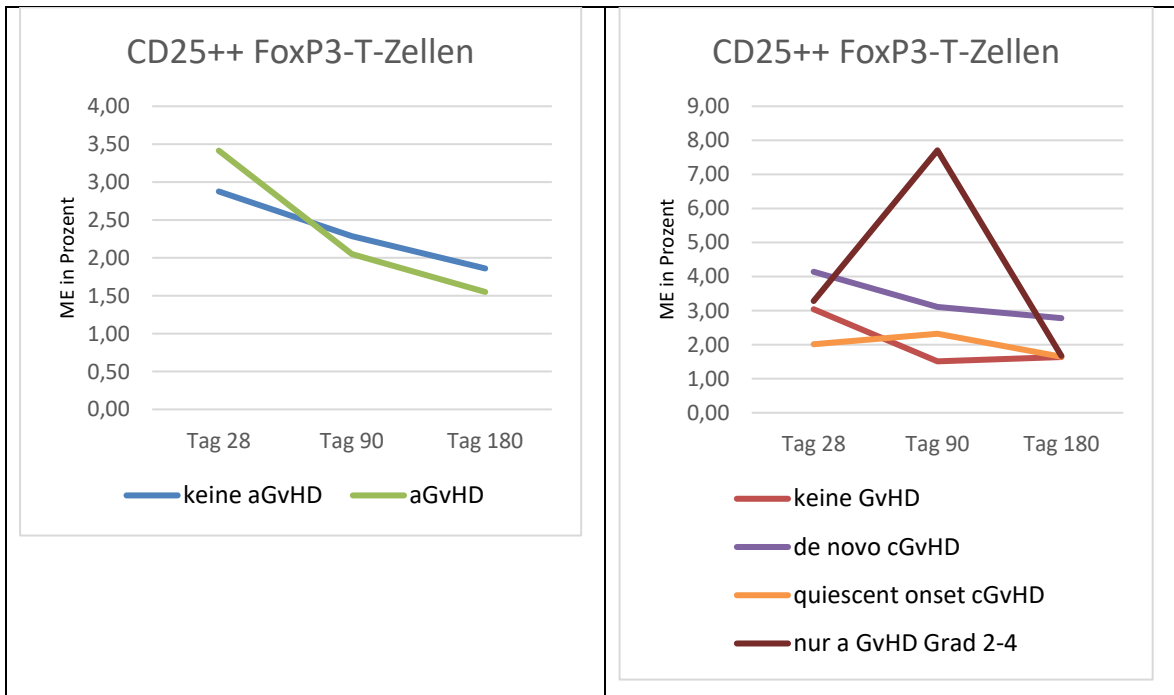


Abbildung 32: T-Zellen im Knochenmark; ME in Prozent bezogen auf die CD3+CD4+ Zellen bzw. einmalig auf die die CD3+Zellen (%CD3) und einmalig auf die CD3+CD4+FoxP3 Zellen (%CD3CD4FoxP3)

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In der vorliegenden Studie zur B-Zell-Rekonstitution wurde erstmals das Knochenmark von Menschen nach allogener HSZT in Kombination mit peripherem Blut untersucht. Insgesamt lagen der Untersuchung Material von 96 Patienten zugrunde. Es konnte gezeigt werden, dass es beim Auftreten einer aGvHD zu einem Reifungsarrest der B-Zell-Rekonstitution auf Höhe der Pro-B-Zellen im Knochenmark kommt. Dieser wirkte sich verzögert auch in das periphere Blut aus. Ein Einfluss der cGvHD auf die B-Zell-Rekonstitution konnte hingegen nicht beobachtet werden. Es zeigten sich Hinweise auf eine mögliche Korrelation der de novo cGvHD bezogen auf die T-Zellen.

4.2 Diskussion der Methoden

Es erfolgte eine Definition der Subpopulationen anhand verschiedener Antikörper. Blut und Knochenmark von Patienten wurden mittels FACS-Analyse untersucht und anschließend in Abhängigkeit einer Normalverteilung mittels des Student's T-Test oder des Mann-Whitney-U-Test analysiert.

Der Festlegung der Definition der Subpopulationen lagen diverse Voruntersuchungen zugrunde. [9–14, 18–21, 24, 26, 30, 32] Bei einigen Populationen wird bisher in der Literatur eine uneinheitliche Charakterisierung der humanen Vorläuferzellen beschrieben. Für die vorliegende Arbeit wurden die in der Einleitung beschriebenen Definitionen verwendet. Diese können allerdings zu Missverständnissen beim Vergleich verschiedener Studien führen. In Bezug auf die Definition der einzelnen Populationen scheint es für die Zukunft sinnvoll, eine standardisierte einheitliche Antikörpercharakterisierung der einzelnen Zellpopulationen zu erarbeiten, die von allen Forschungsgruppen verwendet wird.

Die vorliegende Studie untersuchte die B-Zell-Rekonstitution beim Menschen und unterliegt aus diesem Grund diversen Limitationen. Im Gegensatz zum murinen Versuchsmodell stand nicht das Experiment, sondern der Mensch im Vordergrund. Die behandelnden Ärzte versuchten bei jedem Patienten durch individuelle Therapieversuche die Überlebensrate zu steigern. Damit einhergehend gab es unterschiedliche Medikation bei den Patienten, welche die Immunrekonstitution und damit die Messergebnisse beeinflussten. Ein insbesondere für

die vorliegende Studie wichtiges Medikament war dabei Rituximab. Die Verwendung dieses Medikamentes führte zur Depletion CD-20-positiver B-Zell-Subpopulationen, weswegen eine Aussage über die stattfindende B-Zell-Rekonstitution nicht mehr möglich war. Die Patienten wurden deshalb ab dem Zeitpunkt der Rituximab-Gabe von der Studie ausgeschlossen. Für eine korrelationsfreie Analyse wäre es für zukünftige Studien wichtig eine größere Probandenzahl zu generieren, zum Beispiel durch einen Zusammenschluss zwischen mehreren Kliniken, um so verschieden medikamentös therapierte Patienten mit ausreichender Fallzahl vergleichen zu können.

Die Verwendung der FACS-Analyse zeigt selbst Limitationen. [82] In der vorliegenden Studie zeigte sich bei der Verwendung von Knochenmark in der FACS-Analyse gelegentlich ein Artefakt während den Messungen, welcher am ehestens durch eine Autofluoreszenz von Knochenmark-Populationen bedingt war und die Auswertung behinderte. Unter Verwendung eines initialen Gatings von CD45 konnte der Artefakt eliminiert werden. Das Problem manifestierte sich allerdings erst während der bereits laufenden Studie. In den bereits erfolgten Messungen konnte der Artefakt teilweise durch Backgating-Strategien eliminiert werden, was jedoch potentiell Relativwerte bezogen auf die LM- Population beeinflusste. Für zukünftige Studien sollte nach dem LM-Gate daher immer ein Gating auf CD45 erfolgen und dies als Ausgangswert der LM betrachtet werden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Diskussion der Ergebnisse an Tag 28: Einfluss aGvHD

4.3.1.1 im peripheren Blut (aGvHD d28)

An Tag 28 zeigten sich in den untersuchten Blutproben der Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen von Patienten, die eine aGvHD entwickelt hatten und Patienten ohne aGvHD.

Untersuchte murine Blutproben von anderen Forschungsgruppen konnten zu diesem Zeitpunkt bereits einen deutlichen Unterschied der B-Zell-Rekonstitution zwischen Mäusen mit aGvHD und solchen ohne zeigen [83].

Die humane Rekonstitution des adaptiven Immunsystems dauert wie in einigen Publikationen beschrieben Monate bis Jahre und damit deutlich länger als im murinen Modell [63, 67]. Das erklärt, wieso bei Auftreten einer aGvHD zu einem frühen Zeitpunkt im murinen Modell bereits deutliche Unterschiede zu sehen sind, beim Menschen aber nicht.

4.3.1.2 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen (aGvHD d28)

Im Knochenmark konnten in murinen Modellen eine deutlich reduzierte Anzahl an B-Vorläuferzellen für Mäuse mit aGvHD detektiert werden [83]. Viele bisherige humane Untersuchungen der Immunrekonstitution nach allogener Knochenmarkstransplantation beschreiben vor allem Messungen aus dem peripheren Blut [67].

Im humanen Knochenmark konnten im Rahmen dieser Studie bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach HSZT, also an Tag 28 einige signifikante Unterschiede der Vorläuferzellen zwischen Patienten mit aGvHD und ohne aGvHD detektiert werden, wenn auch nicht für alle Reifungsstufen.

So zeigten sich die frühesten Reifungsstufen, die der HSC und MPP signifikant vermindert bei Patienten mit aGvHD.

Die Zwischenstufen der CLP und Pro B-Zellen zeigten zwar verminderte Medianwerte für Patienten, die bis zu diesem Zeitpunkt eine aGvHD entwickelt hatte, jedoch waren diese verminderten Werte nicht signifikant. In anderen Studien konnte für die Pro-B-Zellen (in den Studien als CD19+CD10+CD34+ definiert) bereits signifikant verminderte Werte im Knochenmark für Patienten mit aGvHD detektieren [77, 84, 85].

Für die späteren Reifungsstufen der Pre B-I und II-B-Zellen, sowie der immaturen und transitionellen B-Zellen zeigten sich signifikant geringe Werte für Patienten mit aGvHD. Dieser Effekt wurde bereits für die Zellpopulation der CD19+CD10+CD34- Zellen (was in dieser Arbeit der Per-B-I und II-B-Zellen, sowie den immaturen und transitionellen B-Zellen entspricht) von anderen Autoren am Tag 30, aber auch am Tag 60 gezeigt [86].

Auch in einer anderen Studie wurden für die CD19 positiven B-Zellen, also B-Vorläuferzellen ab Reifungsstufe der Pro-B-Zelle (CD45CD19+) signifikant niedrigere Werte für Patienten mit aGvHD Grad2-4 im Vergleich zu Patienten mit aGvHD Grad 1 gezeigt [66].

4.3.1.3 im Knochenmark auf die T-Zellen (aGvHD d28)

Signifikant niedrigere Werten lagen für die Populationen der terminalen Effektor CD4-T-Zellen, sowie der CD45RA FoxP3-T-Zellen bei Patienten mit aGvHD vor. Ein erhöhter Wert für die regulatorischen T-Zellen könnte die vorbestehende These eines protektiven Effekts auf die Knochenmarksnische für Patienten ohne aGvHD unterstreichen [87–89].

Signifikant höhere Werten waren bei der Population der peripheren Effektor CD4-T-Zellen für Patienten mit aGvHD zu beobachten.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse an Tag 28: Einfluss cGvHD

4.3.2.1 im peripheren Blut (cGvHD d28)

Im Blut zeigten sich in der vorliegenden Studie am Tag 28 für die B-Zellen im Blut keine Abweichungen zu Kontroll-Gruppen für Patienten, die im Verlauf noch eine cGvHD entwickeln würden. B-Zellen sind im peripheren Blut zu diesem Zeitpunkt vor allem direkt vom Spender (aus dem Transplantat) zu detektieren, daher ist im humanen Bereich noch kein direkter Effekt der GvHD zu erwarten [63].

4.3.2.2 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen (cGvHD d28)

Am Tag 28 konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied von Patienten mit cGvHD gegenüber ihrer Kontrollgruppe detektiert werden (also nur aGvHD versus (vs) quiescent onset cGvHD bzw. keine GvHD vs de novo cGvHD).

Es zeigten sich geringere Werte der B-Zell-Vorläufer für Patienten mit quiescent onset cGvHD oder nur aGvHD gegenüber den anderen beiden Gruppen (also keine GvHD und de novo cGvHD), was vermutlich auf den Effekt der aGvHD zurückzuführen ist. Signifikant war dieser Unterschied nicht mehr, wenn die Patienten in die 4 Subgruppen aufgeteilt sind, vermutlich bei zu geringer Zahl an Patienten in der jeweiligen Gruppe.

Von anderen Autoren wurde ebenfalls bereits am Tag 30 Knochenmark auf die Dichte an B-Zellen untersucht. Fedoriw et al. detektierten signifikant niedrigere B-Vorläuferzellen im Knochenmark für Patienten die im Verlauf eine cGvHD entwickelten [71]. Diese Untersuchungen scheinen auf den ersten Blick im Widerspruch zu den vorliegenden Studienergebnissen zu stehen. Betrachtet man die Patienteneinteilung von Fedoriw et al. genauer, ist jedoch beschrieben, dass alle Patienten in der cGvHD-Gruppe zu dem Zeitpunkt

bereits eine aGvHD hatten bzw. anschließend entwickelten. Die Ergebnisse wären daher auch mit einer aGvHD-Assoziation vereinbar, die auch in den vorliegenden Untersuchungen entdeckt wurde und nicht zwangsläufig auf eine Assoziation der cGvHD zurückzuführen.

4.3.2.3 im Knochenmark auf die T-Zellen (cGvHD d28)

Es zeigten sich signifikant erhöhte Werte für Patienten mit de novo GvHD gegenüber Patienten mit aGvHD bzw. quiescent onset cGvHD für die Population der terminalen Effektor CD4-T-Zellen.

Signifikant höher waren auch die Werte für CD45RA FoxP3-T-Zellen bei Patienten mit de novo cGvHD gegenüber Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der vorbeschriebene protektive Effekt der Tregs auf die Knochenmark-Nische sein [89].

4.3.3 Diskussion der Ergebnisse an Tag 90: Einfluss aGvHD

4.3.3.1 im peripheren Blut (aGvHD d90)

Am Tag 90 waren die Werte der B-Zellen im peripheren Blut für die Patienten ohne aGvHD im Vergleich zu Patienten mit aGvHD erhöht.

Signifikant war dieser Unterschied für die Untergruppe der immaturen B-Zellen (sowohl gegenüber aGvHD Grad 1 als auch gegenüber aGvHD Grad 2 - 4).

Das bereits am Tag 28 sichtbare Reifungsproblem der B-Vorläuferzellen im Knochenmark bei aGvHD schien sich zu diesem Zeitpunkt auch auf die B-Zell-Regeneration im peripheren Blut auszuwirken. Eine Korrelation zwischen dem Prozentsatz an CD19+ B-Vorläuferzellen im Knochenmark am Tag 80 und der Anzahl an B-Zellen im peripheren Blut konnten Storek et al. bereits 2001 zeigen [66].

In der Dissertation von Xiao Xi Oey 2018 wurden die untersuchten Patienten in eine Gruppe mit frühem B-Zell-Rekonstitutionsbeginns (zwischen Tag 60 und 90) und einen späten Beginn eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte anhand des Anstiegs an transitionellen B-Zellen. Es zeigte sich dort eine Korrelation zwischen einer verzögerten B-Zell-Rekonstitution und einer vorausgehenden aGvHD, was im Einklang mit unseren Untersuchungen steht [90].

4.3.3.2 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen (aGvHD d90)

Im Knochenmark lagen am Tag 90 für die frühen Vorläuferzellen, die Populationen der HSC, MPP und CLP ähnliche Werte für Patienten mit oder ohne aGvHD am Tag 90 vor.

Ab der nächsten Reifungsstufe waren die Werte der Patienten nach aGvHD signifikant verringert im Vergleich zu Patienten ohne aGvHD, also für die Stufen der Pro-B-Zelle, Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen und der immaturen und transitionellen B-Zellen. Xiao Xi Oey konnte ebenfalls verminderte Werte für die CD19+ B-Vorläuferzellen im Knochenmark zeigen [90]. Storek et al. zeigten 2001 verminderte CD19+ Vorläuferzellen im Knochenmark für Patienten mit aGvHD Grad 2 - 4 im Vergleich zu Patienten mit aGvHD Grad 1 [66].

Sanchez-Garcia et al. konnten 2006 für die Zellpopulationen CD19+CD10+CD34+ (entspricht der von uns verwendeten Definition von Pro-B-Zellen) bzw. CD19+CD10+CD34 – (entspricht Pre-B-I-, Pre-B-II-B-Zellen sowie immaturen und transitionellen B-Zellen) am Tag 30 und 60 im Knochenmark verminderte Werte für Patienten mit aGvHD zeigen. Am Tag 90 waren die Werte für diese Populationen weiterhin vermindert, wenn auch nicht signifikant [86]. Am Tag 90 lag in dieser Studie lediglich Knochenmark von insgesamt 21 Patienten vor, wodurch eventuell die fehlende Signifikanz zu erklären wäre.

Eine verzögerte B-Zell-Rekonstitution bei aGvHD konnten auch Mensen et al. bestätigen [89].

Die von uns beschriebenen signifikant verminderten B-Vorläuferzellen im Knochenmark bei vorausgegangener aGvHD bestätigen entsprechend die bisher in diesem Bereich veröffentlichten Studien.

4.3.3.3 im Knochenmark auf die T-Zellen (aGvHD d90)

Generell konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei der aGvHD CD8+ T-Zellen Empfänger-Gewebe angreifen und es zu einer Zerstörung der Osteoblasten kommt. Dadurch werden APC aktiviert und es kommt zu einer inflammatorischen Kaskade („Zytokinsturm“) [89, 91]. Durch diese Abläufe kommt es bei aGvHD zu einer verzögerten B-Zell-Rekonstitution [89].

In unserer Studie wurden die CD4+ T-Zellen im Knochenmark untersucht. Einen Einfluss der aGvHD zeigte sich dort nicht.

4.3.4 Diskussion der Ergebnisse an Tag 90: Einfluss cGvHD

4.3.4.1 im peripheren Blut (cGvHD d90)

Am Tag 90 zeigten sich für die CD27- B-Zellen, also für die naiven und transitionellen B-Zellen keine signifikanten Unterschiede, aber jeweils die höchsten Werte für Patienten mit de novo cGvHD.

In den Subpopulationen der CD27+ B-Zellen (also Memory-B-Zellen incl. Subgruppen) zeigten die Gruppen mit aGvHD niedrigere Werte gegenüber den anderen Gruppen, jedoch meist nicht signifikant.

Signifikant niedrigere Werte zeigten sich für die Patienten mit quiescent onset cGvHD im Vergleich zu Patienten mit de novo cGvHD dagegen bei immaturren B-Zellen.

Greinix et al. zeigten 2008 an Tag 100 einen erhöhten prozentualen Anteil an CD19+CD21^{low} B-Zellen im peripheren Blut bei den Patienten, die im Verlauf eine cGvHD entwickeln [92]. Die vorliegenden Messungen stehen dazu in scheinbarem Widerspruch. So zeigte sich bei uns für die CD21- Memory B-Zellen, sowie die CD21- IgM Memory B-Zellen an Tag 90 im peripheren Blut die höchsten Werte für Patienten ohne GvHD. In der Studie von Greinix et al. konnte bei fehlendem Einsatz von CD10 und CD38 nicht zwischen immaturren und CD21- Memory B-Zellen unterschieden werden. Betrachtet man unsere Daten in Zusammenhang mit der Studie von Greinix et al., könnte es sich bei der beobachteten Erhöhung von CD19+CD21^{low} B-Zellen, um die Population der CD21- Memory B-Zellen handeln. In unserer Studie zeigte sich für diese Population erhöhte Werte für Patienten mit quiescent onset cGvHD im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe, also Patienten mit nur aGvHD, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war[93].

4.3.4.2 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen (cGvHD d90)

Im Knochenmark zeigten sich für die HSC und MPP keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Für die CLP zeigten sich signifikant niedrigere Werte bei Patienten mit de novo cGvHD im Vergleich zu Patienten ohne GvHD.

Für die Pro B-Zellen lagen die Werte in absteigende Reihenfolge: de novo cGvHD, keine GvHD, quiescent cGvHD, nur aGvHD. Signifikant war dieser Unterschied für die Patienten mit de novo GvHD gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD. Signifikant höher waren darüber

hinaus die Werte für Patienten ohne GvHD sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD, sowie gegenüber Patienten mit nur aGvHD.

Für die Pre-BI- und Pre-BII-B-Zellen lagen die Werte in absteigender Reihenfolge: de novo cGvHD, keine GvHD, nur aGvHD, quiescent cGvHD. Signifikant höher waren dabei die Werte der Patienten mit de novo cGvHD gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD, sowie nur aGvHD Grad 2 - 4. Signifikant höher waren auch die Werte der Patienten ohne GvHD gegenüber Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 oder quiescent onset cGvHD.

Für die immaturen und transitionellen B-Zellen stiegen die Werte folgendermaßen ab: de novo cGvHD, keine GvHD, quiescent cGvHD, nur aGvHD. Signifikant höher waren die Werte der de novo cGvHD gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD. Signifikant höher waren auch die Werte ohne GvHD sowohl gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD als auch gegenüber Patienten mit nur aGvHD.

In murinen Studien konnte gezeigt werden, dass auch hier bei GvHD die B-Vorläuferzellen im KM vermindert sind, hier ab Reifungsstufe der CLP [78, 94]. Es besteht aber kein Konsens darin, ob dies Folge der aGvHD ist [78] oder an der sich bereits entwickelnden cGvHD liegt [94]. Gemeinsamkeiten bestehen in der Annahme, dass durch eine T-Zellinfiltration Osteoblasten beeinträchtigt werden, die wichtig für das Funktionieren und die Reifung der B-Zellen in der Knochenmarknische sind [78, 94, 95].

Michonneau et al. konnten bei HLA-identischen Transplantationen zeigen, dass erhöhte Werte für Pro-B-Zellen (CD34+CD19+) mit einem verminderten Auftreten von aGvHD Grad 2-4 assoziiert sind. Dabei war ein niedriges Verhältnis von CD3+ Zellen/Pro B-Zellen mit einem geringeren Risiko verbunden [96]. Wie in der vorliegenden Studie, konnte auch dort keine Assoziation zwischen der cGvHD und B-Vorläuferzellen detektiert werden.

Eine Untersuchung mit Einteilung in die 4 von uns gewählten Patientengruppen erfolgte dabei in keiner bisher veröffentlichten Studien. Die vorliegende Studie kann besser als vorausgegangene Studien zwischen Effekten der aGvHD und denen der cGvHD unterscheiden, da Patienten mit nur aGvHD mit Patienten mit quiescent onset cGvHD verglichen werden konnten, sowie Patienten ohne GvHD mit Patienten mit de novo GvHD. Bei dieser Betrachtung fiel am Tag 90 im Knochenmark ein bislang unbekannter Aspekt der de novo cGvHD auf. So hatten diese Patienten den geringsten Anteil an CLP. Dieser Unterschied war signifikant zu

Patienten ohne GvHD. Für die weiteren Reifungsstufen lagen die Werte am Tag 90 für die Patienten mit de novo cGvHD am höchsten, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant im Vergleich zu Patienten ohne GvHD war. Es scheinen sich also bei Patienten mit de novo cGvHD mehr CLP in die B-Zell-Richtung zu entwickeln, möglicherweise als eine Art überschießende Reaktion auf das im peripheren Blut deutlich reduzierte B-Zell-Kompartiment. Eventuell sorgen bei cGvHD länger erhöhte BAFF-Spiegel nicht nur zu einem Überleben autoreaktiver B-Zellen, sondern auch zu einer insgesamt erhöhten Bildung.

4.3.4.3 im Knochenmark auf die T-Zellen (cGvHD d90)

Im Mausmodell wurde beschrieben, dass bei cGvHD CD4+ T-Zellen des Spenders notwendig sind, um B-Zellen des Spenders zu aktivieren, die zu Germinal Center B-Zellen werden und dann AK produzieren, die das Gewebe schädigen [56]. Am Tag 60 konnte in einem murinen Modell nachgewiesen werden, dass B-Zellen zur Induktion einer cGvHD mit klassengewechselten AK benötigten werden [97].

Bei der Analyse der T-Zellen in Bezug auf die cGvHD gab es nur zwischen der Gruppe der Patienten mit quiescent onset cGvHD und den Patienten mit ausschließlicher aGvHD Grad 2 - 4 signifikante Unterschiede. So zeigten sich signifikant höhere Werte für Patienten mit quiescent onset cGvHD bei naiven CD4-T-Zellen, zentralen Memory CD4-T-Zellen und terminalen Effektor CD4-T-Zellen. Beiden Patientengruppen hatten vorausgehend eine aGvHD. Es lag aber ein Unterschied bezüglich der Entwicklung einer cGvHD vor. Dies könnte die These aus dem murinen Modell bestätigen, wonach die cGvHD mit einem erhöhten Wert an T-Helferzellen einhergeht. Das vorliegende Ergebnis bestätigt damit den von Greinix und al detektierten erhöhten prozentualen Wert an und CD4+CD45RA+CD31+ T-Zellen bei Patienten am Tag 100, die eine neue cGvHD entwickeln, zumindest für Patienten mit vorausgegangener aGvHD, also für Patienten mit quiescent onset cGvHD im Vergleich zu Patienten mit ausschließlicher aGvHD [93].

Bei Patienten mit quiescent onset cGvHD könnten erhöhte aktivierte CD4+ T-Zellen verstärkt B-Zellen aktivieren. Die T-Zellen werden wahrscheinlich durch residuelle Empfänger APC oder auch APC des Spenders aktiviert und aktivieren Spender-B-Zellen, die Host-reaktive Antikörper produzieren können.

Im Gegensatz dazu zeigten sich signifikant höhere Werte für die Patienten mit ausschließlicher aGvHD Grad 2 - 4 für die Population der peripheren Effektor CD4-T-Zellen im Vergleich zu den

Patienten mit quiescent onset cGvHD, wobei zu beachten ist, dass der Prozess der Induktion von Host-reaktiven B-Zellen in den Lymphknoten stattfindet und möglicherweise die Abwesenheit dieser Reaktion im peripheren Blut höhere Zahlen von CD4+ T-Zellen bedingt.

4.3.5 Diskussion der Ergebnisse an Tag 180: Einfluss aGvHD

4.3.5.1 im peripheren Blut (aGvHD d180)

Auch am Tag 180 ließ sich eine deutliche Reduktion der B-Zellen im peripheren Blut bei Patienten nach aGvHD beobachten. Dieser Unterschied war signifikant für die CD19+ B-Zellen, die naiven und transitionellen B-Zellen, die immature B-Zellen und die Plasmablasten.

Bereits Storek et al. konnten zeigen, dass verminderte B-Vorläuferzellen im Knochenmark an Tag 80 zu einer verminderten B-Zellzahl im peripheren Blut im Verlauf (1 Jahr nach Transplantation) führten [66].

4.3.5.2 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen (aGvHD d180)

Es zeigten sich für alle B-Vorläuferzellen niedrigere Werte für Patienten nach aGvHD Grad 2 - 4.

Nicht signifikant niedriger waren diese Werte für HSC und MPP, sowie CLP.

Für alle weiteren Reifungsstufen, also die der Pro-B-Zelle, Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen, immaturen und transitionellen B-Zellen waren die Werte bei Patienten nach aGvHD signifikant vermindert.

Das bestätigt die von Shono et al. geäußerte Vermutung, dass die Knochenmark-Nische ein Ziel der aGvHD ist und es nach aGvHD zu einer Störung der Hämatopoese kommt [78].

4.3.5.3 im Knochenmark auf die T-Zellen (aGvHD d180)

An Tag 180 zeigten sich für die T-Zellen keine Unterschiede zwischen Patienten, die zuvor eine aGvHD hatten und Patienten ohne aGvHD. Da an Tag 90 bei den untersuchten Populationen der T-Zellen keine Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert wurden, war das an Tag 180 nicht überraschend, lag die aGvHD zu diesem Zeitpunkt bei den meisten Patienten schon einige Monate zurück.

4.3.6 Diskussion der Ergebnisse an Tag 180: Einfluss cGvHD

4.3.6.1 im peripheren Blut (cGvHD d180)

In den letzten Jahren zeigte sich eine Zunahme der cGvHD [85]. Die cGvHD bleibt weiterhin nur unzureichend erforscht und wirft weitere Fragen auf. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die B-Zell-Rekonstitution beim Menschen circa 1-2 Jahre, insbesondere bei den Memory B-Zellen (CD27+) aber bis zu 5 Jahre andauern kann. Naive B-Zellen hingegen scheinen schneller zu regenerieren [98].

In unserer Studie zeigten sich am Tag 180 im peripheren Blut deutlich weniger B-Zellen bei Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4 und quiescent onset cGvHD im Vergleich zu den Patienten ohne GvHD oder de novo cGvHD.

Signifikant niedrigere Werte zeigten sich bei den B-Zellen (CD19+) für Patienten mit quiescent onset cGvHD oder aGvHD Grad 2 - 4 im Vergleich zu Patienten ohne GvHD.

Bei den naiven und transitionellen B-Zellen waren die Werte bei Patienten ohne GvHD signifikant höher als bei Patienten mit quiescent onset cGvHD. In einigen anderen Studien wurde bei Patienten mit cGvHD erhöhte BAFF/B-Zell Quotienten detektiert werden. BAFF führt bei immaturren B-Zellen aber auch Plasmablasten zu einer Proliferation. Das kann darauf hindeuten, dass erhöhte BAFF Spiegel bei cGvHD zu einer höheren Zahl von naiven B-Zellen führen [84].

Für die immaturren Zellen zeigten sich signifikant erhöhte Werte für die Patienten ohne GvHD gegenüber den anderen 3 Gruppen, das heißt hier war auch ein Unterschied zu den Patienten mit de novo GvHD zu sehen.

Für die Gruppe der Plasmablasten waren die Werte für Patienten ohne GvHD signifikant höher im Vergleich zu Patienten mit nur aGvHD Grad 2 - 4.

In anderen Studien wurde ca. 1 Jahr nach HSZT bei Patienten mit aktiver cGvHD erhöhte Frequenzen an immature/transitionellen CD19+CD21^{low} B-Zellen detektiert [92, 99]. Wie bereits in der Diskussion von Tag 90 stecken hinter den CD19+ CD21⁻ B-Zellen verschiedene Zellpopulationen, die in unserer Studie mittels CD10 und CD38 weiter aufgeteilt werden konnten. Signifikant erhöhte Werte lagen in den einzelnen Populationen nicht vor für Patienten mit cGvHD. Es könnte sich jedoch bei der in anderen Studien beobachteten Erhöhung von CD19+CD21^{low} B-Zellen um die Population der CD21⁻ Memory B-Zellen handeln.

Für diese Population zeigten sich in unserer Studie auch am Tag 180 dort für Patienten mit quiescent onset cGvHD im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe, also den Patienten mit nur aGvHD erhöhte Werte, auch wenn diese nicht signifikant waren.

4.3.6.2 im Knochenmark auf die B-Vorläuferzellen (cGvHD d180)

Für die B-Vorläuferzellen im Knochenmark zeigten sich in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede für die HSC und MPP, sowie die CLP.

Signifikant niedrigere Werte zeigten Patienten mit aGvHD 2-4 oder quiescent onset cGvHD im Vergleich zu Patienten ohne GvHD für die Population der Pro B-Zellen.

Sanchez et al. zeigten bei Patienten mit cGvHD signifikant niedrigere Werte der CD19+CD10+CD34+ Zellen, was unserer Definition von Pro-B-Zellen entspricht, für Patienten mit cGvHD 7 und 9 Monate nach HSZT, wobei keine Trennung zwischen einem de novo versus quiescent onset erfolgte. [86]. Ob der von Sanchez beschriebene Effekt tatsächlich der cGvHD zuordenbar ist, bleibt damit sehr fraglich, da zur Beurteilung des reinen cGvHD Effektes Patienten ohne GvHD gegenüber Patienten mit de novo cGvHD betrachten werden müssten, sowie Patienten mit quiescent onset cGvHD gegenüber Patienten mit einer isolierten akuten GvHD [86].

Signifikant niedrigere Werte zeigten auch Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen von Patienten mit aGvHD 2-4 oder quiescent onset cGvHD im Vergleich zu Patienten ohne GvHD.

Auch bei den immaturren und transitionellen B-Zellen zeigten sich auch signifikant niedrigere Werte bei Patienten mit aGvHD 2-4 oder quiescent onset cGvHD im Vergleich zu Patienten ohne GvHD.

Auch hier zeigten Sanchez et al. signifikant niedrigere Werte für CD19+CD10+CD34- Zellen (was unseren Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen, sowie den immaturren und transitionellen B-Zellen zusammengenommen entspricht) 7 bzw. 9 Monate nach HSZT bei Patienten mit cGvHD. Aber auch hier bleibt durch die Gruppeneinteilung fraglich, ob es sich wirklich um einen Effekt der cGvHD handelt [86].

4.3.6.3 im Knochenmark auf die T-Zellen (cGvHD d180)

Signifikante Unterschiede lagen für die Population der zentralen Memory CD4-Zellen vor. Dort zeigten sich signifikant verminderte Werte für Patienten mit aGvHD, sowohl gegenüber Patienten mit de novo cGvHD als auch gegenüber Patienten mit quiescent onset cGvHD.

Patienten mit de novo cGvHD zeigten im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen niedrigere Werte für die Population der CD25niedrige FoxP3-T-Zellen.

T-Helferzellen induzieren eine Weiterentwicklung und Differenzierung der B-Zellen. In murinen Modellen für cGvHD oder BOS konnten erhöhte Frequenzen an T-Helferzellen gezeigt werden, wodurch naive B-Zellen sich weiterentwickeln und AK produzieren können [87, 100]. Allerdings wurden auch B-Zell-unabhängige Effektormechanismen der cGvHD beobachtet, wobei zirkulierende T-Helferzellen cTH CD4+CD45RA- eine wichtige Rolle spielen [87]. Die signifikant höheren Werte der Memory CD4-Zellen (CD3+CD4+CD45RA-CCR7+) für Patienten mit de novo oder quiescent onset cGvHD bestätigen diese These. Bestätigt werden diese Ergebnisse auch durch eine Studie von Forcade et al. [101].

Eine Theorie zur Entstehung der cGvHD ist, dass mature Spender T-Zelle über Empfänger APC aktiviert werden danach Host-reaktiv sind. Eine andere aktuelle Theorie zur Entstehung der cGvHD vermutet, dass mature Spender B-Zellen, die Host-reaktiv sind autoreaktive Host-reaktive T-Zellen als APC aktivieren [87].

Tregs scheinen einen protektiven Effekt auf die Osteoblasten zu haben, die die Knochenmark-Nische für die B-Vorläuferzellen bilden [87]. Signifikante Unterschiede für regulatorische T-Zellen zeigten sich aber nicht für Patienten mit cGvHD gegenüber ihren jeweiligen Kontrollgruppen.

4.3.7 Diskussion der Ergebnisse tagesunabhängig: Einfluss aGvHD

In der Literatur gibt es viele Untersuchungen über die Hämatopoese nach HSZT und die veränderten Reifungsprozesse bei akuter oder cGvHD [95, 102].

An der aGvHD sind vor allem Host-reaktive Spender- T-Zellen, die proinflammatorische Zytokine freisetzen und direkt Gewebe schädigen beteiligt [102].

Im murinen Modell konnte in vorigen Studien gezeigt werden, dass es nach einer aGvHD zu einem Reifungsarrest der B-Zell-Regeneration nach HSZT kommt [83]. Ein solcher Reifungsarrest im Knochenmark konnte in der vorliegenden Studie im humanen Knochenmark gezeigt werden.

Bereits am Tag 28 bestanden Unterschiede zwischen den Patienten, die bis dahin schon eine aGvHD entwickelten im Vergleich zu den Patienten ohne aGvHD. Am Tag 28 waren die Medianwerte ab der Reifungsstufe der Pre-B-Zellen vermindert bei Patienten mit aGvHD, also die hier gemessene Population der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM), sowie der immaturen und transitionellen B-Zellen ((CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM).

Am Tag 90 und Tag 180 waren die Werte ab der Reifungsstufe der Pro-B-Zelle, also den Populationen der Pro-B-Zelle ((CD45) CD22+ CD19+ CD34+ CD10+ IgM- %LM), der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen ((CD45) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM- %LM), sowie der immaturen und transitionellen B-Zellen ((CD45+) CD22+ CD19+ CD34- CD10+ IgM+ %LM), beim Auftreten einer aGvHD signifikant vermindert, wobei die Signifikanz dabei mit $p < 0,000$ stets höchst signifikant war.

Damit findet der Reifungsarrest bereits auf der Reifungsstufe der ersten Vorläufer-Zelle statt, die nur noch das Potential hat sich in B-Lymphozyten zu entwickeln, der Pro-B-Zelle. Die Reifungsstufe zuvor, die der CLP, die noch das Potential in sich hat sich in alle lymphatischen Zellen zu entwickeln, ist davon noch nicht betroffen.

Ursächlich für die Beeinträchtigung der Hämatopoese könnte eine Störung in der Knochenmark-Nische sein, die auch für die B-Zell-Entwicklung wichtig ist [22].

Nach Abklingen der aGvHD scheint die Hämatopoese aufzuholen, wobei auch erhöhte BAFF-Werte zur beschleunigten B-Zell-Regeneration beitragen könnten [103].

Es wird diskutiert, dass die erhöhten BAFF-Level potentiell zu einem Versagen der physiologischen negativen Selektion führen und konsekutiv das Überleben allo- und autoreaktiver B-Zellen begünstigen [102, 104, 105].

In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlich reduzierter Anteil an B-Vorläuferzellen bei Patienten nach aGvHD im Knochenmark gezeigt werden.

Der Reifungsarrest nach aGvHD der B-Zell-Rekonstitution führt konsekutiv zu einem verminderter B-Zell Anteil im peripheren Blut, wie man in der vorliegenden Arbeit sehen konnte. Dieser verminderte Anteil an B-Zellen im peripheren Blut nach aGvHD konnte auch von anderen Autoren gezeigt werden [106].

Ausgenommen war in der vorliegenden Arbeit das Memory-Kompartiment, das zunächst wahrscheinlich durch die direkte Übertragung vom Spender entsteht.

Am Tag 180 ist dieser Effekt nicht mehr eindeutig nachweisbar, wobei sowohl die sich erholende Knochenmarkproduktion als auch eine periphere Expansion zur Regeneration beitragen [104].

4.3.8 Diskussion der Ergebnisse tagesunabhängig: Einfluss cGvHD

Während die aGvHD bereits relativ gut untersucht ist, sind Daten zum Immundefekt bei cGvHD relativ limitiert [87, 95, 102]. Die cGvHD wird durch die CD34-Zelldosis, die Transplantatquelle, das Patienten- und Spenderalter beeinflusst [66]. Einige Autoren konnten Parallelen zu „Autoimmun-Syndromen“ zeigen. So scheint bei der cGvHD eine T-Zell-Komponente mit B-Zell-Stimulation vorzuliegen. Es kommt dabei zu einer Auto-AK Produktion und einer systemischen Fibrose [91]. Es wird aber auch eine Thymusdysfunktion mit einer verminderten Anzahl an Tregs und einer erhöhten Anzahl autoreaktiver CD4-Zellen beobachtet, die eine Host-reaktive B-Zell-Antwort generieren, wodurch Schäden durch Fibrose und chronische Entzündung entstehen [91].

Unterstützt wird die Beobachtung von Parallelen zu „Autoimmun-Syndromen“ durch die Tatsache, dass bei Patienten mit cGvHD eine inadäquate B-Zell-Rekonstitution, sowie persistierende hohe BAFF Level mit Expansion aktivierter CD27+ B Zellen aufweisen [105, 107]. Bei Patienten ohne cGvHD ist der BAFF Spiegel zwar während der Rekonstitution ebenfalls erhöht, aber die BAFF/B-Zell Ratio ist nach 20 Monaten im Gegensatz zu Patienten mit cGvHD bereits normalisiert [107]. Generell zeigt sich nach HSZT ein höherer BAFF-Spiegel, der sich aber bei Patienten ohne cGvHD früher normalisiert [103].

Erhöhte BAFF-Spiegel konnten bei vielen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden [108–111]. Im physiologischen Ablauf verlassen auch autoreaktive B-Zellen das Knochenmark, werden dann aber oft eliminiert. Bei vielen Autoimmunerkrankungen führen hohe BAFF-

Spiegel jedoch dazu, dass viele potentiell autoimmune Zellen überleben. Bei Patienten mit cGvHD liegen weniger BAFF-Rezeptoren vor und damit erhöhte BAFF-Spiegel, da weniger BAFF eliminiert wird [87, 103]. Das führt zu einer geringeren peripheren Toleranz und damit zu einer erhöhten Antwort auf Antigene über den B-Zell-Rezeptor, was mit einer schlechten Erholung des naiven B-Zell-Kompartiments und erhöhtem B-Zell-Überleben einhergeht [99, 105, 112]. Bei Patienten, die keine cGvHD entwickeln scheint es wichtig zu sein, dass supranormale Anzahl von naiven und transitionellen B-Zellen vorliegen, die BAFF genügend neutralisieren können [87]. In unseren Untersuchungen konnte die These, dass eine erhöhte Anzahl von naiven und transitionellen B-Zellen vorliegen muss, um keine cGvHD zu entwickeln, nicht bestätigt werden. So lagen im peripheren Blut an Tag 90 und 180 ähnliche Relativwerte für Patienten mit de novo cGvHD und ohne GvHD vor, sowie niedrigere, aber ebenfalls ähnliche Werte für Patienten mit nur aGvHD und quiescent onset cGvHD.

Zusammenfassend beobachteten Li et al., dass im murinen Modell bei Patienten mit cGvHD eine gestörte B-Zell-Rekonstitution aufgrund einer gestörten B-Zell-Vorläufer-Nische stattfindet. Im murinen Modell kommt es dadurch zu einer verringerten Anzahl an CLPs, Pro B, Pre B und immaturen B-Zellen [107]. In unseren Untersuchungen steht diese These zumindest für die Patienten mit quiescent onset cGvHD im Einklang. So zeigt sich eine Störung der B-Zell-Rekonstitution aufgrund einer vorausgegangenen aGvHD. Hinweis auf einen Einfluss der cGvHD auf die B-Zell-Rekonstitution lässt sich in unseren Studien im humanen Bereich nicht zeigen.

Bei den Patienten mit cGvHD könnte es bei erhöhten BAFF-Spiegeln zu einem BAFF-abhängigen Entwicklungsweg kommen, bei dem Pre-Germinal Center B-Zellen (IgD+CD38highCD27+) und Plasmablasten (IgD low CD38high CD27+) ansteigen [107]. Es scheint dabei bei den CD27+ Zellen einen BCR unabhängigen Weg der Antikörper-Produktion zu geben [87]. In unseren Untersuchungen zeigten sich am Tag 90 höhere Werte der Plasmablasten für Patienten mit de novo cGvHD, auch wenn das nicht signifikant war. Es könnte jedoch auf einen BAFF-abhängigen Entwicklungsweg bei Patienten mit de novo GvHD hindeuten, da Plasmablasten BAFF reaktiv sind.

Nimmt man die oben aufgestellte Hypothese an, dass veränderte Bedingungen in der B-Zell-Rekonstitution, erhöhte BAFF-Spiegel und damit ein erhöhtes Überleben von allo- und

autoreaktiven B-Zellen zum Entstehen einer cGvHD beitragen, so ist es wichtig sicherzugehen, dass nicht nur einen verspäteten Effekt der aGvHD betrachtet wird.

Um zu prüfen, ob ein solcher Effekt bei Patienten mit quiescent onset cGvHD vorliegt ist eine Überprüfung dieser Patientengruppe gegenüber Patienten mit nur aGvHD nötig. Dabei zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass es im Bereich der B-Zell-Rekonstitution keine relevanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen gibt. Es zeigten sich höhere Werte für die HSC+MPP und CLP bei Patienten mit quiescent onset cGvHD, sowie signifikant höhere Werte für die untersuchten Subpopulationen der CD4-T-Zellen im Knochenmark. Möglicherweise scheint es also einen T-Zell-vermittelte Ursache für das Auftreten einer quiescent onset cGvHD zu geben. Für ein höheres Vorliegen an allo- und autoreaktiven B-Zellen gibt es in der vorliegenden Arbeit bei gleichbleibenden Anteilen an B-Vorläuferzellen keinen Hinweis. Für den Effekt der cGvHD wäre daher eine weiterführende Analyse der T-Zellen von Interesse, auch von den hier nicht untersuchten CD8-T-Zellen.

Um zu prüfen, ob ein erhöhtes Überleben von allo- und autoreaktiven B-Zellen zum Entstehen einer de novo cGvHD beiträgt, kann man die Patienten mit de novo cGvHD mit Patienten ohne GvHD vergleichen. Dabei zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein höherer Anteil an B-Vorläuferzellen ab Reifungsstufe der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen am Tag 90. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine Ausweitung der Personenzahl könnte diesen Effekt in weiterführenden Studien möglicherweise bestätigen und prüfen, ob dabei erhöhte BAFF-Werte in der Gruppe der Patienten vorliegen, die eine de novo cGvHD entwickeln werden. Trifft das zu, wären sowohl BAFF-Spiegel als auch erhöhte Populationen der Pre-B-I- und Pre-B-II-B-Zellen, sowie nachfolgender Reifungsstufen am Tag 90 ein möglicher Biomarker für das Auftreten einer de novo cGvHD.

5 Zusammenfassung

Die HSZT ist oft die einzig kurative Therapieoption bei hämatologischen Erkrankungen. Sie hat dabei aber ein hohes Mortalitätsrisiko. Ein Faktor dafür ist das erhöhte Risiko an Infektionen zu versterben bei fehlender Immunkompetenz.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aGvHD einen signifikanten Effekt auf die B-Zell-Rekonstitution hat. So kommt es nach dem Auftreten einer aGvHD zu einem Reifungsarrest auf Höhe der Pro-B-Zellen im Knochenmark, der sich verzögert bis ins periphere Blut auswirkt und folglich zu niedrigeren B-Zellen bei Patienten nach aGvHD führt.

In der Analyse der B-Zellen und ihrer Vorläuferzellen konnten kaum signifikante Unterschiede zwischen Patienten ohne GvHD und Patienten mit de novo cGvHD gezeigt werden. Auch zwischen Patienten mit nur aGvHD und quiescent onset cGvHD lagen für diese Zellen kaum signifikante Unterschiede vor. Die cGvHD scheint sich daher kaum auf die B-Zell-Rekonstitution auszuwirken. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen resultierten daher vor allem aus dem Effekt der aGvHD.

Während bei der de novo cGvHD offensichtlich die Produktion von B-Zellen nicht beeinträchtigt ist, konnten Veränderungen im Memory-B-Zell-Kompartiment mit dem Auftreten von CD21- Memory B-Zellen im peripheren Blut wiederholt mit der cGvHD assoziiert werden, wobei es sich dabei um einen Knochenmark-unabhängigen Prozess handelt.

6 Literatur

- 1 *Janeway C, Murphy KP.* Janeway Immunologie. 7 Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2009
- 2 *Müller WA, Hassel M,* Hrsg. Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012
- 3 *Janeway CA, Medzhitov R.* Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*; DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- 4 *Delves PJ, Roitt IM.* The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*; DOI: 10.1056/NEJM200007063430107
- 5 *Sompayrac L.* How the immune system works. 4 Aufl. Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2012
- 6 *Matsuuchi L, Gold MR.* New views of BCR structure and organization. *Current Opinion in Immunology*; DOI: 10.1016/S0952-7915(00)00215-6
- 7 *Delves PJ, Roitt IM.* The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.*; DOI: 10.1056/NEJM200007133430207
- 8 *Orkin SH, Zon LI.* Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*; DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.025
- 9 *Ichii M, Oritani K, Kanakura Y.* Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells*; DOI: 10.4252/wjsc.v6.i4.421
- 10 *Payne KJ, Crooks GM.* Human hematopoietic lineage commitment. *Immunol Rev*; DOI: 10.1034/j.1600-065X.2002.18705.x
- 11 *Payne KJ, Crooks GM.* Immune-cell lineage commitment: translation from mice to humans. *Immunity*; DOI: 10.1016/j.immuni.2007.05.011
- 12 *Doulatov S, Notta F, Laurenti E et al.* Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*; DOI: 10.1016/j.stem.2012.01.006
- 13 *Chao MP, Seita J, Weissman IL.* Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; DOI: 10.1101/sqb.2008.73.031
- 14 *Pang WW, Price EA, Sahoo D et al.* Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; DOI: 10.1073/pnas.1116110108
- 15 *Wang LD, Wagers AJ.* Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; DOI: 10.1038/nrm3184
- 16 *Lai AY, Kondo M.* T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin. Immunol.*; DOI: 10.1016/j.smim.2008.05.002
- 17 *Galy A, Travis M, Cen D et al.* Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*; DOI: 10.1016/1074-7613(95)90175-2
- 18 *Blom B, Spits H.* Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.*; DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090612
- 19 *LeBien TW.* Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000; 96 (1): 9–23
- 20 *Chicha L, Jarrossay D, Manz MG.* Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J. Exp. Med.*; DOI: 10.1084/jem.20040809
- 21 *Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG et al.* Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*; DOI: 10.1002/cyto.b.20547
- 22 *Nagasawa T.* Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*; DOI: 10.1038/nri1780

- 23 *Kurosaka D, LeBien TW, Pribyl JAR.* Comparative studies of different stromal cell microenvironments in support of human B-cell development. *Experimental Hematology*; DOI: 10.1016/S0301-472X(99)00067-3
- 24 *Ghia P, Boekel E ten, Rolink AG et al.* B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunology Today*; DOI: 10.1016/S0167-5699(98)01330-9
- 25 *Pieper K, Grimbacher B, Eibel H.* B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.*; DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.046
- 26 *van Lochem, E G, van der Velden, V H J, Wind HK et al.* Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*; DOI: 10.1002/cyto.b.20008
- 27 *Cuss AK, Avery DT, Cannons JL et al.* Expansion of Functionally Immature Transitional B Cells Is Associated with Human-Immunodeficient States Characterized by Impaired Humoral Immunity. *The Journal of Immunology* 2006; 176 (3): 1506–1516
- 28 *Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H.* Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*; DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0109.x
- 29 *Monroe JG, Dorshkind K.* Fate Decisions Regulating Bone Marrow and Peripheral B Lymphocyte Development. In: Alt FW, Hrsg. *Advances in immunology: Volume 95.* New York: Academic Press; 2007: 1–50
- 30 *Sims GP, Ettinger R, Shirota Y et al.* Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2004-11-4284
- 31 *Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B et al.* Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2009-07-234799
- 32 *Vossenkämper A, Spencer J.* Transitional B Cells: How Well Are the Checkpoints for Specificity Understood? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*; DOI: 10.1007/s00005-011-0135-0
- 33 *Bhandoola A, Sambandam A.* From stem cell to T cell: one route or many? *Nat. Rev. Immunol.*; DOI: 10.1038/nri1778
- 34 *Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R.* Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*; DOI: 10.1038/nri3158
- 35 *Corthay A.* How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.*; DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x
- 36 *Peterson RA.* Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*; DOI: 10.1177/0192623311430693
- 37 *Tang Q, Bluestone JA.* The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.*; DOI: 10.1038/ni1572
- 38 *Leveque L, Le Texier L, Lineburg KE et al.* Autophagy and haematopoietic stem cell transplantation. *Immunol. Cell Biol.*; DOI: 10.1038/icb.2014.95
- 39 *Soiffer RJ.* Hematopoietic stem cell transplantation. 2 Aufl. Totowa, N.J., London: Humana; Springer [distributor]; 2008
- 40 *Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ.* Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*; DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141606
- 41 *Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P et al.* Graft-versus-host disease. *The Lancet*; DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3
- 42 *Baird K, Pavletic SZ.* Chronic graft versus host disease. *Curr. Opin. Hematol.*; DOI: 10.1097/01.moh.0000245689.47333.ff

- 43 *Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.09.004
- 44 *Harris AC, Ferrara, James L M, Levine JE.* Advances in predicting acute GVHD. *Br. J. Haematol.*; DOI: 10.1111/bjh.12142.
- 45 *Reddy P, Ferrara JLM.* Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Reviews*; DOI: 10.1016/S0268-960X(03)00009-2
- 46 *Biron CA, Nguyen KB, Pien GC et al.* Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*; DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.189
- 47 *Choi SW, Levine JE, Ferrara, James L M.* Pathogenesis and management of graft-versus-host disease. *Immunol Allergy Clin North Am*; DOI: 10.1016/j.iac.2009.10.001.
- 48 *gr3.jpg* (JPEG-Grafik, 806 × 698 Pixel) (19.11.2012). Im Internet: thelancet.com/cms/attachment/2001001855/2003729861/gr3.jpg; Stand: 18.07.2017
- 49 *Storb R, Deeg HJ, Farewell V et al.* Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood* 1986; 68 (1): 119–125
- 50 *Choi SW, Reddy P.* Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol*; DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.102
- 51 *Paczesny S, Choi SW, Ferrara, James L M.* Acute graft-versus-host disease: new treatment strategies. *Curr. Opin. Hematol.*; DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283319a6f.
- 52 *Harris AC, Levine JE, Ferrara, James L M.* Have we made progress in the treatment of GVHD? *Best Pract Res Clin Haematol*; DOI: 10.1016/j.beha.2012.10.010.
- 53 *Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M et al.* Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2008-07-168401
- 54 *MacMillan M.* Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*; DOI: 10.1053/bbmt.2002.v8.pm12171485
- 55 *Lee SJ, Vogelsang G, Flowers, Mary E D.* Chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1053/bbmt.2003.50026
- 56 *Flynn R, Du J, Veenstra RG et al.* Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2014-03-562231
- 57 *Schultz KR, Paquet J, Bader S et al.* Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16 (2): 289–295
- 58 *Zheng H, Matte-Martone C, Li H et al.* Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2007-08-109678
- 59 *Sarantopoulos S, Blazar BR, Cutler C et al.* Reprint of: B Cells in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.033
- 60 *Kuzmina Z, Krenn K, Petkov V et al.* CD19(+)CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2012-06-435008
- 61 *Glauzy S, Soret J, Fournier I et al.* Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2014-05-573303

- 62 *Wolff D, Bertz H, Greinix H et al.* The treatment of chronic graft-versus-host disease: consensus recommendations of experts from Germany, Austria, and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int*; DOI: 10.3238/arztebl.2011.0732
- 63 *Bosch M, Khan FM, Storek J.* Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.*; DOI: 10.1097/MOH.0b013e328353bc7d
- 64 *Holländer GA.* Lymphoid reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. Of mice and men: progress made in HSCT immunobiology. *Semin Immunopathol*; DOI: 10.1007/s00281-008-0139-y
- 65 *Auletta JJ, Lazarus HM.* Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant.*; DOI: 10.1038/sj.bmt.1704966
- 66 *Storek J.* Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*; DOI: 10.1182/blood.V98.2.489
- 67 *Avanzini MA, Locatelli F, Santos CD et al.* B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Experimental Hematology*; DOI: 10.1016/j.exphem.2005.01.005
- 68 *Mackall C, Fry T, Gress R et al.* Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant.*; DOI: 10.1038/bmt.2009.255
- 69 *Williams KM, Gress RE.* Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*; DOI: 10.1016/j.beha.2008.06.003
- 70 *Krenger W, Blazar BR, Holländer GA.* Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2011-02-334623
- 71 *Fedoriw Y, Samulski TD, Deal AM et al.* Bone Marrow B cell Precursor Number after Allogeneic Stem Cell Transplantation and GVHD Development. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2012.03.005
- 72 *Hilgendorf I, Mueller-Hilke B, Kundt G et al.* The lack of memory B cells including T cell independent IgM+ IgD+ memory B cells in chronic graft-versus host disease is associated with susceptibility to infection. *Transpl. Int.*; DOI: 10.1111/j.1432-2277.2011.01388.x
- 73 *Jan Storek, German Espino, Monja A. Dawson, Barry Storer, Mary E. D. Flowers, and David G. Maloney.* Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation
- 74 *Storek J, Espino G, Dawson MA et al.* Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 2000; 96 (9): 3290–3293
- 75 *Seggewiss R, Einsele H.* Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2009-12-234096
- 76 *Corre E, Carmagnat M, Busson M et al.* Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica*; DOI: 10.3324/haematol.2009.018853
- 77 *Sanchez-Garcia J, Serrano J, Gomez P et al.* The impact of acute and chronic graft-versus-host disease on normal and malignant B-lymphoid precursors after allogeneic stem cell transplantation for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006; 91 (3): 340–347
- 78 *Shono Y, Ueha S, Wang Y et al.* Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2009-11-253559

- 79 *Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW et al.* Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2003-11-4011
- 80 *Zhu J, Garrett R, Jung Y et al.* Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2006-08-041384
- 81 *Sack U*, Hrsg. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen. Basel, Freiburg [Breisgau], Paris, London, New York, Bangalore, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney: Karger; 2007
- 82 *Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G et al.* Flow cytometry. *J Invest Dermatol*; DOI: 10.1038/jid.2012.282
- 83 *Doser K.* Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation. Regensburg: Universität Regensburg, 2011
- 84 *Allen JL, Fore MS, Wooten J et al.* B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2012-06-438911
- 85 *Arai S, Arora M, Wang T et al.* Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.10.021
- 86 *Sánchez-García J, Serrano J, Gómez P et al.* The impact of acute and chronic graft-versus-host disease on normal and malignant B-lymphoid precursors after allogeneic stem cell transplantation for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006; 91 (3): 340–347
- 87 *Li X, Gao Q, Feng Y et al.* Developing role of B cells in the pathogenesis and treatment of chronic GVHD. *Br. J. Haematol.*; DOI: 10.1111/bjh.15719
- 88 *Pierini A, Ruggeri L, Mancusi A et al.* T cell depletion and no post transplant immune suppression allow separation of graft versus leukemia from graft versus host disease. *Bone Marrow Transplant.*; DOI: 10.1038/s41409-019-0597-y
- 89 *Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I et al.* Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2013-11-539031
- 90 *Oey M.* Verzögerte B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation in Patienten mit GvHD. Freie Universität Berlin; 2018
- 91 *Schroeder MA, DiPersio JF.* Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech*; DOI: 10.1242/dmm.006668
- 92 *Greinix HT, Pohlreich D, Kouba M et al.* Elevated numbers of immature/transitional CD21- B lymphocytes and deficiency of memory CD27+ B cells identify patients with active chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.10.009
- 93 *Greinix HT, Kuzmina Z, Weigl R et al.* CD19+CD21low B cells and CD4+CD45RA+CD31+ T cells correlate with first diagnosis of chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.11.010
- 94 *Kolupaev OV, Dant TA, Bommiasamy H et al.* Impaired bone marrow B-cell development in mice with a bronchiolitis obliterans model of cGVHD. *Blood Adv*; DOI: 10.1182/bloodadvances.2017014977
- 95 *Szyska M, Na I-K.* Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2016.00118
- 96 *Michonneau D, Peffault de Latour, Régis, Porcher R et al.* Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Br. J. Haematol.*; DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07574.x

- 97 *Srinivasan M, Flynn R, Price A et al.* Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2011-07-364414
- 98 *Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S et al.* Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2016.00507
- 99 *Rozmus J, Kariminia A, Abdossamadi S et al.* Comprehensive B Cell Phenotyping Profile for Chronic Graft-versus-Host Disease Diagnosis. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.11.007
- 100 *Zhang C, Todorov I, Zhang Z et al.* Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2005-09-3623
- 101 *Forcade E, Kim HT, Cutler C et al.* Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2015-12-688895
- 102 *Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S et al.* The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.09.023
- 103 *Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT et al.* High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res*; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1290
- 104 *Sarantopoulos S, Ritz J.* Aberrant B cell homeostasis in chronic GVHD. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2014-12-567834
- 105 *Sarantopoulos S, Blazar BR, Cutler C et al.* B cells in chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.10.029
- 106 *Glauzy S, Soret J, Fournier I et al.* Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2014-05-573303
- 107 *Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT et al.* Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2008-09-177840
- 108 *Groom J, Kalled SL, Cutler AH et al.* Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*; DOI: 10.1172/JCI14121
- 109 *Mariette X, Roux S, Zhang J et al.* The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*; DOI: 10.1136/ard.62.2.168
- 110 *Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K et al.* Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum*; DOI: 10.1002/art.21526
- 111 *Zhang J, Roschke V, Baker KP et al.* Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*; DOI: 10.4049/jimmunol.166.1.6
- 112 *Wang KS, Kim HT, Nikiforow S et al.* Antibodies targeting surface membrane antigens in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*; DOI: 10.1182/blood-2017-08-801001

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Vorrangig danke ich Herrn Prof. Dr. Daniel Wolff für die Bereitstellung des interessanten Themas. Insbesondere gilt mein Dank für die immerwährende Unterstützung und die gute Betreuung über die lange Zeit.

Frau Ute Fehn danke ich von Herzen für die intensive Unterstützung mit ihrer ausgeprägten Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und witzigen Art.

Der Universität Regensburg danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Heidi und Wolfgang Sczuka für die Ermöglichung des Studiums und der Promotion und die stetige Zuversicht in meine Fähigkeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Herrn Jonas Weigert. Danke für die moralische, verständnisvolle und tatkräftige Unterstützung.

Sicherlich kann das nur ein kurzer Auszug der Menschen sein, die mich auf dem manchmal sehr schönen und manchmal sehr steinigen Weg durch das Studium hin zur Promotion begleitet haben. Ich hoffe ihr alle wisst, wie wichtig ihr mir seid und wie viel Unterstützung jeglicher Art ihr mir über die Jahre entgegengebracht habt. Vielen Dank dafür!