

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie
Prof. Dr. med. Matthias Evert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Analyse IgA-exprimierender Zellen in intestinalen Gewebeproben nach allogener
Stammzelltransplantation und deren Bedeutung beim Vorliegen einer Graft-versus-
Host-Erkrankung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lucia Scheidler

2024

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie
Prof. Dr. med. Matthias Evert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Analyse IgA-exprimierender Zellen in intestinalen Gewebeproben nach allogener
Stammzelltransplantation und deren Bedeutung beim Vorliegen einer Graft-versus-
Host-Erkrankung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lucia Scheidler

2024

Dekan:	Prof. Dr. med. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ernst Holler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias Evert
Tag der mündlichen Prüfung:	17.05.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Pathogenese und Einteilung der GvHD	1
1.1.1 Inzidenz	1
1.1.2 Differenzierung zwischen akuter und chronischer Form	1
1.1.3 Abgrenzung zum GvL-Effekt	2
1.1.4 Grundlagen der Pathogenese	2
1.1.5 Risikofaktoren der GvHD	3
1.2 Klinik und Histopathologie der intestinalen GvHD	4
1.2.1 Klinische Manifestation und Grading der intestinalen GvHD	4
1.2.2 Histopathologische Merkmale und Gradeinteilung nach Lerner	5
1.3 Notwendigkeit diagnostischer und prognostischer Biomarker	6
1.3.1 MAGIC Algorithmus	6
1.3.2 Einfluss und Bestimmung der intestinalen Dysbiose	6
1.4 Bedeutung der IgA-exprimierenden Zellen	8
1.4.1 Störung der intestinalen Barrierefunktion	8
1.4.2 Humorale Immunantwort	8
1.4.3 Ursprung der intestinalen antikörperproduzierenden Zellen	9
1.4.4 Rezirkulation der IgA-exprimierenden Zellen	11
1.4.5 Aufbau und Transzytose des sekretorischen IgA	11
1.4.6 Funktionen des sekretorischen IgA	12
1.4.7 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.2 Patientenkollektiv und Probenauswahl	17
2.3 Fixation und Vorbereitung der Proben	20
2.4 Grundlagen der Immunhistochemie	21
2.4.1 Antigen-Antikörper-Reaktion	21
2.4.2 Automatisiertes Färbesystem	22
2.5 Auswertung der digitalisierten Schnitte	23
2.6 Statistische Auswertung	26
3 Resultate	27
3.1 IgA ⁺ Zellen vor und nach der Stammzelltransplantation	27

3.2	Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten	28
3.3	Zusammenhang zum GvHD-Schweregrad nach Lerner	30
3.4	Bezug zum klinischen GvHD-Schweregrad	36
3.5	Regeneration der IgA ⁺ Zellen	39
3.6	Überlebenszeitanalyse.....	41
3.6.1	Therapie- und rezidivassoziierte Mortalität	41
3.6.2	Cox-Regression	44
3.7	Korrelation mit REG-3- α und 3-IS	45
4	Diskussion	46
4.1	Zusammenhang zum Schweregrad der GvHD.....	46
4.2	Unterschiede der Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten.....	47
4.3	Verzögerte Regeneration der IgA ⁺ Zellen	48
4.4	Prognostische Aussagekraft	50
4.5	Korrelation mit REG-3- α und 3-IS	51
4.6	Grenzen der vorliegenden Arbeit.....	52
4.7	Ausblick	53
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis.....	55
7	Danksagung	
8	Lebenslauf	
9	Eidesstattliche Erklärung.....	

Abkürzungsverzeichnis

3-IS	3-Indoxylsulfat
Abb.	Abbildung
aGvHD	akute Graft-versus-Host-Erkrankung
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
allo-HSCT	allogene Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
CCR10	C-C motif receptor 10
cGvHD	chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
Fab	fragment antigen binding
Fc	fragment crystallisable
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GIT	gastrointestinaler Trakt
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukämie
HE	Hämatoxylin und Eosin
H-Kette	schwere Kette
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	Hazard Ratio
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin

IgA	Immunglobulin A
IgA ⁺ Zelle	IgA-exprimierende Zelle
IHC	Immunhistochemie
L-Kette	leichte Kette
MAGIC	Mount Sinai Acute GVHD International Consortium
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MHC	major histocompatibility complex
miHA	Minor-Histokompatibilitätsantigen
MRD	minimale Resterkrankung
NIH	National Institutes of Health
REG	Regenerating islet-derived protein
RRM	rezidivassoziierte Mortalität
SC	sekretorische Komponente
SHM	somatische Hypermutation
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
ST2	Suppression of Tumorigenicity 2
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue-Microarray
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRM	therapieassoziierte Mortalität

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Geräte	S. 15
Tab. 2:	Reagenzien	S. 16
Tab. 3:	Verbrauchsmaterial	S. 16
Tab. 4:	Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs	S. 19
Tab. 5:	Grundprinzip der Entwässerung und Paraffineinbettung in einem Einkammer-Einbettautomaten	S. 20
Tab. 6:	Zusammenfassung des HE-Protokolls für Paraffinschnitte des eingesetzten Färbeautomaten	S. 20
Tab. 7:	Zusammenfassung des Färbeprotokolls für das VENTANA BenchMark ULTRA Färbesystem	S. 22
Tab. 8:	Vergleich der Zelldichte vor und nach der allogenen Stammzelltransplantation	S. 27
Tab. 9:	Vergleich der Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten	S. 29
Tab. 10:	Gegenüberstellung der Lerner-Grade	S. 30
Tab. 11:	Vergleich der Zelldichte nach Subgruppen-Bildung anhand der Lerner-Gradeinteilung	S. 31
Tab. 12:	Gegenüberstellung der klinischen Schweregrade	S. 36
Tab. 13:	Vergleich nach Subgruppenbildung anhand der klinischen Gradeinteilung	S. 37
Tab. 14:	Zelldichte im zeitlichen Verlauf	S. 40
Tab. 15:	Therapieassoziierte Mortalität	S. 42
Tab. 16:	Rezidivassoziierte Mortalität	S. 43
Tab. 17:	Cox-Regression	S. 44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aufbau der Immunglobuline	S. 9
Abb. 2:	Interaktionen des sekretorischen Immunglobulin A mit dem Mikrobiom	S. 13
Abb. 3:	Immunhistochemischer Nachweis des Immunglobulin A	S. 23
Abb. 4:	Digitale manuelle Flächenmarkierung	S. 25
Abb. 5:	Digitale Darstellung von Hauptgesichtsfeldern	S. 25
Abb. 6:	Vergleich der Zelldichte vor und nach der allogenen Stammzelltransplantation	S. 28
Abb. 7:	Vergleich der Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten	S. 29
Abb. 8:	Gegenüberstellung der Lerner-Grade	S. 32
Abb. 9:	Vergleich nach Subgruppenbildung anhand der Lerner-Gradeinteilung	S. 32
Abb. 10:	Vergleich mit den vor der Stammzelltransplantation gewonnenen Referenzproben	S. 33
Abb. 11:	Vergleich der Darmabschnitte nach Subgruppenbildung anhand der Lerner-Gradeinteilung	S. 34
Abb. 12:	Gegenüberstellung der klinischen Schweregrade	S. 38
Abb. 13:	Vergleich nach Subgruppenbildung anhand der klinischen Gradeinteilung	S. 38
Abb. 14:	Zelldichte im zeitlichen Verlauf	S. 40
Abb. 15:	Kaplan-Meier-Kurven zur therapieassoziierten Mortalität	S. 42
Abb. 16:	Kaplan-Meier-Kurven zur rezidivassoziierten Mortalität	S. 43

1 Einleitung

1.1 Pathogenese und Einteilung der GvHD

1.1.1 Inzidenz

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-HSCT) umfasst ein potentiell kuratives Therapiekonzept zur Behandlung erworbener oder genetisch bedingter, benigner und maligner Störungen der Hämatopoese. (1) Pro Jahr werden weltweit mehr als 50.000 Stammzelltransplantationen durchgeführt. (2) Laut der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) ist die häufigste Indikation in Europa die akute myeloische Leukämie (AML), gefolgt von der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL). (3) Trotz diverser Fortschritte ist die allo-HSCT noch immer mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Als Hauptursache dafür gilt neben dem hohen Infektionsrisiko die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD), eine gegen das Empfängergewebe gerichtete zytotoxische Reaktion der gespendeten Immunzellen. (1,4) Bedingt durch die große Anzahl an Einflussfaktoren schwanken die Angaben zur Inzidenz der GvHD nach einer allo-HSCT stark. Laut dem Handbuch der EBMT entwickelt sich bei schätzungsweise 40% aller stammzelltransplantierten Patienten eine akute GVHD (aGvHD), maßgeblich beeinflusst durch die Art des Spenders und die Wahl der GvHD-Prophylaxe. Die chronische GvHD (cGvHD) tritt mit steigender Tendenz bei ungefähr 50% der Patienten innerhalb eines Jahres nach allo-HSCT auf. (1)

1.1.2 Differenzierung zwischen akuter und chronischer Form

Die klassische Einteilung in aGvHD und cGvHD orientiert sich lediglich am zeitlichen Verlauf: Als Grenze zwischen den beiden Formen gilt eine Zeitdauer von unter oder über 100 Tagen bis zur Krankheitsmanifestation nach der allo-HSCT. (1,5) Mittlerweile spielt jedoch die Einteilung anhand der klinischen Symptomatik eine immer wichtigere Rolle. Nach den National Institutes of Health (NIH)-Konsensus-Kriterien aus dem Jahr 2005 wird die aGvHD eingeteilt in die klassische aGvHD, die innerhalb von 100 Tagen nach allo-HSCT auftritt und die persistierende, rekurrende oder späte aGvHD, welche sich nach Tag 100 und oft im Rahmen einer Reduzierung der Immunsuppression

entwickelt. (5) Zusätzlich gibt es die Bezeichnung „hyperakute GvHD“ für eine Manifestation innerhalb von 14 Tagen nach der allo-HSCT. (6,7) Bei der cGvHD werden die klassische cGvHD und das „overlap syndrome“ mit dem gleichzeitigen Auftreten von Merkmalen der cGvHD und aGvHD unterschieden. (5)

1.1.3 Abgrenzung zum GvL-Effekt

Während ursprünglich angenommen wurde, dass die der allo-HSCT vorausgehende Konditionierung zur Elimination der malignen Zellen führt, wird der ausschlaggebende zytotoxische Effekt mittlerweile den Spender-T-Zellen zugeschrieben. Dies bezeichnet man als Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt. (1,8,9) Idealerweise würde nach einer Stammzelltransplantation ein ausgeprägter GvL-Effekt auftreten, welcher alle malignen Zellen zerstört, während gleichzeitig keine Schädigung des gesunden Empfängergewebes durch eine GvHD auftritt. Somit ist die GvHD als potentiell lebensbedrohliche Komplikation vom erwünschten GvL-Effekt abzugrenzen. Allerdings beruhen beide Reaktionen zum Teil auf den gleichen immunologischen Prozessen. (9, 10) Andererseits gibt es auch Untersuchungen, welche zeigen, dass die Ausprägung des GvL-Effektes auch von der Form der malignen Grunderkrankung abhängt und nicht immer im Zusammenhang mit dem Schweregrad der GvHD steht. (11) Aus therapeutischer Sicht wäre eine Unterdrückung der GvHD mit gleichzeitigem Erhalt des GvL-Effektes wünschenswert. Voraussetzung dafür sind sensible diagnostische Verfahren zur frühen Erfassung der entsprechenden Reaktionen.

1.1.4 Grundlagen der Pathogenese

Billingham formulierte 1966 drei Voraussetzungen für das Entstehen einer GvHD: immunologisch kompetente Spenderzellen, von den Antigenen des Spenders abweichende Antigene des Empfängergewebes und die Unfähigkeit des Empfängerorganismus, die Spenderzellen zu eliminieren. (12) Diverse Organe, darunter auch das hämatopoetische System selbst, können betroffen sein. (1,4,5) Die Pathogenese der aGvHD beruht auf drei grundlegenden Schritten. (4) Zunächst erfolgt eine Antigenpräsentation unter der Beteiligung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen. (13–15) Die Antigenpräsentation führt im zweiten Schritt zusammen mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu einer Proliferation, Differenzierung und Migration der Spender-T-Lymphozyten. Im

letzten Schritt erfolgt die Gewebeschädigung durch zytotoxische T-Lymphozyten via Perforin und Granzym oder die Expression des Fas-Liganden sowie durch reaktive Sauerstoffspezies der neutrophilen Granulozyten. (4,16,17) Als Effektorzellen gelten in erster Linie die T-Lymphozyten des Spenders, da die Inzidenz und Schwere der GvHD nach T-Zell-Depletion erheblich abnimmt. (18) In Anbetracht der Tatsache, dass die Oberflächenmoleküle des Empfängergewebes körperfremde Strukturen für die Spender-T-Lymphozyten darstellen, ist deren zytotoxische Reaktion als physiologisch zu bewerten. (4) Allerdings spielen auch andere Immunzellen wie die regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle. (4,19) Daneben trägt die schnelle und gesteigerte Freisetzung von Zytokinen in der Effektorphase maßgeblich zur Entzündungsreaktion bei. (4)

1.1.5 Risikofaktoren der GvHD

Ein hohes Risiko für die Entwicklung einer GvHD stellen Abweichungen der major histocompatibility complex (MHC)-Moleküle zwischen Spender und Empfänger dar, deren Analyse die Grundlage für die Auswahl des Spenders stellt. Unterschieden werden jeweils drei Antigenstrukturen der Klasse I, HLA-A, -B und -C, und der Klasse II, HLA-DQ, -DR und -DP, als Genprodukte des HLA-Locus. (20) In der üblichen genotypisch HLA-kompatiblen Situation wird die zytotoxische Reaktion im Rahmen einer GvHD jedoch über die Erkennung von Minor-Histokompatibilitätsantigenen (miHA) im Gewebe des Empfängers induziert, welche bei der Spenderauswahl nicht berücksichtigt werden. (4,21,22) Neben dem Patientenalter und dem Stadium der Grunderkrankung stellt zudem die Art der Konditionierung einen Risikofaktor dar. Durch die Konditionierung erzeugte Schleimhautschäden im gastrointestinalen Trakt (GIT) vor der allo-HSCT erhöhen beispielsweise das Risiko für die Translokation von luminalen Antigenen. Deswegen bietet sich die Wahl einer Konditionierung mit reduzierter Intensität in Abhängigkeit des Krankheitsstatus als eine klinische Strategie zur Vermeidung der GvHD an. (4,8)

1.2 Klinik und Histopathologie der intestinalen GvHD

1.2.1 Klinische Manifestation und Grading der intestinalen GvHD

In einer retrospektiven Analyse von Martin et al. zeigte sich bei Erstmanifestation der aGvHD in 54 % der Fälle eine Beteiligung des GIT. (23) Die GvHD kann sowohl den oberen als auch den unteren GIT betreffen. (1,24) Der obere GIT umfasst in diesem Fall Ösophagus und Magen, während der untere GIT den Dünn- und Dickdarm umfasst. Eine Beteiligung des unteren GIT ruft Symptome wie Diarrhoe, krampfartige Schmerzen und Hämatochezie bei fortgeschrittener Schädigung der Schleimhaut hervor. (1,4,25,26) Die durch eine GvHD hervorgerufene Diarrhoe ist sekretorisch und dauert auch bei Nahrungskarenz und in der Nacht an. (1,27) Eine Manifestation der GvHD im unteren GIT wird am häufigsten mit der therapieassoziierten Mortalität (TRM) nach einer allo-HSCT in Zusammenhang gebracht. (28) Charakteristische Symptome einer GvHD des oberen GIT sind Anorexie, Dyspepsie, Nahrungsmittelunverträglichkeiten und Erbrechen. Es konnte beobachtet werden, dass sich eine GvHD vom oberen GIT bei erfolgloser Therapie in den unteren GIT ausbreiten kann. Eine Lebensbedrohung besteht durch den Verlust von Flüssigkeit, die Entwicklung einer Malabsorption mit ausgeprägtem Gewichtsverlust und die Translokation intestinaler Bakterien mit nachfolgender Sepsis. (27,29)

Das klinische Grading kann unter anderem nach Glucksberg erfolgen. (30) Das System basiert im ersten Schritt auf der getrennten Beurteilung von Haut, Leber und GIT. Die Stadien der einzelnen Organe werden in Form einer Gesamteinstufung zusammengefasst. Unterschieden werden vier Schweregrade, bezeichnet mit I bis IV. (25,31,32) Als Einteilungskriterium der GvHD im GIT wird das Volumen und die Frequenz der Diarrhoe herangezogen. (28) Ein Kritikpunkt des Systems betrifft die fehlende eindeutige prognostische Aussagekraft des Gesamtgrades durch die Gleichgewichtung der Organsysteme. Beispielsweise führt sowohl eine isolierte GvHD Grad IV der Haut als auch des Darmes zu einer Grad-IV-GvHD in der Gesamtbeurteilung, obwohl im ersten Fall mit einer besseren Prognose zu rechnen ist. (31) Durch die Verwendung einheitlicher Kriterien nach dem Mount Sinai Acute GvHD International Consortium (MAGIC) wird eine Standardisierung des Stagings angestrebt, um die Durchführung von multizentrischen Studien zu erleichtern. Gemäß den Empfehlungen des MAGIC sollte zusätzlich ein Konfidenz-Level angegeben werden.

Dafür werden Faktoren wie die histopathologische Diagnostik und mögliche Differentialdiagnosen berücksichtigt. Basierend darauf wird das Konfidenz-Level der GvHD-Diagnose als „negativ“, „möglich“, „wahrscheinlich“ oder „bestätigt“ angegeben. (28)

1.2.2 Histopathologische Merkmale und Gradeinteilung nach Lerner

Die Entnahme einer Gewebeprobe im Rahmen einer Ösophagogastroduodenoskopie, Koloskopie oder Rektoskopie dient zur Sicherung der Diagnose bei Verdacht auf eine GvHD mit Beteiligung des GIT. (33) Eine Rektum-Biopsie gilt als besonders sensitiv und spezifisch und hat den höchsten positiv und negativ prädikativen Wert. (24) Die histologische Einstufung sollte anhand der am schwersten betroffenen Areale erfolgen. Beurteilt werden die für eine GvHD typischen Veränderungen wie die Anzahl der Apoptosen, Kryptendestruktion und Kryptenverlust, Epitheldenudierungen, aber auch die im Rahmen anderer Erkrankungen auftretenden Veränderungen wie Entzündungszeichen, Kryptenabszesse und Pseudomembranen. Wichtig ist der Ausschluss von Differentialdiagnosen, darunter eine schwere Infektion mit dem Cytomegalievirus oder Schleimhautschäden durch die begleitende Medikation. (34,35,36) In vielen Zentren werden zur Einteilung die Lerner-Grade von 1 bis 4 verwendet. (37) Oft wird zusätzlich der Grad 0 für Proben ohne Merkmale einer GvHD vergeben. (35) Bei Grad 1 nach Lerner liegen apoptotische und dilatierte Krypten vor, bei Grad 2 zeigt sich eine diffuse Destruktion der Krypten. Eine fokale Denudation der Mukosa gilt als Kriterium für Grad 3, während eine diffuse Denudation Grad 4 kennzeichnet. (35,37) Als weitere Hinweise auf einen höheren Schweregrad nennen Lerner et al. Ödeme in Mukosa und Submukosa, abgeflachte Zotten, atypische und nekrotische Epithelzellen, mononukleäre Zellinfiltrate sowie eine mykotische oder bakterielle Infektion der Schleimhaut. (37) Andere histopathologische Grading-Systeme, beispielsweise nach Sale oder nach Melson, basieren ebenfalls auf einer Einteilung in vier Schweregrade. Allerdings weichen die Einteilungskriterien voneinander ab. So fokussiert sich beispielsweise das System nach Melson allein auf das Ausmaß des Kryptenverlusts. (35,38) Die Einteilung nach Lerner gilt als vorteilhaft, da eine gute Korrelation mit der klinischen Situation des Patienten besteht und die Kriterien die Merkmale einer aktiven, mit Steroidtherapie behandelbaren Erkrankung umfassen. Des Weiteren besteht eine Assoziation mit der Gesamtüberlebenszeit und der

TRM. (35) Shulman et al. empfehlen im Rahmen der NIH-Konsensus-Kriterien, dass jedes Grading-System zur abschließenden Beurteilung der GvHD die Bilanz aus klinischer Symptomatik, endoskopischen Befunden, Ergebnissen weiterer bildgebenden Verfahren und histopathologischer Diagnostik berücksichtigen sollte. (34)

1.3 Notwendigkeit diagnostischer und prognostischer Biomarker

1.3.1 MAGIC Algorithmus

Die Nutzung spezifischer Biomarker für die GvHD-Diagnostik als weniger invasive Alternative im Vergleich zu einer Biopsie und als Ergänzung der geläufigen Histopathologie steht aktuell im Fokus der Forschung. Ein frühes Erkennen der GvHD ist aufgrund der Möglichkeit eines schwerwiegenden Verlaufs entscheidend für die Prognose der Patienten. Gleichzeitig liefern Biomarker Hinweise auf die Pathogenese der GvHD und können somit zum Grundverständnis der Erkrankung beitragen.

Für die Vorhersage einer GvHD mit hohem Letalitätsrisiko und zur Abschätzung der TRM wurde ein Diagnostik-Algorithmus auf der Basis der serologischen Bestimmung zweier Biomarker am siebten Tag nach der Stammzelltransplantation erstellt: der MAGIC Algorithmus. Bei den Markern handelt es sich um Regenerating islet-derived protein (REG)-3- α , ein antimikrobielles Peptid der Paneth-Körnerzellen, und Suppression of Tumorigenicity 2 (ST2). (39) Das REG-3- α ist ein Indikator für die Schädigung der Paneth-Körnerzellen und steht über die antibakterielle Wirkung im Zusammenhang mit dem intestinalen Mikrobiom. (36,40) Die REG-3- α -Spiegel steigen bei Zerstörung der Paneth-Körnerzellen im Rahmen einer GvHD an. Gleichzeitig trägt das REG-3- α zum Schutz des Kryptenepithels bei, indem die Apoptose der Zellen verhindert wird, und hilft somit bei der Eindämmung einer aGvHD. (41) Die MAGIC Biomarker konnten bereits erfolgreich eingesetzt werden, um beispielsweise das Risiko einer TRM bei Patienten mit einer steroidresistenten aGVHD vorherzusagen. (42)

1.3.2 Einfluss und Bestimmung der intestinalen Dysbiose

Neben dem MAGIC Algorithmus ist das 3-Indoxylsulfat (3-IS) ein weiterer vielversprechender Marker für die GvHD-Diagnostik im GIT, welcher Rückschlüsse auf

die Zusammensetzung des Mikrobioms erlaubt. (43) 3-IS entsteht aus der Aminosäure L-Tryptophan, welche über die Nahrung aufgenommen wird. Tryptophanase-exprimierende Bakterien verstoffwechseln diese zunächst zu Indol, welches über die Darmschleimhaut aufgenommen wird. In der Leber erfolgt daraufhin die enzymatische Umwandlung in Indoxyl und schließlich in 3-IS, welches über den Urin ausgeschieden wird. Bei Patienten mit niedrigen 3-IS-Konzentrationen im Urin zwischen Tag 0 und 10 nach erfolgter allo-HSCT konnte ein Zusammenhang mit einem signifikant höheren Mortalitätsrisiko innerhalb der ersten zwölf Monate nach der allo-HSCT gezeigt werden. (43) Hohe 3-IS-Konzentrationen im Urin sind dagegen mit der Besiedlung von als protektiv geltenden Bakterien assoziiert. (43,44) Neben den erwähnten Biomarkern REG-3- α und 3-IS weisen diverse Studien darauf hin, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms im GIT die Pathogenese der GvHD und die Prognose nach der allo-HSCT beeinflusst. (45) Diese Erkenntnis ist besonders relevant, da die Patienten im Rahmen einer allo-HSCT zusätzlichen Risikofaktoren wie Konditionierung, Antibiose und immunsuppressiver Therapie ausgesetzt sind, welche das Mikrobiom negativ beeinflussen können. Beispielsweise zeigte sich sowohl im Mausmodell als auch bei Patienten ein Diversitätsverlust. (46,47) Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Diversitätsverlust des Mikrobioms eine unabhängige Prognose für die Mortalität nach der allo-HSCT liefert: Eingeteilt in Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Diversität des Mikrobioms ergaben sich für Patienten nach 3 Jahren entsprechende Überlebensraten von 36%, 60% und 67%. (48) Gleichzeitig bedeuten die genannten Erkenntnisse, dass das Mikrobiom ein potentielles Therapieziel darstellt. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass prophylaktische oder therapeutische Stuhltransplantationen nach der allo-HSCT Vorteile für die Patienten mit sich bringen könnten. (49) Der endgültige Nachweis klinischer Vorteile steht in diesem Bereich jedoch noch aus. (50) Vollständigkeitshalber sei erwähnt, dass auch Pilze, Viren, Archäen und Eukaryonten den GIT kolonisieren und als potentielle Risikofaktoren neben den Bakterien beachtet werden sollten. (45)

1.4 Bedeutung der IgA-exprimierenden Zellen

1.4.1 Störung der intestinalen Barrierefunktion

Als bedeutendes Bindeglied zwischen Mikrobiom und GvHD gilt eine gestörte intestinale Barrierefunktion. Diese äußert sich häufig in Form einer Bakteriämie nach der allo-HSCT. (51,52) Die physiologische Barriere des GIT setzt sich zusammen aus der Epithelschicht der Tunica mucosa, einer komplexen luminalen Schleimschicht auf dem Epithel und den intestinalen Immunzellen. Zu den Immunzellen zählen unter anderem die antikörperproduzierenden Lymphozyten aus der B-Zell-Reihe. Die Barrierefunktion hat keine vollständige Abschirmung als Ziel. Vielmehr stehen die intestinalen Immunzellen ständig in Kontakt mit den Antigenen aus dem Darmlumen.. Beispiele dafür sind die Fortsätze von dendritischen Zellen, welche durch das Epithel reichen, und der gezielte Transport von luminalen Antigenen durch das Epithel zu den Immunzellen mit Hilfe der Mikrofalten-Zellen. (53–55) Eine Besonderheit stellt die Konzentration der immunologisch aktiven Strukturen in den als Peyer-Plaques bezeichneten lymphoepithelialen Verbänden des Ileums dar. Daneben finden sich vergleichsweise diffus verteilte Ansammlungen von Immunzellen in der Mukosa im gesamten Dün- und Dickdarm. Zusammengefasst spricht man vom „gut-associated lymphoid tissue“ (GALT) als Unterform des „mucosa-associated lymphoid tissue“ (MALT). (53,54)

1.4.2 Humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort, insbesondere das Immunglobulin A (IgA), ist ein wichtiger Bestandteil der intestinalen Barrierefunktion. Immunglobuline (Ig) sind antigenbindende Glykoproteine der B-Lymphozyten. (56) Sie werden als Antikörper frei sezerniert oder dienen als membrangebundene B-Zell-Rezeptoren. (54) Allgemeine Funktionen der Antikörper im Rahmen der Abwehr von Pathogenen umfassen Opsonierung, Neutralisierung, Komplementaktivierung, antikörpervermittelte Zytotoxizität und Mastzellaktivierung. (53) Antikörper sind Y-förmig aufgebaut und bestehen aus zwei schweren (H-Ketten) und zwei leichten Ketten (L-Ketten), welche über eine Gelenkregion miteinander verbunden sind. Diese Ketten bestehen wiederum aus Domänen. Konstante Domänen bestimmen die Antikörperklasse: Unterschieden werden IgG, IgD, IgM, IgA und IgE. (54,56) Demgegenüber bilden die variablen

Domänen den antigenbindenden Teil. Durch Enzymsspaltung kann der Antikörper in Fragmente zerteilt werden: „fragment crystallisable“ (Fc-Fragment) und „fragment antigen binding“ (Fab-Fragment). (54) Das Fc-Fragment wird von den konstanten Domänen der schweren Ketten gebildet und dient als Bindungsstelle für andere Immunzellen. Das Fab-Fragment wird aus je zwei konstanten und zwei variablen Teilen der schweren und leichten Ketten gebildet. Wie in Abbildung (Abb.) 1 am Beispiel des IgG gezeigt, liegen pro Antikörper zwei Fab-Fragmente vor. (56) Durch die große Variabilität der antigenerkennenden Region entsteht eine große Antikörpervielfalt. (53,54)

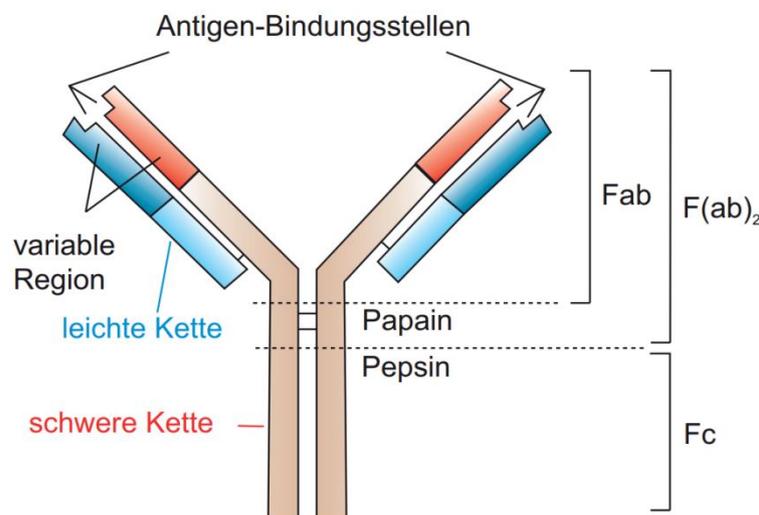


Abbildung 1: Aufbau der Immunglobuline (Ig). Erklärung anhand des Schemas eines Immunglobulin G (IgG)-Moleküls. Die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette bilden die Antigenbindungsstellen. Fab: fragment antigen binding; Fc: fragment crystallisable. (Nachdruck mit Genehmigung der Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Mulisch 2014 – Verfahren der Immunlokalisation, S. 5) (56)

1.4.3 Ursprung der intestinalen antikörperproduzierenden Zellen

Es wird geschätzt, dass sich rund 80% aller IgA-exprimierenden Zellen (IgA⁺ Zellen) im GIT befinden und dort pro Tag etwa 40 – 60 mg IgA pro kg Körpergewicht produzieren. (57–59) Damit übertrifft die IgA-Produktion mengenmäßig die Produktion der anderen Ig-Typen. (59) Die IgA⁺ Zellen entstammen der B-Zellreihe. Im Zuge ihrer Entwicklung exprimieren B-Zellen zunächst IgM und IgD und gelten ab diesem Zeitpunkt als reif. (60) Reife B-Zellen können wiederum in drei große Subgruppen unterteilt werden: folliculäre B-Zellen, B-Zellen in der Marginalzone der Milz und B1-

Zellen im Bereich von Peritoneum und Pleura. Den größten Anteil machen die folliculären B-Zellen aus. (61–63) Der Prozess der Differenzierung zu IgA⁺ Zellen ist komplex und unterliegt mehreren Einflussfaktoren. Insbesondere wird diskutiert, welchen Einfluss die T-Zellen auf die Produktion und Funktion des IgA im GALT nehmen. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer T-Zell-abhängigen und einer T-Zell-unabhängigen Antikörperbildung. (63,64) Eine spezifische Reaktion scheint nur mit T-Zell-Hilfe möglich zu sein, da diese eine Voraussetzung für eine starke Affinität der Antikörper ist. (64) Entscheidend dabei ist der Prozess der somatischen Hypermutation (SHM), welchen die B-Zellen nach Antigenkontakt in den Keimzentren der Lymphfollikel durchlaufen. Bei der SHM werden zufällige Mutationen in die Antikörpergene eingefügt, welche in einigen Fällen zu einer erhöhten Affinität führen. Die entsprechenden Zellen werden selektiert, sodass am Ende die Zellen überleben, deren Antikörper das Antigen am besten binden können. (60) Die Bildung von Keimzentren und der Ablauf der SHM kann jedoch auch ohne T-Zell-Einfluss stattfinden. (65,66) Die T-Zell-abhängige Differenzierung der B-Zellen beruht auf zwei wesentlichen Schritten. (63) Die Induktion der naiven B-Zellen findet vornehmlich im GALT statt. (67) Zunächst entsteht aus der naiven B-Zelle durch Antigenkontakt ein Lymphoblast, welcher proliferiert, gegebenenfalls die Antikörperklasse wechselt und sich schließlich in einen kurzlebigen Plasmoblasten differenziert, welcher bereits Antikörper produziert. (63) Diese erste Phase wird als extrafollikuläre Antwort bezeichnet. (68) Dabei findet wenig SHM statt, sodass die Antikörperaffinität als konstant und eher moderat eingeschätzt wird. (63) Die Mitwirkung der T-Zellen scheint für den Klassenwechsel als Voraussetzung für die Produktion von IgA nicht unbedingt erforderlich zu sein. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass der Klassenwechsel zu IgA im GALT sowohl T-Zell-abhängig als auch T-Zell-unabhängig erfolgen kann. (69) Im zweiten Schritt formen die aktivierten Zellen unter dem Einfluss von folliculären T-Helferzellen ein Keimzentrum im Lymphfollikel. Aus dem Keimzentrum gehen schließlich langlebige ausdifferenzierte Plasmazellen sowie Gedächtniszellen hervor. Die Plasmazellen sind auf die Sekretion von Antikörpern, darunter IgA, spezialisiert, während die Gedächtniszellen dazu fähig sind, nach erneutem Antigenkontakt schnell zu proliferieren und Antikörper zu produzieren. Ein Klassenwechsel findet in diesen Stadien nicht mehr statt. (63)

1.4.4 Rezirkulation der IgA-exprimierenden Zellen

Eine wichtige Erkenntnis ist, dass die aktivierten B-Lymphozyten nicht ortsgebunden sind, sondern nach Antigenkontakt über die intestinalen Lymphknoten und den Blutkreislauf rezirkulieren. Die Expression des Chemokinrezeptors C-C motif receptor 10 (CCR10) und speziell des Integrins $\alpha 4\beta 7$ als Adhäsionsmolekül auf IgA⁺ Zellen im Blut gesunder Probanden weist darauf hin, dass diese Zellen ursprünglich durch eine Immunreaktion in der Darmschleimhaut induziert wurden. (70) Darauf basiert die Vermutung, dass die IgA⁺ Zellen in den Schleimhäuten und die IgA⁺ Zellen im Serum ursprünglich vom gleichen B-Zell-Klon abstammen. (71) Die Lymphozyten gelangen nach der Zirkulation im Blut nicht zwangsweise zu dem Ort der initialen Aktivierung, sondern können auch auf andere Schleimhäute verteilt werden. (54,55) Darüber hinaus können die Zellen in Organsysteme einwandern, welche primär nicht mit dem MALT in Verbindung stehen. (64) Vom Darm ausgehend werden Achsen zum Knochenmark, zur Niere und zum ZNS beschrieben. (71, 72, 73)

1.4.5 Aufbau und Transzytose des sekretorischen IgA

Auf molekularer Ebene lassen sich bezüglich des Aufbaus des IgA drei Formen unterscheiden: Monomere, Dimere und das sekretorische IgA (sIgA). Letzteres liegt als Dimer in Kombination mit der sekretorischen Komponente (SC) vor. Das monomere IgA findet sich dagegen im Serum. (53,54) Für die Entstehung der sIgA-Moleküle bindet das von den intestinalen IgA⁺ Zellen produzierte dimere IgA CD71 – beziehungsweise Transferrinrezeptor-abhängig – an die basolaterale Zellmembran der Epithelzellen und wird via Endozytose zusammen mit dem Rezeptor von diesen aufgenommen. (53,64,74) Die Menge des sIgA im Lumen wird somit auch durch die Expression des IgA-Rezeptors beeinflusst. (64) Nach der Transzytose erfolgt die Proteolyse des Rezeptors, welcher die SC-Kette liefert. Die glykosylierte SC-Kette schützt den IgA-Komplex vor der Proteolyse im Darmlumen. (75,76) Das Mikrobiom kann die IgA-Antwort auf mehreren Wegen induzieren, beispielsweise über Liganden der Toll-Like-Rezeptoren und mikrobielle Metaboliten wie die kurzkettige Fettsäure Acetat. (77,78)

1.4.6 Funktionen des sekretorischen IgA

Die besondere Fähigkeit des sIgA besteht darin, die Abwehrfunktion des Epithels zu unterstützen und gleichzeitig die intestinale Homöostase aufrecht zu erhalten: Die IgA-Antwort muss zum einen das Eindringen von Pathogenen verhindern und zum anderen eine Kolonisierung der Schleimhaut mit kommensalen Bakterien im Sinne einer Eubiose ermöglichen. (64) Das Eindringen von Pathogenen wird durch verschiedene Mechanismen verhindert. Das sIgA bindet Antigene im Darmlumen sowohl kanonisch mit dem Fab-Fragment als auch nicht-kanonisch mit anderen Teilen des Antikörpers. (79) Im Sinne der „cross-species reactivity“ besitzt ein monoklonales sIgA-Molekül die Fähigkeit zur gleichzeitigen Bindung mehrerer bakterieller Antigene, welche von unterschiedlichen Taxa stammen. (80) Als „bacterial clumping“ wird das Zusammenketten der Mikroben zur Verhinderung einer Invasion bezeichnet. (64) In Abb. 2 werden die Möglichkeiten zur Bindung des sIgA an verschiedene Spezies der bakteriellen Darmflora dargestellt. Von sIgA bedeckte Bakterien können anhand dieser Umhüllung sogar differenziert werden. (81) Untersuchungen mit dem Transfer von selektierten Bakterien deuten darauf hin, dass die mit IgA bedeckten Bakterien potentiell gefährlicher sind. (82) Die Funktionen des sIgA hängen darüber hinaus mit der ausgeprägten Glykosylierung des Moleküls zusammen. Die Glykosylierung des sIgA trägt zur nicht-kanonischen Bindung bei und bietet das Potential für die kompetitive Bindung bakterieller Adhäsine unabhängig von Fab-Fragmenten. (64) Des Weiteren stellen die glykosylierten Abschnitte des sIgA eine mögliche Kohlenhydrat- und damit Nahrungsquelle für die Mikroben dar. (83)

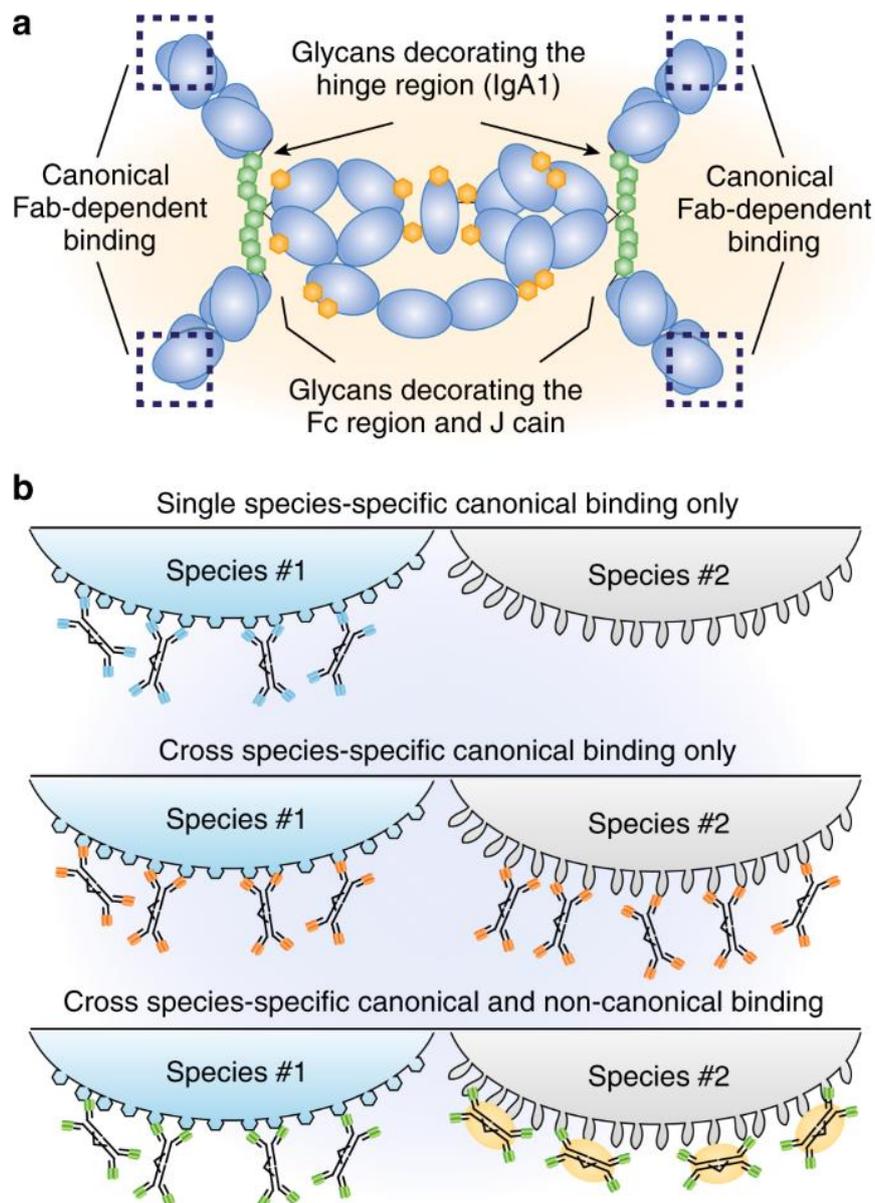


Abbildung 2: Interaktionen des sekretorischen Immunglobulin A (sIgA) mit dem Mikrobiom. Die Interaktionen erfolgen über kanonische Fab-abhängige und nicht-kanonische Glykan-abhängige Bindungen. **a** Schematische Darstellung des humanen IgA. Eine kanonische Bindung entsteht mittels der gestrichelt gezeichneten Fab-Fragmente. Nicht-kanonische Interaktionen werden über Glykane vermittelt. O-Glykane (grün) befinden sich in der Gelenkregion. N-Glykane (orange) befinden sich im Bereich der Fc-Abschnitte und der J-Kette. **b** Kanonische und nicht-kanonische Interaktionen gewährleisten die Bindung an die Mikroben. Oben wird schematisch die Bindung des sIgA an eine Spezies mit Hilfe des Fab-Fragments demonstriert. In diesem Fall bindet der Antikörper hochspezifisch an eine bestimmte Spezies. Mittig gezeigt wird das “cross-species binding”, die Bindung des gleichen Antikörpers an zwei verschiedene Spezies, welches auf der gleichen Epitop-Expression durch beide Spezies beruht. Unten wird dargestellt, wie das “cross-species binding” darüber hinaus durch eine Kombination aus kanonischen und nicht-kanonischen Bindestellen entstehen kann. (Übersetzung aus dem Englischen und Nachdruck mit Genehmigung durch O. Pabst, Uniklinik RWTH Aachen: Pabst et al. 2020 – IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific , S. 17) (64)

1.4.7 Zielsetzung der Arbeit

Während der Verlauf des IgA-Serumspiegels nach einer allo-HSCT bereits untersucht wurde, gibt es keine aktuellen Daten zur Verteilung und Regeneration der ortsständigen IgA⁺ Zellen im GIT. (84) Es gibt lediglich eine Untersuchung der intestinalen Plasmazellen von 55 stammzelltransplantierten Patienten aus dem Jahre 1981: Beschorner et al. zeigten, dass die Dichte der IgA⁺ Zellen und die Gesamtzahl aller Plasmazellen nach dem Engraftment reduziert waren, während bei Patienten ohne erfolgreiches Engraftment vergleichsweise viele dieser Zellen nachweisbar waren. Beim Auftreten einer GvHD war die Anzahl der IgA- und IgM-exprimierenden Plasmazellen wiederum stark erniedrigt. (85) Zum jetzigen Zeitpunkt ist offen, welche Rolle die intestinalen IgA⁺ Zellen im Zuge der Pathogenese der GvHD spielen und wie sich eine allo-HSCT im Detail auf diese Zellen auswirkt. Für die vorliegende Arbeit wurden deswegen intestinale Gewebeproben stammzelltransplantierter Patienten retrospektiv analysiert. Im Fokus stand dabei die Frage nach einem Zusammenhang mit dem histopathologisch diagnostizierten GvHD-Schweregrad sowie mit der Überlebenszeit.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen (Tab.) 1–3 aufgelistet.

Produkt	Hersteller
HistoStar™ Ausgießstation	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Shandon Pathcentre Gewebeprozessor (Fixierautomat)	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
HM 430 Schlittenmikrotom	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
HM 340E Elektronisches Rotationsmikrotom	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
CTM6 Glaseindeckautomat	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Automatischer Färbe- und Glaseindeckautomat Tissue-Tek® Prisma & Tissue-Tek® Glas™ g2d	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, DE
Pannoramic 250 (Scanner für Objektträger)	3DHISTECH, Budapest, HU
Desert - Probentrockner	MICROS Produktions- & Handelsges.m.b.H.; St. Veit/Glan, AT
VENTANA E-Bar™ II Printing System	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
VENTANA BenchMark ULTRA Färbesystem	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
MEDION® 29,5 CM/11,6“ Multimode Notebook E2228T	MEDION AG, Essen, DE
ASUS Bildschirm VN247H 23.6“, 1920x1080, Full HD 1080P, Pixel Pitch: 0.2715 mm	ASUSTeK COMPUTER INC., Taipei, TW

Tabelle 1: Geräte

Produkt	Hersteller
Formalinlösung 4%	SG Planung, Holzkirchen, DE
PREP Kit 55	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
OptiView DAB ICH Detection Kit	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Antibody Diluent	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Reaction Buffer Concentrate (10x)	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
EZ Prep Concentrate (10x)	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1)	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
ULTRA LCS (Predilute)	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Bluing Reagent	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA, Code-Nr. A 0262	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK

Tabelle 2: Reagenzien

Produkt	Hersteller
Gewebe-Einbettkassetten	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, DE
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific™ GmbH, Schwerte, DE
Einbettschälchen	Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE
Mikroskopische Deckgläser, Stärke 1 (0,13 – 0,16 mm), 24 x 50 mm	R. Langenbrick GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmedingen, DE
Spülmittel	August Wencke OHG, Bremen-Lesum, DE

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

2.2 Patientenkollektiv und Probenauswahl

Für die Analyse wurden initial 436 intestinale Gewebeproben in Form von Biopsien und Resektaten von insgesamt 146 Patienten des Universitätsklinikums Regensburg, bei denen im Zeitraum zwischen dem 23.04.2008 und dem 06.11.2019 eine allo-HSCT durchgeführt wurde, ausgewählt. Die Patienten hatten im Vorfeld der Analyse für Studienzwecke zugestimmt. Bei der Arbeit handelte es sich um einen Beitrag zur Untersuchung von intestinalen Gewebeproben zur Erforschung der GvHD im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 221 GvHGvL (Bewilligung 09/059). Genaue Zahlengaben zum Patientenkollektiv zeigt Tab. 4. Festgehalten wurden Geschlecht, Alter, Diagnose, Krankheitsstadium zum Diagnosezeitpunkt, Transplantationszeitpunkt, Kompatibilität mit dem Spender und Quelle der Stammzellen.

Die Auswahl der Proben erfolgte unter ärztlicher Supervision (Dr. med. Katrin Hippe) aus dem im Institut der Pathologie eingelagerten und in Paraffin eingebetteten Gewebe. Von einigen Patienten lagen zusätzlich Gewebeproben vor, welche bereits vor der allo-HSCT gewonnen worden waren. Diese wurden als Kontrollproben verwendet. Es entfielen fünf Proben aufgrund neoplastischer Gewebeeränderungen oder ungeeigneter Lokalisation mit Anteilen von Magenschleimhaut. Neun weitere Proben wurden als „nicht auswertbar“ gekennzeichnet, da die auswertbare Fläche das festgelegte Mindestmaß von $0,3 \text{ mm}^2$ nicht erreichte. Bei den vier Resektat-Proben zeigte sich ein abweichendes Färbeverhalten. Deswegen flossen auch diese Proben nicht in die Auswertung ein. Somit verblieben am Ende 418 Biopsie-Gewebeproben für die Analyse, darunter 40 (9,6%) vor der allo-HSCT entnommene Kontrollproben.

In die Analyse wurden Proben aus unterschiedlichen Abschnitten des Dünn- und Dickdarms, darunter Duodenum, Ileum, Caecum, Colon und Rektum, miteinbezogen. Die Präparate stammten zu 28,5% aus dem Duodenum und zu 9,1% aus dem Ileum. Die restlichen 62,4% verteilten sich auf Caecum, Colon und Rektum. Ursprünglich erfolgte eine Einteilung der Proben nach dem jeweiligen Entnahmeort in Duodenum, Ileum, linken Dickdarmabschnitt und rechten Dickdarmabschnitt. Als Grenze für die letzten beiden Kategorien diente die Flexura coli sinistra. Linker und rechter Dickdarmabschnitt wurden jedoch im Nachhinein zur Entität „Dickdarm“ zusammengefasst, da bei elf Gewebeproben retrospektiv der genaue Entnahmeort im Colon nicht mehr nachvollzogen werden konnte.

Des Weiteren wurde bei jedem untersuchten Präparat der zum Biopsie-Zeitpunkt vorliegende histopathologische und klinische GvHD-Status retrospektiv aus den entsprechenden Befunden übernommen.

In einigen Fällen konnten zusätzlich die Werte von 3-IS und REG-3- α nachbestimmt werden. Voraussetzung dafür war, dass konservierte Blut- und Urinproben aus dem Zeitraum von einer Woche vor oder nach der Biopsie-Entnahme vorlagen. Die Werte für das REG-3- α wurden mittels ELISA Realtime Analyse ermittelt. Zur Bestimmung des 3-IS in den Urinproben wurde Hochdruck-Flüssigchromatographie, gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer, eingesetzt.

Charakteristikum	Wert	
Patientenanzahl	146	
Männlich, n (%)	86	(58,9)
Alter zum Zeitpunkt der 1. Transplantation, Median (IQR)	56,6	(46,6-62,6)
Patienten mit > 1 Transplantation, n (%)	17	(11,6)
Grunderkrankungen (gruppiert), n (%)		
Akute myeloische Leukämie	73	(50,0)
Non-Hodgkin-Lymphom	28	(19,1)
Myelodysplastisches Syndrom	16	(11,0)
Myeloproliferatives Syndrom	16	(11,0)
Akute lymphoblastische Leukämie	7	(4,8)
Benigne Grunderkrankung	4	(2,7)
Hodgkin-Lymphom	2	(1,4)
Spender (1. Transplantation), n (%)		
Fremdspender	102	(69,9)
Geschwisterspender	33	(22,6)
Haploident	11	(7,5)
Konditionierung (1. Transplantation), n (%)		
Reduzierte Intensität	127	(87,0)
Standard	19	(13,0)
Stammzellquelle (1. Transplantation), n (%)		
Peripheres Blut	122	(83,6)
Knochenmark	24	(16,4)

Tabelle 4: Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs

2.3 Fixation und Vorbereitung der Proben

Alle Gewebeproben der Patienten wurden zunächst in einer gepufferten, vierprozentigen Formalinlösung fixiert und daraufhin in Paraffinwachs eingebettet. Dazu erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe und eine Reinigung in Xylol. In Tab. 5 werden die grundlegenden Schritte der Paraffineinbettung dargestellt. Nach der Kühlung wurden von den Paraffinblöcken drei Mikrometer dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt. Diese wurden anschließend auf einen Objektträger aufgezogen und nach der Trocknung entparaffiniert und routinemäßig wie in Tab. 6 beschrieben in einem Färbe- und Glaseindeckautomaten mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt. (86) Die mittels HE angefärbten Schnitte dienen als Referenz.

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1. Entwässerung	50% Ethanol	1h	37°C
	70% Ethanol	1h	37°C
	96% Ethanol	1h	37°C
	96% Ethanol	1h	37°C
	100% Ethanol	2 x 1h	37°C
2. Clearing	100% Xylol	2 x 1h	37°C
3. Infiltration	Paraffin	4 x 45 min	60°C

Tabelle 5: Grundprinzip der Entwässerung und Paraffineinbettung in einem Einkammer-Einbettautomaten (86)

Schritt	Reagenz/Vorgang	Dauer
1. Rehydrierung	Xylol	2 x 2 min
	Isopropanol 100%	1,5 min
	Isopropanol 96%	1,5 min
	Isopropanol 70%	1,5 min
	Waschen	1,75 min
2. Färbung	Hämalaun	5,25 min
	0,22% HCL-Alkohol	1,75 min
	Waschen	3 min
	Eosin	3,5 min
	Waschen	1,75 min
3. Entwässerung	Isopropanol 70%	1,5 min
	Isopropanol 96%	1,5 min
	Isopropanol 100%	1,5 min
	Xylol	2,5 min

Tabelle 6: Zusammenfassung des HE-Protokolls für Paraffinschnitte des eingesetzten Färbeautomaten. HE: Hämatoxylin und Eosin.

2.4 Grundlagen der Immunhistochemie

2.4.1 Antigen-Antikörper-Reaktion

Die Basis der Immunhistochemie (IHC) bildet die Antigen-Antikörper-Reaktion. (86, 87) Die Darstellung der IgA⁺ Zellen erfolgte mittels der IHC-Färbung des IgA-Moleküls. Nach der Vorbereitung der Proben erfolgte im ersten Schritt die Bindungsreaktion eines Primärantikörpers an das IgA-Molekül. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper aus der Ig-Fraktion eines gereinigten Kaninchen-Antiserums eingesetzt, der sich gegen die α -Kette des humanen IgA richtet. (88) Dieser Primärantikörper wurde im zweiten Schritt durch eine Mischung aus Sekundärantikörpern lokalisiert. Dafür dienten haptenmarkierte Antikörper der Ziege, welche spezifisch Maus- und Kaninchen-Primärantikörper nachweisen können. Im dritten Schritt wurden die gebundenen Sekundärantikörper-Moleküle durch enzymmarkierte Tertiärantikörper gebunden. (89) Im letzten Schritt führte eine Enzymfällungsreaktion zur gewünschten Färbung, exemplarisch dargestellt in Abb. 3. Bei dem Enzym des eingesetzten Tertiärantikörpers handelte es sich um die Meerrettichperoxidase, ein in der Biochemie sehr häufig genutztes Reporterenzym. Als Reduktionsmittel diente das chromogene Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), welches im Gegenzug zu seinem braunen Endprodukt oxidiert wurde. Um die optische Dichte des polymerisierten DAB zu erhöhen, wurde Kupfer eingesetzt. (87) Der eingesetzte Primärantikörper wurde ursprünglich für die Unterstützung der Klassifikation von B-Zell-Neoplasien entwickelt. (88) Jedoch eignet sich der Antikörper auch zur Identifizierung der IgA⁺ Zellen im GIT. Um eine gute Qualität der Färbung zu gewährleisten, erfolgte im Vorfeld die Austestung des Primärantikörpers. Hierzu wurden in Vorversuchen Antikörperverdünnung, Temperatur, Puffer zur Antigendemaskierung und Inkubationszeiten variiert. Die Ergebnisse dienten zur Erstellung des Färbeprotokolls (vgl. Tab. 7). Zum Vergleich dienten ein Tissue-Microarray und das Gewebe einer Tonsille als Positivkontrolle. Beurteilung und Auswahl der Bedingungen für den Antikörper erfolgten durch Dr. med. Katrin Hippe. Ausgewählt wurde die Antikörper-Verdünnung 1:2000.

2.4.2 Automatisiertes Färbesystem

Der Färbeprozess erfolgte Barcode-gekoppelt in einem automatisierten Färbesystem (VENTANA BenchMark ULTRA Färbesystem, vgl. Tab. 1). Eine Zusammenfassung des Färbeprotokolls zeigt Tab. 7. Die Proben wurden zunächst entparaffiniert und rehydriert, da das hydrophobe und alkoholunlösliche Paraffin sonst die Färbereaktion verhindern würde. (86) Durch die vorausgehende Formalinfixierung bestand die Gefahr einer Antigenmaskierung, da anbindende Formaldehydmoleküle das Epitop verändern können und so der Zugang des Primärantikörpers zu seinem Epitop erschwert wird. (87) Zur Antigendemaskierung erfolgte eine Hitzebehandlung sowie der Einsatz eines Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-basierten Puffers. Dieser wurde für 16 Minuten bei 95°C inkubiert. Es folgte die Hemmung der endogenen Peroxidase durch den Einsatz eines Vor-Primärperoxidase-Hemmers. Als Nächstes wurde der Primärantikörper in der Verdünnung 1:2000 hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug vier Minuten. Daraufhin wurden Sekundär- und Tertiärantikörper zur Detektion zugegeben. Zum Abschluss erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Zwischen den einzelnen Schritten wurden wiederholt Waschschrte mit einem Reaktionspuffer durchgeführt. Durch den Einsatz des bereits erwähnten DAB wiesen die IgA-Moleküle nach Abschluss des Färbeprozesses die in Abb. 3 gezeigte braune Färbung auf.

Schritt
1. Mixer
2. Erhöhung der Objektträger-Temperatur für Entparaffinierung
3. Mehrmaliges Spülen mit EZ Prep und Auftragen von Coverslip
4. 4-minütige Inkubation des Cell Conditioner Nr. 1 bei 95°C
5. Temperatureinstellung auf 36°C und Spülen mit Reaktionspuffer
6. 4-minütige Inkubation des Peroxidase-Inhibitors
7. 4-minütige Inkubation des PREP KIT 124
8. 8-minütige Inkubation des HQ Universal Linker
9. 8-minütige Inkubation des HRP MULTIMER
10. Zugabe von H ₂ O ₂ , DAB und LCS
11. 4-minütige Inkubation des OV COPPER
12. Gegenfärbung mit COUNTERSTAIN 1
13. Zugabe des BLUING REAGENT

Tabelle 7: Zusammenfassung des Färbeprotokolls für das VENTANA BenchMark ULTRA Färbesystem

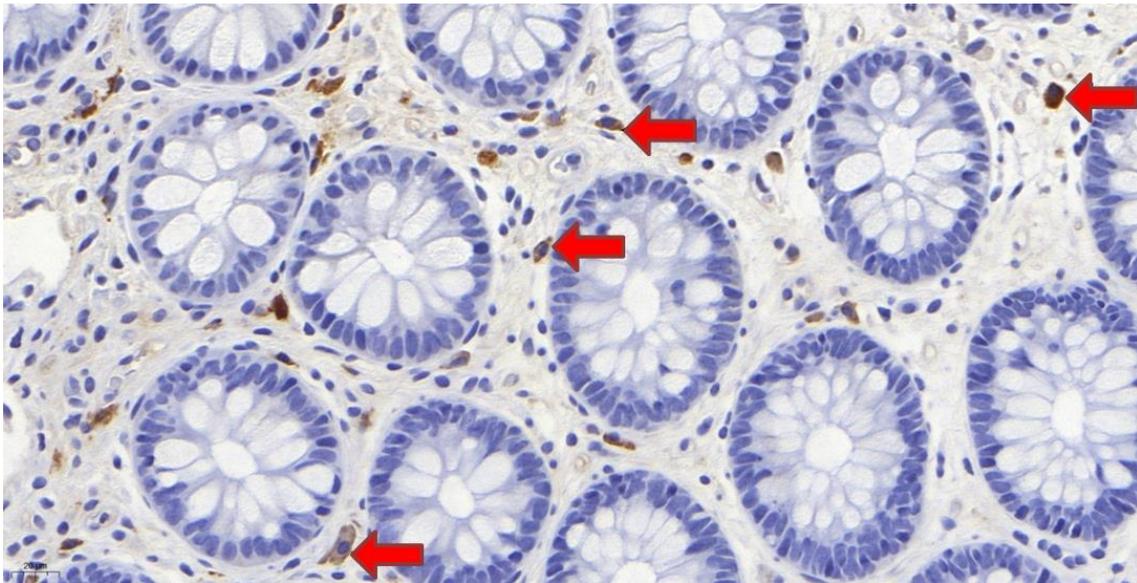


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis des Immunglobulin A (IgA). Darstellung IgA-exprimierender Zellen (Braunfärbung, Beispiele mit Pfeilmarkierung) zwischen den Krypten des Colons. Biopsiegewebe aus dem Colon sigmoideum eines stammzelltransplantierten Patienten; Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Vergrößerung 400-fach.

2.5 Auswertung der digitalisierten Schnitte

Die gefärbten Schnittpräparate wurden mit Hilfe eines Scanners für Mikroskop-Objektträger (Pannoramic 250, vgl. Tab. 1) digitalisiert und in einer Datenbank („CaseCenter“ von 3DHISTECH) gespeichert. Eine dazugehörige Anwendung („CaseViewer“ von 3DHISTECH) erlaubte Ansicht, Bearbeitung und Auswertung der Proben. Die Datensicherheit wurde durch Pseudonymisierung, geschützte Server mit eigener Firewall und passwortgesicherte, eingeschränkte Zugriffsrechte gewährleistet. Die Auswertung erfolgte verblindet. Für die vorliegende Arbeit wurden die Zellen in der Tunica mucosa mit Ausschluss der Lamina muscularis mucosae ausgezählt. Durch die digitale Auswertung konnten die entsprechenden Areale der Schnittpräparate markiert und ausgemessen werden. Exemplarisch wird in den Abb. 4 und 5 die verwendete digitale Flächenmarkierung durch Umrandung der digitalen Auswertung der sonst üblichen Methode mit Hauptgesichtsfeldern gegenübergestellt. Die Ausschlusskriterien der zu untersuchenden Bereiche umfassten Detritus, ausgedehnte Nekrosen, verminderte Qualität durch Falten und Risse sowie Areale mit verminderter Färbequalität. Pro Gewebeprobe wurde mindestens eine Fläche von $0,3 \text{ mm}^2$ ausgewertet. Im Durchschnitt wurde eine Fläche von rund $1,7 \text{ mm}^2$ analysiert. In den markierten Arealen erfolgte die Auszählung der IgA^+ Zellen. Dabei wurden folgende

Kriterien festgelegt: Eine Zelle zählte als IgA⁺, wenn eine mindestens mittelstarke Braunfärbung vorlag, ein Zellkern sichtbar und die Zellgrenzen erkennbar waren. Anhand ihrer Morphologie wurden Makrophagen und Endothel-Zellen ausgeschlossen, welche gelegentlich eine schwache Braunfärbung aufwiesen. Im Anschluss wurden die Zellzahlen mit den klinischen Daten zusammengeführt.



Abbildung 4: Digitale manuelle Flächenmarkierung. Der Objektträger wurde dafür eingescannt. Die Markierung kann an Form und Struktur der Gewebeprobe angepasst werden. Biopsie-Gewebe aus dem Colon 30cm ab ano eines stammzelltransplantierten Patienten; Immunhistochemischer Nachweis des Immunglobulin A (IgA) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Vergrößerung 100-fach.

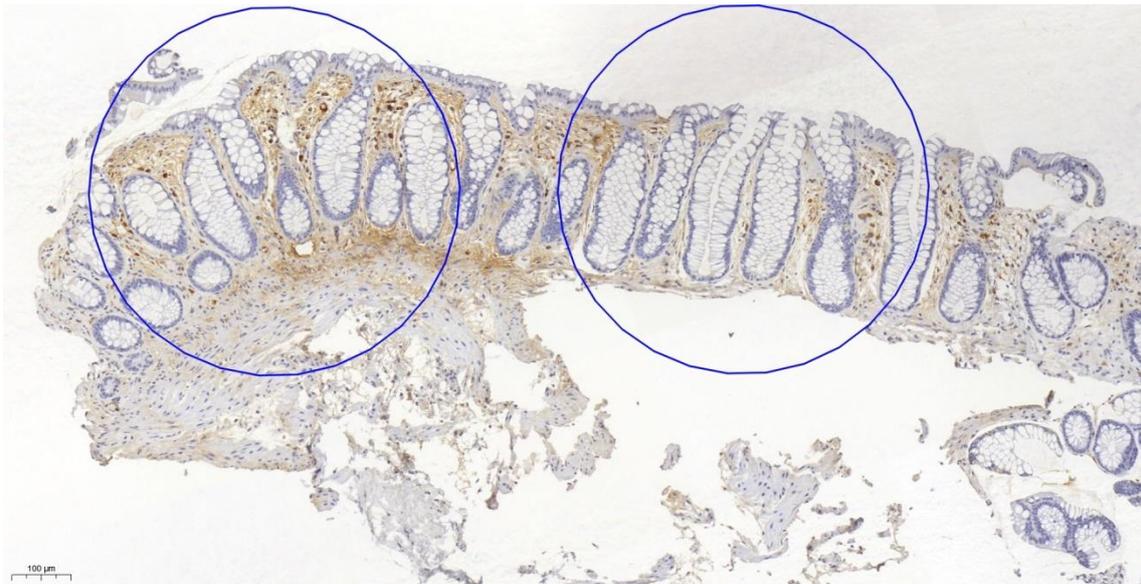


Abbildung 5: Digitale Darstellung von Hauptgesichtsfeldern. Der Objektträger wurde dafür eingescannt. Die Felder können der auswertbaren Fläche im Vergleich zur manuellen Markierung nicht genau angepasst werden. Biopsie-Gewebe aus dem Colon 30cm ab ano eines stammzelltransplantierten Patienten; Immunhistochemischer Nachweis des Immunglobulin A (IgA) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Vergrößerung 100-fach.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (IBM SPSS Statistics 25). Da keine Normalverteilung der Daten gegeben war, wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Dunn-Bonferroni-Test sowie der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient eingesetzt. Die Überlebensanalyse erfolgte univariat mittels Kaplan-Meier-Methode und Log-Rank-Test. Von einigen Patienten lagen mehrere Gewebeproben vor. Für die Überlebensanalysen wurde in diesem Fall pro Patient eine stellvertretende Probe ausgewählt. Dabei wurde bei Patienten mit einer GvHD die Probe der Biopsie beim erstmaligen Auftreten der Erkrankung verwendet. Bei Patienten ohne GvHD wurde die Probe der ersten Biopsie-Entnahme nach der allo-HSCT ausgewählt. Unter der Bedingung der Vollständigkeit des jeweiligen Datensatzes konnten am Ende die Proben von 130 Patienten in die Überlebensanalysen miteinbezogen werden. Die Überlebenszeitanalysen beruhten auf dem Vergleich von zwei Gruppen. Als Einteilungskriterium diente eine Anzahl der IgA⁺ Zellen pro mm² zum Biopsie-Zeitpunkt oberhalb oder unterhalb der ermittelten medianen Zelldichte nach der allo-HSCT. Die Überlebenszeit wurde ab dem Datum der allo-HSCT berechnet. Die Ergebnisse zur TRM und zur rezidivassozierten Mortalität (RRM) wurden abschließend in einer multivariaten Cox-Regression überprüft. Die Werte des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten dienten zur Analyse der Korrelation zwischen der Anzahl der IgA⁺ Zellen und den gemessenen 3-IS-Werten im Urin sowie den REG-3- α -Werten im Serum.

3 Resultate

3.1 IgA⁺ Zellen vor und nach der Stammzelltransplantation

Die histopathologisch ermittelten Werte zur Anzahl der IgA⁺ Zellen in den Gewebeproben, welche nach der allo-HSCT entnommen worden waren (N = 378), wurden zunächst deskriptiv analysiert (vgl. Tab. 8 und Abb. 6). Eine Normalverteilung konnte nach dem Test von Kolmogorov und Smirnov abgelehnt werden ($p < 0,001$). Die vor der allo-HSCT gewonnenen Proben (N = 40) wurden separat analysiert. Im Vergleich war die mediane Zelldichte in den Proben vor der allo-HSCT tendenziell höher, allerdings unterschied sich die Verteilung im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p = 0,447$).

IgA⁺ Zellen [Variable/mm²] vor allo-HSCT	
Fallzahl	40
Median	103,3
Minimum	0,0
Maximum	745,9
Interquartilbereich	144,5
IgA⁺ Zellen [Variable/mm²] nach allo-HSCT	
Fallzahl	378
Median	82,8
Minimum	0,0
Maximum	585
Interquartilbereich	123,5

Tabelle 8: Vergleich der Zelldichte vor und nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT). Histopathologisch ermittelte Werte zur Anzahl Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben vor (N = 40) und nach (N = 378) der allo-HSCT.

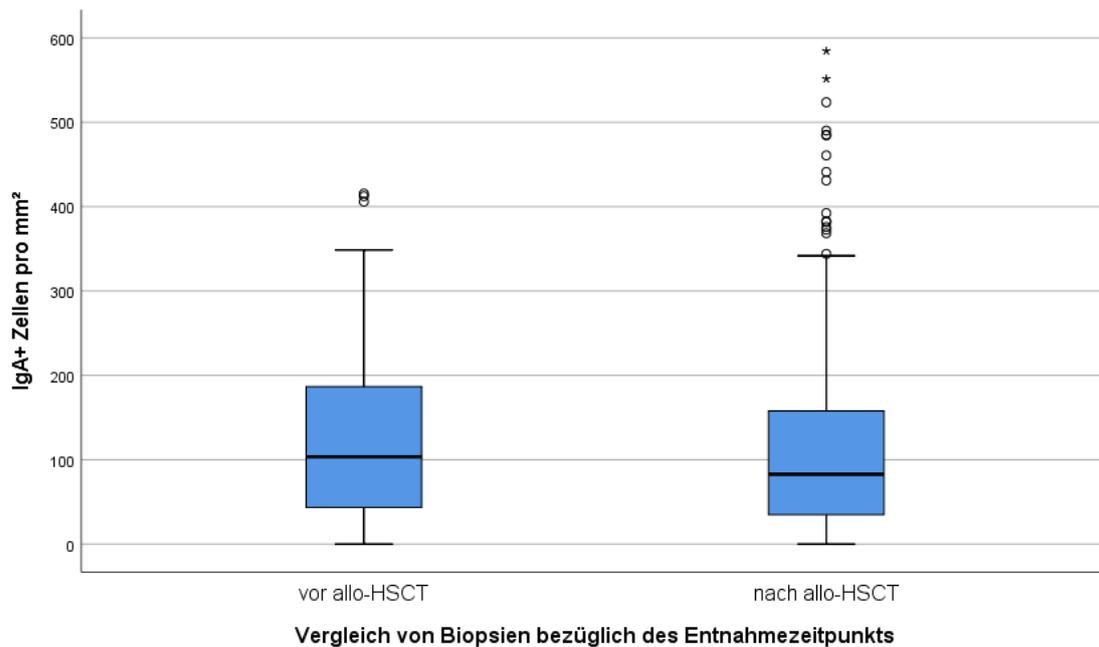


Abbildung 6: Vergleich der Zelldichte vor und nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT). Histopathologisch ermittelte Werte zur Anzahl Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben vor (N = 40) und nach (N = 378) der allo-HSCT. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Verteilung der Zelldichte unterschied sich nicht signifikant.

3.2 Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten

Gruppier nach den verschiedenen Darmabschnitten zeigte sich keine Normalverteilung der Zelldichte nach Kolmogorov und Smirnov ($p < 0,001$) in den Proben, welche nach der allo-HSCT entnommen worden waren. Ohne Berücksichtigung des GvHD-Status war die mediane Zelldichte in den Proben aus dem Ileum mit 47,3 Zellen pro mm^2 am niedrigsten (vgl. Tab. 9 und Abb. 7). Im Dickdarm zeigte sich eine mediane Zelldichte von 79,8 Zellen pro mm^2 . Am höchsten war die Dichte der IgA⁺ Zellen im Duodenum mit 123,2 Zellen pro mm^2 . Die Unterschiede bezüglich der Zellzahlen in den unterschiedlichen Darmabschnitten präsentierten sich signifikant: In der Gegenüberstellung ergab sich $p = 0,013$ für Ileum und Dickdarm, $p < 0,001$ für Ileum und Duodenum und $p = 0,005$ für Dickdarm und Duodenum.

Darmabschnitt und IgA ⁺ Zellen [Variable/mm ²] nach allo-HSCT		
Duodenum	Fallzahl	108
	Median	123,2
	Minimum	0,0
	Maximum	551,4
	Interquartilbereich	159,6
Ileum	Fallzahl	30
	Median	47,3
	Minimum	0,0
	Maximum	175,1
	Interquartilbereich	63,4
Dickdarm	Fallzahl	240
	Median	79,8
	Minimum	0,0
	Maximum	584,5
	Interquartilbereich	112,4

Tabelle 9: Vergleich der Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten. Histopathologisch ermittelte Werte zur Anzahl Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach der allo-HSCT (N = 378).

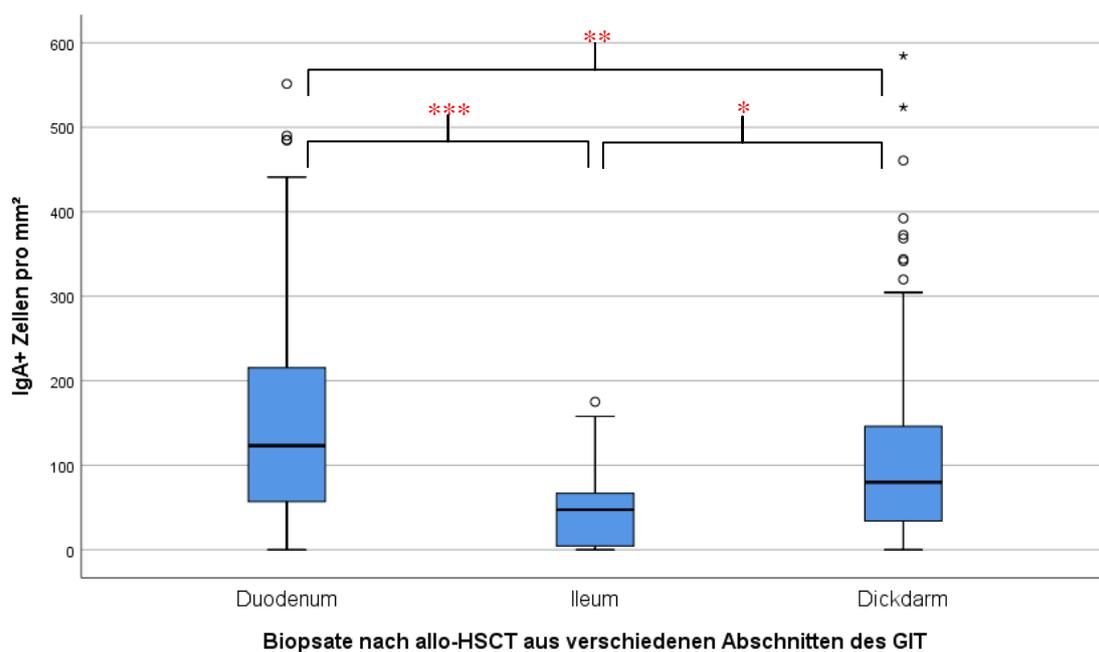


Abbildung 7: Vergleich der Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten. Histopathologisch ermittelte Werte zur Anzahl Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach der allo-HSCT (N = 378). Die Kategorie „Dickdarm“ umfasst Proben aus dem Caecum, dem Colon ascendens, transversum, descendens und sigmoideum sowie aus dem Rektum. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05; ** = p < 0,01 und *** = p < 0,001.

3.3 Zusammenhang zum GvHD-Schweregrad nach Lerner

Von 365 Proben lagen genaue Angaben zum histopathologischen GvHD-Status vor. Die Daten zur Zelldichte zeigten gruppiert nach den Lerner-Graden von 1 bis 4 und der Definition von Grad 0 als „Keine GvHD“ wie in Tabelle 10 und Abbildung 8 aufgeführt keine Normalverteilung im Kolmogorov-Smirnov-Test ($p < 0,001$). Es erfolgte im zweiten Schritt eine Bildung von Subgruppen (vgl. Tab. 11 und Abb. 9). Die Einteilung erfolgte in die Kategorien „Keine GvHD“ (Grad 0), „Geringe GvHD“ (Grad 1 und 2) und „Ausgeprägte GvHD“ (Grad 3 und 4).

Lerner-Grad und IgA⁺ Zellen [Variable/mm²] nach allo-HSCT		
Grad 0	Fallzahl	156
	Median	100,7
	Minimum	0,0
	Maximum	551,4
	Interquartilbereich	135,5
Grad 1	Fallzahl	113
	Median	81,0
	Minimum	0,00
	Maximum	490,1
	Interquartilbereich	118,0
Grad 2	Fallzahl	42
	Median	79,0
	Minimum	0,0
	Maximum	523,7
	Interquartilbereich	117,6
Grad 3	Fallzahl	43
	Median	38,0
	Minimum	0,0
	Maximum	584,5
	Interquartilbereich	100,1
Grad 4	Fallzahl	11
	Median	7,1
	Minimum	0,0
	Maximum	234,2
	Interquartilbereich	78,5

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Lerner-Grade. Deskriptive Statistik der ermittelten Werte zur Anzahl Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT), gruppiert nach den Lerner-Graden von 1 bis 4 der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) und der Definition von Grad 0 als „Keine GvHD“.

Gruppierte Lerner-Grade und IgA⁺ Zellen [Variable/mm²] nach allo-HSCT		
Keine GvHD (Grad 0)	Fallzahl	156
	Median	100,7
	Minimum	0,0
	Maximum	551,4
	Interquartilbereich	135,5
Geringe GvHD (Lerner-Grade 1 und 2)	Fallzahl	155
	Median	81,0
	Minimum	0,0
	Maximum	523,7
	Interquartilbereich	119,4
Ausgeprägte GvHD (Lerner-Grade 3 und 4)	Fallzahl	54
	Median	35,1
	Minimum	0,00
	Maximum	584,5
	Interquartilbereich	96,0

Tabelle 11: Vergleich der Zelldichte nach Subgruppen-Bildung anhand der Lerner-Gradeinteilung. Deskriptive Statistik der ermittelten Werte zur Anzahl Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT) mit Subgruppen-Bildung anhand der Lerner-Schweregradeinteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD).

Als Nullhypothese wurde formuliert, dass es keine Unterschiede bezüglich der Zelldichte zwischen den Schweregraden gibt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Schweregraden mit $H = 23,588$ und $p < 0,001$. Der anschließend durchgeführten Dunn-Bonferroni-Test ergab signifikante Unterschiede für den paarweisen Vergleich von Grad 0 und Grad 3 ($p = 0,001$) sowie von Grad 0 und Grad 4 ($p = 0,018$).

Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich bei Verwendung der Subgruppen „Keine GvHD“ (Grad 0), „Geringe GvHD“ (Grad 1 und 2) und „Ausgeprägte GvHD“ (Grad 3 und 4): Nach dem Kruskal-Wallis-Test unterschieden sich die Gruppen mit $H = 22,501$ als Gruppierungsvariable und $p < 0,001$. Die Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen im Dunn-Bonferroni-Test ergab folgende Werte: Ein signifikanter Unterschied der Zelldichte zeigte sich zwischen den Gruppen „Keine GvHD“ und „Ausgeprägte GvHD“ ($p < 0,001$). Ebenfalls signifikant war der Vergleich der Zellzahlen zwischen den Gruppen „Geringe GvHD“ und „Ausgeprägte GvHD“ ($p = 0,003$). Demgegenüber unterschieden sich die Gruppen „Keine GvHD“ und „Geringe GvHD“ nicht signifikant ($p = 0,156$).

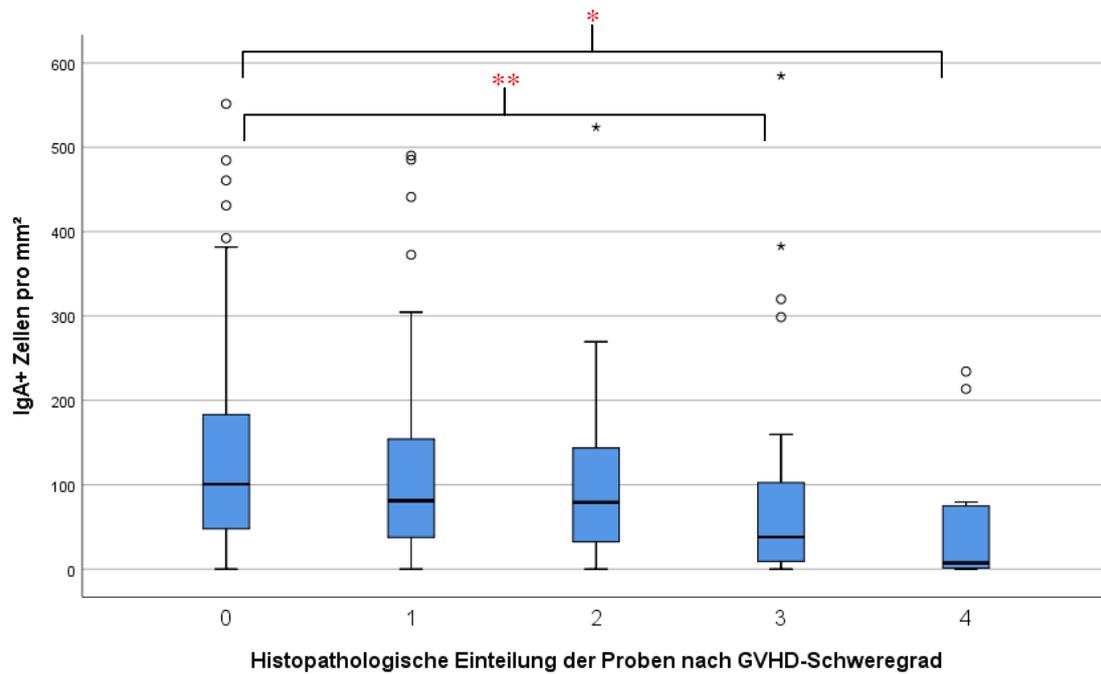


Abbildung 8: Gegenüberstellung der Lerner-Grade. Immunglobulin-A-exprimierende Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben, gruppiert nach den Lerner-Graden von 1 bis 4 der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) und der Definition von Grad 0 als „Keine GvHD“. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt vom Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

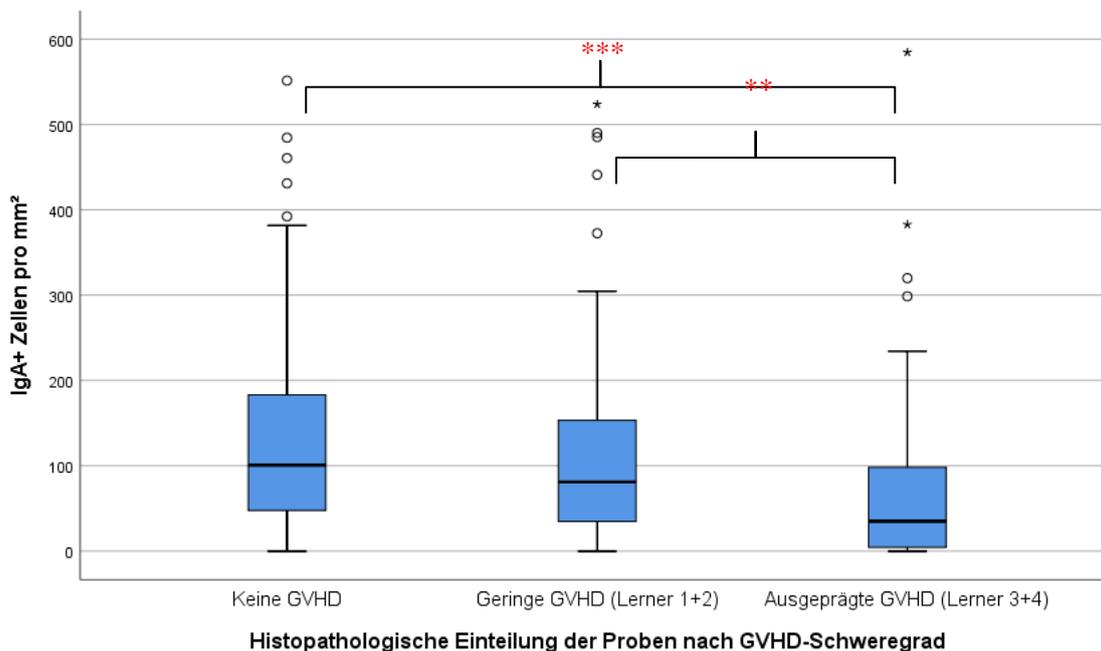


Abbildung 9: Vergleich nach Subgruppenbildung anhand der Lerner-Gradeinteilung. Immunglobulin-A-exprimierende Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach Subgruppenbildung anhand der Lerner-Einteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt vom Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanzen sind angegeben mit ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit der Zelldichte in den vor der allo-HSCT entnommenen Proben (N = 40) zeigte sich nur eine geringe Abweichung, wenn die Patienten zum Biopsie-Zeitpunkt nicht von einer GvHD betroffen waren (N = 156): Die mediane Zelldichte betrug rund 103,3 Zellen pro mm² vor der allo-HSCT und rund 100,7 Zellen pro mm² bei negativem GvHD-Status nach der allo-HSCT. Auch in Bezug auf eine gering ausgeprägte GvHD (N = 155) bestand im paarweisen Vergleich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen. Demgegenüber war die mediane Zelldichte im Falle einer ausgeprägten GvHD (N = 54) gegenüber den vor der allo-HSCT bestehenden Werten deutlich erniedrigt (p = 0,009).

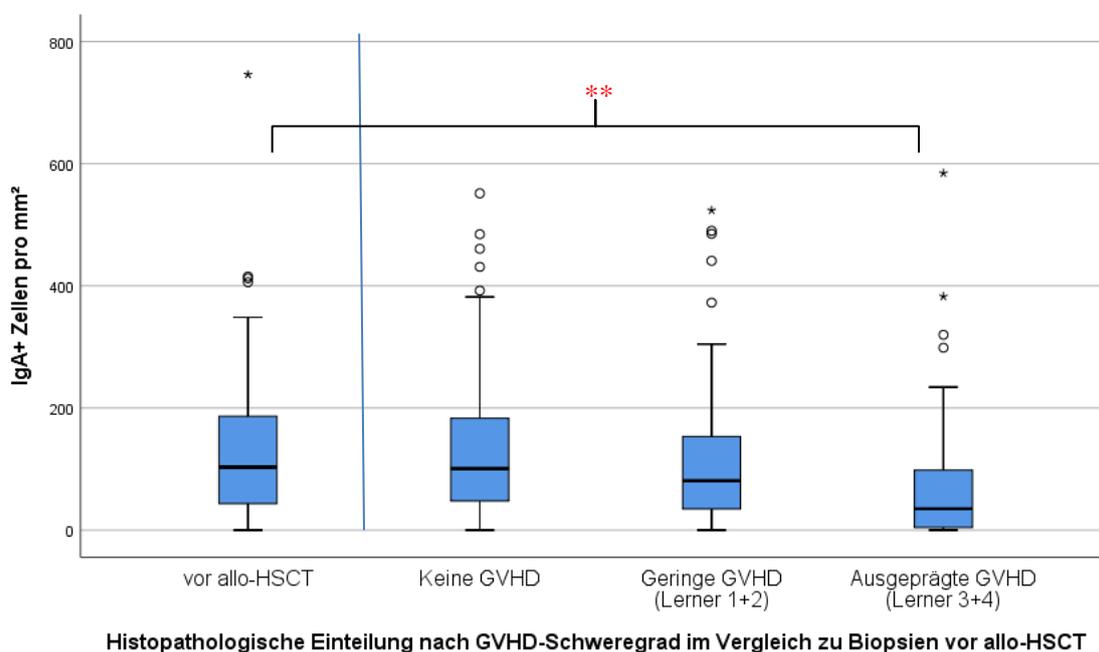


Abbildung 10: Vergleich mit den vor der Stammzelltransplantation gewonnenen Referenzproben. Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben vor und nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT) mit Subgruppen-Bildung anhand der Lerner-Einteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Die Signifikanzen sind angegeben mit ** = p < 0,01.

Unter der Verwendung der Subgruppen wurden die Werte für die unterschiedlichen Darmabschnitte anschließend getrennt beurteilt (vgl. Abb. 11). Im Duodenum zeigte sich nach dem Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen mit H = 2,277 und p = 0,320, während die Nullhypothese im Ileum (H = 7,536 und p = 0,023) und im Dickdarm (H = 10,059 und p = 0,007) abgelehnt werden konnte.

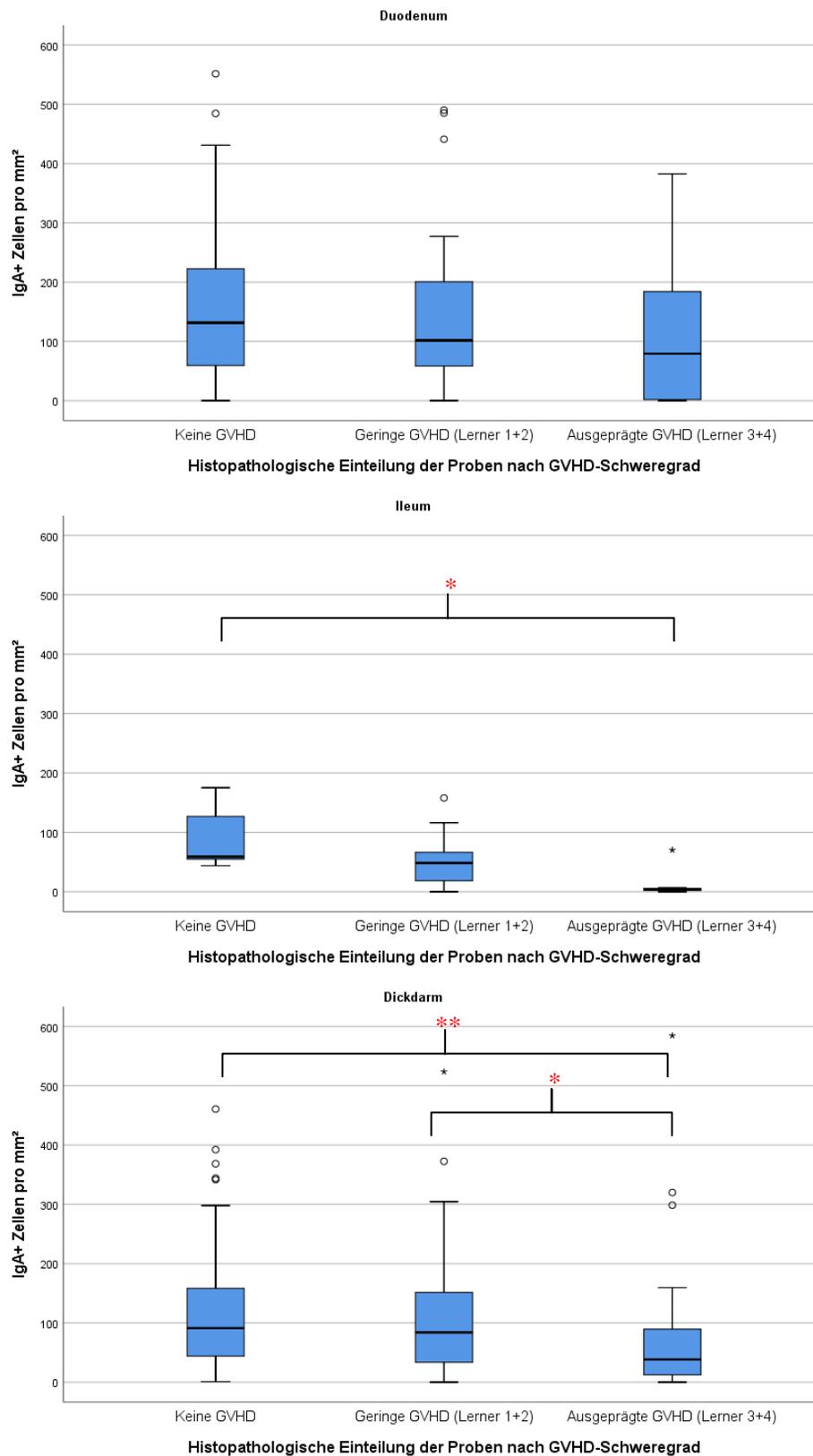


Abbildung 11: Vergleich der Darmabschnitte nach Subgruppenbildung anhand der Lerner-Gradeinteilung. Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) und Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) in Duodenum, Ileum und Dickdarm. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

Die Korrelation zwischen dem Lerner-Grad als ordinale Variable und der Konzentration der IgA-produzierenden Zellen als intervallskalierte Variable wurde zusätzlich mit dem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten überprüft. Ohne Unterscheidung zwischen den verschiedenen Darmabschnitten zeigte sich eine signifikante schwache Korrelation, $N = 365$, Spearman's $\rho = -0,231$, $p < 0,001$. Gruppieren nach den Darmabschnitten ergaben sich folgende Ergebnisse: keine signifikante Korrelation mit $N = 105$, Spearman's $\rho = -0,130$, $p = 0,185$ für Biopsien aus dem Duodenum, eine signifikante moderate Korrelation mit $N = 29$, Spearman's $\rho = -0,513$, $p = 0,004$ für Biopsien aus dem Ileum und eine signifikante schwache Korrelation mit $N = 231$, Spearman's $\rho = -0,180$, $p = 0,006$ für Biopsien aus dem Dickdarm.

3.4 Bezug zum klinischen GvHD-Schweregrad

Zu 355 Proben konnte retrospektiv der klinische GvHD-Status zum Biopsie-Zeitpunkt bestimmt werden. Im Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte sich keine Normalverteilung der Daten. In der deskriptiven Statistik fiel eine sehr geringe mediane Zelldichte der IgA⁺ Zellen bei Schweregrad 4 auf (vgl. Tab. 12 und Abb. 12). Vergleichbar mit der Zusammenfassung der Lerner-Grade wurden zusätzlich die Subgruppen „Klinisch keine GvHD“ (Grad 0), „Milde GvHD“ (Grad 1 und 2) und „Schwere GvHD“ (Grad 3 und 4) gebildet (vgl. Tab 13 und Abb. 13).

Klinischer GvHD-Schweregrad und IgA⁺ Zellen [Variable/mm²]		
Grad 0	Fallzahl	133
	Median	115,4
	Minimum	0,0
	Maximum	485,2
	Interquartilbereich	135,8
Grad 1	Fallzahl	122
	Median	71,9
	Minimum	0,0
	Maximum	551,4
	Interquartilbereich	124,2
Grad 2	Fallzahl	68
	Median	65,4
	Minimum	0,0
	Maximum	584,5
	Interquartilbereich	98,8
Grad 3	Fallzahl	25
	Median	79,5
	Minimum	0,00
	Maximum	382,7
	Interquartilbereich	129,6
Grad 4	Fallzahl	7
	Median	11,4
	Minimum	1,9
	Maximum	144,7
	Interquartilbereich	55,6

Tabelle 12: Gegenüberstellung der klinischen Schweregrade. Vergleich der Dichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben von stammzelltransplantierten Patienten in Bezug auf die klinische Beurteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD).

Klinischer GvHD-Schweregrad (gruppiert) und IgA⁺ Zellen [Variable/mm²]		
Klinisch keine GvHD (Grad 0)	Fallzahl	133
	Median	115,4
	Minimum	0,00
	Maximum	485,2
	Interquartilbereich	135,8
Milde GvHD (Grad 1 und 2)	Fallzahl	190
	Median	70,6
	Minimum	0,0
	Maximum	584,5
	Interquartilbereich	113,0
Schwere GvHD (Grad 3 und 4)	Fallzahl	32
	Median	64,6
	Minimum	0,0
	Maximum	382,7
	Interquartilbereich	121,6

Tabelle 13: Vergleich nach Subgruppenbildung anhand der klinischen Gradeinteilung. Vergleich der Dichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben von stammzelltransplantierten Patienten in Bezug auf die klinische Beurteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) mit Subgruppen-Bildung.

Als Nullhypothese wurde formuliert, dass es keine Unterschiede bezüglich der Zelldichte gibt. Die Nullhypothese konnte mit $H = 18,160$ und $p = 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test abgelehnt werden. Nach dem Dunn-Bonferroni-Test zeigten sich signifikante Unterschiede der Dichte zwischen den Graden 0 und 4 ($p = 0,035$) und den Graden 0 und 2 ($p = 0,012$).

Für die Subgruppen „Klinisch keine GVHD“ (Grad 0), „Leichte GVHD“ (Grad 1 und 2) und „Schwere GVHD“ (Grad 3 und 4) konnte die Nullhypothese im Kruskal-Wallis-Test mit $H = 13,536$ und $p = 0,001$ ebenfalls abgelehnt werden. Im paarweisen Vergleich unterschied sich die Zellkonzentration zwischen den Gruppen „Klinisch keine GVHD“ und „Schwere GVHD“ ($p = 0,012$) sowie zwischen den Gruppen „Klinisch keine GVHD“ und „Milde GVHD“ ($p = 0,005$) signifikant, während kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Milde GVHD“ und „Schwere GVHD“ festgestellt werden konnte.

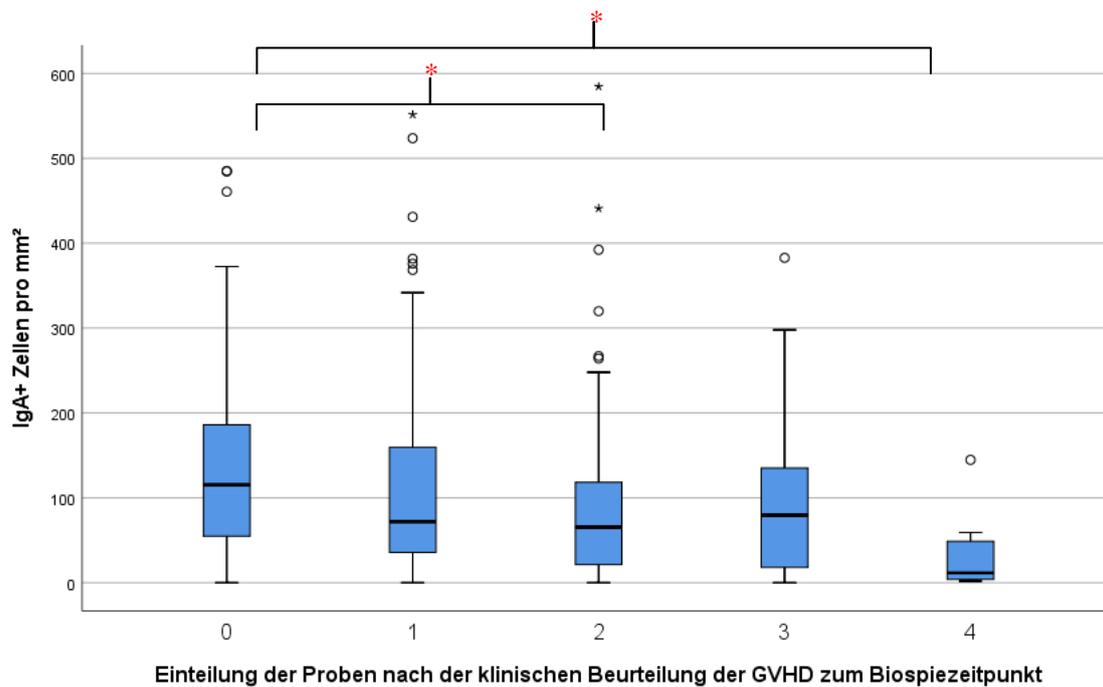


Abbildung 12: Gegenüberstellung der klinischen Schweregrade. Vergleich der Dichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben in Bezug auf die klinische Beurteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$.

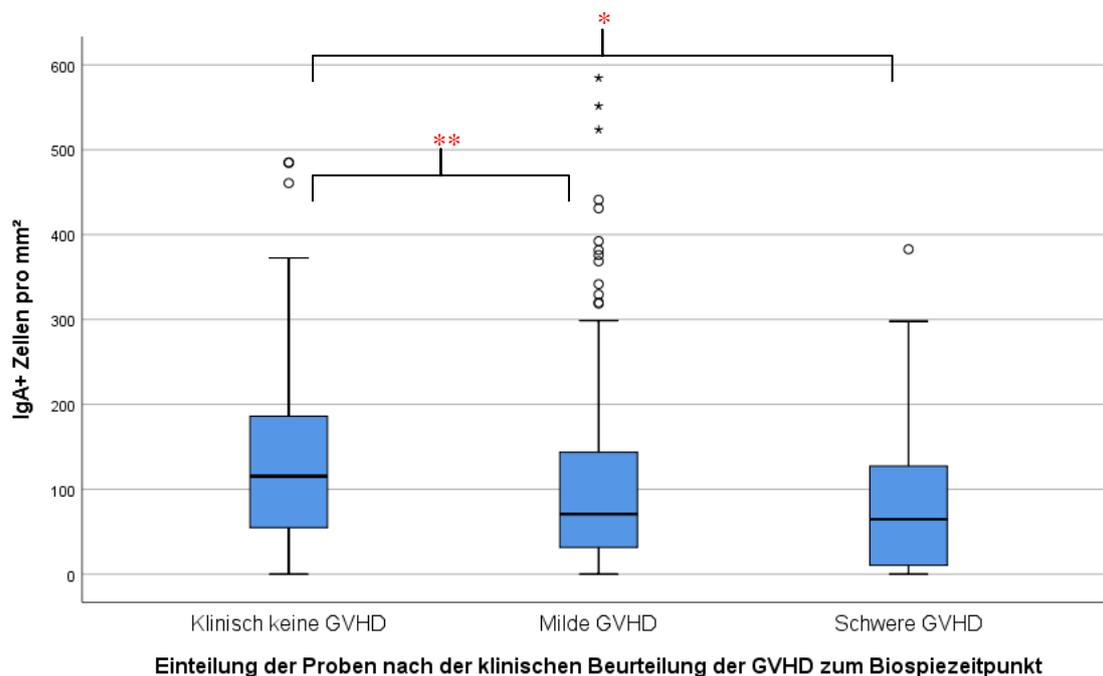


Abbildung 13: Vergleich nach Subgruppenbildung anhand der klinischen Gradeinteilung. Vergleich der Dichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben in Bezug auf die klinische Beurteilung der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) mit Subgruppen-Bildung. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

Wie bei den Lerner-Graden erfolgte eine weitere Analyse mit der Gruppierung der Daten anhand des Darmabschnitts. Signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen zeigten sich im Dickdarm mit $H = 13,171$ und $p = 0,001$. Dagegen unterschieden sich die Zelldichten in Bezug auf die Schweregrade im Duodenum ($H = 1,732$ und $p = 0,421$) und im Ileum ($H = 1,770$ und $p = 0,413$) nicht signifikant.

Die Korrelation zwischen dem klinischen GvHD-Grad als ordinale Variable und der Zelldichte als intervallskalierte Variable wurde wie bei der histopathologischen Schweregradeinteilung mit dem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten getestet. Ohne Unterscheidung zwischen den verschiedenen Darmabschnitten zeigte sich eine signifikante schwache Korrelation, $N = 355$, Spearman's $\rho = -0,210$, $p < 0,001$. Aufgeteilt nach Darmabschnitten zeigten sich keine signifikante Korrelation im Duodenum mit $N = 102$, $\rho = -0,032$ und $p = 0,749$ und keine signifikante Korrelation im Ileum mit $N = 29$, Spearman's $\rho = -0,149$ und $p = 0,441$. Im Dickdarm zeigte sich eine signifikante schwache Korrelation mit $N = 224$, Spearman's $\rho = -0,235$ und $p < 0,001$.

3.5 Regeneration der IgA⁺ Zellen

Zur Untersuchung der Regeneration der IgA⁺ Zellen erfolgte eine Einteilung der Daten nach dem Entnahmezeitpunkt der Biopsie. Es wurden drei Zeitgruppen untersucht: Diese umfassten die Zeiträume Tag 0 bis 30, Tag 31 bis 180 und über 180 Tage nach der allo-HSCT (vgl. Tab. 14 und Abb. 14). Es zeigte sich eine höhere mediane Zelldichte in den Proben aus dem Zeitraum vor Tag 30 nach der allo-HSCT im Vergleich zum Entnahmezeitraum zwischen Tag 30 und 180, entsprechend einer medianen Zelldichte von 86,8 Zellen pro mm² gegenüber einer Konzentration von 67,5 Zellen pro mm². In den Proben aus dem Zeitraum nach Tag 180 war wiederum eine höhere mediane Konzentration von 126,4 Zellen pro mm² nachweisbar (vgl. Tab. 14). Als Nullhypothese wurde angenommen, dass sich die Zelldichte in den genannten Zeiträumen nach der allo-HSCT nicht signifikant verändert. Die Nullhypothese konnte im Kruskal-Wallis-Test mit $H = 14,163$ und $p = ,001$ abgelehnt werden. Paarweise gegenübergestellt unterschied sich die Zelldichte zwischen dem Zeitraum von Tag 31 bis 180 und dem Zeitraum über 180 im anschließend durchgeführten Dunn-Bonferroni-Test signifikant mit $p = 0,001$ (vgl. Abb. 14).

IgA ⁺ Zellen [Variable/mm ²] im zeitlichen Verlauf nach der allo-HSCT		
Tag 0 bis 30	Fallzahl	136
	Median	86,8
	Minimum	0,0
	Maximum	584,5
	Interquartilbereich	118,5
Tag 31 bis 180	Fallzahl	152
	Median	67,5
	Minimum	0,0
	Maximum	392,3
	Interquartilbereich	104,1
>180 Tage	Fallzahl	90
	Median	126,4
	Minimum	0,0
	Maximum	523,7
	Interquartilbereich	190,1

Tabelle 14: Zelldichte im zeitlichen Verlauf. Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT).

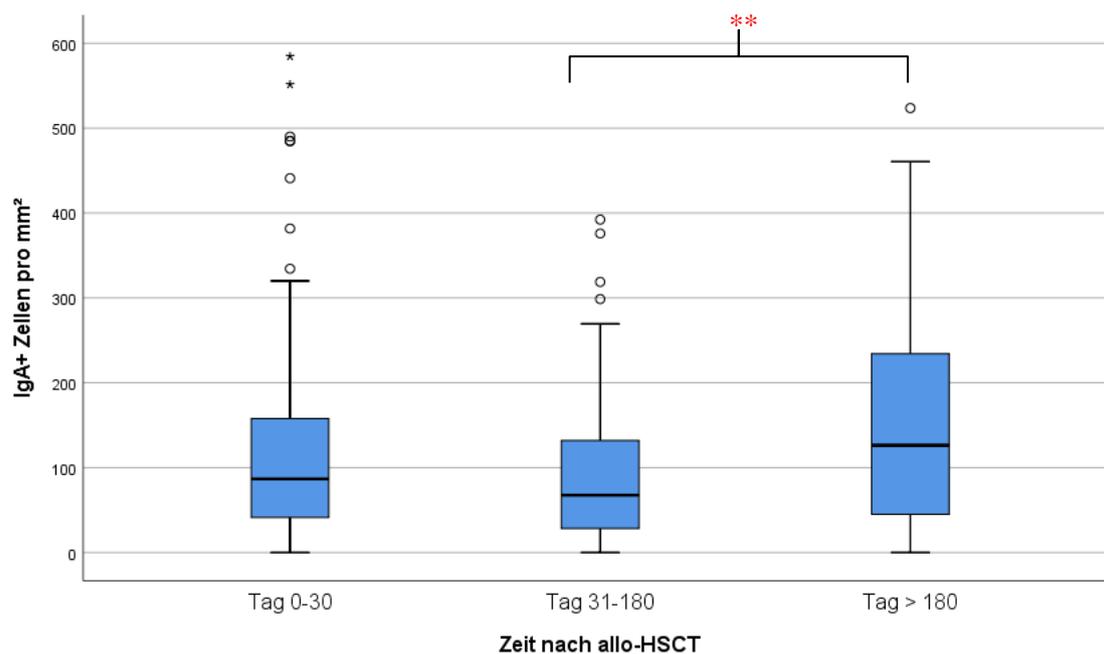


Abbildung 14: Zelldichte im zeitlichen Verlauf. Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach der allogenen Stammzelltransplantation (allo-HSCT). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test. Signifikanz ist angegeben mit ** = $p < 0,01$.

3.6 Überlebenszeitanalyse

3.6.1 Therapie- und rezidivassoziierte Mortalität

Für die Überlebensanalysen wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet. Es erfolgte die Bildung von zwei Gruppen anhand der Zelldichte in der Gewebeprobe des jeweiligen Patienten: Das Kriterium für die Einteilung war eine Zelldichte oberhalb oder unterhalb der medianen Zelldichte der Proben aller Patienten nach der allo-HSCT. Der ermittelte Median (82,8 Zellen/mm²) wurde dafür auf den Wert 83,0 Zellen/mm² aufgerundet. Als Nullhypothese wurde formuliert, dass die Höhe der Zelldichte die Prognose nicht beeinflusst. Als Ereignisse wurden die TRM (vgl. Tab. 15 und Abb. 15) und die RRM (vgl. Tab. 16 und Abb. 16) betrachtet. Bei der Analyse der RRM kann die Nullhypothese mit $p = 0,012$ abgelehnt werden. Somit konnte ein signifikant höheres Risiko für eine RRM bei einer erhöhten medianen Zelldichte beobachtet werden. Bei der TRM zeigte sich ein umgekehrter Trend: Das Risiko für die TRM war bei einer reduzierten Zelldichte erhöht. Jedoch unterschieden sich die Gruppen in diesem Fall nach dem Log-Rang-Test nicht signifikant ($p = 0,099$).

In einem weiteren Schritt wurde die Analyse nach dem Ausprägungsgrad der GvHD geschichtet. Unterschieden wurde zwischen zwei Gruppen: einer GvHD zwischen Grad 0 bis 1 und einer GvHD zwischen Grad 2 bis 4 nach Lerner. Bezogen auf die histopathologische Diagnose zeigte der Log-Rang-Test für die TRM mit $p = 0,290$ einen noch geringeren und nicht signifikanten Unterschied.. Für die RRM zeigte die Schichtung nach der histologischen GvHD-Diagnose weiterhin einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,015$.

TRM und IgA ⁺ Zellen [Variable/mm ²] in intestinalen Biopsien nach allo-HSCT		
IgA ⁺ Zellen pro mm ² < Median	Fallzahl	68
	Anzahl Ereignisse	23
	Zensiert	45
	Mittelwert-Schätzer	2221,0
IgA ⁺ Zellen pro mm ² > Median	Fallzahl	62
	Anzahl Ereignisse	13
	Zensiert	49
	Mittelwert-Schätzer	2170,5
Gesamt	Fallzahl	130
	Anzahl Ereignisse	36
	Zensiert	94
	Mittelwert-Schätzer	2361,378

Tabelle 15: Therapieassoziierte Mortalität (TRM). Die Analyse erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzer in Bezug auf die Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HSCT) unterhalb oder oberhalb der medianen Konzentration.

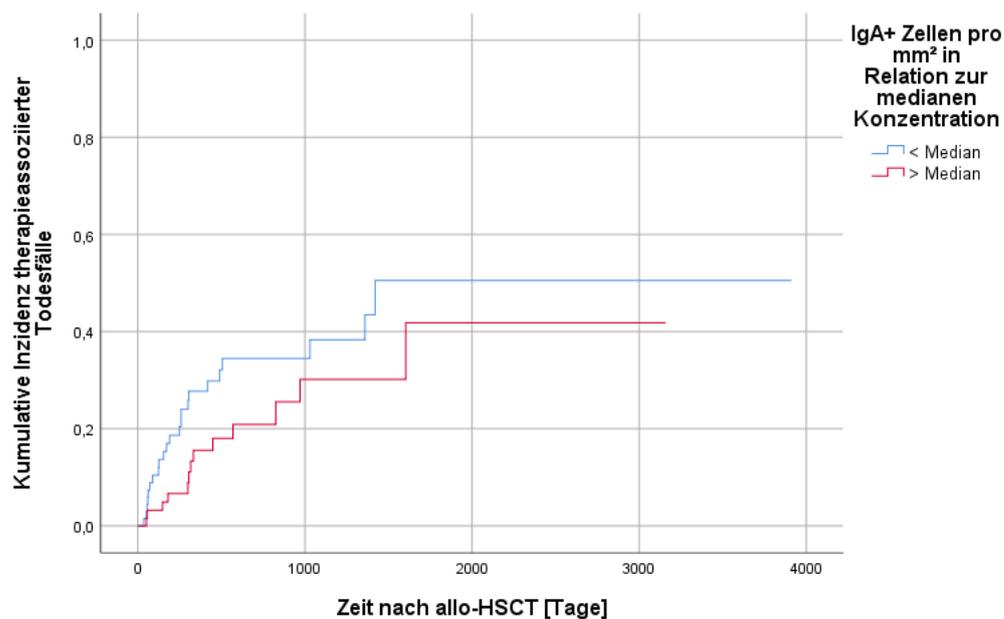


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven zur therapieassoziierten Mortalität. Die Analyse erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzer in Bezug auf die Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HSCT) unterhalb oder oberhalb der medianen Konzentration.

RRM und IgA+ Zellen [Variable/mm ²] in intestinalen Biopsien nach allo-HSCT		
IgA+ Zellen pro mm ² < Median	Fallzahl	68
	Anzahl Ereignisse	5
	Zensiert	63
	Mittelwert-Schätzer	3475,1
IgA+ Zellen pro mm ² > Median	Fallzahl	62
	Anzahl Ereignisse	17
	Zensiert	45
	Mittelwert-Schätzer	1860,8
Gesamt	Fallzahl	130
	Anzahl Ereignisse	22
	Zensiert	108
	Mittelwert-Schätzer	2514,3

Tabelle 16: Rezidivassoziierte Mortalität (RRM). Die Analyse erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzer in Bezug auf die Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HSCT) unterhalb oder oberhalb der medianen Konzentration.

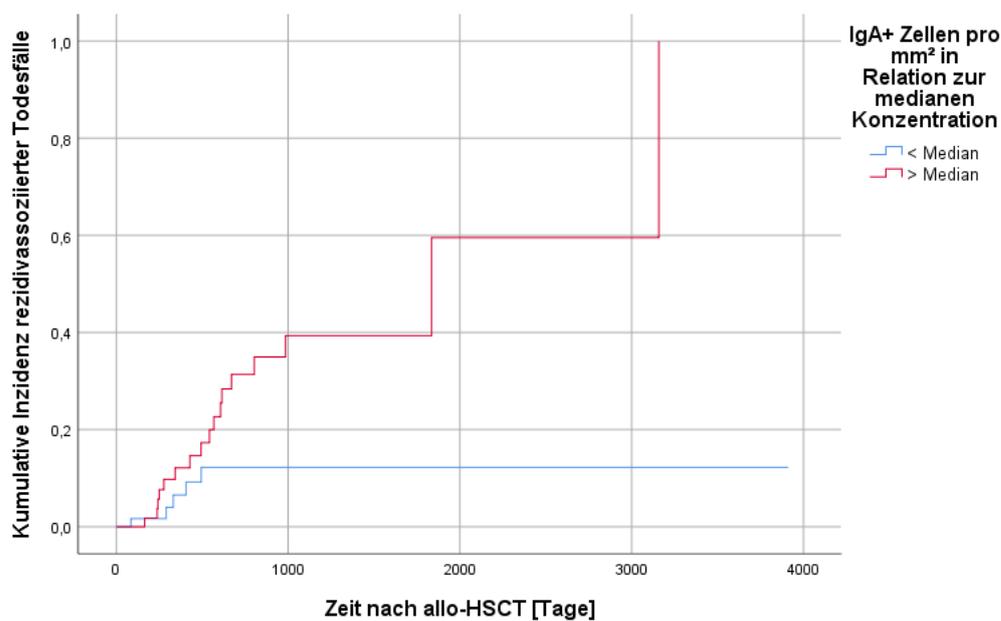


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven zur rezidivassoziierten Mortalität. Die Analyse erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzer in Bezug auf die Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HSCT) unterhalb oder oberhalb der medianen Konzentration.

3.6.2 Cox-Regression

Zur Beurteilung des Einflusses anderer Variablen wurde die Methode der Cox-Regression eingesetzt. Die GvHD-Diagnose bezieht sich wie beim Kaplan-Meier-Schätzer auf die Gruppen Lerner Grad 0 bis 1 und Lerner Grad 2 bis 4. Die Hazard-Rate von 3,426 zeigte, dass das erhöhte Risiko für die RRM bei einer Zelldichte über dem Median unabhängig von Alter, Art des Spenders, fortgeschrittenem Stadium der Grunderkrankung und GvHD-Schweregrad ist (vgl. Tab. 17).

Cox-Regression zur TRM	Signifikanz	Exp(B)	95%-Konfidenzintervall für Exp(B)
IgA+ Zellkonzentration > Median	,198	0,634	0,317 – 1,268
Altersgruppe 50+ bei Transplantation	,056	2,267	0,979 – 5,251
Genotypisch identischer Spender	,519		
Nicht-verwandter Spender	,484	1,359	0,575 – 3,211
Haploidenter Spender	,255	1,977	0,612 – 6,382
GvHD-Diagnose Grad 2 bis 4	,003	2,800	1,433 – 5,472
Fortgeschrittenes Stadium 3 der Grunderkrankung	,192	1,598	0,790 – 3,230
Cox-Regression zur RRM	Signifikanz	Exp(B)	95%-Konfidenzintervall für Exp(B)
IgA+ Zellkonzentration > Median	,018	3,426	1,233 – 9,520
Altersgruppe 50+ bei Transplantation	,125	2,235	0,800 – 6,244
Genotypisch identischer Spender	,482		
Nicht-verwandter Spender	,227	2,021	0,646 – 6,325
Haploidenter Spender	,985	0,000	0,000
GvHD-Diagnose Grad 2 bis 4	,668	0,763	0,222 – 2,623
Fortgeschrittenes Stadium 3 der Grunderkrankung	,038	2,524	1,051 – 6,058

Tabelle 17: Cox-Regression. Therapieassoziierte (TRM) und rezidivassoziierte (RRM) Mortalität in Abhängigkeit von der medianen Zelldichte Immunglobulin-A-exprimierender Zellen (IgA⁺ Zellen) in intestinalen Gewebeproben stammzelltransplantierten Patienten. Eine Zelldichte über dem Median zeigte unabhängig von Alter, Art des Spenders, fortgeschrittenem Stadium der Grunderkrankung und Schweregrad der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) ein erhöhtes Risiko für die RRM an.

3.7 Korrelation mit REG-3- α und 3-IS

Die Werte zur Zelldichte der IgA⁺ Zellen wurden zusätzlich mit der Höhe der Biomarker REG-3- α und 3-IS korreliert, wenn entsprechende Messwerte im Zeitraum von sieben Tagen vor oder nach der Gewebeentnahme vorlagen. Die Zelldichte korrelierte moderat negativ mit der REG-3- α -Konzentration im Serum, mit N = 75, Spearman's $\rho = -0,412$ und $p < 0,001$. In Bezug auf die Höhe der 3-IS-Werte im Urin konnte keine signifikante Korrelation beobachtet werden, mit N = 90, Spearman's $\rho = 0,046$ und $p = 0,668$.

4 Diskussion

4.1 Zusammenhang zum Schweregrad der GvHD

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Zelldichte intestinaler IgA⁺ Zellen durch eine allo-HSCT und die daraus resultierenden Komplikationen auf vielfältige Weise beeinflusst wird. Für das untersuchte Patientenkollektiv konnte ein Zusammenhang mit dem klinisch sowie insbesondere mit dem histopathologisch diagnostizierten Schweregrad der GvHD gezeigt werden. Beobachtet wurde der Trend, dass die Zelldichte mit zunehmender Schwere der histopathologisch diagnostizierten GvHD kontinuierlich sank. Dies deckt sich mit den eingangs vorgestellten Ergebnissen von Beschorner et al., welche ebenfalls eine verminderte Anzahl intestinaler IgA- und auch IgM-produzierender Plasmazellen in Gewebeproben stammzelltransplantierte Patienten beim Auftreten einer GvHD feststellten. (85). Im Hinblick auf die klinische Schweregradeinteilung zeigte sich ein vergleichbarer Trend, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der Betrachtung der histopathologischen Schweregradeinteilung. Somit zeigten die Ergebnisse gleichzeitig, dass die klinische und histopathologische Gradeinteilung des GvHD-Status für das untersuchte Patientenkollektiv nicht durchweg deckungsgleich waren.

Da das intestinale sIgA wie bereits eingangs erwähnt einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der intestinalen Barrierefunktion leistet, könnte eine gestörte IgA-Produktion das vermehrte Eindringen von pathogenen Antigenstrukturen erleichtern, welche wiederum die Entstehung einer GvHD begünstigen. (64) Andererseits richtet sich die zytotoxische Reaktion im Rahmen einer GvHD gegen die Immunzellen des Empfängers und damit auch gegen die IgA⁺ Zellen. (1,4). Bei einer Manifestation im GIT kommt es zudem zur Schädigung der Mukosa bis hin zum Epithelverlust, so dass dadurch wahrscheinlich auch die IgA⁺ Zellen und die rezeptorvermittelte Transzytose des IgA in das Darmlumen beeinträchtigt werden. (34,53,54) Eine inverse Beziehung zwischen der Zellanzahl und dem steigenden Schweregrad der GvHD konnte darüber hinaus bereits für die Paneth-Körnerzellen im Duodenum gezeigt werden, welche über die Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie dem Reg-3- α ebenfalls an der Steuerung der intestinalen Homöostase beteiligt sind. (36) Dazu passt auch die beobachtete negative Korrelation zwischen den IgA⁺ Zellen und der REG-3- α -Konzentration im Serum.

Es stellt sich die Frage, ob die beobachteten Trends auf die ortsständigen, in der intestinalen Mukosa lokalisierten IgA⁺ Zellen beschränkt ist oder ob das Auftreten einer GvHD die IgA-Produktion im gesamten Körper beeinträchtigt. Da das Auftreten einer GvHD die Immunrestitution beeinträchtigen kann, liegt es nahe, dass durch die verminderte Anzahl der B-Lymphozyten auch weniger IgA gebildet werden kann. (84) Dazu passen Ergebnisse aus einer Studie mit Blutuntersuchungen, in deren Rahmen niedrigere IgA-Serumpiegel bei Patienten mit einer cGVHD im Vergleich zu Patienten ohne GvHD an Tag 180 nach der Transplantation gemessen wurden. (90) Zudem zeigten Speicheluntersuchungen bei Patienten mit Befall der Speicheldrüsen im Rahmen einer ausgeprägten cGvHD eine reduzierte Menge oder das vollständige Fehlen des sIgA. (91)

4.2 Unterschiede der Zelldichte in verschiedenen Darmabschnitten

Der Abfall der Zelldichte der IgA⁺ Zellen mit ansteigendem Schweregrad der GvHD konnte auch nach der Gruppierung der Gewebeproben anhand des Entnahmeortes im GIT beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde zudem durch den schwach bis moderat negativen Spear'schen Rangkorrelationskoeffizienten als Hinweis auf eine inverse Beziehung zwischen steigendem GvHD-Grad und Höhe der Zellzahl gestützt. Der beschriebene Trend konnte sowohl im Duodenum als auch im Ileum und im Dickdarm beobachtet werden, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht in jedem Darmabschnitt erreicht. Die Mehrzahl der Proben stammte aus dem Dickdarm (N = 240). Im Dickdarm waren die Unterschiede sowohl in Bezug auf die klinische als auch auf die histopathologische Gradeinteilung der GvHD signifikant. Im Duodenum waren die Unterschiede dagegen schwächer ausgeprägt. Die Beobachtung der deutlicher ausgeprägten Abweichungen der medianen Zelldichte zwischen den GvHD-Graden im Dickdarm könnte sich darüber erklären, dass der Dickdarm vergleichsweise dicht bakteriell besiedelt ist und deswegen die IgA-gestützte intestinale Homöostase und die Interaktion mit dem Mikrobiom besonders wichtig ist. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass auch der Dünndarm ein spezifisches Mikrobiom, wenn auch mit geringerer Diversität im Vergleich zum Dickdarm, aufweist. (92) Eine Auffälligkeit im Zuge der Analyse war die im Vergleich mit den anderen Darmabschnitten deutlich niedrigere mediane Zelldichte in den Proben aus dem Ileum. Lerner et al. wiesen in ihrer Arbeit

zur Gradeinteilung der GvHD bereits darauf hin, dass die Läsionen in den von ihnen untersuchten Proben im Ileum besonders ausgeprägt waren. (37) Des Weiteren untersuchten Yip et al. in einer kleinen Kohorte die Sensitivität der histopathologischen Diagnose in Bezug auf die klinische Diagnose einer schweren GvHD. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich eine klinische Grad 4-GvHD am zuverlässigsten mit der histopathologischen Untersuchung einer Probe aus dem terminalen Ileum identifizieren ließ. (93) Die genannten Untersuchungen weisen darauf hin, dass sich eine GvHD im Ileum besonders deutlich manifestiert. Allerdings zeigte sich die relativ niedrige Zelldichte der IgA⁺ Zellen im Ileum sowohl in den Proben von Patienten mit einer GvHD-Diagnose als auch bei Patienten ohne GvHD nach der allo-HSCT. Somit lässt sich die niedrige Zelldichte in diesem Fall nicht dadurch erklären, dass vor allem bei Patienten mit einer schweren GvHD Biopsien aus dem Ileum entnommen wurden. Das Ileum zeichnet sich gegenüber den anderen Darmabschnitten zudem dadurch aus, dass die immunologisch aktiven Strukturen in Form der Peyer-Plaques angeordnet sind. (53) Dieser besondere Aufbau des Ileums mit einer hohen Konzentration immunologisch aktiver Strukturen könnte zusammen mit der erhöhten Vulnerabilität dieses Darmabschnittes gegenüber der GvHD als Erklärung für die Abweichungen der Zelldichte herangezogen werden.

4.3 Verzögerte Regeneration der IgA⁺ Zellen

Neben dem Auftreten einer GvHD und dem Entnahmeort beeinflusste auch die Zeitdauer zwischen der allo-HSCT und der Gewebeentnahme die Anzahl der IgA⁺ Zellen. Als Ergebnis ergab sich, dass die Zelldichte unabhängig vom GvHD-Status bis Tag 180 zunächst abfiel. Danach zeigten sich wieder höhere Werte. Die Einteilung der Proben in Zeitgruppen orientierte sich an den Werten für das Engraftment. Eine gängige Einteilung der Immunrestitution nach einer allo-HSCT umfasst das „Preengraftment“ von Tag 0 bis 30, das „Early Postengraftment“ von Tag 30 bis 100 und das „Late Postengraftment“ nach Tag 100. (94) Die einzelnen Phasen zeigen unterschiedliche Charakteristika im Hinblick auf die immunologische Abwehrfähigkeit. So ist die Phase bis Tag 30 nach Pereira et al. durch eine Neutropenie, die damit verbundene Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen und ein erhöhtes Mukositis-Risiko gekennzeichnet. Für den Zeitraum zwischen Tag 30 und Tag 100 wird eine B- und T-Zelldysfunktion beschrieben. Die Phase ab Tag 100 wird zusätzlich zur

Zelldysfunktion durch eine gestörte humorale Immunantwort charakterisiert. In der Zeit nach dem Engraftment treten entsprechend vermehrt virale Infektionen auf. (94) Die Werte zur Anzahl der IgA⁺ Zellen spiegeln möglicherweise die Elimination der Empfänger-Plasmazellen nach der allo-HSCT wieder, welche anschließend nach dem Engraftment um Tag 30 nach der allo-HSCT schrittweise durch Spender-Plasmazellen ersetzt werden. In der Literatur liegen bisher in erster Linie Untersuchungen zu Zellzahlen und Antikörperspiegeln nach der allo-HSCT im Blut vor: Fujimaki et al. beobachteten in diesem Zusammenhang, dass sich die IgM- und IgG-Spiegel bis Tag 100 normalisierten. Demgegenüber lagen die IgA-Serumspiegel selbst an Tag 180 noch unter dem Normwert. (90) In einer Studie von de Silva et al. war die Anzahl der B-Zellen im Blut direkt nach allo-HSCT am niedrigsten und stieg dann kontinuierlich an, bis sie nach neun bis zwölf Monaten wieder im Normalbereich lag. In dieser Zeit wurde der physiologische Prozentsatz an B-Zellen wieder erreicht und erholte sich somit schneller als die totale Zellzahl. In der selben Untersuchung lag der IgA-Spiegel bis zum letzten Follow-Up nach zwölf Monaten unter dem Normwert. Höhere IgA-Spiegel wurden zu Beginn und drei Monate nach der allo-HSCT bei Patienten mit Infektionen der Schleimhäute gemessen. (84) Niedrige IgA-Spiegel an Tag 180 nach allo-HSCT korrelierten dagegen mit einer erhöhten Infektionsrate. Die IgA-Spiegel an Tag 180 korrelierten mit der gemessenen Anzahl an B-Zellen zu diesem Zeitpunkt. (95) Die genannten Untersuchungen zeigen, dass die Erholung der B-Zellen und der IgA-Spiegel im Blut einen vergleichsweise langen Zeitraum von über 100 Tagen in Anspruch nimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dies auch für die intestinalen IgA⁺ Zellen gilt. Im Unterschied zu den im Blutkreislauf zirkulierenden B-Zellen ist deren Anzahl jedoch nicht direkt nach der allo-HSCT am niedrigsten. Möglicherweise sind die ortständigen IgA⁺ Zellen des Empfängers zunächst nicht unmittelbar von den Folgen der allo-HSCT betroffen und werden erst später durch Spender-Zellen eliminiert und ersetzt.

4.4 Prognostische Aussagekraft

Die Überlebensanalysen lieferten Hinweise darauf, dass eine hohe Anzahl der IgA⁺ Zellen in Bezug auf die mediane Zelldichte nach einer allo-HSCT mit einer erniedrigten TRM und auf der anderen Seite mit einer erhöhten RRM assoziiert ist. Bezüglich der TRM kann die Reduktion der IgA⁺ Zellen am ehesten als Ausdruck der Schwere der GvHD betrachtet werden, welche wiederum mit der TRM assoziiert ist. Zudem könnte das erhöhte Risiko für die TRM bei einer erniedrigten Zelldichte über den Verlust der protektiven Funktionen des IgA bei Infektionserkrankungen erklärt werden. (96) Bezüglich der RRM stellt sich die Frage, welche Verbindung zwischen den IgA⁺ Zellen und einem Rezidiv bestehen könnte. In der Cox-Regression blieb der signifikante Einfluss einer hohen Anzahl intestinaler IgA⁺ Zellen auch unter Einbeziehung des histopathologischen GvHD-Schweregrades, des Stadiums der Grunderkrankung zum Transplantationszeitpunkt und des Patientenalters weiterhin bestehen. Wie eingangs erwähnt wird ein Rezidiv im Idealfall durch den GvL-Effekt verhindert. Deswegen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine hohe Anzahl der im GIT lokalisierten IgA⁺ Zellen darauf hinweist, dass die Alloreaktion und damit auch der GvL-Effekt weniger stark ausgeprägt sind, da in diesem Fall die Elimination der intestinalen IgA⁺ Zellen des Empfängers verlangsamt abläuft. Zur weiteren Erklärung kann man die Ergebnisse aus Untersuchungen zum Chimärismus nach allo-HSCT und zu dessen prognostischer Aussagekraft hinsichtlich eines Rezidivs heranziehen. Nach allo-HSCT sind zur Rezidivfrüherkennung zwei Methoden bekannt, die Chimärismusanalyse und die Analyse der minimalen Resterkrankung (MRD). Die MRD-Analyse hat den Nachweis maligner Zellen zum Ziel, während die Chimärismusanalyse Aufschluss über das Engraftment geben kann. (97,98) Ein vollständiger Chimärismus tritt auf, wenn bei einem Patienten nach allo-HSCT die gesamten Zellen des hämatopoetischen Systems vom Spender stammen. Direkt nach der Transplantation liegt in der Regel ein gemischter Chimärismus vor. Das bedeutet, dass die blutbildenden Zellen zum Teil vom Spender und zum Teil vom Empfänger abstammen. (98) Abhängig vom Erfolg des Engraftments zeigen sich im Verlauf unterschiedliche Ausprägungsstufen des Chimärismus. (98,99) Ein gemischter Chimärismus wird mit einem höheren Rezidivrisiko in Verbindung gebracht. (100) Es ist anzunehmen, dass bei einem gestörten Engraftment und dem daraus resultierenden geringeren Ausprägungsgrad des Chimärismus auch die intestinalen IgA⁺ Zellen wie bereits erwähnt nicht oder langsamer durch die entsprechenden Zellen des Spenders ersetzt werden.

4.5 Korrelation mit REG-3- α und 3-IS

Beim Vergleich der Anzahl der IgA⁺ Zellen mit den REG-3- α -Werten im Serum im Zeitraum von sieben Tagen vor oder nach der Gewebeentnahme zeigte sich eine signifikante, schwach negative Korrelation. Dies passt mit der Beobachtung der sinkenden Zelldichte bei steigendem Schweregrad der GvHD zusammen, da bereits in mehreren Studien gezeigt wurde, dass der REG-3- α -Spiegel beim Auftreten einer GvHD im GIT erhöht ist. (39,41,101,102) Hohe Konzentrationen des REG-3- α sind darüber hinaus mit einer höheren TRM verbunden. (102) Die bei den IgA⁺ Zellen beobachtete inverse Beziehung zwischen der Höhe der Zelldichte und dem Schweregrad der GvHD wurde ebenfalls für die Paneth-Körnerzellen gezeigt, welche das REG-3- α produzieren. (36) Es bleibt abzuklären, ob sich der Zusammenhang zwischen den REG-3- α -Werten und der Dichte der IgA⁺ Zellen alleine durch die GvHD erklären lässt oder ob es einen gemeinsamen Bezug zu einer Störung des Mikrobioms gibt, da letzteres sowohl durch das REG-3- α als antimikrobielles Peptid als auch durch die vielfältigen Funktionen des sIgA beeinflusst wird. Eine Gemeinsamkeit dieser beiden Moleküle ist, dass sie zur Abwehr von potentiell pathogenen Erregern beitragen. (36,64) Dieser Annahme steht entgegen, dass keine signifikante Korrelation der IgA⁺ Zellen mit den 3-IS-Konzentrationen im Urin, welche Auskunft über die Zusammensetzung des Mikrobioms geben, festgestellt werden konnte. Ein Problem bei der Beurteilung war jedoch die vergleichsweise kleine Zahl der Patienten, deren Werte zur 3-IS-Konzentration im Urin und zur REG-3- α -Serumkonzentration für die Auswertung zur Verfügung standen.

4.6 Grenzen der vorliegenden Arbeit

Da die klinischen Daten der Patienten retrospektiv erhoben wurden, konnte nicht in jedem Fall eine Vollständigkeit des Datensatzes gewährleistet werden. Zudem ist die Heterogenität der Probenauswahl in Bezug auf den Biopsiezeitpunkt und den Entnahmeort zu beachten. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass es Unterschiede bei der Regulation der IgA-Antwort in den unterschiedlichen Darmabschnitten gibt. Darüber hinaus fehlten Vergleichswerte zur physiologischen Anzahl der intestinalen IgA⁺ Zellen in den Proben gesunder Probanden. Die Bezugsgröße, die im Rahmen der Arbeit bestimmt wurde, beschränkt sich auf die Zelldichte in Gewebeproben von mittlerweile allogenen stammzelltransplantierten Patienten mit einer entsprechenden Grunderkrankung. Deswegen besteht die Möglichkeit einer auf der Grunderkrankung beruhenden Beeinflussung der IgA⁺ Zellen bereits vor der allo-HSCT. Gleiches gilt für eine vorausgehende Chemotherapie. Als Quelle für die Beurteilung der GvHD nach Lerner diente retrospektiv der histopathologische Befund. Wenn die Gradeinteilung durch unterschiedliche Pathologen erfolgte, besteht das Risiko einer Interobservervariabilität. Bei der genauen Gradeinteilung der GvHD kam es in einem Ringversuch unter der Beteiligung von fünf Pathologen in über 50% der Fälle zu Abweichungen vor der Festlegung gemeinsamer Diagnosekriterien. (103) Bei den Überlebenszeitanalysen ist die Definition der Zeitdauer mit der allo-HSCT als Bezugspunkt möglicherweise nicht ideal, um einen Zusammenhang zu den IgA⁺ Zellen aufzuzeigen. Eine Alternative für zukünftige Analysen wäre deswegen die Berechnung der Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Biopsie-Entnahme.

4.7 Ausblick

Der Zusammenhang zwischen der Anzahl intestinaler IgA⁺ Zellen zum Schweregrad der GvHD könnte in Zukunft die histopathologische Diagnostik unterstützen. Der methodische Ansatz der Auswertung der digitalisierten Objektträger stellt eine Alternative zur klassischen lichtmikroskopischen Auswertung mittels Hauptgesichtsfeldern dar. Ein großer Vorteil der Methode war die Möglichkeit der Umrandung und Ausmessung von ausgewählten Arealen der Präparate. Durch die Umrandung konnte zum einen sichergestellt werden, dass nur das gewünschte Gewebe in die Analyse miteinbezogen wird, und zum anderen hatte man die Möglichkeit, Leerstellen und Artefakte auszuschließen. Perspektivisch könnte diese digitale Analyse in Zukunft durch künstliche Intelligenz unterstützt werden. Die Verwendung gemeinsamer, einheitlicher Diagnosekriterien sowie die Angabe der Sicherheit der histopathologischen GvHD-Diagnose nach den eingangs erwähnten NIH-Konsensus-Kriterien sollte für zukünftige Untersuchungen angestrebt werden, um die Interobservervariabilität zu verringern und multizentrische Studien zu erleichtern. Die diskutierten Ergebnisse werfen einige neue Fragen auf. Zunächst sollte die Abstammung der intestinalen IgA⁺ Zellen nach einer allo-HSCT abgeklärt werden. Damit könnte der vermutete Zusammenhang zu einem Rezidiv über eine abgeschwächte Alloreaktion überprüft werden. Aufgrund der relativ langen Überlebenszeit von Plasmazellen sollte speziell der Chimärismus der IgA⁺ Zellen untersucht werden, um deren Abstammung zu bestimmen. Wünschenswert wäre zudem eine im Vergleich zur Biopsie-Entnahme weniger invasive Probengewinnung wie beispielsweise die Blutanalyse oder die Untersuchung von sIgA in Stuhlproben.

5 Zusammenfassung

Das Auftreten einer GvHD gilt nach wie vor als eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität nach einer allo-HSCT. Gleichzeitig besteht eine Beziehung zum erwünschten GvL-Effekt. Ein möglichst frühzeitiges und zuverlässiges Erkennen beider Entitäten ist aufgrund der möglichen schwerwiegenden Folgen für die Patienten das Ziel diverser Forschungsprojekte. Die bisherige Diagnostik zur Immunrestitution stammzelltransplantierter Patienten fokussierte sich in erster Linie auf Analysen im peripheren Blut. Während die Konzentration des IgA-Spiegels und die B-Lymphozyten in Blutproben im Verlauf nach einer allo-HSCT bereits mehrfach untersucht wurden, gab es keine aktuellen Daten zur Verteilung, Regeneration und Beeinträchtigung der ortsständigen IgA⁺ Zellen im GIT. An diesem Punkt setzte die vorliegende Arbeit an. Ziel war das Aufzeigen von Zusammenhängen und Trends durch die immunhistochemisch gestützte Analyse der IgA⁺ Zellen in intestinalen Gewebeproben aus unterschiedlichen Abschnitten des Dünn- und Dickdarms (Duodenum, Ileum, Caecum, Colon, Rektum) allogent-stammzelltransplantierter Patienten. Im Mittelpunkt stand dabei der Bezug auf den histopathologisch ermittelten Schweregrad der GvHD nach Lerner.

Für das untersuchte Patientenkollektiv zeigte sich eine Abnahme der Zelldichte mit steigendem histopathologischen GvHD-Grad in allen untersuchten Darmabschnitten. Darüber hinaus wiesen die Ergebnisse auf eine mögliche prognostische Aussagekraft der Zelldichte hin: Die Mortalität durch ein Rezidiv der malignen Grunderkrankung war – unabhängig vom Auftreten einer GvHD – bei einer Zellzahl oberhalb der medianen Zelldichte signifikant mit geringeren Überlebensraten assoziiert. Der Zusammenhang stellte sich bezüglich der TRM umgekehrt dar. Die Ergebnisse zur TRM erklären sich wahrscheinlich über einen Zusammenhang zum GvHD-Schweregrad: Eine reduzierte Zellzahl kann in diesem Sinne als Ausdruck einer stärker ausgeprägten GvHD betrachtet werden. Demgegenüber könnte eine geringere Zelldichte im Hinblick auf die RRM auf eine verminderte Elimination der ortsständigen IgA⁺ Zellen hinweisen, als Folge einer geringer ausgeprägten Alloreaktion und des darauf beruhenden GvL-Effektes. Abschließend lässt sich auf dieser Basis die Hypothese aufstellen, dass sich die intestinalen IgA⁺ Zellen als Indikatoren der Alloreaktion eignen und somit eine prognostische Aussagekraft besitzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Carreras E, editor. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham: Springer International Publishing; Springer; 2019. XL, 702 Seiten in 1 Teil. eng.
2. World Health Organization. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation HSCtx* [Internet]. Geneva, Switzerland. 2018 [cited 2021 Feb 2]. Available from: <https://www.who.int/transplantation/hscctx/en/>
3. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, Corbacioglu S, Dreger P, Dufour C, Gennery AR, Kuball J, Lankester AC, Lanza F, Montoto S, Nagler A, Peffault de Latour R, Snowden JA, Styczynski J, Yakoub-Agha I, Kröger N, Mohty M. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(10):1525–52. doi:10.1038/s41409-019-0516-2 Cited in: PubMed; PMID 30953028.
4. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550–61. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3 Cited in: PubMed; PMID 19282026.
5. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers MED. 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*. 2005;11(12):945–56. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.004 Cited in: PubMed; PMID 16338616.
6. Sullivan KM, Deeg HJ, Sanders J, Klosterman A, Amos D, Shulman H, Sale G, Martin P, Witherspoon R, Appelbaum F. Hyperacute graft-v-host disease in patients not given immunosuppression after allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1986;67(4):1172–5. Cited in: PubMed; PMID 3513869.
7. Saliba RM, Lima M de, Giral S, Andersson B, Khouri IF, Hosing C, Ghosh S, Neumann J, Hsu Y, Jesus J de, Qazilbash MH, Champlin RE, Couriel DR. Hyperacute GVHD: risk factors, outcomes, and clinical implications. *Blood*. 2007;109(7):2751–8. doi:10.1182/blood-2006-07-034348 Cited in: PubMed; PMID 17138825.
8. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Hämatopoetische Stammzelltransplantation und Zelluläre Therapie e. V. (DAG-HSZT). *DAG-KBT Leitlinien: Konditionierung* [Internet]. 2016 [cited 2021 Apr 25]; [4 p.]. Available from: https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-07_Konditionierung.pdf
9. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555–62. Cited in: PubMed; PMID 2297567.

10. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen Av Av, Bandini G, Devergie A, Schattenberg A, Frassoni F, Guglielmi C, Iacobelli S, Michallet M, Kolb H-J, Ruutu T, Niederwieser D. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002;100(12):3877–86. doi:10.1182/blood.V100.12.3877 Cited in: PubMed; PMID 12433695.
11. Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringdén O, Stone JA, Bortin MM. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med*. 1994;120(8):646–52. doi:10.7326/0003-4819-120-8-199404150-00004 Cited in: PubMed; PMID 8135448.
12. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;6221–78. Cited in: PubMed; PMID 4875305.
13. Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzko M. Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(9):833–45. doi:10.1007/s00109-011-0767-x Cited in: PubMed; PMID 21573893.
14. Ramadan A, Paczesny S. Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. *Front Immunol*. 2015;6:14. doi:10.3389/fimmu.2015.00014 Cited in: PubMed; PMID 25674088.
15. Heidegger S, van den Brink MRM, Haas T, Poeck H. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2014;5:337. doi:10.3389/fimmu.2014.00337 Cited in: PubMed; PMID 25101080.
16. Blazar BR, Taylor PA, Valleria DA. CD4+ and CD8+ T cells each can utilize a perforin-dependent pathway to mediate lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex-disparate recipients. *Transplantation*. 1997;64(4):571–6. doi:10.1097/00007890-199708270-00004 Cited in: PubMed; PMID 9293867.
17. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, Reichardt W, Karlsson FJ, Radhakrishnan SV, Hanke K, Schmitt-Graeff A, Freudenberg M, Loewenich FD v., Wolf P, Leonhardt F, Baxan N, Pfeifer D, Schmah O, Schönle A, Martin SF, Mertelsmann R, Duyster J, Finke J, Prinz M, Henneke P, Häcker H, Hildebrandt GC, Häcker G, Zeiser R. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med*. 2014;20(6):648–54. doi:10.1038/nm.3517 Cited in: PubMed; PMID 24836575.
18. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*. 1986;68(3):770–3. doi:10.1182/blood.V68.3.770.770
19. Cohen JL, Boyer O. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(5):580–5. doi:10.1016/j.coi.2006.07.007 Cited in: PubMed; PMID 16879951.
20. Prasad VK, Kernan NA, Heller G, O'Reilly RJ, Yang SY. DNA typing for HLA-A and HLA-B identifies disparities between patients and unrelated donors matched by HLA-A and HLA-B serology and HLA-DRB1. *Blood*. 1999;93(1):399–409. Cited in: PubMed; PMID 9864187.
21. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):371–80. doi:10.1038/nrc1365 Cited in: PubMed; PMID 15122208.

22. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1996;334(5):281–5. doi:10.1056/NEJM199602013340501 Cited in: PubMed; PMID 8532022.
23. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood.* 1990;76(8):1464–72. Cited in: PubMed; PMID 2207321.
24. Aslanian H, Chander B, Robert M, Cooper D, Proctor D, Seropian S, Jain D. Prospective evaluation of acute graft-versus-host disease. *Dig Dis Sci.* 2012;57(3):720–5. doi:10.1007/s10620-011-1938-x Cited in: PubMed; PMID 22011927.
25. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295–304. doi:10.1097/00007890-197410000-00001 Cited in: PubMed; PMID 4153799.
26. Schwartz JM, Wolford JL, Thornquist MD, Hockenbery DM, Murakami CS, Drennan F, Hinds M, Strasser SI, Lopez-Cubero SO, Brar HS, Ko CW, Saunders MD, Okolo CN, McDonald GB. Severe gastrointestinal bleeding after hematopoietic cell transplantation, 1987-1997: incidence, causes, and outcome. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(2):385–93. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03549.x Cited in: PubMed; PMID 11232680.
27. Weisdorf DJ, Snover DC, Haake R, Miller WJ, McGlave PB, Blazar B, Ramsay NK, Kersey JH, Filipovich A. Acute upper gastrointestinal graft-versus-host disease: clinical significance and response to immunosuppressive therapy. *Blood.* 1990;76(3):624–9. Cited in: PubMed; PMID 2378989.
28. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, Ordemann R, Qayed M, Renteria AS, Reshef R, Wöfl M, Chen Y-B, Goldstein S, Jagasia M, Locatelli F, Mielke S, Porter D, Schechter T, Shekhovtsova Z, Ferrara JLM, Levine JE. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(1):4–10. doi:10.1016/j.bbmt.2015.09.001 Cited in: PubMed; PMID 26386318.
29. Wakui M, Okamoto S, Ishida A, Kobayashi H, Watanabe R, Yajima T, Iwao Y, Hisamatsu T, Hibi T, Ikeda Y. Prospective evaluation for upper gastrointestinal tract acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(6):573–8. doi:10.1038/sj.bmt.1701613 Cited in: PubMed; PMID 10217188.
30. Cahn J-Y, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, Leblond V, Ifrah N, Jouet J-P, Loberiza F, Ringden O, Barrett AJ, Horowitz MM, Socié G. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood.* 2005;106(4):1495–500. doi:10.1182/blood-2004-11-4557 Cited in: PubMed; PMID 15878974.

31. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, Cahn JY, Calderwood S, Gratwohl A, Socié G, Abecasis MM, Sobocinski KA, Zhang MJ, Horowitz MM. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol.* 1997;97(4):855–64. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.1112925.x Cited in: PubMed; PMID 9217189.
32. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15(6):825–8. Cited in: PubMed; PMID 7581076.
33. Ross WA, Ghosh S, Dekovich AA, Liu S, Ayers GD, Cleary KR, Lee JH, Couriel D. Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(4):982–9. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01639.x Cited in: PubMed; PMID 18028511.
34. Shulman HM, Cardona DM, Greenson JK, Hingorani S, Horn T, Huber E, Kreft A, Longerich T, Morton T, Myerson D, Prieto VG, Rosenberg A, Treister N, Washington K, Ziemer M, Pavletic SZ, Lee SJ, Flowers MED, Schultz KR, Jagasia M, Martin PJ, Vogelsang GB, Kleiner DE. NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(4):589–603. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.031 Cited in: PubMed; PMID 25639770.
35. Kreft A, Hippe K, Wagner-Drouet EM, Ries I, Kandulski A, Büttner-Herold M, Neumann H, Weber D, Holler E, Schindeldecker M. An investigation of the diagnostic, predictive, and prognostic impacts of three colonic biopsy grading systems for acute graft versus host disease. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU); 2021. Online-Ressource. eng.
36. Levine JE, Huber E, Hammer STG, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Ferrara JLM, Holler E. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood.* 2013;122(8):1505–9. doi:10.1182/blood-2013-02-485813 Cited in: PubMed; PMID 23760615.
37. Lerner KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED. Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplant Proc.* 1974;6(4):367–71. Cited in: PubMed; PMID 4155153.
38. Melson J, Jakate S, Fung H, Arai S, Keshavarzian A. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Hematol.* 2007;82(10):881–6. doi:10.1002/ajh.20976 Cited in: PubMed; PMID 17570511.
39. Hartwell MJ, Özbek U, Holler E, Renteria AS, Major-Monfried H, Reddy P, Aziz M, Hogan WJ, Ayuk F, Efebera YA, Hexner EO, Bunworasate U, Qayed M, Ordemann R, Wöfl M, Mielke S, Pawarode A, Chen Y-B, Devine S, Harris AC, Jagasia M, Kitko CL, Litzow MR, Kröger N, Locatelli F, Morales G, Nakamura R, Reshef R, Rösler W, Weber D, Wudhikarn K, Yanik GA, Levine JE, Ferrara JL. An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI Insight.* 2017;2(3):e89798. doi:10.1172/jci.insight.89798 Cited in: PubMed; PMID 28194439.
40. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SWJ, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin

- A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;118(25):6702–8. doi:10.1182/blood-2011-08-375006 Cited in: PubMed; PMID 21979939.
41. Zhao D, Kim Y-H, Jeong S, Greenson JK, Chaudhry MS, Hoepting M, Anderson ER, van den Brink MR, Peled JU, Gomes AL, Slingerland AE, Donovan MJ, Harris AC, Levine JE, Ozbek U, Hooper LV, Stappenbeck TS, Ver Heul A, Liu T-C, Reddy P, Ferrara JL. Survival signal REG3 α prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest*;128(11):4970–9. doi:10.1172/JCI99261 Cited in: PubMed; PMID 30106382.
 42. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, Efebera YA, Hogan WJ, Wöfl M, Qayed M, Hexner EO, Wudhikarn K, Ordemann R, Young R, Shah J, Hartwell MJ, Chaudhry MS, Aziz M, Etra A, Yanik GA, Kröger N, Weber D, Chen Y-B, Nakamura R, Rösler W, Kitko CL, Harris AC, Pulsipher M, Reshef R, Kowalyk S, Morales G, Torres I, Özbek U, Ferrara JLM, Levine JE. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018;131(25):2846–55. doi:10.1182/blood-2018-01-822957 Cited in: PubMed; PMID 29545329.
 43. Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, Koestler J, Gessner A, Weber M, Hahn J, Wolff D, Stämmler F, Spang R, Herr W, Dettmer K, Holler E. Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood*. 2015;126(14):1723–8. doi:10.1182/blood-2015-04-638858 Cited in: PubMed; PMID 26209659.
 44. Farowski F, Els G, Tsakmaklis A, Higgins PG, Kahlert CR, Stein-Thoeringer CK, Bobardt JS, Dettmer-Wilde K, Oefner PJ, Vehreschild JJ, Vehreschild MJGT. Assessment of urinary 3-indoxyl sulfate as a marker for gut microbiota diversity and abundance of Clostridiales. *Gut Microbes*. 2019;10(2):133–41. doi:10.1080/19490976.2018.1502536 Cited in: PubMed; PMID 30118620.
 45. Kumari R, Palaniyandi S, Hildebrandt GC. Microbiome: An Emerging New Frontier in Graft-Versus-Host Disease. *Dig Dis Sci*. 2019;64(3):669–77. doi:10.1007/s10620-018-5369-9 Cited in: PubMed; PMID 30523482.
 46. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, Liu C, West ML, Singer NV, Equinda MJ, Gobourne A, Lipuma L, Young LF, Smith OM, Ghosh A, Hanash AM, Goldberg JD, Aoyama K, Blazar BR, Pamer EG, van den Brink MRM. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2012;209(5):903–11. doi:10.1084/jem.20112408 Cited in: PubMed; PMID 22547653.
 47. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, Littmann ER, Ling L, Gobourne AC, Miller LC, Docampo MD, Peled JU, Arpaia N, Cross JR, Peets TK, Lumish MA, Shono Y, Dudakov JA, Poeck H, Hanash AM, Barker JN, Perales M-A, Giralt SA, Pamer EG, van den Brink MRM. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(8):1373–83. doi:10.1016/j.bbmt.2015.04.016 Cited in: PubMed; PMID 25977230.
 48. Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, No D, Gobourne A, Viale A, Dahi PB, Ponce DM, Barker JN, Giralt S, van den Brink M, Pamer EG. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*.

- 2014;124(7):1174–82. doi:10.1182/blood-2014-02-554725 Cited in: PubMed; PMID 24939656.
49. van Lier YF, Davids M, Haverkate NJE, Groot PF de, Donker ML, Meijer E, Heubel-Moenen FCJI, Nur E, Zeerleder SS, Nieuwdorp M, Blom B, Hazenberg MD. Donor fecal microbiota transplantation ameliorates intestinal graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Sci Transl Med*. 2020;12(556). doi:10.1126/scitranslmed.aaz8926 Cited in: PubMed; PMID 32801142.
50. Henig I, Yehudai-Ofir D, Zuckerman T. The clinical role of the gut microbiome and fecal microbiota transplantation in allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2021;106(4):933–46. doi:10.3324/haematol.2020.247395 Cited in: PubMed; PMID 33241674.
51. Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Storb R. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):512–20. doi:10.1053/bbmt.2002.v8.pm12374456 Cited in: PubMed; PMID 12374456.
52. Kamboj M, Chung D, Seo SK, Pamer EG, Sepkowitz KA, Jakubowski AA, Papanicolaou G. The changing epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(11):1576–81. doi:10.1016/j.bbmt.2010.05.008 Cited in: PubMed; PMID 20685257.
53. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. 3rd ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010. XI, 596 S. ger.
54. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, editors. *Physiologie*. 6th ed. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2013. Online-Ressource. ger.
55. Lycke NY, Bemark M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunol*. 2017;10(6):1361–74. doi:10.1038/mi.2017.62 Cited in: PubMed; PMID 28745325.
56. Mulisch M. *Verfahren der Immunlokalisation: Ein Überblick*. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2014. VIII, 47 S. (Essentials). ger.
57. Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:243–73. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101314 Cited in: PubMed; PMID 20192805.
58. Tezuka H, Ohteki T. Regulation of IgA Production by Intestinal Dendritic Cells and Related Cells. *Front Immunol*. 2019;10:1891. doi:10.3389/fimmu.2019.01891 Cited in: PubMed; PMID 31456802.
59. Brandtzaeg P, Johansen F-E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev*. 2005;206:32–63. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x Cited in: PubMed; PMID 16048541.
60. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2014. XXVI, 1093 Seiten. (Lehrbuch). ger.
61. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(2):149–57. doi:10.1016/j.coi.2008.03.014 Cited in: PubMed; PMID 18434123.

62. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004;197:179–91. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0109.x Cited in: PubMed; PMID 14962195.
63. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):160–71. doi:10.1038/nri3795 Cited in: PubMed; PMID 25698678.
64. Pabst O, Slack E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunol.* 2019;13(1):12–21. doi:10.1038/s41385-019-0227-4 Cited in: PubMed; PMID 31740744.
65. Scheeren FA, Nagasawa M, Weijer K, Cupedo T, Kirberg J, Legrand N, Spits H. T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *J Exp Med.* 2008;205(9):2033–42. doi:10.1084/jem.20070447 Cited in: PubMed; PMID 18695003.
66. Vinuesa CG de, Cook MC, Ball J, Drew M, Sunners Y, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, MacLennan IC. Germinal centers without T cells. *J Exp Med.* 2000;191(3):485–94. doi:10.1084/jem.191.3.485 Cited in: PubMed; PMID 10662794.
67. Lécuyer E, Rakotobe S, Lengliné-Garnier H, Lebreton C, Picard M, Juste C, Fritzen R, Eberl G, McCoy KD, Macpherson AJ, Reynaud C-A, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity.* 2014;40(4):608–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.009 Cited in: PubMed; PMID 24745335.
68. MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, Serre K, Sze DM-Y, Zúñiga E, Cook MC, Vinuesa CG. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev.* 2003;194:8–18. doi:10.1034/j.1600-065x.2003.00058.x Cited in: PubMed; PMID 12846803.
69. Bergqvist P, Stensson A, Lycke NY, Bemark M. T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *J Immunol.* 2010;184(7):3545–53. doi:10.4049/jimmunol.0901895 Cited in: PubMed; PMID 20207993.
70. Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dörner T. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood.* 2009;113(11):2461–9. doi:10.1182/blood-2008-04-153544 Cited in: PubMed; PMID 18987362.
71. Keppler SJ, Goess MC, Heinze JM. The Wanderings of Gut-Derived IgA Plasma Cells: Impact on Systemic Immune Responses. *Front Immunol.* 2021;12:670290. doi:10.3389/fimmu.2021.670290 Cited in: PubMed; PMID 33936114.
72. Rojas OL, Pröbstel A-K, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, Lee DSW, Galicia G, Ramaglia V, Ward LA, Leung LYT, Najafi G, Khaleghi K, Garcillán B, Li A, Besla R, Naouar I, Cao EY, Chiaranunt P, Burrows K, Robinson HG, Allanach JR, Yam J, Luck H, Campbell DJ, Allman D, Brooks DG, Tomura M, Baumann R, Zamvil SS, Bar-Or A, Horwitz MS, Winer DA, Mortha A, Mackay F, Prat A, Osborne LC, Robbins C, Baranzini SE, Gommerman JL. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell.* 2019;177(2):492–3. doi:10.1016/j.cell.2019.03.037 Cited in: PubMed; PMID 30951673.
73. Wilmore JR, Gaudette BT, Gomez Atria D, Hashemi T, Jones DD, Gardner CA, Cole SD, Misisic AM, Beiting DP, Allman D. Commensal Microbes Induce Serum

- IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis. *Cell Host Microbe*. 2018;23(3):302-311.e3. doi:10.1016/j.chom.2018.01.005 Cited in: PubMed; PMID 29478774.
74. Hand TW, Reboldi A. Production and Function of Immunoglobulin A. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:695–718. doi:10.1146/annurev-immunol-102119-074236 Cited in: PubMed; PMID 33646857.
 75. Hughes GJ, Reason AJ, Savoy L-A, Jaton J-C, Frutiger-Hughes S. Carbohydrate moieties in human secretory component. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999;1434(1):86–93. doi:10.1016/S0167-4838(99)00168-5
 76. Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, van Gijlswijk-Janssen D, Redwan E-RM, Wilson IA, Daha MR, Dwek RA, Rudd PM. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20140–53. doi:10.1074/jbc.M301436200 Cited in: PubMed; PMID 12637583.
 77. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, Akira S, Ohteki T. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*. 2007;448(7156):929–33. doi:10.1038/nature06033 Cited in: PubMed; PMID 17713535.
 78. Wu W, Sun M, Chen F, Cao AT, Liu H, Zhao Y, Huang X, Xiao Y, Yao S, Zhao Q, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol*. 2017;10(4):946–56. doi:10.1038/mi.2016.114 Cited in: PubMed; PMID 27966553.
 79. Mathias A, Corthésy B. N-Glycans on secretory component: mediators of the interaction between secretory IgA and gram-positive commensals sustaining intestinal homeostasis. *Gut Microbes*. 2011;2(5):287–93. doi:10.4161/gmic.2.5.18269 Cited in: PubMed; PMID 22067937.
 80. Bunker JJ, Erickson SA, Flynn TM, Henry C, Koval JC, Meisel M, Jabri B, Antonopoulos DA, Wilson PC, Bendelac A. Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science*. 2017;358(6361). doi:10.1126/science.aan6619 Cited in: PubMed; PMID 28971969.
 81. Tsuruta T, Inoue R, Iwanaga T, Hara H, Yajima T. Development of a method for the identification of S-IgA-coated bacterial composition in mouse and human feces. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(5):968–73. doi:10.1271/bbb.90801 Cited in: PubMed; PMID 20460734.
 82. Palm NW, Zoete MR de, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao L, Degnan PH, Hu J, Peter I, Zhang W, Ruggiero E, Cho JH, Goodman AL, Flavell RA. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2014;158(5):1000–10. doi:10.1016/j.cell.2014.08.006. Cited in: PubMed; PMID 25171403.
 83. Briiliūtė J, Urbanowicz PA, Luis AS, Baslé A, Paterson N, Rebello O, Hendel J, Ndeh DA, Lowe EC, Martens EC, Spencer DIR, Bolam DN, Crouch LI. Complex N-glycan breakdown by gut *Bacteroides* involves an extensive enzymatic apparatus encoded by multiple co-regulated genetic loci. *Nat Microbiol*. 2019;4(9):1571–81. doi:10.1038/s41564-019-0466-x Cited in: PubMed; PMID 31160824.
 84. Silva HD de, Ffrench RA, Korem M, Orłowski E, Curtis DJ, Spencer A, Avery S, Patil S, Morrissey CO. Contemporary analysis of functional immune recovery to

- opportunistic and vaccine-preventable infections after allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. *Clin Transl Immunology*. 2018;7(10). doi:10.1002/cti2.1040 Cited in: PubMed; PMID 30323928.
85. Beschorner WE, Yardley JH, Tutschka PJ, Santos GW. Deficiency of intestinal immunity with graft-vs.-host disease in humans. *J Infect Dis*. 1981;144(1):38–46. doi:10.1093/infdis/144.1.38 Cited in: PubMed; PMID 7021700.
86. Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. Online-Ressource. ger.
87. Boenisch T, Henne C, editors. *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Hamburg; 2003. 88 p. ger.
88. Dako Denmark A/S. Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA: Code A0262; 2018.
89. Ventana Medical Systems, Inc. OptiView DAB IHC Detection Kit; 2011.
90. Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, Kanamori H, Ishigatsubo Y. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(12):1275–81. doi:10.1038/sj.bmt.1703056 Cited in: PubMed; PMID 11548845.
91. Izutsu KT, Sullivan KM, Schubert MM, Truelove EL, Shulman HM, Sale GE, Morton TH, Rice JC, Witherspoon RP, Storb R, Thomas ED. Disordered salivary immunoglobulin secretion and sodium transport in human chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1983;35(5):441–6. doi:10.1097/00007890-198305000-00010 Cited in: PubMed; PMID 6342224.
92. Mailhe M, Ricaboni D, Vitton V, Gonzalez J-M, Bachar D, Dubourg G, Cadoret F, Robert C, Delerce J, Levasseur A, Fournier P-E, Angelakis E, Lagier J-C, Raoult D. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. *BMC Microbiology*. 2018;18(1):1–11. doi:10.1186/s12866-018-1304-7
93. Yip RHL, Naso JR, Yang H-M. Terminal ileum is the most sensitive site for the histologic diagnosis of grade 4 graft-versus-host disease (GvHD) in the lower GI tract and is a harbinger of poor outcome. *Virchows Archiv*. 2021;1–7. doi:10.1007/s00428-021-03136-z
94. Pereira MR, Pouch SM, Scully B. Infections in Allogeneic Stem Cell Transplantation. In: Safdar A, editor. *Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases*. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 209–26.
95. Podgorny PJ, Pratt LM, Liu Y, Dharmani-Khan P, Luider J, Auer-Grzesiak I, Mansoor A, Williamson TS, Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Khan FM, Larratt L, Jimenez-Zepeda VH, Stewart DA, Russell JA, Daly A, Storek J. Low Counts of B Cells, Natural Killer Cells, Monocytes, Dendritic Cells, Basophils, and Eosinophils are Associated with Postengraftment Infections after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):37–46. doi:10.1016/j.bbmt.2015.09.003 Cited in: PubMed; PMID 26363444.
96. Corthésy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmun Rev*. 2013;12(6):661–5. doi:10.1016/j.autrev.2012.10.012 Cited in: PubMed; PMID 23201924.
97. Bader P, Kreyenberg H, Stackelberg A v., Eckert C, Salzmänn-Manrique E, Meisel R, Poetschger U, Stachel D, Schrappe M, Alten J, Schrauder A, Schulz A, Lang P, Müller I, Albert MH, Willasch AM, Klingebiel TE, Peters C. Monitoring

- of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. *J Clin Oncol.* 2015;33(11):1275–84. doi:10.1200/JCO.2014.58.4631 Cited in: PubMed; PMID 25605857.
98. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005;35(2):107–19. doi:10.1038/sj.bmt.1704715 Cited in: PubMed; PMID 15502849.
99. Fehse B, Chukhlovin A, Kühlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, Krüger W, Zabelina T, Dudina O, Finckenstein FG, Kröger N, Kabisch H, Hochhaus A, Zander AR. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10(3):419–25. doi:10.1089/152581601750289028 Cited in: PubMed; PMID 11454317.
100. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, Kremens B, Dilloo D, Sykora K-W, Schrappe M, Niemeyer C, Stackelberg A v., Gruhn B, Henze G, Greil J, Niethammer D, Dietz K, Beck JF, Klingebiel T. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1696–705. doi:10.1200/JCO.2004.05.198 Cited in: PubMed; PMID 15117992.
101. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SWJ, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2011;118(25):6702–8. doi:10.1182/blood-2011-08-375006 Cited in: PubMed; PMID 21979939.
102. DePriest BP, Li H, Bidgoli A, Onstad L, Couriel DR, Lee SJ, Paczesny S. Regenerating Islet-Derived 3-alpha is a Prognostic Biomarker for Gastrointestinal Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Blood Adv.* 2022. doi:10.1182/bloodadvances.2021005420 Cited in: PubMed; PMID 35030629.
103. Kreft A, Mottok A, Mesteri I, Cardona DM, Janin A, Kühl AA, Andrulis M, Brunner A, Shulman HM, Negri G, Tzankov A, Huber E. Consensus diagnostic histopathological criteria for acute gastrointestinal graft versus host disease improve interobserver reproducibility. *Virchows Archiv.* 2015;467(3):255–63. doi:10.1007/s00428-015-1803-y Cited in: PubMed; PMID 26164839.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. med. Ernst Holler und bei Fr. Dr. Katrin Hippe bedanken, welche mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben. Danke für die zahlreichen Ratschläge und für die zuverlässige Unterstützung bis zum Abschluss!

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem pathologischen Institut sowie aus der Arbeitsgruppe im Biopark für das geteilte Wissen und die ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank geht an Fr. Doris Gaag aus dem Institut für Pathologie für die sehr gute und geduldige Einführung in die faszinierende Praxis der Immunhistochemie.

Der Erstellungsprozess der Doktorarbeit hat viel Zeit und Energie gekostet. Deswegen möchte ich mich bei allen Familienmitgliedern, Freunden und Bekannten für ihr Verständnis in dieser Phase bedanken. Wenn ich zu tief in die Medizinwelt abtauche, finde ich am Ende dank euch immer wieder den Weg zurück zur richtigen Balance!

Ich bedanke mich bei meiner gesamten Familie für all die aufbauenden Worte während der Zeit meines Studiums und den unbezahlbaren Zusammenhalt. Besonders dankbar bin ich für meine Oma Marianne Müller, welche mit ihren nun fast 93 Jahren ein großes Vorbild für mich ist. Genauso dankbar bin ich für meinen Onkel Peter Müller, den zuverlässigsten Menschen, den ich kenne.

Zu guter Letzt möchte ich diese Arbeit meinen Eltern Sabine und Gerhard Scheidler widmen, welche mir in allen Lebenslagen und bei allen Plänen mit Rat und Tat zur Seite stehen – meine Mutter mit ihrem herzlichen Lachen und mein Vater mit seinem außergewöhnlichen Intellekt. Vielen Dank für eure bedingungslose Unterstützung von Anfang an!

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Lucia Scheidler
Geburtsdatum: 19.08.1998

Ausbildung

Oktober 2017 – November 2023 Humanmedizin, Universität Regensburg
September 2009 – Juli 2017 Gymnasium Neutraubling
September 2005 – Juli 2009 Grundschule Sünching

Förderung

Oktober 2017 – März 2023 Stipendiatin des Max Weber-Programms (MWP) des Freistaats Bayern

Publikationen

Scheidler L, Hippe K, Ghimire S, Weber D, Weber M, Meedt E, Hoffmann P, Lehn P, Burkhardt R, Mamilos A, Edinger M, Wolff D, Poeck H, Evert M, Gessner A, Herr W, Holler E. Intestinal IgA-positive plasma cells are highly sensitive indicators of alloreaction early after allogeneic transplantation and associate with both graft-versus-host disease and relapse-related mortality. *Haematologica*. 2023 Nov 1;108(11):2993-3000. doi: 10.3324/haematol.2022.282188. PMID: 37259539; PMCID: PMC10620570.

Scheidler L, Ramdohr M, Fleck M, Ehrenstein B. Von der Kindheit eingeholt – schwanenhalsartige Deformitäten ohne Erosionen. Deutscher Rheumatologiekongress 2023, 51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Leipzig, 30.08.-02.09.2023. doi: 10.3205/23dgrh082.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 13.02.2024

Lucia Scheidler