

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

(Department) Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,  
Rheumatologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Immunrekonstitution nach haploidenter  
hämatopoetischer Stammzelltransplantation:  
Einfluss eines CD3/CD19 depletierten gegenüber einem  
CD34 selektionierten Transplantat**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Matthias Hägele

aus

Tübingen

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. W. Bethge

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. Dipl.-Biochem. I. Müller

*Meinen Eltern und meiner Frau*

*in Liebe und Dankbarkeit*

*gewidmet*

**"In einem Zeitalter, wo man Früchte oft vor der Blüte erwartet und vieles  
darum zu verachten scheint, weil es nicht unmittelbar Wunden heilt,  
den Acker düngt, oder Mühlräder treibt, ... vergisst man, dass  
Wissenschaften einen inneren Zweck haben und verliert das  
eigentlich literarische Interesse, das Streben nach Erkenntnis,  
als Erkenntnis, aus dem Auge."**

*Alexander von Humboldt (1769-1859)*

*"Über die Freiheit des Menschen. Auf der Suche nach Wahrheit"*

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Hämatopoetische Stammzellen.....	1
1.2 Maligne hämatologische Erkrankungen .....	2
1.3 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen .....	4
1.4 Transplantationsbarrieren .....	7
1.4.1 Das HLA-System.....	7
1.4.2 Der T-Zell Rezeptor.....	9
1.4.3 HLA-System und Alloreaktivität.....	10
1.5 Dosisreduzierte Konditionierung.....	13
1.6 Haploidente allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	14
1.7 Die Rolle der natürlichen Killerzellen bei der haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantation .....	16
1.8 Immunrestitution nach allogener haploidenter Stammzelltransplantation ....	20
1.9 Fragestellung .....	23
2. Material und Methoden .....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Verwendete Geräte, Glas- und Plastikmaterialien.....	24
2.1.2 Verwendete Materialien für die Durchflusszytometrie .....	24
2.1.2.1 Verwendete Antikörper zur Untersuchung des V $\beta$ T-Zell-Rezeptor- Repertoires.....	25
2.1.2.2 Verwendete Antikörper zur Untersuchung des Rezeptor Repertoires von natürlichen Killerzellen .....	26
2.1.2.3 Verwendete Antikörper zur Untersuchung der Immunrestitution....	26
2.1.3 Material für die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen.....	27
2.1.4 Material für Zellzählung, Gefrier Aufbewahrung und Auftauen der Zellen ...	27
2.1.5 Liste der Firmenadressen.....	28
2.2 Patienten .....	29
2.2.1 Patientendaten und Einschlusskriterien .....	29
2.3 Methoden .....	29
2.3.1 Leukapherese .....	29
2.3.2 CD3/CD19 Depletion und CD34 Selektion .....	30
2.3.3 Konditionierung.....	31
2.3.4 Evaluation des Engraftments, des Chimärismus, der Immunrestitution und von Spender Lymphozyten Infusionen.....	32
2.3.5 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen.....	32
2.3.6 Gefrier Aufbewahrung der Zellen .....	33
2.3.7 Auftauen der Zellen .....	33
2.3.8 Durchflusszytometrie.....	34
2.3.9 Messen der Proben .....	36
2.3.10 Durchflusszytometrische Untersuchung des TCR-V $\beta$ - Repertoires.....	36
2.3.11 Durchflusszytometrische Untersuchung des NK-Zell-Rezeptor-Repertoires .....	37
2.3.12 Auswertung der Durchflusszytometrie.....	38
2.3.13 Statistische Auswertung .....	38
3. Ergebnisse.....	41

3.1 CD3/CD19 depletierte Gruppe .....	41
3.2 Hämatopoetische Rekonstitution .....	42
3.2.1 Thrombozyten.....	43
3.2.2 Neutrophile Granulozyten .....	43
3.2.3 Chimärismus .....	44
3.3 Immunrekonstitution und Funktion .....	45
3.3.1 Rekonstitution der natürlichen Killerzellen.....	45
3.3.1.1 Rekonstitution der CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>dim</sup> Subfamilien der natürlichen Killerzellen in der CD3/19 Gruppe .....	47
3.3.2 Rekonstitution des Rezeptor-Repertoires natürlicher Killerzellen nach CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation ....	49
3.3.2.1 Aktivierende natürliche Killerzell-Rezeptoren.....	49
3.3.2.1.1 Natürliche zytotoxische Rezeptoren.....	50
3.3.2.1.2 NKG2D Rezeptoren .....	52
3.3.2.2 Inhibierende natürliche Killerzell-Rezeptoren .....	54
3.3.2.2.1 HLA-Klasse-I-inhibitorische Rezeptoren .....	54
3.3.2.2.2 Nicht HLA-Klasse-I-inhibitorische-Rezeptoren.....	58
3.3.3 B-Zell Rekonstitution .....	59
3.3.4 T-Zell Rekonstitution .....	61
3.3.4.1 Rekonstitution der CD4+ T-Lymphozyten CD45 Isoformen in der CD3/19 depletierten Gruppe.....	63
3.3.5 TCR-V $\beta$ -Repertoire Entwicklung bei CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation .....	64
3.3.5.1 TCR-Repertoire Patient #1 .....	66
3.3.5.2 TCR-Repertoire Patient #2 .....	67
3.3.5.3 TCR-Repertoire Patient #3 .....	68
3.3.5.4 TCR-Repertoire Patient #4 .....	69
3.3.5.5 TCR-Repertoire Patient #5 .....	70
3.3.5.6 TCR-Repertoire Patient #6 .....	71
3.3.5.7 TCR-Repertoire Patient #7 .....	72
3.3.5.8 Die Entwicklung des TCR-Repertoires in der Übersicht .....	73
3.4 Infektionen und GvH-Reaktionen .....	75
3.5 Vergleich einer historischen CD34 selektiert transplantierten Gruppe mit der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe .....	76
3.5.1 Transplantat-Zusammensetzung bei CD34 selektionierter im Vergleich zu CD3/19 depletierter Stammzelltransplantation. ....	77
3.5.2 Vergleich der hämatopoetischen Rekonstitution.....	78
3.5.2.1 Vergleich der Rekonstitution der Thrombozyten .....	78
3.5.2.2 Vergleich der Rekonstitution der Neutrophile Granulozyten.....	78
3.5.2.3 Vergleich des Chimärismus.....	79
3.5.2.4 Vergleich der Transfusionsbedürftigkeit.....	80
3.5.3 Immunrekonstitution und Funktion .....	83
3.5.3.1 Vergleich der Rekonstitution der Natürliche Killerzellen.....	83
3.5.3.2 Vergleich der Rekonstitution der B-Zellen .....	85
3.5.3.3 Vergleich der Rekonstitution der T-Zellen.....	88
3.5.4 Vergleich der Infektionen und GvH-Reaktionen.....	92
4. Diskussion .....	94
4.1 Hämatopoetische Rekonstitution.....	95

4.2 Immunrekonstitution und beeinflussende Faktoren .....	99
4.2.1 Rekonstitution der natürlichen Killerzellen.....	102
4.2.1.1 Rekonstitution der natürlichen Killerzell-Rezeptoren nach CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	108
4.2.2 B-Zell Rekonstitution .....	113
4.2.3 T-Zell Rekonstitution .....	115
4.2.3.1 Rekonstitution des T-Zell-Rezeptorrepertoires nach CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation .....	118
4.3 Infektionen und GvH-Reaktionen .....	123
4.4 Schlussfolgerung .....	127
5. Zusammenfassung .....	128
Literaturverzeichnis .....	I

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen Presenting Cells (=Antigen präsentierende Zellen)
CD	Cluster of Differentiation (immunphänotypischer Oberflächenmarker auf Leukozyten)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescent-activated cell sorting (=Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter (=Vorwärtsstreulicht)
g	Mittlere Erdschwerebeschleunigung
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (= Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)
GMP	Good manufacturing practice (= Richtlinie zur Qualitätssicherung)
GvH	Graft versus host (=Transplantat Gegen Wirt)
GvL	Graft versus leukemia (=Transplantat Gegen Leukämie)
GvT	Graft versus tumor (=Transplantat Gegen Tumor)
HDC	High Dose Chemotherapy (=Hochdosis Chemotherapie)
HLA	Human Leukocyte Antigen (=Humanes Leukozyten Antigen)
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
HvG	Host versus Graft (=Spender Gegen Transplantat Reaktion)
Ig	Immunglobulin
kD	Kilo Dalton
KIR	Killer Cell Immunoglobuline-like Receptor (Rezeptoren auf der Oberfläche von NK-Zellen)
MHC	Major Histocompatibility Complex (=Haupthistokompatibilitätskomplex)
MM	Multiples Myelom
NHL	Non Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline (=Natriumphosphatpuffer)
PBSCT	Peripheral Blood Stem Cell Transplant (=Periphere Blutstammzelltransplantation)
RIC	Reduced intensity conditioning (=Dosis reduzierte Konditionierung)
SSC	Side Scatter (=Seitwärtsstreulicht)
STR	Short tandem repeats
TCR	T-Cell-Receptor (=T-Zell-Rezeptor)



# 1. Einleitung

## ***1.1 Hämatopoetische Stammzellen***

Die menschliche Hämatopoese ist hierarchisch aufgebaut und findet nach der Geburt hauptsächlich im Knochenmark statt. Alle Zellen des peripheren Blutes stammen von undeterminierten, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Diese Zellpopulation behält lebenslang die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ist jedoch wenig teilungsaktiv. Kommt es zur Teilung einer Stammzelle, so entwickelt sich nur eine Tochterzelle weiter, während die andere im Stammzellvorrat verbleibt. Da einer solchen Tochterzelle mehrere Differenzierungswege offen stehen, werden diese Stammzellen als pluripotent bezeichnet (Abbildung 1).

Fast allen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ist gemein, dass sie dasselbe membranständige Glykoprotein auf ihrer Oberfläche tragen. Es handelt sich um das 116 kiloDalton schwere CD34-Antigen, dem eine wichtige Funktion in der Hämatopoese zugeschrieben wird. Dieses gemeinsame Oberflächenmolekül kann für therapeutische Zwecke genutzt werden, um zum Beispiel Stammzellen gezielt zu isolieren und anzureichern. Es gibt jedoch auch CD34 negative hämatopoetische Stammzellen, die weitere klinische und diagnostische Möglichkeiten eröffnen [4].

Diese Stammzellen sind beim erwachsenen Menschen im Knochenmark lokalisiert und bilden den Ausgangspunkt für alle myeloischen, lymphatischen, megakaryozytären und erythrozytären Zellreihen. Die zellulären Vorgänge bei der Hämatopoese lassen sich in Proliferation und Differenzierung gliedern. Die Zellen des Knochenmark-Stromas stellen ein geeignetes Mikromillieu für die Hämatopoese sicher. Bei diesen Zellen handelt es sich um fibroblastische Retikulumzellen, um lipidbeladene Retikulumzellen, um Makrophagen und um Zellen des Sinusendothels. Durch Interaktion der hämatopoetischen Stammzellen mit diesen Stromazellen, wird die regelrechte Proliferation und Differenzierung der Stammzellen beeinflusst und durch Zytokine und andere Faktoren angeregt und reguliert [38].

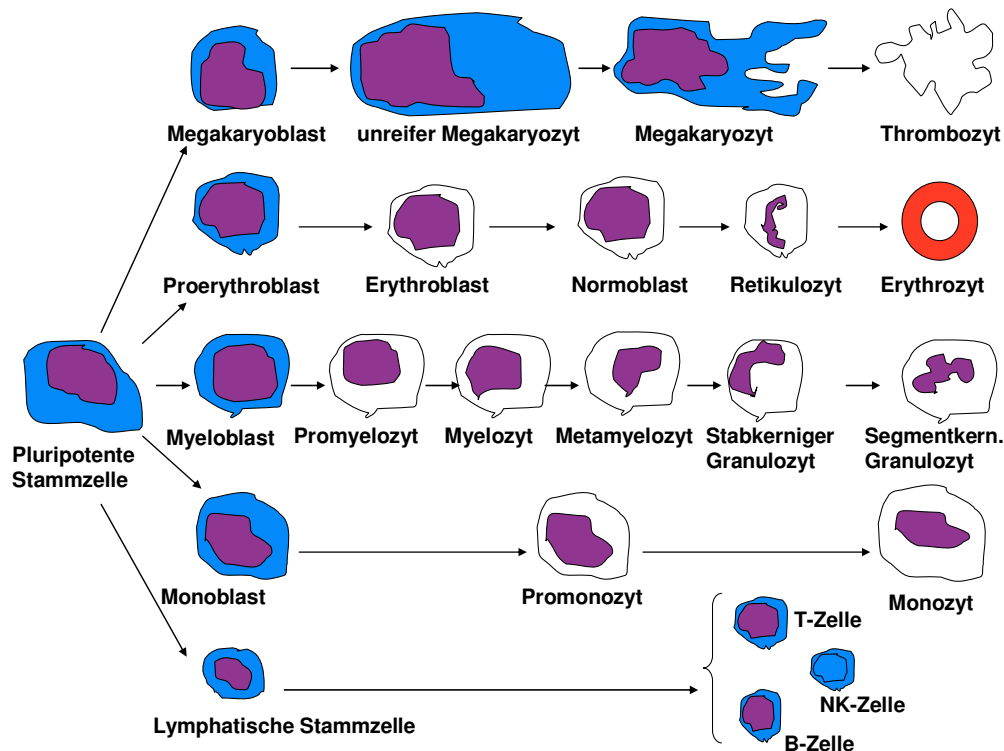


Abbildung 1; Schematische Darstellung der Entwicklung der hämatopoetischen Zellen aus pluripotenten Stammzellen

## 1.2 Maligne hämatologische Erkrankungen

Unter einer malignen hämatologischen Erkrankung versteht man eine durch maligne Transformation hämatopoetischer Zellen entstandene Funktionsstörung des blutbildenden Systems. Als maligne Transformation bezeichnet man den Übergang von normalen, in ihrem Wachstum kontrollierten Zellen zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen. Diese maligne Entartung kann Zellen aller Zellreihen von frühen Stammzellen bis zu differenzierten Zellen betreffen.

Zur Entstehung von Tumorzellen gibt es unterschiedliche Erklärungsversuche. Das wohl plausibelste Modell ist die bereits 1976 von Peter C. Nowell aufgestellte und bis heute gültige Mehrschritthypothese der Tumorentstehung.

Die Karzinogenese wird hier nicht als singuläres Ereignis, sondern als ein in mehreren Schritten ablaufender Prozess beschrieben. Die so genannte monoklonale Entwicklungstheorie legt diesem Prozess die Transformation einer einzigen Zelle zugrunde. Durch Proliferation dieser Zelle werden schließlich alle normalen Zellen durch Tumorzellen ersetzt [107]. Damit sich aus einer geschädigten Zelle eine Tumorzelle entwickelt, muss bei dieser eine Störung im gene-

tischen Programm vorliegen. Neben den Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, spielen Gene zur Regulierung von Apoptose und Telomerase sowie DNA-Reparaturgene eine wichtige Rolle bei der physiologischen Zellproliferation und -differenzierung. Wird die genetische Information einer Zelle verändert, sei es durch Amplifikation, chromosomale Translokation, Punktmutation, Integration einer primär nicht onkogenen Sequenz oder Deregulierung der Onkogenexpression, kann dies zu einer Überaktivierung oder Mutation von Onkogenen und/oder zu einer Inaktivierung oder Suppression von Tumorsuppressorgenen führen. Die daraus resultierende Wachstumsstimulation beziehungsweise fehlende negative Regulation kann einen deregulierten Wachstum- oder Differenzierungsprozess auslösen. Es entwickelt sich eine zunehmende Tumorzellheterogenität, die auf die genetische Instabilität der Tumorzellen zurückzuführen ist. Diese Heterogenität kann für Tumoren von Vorteil sein, um die körpereigene Tumorabwehr zu umgehen und der zytostatischen Therapie zu entgehen [23].

Als mögliche Auslöser maligner hämatologischer Erkrankungen werden ionisierende Strahlung, Zytostatika, verschiedene chemische Substanzen (z.B. Benzol) und in seltenen Fällen auch virale Faktoren, wie bei der durch das Humane T-lymphotrope Virus (HTLV)-I und HTLV-II-Viren ausgelösten T-Zellleukämie, angesehen. Darüber hinaus sind einige erbliche Erkrankungen mit einem erhöhten Leukämie beziehungsweise Lymphomrisiko verbunden, darunter unter anderem das Down-Syndrom und die Fanconi-Anämie [49]. In den meisten Fällen bleiben die Ursachen der Erkrankung jedoch unbekannt.

Betrifft diese maligne Entartung das hämatopoetische System, wird die normale Hämatopoese verdrängt und unterdrückt - mit entsprechender Beeinträchtigung der Blutbildung und der Immunabwehr. Je nach Differenzierungsgrad der entarteten Zellen in der Entwicklung aus der hämatopoetischen Stammzelle, zeigen sich Unterschiede der Erkrankungen in Klinik, Epidemiologie, Verlauf und Prognose. Hierbei unterscheidet man je nach betroffener Entwicklungsbahn der Hämatopoese die Erkrankungen des myeloischen und lymphatischen Systems. Die Erkrankungen der myeloischen Zellreihe lassen sich weiter untergliedern in die chronischen myeloproliferativen Erkrankungen und die akuten myeloischen

Leukämien. Bei den Erkrankungen des lymphatischen Systems lassen sich akute lymphoblastische und chronische lymphatische Leukämien, die Lymphomkrankungen sowie Plasmozytome und Haarzelleukämien differenzieren.

Die Gesamtzahl der jährlich auftretenden Krebsneuerkrankungen wird in Deutschland auf rund 400.000 Erkrankungen geschätzt. Davon erkranken jährlich rund 10.250 Menschen an Leukämie, darunter ca. 5.500 Männer und 4.750 Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 60 und für Frauen bei 65 Jahren. Leukämien finden sich damit auf Platz 11 in der Liste der häufigsten Krebsarten in Deutschland. Mit höherem Lebensalter geht ein Anstieg der Inzidenz einher [40].

### **1.3 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen**

Für eine Vielzahl von fortgeschrittenen hämatologischen Erkrankungen stellt eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) die einzige kurative Therapieoption dar (Tabelle 1). Da es sich bei allen hämatologischen malignen Erkrankungen letztlich um eine Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen handelt, bietet eine HSZT die Möglichkeit des Austausches des erkrankten Zellsystems und durch die Bereitstellung eines neuen Immunsystems gleichzeitig eine sehr effektive Immuntherapie gegenüber der malignen Erkrankung. Dieser immuntherapeutische Effekt wird als Transplantat Gegen Tumor (GvT) Effekt bezeichnet.

**Tabelle 1; Hämatologische Erkrankungen, die mit allogener Blutstammzelltransplantation behandelt werden aus [127]**

- |                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| - Akute myeloische Leukämie       | - Akute lymphoblastische Leukämie |
| - Chronisch myeloische Leukämie   | - Myelodysplastisches Syndrom     |
| - Myeloproliferative Erkrankungen | - Non-Hodgkin-Lymphom             |
| - Hodgkin-Lymphom                 | - Chronisch lymphatische Leukämie |
| - Multiples Myelom                |                                   |

Das Behandlungskonzept der allogenen HSZT basiert letztlich auf den traurigen Erfahrungen der Atombombenabwürfe am Ende des Zweiten Weltkrieges, als man beobachtete, dass radioaktive Strahlung die Knochenmarksfunktion zerstörte. Schon kurze Zeit später wurde in den 50er Jahren des letzten

Jahrhunderts die Theorie der HSZT diskutiert und in Tiermodellen getestet [69]. 1951 konnte erstmals gezeigt werden, dass Mäuse, die einer letalen Ganzkörperstrahlung ausgesetzt wurden, durch die Transplantation von Knochenmarkzellen eines anderen Tieres erfolgreich vor einer tödlichen Aplasie des Knochenmarks geschützt werden können [84].

Die ersten erfolgreichen Transplantationen von humanen hämatopoetischen Stammzellen fanden zu Beginn der 1970er Jahre in Seattle statt [145]. Im Jahre 1990 erhielt Edward Donnall Thomas gemeinsam mit Joseph Edward Murray den Nobelpreis für Medizin „für ihre Einführung der Methode der Übertragung von Gewebe und Organen als klinische Behandlungspraxis in die Humanmedizin“.

An der Universitätsklinik Tübingen werden seit 1976 Knochenmarktransplantationen durchgeführt und 1986 fand die erste Fremdspendertransplantation Deutschlands in Tübingen statt.

Das Prinzip der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen besteht in der Transfusion einer Suspension gesunder Knochenmarkzellen oder entsprechend mobilisierter Blutstammzellen, nach Zerstörung des blutbildenden Systems der Empfänger durch eine aggressive Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung (Konditionierung) [30]. Ausgehend von der immungenetischen Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger unterscheidet man zwischen allogener (immungenetisch fremd), syngener (immungenetisch identisch) und autologer (Reinfusion von eigenen Blutstammzellen) Transplantation. Xenotransplantation (fremde Spezies) spielt in der Hämatologie bisher keine Rolle.

Initial wurden die Stammzellen direkt aus dem Knochenmark gewonnen. Ende der 1980er Jahren entwickelte man durch die Einführung hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (G-CSF) Techniken, Stammzellen auch aus dem peripheren Blut zu gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von G-CSF die Bildung sowie die Mobilisierung der CD34 positiven Progenitorzellen unterstützt und verstärkt [53]. Die G-CSF Gabe vor der Stammzellspende führt zu

einer Erhöhung der im peripheren Blut zirkulierenden Stammzellen, die dann mittels Leukapherese gesammelt werden können [25]. Das Ziel, ist ein möglichst CD34-zellreiches Transplantat mit mehr als  $3 \times 10^6$  CD34+-Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers zu erhalten. Im Vergleich zu einer herkömmlichen Knochenmarkentnahme aus dem Beckenkamm ist keine Vollnarkose nötig und somit die Akzeptanz bei freiwilligen Spendern deutlich höher. Für den Empfänger bietet eine mit G-CSF stimulierte periphere HSZT den Vorteil einer deutlich schnelleren hämatopoetischen Regeneration (kürzere Neutropenie) verbunden mit einer kürzeren Hospitalisierung und einer niedrigeren Rate an febrilen Neutropenien [25]

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der T-Zell Rekonstitution, der Inzidenz von Infektionen oder dem Auftreten und dem Schweregrad einer akuten Transplantat Gegen Wirt (GvH) Reaktion [121] im Vergleich zur klassischen Knochenmarkstransplantation. Bei Patienten, die mit einer hohen Zellzahl an CD34+Stammzellen transplantiert wurden, wurde allerdings eine erhöhte Inzidenz chronischer GvH Reaktionen beobachtet [99].

Durch die HSZT soll ein vollständiger und dauerhafter Chimärismus erreicht und eine wechselseitige Immuntoleranz von Transplantat und Empfänger gewährleistet werden. Unter einem Chimärismus versteht man das Vorhandensein von zwei oder mehr genetisch verschiedenen Geweben in einem Organismus. Diese Bezeichnung geht auf Homers Ilias zurück, in der im 6. Gesang (Vers 181) ein Fabelwesen mit den Worten „Vorne ein Leu und hinten ein Drache und Geiß in der Mitte“ beschrieben wird [73]. In der modernen Transplantationsmedizin beschreibt der Chimärismus das Verhältnis der körpereigenen Zellen des Patienten mit den körperfremden Zellen eines Spenderorgans. Bei der allogenen HSZT ist ein vollständiger Chimärismus definiert als ein Zustand, in dem alle hämatopoetischen und lymphatischen Zellen vom Spender abstammen. Die nicht hämatopoetischen Zellen sind weiterhin vom Empfänger. Ein gemischter Chimärismus beschreibt den Zustand, in dem Spender- und Patientenzellen gleichzeitig im Blut oder im Knochenmark vorhanden sind. Dieser kann im Verlauf stabil sein oder eine transiente Phase nach HSZT darstellen, die entweder

zu einem vollständigen Chimärismus oder zu einer Transplantatabstoßung führen kann.

Die Risiken und Komplikationen einer HSZT sind vielfältig und oftmals schwerwiegend. Neben den toxischen Nebenwirkung der Konditionierungstherapie [17], Infektionen und einer GvH Reaktionen stellen das Transplantatversagen oder die Entwicklung einer Lebervenenverschlusskrankheit [97] die größten Risiken bei einer Transplantation dar. Das Auftreten eines Rezidivs der Grunderkrankung oder einer schweren GvHD und/oder opportunistischen Infektionen sind die Haupttodesursachen nach Stammzelltransplantation [144]. Gratwohl et. al konnten 2005 in einer groß angelegten retrospektiven Kohortenstudie an 14 404 Patienten zeigen, dass 30% der Patienten nach HSZT an einem Rezidiv der Grunderkrankung, 25% an Folgen einer GvHD und 10% an den Folgen einer stattgehabten Infektion verstarben [57].

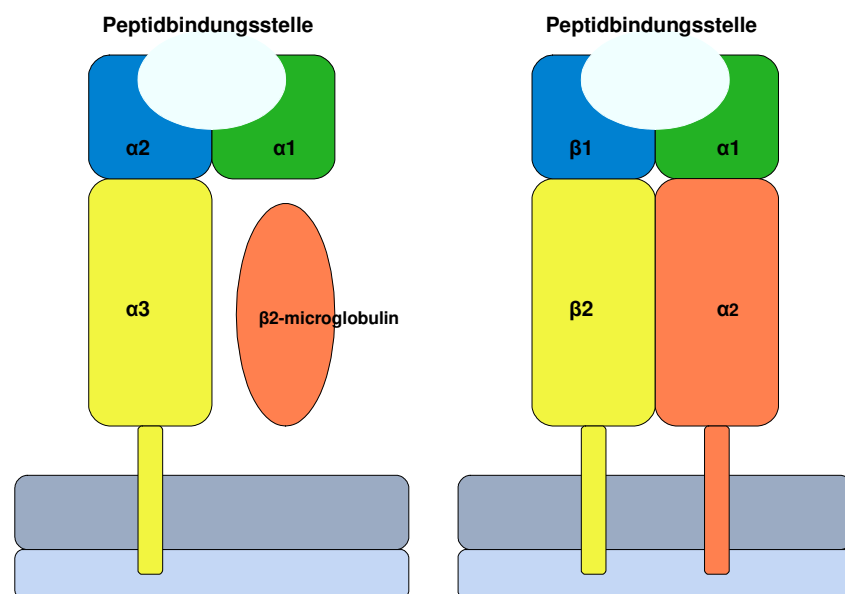
## ***1.4 Transplantationsbarrieren***

### **1.4.1 Das HLA-System**

Eine entscheidende Barriere bei einer allogenen HSZT ist die so genannte Human Leukocyte Antigen (HLA)-Barriere. Erstmals wurde der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Komplex) 1948 bei Mäusen im Rahmen experimenteller Gewebstransplantationen beschrieben [141]. Weiterführende Untersuchungen [35] ermöglichten die Charakterisierung des MHC-Komplexes beim Menschen - das bereits Eingangs erwähnte HLA-System. Dies stellte einen Durchbruch auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin dar, da das HLA System bei der Immunantwort eines Individuums und der Differenzierung zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“ eine Schlüsselrolle spielt. Diese zentrale Rolle wird dadurch bestimmt, dass eine adäquate Immunantwort nur möglich ist, wenn ein funktionierendes Zusammenspiel der antigenerkennenden T-Zell-Rezeptoren (TCR) und der HLA-Antigene vorliegt [119]. Es gibt zwei Klassen von HLA-Molekülen, die als HLA-Klasse-I- (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) bezeichnet werden.

Die Klasse-I Moleküle, die sich mit wenigen Ausnahmen auf allen kernhaltigen Körperzellen befinden und in Körperzellen produzierte Proteine an CD8-positive T-Zellen (Zielzellen) präsentieren, bestehen aus einer ca. 45kD schwere  $\alpha$ -Kette, die nicht-kovalent mit einem  $\beta$ 2-Mikroglobulin verbunden ist. Die  $\alpha$ -Kette kann in drei extrazelluläre Domänen ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3), eine transmembranäre und eine intrazytoplasmäre Region unterteilt werden. Die von der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne gebildete Bindungstasche dient zur Präsentation von im Zytosol an den Ribosomen synthetisierten Proteinen, die  $\alpha$ 3-Domäne weist eine CD8 Bindungsstelle auf. Die Ausprägung der HLA-Moleküle auf den Zellen wird durch Zytokine gesteuert (Abbildung 2).

Die Klasse-II-Moleküle, die der Präsentation exogener Antigene gegenüber CD4-positiven T-Zellen dienen, sind aus einer schweren (30-34kD)  $\alpha$ - und einer leichteren (29kD)  $\beta$ -Kette aufgebaute Heterodimere. Die Peptidbindungstasche wird von den Domäne  $\alpha$ 1 und  $\beta$ 1 geformt und die  $\beta$ 2 Domäne wirkt als Bindungsstelle für das CD4-Molekül (Abbildung 2).



**Abbildung 2; Die Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls (links) und eines MHC-Klasse-II-Moleküls (rechts), in vereinfachter schematischer Darstellung**

Die Gene der MHC-Moleküle unterliegen den Mendelschen Gesetzen und werden kodominant vererbt. So liegen bei jedem Individuum 2 Gruppen von allelen Gene (Haplotypen) vor.



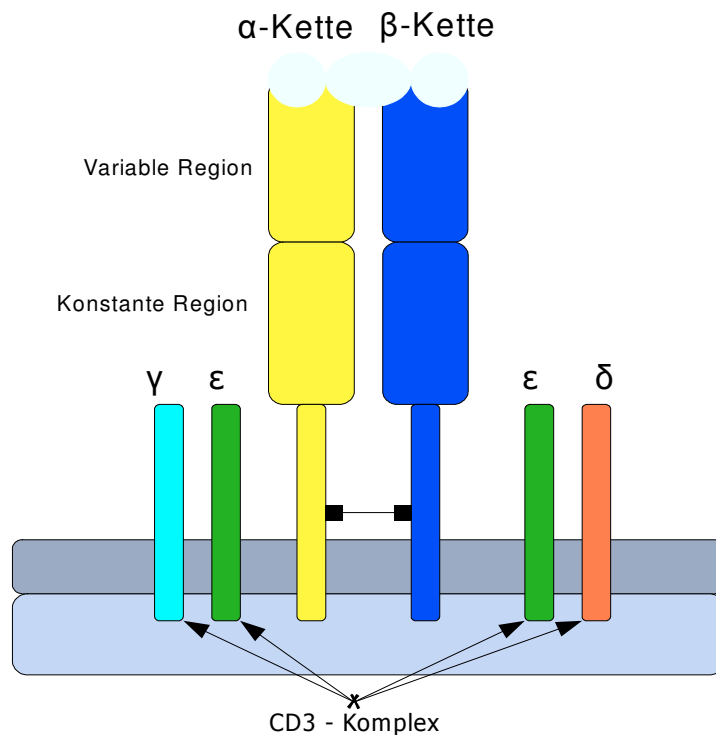
### 1.4.2 Der T-Zell Rezeptor

Alle T-Zellen zeichnen sich durch einen gemeinsamen Oberflächenmarker aus, den so genannten „T-Zell-Antigen-Rezeptor“ (TCR); ein heterodimeres Molekül, das sich aus 2 Polypeptidketten zusammensetzt, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Bei den TCR lassen sich 2 Gruppen unterscheiden. TCR-1 (TCR  $\gamma\delta$ ) mit einer  $\gamma$  und einer  $\delta$  Polypeptid-Kette und TCR-2 (TCR  $\alpha\beta$ ) bestehend aus  $\alpha$  und  $V\beta$  Untereinheiten. Der Großteil (ca. 95%) der T-Zellen trägt den TCR-2-Rezeptor und lässt sich in CD4 positive T-Helfer-Zellen und CD8 positive T-Zytotoxische-Zellen unterteilen. Die restlichen 5% tragen den TCR-1-Rezeptor und sind zum größten Teil CD4 und CD8 negativ, zum kleineren Teil nur CD8 positiv.

Die extrazellulären Anteile der Peptid-Ketten besitzen eine variable und eine konstante Ig-Domäne. Der TCR besitzt insgesamt fünf variable Segmente. Die Segmente V und J in der  $\alpha$ -Kette sowie die Segmente V-D-J in der  $\beta$ -Kette. Die Antigenbindungsstelle wird von den variablen Domänen beider Ketten gebildet. Die Information für den TCR verteilt sich auf ca. 50  $V\alpha$ - und 70  $J\alpha$ -Teilgene für die  $\alpha$ -Kette und ca. 30  $V\beta$ -, 12  $J\beta$ - und 2  $D\beta$ -Teilgene für die  $\beta$ -Kette [124]. Durch somatische Rekombination ergibt sich eine Vielfalt an Antigenbindungsstellen, die eine spezifische Immunantwort ermöglicht. Nach Berechnungen von Hunkapiller und Hood sind alleine  $4,4 \times 10^{13}$  unterschiedliche Formen für  $V\beta$  und  $6,5 \times 10^{12}$  unterschiedliche Formen für  $V\alpha$  möglich. Im Rückschluss kann berechnet werden, dass es mindestens  $2,9 \times 10^{20}$  potentielle TCR geben muss.

Jeder TCR erkennt ein spezifisches Antigen, sofern es ihm in Form eines Konglomerates von Antigen und HLA-Molekül präsentiert wird. Die Signaltransduktion nach Antigenerkennung wird durch den CD3-Komplex gewährleistet, der gemeinsam mit dem TCR den funktionellen TCR bildet (Abbildung 3). Dies führt zur Aktivierung der jeweiligen T-Zelle und regt eine verstärkte Proliferation der Zellen an. Je nach Art der stimulierten T-Zellen kommt es zur Produktion verschiedener Zytokine (z.B. IL-3, GM-CSF und TNF $\alpha$  bei TH1 und TH2).

Unabdingbar für eine adäquate T-Zell-Antwort ist also die Präsentation spezifischer Antigene in Form eines Peptids: dem bereits beschriebenen MHC-Komplex auf der Oberfläche einer aktivierten antigenpräsentierenden Zelle (APC). Diese APC dienen als Verbindungsglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr und umfassen die dendritischen Zellen, die Makrophagen und unter gewissen Bedingungen auch B-Zellen. Die einzige bekannte Aufgabe der hoch spezialisierten dendritischen Zellen, ist die Antigenpräsentation an zirkulierende T-Zellen. Nach stattgehabtem Antigenkontakt wandern die APC in nahe gelegene Lymphstationen und präsentieren auf ihrer Oberfläche den Komplex aus MHC und dem aufgenommenen Peptid.



**Abbildung 3; schematischer Aufbau des T-Zell-Rezeptors mit dem CD3-Komplex. Der TCR erkennt einen spezifischen Komplex aus antigenem Peptid und MHC, jedoch kann diese Erkennung nur dann stattfinden, wenn es zur gemeinsamen Erfassung des Peptid und des MHC-Moleküls kommt.**

### 1.4.3 HLA-System und Alloreaktivität

Im Sinne der HLA-Barriere werden vom Spender stammende Peptide von den T-Lymphozyten des Empfängers bei einer Transplantation durch ihre Präsentation in Verbindung mit den HLA-Molekülen als fremd erkannt und so zum Ziel einer gegen sie gerichteten Immunantwort. Die hieraus resultierende Absto-

Bungsreaktion, die so genannte Wirt Gegen Transplantat (HvG) Reaktion, kann die Abstoßung des allogenen Stammzelltransplantates zur Folge haben. Umgekehrt führen reife, mittransplantierte T-Lymphozyten des Spenders, die das Gewebe, genauer gesagt die Histokompatibilitätsantigene des Empfängers als fremd erkennen, zu der bereits erwähnten GvH-Reaktion. Um diese so genannten alloreaktive Reaktionen zu vermeiden, wird mittels Konditionierung vor der Transplantation unter anderem versucht, das Immunsystems des Empfängers zu unterdrücken. Des Weiteren ist, um einer GvH-Reaktion effektiv vorzubeugen, eine immunsuppressive Therapie nach Transplantation von eminenter Bedeutung. Hierbei kommen Medikamente wie Ciclosporin A, Methotrexat, Tacrolimus oder Mycophenolat Mofetil zum Einsatz.

Um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern, ist es darüber hinaus wichtig, die MHC-Typen von Spender und Empfänger genau aufeinander abzustimmen (so genanntes „matchen“). Eine HLA-Identität liegt formal nur dann vor, wenn die Genprodukte der für die allogene Blutstammzelltransplantation als relevant erkannten HLA-Genorte bei Spender und Patient übereinstimmen. Derzeit entspricht dies einer Übereinstimmung der HLA-Testresultate auf vierstelligem Niveau aller 10 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 Allele zwischen Patient und prospektivem nicht verwandten Spender - so genanntes 10/10-Match [39]. Dies kann jedoch aufgrund der polymorphen Natur und der Komplexität der menschlichen MHC-Moleküle nie ganz exakt sein und einer durch Antikörper gegen MHC-Proteine festgestellten Identität der HLAs liegt selten ein identischer MHC-Genotyp zu Grunde. Ausnahmen bilden hierbei HLA-idente Geschwister. Doch auch bei einer solchen Transplantation werden mitunter Abstoßungsreaktionen beobachtet, die aber in aller Regel schwächer verlaufen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Spender und Empfänger noch in anderen Genloci divergieren, den Nebenhistokompatibilitätsantigenen oder Minorantigenen, die an die MHC-Klasse-I-Moleküle des Transplantates gebunden sind [70].

Jedoch ist die Transplantatabstoßung bei einer Stammzelltransplantation nicht das Hauptproblem, da durch die vorhergehende Konditionierung das Immun-

system des Empfängers ablatiert wurde. Dagegen ist die Reaktion des neuen Immunsystems gegen den Empfänger, die GvH-Reaktion, für die meisten schwerwiegenderen Komplikationen verantwortlich. Hierbei lösen immunkompetente Zellen des Spenders eine immunologische Reaktion gegen den Empfängerorganismus aus. Diese vor allem durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion führt zur Aktivierung von CD4+ (T-Helfer-) und CD8+ (zytotoxischen-) T-Zellen des Spenders. Es kann sich eine akute Abstoßungssymptomatik in zahlreichen Organen entwickeln, wobei vor allem die Haut, der Gastrointestinaltrakt und die Leber befallen werden. Tritt eine solche Reaktion 100 Tage oder später nach Transplantation auf, spricht man von einer chronischen GvH-Reaktion, die zu den oben aufgeführten Organen noch weitere Organsysteme betreffen kann, wie die Speicheldrüsen oder die Lunge.

Neben den bereits aufgeführten HLA-identen Geschwistern, besteht auch in seltenen Fällen die Möglichkeit, eine syngene Transplantation zwischen Zwillingen durchzuführen. Hierbei tritt keine GvH-Reaktion auf, jedoch kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Rezidivwahrscheinlichkeit [51]. Dies unterstreicht die Bedeutung des mit einer GvH-Reaktion vergesellschafteten GvT-Effektes für den Erfolg einer allogenen HSZT.

Schon Mitte der 1950er Jahre wurde dieser der GvH-Reaktion ähnliche, jedoch erwünschte Effekt beschrieben. In einer Versuchsreihe an Mäusen, die mit einer letalen Dosis an Röntgenstrahlen behandelt wurden, beobachteten Barnes et al. einen Antitumoreffekt nach Transplantation von Knochenmark, der nicht durch eine Chemo- oder Bestrahlungstherapie zu erklären ist [16]. Man bezeichnet diesen als Transplantat Gegen Leukämie (GvL) Effekt oder Transplantat Gegen Tumor (GvT) Effekt. Dieser Effekt ist ebenfalls T-Zell vermittelt und es konnte bei einigen Erkrankungen (z.B. CML) gezeigt werden, dass er ausreichen kann, die Erkrankung zu kurieren [134].

Im Rahmen einer HLA-identen HSZT haben somit T-Zellen eine zentrale Bedeutung für das Gelingen. Zum einen sind sie für Immunreaktionen gegen körperfremde Proteine auf dem Spendergewebe hauptverantwortlich und führen so unter Umständen zu einer Abstoßungs- oder einer GvH-Reaktion, zum anderen

sind sie aber auch für den GvL-Effekt wichtig und senken somit die Rückfallrate. Der effektivste Weg eine GvH-Reaktion zu vermeiden, ist die Depletion der für diese Reaktion verantwortlichen T-Zellen. Wie zu erwarten ist ein solches Vorgehen jedoch mit einer erhöhten Rezidivneigung verbunden, da auch der GvL Effekt vermindert wird.

### **1.5 Dosisreduzierte Konditionierung**

Wie bereits erwähnt, stellt die Toxizität der Konditionierung häufig einen limitierenden Faktor für den Erfolg einer Stammzelltransplantation dar. Die zunächst verwendeten intensiven Konditionierungsprotokolle zogen signifikante extramedulläre Toxizitäten nach sich, was dazu führte, dass ihre Anwendung auf junge und relativ gesunde Patienten beschränkt war. Älteren Patienten oder Patienten mit Begleiterkrankungen oder nach zahlreichen Vortherapien kann ein solches intensives Konditionierungsprotokoll aufgrund der kumulativen Toxizität nicht mehr zugemutet werden.

In Anbetracht dieser Problematik wurde nach alternativen Wegen gesucht, auch diesen Patienten eine allogene HSZT anzubieten. Ziel einer solchen Strategie ist eine ausreichende Immunsuppression für ein erfolgreiches Engraftment bei minimierter therapieassoziierte Toxizität. Man bezeichnet diese Art der Konditionierung als dosisreduzierte Konditionierung (RIC). Dies ermöglicht durch eine geringere Schädigung des Thymus auch eine bessere Immunrestitution nach Transplantation. RIC wurde als Regime definiert, das nicht beabsichtigt die Empfängerhämatoopoese komplett zu eradizieren, jedoch einen Basis zu schaffen, auf der ein komplettes Engraftment möglich ist und gleichzeitig der GvT Effekt erhalten bleibt [13].

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass der Einsatz einer RIC zur allogenen HSZT, zu einer Verminderung der Inzidenz und des Schweregrades der auftretenden GvH-Reaktion und des Infektionsrisikos führt [79]. Als Konsequenz daraus, konnte die therapiebedingte Sterblichkeitsrate reduziert werden. Desweiteren kann nun auch älteren, komorbiden Patienten vielfach eine HSZT als Therapie angeboten und ermöglicht werden.

## **1.6 Haploidente allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation**

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Kriterien zur Spendersuche, steht nur für ca. 30% der Patienten ein passender HLA-identer Familienspender und für bis zu 70% ein HLA-identer Fremdspender zur Verfügung [94]. Bei ethnischen Minderheiten sind diese Zahlen noch deutlich geringer. Des Weiteren ist die Suche nach einem HLA-identen Spender mitunter sehr zeitaufwändig, eine zeitnahe Transplantation z.B. bei Rezidivsituationen jedoch oft die einzige Therapieoption. Da jedoch jeder Patient theoretisch einen potentiell passenden haploidenten verwandten Spender in Form von Eltern, Kinder oder Geschwister hat, ermöglicht eine haploidente HSZT eine Transplantation nahezu bei allen Patienten mit entsprechender Indikation. Allerdings bringt die Transplantation von einem haploidenten Spender erhebliche immunologischen Risiken mit sich, birgt jedoch auch einige Vorteile. Zwar steigt die Zahl der Transplantatabstoßungen und GvH-Reaktionen deutlich an, [18],[3] jedoch nimmt auch die Rückfallrate mit zunehmender HLA-Disparität ab.

Transplantatabstoßung und GvH-Reaktionen werden hauptsächlich T-Zell vermittelt. Daher ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche haploidente HSZT eine vorherige ausgeprägte T-Zelldepletion des Transplantates. Hierdurch erreicht man eine Senkung der Zahl der Transplantatabstoßungen und des Auftretens schwerer GvH-Reaktionen trotz erhöhter HLA-Barriere. Allerdings riskiert man gleichzeitig durch die resultierende Immunschwäche eine erhöhte Infektions- und Rückfallrate. Daher waren bisher die Ergebnisse mit alleiniger T-Zell-Depletion nicht zufriedenstellend.

Einen Durchbruch ermöglichten erst die Arbeiten von Martelli und Reisner [120], die sich mit dem Einsatz einer erhöhten Stammzelldosis (Megadosis) zur haploidenten HSZT beschäftigten. Nach vielversprechenden Tierversuchen, in denen eine Transplantation mit einer Megadosis von hämatopoetischen Stammzellen erfolgreich durchgeführt wurde [12], begannen 1993 erste klinische Versuche [9], die nicht zuletzt durch die Verwendung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren seit Ende der 90er Jahre ermöglicht wurden. Hier-

durch ist es möglich, ein Transplantat aus dem peripheren Blut nach G-CSF Mobilisierung zu gewinnen, welches  $>10 \times 10^6$  CD34+ Stammzellen/kg enthält. Durch die Verwendung einer Megadosis CD34 positiv selektionierter Stammzellen, werden einerseits Stammzellen hoch angereichert, andererseits T-Zellen massiv depletiert, was eine erfolgreiche haploidente HSZT mit deutlich reduziertem Risiko einer GvH-Reaktion möglich macht [10].

Um ein solches CD34 angereichertes und T-Zell depletiertes Transplantat zur haploidenten Stammzelltransplantation zu erhalten, wird eine immunomagnetische Positivselektion verwendet. Mittels magnetischer Mikrobeads die mit Antikörpern gegen das CD34- oder das CD133-Antigen (Positivselektion [62],[80]) beschichtet wurden, werden die Stammzellen markiert und die durch Mikrobeads markierten Zellen werden nun in einem Magnetfeld von den übrigen hämatopoetischen Zellen getrennt. Hierdurch erhält man ein hochaufgereinigtes Transplantat mit bis zu 97% CD34 positiven Zellen.

Aversa et. al gelang die erfolgreiche Umsetzung des Megadosis-Prinzips im Rahmen klinischer Studien an 43 Patienten mit Leukämie, die mit einer hohen Dosis CD34-selektionierten haploidenten Stammzellen transplantiert wurden [9, 10]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Kindern von Handgretinger et al. [62, 80] vorgestellt. Hervorzuheben ist, dass ein erfolgreiches Engraftment bei gleichzeitig niedriger Inzidenz einer GvH-Reaktion erfolgte. Die Patienten in beiden Studien erhielten keine prophylaktische Immunsuppression nach Transplantation. Dies ist möglich, da durch eine Hochanreicherung CD34+ Zellen eine um den Faktor 10-100 bessere T-Zelldepletion als durch andere Verfahren erreicht wird. Andererseits bringt das Ausmaß der T-Zelldepletion eine verzögerte Immunrekonstitution mit einem erhöhten Risiko insbesondere von viralen Infektionen mit sich. Es wird außerdem befürchtet, dass auch eine erhöhte Rezidivrate mit einem solchen Vorgehen verbunden ist, da T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung einer GvT Antwort spielen. Bei einer komplett nicht HLA-identen HSZT könnten jedoch NK-Zellen diesbezüglich eine bedeutende Rolle spielen.

Auf Basis dieser Erfahrungen hat das Transplantationszentrum Tübingen ein neues Verfahren zur Transplantataufbereitung mittels Negativselektion mit CD3/CD19 Mikrobeads entwickelt. Um ein möglichst unberührtes Transplantat zu verwenden und möglichst viele immunkompetente Zellen zu transplantieren, bietet sich diese negative Selektionsmethode an. Dabei werden nur die Zellen, die für Hauptkomplikationen bei einer haploidenten Transplantation verantwortlich sind, also T-Zellen im Hinblick auf GvH-Reaktion und B-Zellen im Hinblick auf lymphoproliferative Erkrankungen, entfernt. Dies ermöglicht zudem die Transplantation möglichst unberührter, das heißt nicht mit Mikrobeads markierter Stammzellen. Es gibt Hinweise, dass eine CD34+ Markierung mit dem entsprechenden Antikörper Einfluss auf die Zytoadhäsion und Koloniebildung der transplantierten Zellen haben kann [143],[56]. Technisch ist eine solche T- und B-Zelldepletion über eine CliniMACS-Säule (Miltenyi Biotec) nach „good manufacturing practice“ (GMP) möglich. Das Transplantat enthält dadurch immer noch CD34 negative Progenitor Zellen, NK-Zellen, dendritische und für das Engraftment mit verantwortliche Zellen („Facilitating Cells“). Bei der Negativselektion soll durch die Mittransplantation von Effektorzellen mit möglicher antileukämischer Wirkung die GvT-Reaktion verstärkt und gleichzeitig ein besseres und schnelleres Engraftment ermöglicht werden. Dieses Verfahren wurde zunächst bei pädiatrischen Patienten eingesetzt und nach Erfolg versprechenden Erfahrungen auf die HSZT bei Erwachsenen übertragen [61],[20].

### ***1.7 Die Rolle der natürlichen Killerzellen bei der haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantation***

Die Verminderung der GvH-Reaktion bei Erhaltung der GvL-Reaktion stellt wie bereits ausgeführt, eines der Schlüsselprobleme einer allogenen HSZT dar. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Natürliche Killer (NK) Zellen bei einer haploidenten Transplantation eine für den GvL-Effekt und das Engraftment wichtige Rolle einnehmen [129]. Sie werden für dieses Setting als ähnlich wichtig beschrieben, wie T-Zellen bei der HLA-identen Transplantation [117].

NK-Zellen sind Zellen der lymphatischen Reihe, die dem unspezifischen Im-

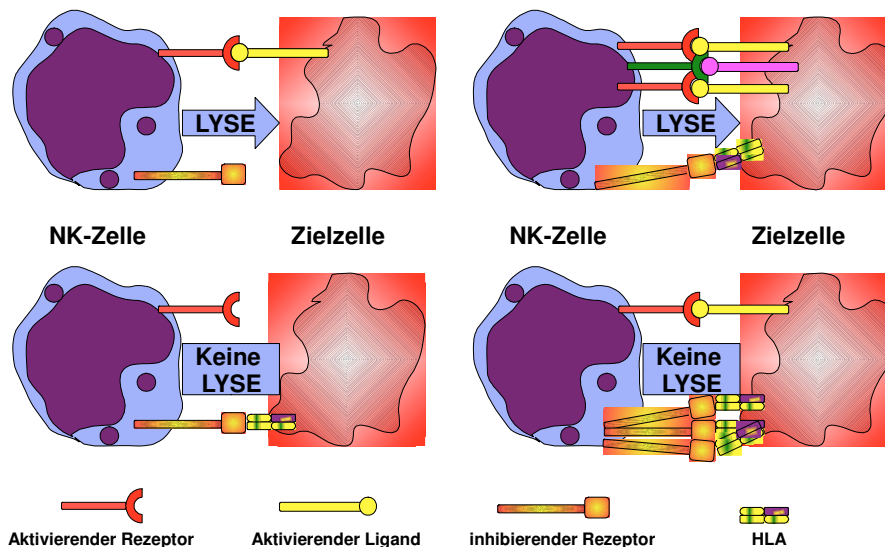


munsystem angehören. Das unspezifische Immunsystem ist ein sehr primitives und ontogenetisch altes Immunsystem, welches z.B. Fische besitzen. Zum unspezifischen Immunsystem gehören neben den mechanischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren des Körpers auch die Gewebemakrophagen, die natürlichen Killerzellen und das Komplementsystem.

Die NK-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus der gemeinsamen lymphatischen Progenitorzelle, zirkulieren im Blut und machen bis zu 15% der Lymphozyten aus. Sie lassen sich grundsätzlich in 2 funktionelle Gruppen unterteilen; die so genannten immunregulatorischen Zellen (CD56<sup>bright</sup>) und die zytotoxischen Zellen (CD56<sup>dim</sup>). In der frühen Phase der Immunabwehr spielen die NK-Zellen eine wichtige Rolle bei Infektionen, ausgelöst durch intrazelluläre Pathogene wie zum Beispiel das Herpesvirus, den protozoischen Parasiten *Leishmania* und das Bakterium *Listeria monocytogenes* [70]. Auch zur Abwehr von Cytomegalievirus- (CMV) [66] - und bei Pilz-Infektionen [102] sind NK-Zellen sehr wichtig. NK-Zellen können auch bei der Behandlung maligner Erkrankungen, durch ihre Eigenschaft neoplastische Zellen auch ohne tumorspezifische Antigenerkennung zu lysieren [47], eine wichtige Bedeutung haben.

Die Mechanismen, die es den NK-Zellen ermöglichen zwischen nicht infizierten und infizierten bzw. maligne entarteten und gesunden Zellen zu unterscheiden, sind noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Da NK-Zellen keiner vorherigen Aktivierung bedürfen und auch keine für Antigene spezifischen Rezeptoren besitzen, müssen andere Voraussetzungen gegeben sein, um eine funktionierende Immunabwehr zu garantieren. 1985 wurde von Klas Kärre die Hypothese des so genannten „Fehlenden Selbst“ (Missing Self) aufgestellt, die besagt, dass NK-Zellen andere körpereigene Zellen lysieren, sofern sich die Dichte der HLA-I Moleküle auf den Zelloberflächen verändert [74]. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Theorie noch nicht alle Fragen beantworten konnte. So wurden zum Beispiel beobachtet, dass viele Zellen im menschlichen Körper eine sehr niedere Expression von HLA-I Molekülen aufweisen, jedoch dennoch resistent gegen NK-Zellen sind. Hieraus wurden zwei Erklärungsversuche abgeleitet, die sich später beide als richtig herausstellten. Zum einen wurde postu-

liert, dass es Nicht-HLA-Moleküle geben muss, die die NK-Zell Funktion hemmen und zum ändern wurde postuliert, dass Zellen mit einer niederen Expression von HLA-I-Molekülen und aktivierenden Rezeptoren nicht in der Lage sind NK-Zellen zu aktivieren. Inzwischen gilt es als gesichert, dass die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen bestimmt, ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht. Dies setzt ein präzises Zusammenspiel der beiden Typen von Oberflächenrezeptoren voraus, die sich auf NK-Zellen finden und die zytotoxische Aktivität steuern (Abbildung 4). Sie lassen sich in aktivierende und inhibierende Rezeptoren einteilen. Inhibitorische Rezeptoren sind in der Lage die Aktivierung einer NK-Zelle zu verhindern. Diese Rezeptoren lassen sich in HLA-Klasse-I inhibitorische Rezeptoren und nicht-HLA-bindende inhibitorische Rezeptoren unterteilen. Die wichtigsten Vertreter dieser ersten Gruppe sind die KIR-Rezeptoren (KIR = „killer cell immunoglobulin-like receptors“). Sie können, so die Hypothese, bei veränderter Expression von bestimmten HLA-Klasse-I-Molekülen selektiv die Zielzelle töten.



**Abbildung 4; Regulation der NK-Zellen durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren**

Eine veränderte HLA-Expression findet sich möglicherweise sowohl auf infizierten Zellen als auch auf Tumorzellen. Die Aktivierung von NK-Zellen, sei es durch einen fehlenden inhibitorischer oder einen vorhandenen aktivierenden Impuls führt zu einer Degranulation und Sekretion der zytotoxischen Granula und damit zum Untergang der Zielzelle [112].

Jeder KIR wird von einer bestimmten HLA-I Allelgruppe blockiert (Tabelle 2). Ist diese Kombination von KIR und HLA-I Allel nicht gegeben, spricht man von einem KIR-Mismatch und es kommt zu einer verstärkten Alloreaktivität der NK-Zellen.

**Tabelle 2; HLA-Klasse-I-Spezifität der Haupt-KIRs bei menschlichen NK-Zellen (nach [149])**

KIR	HLA-Klasse-I-Spezifität
p58.1 (KIR2DL1)	Gruppe 2 HLA-C-Allele (-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6)
p58.2 (KIR2DL2/3)	Gruppe 1 HLA-C-Allele (-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8)
p70 (KIR3DL1)	HLA-Bw4-Allele (z.B. HLA-B27)
p140 (KIR3DL2)	HLA-A3, -A11

Durch Versuche im Tiermodell wurde gezeigt, dass die NK-Zell-vermittelte Alloreaktivität eine effektive GvT-Antwort vermittelt, eine Transplantatabstoßung verhindert und auch modulatorisch auf eine GvH-Reaktion wirken kann [129]. Das KIR-Mismatch in GvH-Richtung scheint eine wichtige Rolle zu spielen, da hierdurch das Risiko einer Transplantatabstoßung verringert werden kann und eine verstärkte GvT-Reaktion beobachtet wird. Ein weiterer Vertreter der Gruppe der HLA-Klasse-I inhibitorischen Rezeptoren ist das Dimer CD94/NKG2A, das spezifisch für HLA-E ist. Die nicht-HLA-bindenden inhibitorischen Rezeptoren umfassen eine Gruppe von unterschiedlichsten Proteinen. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind NKR-P1 und 2B4. Sie waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die aktivierenden Rezeptoren sind unabdingbar für NK-Zellen beim Prozess der Zellaktivierung. Auch die aktivierenden Rezeptoren lassen sich weiter untergliedern in natürliche zytotoxische Rezeptoren, in die Gruppe der NKG2D Rezeptoren sowie HLA-bindenden aktivierenden Rezeptoren und spezifische aktivierende Rezeptoren für Moleküle von Mikroorganismen. Die wichtigsten Vertreter aktivierender Rezeptoren sind die Proteine NKp30, NKp44 und NKp46. Diese Rezeptoren-Gruppe ist einzigartig bei NK-Zellen und ist von elementarer Wichtigkeit für die NK-Zell spezifische Erkennung von Tumorzellen. Zusätzlich zu

diesen Rezeptoren war auch das erwähnte Homodimer NKG2D Gegenstand unsere Untersuchung.

### **1.8 Immunrekonstitution nach allogener haploidenter Stammzelltransplantation**

Unter dem Begriff der „Immunrekonstitution“ versteht man den Reifungsprozess transplanteder hämatopoetischer Stammzellen und determinierter Progenitorzellen zu Zellen der spezifischen und der unspezifischen Abwehr. Eine erfolgreiche und möglichst rasche Wiederherstellung der Immunität ist ein entscheidender prognostischer Faktor für Patienten nach HSZT. Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft und Entwicklungswege der einzelnen Zellen des Immunsystems, divergiert der jeweilige zeitliche Ablauf der funktionellen und quantitativen Rekonstruktion. Der vorausgegangenen Konditionierung und folgenden HSZT schließt sich bei komplikationslosem Verlauf eine rasche Rekonstitution des hämatopoetischen Systems und der unspezifischen, zellulären Immunität an. Im Gegensatz zu diesem relativ schnell abgeschlossenen Vorgang (meist innerhalb eines Monats), bedarf die Rekonstitution der spezifischen, zellulären Immunität deutlich mehr Zeit. Die peripheren Lymphozytenzahlen erreichen zwar schon nach ungefähr 3 Monaten Normalwerte, jedoch findet die vollständige Repopulation der lymphatischen Organe erst in den folgenden Monaten statt. Bis dann wieder eine ausreichende Funktionalität der einzelnen Zellen vorliegt, kann es mitunter bis zu 6 Monaten dauern. To et al. stellten 1997 die These auf, dass eine dauerhafte Immunrekonstitution sowie eine Erholung des hämatopoetischen Systems nach Myeloablation hauptsächlich auf das regenerative Potential der transplantierten pluripotenten Stammzellen zurückzuführen ist [146].

In der Zeit der frühen Immunrekonstitution, was den ersten 6 Monaten nach HSZT entspricht, ist die Anfälligkeit für opportunistische Infektionen besonders hoch. Gefürchtet sind besonders Infektionen, ausgelöst durch CMV, da hier gehäuft lebensbedrohliche Verläufe beobachtet werden. Auch Lungenentzündungen, verursacht durch eine Pilzinfektion stellen ein großes Problem dar.

Die Immunrekonstitution nach HSZT erfolgt in folgenden Schritten:

Die NK-Zellen, die für die antivirale Immunität und den GvL Effekt eine bedeutende Rolle spielen, erreichen schon ungefähr 30 Tage nach Transplantation Normwerte und stellen zu dieser Zeit die größte Subpopulation der Lymphozyten dar. Die Entwicklung der NK-Zellen findet im Knochenmark statt. Die Struktur des Knochenmarks bietet ein breites Spektrum an Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die die Entwicklung der NK-Zellen unterstützen können und enthält die für die vollständige Ausreifung der NK-Zellen wichtigen Stromazellen. Aus einer pluripotenten Vorläuferzelle – der so genannten common lymphocyte progenitor cell - aus der sich auch die T- und die B-Zellen entwickeln, entsteht ebenfalls eine Vorläuferzelle für NK-Zellen, die NK-Precursor-Zelle. Diese wiederum differenziert sich weiter zu der NK-Vorläuferzelle, der reifen NK-Progenitor-Zelle. Über das Stadium der unreifen und der pseudoreifen lytischen NK-Zelle, entsteht schließlich die reife NK-Zelle [31].

Die Erholung der spezifischen Immunabwehr ist nicht so schnell abgeschlossen wie die der unspezifischen. Sind z.B. die NK-Zell-Spiegel schon nach 30 Tagen wieder in Normbereich, benötigen B- und T-Zellen mehrere Monate zur kompletten Ausreifung.

Die B-Zelldifferenzierung vollzieht sich über mehrere Stadien (von der Stammzelle über die Pro- und Prä-B-Zelle zur reifen B-Zelle), die gekennzeichnet sind durch aufeinander folgende Umordnung und Expression der Gene für die Immunglobuline. Die Entwicklung von der unreifen zu reifen B-Zelle findet nicht mehr im Knochenmark, sondern in peripheren lymphatischen Organen wie der Milz statt. Die Rekonstitution der B-Zellen nach Transplantation speist sich aus verschiedenen Quellen. Entweder aus transplantierten peripheren B-Zellen, die dann entweder im Knochenmark, in den Lymphknoten oder in der Milz proliferieren oder aus den im Transplantat vorhandenen B-Progenitorzellen [58].

Die T-Zell Entwicklung erfolgt sowohl im Thymus als auch extrathymisch. Die Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Wiederherstellung der Immunität sind das Angehen der transplantierten, hämatopoetischen Zellen und eine noch adäquate Thymusfunktion. Auch wenn die Mechanismen der T-Zell Rekonstitution noch nicht vollständig aufgeklärt sind [105], scheint es klar zu sein, dass

dafür prinzipiell zwei Wege zur Verfügung stehen. Die antigengetriggerte, periphere Expansion reifer, transplantiertes T-Zellen und die „de novo“ Generierung naiver T-Zellen aus den transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen im Thymus. Eine verspätete und oft inkomplette Immunrekonstitution ist eventuell auf eine beim Großteil der Patienten vorhandene reduzierte Thymusfunktion zurückzuführen, die durch das Alter, die Konditionierung, hormonelle Umstellungen und mögliche GvH-Reaktionen bedingt sein kann. Jedoch ist der Thymus nicht der einzige Ort der T-Zell-Regeneration und es wird angenommen, dass die extrathymische T-Zellreifung, in der Darmmukosa, der Leber und im Knochenmark durchaus an der Immunrekonstitution nach HSZT beteiligt ist. Ähnlich der Umlagerungen der Gene der Immunglobuline, ist auch die Entwicklung des T-Zell-Rezeptors durch Neuordnung und Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TCRs geprägt. Durch vielfältige Verknüpfungsmöglichkeiten und zufällige Rezeptorumlagerungen, entsteht hierbei die Diversität des T-Zell-Rezeptorrepertoires. Die Spezifität des Rezeptorrepertoires wird durch eine Kombination aus Gensegmenten der Keimbahn und Verbindungsregionen bestimmt. Durch positive und negative Selektion, die sich im Thymus vollzieht, wird aus dem primären Repertoire mit einer inhärenten Spezifität eine Auswahl an T-Zell-Rezeptoren getroffen. Auf diese Weise entsteht ein breites Rezeptorrepertoire, das eine ausreichende Immunität gewährleistet [70].

## **1.9 Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Immunrekonstitution nach CD3/19 depletierter allogener haploidenter Stammzelltransplantation bei Erwachsenen zur Therapie einer malignen hämatologischen Erkrankung.

Folgende Fragestellungen lagen der Arbeit zu Grunde:

- a) Untersuchung des hämatopoetischen Engraftments
- b) Untersuchung der Transfusionsbedürftigkeit
- c) Untersuchung der Rekonstitution der NK-Zellen
  - und der Entwicklung der NK-Zell-Rezeptoren mit besonderem Augenmerk auf die NK-KIR.
- d) Untersuchung der Entwicklung der B-Zellen
- e) Untersuchung der Entwicklung der T-Zellen
  - und des sich rekonstruierenden Repertoires der V $\beta$ -T-Zell-Rezeptoren Subfamilie
- f) Untersuchung des Auftretens von Infektionen und GvHD nach Transplantation

Zusätzlich wurden diese Fragen in einem historischen Vergleich von Patienten nach einer CD34 angereicherten und einer CD3/19 depletierten HSZT untersucht und deren Verlauf anhand von zwei Patientengruppen aufgezeigt und ausgewertet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Geräte, Glas- und Plastikmaterialien

Tabelle 3; Verwendete Geräte, Glas- und Plastikmaterialien

Material	Bezugsquelle
Sterile Werkband Hera safe	Heräus
Laborzentrifugen - Rotixa 50 RS / Rotixa RP	Hettich
Blutanalysegerät - Cellcounter Advia 140	Bayer
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel
Verstellbare Pipetten (Pipetman)	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
Kühlschrank zur Kryokonservierung	
Handschuhe	Kimberly-Clark

#### 2.1.2 Verwendete Materialien für die Durchflusszytometrie

Tabelle 4; Materialien für die Durchflusszytometrie

Material	Bezugsquelle
FACS CALIBUR	Becton Dickinson
Verwendete Hardware	Apple Macintosh
Auswertungsprogramm	Cell Quest Becton Dickinson
GraphPad Prism	GraphPad Software
FACS – Puffer – 500 ml Phosphat buffered saline (PBS) – 1,66 ml Bovine serum albumin (BSA), 30% – 5 ml Natriumazid, 10%	- Invitrogen - Sigma - Sigma
Analyseröhrchen - 5 ml Rundboden - spitz	- Becton Dickinson - Sarsted



### 2.1.2.1 Verwendete Antikörper zur Untersuchung des V $\beta$ T-Zell-Rezeptor-Repertoires

Zur Analysierung des TCR V $\beta$ -Repertoires wurde der IO Test Beta Mark (TCR V $\beta$  Repertoire Kit) der Firma Beckman Coulter verwendet (Tabelle 5). Dieser Test ermöglicht eine einfache und schnelle quantitative Analyse des humanen T-Zell-Rezeptor-Repertoires durch spezifische monoklonale Antikörper mittels Durchflusszytometrie. Das Kit-System ist für die Analyse von Vollblutproben ausgelegt und deckt ca. 70% des TCR V $\beta$ -Repertoires ab. Die Kontrollfärbung erfolgte mit IgG1, die Markierung der T-Zellen mit CD3-PC5. Das Kit erlaubt die Untersuchung der folgenden 24 unterschiedlichen V $\beta$ -Ketten und ist folgendermaßen auf 8 Röhren aufgeteilt:

**Tabelle 5; TCR V $\beta$ -Antikörper-Kit. Pro Probenröhrchen wurden drei V $\beta$  Subfamilien gemessen, von denen eine FITC, eine andere PE und eine dritte FITC/PE markiert waren. Der verwendete Kit deckt bei Kombination mit einem CD3 Antikörper ca. 70% der V $\beta$  ab.**

Probe	V $\beta$	Fluorochrom	Klon	Isotyp
A	V $\beta$ 5.3	PE	3D11	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 7.1	PE+FITC	ZOE	IgG2a (Maus)
	V $\beta$ 3	FITC	CH92	IgM (Maus)
B	V $\beta$ 9	PE	FIN9	IgG2a (Maus)
	V $\beta$ 17	PE+FITC	E17.5F3	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 16	FITC	TAMYA1.2	IgG1 (Maus)
C	V $\beta$ 18	PE	BA62.6	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 5.1	PE+FITC	IMMU 157	IgG2a (Maus)
	V $\beta$ 20	FITC	ELL1.4	IgG (Maus)
D	V $\beta$ 13.1	PE	IMMU222	IgG2b (Maus)
	V $\beta$ 13.6	PE+FITC	JU74.3	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 8	FITC	56C5.2	IgG2a (Maus)
E	V $\beta$ 5.2	PE	36213	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 2	PE+FITC	MPB2D5	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 12	FITC	VER2.32	IgG2a (Maus)
F	V $\beta$ 23	PE	AF23	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 1	PE+FITC	BL37.2	IgG1 (Ratte)
	V $\beta$ 21.3	FITC	IG125	IgG2a (Maus)
G	V $\beta$ 11	PE	C21	IgG2a (Maus)
	V $\beta$ 22	PE+FITC	IMMU546	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 14	FITC	CAS1.1.3	IgG1 (Maus)
H	V $\beta$ 13.2	PE	H132	IgG1 (Maus)
	V $\beta$ 4	PE+FITC	WJF24	IgM (Ratte)
	V $\beta$ 7.2	FITC	ZIZOU4	IgG2a (Maus)

### 2.1.2.2 Verwendete Antikörper zur Untersuchung des Rezeptor Repertoires von natürlichen Killerzellen

Zur Untersuchung der NK-Zell-Rezeptoren wurde ein selbst zusammengestelltes Antikörper-Panel verwendet, welches die wichtigsten aktivierenden und inhibitorischen NK-Zellrezeptoren abdeckt (Tabelle 6). Das Panel umfasst neun Proben, die die folgenden Antikörper enthalten:

**Tabelle 6; Zusammensetzung des Antikörper Panels zur Untersuchung des NK-Zell Rezeptorrepertoires. Die Antikörper wurden im Verhältnis 100-100-100-50 µL gemischt und sind bei 2-8°C aufzubewahren**

	<b>Antikörper + Markierung (Hersteller: Becton Dickinson)</b>			
<b>Probe 1 (Kontrolle)</b>	IgG1 FITC	IgG2 PE	IgG1 PerCp	IgG2 APC
<b>Probe 2</b>	158a FITC	158b PE	DX9 PerCp	NKG2D APC
<b>Probe 3</b>	56 FITC	16 PE	3 PerCP	56 APC
<b>Probe 4</b>	94 FITC	NKG2A PE	3 PerCP	56 APC
<b>Probe 5</b>	2 FITC	NKP30 PE	3 PerCP	56 APC
<b>Probe 6</b>	54 FITC	NKP44 PE	3 PerCP	56 APC
<b>Probe 7</b>	11a FITC	NKP46 PE	3 PerCP	56 APC
<b>Probe 8</b>	69 FITC	85j PE	3 PerCP	56 APC
<b>Probe 9</b>	FAS-L FITC	161 PE	3 PerCP	56 APC

### 2.1.2.3 Verwendete Antikörper zur Untersuchung der Immunrekonstitution

**Tabelle 7; Zusammensetzung der Proben für die Untersuchung der Immunrekonstitution**

	<b>Antikörper + Markierung (Hersteller: Becton Dickinson)</b>	
<b>Probe 1 (Kontrolle)</b>	Mouse IgG1 PE	Mouse IgG1 FITC
<b>Probe 2</b>	CD4 PE	CD3 FITC
<b>Probe 3</b>	CD8 PE	CD3 FITC
<b>Probe 4</b>	CD16+56 PE	CD3 FITC
<b>Probe 5</b>	CD19 PE	CD20 FITC
<b>Probe 6</b>	CD14 PE	CD45 FITC
<b>Probe 7</b>	CD4 PE	CD45 RO FITC
<b>Probe 8</b>	CD4 PE	CD45 RA FITC
<b>Probe 9</b>	CD25 PE	CD4 FITC

### 2.1.3 Material für die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Tabelle 8; Material zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Material	Bezugsquelle
Peripheres Vollblut	Patient
Ficoll	Cell Quest Becton Dickinson
Phosphat bufferd saline (PBS-Puffer)	Invitrogen
Analyseröhrchen	
- 5 ml Falcons	Sarsted
- 15 ml Falcons	Sarsted

### 2.1.4 Material für Zellzählung, Gefrier Aufbewahrung und Auftauen der Zellen

Tabelle 9; Materialien für Zellzählung, Gefrier Aufbewahrung und Auftauen

Material	Bezugsquelle
Neubauer Zählkammer	Brandt
Deckglas	Menzel
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Lichtmikroskop	Zeiss
Einfriermedium	
- Fetales Kälberserum (FCS), 90%	- PAA Laboratoires
- Dimethylsulfoxid (DMSO) 10%	- Sigma
Auftaumedium	
- RPMI-1640 *, 60%	- Biochrom
- Fetales Kälberserum (FSC), 40%	- PAA Laboratoires
Kryovials	Qualilab
Qualifreeze	Qualilab
Kryo-Einfriergerät	Qualilab
Beheizbares Wasserbad	Köttermann

\* RPMI steht für Rosewell Park Memorial Institute. Das Institut in Buffalo (New York) in dem Mitte der 1960er Jahre dieses Zellkulturmedium für Leukozyten entwickelt wurde.

## 2.1.5 Liste der Firmenadressen

Tabelle 10; Firmenadressen

Firma	Adresse
<b>Heraeus Holding GmbH</b> Konzernkommunikation Heraeusstraße 12-14 63450 Hanau Tel.: +49 (0) 6181/35-0 E-Mail: pr@heraeus.com	<b>Andreas Hettich GmbH &amp; Co.KG</b> Föhrenstr.12 D-78532 Tuttlingen Tel.: +49 7461 / 705-0 Fax: +49 7461 / 705-125 E-Mail: info@hettichlab.com
<b>Köttermann GmbH &amp; Co KG</b> Industriestrasse 2-10 D-31311 Uetze/Hänigsen  Telefon: +49 5147 976-0 Fax: +49 5147 976-844	<b>Custom Laboratory Services</b> Invitrogen Corporation EvoQuest™ Laboratory Services 1600 Faraday Avenue Carlsbad, CA 92008/USA Fax: +44 (0) 141 814 3236 euroevoquest@invitrogen.com
<b>KA®-Werke GmbH &amp; CO. KG</b> Janke & Kunkel-Str. 10 D-79219 Staufen Tel.: +49 7633 831-0 Fax: +49 7633 831-98 E-Mail: info@ika.de	<b>Gilson, Inc.</b> 3000 Parmenter Street P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA <b>Tel:</b> 608-836-1551 or 800-445-7661 e-mail: sales@gilson.com
<b>Kimberly-Clark Professional</b> Carl-Spaeter-Straße 17 56070 Koblenz-Rheinhafen Telefon 02 61 - 92 27-0 Telefax 02 61 - 92 27-488	<b>Becton, Dickinson and Company</b> 1 Becton Drive Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880 Attention: Privacy Officer privacy@bd.com
<b>Apple</b> 1 Infinite Loop Cupertino, CA 95014 408.996.1010	<b>Bayer AG</b> 51368 Leverkusen ++49 (0)214 / 30-1
<b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> Munich, Germany Phone: 49 89 6513 0 Fax: 49 89 6513 1169 E-Mail: Deorders@sial.com	<b>SARSTEDT AG &amp; Co.</b> Rommelsdorfer Straße Postfach 1220 51582 Nümbrecht Deutschland Tel.: +49 2293 305 0 Fax: +49 2293 305 282 E-Mail: info@sarstedt.com
<b>BRAND GMBH + CO KG</b> Otto-Schott Str. 25 97877 Wertheim Germany Tel.: +49 9342 808-0 Fax: +49 9342 808-236 E-Mail: info@brand.de Internet: http://www.brand.de	<b>Gerhard Menzel</b> Glasbearbeitungswerk GmbH&Co. KG Saarbrückener Str. 248 D-38116 Braunschweig  Telefon: +49 (0)531 590080 - Fax: +49 (0)531 509799

<b>Carl Zeiss AG</b> Carl-Zeiss-Str. 22 73447 Oberkochen Tel.: 07364 20 0 Fax: 07364 68 08 info@zeiss.de	<b>PAA Laboratories GmbH</b> PAA-Straße 1 A-4061 Pasching Austria Tel.: +43-7229-64865 Fax: +43-7229-64866
<b>Biochrom AG</b> Leonorenstr. 2-6 D-12247 Berlin Telefon: 030 / 77 99 06 0 Telefax: 030 / 77 10 01 2 E-Mail: info@biochrom.de	<b>QUALILAB</b> 1121, rue de la Bergeresse 45160 OLIVET FRANCE Email : contact@qualilab.com Tél. : + 33 (0)2 38 49 39 00 Fax : + 33 (0)2 38 49 38 19

## **2.2 Patienten**

### **2.2.1 Patientendaten und Einschlusskriterien**

Es wurde je eine Gruppe von Patienten mit CD3/19 depletiertem und mit CD34 selektioniertem Transplantat (historische Vergleichsgruppe) nach HSZT im Verlauf untersucht. Die CD34 selektionierte Gruppe umfasste 10, die CD3/19 depletierte Gruppe 18 Patienten. Es handelte sich um Patienten mit primär therapierefraktären, fortgeschrittenen hämatologischen Neoplasien oder Rezidivkrankungen nach einer intensiven Chemotherapie oder einer autologen oder allogenen HSZT. In der der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe wurde im Gegensatz zur CD34 Gruppe ein dosisreduziertes Konditionierungsregime zur haploidenten HSZT verwendet.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Leukapherese**

Zur Mobilisierung von peripheren hämatopoetischen Stammzellen wurden die Spender 5 Tage mit 2x5µg/kg/Tag humanem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF (Filgrastim, Neupogen®, Amgen, Deutschland, oder Lenograstim, Granocyte®, Chugai Pharma, Deutschland) behandelt. Die Stammzellentnahme wurde an den Tagen 4 und 5 mit einem Baxter CS3000 PLUS (Baxter, Deutschland) oder einem Cobe-Spectra (COBE BCT Inc., Lakewood, CO, USA) Zellseparator durchgeführt. Je Spender wurden 9-15 L Blut mit einem Durchlauf von 50-80mL/min an einem oder zwei aufeinander folgenden Tagen aufbereitet. Ziel

war nach CD3/CD19 Depletion eine Mindestanzahl von  $6 \times 10^6$  CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers; nach CD34 Selektion  $>10 \times 10^6$  CD34+ Zellen. Die Zellen wurden nach immunomagnetischer Aufbereitung vor Beginn der Konditionierung des Empfängers kryokonserviert.

### **2.3.2 CD3/CD19 Depletion und CD34 Selektion**

Die Patienten wurden mit entweder CD34 selektionierten oder CD3/19 depletierten peripheren Stammzellen transplantiert. CD34-selektionierte Stammzellen waren das Ergebnis einer immunomagnetischen Positivselektion, während die CD3/19 depletierten Stammzellen das Ergebnis einer Negativselektion von CD3 bzw. CD19 markierten Zellen waren (unter Verwendung des automatisierten CliniMACS Gerätes von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) [136]. Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) wurden hierbei entweder direkt aufbreitet oder mit einem äquivalenten Volumen an autologem Plasma gemischt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden sie einmal mit CliniMACS PBS Puffer (phosphat-gepufferte Salze ergänzt durch 1mM EDTA und 0,4% Human Albumin) gewaschen und danach entweder mit immunomagnetischen anti-CD34 Beads oder anti-CD3 und anti-CD19 Beads inkubiert (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland). Die Menge der genutzten Beads wurde nach den vom Hersteller ausgegebenen Anweisungen berechnet. Für die CD34 Selektion wurde 1 Fläschchen (7,5ml) für maximal  $6 \times 10^{10}$  WBC mit einem Maximum von  $6 \times 10^8$  CD34+Zellen verwendet, für die CD3/19 Depletion wurde ein Fläschchen für jeweils  $4 \times 10^{10}$  MNC mit maximal  $15 \times 10^9$  CD3+ T-Zellen und  $5 \times 10^9$  CD19+ Zellen verwendet. Abschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert, zwei (CD34) oder einmal (CD3/19) mit dem CliniMACS PBS Puffer gewaschen, in 100-300 ml Pufferlösung resuspendiert und dann mit dem oben bereits erwähnten automatisierten CliniMACS Gerät aufbereitet. Es wurde wie vom Hersteller empfohlen entweder das Programm „Selection“ für die CD34-Selektion oder „Depletion 2.1“ für die CD3/CD19-Depletion verwendet.

Beide Gruppen enthielten nach Transplantation keine Immunsuppression; Patienten der CD34 selektionierten Gruppe erhielten nach Transplantation G-CSF

bis zum kompletten Engraftment, während dies bei der CD3/19 Gruppe aufgrund der inzwischen bekannten potentiell negativen Auswirkung von G-CSF nach Stammzelltransplantation nicht mehr durchgeführt wurde [152].

### 2.3.3 Konditionierung

Die Konditionierung und Transplantation der CD34 selektioniert transplantierten Patienten erfolgte mit 12 Gy Ganzkörperbestrahlung (TBI) (von Tag -6 bis Tag-4), Cyclophosphamid (120 mg/kg) (Tag-3 und Tag-2) mit oder ohne Etoposid (40 mg/kg) oder Thiotepa (10 mg/kg).

Die Konditionierung der CD3/19 depletiert transplantierten Patienten wurde dosisreduziert mit Fludarabin (40 mg/m<sup>2</sup>, von Tag -8 bis Tag -4) Thiotepa (2 x 5 mg/kg an Tag -3), Melphalan (60 mg/m<sup>2</sup>, an Tag -2 und Tag -1) und OKT-3 (5 mg/Tag, von Tag -5 bis +14) durchgeführt.

Zur Infektionsprophylaxe wurden folgende Medikamente in der angegebenen Dosierung verwendet (Tabelle 11):

**Tabelle 11; Infektionsprophylaxe**

Medikament	Dosierung	Dauer
Levofloxacin (Tavanic®)	500-0-0 mg	Die Prophylaxen sollten bis zum Tag +30 fortgeführt werden.  Die Prophylaxen mit Cotrim, Zovirax und Phlebogamma/Polyglobin sollten bis Tag +100 oder solange Immunsuppression vorherrscht durchgeführt werden.
Fluconazol (Diflucan®) oder bei Pilzinfektion in der Vorgeschichte Voriconazol (Vfend®)	200-0-200 mg	
Aciclovir (Zovirax®)	400-800-400 mg	
Phlebogamma 5% alternativ Polyglobin 5%	300 ml oder 15 g alle 3 Wochen	
Trimethoprim 160mg + Sulfamethoxazol 800mg (Cotrim forte®)	1 Tablette Mo-Mi-Fr	
Alternativ zu Cotrim: Pentocarinat Inhalation	300 mg alle 3 Wochen	

An Tag 0 erhielten die Patienten das kryokonservierte Transplantat.

Bei einem Rückfall oder einem Fortschreiten der zu Grunde liegenden Erkrankung, erhielten die Patienten zusätzliche Spenderlymphozyteninfusionen.

### **2.3.4 Evaluation des Engraftments, des Chimärismus, der Immunrekonstitution und von Spender Lymphozyten Infusionen**

Zur Evaluation des Chimärismus nach HSZT wurde eine Multiplex-PCR-Amplifikation von Short Tandem Repeats (STR) verwendet [14]. STR sind hoch polymorphe, einfache, kurze, nicht kodierende Sequenzen von 2-7 DNA Basen. Diese DNA Sequenzen wiederholen sich mehrfach hintereinander. Die Zahl der Repeats, und somit die Länge eines STR Locus variiert von einer Person zur anderen, auch in einer Familie und auch bei HLA-identischen Geschwistern. Das menschliche Genom enthält zahlreiche verschiedene STR-Loci. Die einzigen Individuen, die ein gleiches Muster von STR haben sind eineiige Zwillinge, die definitionsgemäß identisch sind. In der Stammzelltransplantation wird durch Chimärismusanalyse das Angehen bzw. die Abstoßung eines Transplantates beurteilt.

Die Immunrekonstitution und das Engraftment wurden mittels Durchflusszytometrie und Auszählung des peripheren Blutes analysiert. Die Rekonstitution der CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup> Zellen wurden in der ersten Zeit nach Transplantation in 2-4 wöchigen Intervallen später alle 3 Monate beurteilt. Das Engraftment wurde definiert als der erste Tag an dem die absolute Neutrophilenzahl konstant über 500 Zellen/ $\mu$ L lag. Das Thrombozytenengraftment wurde als der erste Tag mit konstant mehr als 20.000 Thrombozyten/ $\mu$ L definiert – ohne zusätzliche Plättchentransfusionen.

### **2.3.5 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen**

Durch die Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation ist eine Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren (EDTA) Blut möglich. Aufgrund des unterschiedlichen Dichtegradienten lassen sie sich mit dieser Methode von anderen Zellen im peripheren Blut trennen. Die einzelnen Zellen ordnen sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte an. Lymphozyten und Monozyten finden sich regelhaft in der Interphase zwischen dem Überstand, der aus Plasma und Thrombozyten gebildet wird und dem verwendeten Medium, dem so genannten Ficoll-Hypaqua. Dieses wässrige Medium, das mit synthetischen Polysacchariden versetzt ist, dient als eine Art Filter, der für die einzelnen Blutbestandteile je nach deren Dichte unterschiedliche durchlässig ist.



Da Erythrozyten und Granulozyten die höchste Dichte der Blutbestandteile aufweisen, bilden sie das Zellsediment. Hierzu werden 15 ml EDTA-Blut mit 15 ml Natriumphosphatpuffer (PBS) verdünnt. Anschließend wurden 20ml Ficoll-Hypaqua Medium untergeschichtet. Nach dreißigminütiger Zentrifugation bei 650 g und 4 °C, werden die mononukleären Zellen, die sich (wie oben beschrieben) in der Grenzschicht der beiden oberen Phasen befanden aufgenommen und noch zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, nun jeweils 10 Minuten bei 450g und 4 °C. Das sich auf diese Weise gebildete Pellet kann weiterverarbeitet verwendet werden. Anschließend werden die Zellen bis zur Durchführung der Experimente, sofern diese nicht gleich im Anschluss durchführbar waren bei -80 °C kryokonserviert.

### **2.3.6 Gefrier Aufbewahrung der Zellen**

Um Zellen einzufrieren, muss zuerst in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt werden, um die benötigte Menge an Einfriermedium zu berechnen. Anschließend werden die Zellen bei 400g für 10 min abzentrifugiert, um dann im Einfriermedium aufgenommen zu werden. Das Einfriermedium enthält 90% FCS und 10% DMSO. Die Zellen werden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$   $\mu\text{L}$  eingefroren, dies stellt die Grundlage zur Berechnung der benötigten Menge an Einfriermedium dar. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryovials in einem Kryoeinfriergerät bei -80 °C eingefroren. Dies garantiert ein allmähliches kontrolliertes Einfrieren der Zellen und langsames Eindringen des DMSO in die Zellen.

### **2.3.7 Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und umgehend in 10ml Auftaumedium (RPMI 60% und FCS 40%), das in 15ml Falcon Röhrchen vorgelegt war und ebenfalls auf 37 °C vorgewärmt wurde, überführt. Daraufhin wurden die Zellen bei 400g für 5 min abzentrifugiert und anschließend erneut mit Medium gewaschen. Anschließend konnte die FACS Messung bei den Zellen durchgeführt werden. Durch Vergleichsproben wurde gesichert, dass die Bestimmung an gefrorenen Zellen der Bestimmung an frischen Zellen entspricht.

### **2.3.8 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie hat sich als einfaches und schnelles Verfahren zur Phänotypisierung mononukleärer Zellen in der wissenschaftlichen Arbeit und der diagnostischen Routine fest etabliert [82]. Sie ermöglicht die Analyse bestimmter Oberflächenantigene durch die Markierung der Zellen mit oberflächenspezifischen fluoreszierenden Farbstoffen. Die Methode ist sehr komplex und erlaubt eine Vielzahl an Untersuchungen [71].

Es handelt sich bei der Durchflusszytometrie um eine Methode, die das Quantifizieren, die Differenzierung und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Einzelzellen und Mikropartikeln in einer Suspension ermöglicht. Die Grundlage hierfür bilden die Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen nach Anregung durch einen monochromatischen Laser. Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl, so verursacht sie ein Streulicht, das je nach Größe und Strukturreichheit der Zelle variiert. Hierbei werden folgende Parameter gemessen:

a) Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC)

Dies bezeichnet das in einem Winkel von ca.  $180^\circ$  gestreute Licht, welches ein relatives Maß für die Größe einer Zelle ist.

b) Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC)

Dies bezeichnet das in einem Winkel von ca.  $90^\circ$  gestreute Licht, welches ein relatives Maß für die Granularität einer Zelle ist.

Die Untersuchung bestimmter Merkmale einzelner Zellen wird mit einer Markierung des gesuchten Merkmales durch monoklonale Antikörper erreicht. Man spricht hierbei von der so genannten fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS-Analyse), die eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen zulässt. Man verwendet hierzu monoklonale Antikörper gegen das zu untersuchende Oberflächenmerkmal, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Durch den monochromatischen Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes definiert angeregt und hierdurch auf ein höheres Energieniveau gehoben. Durch Abgabe von Energie in Form von Pho-

tonen fallen die Elektronen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die Proportionalität der emittierten Photonenkonzentration zur Quantität der auf den Zellen gebundenen Antikörper ermöglicht eine genaue Analyse der Zellen. Die Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe wird durch die unterschiedlichen Emissionsspektren der jeweiligen Farbstoffe ermöglicht.

Unter Berücksichtigung der Fluoreszenz werden zusätzlich zu FSC und SSC folgende Parameter gemessen:

Fluoreszenz 1: geeigneter Fluoreszenzfarbstoff: FITC (Fluoresceinisothiocyanat)

- Anregung bei 480nm; Abstrahlung bei 530 nm

Fluoreszenz 2: geeigneter Fluoreszenzfarbstoff: PE (Phycoerythrin)

- Anregung bei 480nm; Abstrahlung bei 585 nm

Fluoreszenz 3: geeigneter Fluoreszenzfarbstoff PC-5/PE-APC (PE-Zyanin 5 / Allophycocyanin)

- Anregung bei 480nm; Abstrahlung bei 660-675 nm

Fluoreszenz 4: geeigneter Fluoreszenzfarbstoff PE-CY7 (PE-Zyanin 7)

- Anregung bei 480nm; Abstrahlung bei 750-810 nm

Bei der durchflußzytometrischen Analyse des TCR  $\nu\beta$ -Repertoires ist wichtig festzuhalten, dass im Gegensatz zur ebenfalls etablierten genetischen CD3-Spektratypisierung nur eine Beurteilung der tatsächlich exprimierten Oberflächenantigene erlaubt. Jedoch besitzt die Untersuchung des TCR Repertoires mittels Durchflußzytometrie im Vergleich zur CDR3-Spektratypisierung den Vorteil, dass sie nicht nur schnell und einfach durchführbar ist, sondern darüber hinaus auch die Analyse des  $\nu\beta$ -Repertoires innerhalb von T-Zell Subpopulationen und eine genaue quantitative Auswertung der positiven Zellen zulässt [148].

Um die Vergleichbarkeit der gewonnenen Werte zu gewährleisten, ist ein standardisiertes Vorgehen bei der FACS Messung von zentraler Bedeutung. Grundsätzlich gilt es bei jeder durchflußzytometrischen Analyse darauf zu achten, dass man die unerwünschte Einstrahlung eines verwendeten Fluorochroms in einen anderen Fluoreszenzkanal möglichst verhindert, um keine falsch positiven

Ergebnisse zu erhalten. Dieses Problem kann mit einer ausbalancierten Kompensation umgangen werden. Diese Kompensation ist sowohl auf Hardware als auch auf Softwarebasis möglich. Mit diesen in Vorversuchen ermittelten Grundeinstellungen sollten alle weiteren Messungen durchgeführt werden, da die erhobenen Daten andernfalls nicht vergleichbar sind. Regelmäßig durchgeführte Qualitätskontrollen sind zu beachten und durchzuführen. Es wurden pro Probenansatz, wie vom Hersteller empfohlen, 10 000 Zellen gemessen und es fand pro Probe eine Messung statt. Eine weitere Fehlermöglichkeit der Durchflusszytometrie liegt in einer unspezifischen Antikörperbindung, die falsch positive Zellen zur Folge haben kann. Zum Ausgleich und zur Kompensation der Autofluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz, die durch unspezifische Bindung fluoreszenzfarbstoffkonjugierter Antikörper ausgelöst wird, sollte eine Isotypenkontrolle durchgeführt werden. Diese Negativkontrolle ermöglicht es, die Hintergrundfluoreszenz als negativ zu definieren.

### **2.3.9 Messen der Proben**

Die Messung der Proben erfolgte an eine FACS Calibur Geräte der Firma Becton Dickinson. Es wurde die zugehörige Software Cell Quest Prism 3 verwendet, mit der auch die Rohauswertung der Daten erfolgte. Die verwendeten Computer waren Apple Macintosh Rechner.

### **2.3.10 Durchflusszytometrische Untersuchung des TCR-V $\beta$ - Repertoires**

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung des TCR V $\beta$ -Repertoires werden 100  $\mu$ l Vollblut mit 20  $\mu$ l TCR Antikörpern (Tabelle 4) und 10  $\mu$ l CD3-PC5 Antikörpern versetzt, gevortext und anschließend mindestens 20 Minuten bei 18-25°C im Dunkeln inkubiert. Die Mengenangaben entsprechen den Vorgaben des Herstellers. Bei der Färbung durch das TCR V $\beta$  Repertoire Kit handelt es sich um eine Mehrfachfärbung, somit wurden alle Antikörper gleichzeitig hinzugegeben und inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Zellen mit FACS-Lyse lysiert (um die Erythrozyten aus dem Ansatz zu entfernen) und abschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Das in diesem FACS-Puffer enthaltene Serum bindet nun eventuell nicht gebundene, überschüssige Antikörper, die noch in der Zellsuspension vorliegen und die Messung theoretisch stören könnten.

Nach erneuter Zentrifugation und Dekantieren sind die serumgebundenen und freien Antikörper aus dem Ansatz entfernt und lediglich zellgebundene Antikörper sind nun noch in der Suspension enthalten. Durch diese Waschung wird somit eine Verfälschung des Ergebnisses verhindert. Die durchflusszytometrische Untersuchung mit einem FACS Calibur Gerät (Becton Dickinson) schloss sich innerhalb der nächsten 24h an. Bis zur Analyse wurden die Zellen bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

Durch die Kombination von drei V $\beta$ -spezifischen Antikörper in einem Reagenz, mit jedoch nur zwei Farben (ein V $\beta$ -Antikörper ist FITC-markiert, ein anderer PE; der dritte V $\beta$ -Antikörper ist sowohl FITC- als auch PE-markiert) lassen sich drei aufgrund ihres TCR unterschiedliche T-Zell-Populationen in einem FL1/FL2-Histogramm darstellen, wobei sich der sowohl FITC- als auch PE-markierte Antikörper im zweiten Quadranten des FL1/FL2-Histogramms befindet. Alle V $\beta$ -Reagenzien wurden noch CD3-PC5 Antikörper gegengefärbt, um das Gaten auf die gewünschte T-Zellpopulation zu ermöglichen. Mit IgG1 wurde eine Kontrollfärbung durchgeführt.

Nach Inkubation der Antikörper mit Vollblut und der beschriebenen Vorbereitung der Probe, wurden die Zellen an einem FACS-Calibur Gerät gemessen und untersucht. Zuerst wurde in der FSC/SSC Darstellung ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gesetzt. Aus dieser Population wurden durch ein weiteres Gate alle CD3+ markierten Zellen herausgelesen, was die Population aller T-Zellen ergab. Anschließend wurden die einzelnen Proben auf dieses T-Zell Gate ausgerichtet und der prozentuale Anteil der einzelnen Rezeptorenfamilien an den T-Zellen konnte ermittelt werden.

### **2.3.11 Durchflusszytometrische Untersuchung des NK-Zell-Rezeptor-Repertoires**

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung der NK-Zellen, wurden 100 $\mu$ L Vollblut mit 25 $\mu$ L der gewünschten Antikörpermischung bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Zellen mit FACSLyse lysiert und abschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Eventuell nicht gebundene, überschüssige Antikörper können durch diese Waschung aus der Probe entfernt

werden, um somit eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern. Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit einem FACS Calibur Gerät (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur Analyse, die innerhalb der nächsten 24h durchgeführt wurde bei 2-8 °C im Dunkeln gelagert.

Der Bestimmung der CD158e Expression liegt eine indirekte immunhistochemische Färbung zu Grunde. Zunächst wurde die Probe mit einem spezifischen Primärantikörper, in diesem Fall DX9 PerCP konjugiert. In einem zweiten Schritt wurde nun ein Biotin gekoppelter Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtete. Die Farbentstehung wird hierbei durch eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst. Nur so kann eine Markierung der CD158e Rezeptoren erreicht werden.

### **2.3.12 Auswertung der Durchflusszytometrie**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mittels der Software GraphPad Prism (Version 3.0) der Firma GraphPad Software Incorporated durchgeführt, die eine statistische Analyse und die graphische Darstellung der Daten ermöglicht.

### **2.3.13 Statistische Auswertung**

Das Engraftment und die Zeit bis zum Erreichen eines kompletten Chimärismus wurden mit der Kaplan-Meier Methode (Produkt-Limit-Schätzer) ausgewertet. Die Kurven beginnen im Gegensatz zu üblichen Überlebenskurven auf der Ordinate bei 0, um deutlich zu machen, bei wie viel Prozent der untersuchten Gruppe das beobachtete Ereignis schon eingetreten ist. Auf der Abszisse wird die Zeit seit Beobachtungsbeginn festgehalten. Es wird also hierbei das Ereignis gegen die Zeit aufgetragen.

Während zu Beginn der Kurve mit der Kaplan-Meier Methode eine sehr genaue Schätzung möglich ist, da hier der Kurve eine relativ große Anzahl von Patienten zugrunde liegt, ist im Verlauf der Kurve mit einer größeren Ungenauigkeit zu rechnen, da sich die Kurve auf immer weniger Patientendaten stützen kann, da sich ja bei immer mehr Patienten das Ereignis bereits eingestellt hat.

Die Auswertung der Transfusionsbedürftigkeit, sowie die Entwicklung der NK-, B- und T-Zellen erfolgte rein deskriptiv mit Angabe des Medianes unter Angabe der Streuung. Die graphische Darstellung erfolgte durch ein Säulen-Diagramm.

Die Stammzelltransplantation mit Anreicherung von CD34 positiven Zellen, ist ein Verfahren, das in dieser Form an der Universitätsklinik Tübingen zum aktuellen Zeitpunkt nicht mehr durchgeführt wird. Deshalb wurde bei dem im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Vergleich von CD3/CD19 Depletion und CD34 Selektion eine historische Kontrollgruppe aus Tübingen herangezogen. Die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen ist dennoch gewährleistet, da die Zusammensetzung des Transplantates hinsichtlich Gehalts an CD34+ Stammzellen in beiden Fällen vergleichbar war und sich sowohl die Diagnosen als auch die Risikoeinschätzung der Grunderkrankungen in beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden. Darüber hinaus lagen in beiden Gruppen ähnliche klinische Standards vor, da beiden Gruppen im gleichen Zentrum behandelt wurden.

Die unterschiedliche Anzahl an Patienten bedingt sich durch den historischen Vergleich. Diesem Unterschied wurde jedoch durch die Auswertung der Mediane Rechnung getragen. Beide Gruppen erhielten ein unterschiedliches Konditionierungsprotokoll zur haploidenten HSZT. Bei historischen Vergleichen ist natürlich immer die eventuell zwischenzeitlich stattgehabte Weiterentwicklung der Medizin auf diesem Gebiet zu bedenken, die unter Umständen Einfluss auf das Ergebnis haben kann. Da in beiden Gruppen alle jeweils zu diesem Zeitpunkt in Tübingen in die Studien aufgenommenen Patienten eingeschlossen wurden, ist eine Verfälschung der Werte durch eventuell stattgehabte retrospektive Selektion ausgeschlossen.

Der Vergleich wurde abschließend geführt, um die Methode der Stammzelltransplantation nach CD3/19 Depletion zusätzlich kritisch zu hinterfragen und weiter zu evaluieren – das Hauptgewicht der Arbeit lag jedoch auf der Untersuchung der Immunrestitution nach CD3/19 depletierter allogener haploidenter Stammzelltransplantation bei Erwachsenen.

Das Engraftment und die Zeit bis zum Erreichen eines kompletten Chimärismus wurden in den einzelnen Gruppen, wie bereits oben erwähnt, mit der Kaplan-Meier Methode (Produkt-Limit-Schätzer) ausgewertet. Der statistische Vergleich des Engraftment und der Zeit bis zum Erreichen eines kompletten Chimärismus in der CD3/CD19 depletierten und CD34 selektierten Gruppe wurden mit dem Log-Rang-Test durchgeführt. Hierbei werden zwei Überlebenskurven miteinander verglichen und auf ihre statistische Signifikanz hin bewertet. Mit dem Log-Rang-Test können prinzipiell alle Arten von Experimenten ausgewertet werden, bei denen das Ergebnis als genau definierter Endpunkt zu einer bestimmten Zeit ausgedrückt ist. Ob dieser Endpunkt nun Tod, erreichte Mindestzellzahl oder vollständiger Chimärismus ist, spielt hierbei keine Rolle. Der Endpunkt muss nur ein einmaliges Ereignis sein.

Der Log-Rang-Test, dessen Name darauf zurückgeht, dass sich das Verfahren aus einem Test ableiten lässt, der auf dem Logarithmus der Ränge der Daten basiert, gilt als Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche und gehört zu den nichtparametrischen Verfahren [157]. Fehlerquellen ergeben sich bei diesem Test durch Patienten oder Ereignisse, die sich der weiteren Beobachtung entziehen, man spricht dann hierbei von so genannten „drop outs“. Sie würden dann bis zu dem Tag in den Test einfließen, an dem die letzte Beobachtung durchgeführt wurde. Stellt sich nun bei einem „drop out“ Patienten das untersuchte Ereignis ein, hat dies einen systematischer Fehler zur Folge. Dieser Fehler spielt jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Rolle, da kein Patient aus dem follow-up herausfiel.

Der Vergleich der Transfusionsbedürftigkeit sowie der NK-, B-, und T-Zellentwicklung wurde mit dem Mann-Whitney Test geführt. Die Darstellung erfolgte hierbei unter Angabe der Mediane und der Signifikanzen in einem Säulen-Diagramm. Der Mann-Whitney Test, ist ein nichtparametrischer Test, der zwei unpaarige Gruppen untersucht. Ziel des Testes ist es, die Signifikanz der Übereinstimmung von zwei Verteilungen zu überprüfen. Die Testwahrscheinlichkeit wurde beim einem p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.



### **3. Ergebnisse**

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Immunrekonstitution nach CD3/19 depletierter allogener haploidenter Stammzelltransplantation bei Erwachsenen. Im Speziellen wurden hier die Entwicklung des NK-Zell Rezeptor-repertoires und der T-Zell Rezeptoren der V $\beta$ -Subgruppe eingehender untersucht. Durch die Korrelation mit dem klinischen Verlauf der Patienten wurden die gefundenen Ergebnisse auf ihre funktionellen Auswirkungen hin überprüft. Darüber hinaus wird die Immunrekonstitution in einem historischen Vergleich von Patienten nach einer CD34 angereicherten und einer CD3/19 depletierten HSZT verglichen und der Verlauf anhand beider Patientengruppen aufgezeigt und ausgewertet. Dieser Vergleich findet sich am Ende des Ergebnisteils.

#### ***3.1 CD3/CD19 depletierte Gruppe***

##### Patientenkollektiv CD3/19-depletierte HSZT:

In den Jahren zwischen 2003 und 2007 wurden an der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen 18 Patienten, 8 Frauen und 10 Männer, mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen von haploidenten Familienspendern mit CD3/19 depletierten Stammzellen transplantiert (Tabelle 12). Die Diagnosen der Patienten waren 10 akute myeloische Leukämien (AML), 5 akute lymphoblastischen Leukämien (ALL), 1 chronisch myeloische Leukämien (CML) sowie 1 Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und 1 multiples Myelom (MM) (Tabelle 12). Alle Patienten hatten eine Hoch-Risiko Erkrankung (n=18) mit Rückfall nach vorangegangener Transplantat oder Therapierefraktärität. Zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation waren 4 Patienten in Teil-Remission und 14 Patienten in Komplet-Remission. Das mediane Durchschnittsalter der Patienten lag bei 40 Jahren (Streuung: 21-59). Haploidente Spender waren Mütter (n=4), Schwestern (n=2), Brüder (n=5), Töchter (n=1), Söhne (n=3) oder Cousins (n=3) der Patienten. Die HLA-Typisierung, die mit serologischen Standard-Methoden und Polymerase-Ketten-Reaktion mit sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Proben durchgeführt wurde, ergab bei 5 Spender-Empfänger

Paaren ein HLA-Mismatch in 2 und bei 13 Paaren ein HLA-Mismatch in mindestens 3 Genloci.

Tabelle 12; Patienten in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe

#	DIAGNOSE	ALTER	CD34+ /kg KG $\times 10^6$	CD3+ /kg KG $\times 10^4$	CD34 neg Zellen %	Zeit bis Neutrophile > 500/ $\mu$ L (in Tagen)	Zeit bis Thrombozyten > 20.000/ $\mu$ L (in Tagen)	KIR- Mismatch
01	AML	31	10,5	0,06	98,5	11,0	13,0	JA
02	ALL	37	10,9	0,9	97,8	12,0	11,0	JA
03	AML	58	7,6	1,3	99,1	13,0	9,0	JA
04	MM	52	7,5	2,0	89,9	15,0	11,0	NEIN
05	ALL	35	6,2	0,2	99,3	17,0	14,0	JA
06	ALL	30	9,7	8,2	89,8	11,0	11,0	JA
07	AML	58	5,2	2,1	99,0	13,0	13,0	JA
08	NHL	54	17,0	4,0	97,3	13,0	11,0	JA
09	ALL	40	4,9	6,6	98,7	11,0	14,0	JA
10	AML	40	8,3	7,8	98,2	13,0	8,0	NEIN
11	AML	41	6,2	9,0	98,5	10,0	12,0	NEIN
12	AML	21	9,6	7,3	98,7	12,0	8,0	JA
13	AML	58	18,0	2,2	97,4	13,0	7,0	JA
14	CML	45	9,4	9,2	97,8	11,0	8,0	NEIN
15	AML	39	12,9	3,0	98,1	13,0	11,0	NEIN
16	AML	45	8,9	1,2	98,5	10,0	10,0	NEIN
17	AML	59	8,6	2,3	98,2	12,0	10,0	JA
18	ALL	29	14,8	2	98,9	10,0	9,0	NEIN
	<b>MEDIAN</b>	40	9,2	2,2	98,4	12,0	11,0	

Für die Untersuchung des Engraftments sowie der Immunrekonstitution wurden die Daten aller 18 Patienten in der CD3/CD19 Gruppe aufgenommen, in die Auswertung der CD34 selektioniert transplantierten Gruppe gingen ebenfalls alle 10 aufgeführten Patienten ein. An einzelnen Messtagen lagen weniger Werte als aufgeführte Patienten vor, da nicht von allen Patienten zu jedem Zeitpunkt Proben vorlagen.

### 3.2 Hämatopoetische Rekonstitution

Unter Engraftment versteht man den Prozess des Anwachsens transplantierte Spenderstammzellen im Knochenmark des Empfängers und die Produktion von Blutzellen der jeweiligen Zelllinie. Das Engraftment ist evident, wenn neue weiße und rote Blutzellen sowie Thrombozyten im Blut des Empfängers nach Stammzelltransplantation auftreten. Die exakten Kriterien für ein erfolgreiches Engraftment sind bei den jeweiligen Zelllinien ausgeführt.

### 3.2.1 Thrombozyten

Das Engraftment der Thrombozyten wurde als >3 Tage in Folge mit konstant mehr als 20 000 Thrombozyten/ $\mu$ L ohne Gabe von Thrombozyten-Konzentraten definiert.

In der CD3/19 Gruppe lag der Median der Thrombozyten-Rekonstitution bei 11 Tagen (im Bereich von 7-14) nach Transplantation (Abbildung 5).

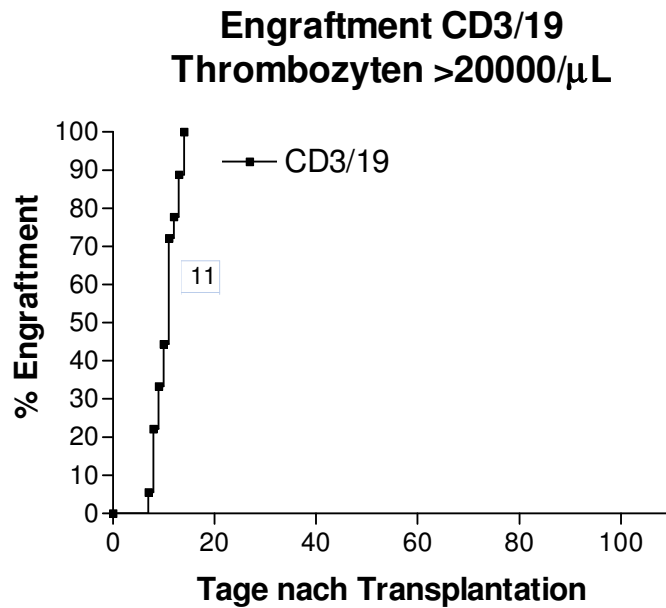


Abbildung 5; Engraftment der Thrombozyten der CD3/19 depletierten Gruppe (Kaplan-Meier-Kurve). Die angegebene Zahl zeigt den Median

### 3.2.2 Neutrophile Granulozyten

Das Engraftment der neutrophilen Granulozyten wurde definiert als >3 Tage in Folge an dem die absolute Neutrophilen Zahl konstant über 500 Zellen/ $\mu$ L lag.

Die Granulozyten-Regeneration lag in der CD3/19 depletierten Gruppe bei 12 Tagen (im Bereich von 10-17) nach Transplantation (Abbildung 6).

### Engraftment CD3/19 Neutrophile Granulozyten >500/ $\mu$ L

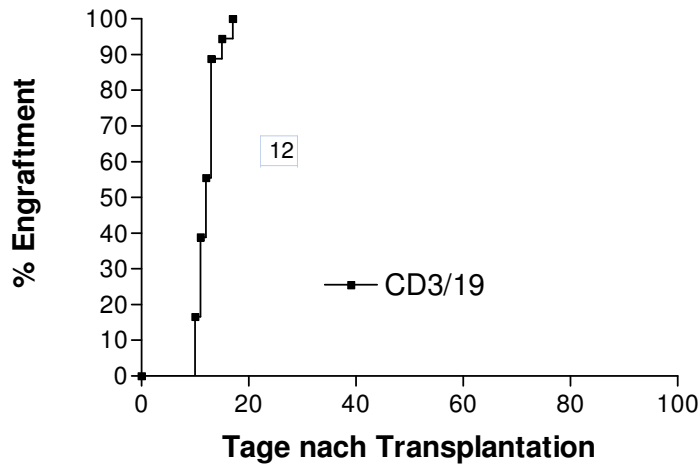


Abbildung 6; Engraftment der neutrophilen Granulozyten der CD3/19 depletierten Gruppe (Kaplan-Meier-Kurve). Die angegebene Zahl zeigt den Median

### 3.2.3 Chimärismus

In der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe erreichten alle Patienten spätestens 21 Tage (im Bereich von 12 bis 21 Tagen; im MEDIAN 14 Tage) nach Transplantation einen vollen Spender Chimärismus (Abbildung 7).

### Chimärismus CD3/19

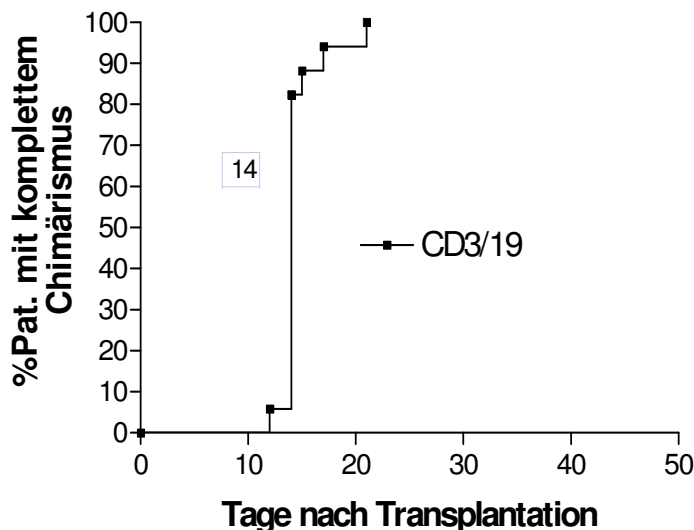


Abbildung 7; Chimärismus in der CD3/19 depletierten Gruppe (Kaplan-Meier-Kurve). Die angegebene Zahl zeigt den Median

### 3.3 Immunrekonstitution und Funktion

Die Immunrekonstitution wurde unter zwei Gesichtspunkten verglichen und untersucht. Zum einen wurden punktuelle Beobachtungen an Tag 50 und Tag 100 (+/- 20 Tage) durchgeführt, zum anderen wurde die Immunrekonstitution im Verlauf von Tag 0 bis Tag 400 beobachtet, um die Entwicklung über die Zeit nachzuvollziehen. Die Verlaufsdaten beziehen sich auf Beobachtungen an den Tagen 30, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200, 250 und 400 nach Transplantation. Da hier die Messwerte in einem Zeitraum von 10 Tagen (Messpunkt minus 10 Tage) erhoben wurden, ergeben sich kleine Unterschiede zu den Absolutzahlen der punktuellen Beobachtungen an Tag 50 und 100, jedoch gab es keinerlei Unterschiede in der Methodik der Untersuchung.

#### 3.3.1 Rekonstitution der natürlichen Killerzellen

Die Normwerte für die NK-Zellen in gesunden Kontrollen unterliegen einer breiten Streuung und befinden sich zwischen 6 und 29% der Lymphozyten im Normbereich; in absoluten Zahlen zwischen 80-1000 Zellen/ $\mu$ L. Es zeigte sich ein rasches Engraftment der NK-Zellen (0-2 Monate). Exemplarisch wurde die Absolutzahl an CD56+ Zellen an Tag 50 und 100 verglichen (jeweils +/- 20 Tage).

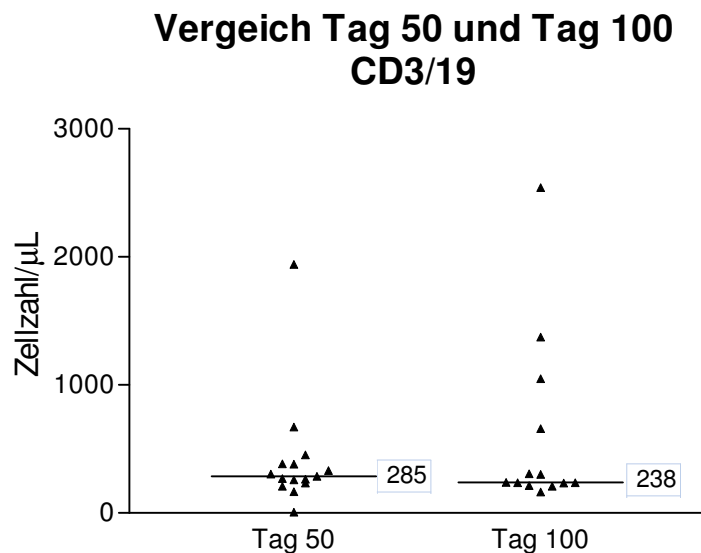


Abbildung 8; Vergleich der Absolutzahl der CD56 positiven Zellen an Tag 50 und an Tag 100 (+/-20 Tage). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

An beiden Messpunkten zeigen sich Werte im Normbereich, wobei sich an Tag 50 im Median 285 (Streuung: 6-1941) CD56+ Zellen/ $\mu$ L finden. An Tag 100 zeigen sich in im Median 238 (Streuung: 164-2541) CD56+ Zellen/ $\mu$ L (Abbildung 8).

Der Verlauf der Immunrekonstitution wurde von Tag 0 bis 400 nach Transplantation an den oben bezeichneten Messpunkten beobachtet.

Es ist zu beobachten, dass bereits 30 Tage nach Transplantation normal hohe Zellzahlen vorlagen. Die NK-Zellwerte steigen im Verlauf noch etwas an – bis ungefähr 400 Zellen/ $\mu$ L - bevor sich dann ab Tag 200 ein leichter Abfall einstellt und sich die NK-Zellwerte bei ungefähr 240 Zellen/ $\mu$ L einpendeln (Abbildung 9).

### CD3/19 Gruppe Median CD56

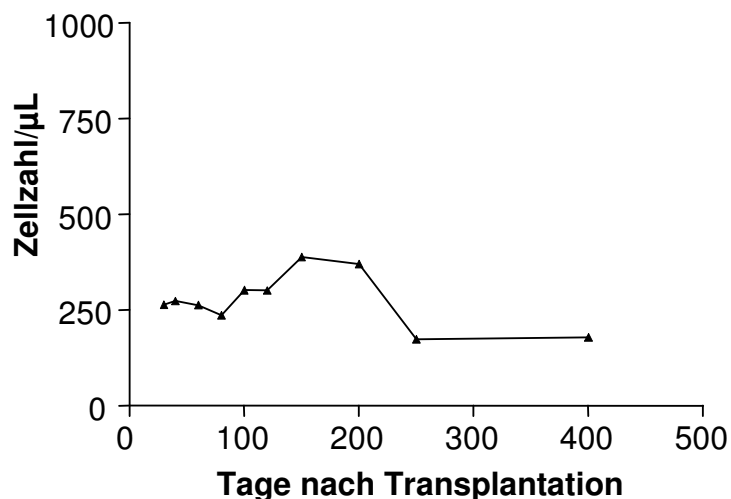


Abbildung 9; Mediane der CD 56+ Zellen im Verlauf in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe.

**Tabelle 13; Verlauf der CD56+ Immunrekonstitution**

Tage p. TX	MEDIAN	Streuung
30	264	1 - 534
40	274	178 - 1064
60	263	110 - 332
80	236	3 - 2809
100	302	103 - 2541
120	301	164 - 1373
150	389	87 - 494
200	370	80 - 1436
250	174	123 - 635
400	179	2 - 1503

### **3.3.1.1 Rekonstitution der CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> Subfamilien der natürlichen Killerzellen in der CD3/19 Gruppe**

Innerhalb der natürlichen Killerzellen können aufgrund ihrer Zelloberflächen zwei Subfamilien unterschieden werden. NK-Zellen mit niedriger CD56 bzw. CD16 Expression werden als CD56<sup>dim</sup> bzw. CD16<sup>dim</sup> bezeichnet, solche mit hoher CD56 bzw. CD16 Expression als CD56<sup>bright</sup> bzw. CD16<sup>bright</sup>. Durch unterschiedliche Markerexpression im FACS lassen sich die einzelnen Subpopulationen klar von einander unterscheiden.

Beim Großteil der natürlichen Killerzellen (ca. 90%) finden sich die so genannte CD56<sup>dim</sup> Isoform, des Oberflächenmarkers CD 56, sowie die CD16<sup>bright</sup> Isoform des CD16 Oberflächemarkers. Wohingegen ca. 10% der menschlichen NK-Zellen die Isoformen CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> exprimieren. Die jeweiligen Subpopulationen unterscheiden sich deutlich in ihrer zytolytischen Aktivität. Die CD56<sup>dim</sup> sind NK-Zellen mit hohem zytolytischen Potential, wohingegen die CD56<sup>bright</sup> die Fähigkeit besitzen, große Zytokin- und Chemokinmengen zu produzieren, jedoch deutlich weniger Zytotoxizität aufweisen [67]. Wir haben die Entwicklung dieser beiden Subfamilien der NK-Zellen in den ersten 100 Tagen nach Transplantation bei 8 CD3/19 depletiert transplantierten Patienten untersucht (Abbildung 10).

### Vergleich der CD56+ Subfamilien in % der NKZ CD3/19 Gruppe

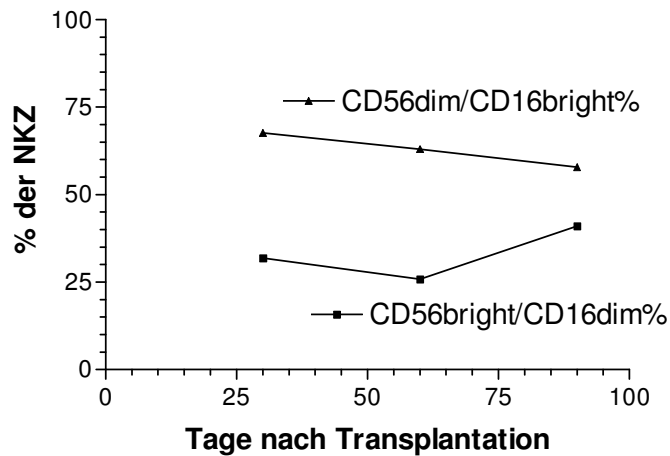


Abbildung 10; Entwicklung der CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> und der CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> NK-Zell Subfamilie in % der NKZ

Tabelle 14; Verlauf der CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> und CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> NK-Zell Subfamilie in % der NKZ

Tage p. TX	CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>dim</sup>		CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>bright</sup>	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
30	32	8 - 59	68	39 - 91
60	26	13 - 73	63	26 - 91
90	41	29 - 79	58	21 - 96

Die Untersuchung fand an Tag 30 (Streuung: 21-43), Tag 60 (Streuung: 45-70) und Tag 90 (Streuung: 84-100) statt. An Tag 30 liegen nur 7 Messwerte zu Grunde, da es zu diesem Zeitpunkt bei einem Patienten nicht möglich war eine Blutprobe zu asservieren. Die relativ breiten Streuwerte sind auf die unterschiedlichen Vorstellungsterminen der Patienten zurückzuführen, wobei die Abstände für die einzelnen Patienten jedoch konstant sind. Zellen, die CD56 positiv jedoch CD16 negativ waren, wurden nicht in die Auswertung aufgenommen. Alle Werte wurden in Medianen mit Streuung angegeben. Diese Untersuchung wurde nur in der CD3/19 Gruppe durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Erhebung, die CD34 selektionierte Gruppe schon abgeschlossen war.

Wir konnten an Tag 30 nach Transplantation mit 31,9% (Streuung= 7,9%-59,1%) CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> Zellen bei einem relativ hohen Anteil an



NK-Zellen im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Normalwerten bei gesunden Kontrollen ausmachen. Mit 67,6% (Streuung: 38,8%-91,0%) lagen die Werte für die CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> Subfamilie zu diesem Zeitpunkt deutlich unter denen der Normalkontrollen (=90% CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup>). Im Verlauf der ersten 100 Tage nach Transplantation steigen die CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> Zellen nach einem leichten Rückgang an Tag 60 (25,9%, Streuung: 4,9%-72,8%) an, während die CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> Zellen entsprechend abfallen. An Tag 90 nach Transplantation zeigt sich, dass sich beide Populationen gegensätzlich entwickelten, wobei die CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> Zellen mit 41,1% (Streuung: 2,2%–78,7%) noch gut 20% unter den Werten der CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> Zellen (57,9%, Streuung: 21,1%-96,4%) liegen.

### **3.3.2 Rekonstitution des Rezeptor-Repertoires natürlicher Killerzellen nach CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Bei 8 Patienten (#10, #11, #12, #13, #14, #15, #17, #18 –Tabelle 12) der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe wurde die Rekonstitution der NK-Zell Rezeptoren nach Transplantation beobachtet. In der CD34 selektionierten Gruppe lagen keine Proben zur Untersuchung des NKZ-Repertoires vor. Wir untersuchten an Tag 30, 60 und 90 mittels durchflusszytometrischer Analyse die NK-Zell Rezeptoren. Die Rezeptorenexpression wurde in gängiger Form im prozentualen Anteil an den NK-Zellen angegeben. NK-Zell Rezeptoren lassen sich in aktivierende und inhibierende Rezeptoren aufteilen. Die Besprechung der Rezeptor Rekonstitution erfolgt in zwei Teilen, wobei zuerst die aktivierenden und anschließend die inhibierenden Rezeptoren dargestellt werden.

#### **3.3.2.1 Aktivierende natürliche Killerzell-Rezeptoren**

Die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen sind im Prozess der Zellaktivierung von entscheidender Bedeutung. Es wurde eine Vielzahl von Rezeptortypen identifiziert, die als aktivierende NK-Zell Rezeptoren fungieren. Sie lassen sich in natürliche zytotoxische Rezeptoren, die Familie der NKG2D Rezeptoren, die HLA-bindenden aktivierenden Rezeptoren und die spezifisch für Moleküle von Mikroorganismen aktivierenden Rezeptoren aufteilen. In vorliegender Arbeit

wurden die natürlichen zytotoxischen Rezeptoren NKP30, NKP44 und NKP46 sowie die NKG2D Rezeptoren untersucht, um die Entwicklung der wichtigsten aktivierenden NK-Zellrezeptoren zu verfolgen und miteinander zu vergleichen.

#### ***3.3.2.1.1 Natürliche zytotoxische Rezeptoren***

Die Gruppe der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren ist einzigartig für NK-Zellen und ist für einen Großteil der NK Zell spezifischen Tumorzellerkennung verantwortlich [100]. Wir haben, wie erwähnt die Rekonstitution der drei Hauptproteine in der Gruppe der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren untersucht (Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 13). Sie gehören zu der Immunglobulin Superfamilie und sind mit Adapterproteinen verbunden, die in ihrer zytoplasmatischen Domäne so genannte „immunotyrosine-based activation motifs“ (ITAMs) enthalten und bei der Bindung eines Liganden eine Kinase aktivieren um auf diesem Wege zu einer Aktivierung der jeweiligen Zellen zu führen [101].

Wir konnten bei der Untersuchung aller drei NKP Rezeptoren beobachten, dass im Verlauf der ersten 100 Tage nach Transplantation der prozentuale Anteil der NK-Zellen, die NKP Rezeptoren exprimieren im Median deutlich zunimmt, jedoch muss die relativ große Streuung erwähnt werden. NKP30 (Abbildung 11) wird an Tag 30 von 41,08% (Streuung: 30,96% - 86,39%), an Tag 60 von 41,49% (Streuung: 9,61%-95,37%) und an Tag 90 von 49,82% (Streuung: 21,00%-91,41%) der NK-Zellen exprimiert. NKP46 (Abbildung 13) wird von der großen Mehrzahl der NK-Zellen exprimiert. An Tag 30 finden sich 83,30% (Streuung: 71,59% - 99,22%), an Tag 60, 92,45% (Streuung: 68,92%-98,50%) und an Tag 90, 91,13% (Streuung: 48,63% - 99,38%) NK-Zellen, die NKP46 exprimieren. NKP44 (Abbildung 12), das nur von aktivierten NK-Zellen exprimiert wird, findet sich im Verlauf auf weniger als 10% aller NK Zellen. An Tag 30 reicht die Streuung von 1,08% - 26,13% mit einem Median von 3,92%. 60 Tage nach Transplantation exprimierten 0% - 34,40% aller NK-Zellen NKP44 mit einem Median von 1,86%, an Tag 90 schließlich 7,88% mit einer Streuung von 0%-43,13%.

### CDNKP30/CD3- Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

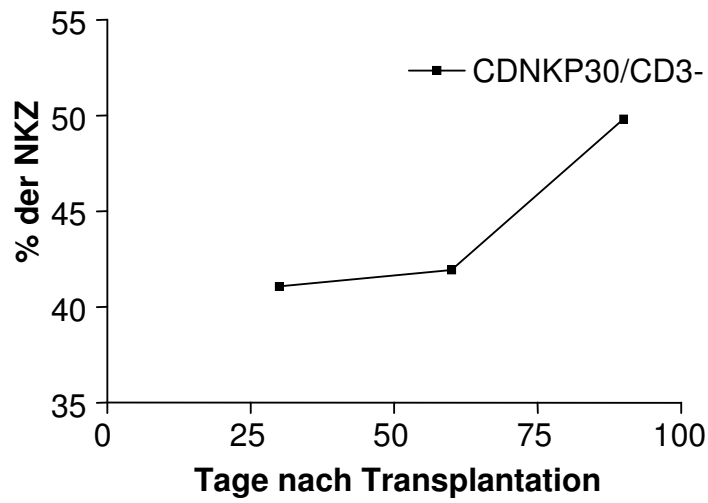


Abbildung 11; Entwicklung des CDNKP30 NK-Zell Rezeptors

### CDNKP44/CD3- Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

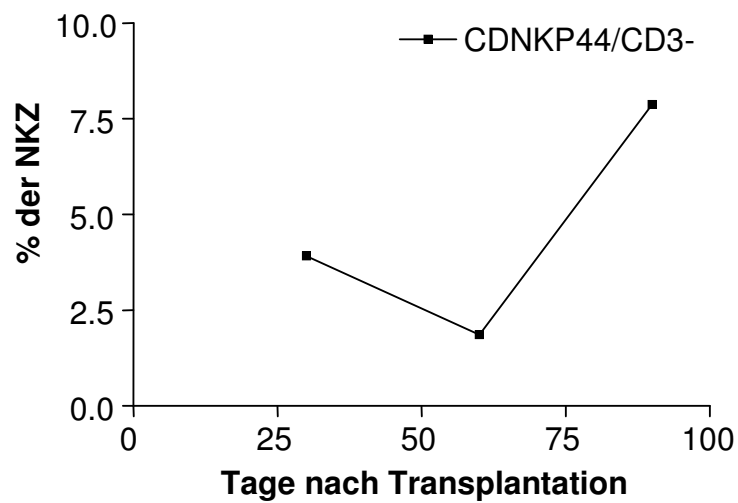


Abbildung 12; Entwicklung des CDNKP44 NK-Zell Rezeptors

### CDNKP46/CD3- Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

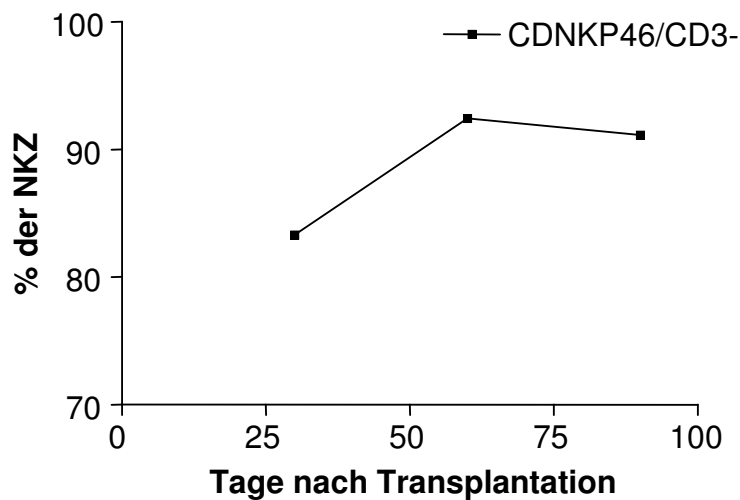


Abbildung 13; Entwicklung des CDNKP46 NK-Zell Rezeptors

#### 3.3.2.1.2 NKG2D Rezeptoren

NKG2D wird als Homodimer auf der NK-Zelloberfläche exprimiert und ist mit den Adapter Proteinen Dap10 oder Dap12 verbunden. Ähnlich den natürlichen zytotoxischen Rezeptoren, ist auch die Adapter Proteine der NKG2D Rezeptor eine ITAM Domäne, durch die die Aktivierung der NK-Zellen nach Ligandenkontakt ausgelöst wird. Im Gegensatz zu den natürlichen zytotoxischen Rezeptoren sinkt der prozentuale Anteil der NK-Zellen, die NKG2D auf ihrer Oberfläche exprimieren im Verlauf der ersten 100 Tage nach Transplantation deutlich ab, jedoch ist auch hier die Streuung sehr groß. Exprimieren zum Beispiel an Tag 30, 82,66% aller NK-Zellen NKG2D, so beträgt die Streuung 8,5%-99,01%. An Tag 60 findet sich NKG2D auf 64,38% (Streuung: 6,96%-88,53%) aller NK-Zellen und an Tag 90 noch auf 56,62% mit einer Streuung von 23,85%-93,36% (Abbildung 14).

### CDNKG2D/CD3- Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

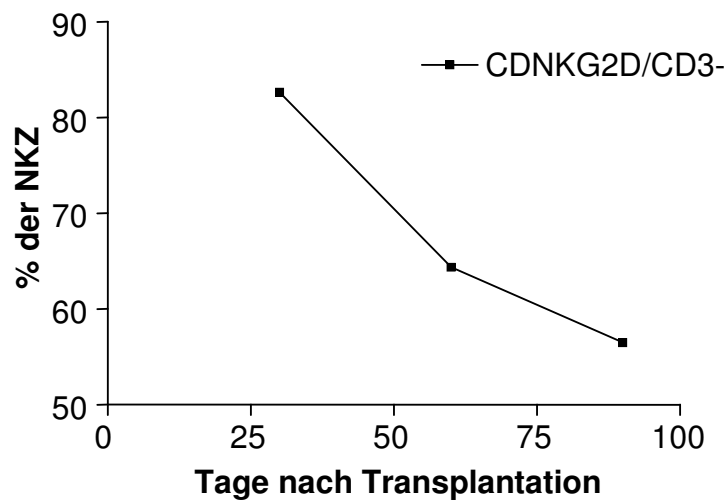


Abbildung 14; Entwicklung des CDNKG2D NK-Zell Rezeptors

Im Folgenden ist noch eine Übersicht der Entwicklung aller in der Arbeit untersuchten, aktivierenden NKZ-Rezeptoren im Balkendiagramm dargestellt, aus der die Verhältnisse der einzelnen Rezeptoren zueinander hervorgehen (Abbildung 15). Deutlich erkennbar werden die gegenläufige Entwicklung von NKG2D und NKP46, während NKP30 über die Zeit relativ stabil bleibt. Darüber hinaus ist die deutlich geringere Expression von NKP46 klar ersichtlich.

### Rekonstitution der aktivierenden NKZ-Rezeptoren in der CD3/19 Gruppe

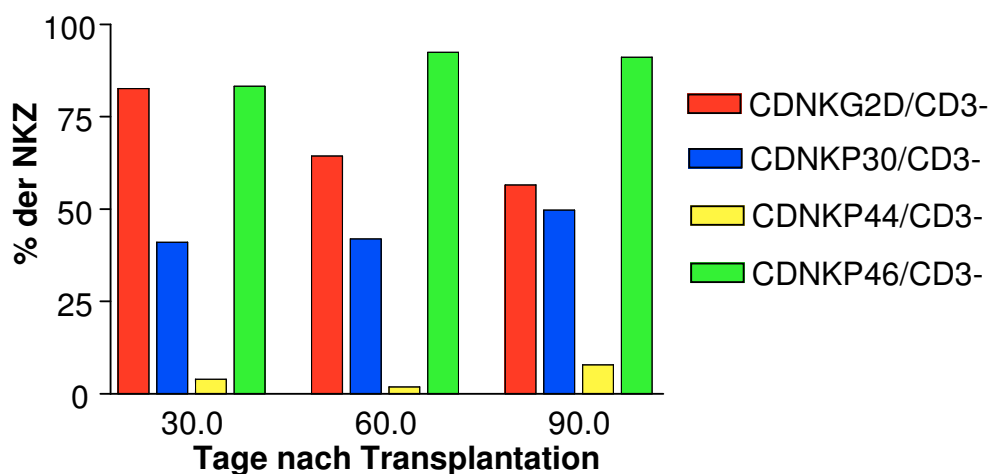


Abbildung 15; Vergleich der Rekonstitution der aktivierende NKZ-Rezeptoren

### **3.3.2.2 Inhibierende natürliche Killerzell-Rezeptoren**

Die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zellen sind in der Lage die Aktivierung der NK-Zellen zu hemmen und verhindern so einen Angriff auf normale Zellen und Gewebe [137]. Ausgehend von ihrer Ligandenspezifität sind zwei Hauptgruppen an inhibitorischen Rezeptoren beschrieben worden – die HLA-Klasse-I-Rezeptoren und die Nicht-HLA-Klasse-I-Rezeptoren. Die genauen Mechanismen der Inhibition bei Nicht-HLA-Klasse-I-Rezeptoren sind bis dato noch nicht gänzlich verstanden und Gegenstand aktueller Forschung [116].

In dieser Arbeit wurde die Rekonstitution der jeweiligen Hauptvertreter aus beiden Klassen im Verlauf untersucht und miteinander verglichen. Wir haben uns auf CD158a, CD158b, CD158e, CD85j sowie CD94/NKG2A aus der ersten Gruppe beschränkt. Aus der Nicht-HLA-Klasse-I-Rezeptoren Gruppe haben wir den Rezeptor NKR-P1B (CD161) näher untersucht.

#### ***3.3.2.2.1 HLA–Klasse-I-inhibitorische Rezeptoren***

Die Hauptvertreter der HLA-Klasse-I-inhibitorischen-NK-Zellrezeptoren sind die großen Untergruppen der Killer Cell Immunoglobulin-like Rezeptoren (=KIR-Rezeptoren) sowie das CD94/NKG2A Dimer. Zu der Familie der KIR gehören die bereits erwähnten CD158a, CD158b, CD158e. CD85j ist zu der Familie der Leukozyten „Ig-like receptors“ zu rechnen. Auch die Ausprägung des CD94/NKG2A Dimers war Gegenstand dieser Arbeit.

In unseren Untersuchungen liess sich keine Korrelation zwischen den exprimierten KIRs des Spenders und dem HLA-Typ des Empfängers feststellen.

Der Anteil an NK-Zellen, die den Marker CD158a exprimieren beläuft sich an Tag 30 auf 7,58% (Streuung: 1,24%-16,16%), an Tag 60 stieg die Expression auf 11,31% (Streuung: 0,74%-21,59%) der NK-Zellen an um an Tag 90 bei 10,01% (Streuung: 3,150%-23,36%) zu liegen (Abbildung 16).

### CD158a Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

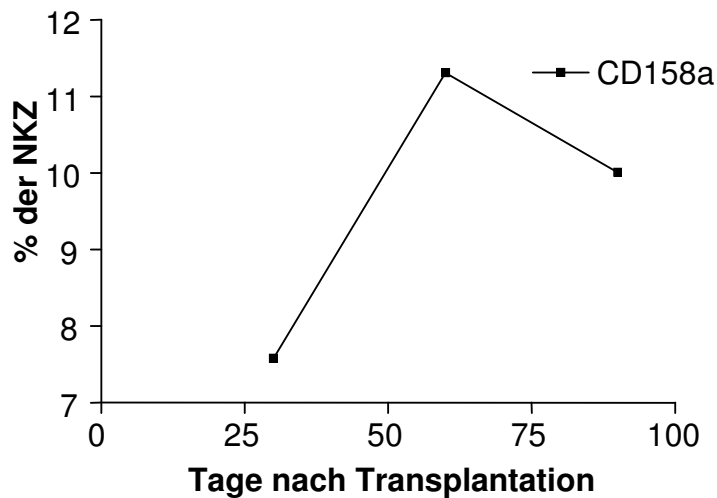


Abbildung 16; Entwicklung des CD158a NK-Zell Rezeptors

Die Expression von CD158b nimmt im Verlauf der Rekonstitution stark ab (Abbildung 17). An Tag 30 nach Transplantation exprimieren 36,03% (Streuung: 5,33%-58,21%) aller NK-Zellen CD158b, an Tag 60 sind dies 29,84% (Streuung: 7,21%-90,55%) und an Tag 90 fand sich CD158b auf 22,99% (Streuung: 0%-74,40%) der NK-Zellen.

### CD158b Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

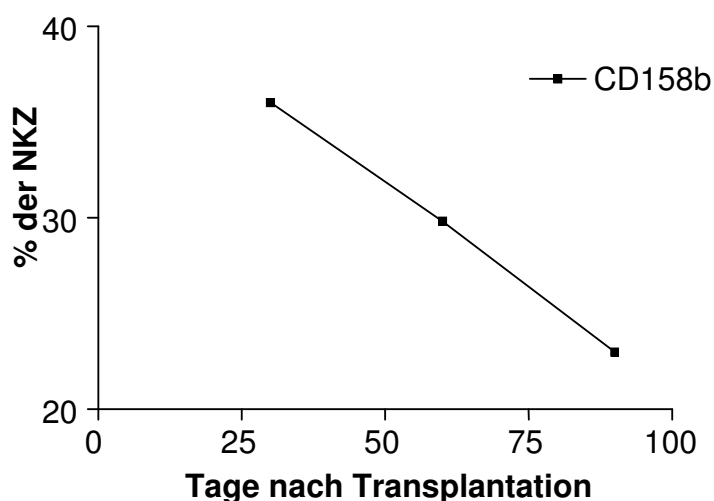


Abbildung 17; Entwicklung des CD158b NK-Zell Rezeptors

Die Expression von CD158e bleibt im Verlauf der Rekonstitution ähnlich wie CD158a relativ konstant, spielt sich aber auf höherem Niveau ab (Abbildung 18). An Tag 30 weisen 16,82% (Streuung: 14,56%-44,13%) aller NK-Zellen CD158e auf, an Tag 60 sind es mit 21,25% (Streuung: 2,48%-43,91%) etwas mehr bevor es sich dann an Tag 90 mit 17,41% (Streuung: 2,36%-42,47%) wieder dem Wert von Tag 30 annähert.

### CD158e Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

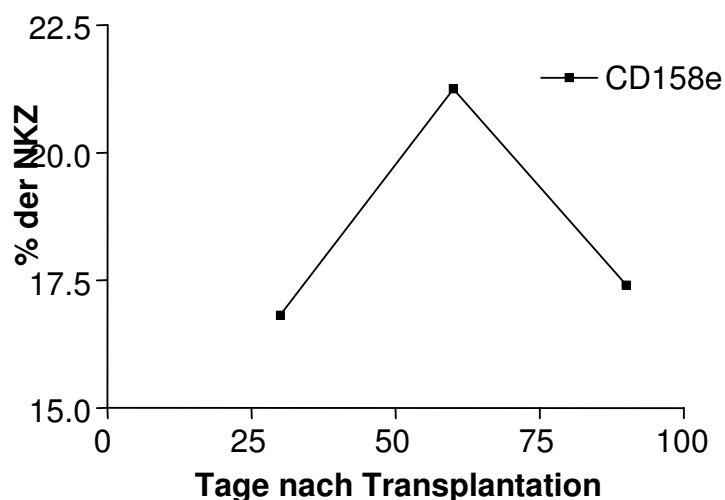


Abbildung 18; Entwicklung des CD158e NK-Zell Rezeptors

CD85j erfährt in der Rekonstitution nach Transplantation einen ähnlichen Verlauf wie CD158b (Abbildung 19). An Tag 30 fanden wir bei 35,68% (Streuung: 10,47%-38,43%) aller NK-Zellen CD85j exprimiert. An Tag 60 waren 27,05% (Streuung: 11,89%-68,63%) aller NK-Zellen CD85j positiv. An Tag 90 zeigt sich wieder eine kleiner Anstieg auf 28,76% (Streuung: 6,76%-38,32%) der NK-Zellen, die CD85j exprimieren.



### CD85j/CD3- Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

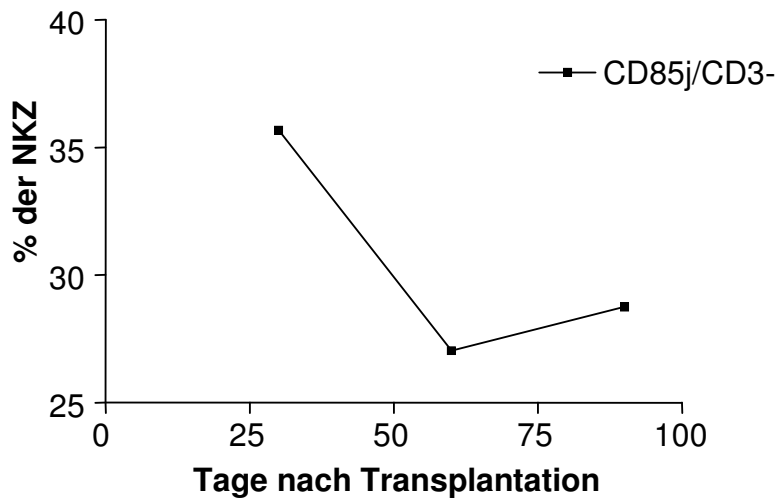


Abbildung 19; Entwicklung des CD85j NK-Zell Rezeptors

Das Dimer CD94/NKG2A, das zu der Gruppe der HLA-Klasse-I-inhibitorische-Rezeptoren gehört, jedoch kein KIR ist, ist an Tag 30 nach Transplantation bei 69,85% (Streuung: 57,45%-92,41%) der NK-Zellen exprimiert. An Tag 60 finden sich 69,20% (Streuung: 26,18%-89,59%) der NK-Zellen mit CD94/NKG2A und an Tag 90 ist dieser Rezeptor auf 58,65% (Streuung: 20,71%-85,71%) aller NK-Zellen zu finden (Abbildung 20).

### CD94/NKG2A Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

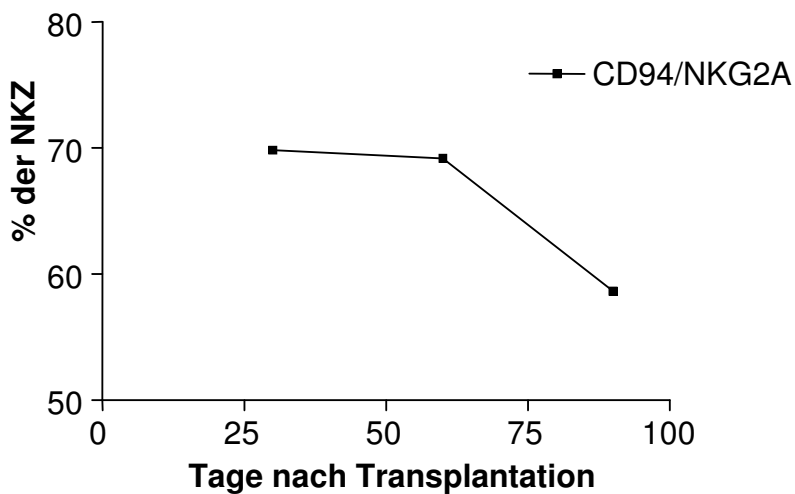


Abbildung 20; Entwicklung des CD94/NKG2A NK-Zell Rezeptors

### 3.3.2.2.2 Nicht HLA-Klasse-I-inhibitorische-Rezeptoren

CD161 gehört zu der Gruppe der nicht-HLA-Klasse-I-inhibitorische-Rezeptoren. Seine Entwicklung ähnelt der Rekonstitution von CD94/NKG2A (Abbildung 21). An Tag 30 finden sich 78,75% (Streuung: 37,73%-87,86%) NK-Zellen, die 161 exprimieren. An Tag 60 hat sich ihr Anteil auf 75,37% (Streuung: 24,40%-91,28%) gesenkt. Bis Tag 90 erfahren sie eine weitere Regression und noch 62,41% (Streuung: 26,75%-85,56%) aller NK-Zellen sind CD161 positiv.

#### CD161 Rekonstitution in der CD3/19 Gruppe

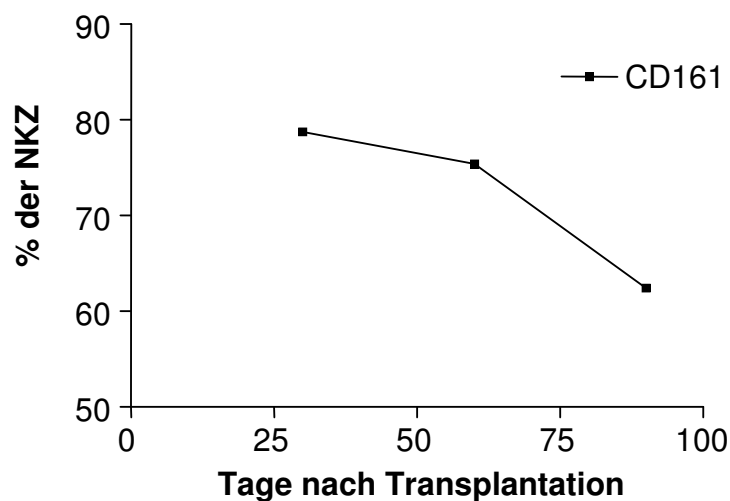


Abbildung 21; Entwicklung des CD161 NK Zell Rezeptors

Im Folgenden ist noch eine Übersicht der Entwicklung der untersuchten inhibierenden NKZ-Rezeptoren im Balkendiagramm dargestellt, aus der die Verhältnisse der einzelnen Rezeptoren zueinander hervorgehen (Abbildung 22). Deutlich erkennbar werden die relativ niedere Expression der KIR und die deutlich stärkere Expression von CD94/NKG2A. Auch der nicht-HLA-Klasse-I-inhibitorische-Rezeptor CD161 zeigt eine deutlich stärkere Expression als die KIR und eine leicht stärkere Expression als CD94/NKG2A.

### Rekonstitution der inhibierenden NKZ-Rezeptoren in der CD3/19 Gruppe

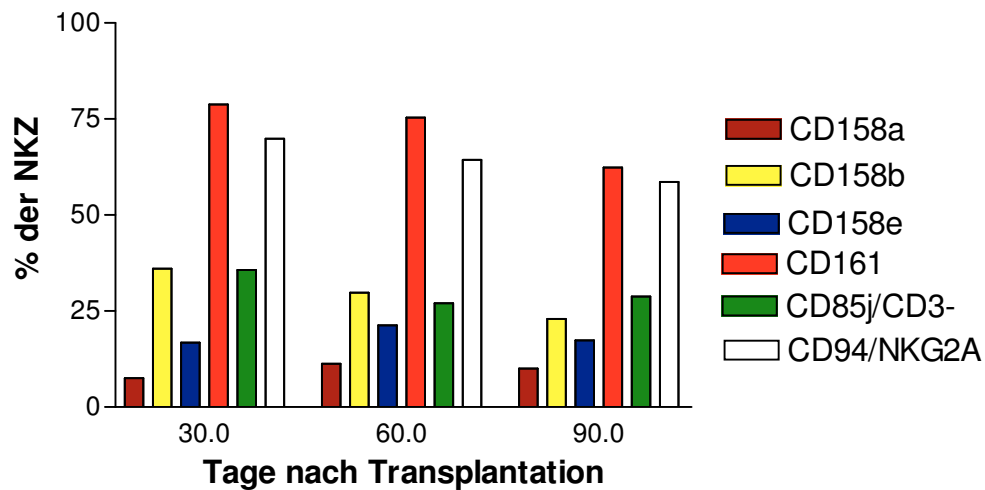
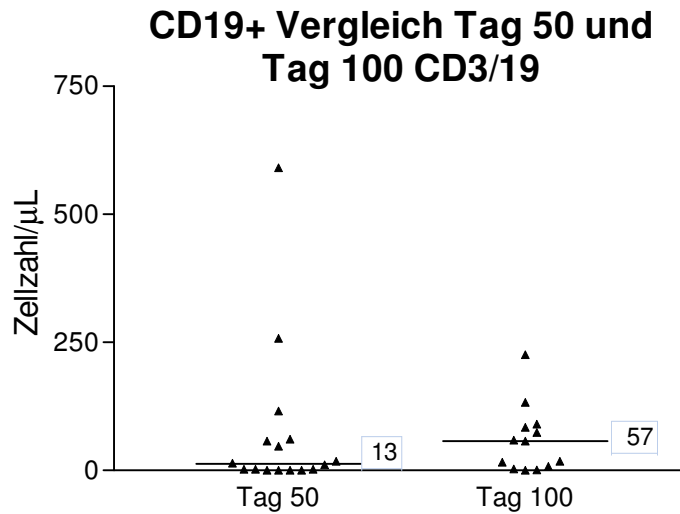


Abbildung 22; Vergleich der Rekonstitution der inhibierenden NKZ-Rezeptoren

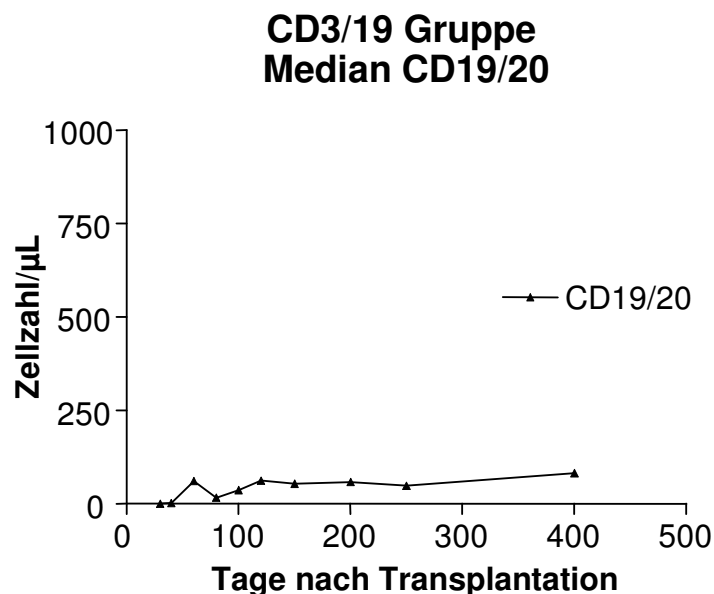
#### 3.3.3 B-Zell Rekonstitution

Die Normwerte für die B-Zellen in gesunden Kontrollen liegen zwischen 7 und 23% der Lymphozyten; in absoluten Zahlen zwischen 100 und 800 Zellen/ $\mu$ L. Es wurde exemplarisch an Tag 50 und 100 (jeweils +/- 20 Tage) nach Transplantation die Rekonstitution untersucht (Abbildung 23). Es zeigte sich eine langsame Regeneration mit im Median 12 (Streuung: 0-258) CD19+ Zellen/ $\mu$ L an Tag 50 und 57 (Streuung: 0-226) CD19+ Zellen/ $\mu$ L an Tag 100. An beiden Messpunkten lagen die beobachteten Werte also deutlich unter den Normalwerten bei gesunden Kontrollen.



**Abbildung 23; Vergleich der Absolutzahl der CD19 positiven Zellen an Tag 50 und an Tag 100 (+/-20 Tage). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.**

Der Verlauf der Immunrekonstitution wurde von Tag 0 bis 400 nach Transplantation beobachtet (Abbildung 24). In der CD3/19 depletierten Gruppe zeigt sich eine langsame Rekonstitution mit niedrigeren Werten in den 400 untersuchten Tagen nach Transplantation. Es lässt sich ab Tag 200 ein steter Anstieg der Zellen messen, der an Tag 400 in 82 (Streuung: 2-304) Zellen/µL gipfelt – was immer noch unter den Werten von gesunden Normalkontrollen liegt.



**Abbildung 24; Mediane der CD19+/20+ Zellen im Verlauf in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe.**

Tabelle 15; Verlauf CD19+/CD20+ Immunrekonstitution

Tage p. TX	CD3/19	
	MEDIAN	Streuung
30	0	0 - 8
40	2	0 - 144
60	61	0 - 269
80	16	0 - 209
100	37	1 - 226
120	62	0 - 220
150	54	0 - 166
200	59	0 - 266
250	49	0 - 377
400	82	2 - 304

### 3.3.4 T-Zell Rekonstitution

Der Normwert für die Gesamtzahl an T-Zellen, gemessen als CD3+ Zellen, liegt in gesunden Kontrollen zwischen 60-85% der Lymphozyten; in absoluten Zahlen zwischen 850 und 3000 Zellen/ $\mu$ L. Wir beobachteten eine langsame Erholung der T-Zellen (Abbildung 25). Die Messwerte an Tag 50 und Tag 100 (jeweils +/- 20 Tage) zeigen Absolutwerte von 16 (Streuung: 0-412) bzw. 163 (Streuung: 15-1416) CD3+ Zellen/ $\mu$ L.

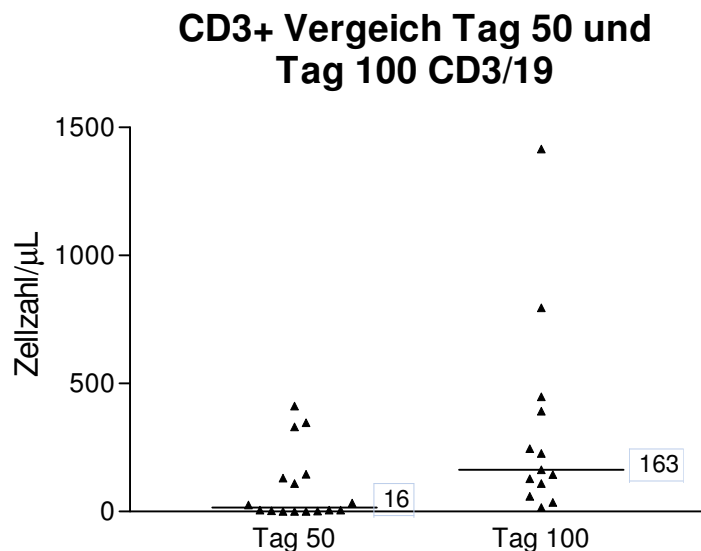
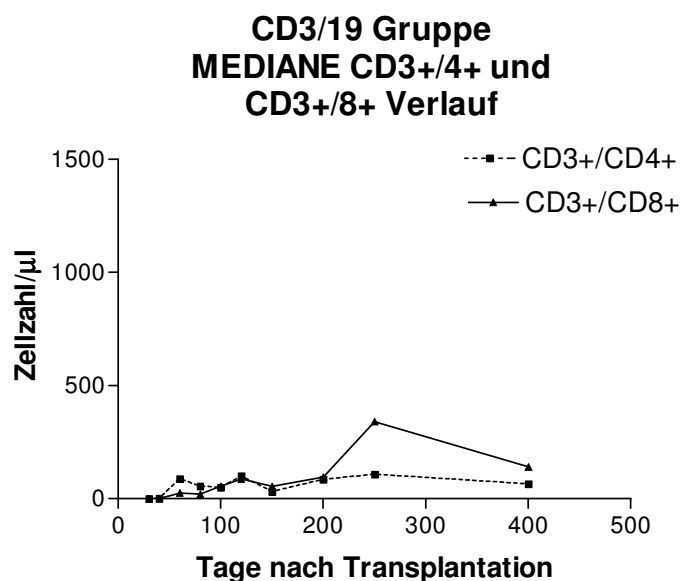


Abbildung 25; Vergleich der Absolutzahl der CD3 positiven Zellen an Tag 50 und an Tag 100 (+/- 20). Die angegeben Zahlen stellen die Mediane dar.

Im Verlauf der ersten 400 Tage wurden die CD3 positiven Zellen differenzierter untersucht, indem zwischen den Subpopulationen CD3+/CD4+ und CD3+/CD8+ (Abbildung 26) unterschieden wurde. Die Normalwerte bei gesunden Kontrollen liegen für CD4+ T-Zellen zwischen 29 und 59% der Lymphozyten (entspricht 450 – 2000 Zellen/ $\mu$ L) und für CD8+ T-Zellen zwischen 19 und 48% der Lymphozyten (entspricht 250-1700 Zellen/ $\mu$ L). Wir beobachteten eine verlangsamte Rekonstitution sowohl in der CD8+ als auch in der CD4+ Subpopulation. Es ist auffällig, dass die CD3+/4+ Werte zu Beginn höher ausfallen als die CD3+/8+ und schneller ansteigen. Zwischen Tag 100 und Tag 250 scheinen sich beide Subpopulationen parallel zueinander zu entwickeln. Ab Tag 250 steigen die CD3+/8+ Zellen stärker an, um sich dann an Tag 400 wieder den CD3+/4+ Zellen anzunähern. Um den Tag 100 nach Transplantation ist ein Peak für beide untersuchte Subpopulationen zu beobachten. Die klinisch wichtige Marke von >200 CD3+ Zellen/ $\mu$ L wird um den Tag 200 überschritten.



**Abbildung 26; Mediane der CD3+/4+ und CD3+/8+ Zellen im Verlauf in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe**

Tabelle 16; Verlauf der CD3+/CD4+ und CD3+/CD8+ Immunrekonstitution

Tage p. TX	CD3+/CD4+		CD4+/CD8+	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
30	0	0 - 15	1	0 - 94
40	2	0 - 81	1	0 - 424
60	88	2 - 303	26	2 - 111
80	55	0 - 277	21	0 - 1345
100	49	1 - 306	56	0 - 282
120	101	9 - 192	87	25 - 1227
150	32	0 - 189	54	0 - 359
200	85	1 - 230	96	1 - 422
250	108	18 - 198	341	1 - 707
400	66	1 - 211	140	3 - 612

### 3.3.4.1 Rekonstitution der CD4+ T-Lymphozyten CD45 Isoformen in der CD3/19 depletierten Gruppe

Die Rekonstitution der CD4+ T-Lymphozyten wurde in der CD3/CD19 Gruppe anhand des Verlaufs der CD45 Isoformen in den ersten 250 Tagen nach Transplantation näher untersucht (Abbildung 27). Diese Untersuchung wurde nur in der CD3/19 Gruppe durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Erhebung, die CD34 selektionierte Gruppe schon abgeschlossen war. CD45, das als „allgemeines Leukozytenantigen“ bezeichnet wird und sich mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten auf allen hämatopoetischen Zellen findet, ist eine transmembranäre Tyrosinphosphatase, die für die Signalgebung von Rezeptoren in verschiedenen Zellen benötigt wird. Von T-Zellen werden unterschiedliche Isoformen des CD45-Antigens exprimiert. Naive T-Zellen tragen eine Isoform mit hohem Molekulargewicht (CD45RA) auf ihrer Oberfläche, T-Zellen die die CD45RO Isoform exprimieren, werden als CD4-T-Gedächtniszellen bezeichnet.

Wir fanden eine deutlich prominentere Expression von CD45 RO, die sich über den gesamten Beobachtungsverlauf erstreckt. Zwar steigen sowohl CD45RO als auch CD45RA nach Transplantation zusehends an, jedoch ist der Anstieg innerhalb der CD45RO Untergruppe stärker. So finden sich an Tag 50 92 (Streuung:3-307) CD45RO+ CD4 T-Zellen. Hier lag der Wert für die CD45RA+ CD4+ T-Zellen mit 5 (Streuung: 1-30) Zellen deutlich darunter (Tabelle 17).

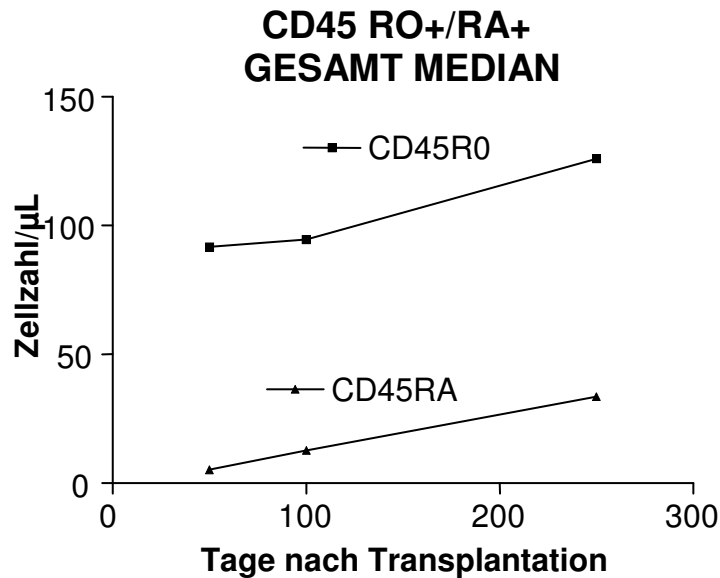


Abbildung 27; Entwicklung der CD45 Isoformen der CD4+ T-Lymphozyten

Tabelle 17; Vergleich des Verlaufs der CD45RO+ und CD45RA+ Immunrestitution in medianer Zellzahl/μL

Tage p. TX	CD45RO+		CD45RA+	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
50	92	3 - 307	5	1 - 30
100	95	9 - 509	13	0 - 55
250	126	31 - 262	34	2 - 183

### 3.3.5 TCR-Vβ-Repertoire Entwicklung bei CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Mittels des TCR Vβ Repertoire Kit (IO Test Beta Mark) wurde bei 7 Patienten in der CD3/19 Gruppe vor Transplantation und an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation (90, 200, 220, 360 Tage) das TCR Vβ Repertoire der CD3+ T-Zellen untersucht. In der historischen CD34 Vergleichsgruppe, standen hierfür keine Proben zur Verfügung. Laut Herstellerangaben deckt diese Untersuchungsmethode 69,95% des gesamten TCR Vβ-Repertoires ab. Da einige Patienten verstarben, konnten zu den späteren Zeitpunkten entsprechend weniger Patienten untersucht werden. Die Untersuchungen zeigten, dass sich das T-Zell-Repertoire bei den einzelnen Patienten individuell regeneriert und sich in seiner Vielfältigkeit und Entwicklung stark unterscheidet. Zu beobachten war, dass um den Tag 200 der Großteil der Patienten ein weitgehend vollständiges



und normalisierendes Repertoire zeigte. Vereinzelt waren noch deutlich überexprimierte V $\beta$  Subpopulationen oder Lücken im Rezeptorrepertoire zu beobachten. Nicht alle Patienten wiesen vor Transplantation ein Normalrepertoire auf und nicht immer fand eine Regeneration zu einem identischen Repertoire statt. Bei einigen Patienten war eine relativ charakteristische Überexpression, einzelner V $\beta$ s über mehrere Messzeitpunkte hinweg zu beobachten. Wie erwähnt, normalisiert sich das Repertoire zwischen Tag 200-250 bei den meisten Patienten. Spätere Stichproben belegen aber, dass das festgestellte Repertoire auch weiterhin Schwankungen unterliegen kann. Eine ausführliche Darstellung und Diskussion der Entwicklungen der einzelnen Patienten schliesst sich an.

Die Ergebnisse wurden mit Normwerten bei einem Kollektiv von 85 Normalproben verglichen, die die prozentuale Verteilung von 24 V $\beta$ -Ketten charakterisieren (Abbildung 28). Zur internen Validierung wurde das TCR V $\beta$ -Repertoire bei 5 Normalpersonen untersucht (nicht gezeigt).

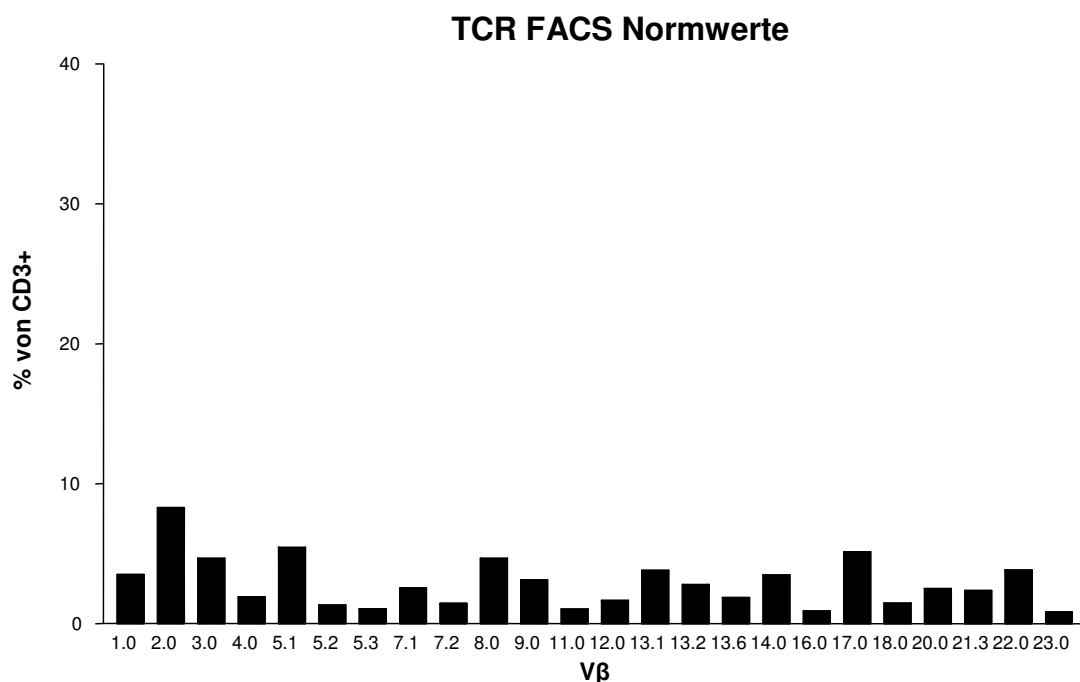


Abbildung 28; TCR Normwerte

### 3.3.5.1 TCR-Repertoire Patient #1

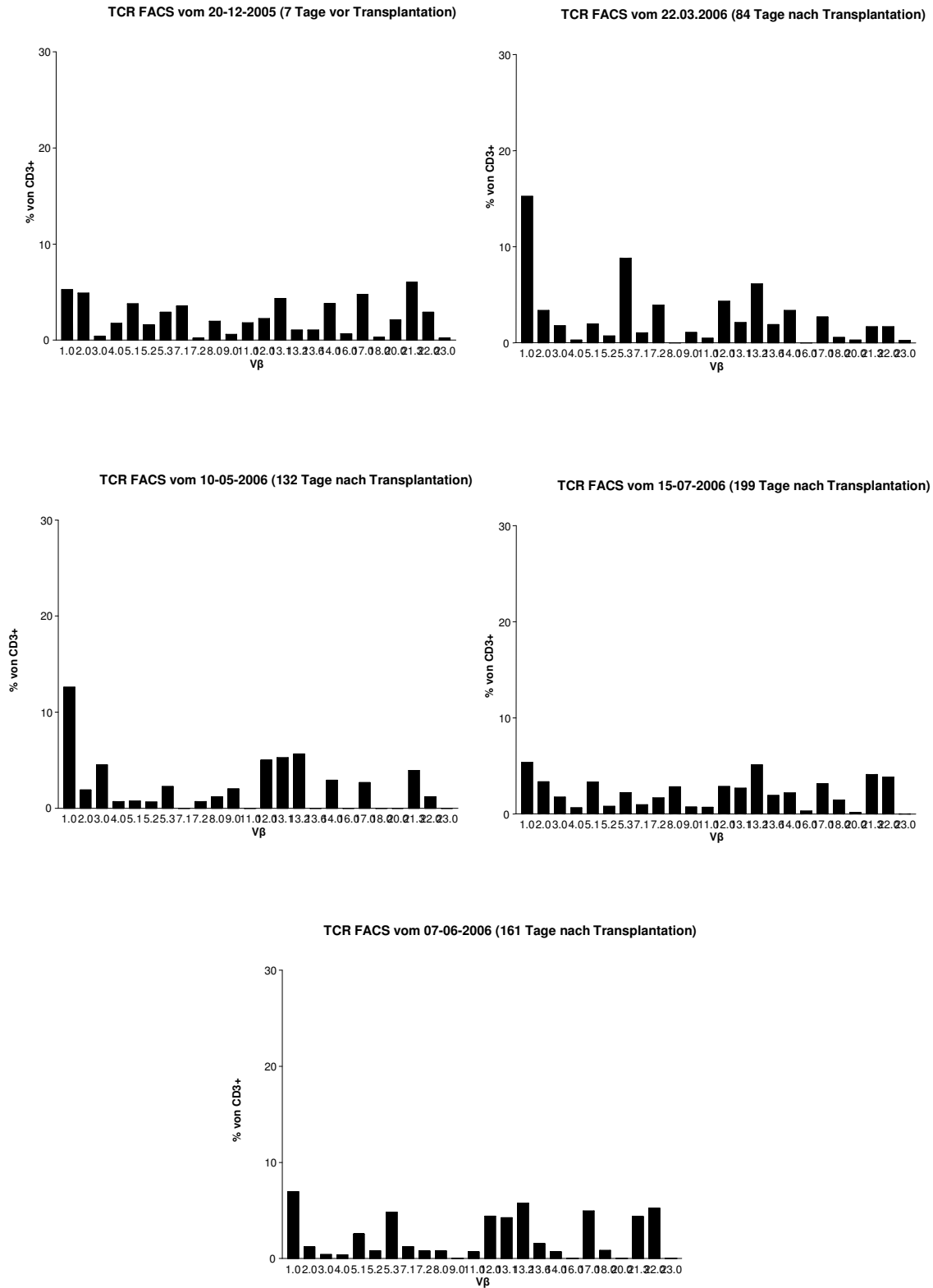


Abbildung 29; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einer 41 jährigen Patientin mit AML.

### 3.3.5.2 TCR-Repertoire Patient #2

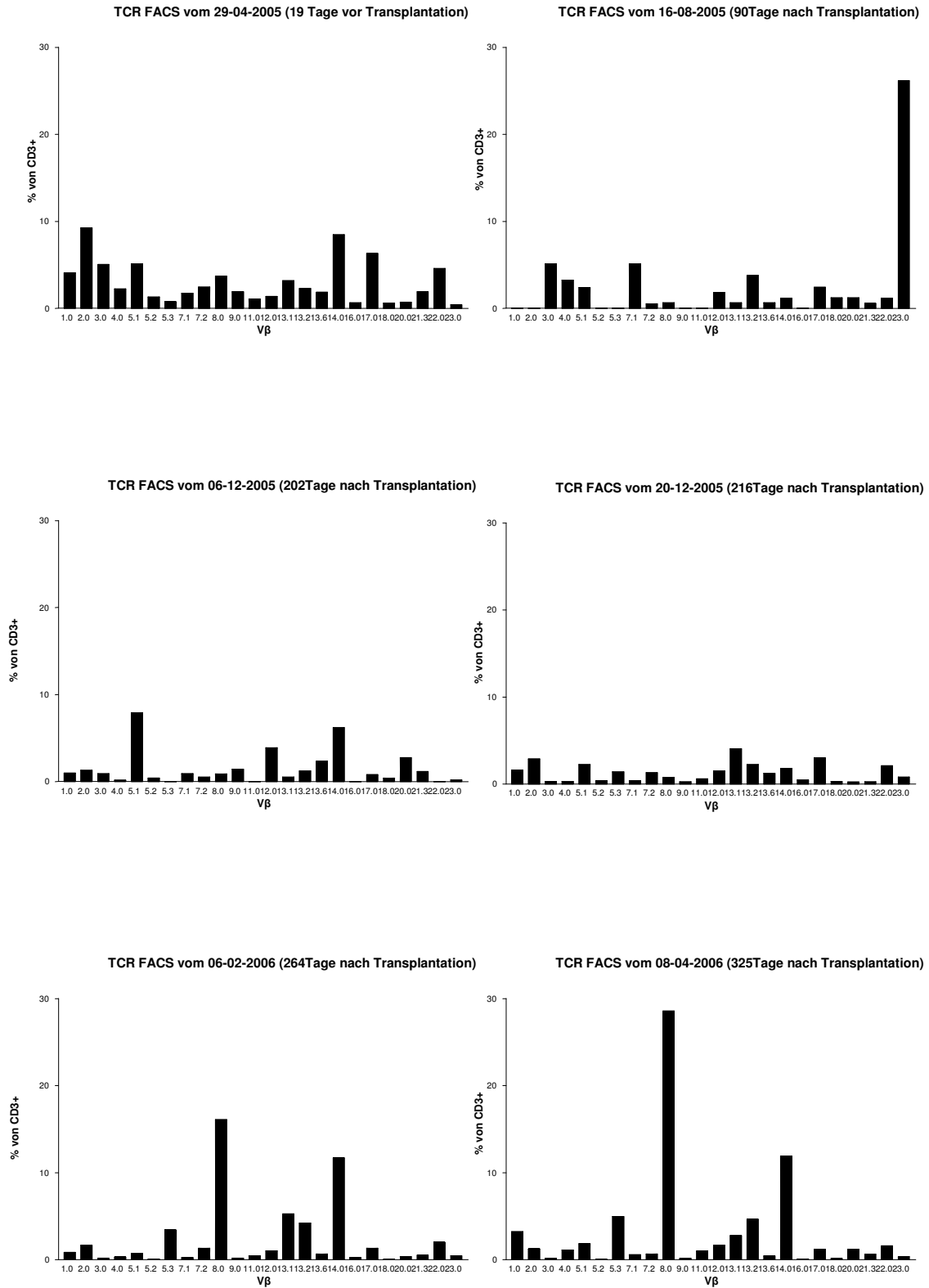


Abbildung 30; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einer 54 jährigen Patientin mit NHL.

### 3.3.5.3 TCR-Repertoire Patient #3

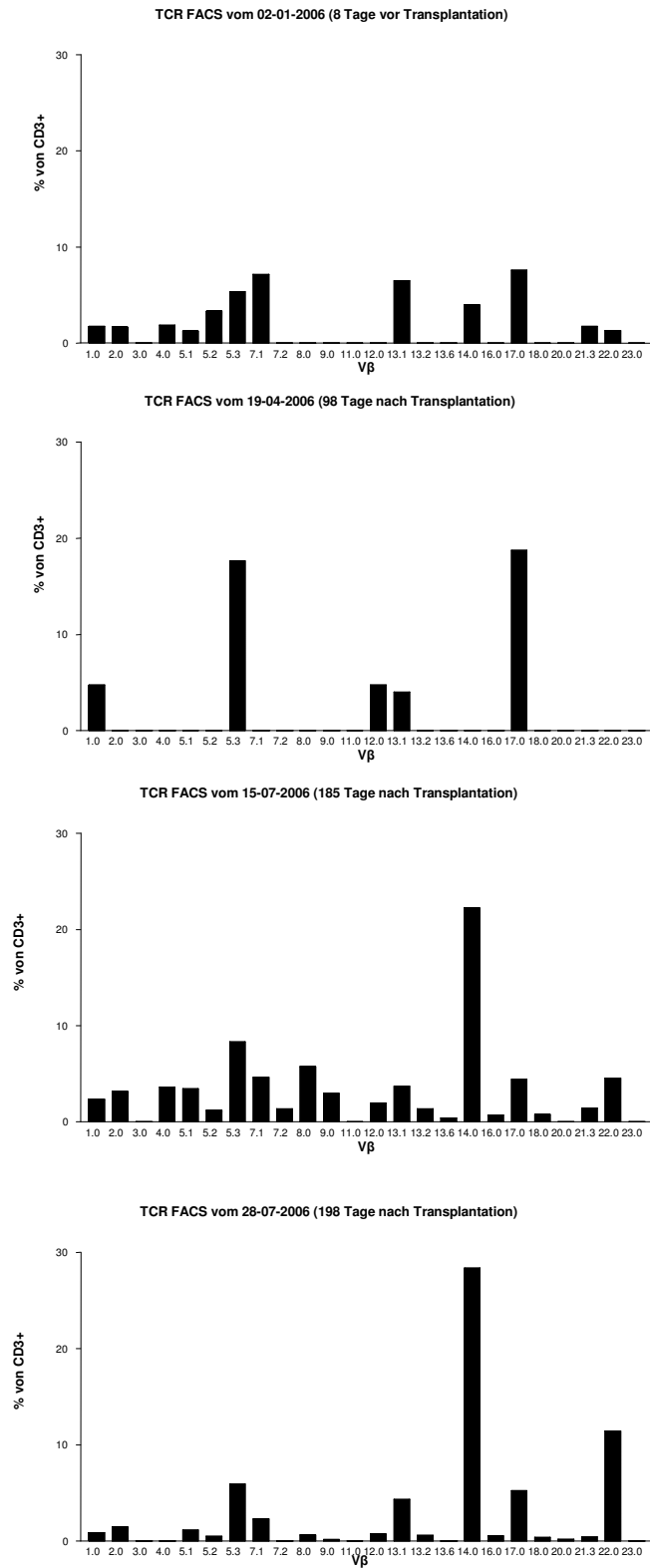


Abbildung 31; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einem 58 jährigen Patienten mit AML.

### 3.3.5.4 TCR-Repertoire Patient #4

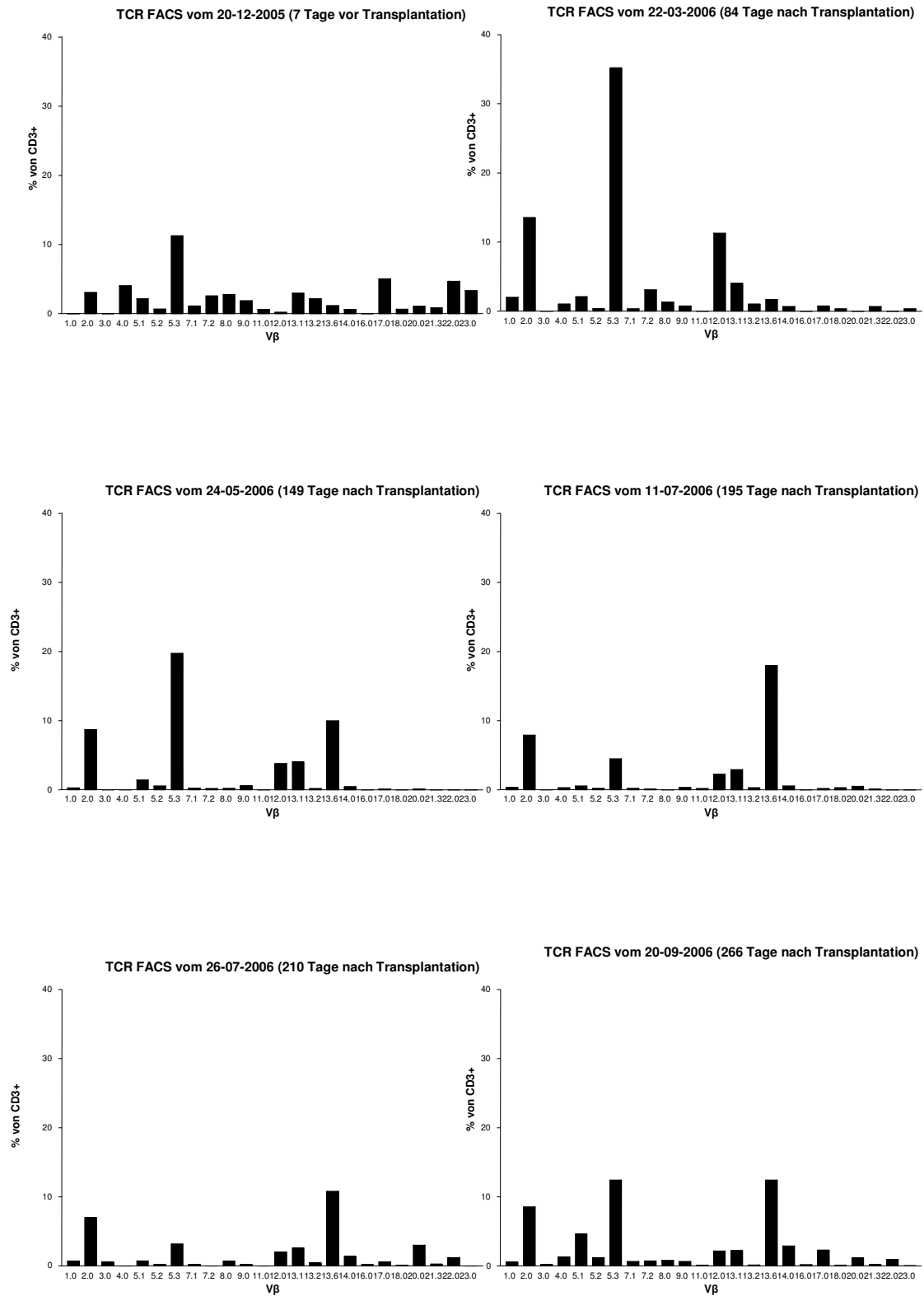


Abbildung 32; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einem 21 jährigen Patienten mit AML.

### 3.3.5.5 TCR-Repertoire Patient #5

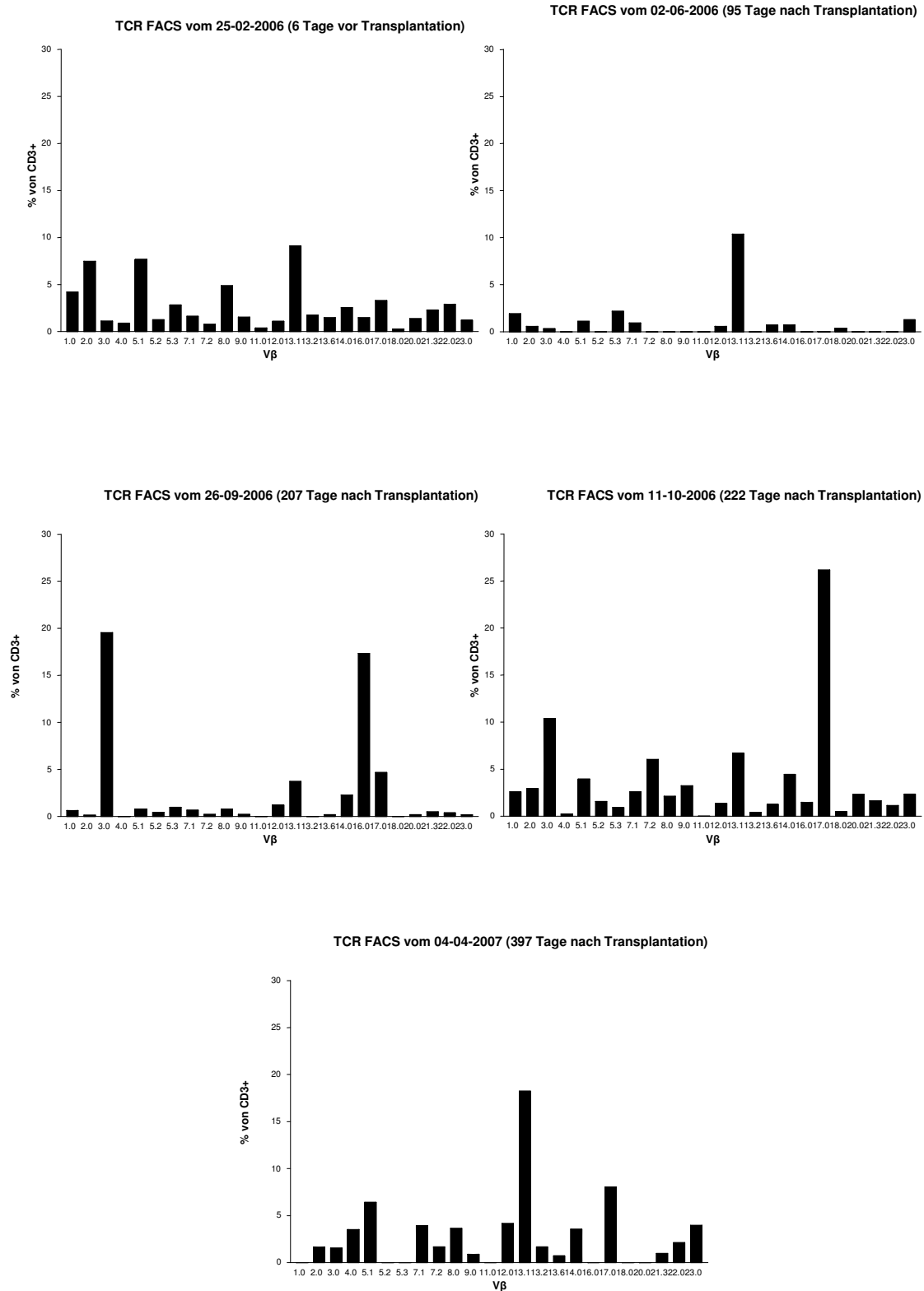


Abbildung 33; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einem 45 jährigen Patienten mit CML.

### 3.3.5.6 TCR-Repertoire Patient #6

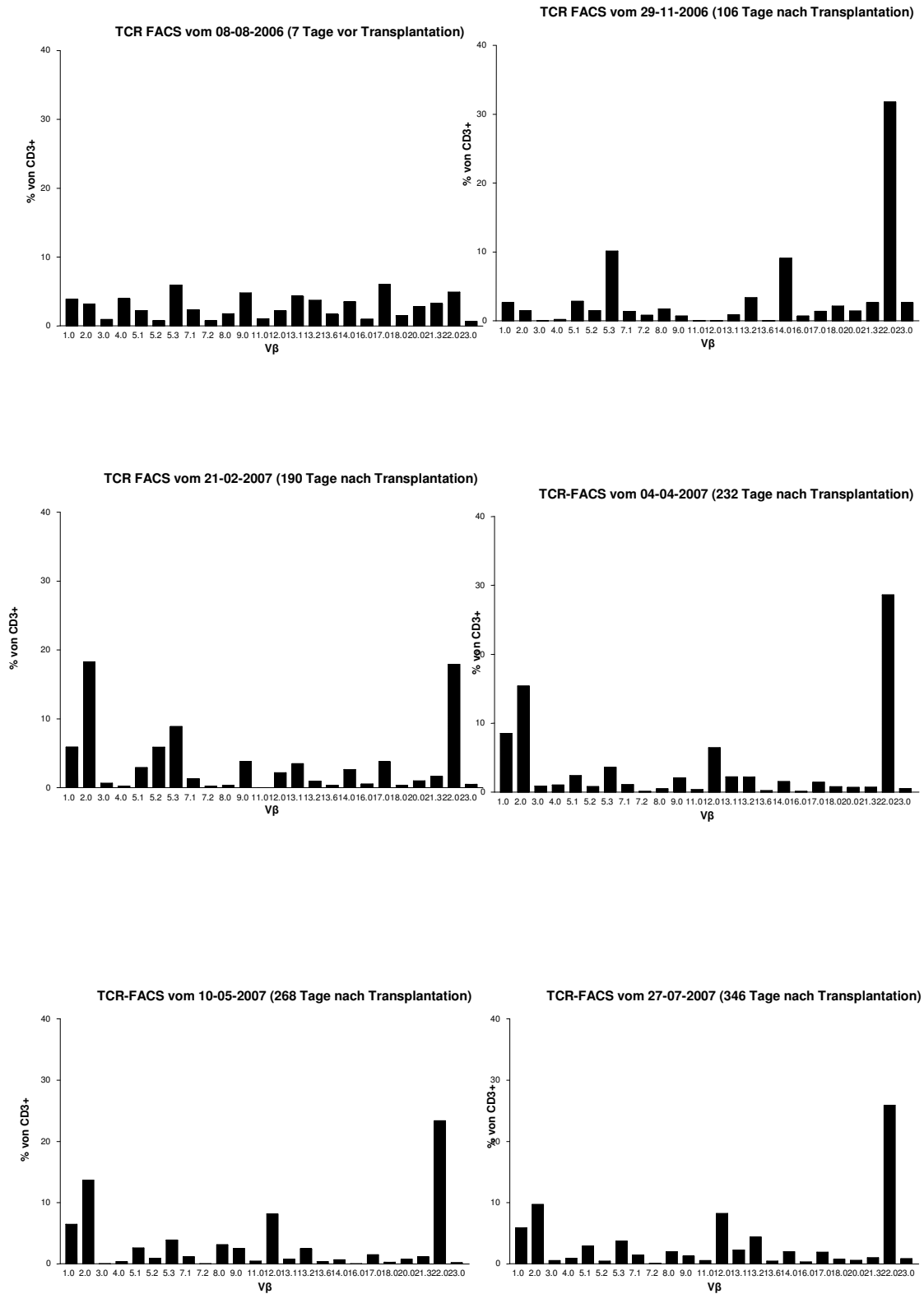


Abbildung 34; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einem 39 jährigen Patienten mit AML.

### 3.3.5.7 TCR-Repertoire Patient #7

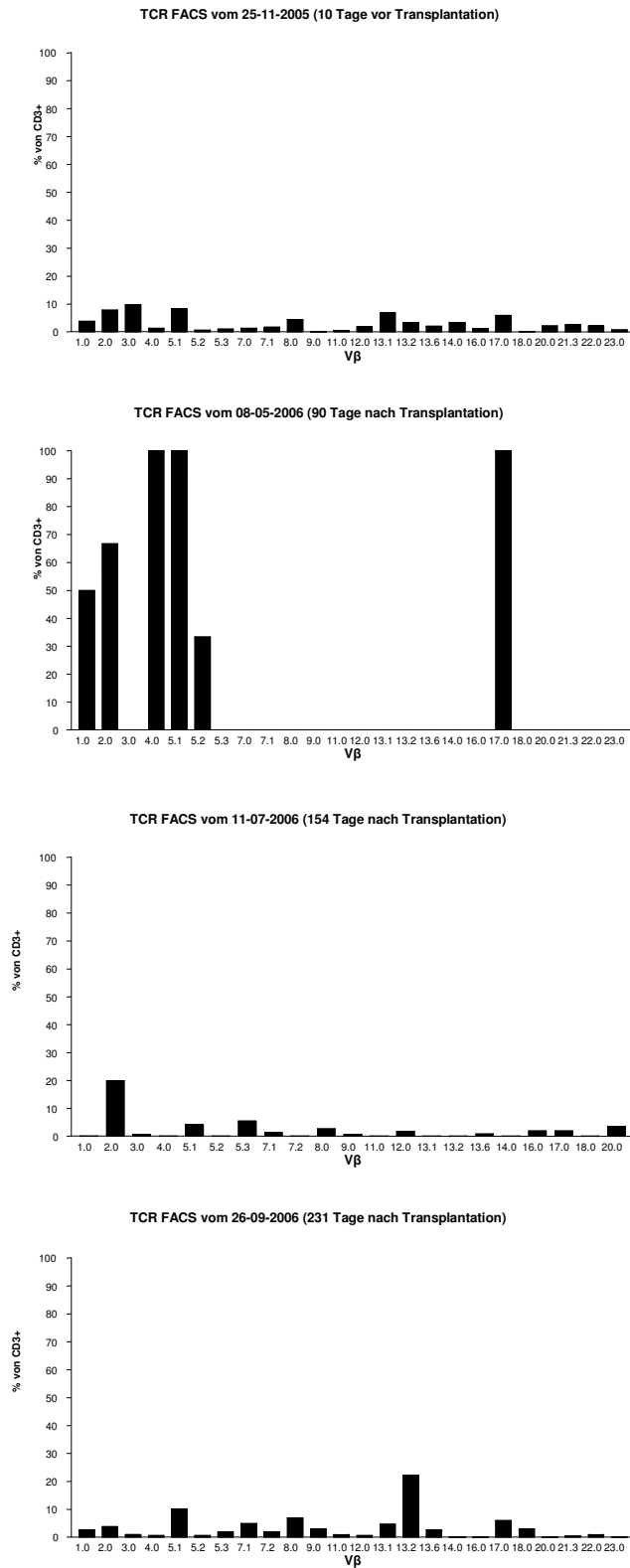


Abbildung 35; TCR Vβ-Repertoire (CD3+) Entwicklung bei einem 40 jährigen Patienten mit AML.



### **3.3.5.8 Die Entwicklung des TCR-Repertoires in der Übersicht**

Es ist zu beobachten, dass sich bei unseren Patienten das Repertoire in den ersten 200 Tagen nach Transplantation noch deutlich reduziert und verändert zeigt. Die Messungen an Tag 90 und Tag 200, sowie die in Einzelfällen noch zwischenzeitlich durchgeführten Messungen wiesen noch lückenhafte T-Zell-Repertoires nach, die durch vereinzelte, prominente V $\beta$  Überexpressionen gekennzeichnet sind.

Bei Patientin 1 fand sich eine deutliche Überexpression von V $\beta$ 1 und V $\beta$ 5.3 an Tag 84 nach Transplantation. Klinisch imponierten zu diesem Zeitpunkt eine diskrete Transplantat Gegen Wirt Reaktion der Haut sowie Beschwerden im Gastrointestinaltrakt. An Tag 132 nach Transplantation wurde eine Besserung der Symptome beschrieben. Die Überexpression von V $\beta$ 5.3 ging merklich zurück und auch V $\beta$ 1 war nicht mehr so stark exprimiert wie noch an Tag 84.

Bei Patientin 2 fand sich an Tag 90 nach Transplantation eine deutliche Überexpression von V $\beta$ 23, die klinisch mit einer abklingenden Transplantat Gegen Wirt Reaktion der Haut korreliert. An Tag 264 und 325 sind die Rezeptoren V $\beta$ 8 und V $\beta$ 14 stark überexprimiert, wobei V $\beta$ 8 an Tag 325 noch deutlich ausgeprägter ist. Klinisch ist an Tag 264 keine Auffälligkeit zu berichten, während an Tag 325 eine fragliche Transplantat Gegen Wirt Reaktion der Haut aufgrund eines beginnenden Hautexanthems zur Diskussion stand, die jedoch nicht näher abklärungsbedürftig war.

Bei Patient 3 fand sich durchweg ein verändertes Repertoire mit zum Beispiel an Tag 98 deutlicher Überexpression von V $\beta$ 17 und V $\beta$ 5.3 und einer an Tag 185 neu beobachteten prominenten V $\beta$ 14 Expression. Es ist jedoch zu beachten, dass sich hier auch schon vor Transplantation ein lückenhaftes Repertoire zeigte. 20 Tage nach Transplantation wurde der Patient mit einer GvH-Reaktion Grad IV der Leber und der Haut stationär aufgenommen, die den Patienten noch lange beeinträchtigte. Zum Aufnahmezeitpunkt liegt kein TCR FACS vor, jedoch geht die Expression von V $\beta$ 14 mit einer klinisch stattgehabten Ver-

schlechterung der GvH-Reaktion einher, die mit einer PUVA Therapie behandelt wurde.

Bei Patient 4 zeigt sich an Tag 84 eine prominente Expression von V $\beta$ 5.3, die auch 149 Tage nach Transplantation noch übermäßig, wenn auch leicht reduziert vorhanden ist. Klinisch zeigte sich ungefähr ab Tag 160 nach Transplantation eine Hodenschwellung und eine Gingiva Hyperplasie, die später als AML-Rezidiv beurteilt wurden. Im TCR FACS zeigt sich ab Tag 149 eine beginnende Überexpression an V $\beta$ 13.6 die sich auch an Tag 195 und 210 noch deutlich zeigt. Auch eine mögliche, nicht eindeutige GvH-Reaktivierung wurde 220 Tage nach Transplantation beschrieben. Zeitgleich zeigte sich eine Überexpression von V $\beta$ 5.3 die sich noch verstärkte.

Bei Patient 5 zeigte sich schon vor Transplantation ein überexprimierter V $\beta$ 13.1, der sich auch an Tag 95 nach Transplantation noch nachweisen lässt. Das hier relativ stark lückenhafte Repertoire, steht im zeitlichen Einklang mit einer prophylaktischen Therapie mit Ribavirin, nach stattgehabter ADV Virämie. Ein sich stark verändertes Repertoire innerhalb der Tage 200-220 nach Transplantation geht zeitlich mit einem molekularen Rezidiv der CML einher.

Bei Patientin 6 zeigt sich 106 Tage nach Transplantation eine deutliche Überexpression von V $\beta$ 22, V $\beta$ 14 und V $\beta$ 5.3, die klinisch mit einer GvH-Reaktion der Schleimhaut korreliert. 190 Tage nach Transplantation hat sich V $\beta$ 14 wieder normalisiert, jedoch zeigt nun V $\beta$ 2 eine starke Ausprägung. V $\beta$ 22 findet sich in jeder Probe deutlich erhöht. V $\beta$ 5.3 ist immer noch stark ausgeprägt. Klinisch findet sich eine zurückgegangene, jedoch noch persistierende GvH-Reaktion. Die Patientin berichtet über eine stärkere Infektionsneigung, was mit einem sich ständig variierenden TCR Repertoire zeitlich korreliert.

Bei Patient 7 imponiert an Tag 90 ein sehr lückenhaftes Repertoire mit einer starken Überexpression von V $\beta$ 1, V $\beta$ 2, V $\beta$ 4, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 5.2 und V $\beta$ 17. Diese starke Überexpression ist den stark dezimierten, fast nicht vorhandenen T-

Zellen geschuldet, die hier 0,95% der 314 Lymphozyten/ $\mu$ L ausmachen – daher kann dieses Ergebnis nur schwerlich als aussagekräftig gewertet werden. Selbst an Tag 154 zeigt sich noch ein sehr leeres Repertoire, das sich auch 231 Tage nach Transplantation noch stark dezimiert zeigt. Klinisch ist zu erwähnen, dass der Patient schon zuvor zweimal erfolglos transplantiert wurde und die klinische Situation dementsprechend schlecht war.

Die Betrachtung dieser Expansionen im Hinblick auf stattgehabte klinische Ereignisse wurde durchgeführt. Eine Abhängigkeit beider Beobachtungen kann jedoch nicht zweifelsfrei belegt werden.

Ab Tag 200 füllt sich bei unseren Patienten das Repertoire langsam und die zuvor zu beobachtenden auffällig starken Überexpressionen sind rückläufig. Sofern eine so lange Verlaufsbeobachtung möglich war, ist bei unseren Patienten noch über ein Jahr nach Transplantation ein verändertes Repertoire im Vergleich zu Kontrollen bei Gesunden festzustellen.

### **3.4 Infektionen und GvH-Reaktionen**

Infektionen stellen nach einer HSZT ein schwerwiegendes Risiko dar und sind oft Ursache komplikationsträchtiger Verläufe. Wir haben in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe die Infektionen im Verlauf des ersten Jahres nach Transplantation beobachtet und in 4 Untergruppen gegliedert (Tabelle 18). Bakterielle Infektionen waren hierbei die am häufigsten beobachtete infektiöse Komplikation.

**Tabelle 18; Infektionen in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe im ersten Jahr nach Transplantation (n=18)**

<b>Art der Infektion</b>	<b>Ereignisse</b>
Virale Infektion	5
Bakterielle Infektion	7
Pilzinfektion	1
Unbekannte Ursache	3
Gesamt	16

Bei einer HSZT mit Differenzen in den HLA-Merkmalen von Spendern und Empfängern können sich akute und chronische GvH-Reaktionen einstellen. Bis zu einem gewissen Grad ist eine solche Reaktion sogar erwünscht, da ein positiver Zusammenhang zwischen einer geringgradigen GvH-Reaktion und einem GvT-Effekt feststellen ließ. Wir beobachteten in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe ausschließlich akute GvH-Ereignisse und keine chronischen GvH-Reaktionen. Unter den akuten GvH-Reaktionen zeigten sich hauptsächlich leichte Formen (Tabelle 19).

**Tabelle 19; Grade der akuten GvH-Ereignisse in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe (n=18)**

Grad der GvH-Reaktion	Ereignisse
0	9
I	0
II	8
III	0
IV	1

### ***3.5 Vergleich einer historischen CD34 selektioniert transplantierten Gruppe mit der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe***

#### Patientenkollektiv CD34-selektionierte HSZT:

Zwischen 1997 und 2003 wurden an der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Tübingen 10 Patienten, 4 Frauen und 6 Männer, mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen mit hämatologischen Stammzellen von haploidenten Familienspendern transplantiert (Tabelle 20). Zur HSZT wurden nach einer myeloablativen Konditionierung mit TBI/Cytosphamid und Etoposid immunomagnetsich CD34 selektionierte Stammzellen verwendet. Die Diagnosen dieser Patienten waren 3 akute myeloische Leukämien (AML), 3 akute lymphatische Leukämien (ALL), 2 chronisch myeloische Leukämien (CML) sowie 1 Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und 1 myelodysplastisches Syndrom (MDS). Alle Patienten hatten eine Hoch-Risiko Erkrankung und waren entweder therapierefraktär gegen Chemotherapie, oder hatten ein Rezidiv nach vorhergegangener primärer Chemotherapie oder autologer HSZT. Das mediane Durchschnittsalter der Patienten lag bei 29 Jahren (Streuung: 19-47). Haplo-

dente Spender waren Väter (n=1), Mütter (n=1), Schwestern (n=2), Brüder (n=3), Töchter (n=1) oder Cousins (n=2) der Patienten. Die HLA-Typisierung, die mit serologischen Standard Methoden und Polymerase-Ketten-Reaktion mit sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Proben durchgeführt wurde, ergab bei 2 Spender-Empfänger Paare ein HLA-Mismatch in 2 und bei 8 Paaren ein HLA-Mismatch in mindestens 3 Genloci.

**Tabelle 20; historische Vergleichsgruppe, CD34 selektioniert**

#	DIAGNOSE	ALTER	CD34+/ kg KG x 10 <sup>6</sup>	CD3+/ kg KG x 10 <sup>4</sup>	CD34 neg Zellen %	Zeit bis Neutrophile > 500/μL (in Tagen)	Zeit bis Thrombozyten > 20.000/μL (in Tagen)
01	MDS	20	6.3	0.6	3	12	nicht erreicht
02	CML	30	9.6	4.2	3	17	35
03	CML	37	4.6	2.1	3	21	28
04	AML	28	7.3	1	10	19	35
05	AML	31	12.1	1.1	4	20	31
06	NHL	20	10.3	0.4	3	14	19
07	ALL	19	14.4	0.9	2	42	54
08	AML	41	12.5	1	2	22	24
09	ALL	47	4.1	0.3	2	23	64
10	ALL	19	5.1	0.7	1	16	nicht erreicht
	<b>Median</b>	<b>30</b>	<b>9.6</b>	<b>0.9</b>	<b>3</b>	<b>19</b>	<b>34</b>

### 3.5.1 Transplantat-Zusammensetzung bei CD34 selektionierter im Vergleich zu CD3/19 depletierter Stammzelltransplantation.

Die Transplantatzusammensetzung war im Hinblick auf die CD34+ und CD3+ Zellen in beiden untersuchten Gruppe vergleichbar (Tabelle 21). Es waren im Median 9,6 (Streuung: 4,1-14,4) x10<sup>6</sup> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht und 0,9 (Streuung: 0,3-4,2) x10<sup>4</sup> CD3+ Zellen/kg Körpergewicht in der CD34 Gruppe gegenüber 9,20 (Streuung: 5,2-18,0) x 10<sup>6</sup> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht und 2,22 (Streuung: 0,06-9,2) x 10<sup>4</sup> CD3+ Zellen/kg Körpergewicht in der CD3/CD19 depletierten Gruppe im Transplantat enthalten (p=0,8484).

**Tabelle 21; Zusammensetzung der Transplante in der CD34 selektionierten sowie in der CD3/CD19 depletierten Gruppe**

Transplantatzusammensetzung	CD3/CD19 Depletion	CD 34 Selektion
CD34+Zellen/kg KG x 10 <sup>6</sup>	9,20	9,6
CD3+ Zellen/kg KG x 10 <sup>4</sup>	2,22	0,9
NK-Zellen/kg KG x 10 <sup>6</sup>	7,15	-

### 3.5.2 Vergleich der hämatopoetischen Rekonstitution

#### 3.5.2.1 Vergleich der Rekonstitution der Thrombozyten

In der CD3/19 Gruppe lag der Median der Thrombozyten-Rekonstitution bei 11 Tagen (im Bereich von 7-14) und in der CD34 Gruppe bei 36 Tagen (im Bereich von 19 bis nicht erreicht) nach Transplantation (Abbildung 36). Dieser Unterschied war mit  $p < 0,0001$  signifikant (Log-rank Test).

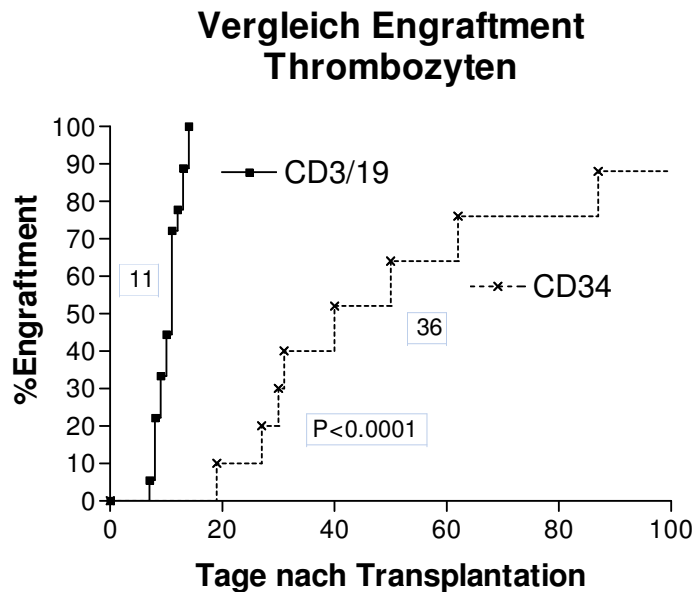


Abbildung 36; Vergleich des Thrombozytenengraftment in der CD3/19 depletiert und CD34 angereicherte transplantierten Gruppe (Kaplan-Meier-Kurve). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane der jeweiligen Gruppe bzw. die Signifikanz dar.

#### 3.5.2.2 Vergleich der Rekonstitution der Neutrophile Granulozyten

Die Granulozyten-Regeneration lag in der CD3/19 depletierten Gruppe bei 12 Tagen (im Bereich von 10-17) und in der CD34 Gruppe bei 19 Tagen (im Bereich von 12-42) nach Transplantation (Abbildung 37). Es ließ sich somit ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen ( $p < 0,0001$ ; Log-rank Test).

## Vergleich Engraftment Neutrophile

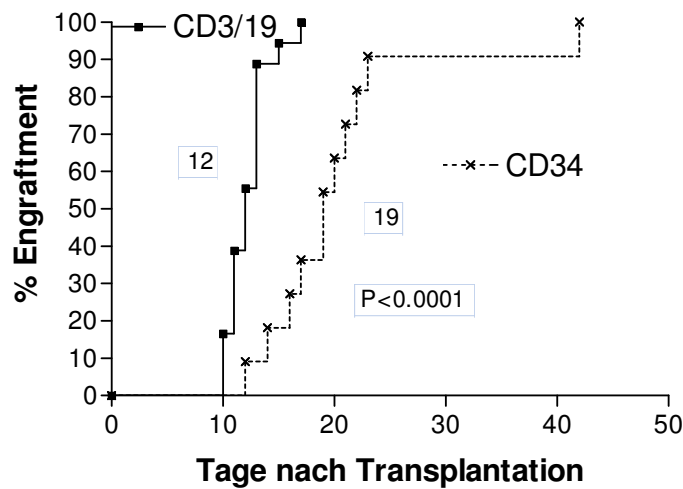


Abbildung 37; Vergleich des Engraftments der Neutrophilen Granulozyten in der CD3/19 depletiert und CD34 angereicherte transplantierten Gruppe (Kaplan-Meier-Kurve). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane der jeweiligen Gruppe bzw. die Signifikanz dar.

### 3.5.2.3 Vergleich des Chimärismus

In der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe erreichten alle Patienten spätestens 21 Tage (im Bereich von 12 bis 21 Tagen und einem MEDIAN von 14 Tagen) nach Transplantation einen vollen Spenderchimärismus (Abbildung 38). In der CD 34 transplantierten Gruppe hingegen, zeigte sich eine deutlich größere Varianz bis zum Erreichen eines vollen Spenderchimärismus (im Bereich von 26 bis 358 Tagen und einem MEDIAN von 29 Tagen - obwohl diese Gruppe das intensivere Konditionierungsregime erhielt. Dieser Unterschied zeigte sich im Log-rank Test mit  $p < 0,0001$  als signifikant.

### Vergleich Chimärismus CD3/19 und CD34

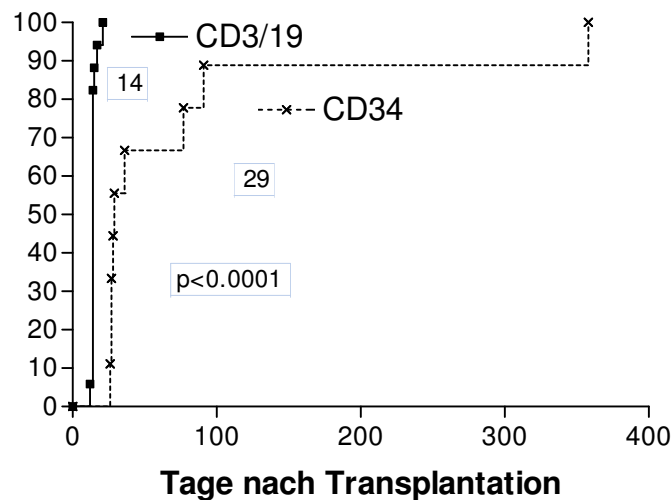


Abbildung 38; Vergleich der Tage bis zum Erreichen eines kompletten Chimärismus in der CD3/19 depletiert und CD34 angereicherte transplantierten Gruppe (Kaplan-Meier-Kurve). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane der jeweiligen Gruppe bzw. die Signifikanz dar.

#### 3.5.2.4 Vergleich der Transfusionsbedürftigkeit

Sowohl was die Anzahl der Erythrozytentransfusionen (Abbildung 39) als auch die der Thrombozytentransfusionen (Abbildung 40) angeht war ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen zu beobachten. Wurden in der CD34 angereichert transplantierten Gruppe im Median 27 (Streuung:16-91) Erythrozytentransfusionen benötigt (Abbildung 39 und Abbildung 40), konnte in der CD3/19 depletierten Gruppe nur eine benötigte Anzahl von 11 (Streuung:2-64) Transfusionen festgestellt werden. Dieser Unterschied war im Mann-Whitney Test mit  $p=0,0025$  signifikant. Bei den Thrombozytentransfusionen fällt dieser Unterschied mit 34 (Streuung: 13-110) benötigten Transfusionen in der CD34 angereichert transplantierten Gruppe und 4,5 (Streuung: 1-62) in der CD3/19 depletierten Gruppe ebenfalls signifikant aus ( $p=0,0010$ , Mann-Whitney Test). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die CD34-selektionierte Gruppe einem intensiveren Konditionierungsprotokoll ausgesetzt war als die CD3/CD19 depletierte Patientengruppe.



## Anzahl an Erythrozytenkonzentraten

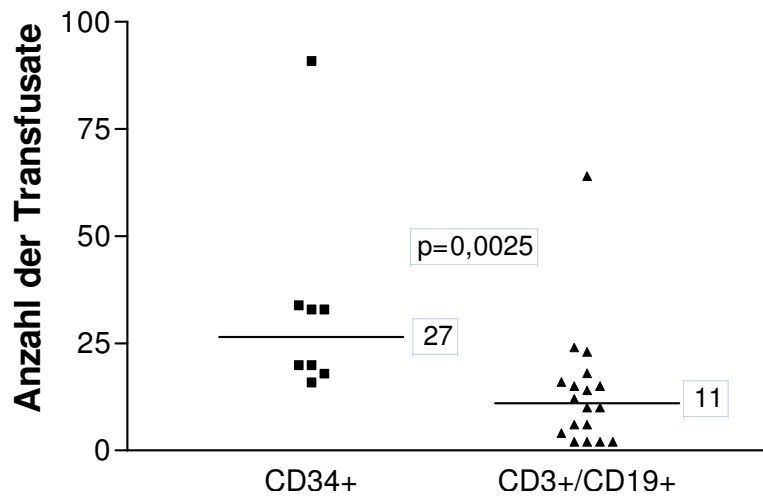


Abbildung 39; Vergleich der Anzahl benötigter Erythrozytentransfusionen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

## Anzahl an Thrombozytenkonzentraten

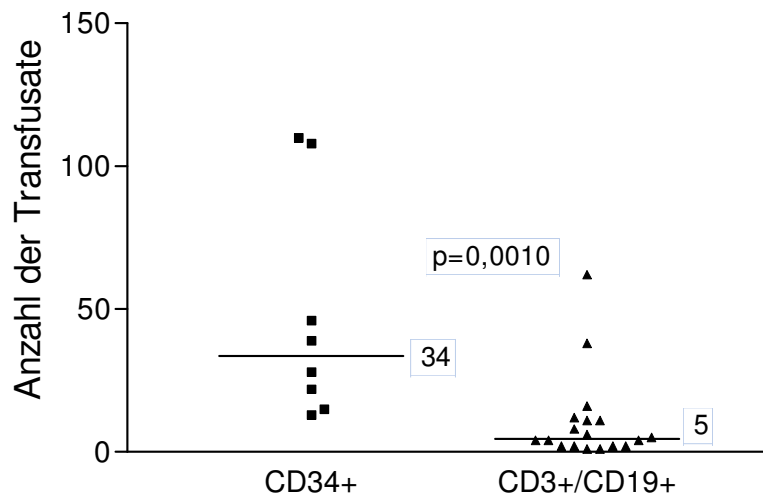


Abbildung 40; Vergleich der Anzahl benötigter Thrombozytentransfusionen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

Die Dauer der Transfusionsbedürftigkeit für Erythrozytentransfusionen (Abbildung 41) ist mit 106 (Streuung: 48-632) Tagen in der CD34+ Gruppe und 106 Tagen (Streuung: 7-375) in der CD3/19 Gruppe im Median identisch ( $p=0,4205$ , Mann-Whitney Test). Ein deutlicher Unterschied findet sich jedoch in

der Dauer der Transfusionsbedürftigkeit nach Transplantation für Thrombozytentransfusionen (Abbildung 42) mit 32 (Streuung: 19-54) Tagen in der CD34 Gruppe gegenüber 10 (Streuung: 7-14) Tagen. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch mit  $p=0,6769$  im Mann-Whitney Test nicht als signifikant.

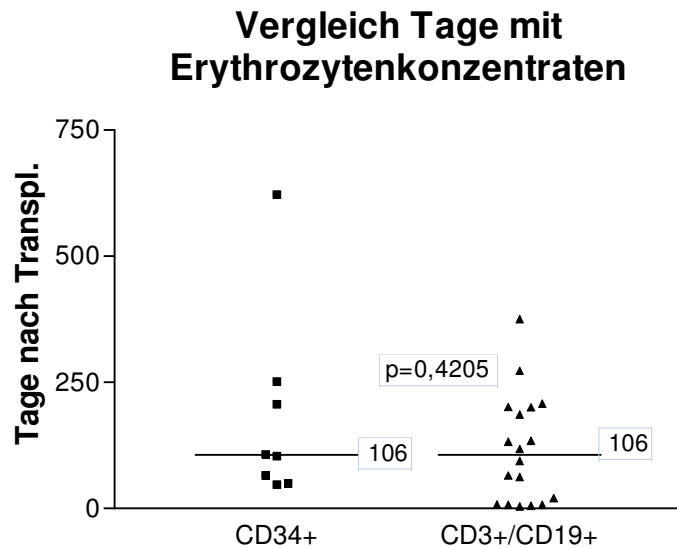


Abbildung 41; Vergleich der Tage mit benötigten Erythrozytentransfusionen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

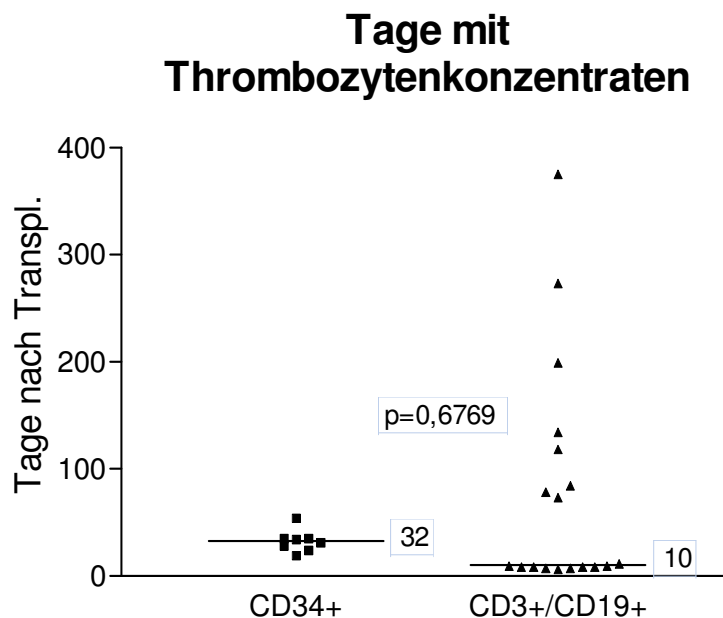


Abbildung 42; Vergleich der Tage mit benötigten Thrombozytentransfusionen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

### 3.5.3 Immunrekonstitution und Funktion

#### 3.5.3.1 Vergleich der Rekonstitution der Natürliche Killerzellen

Sowohl in der CD34 angereicherten als auch in der CD3/19 depletierten Gruppe zeigte sich ein rasches Engraftment der NK-Zellen (0-2 Monate). Exemplarisch wurde die Absolutzahl an CD56+ Zellen in beiden Gruppen an Tag 50 (Abbildung 43) und an Tag 100 (Abbildung 44) verglichen (jeweils +/- 20 Tage). An beiden Messpunkten zeigt sich eine im Median deutlich höhere Zahl an NK-Zellen in der CD3/19 depletierten Gruppe. An Tag 50 finden sich in der CD34 Gruppe im Median 179 (Streuung: 136-703) CD56+ Zellen/ $\mu$ L im Vergleich zu 285 (Streuung: 6-1941) CD56+ Zellen/ $\mu$ L in der CD3/19 depletierten Gruppe. Dieser Unterschied zeigte sich mit  $p=0,1021$  im Mann-Whitney Test als nicht signifikant. An Tag 100 finden sich in der CD34 Gruppe im Median 201 (Streuung: 93-724) CD56+ Zellen/ $\mu$ L, während diese sich in der CD3/19 depletierten Gruppe auf 238 (Streuung: 162-2541) CD56+ Zellen/ $\mu$ L belaufen. Mit  $p=0,055$  zeigte sich auch hierbei im Mann-Whitney Test kein signifikanter Unterschied.

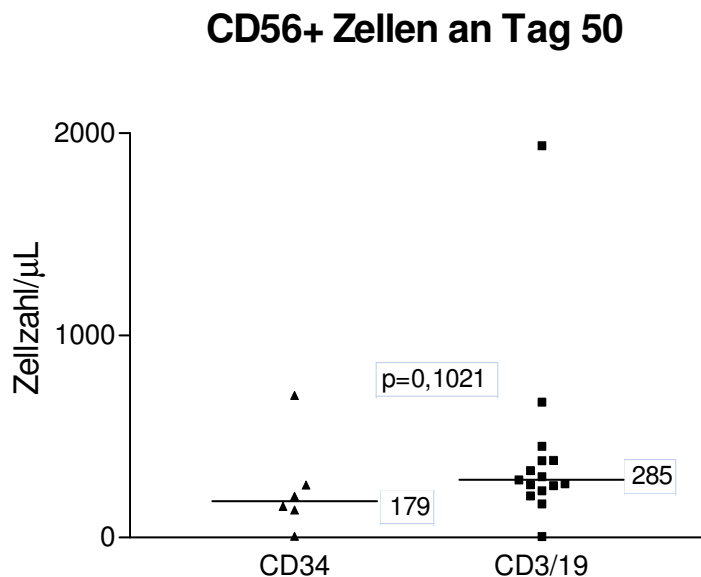
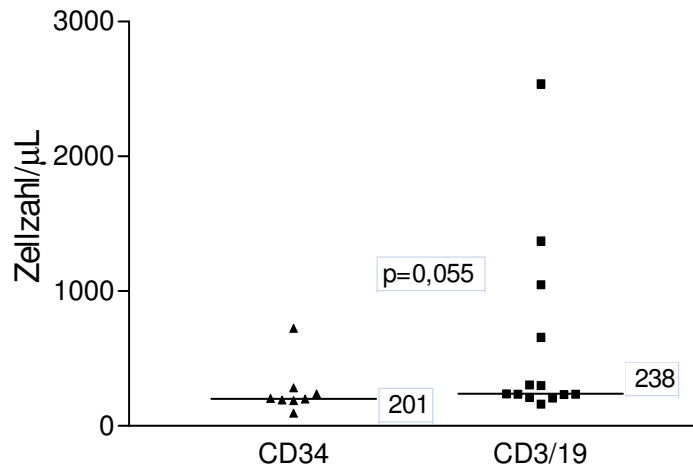


Abbildung 43; Vergleich der Absolutzahlen der CD56 positiven Zellen an Tag 50 (+/- 20). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

## CD56+ Zellen an Tag 100



**Abbildung 44; Vergleich der Absolutzahlen der CD56 positiven Zellen an Tag 100 (+/- 20). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.**

Es ist zu beobachten, dass in beiden Gruppen 30 Tage nach Transplantation normal hohe Zellzahlen vorlagen, mit leicht höheren Werten in der CD3/CD19 Gruppe (264 zu 229) (Abbildung 45). Während sich in der CD3/CD19 transplantierten Gruppe die NK-Zellen auf dem Anfangsniveau stabilisieren, tritt in der CD34 Gruppe jedoch ungefähr an Tag 40 eine deutliche Regression ein, so dass hier im Median nur noch 82 NK-Zellen/µL zu finden waren. Im Verlauf stabilisieren sich in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe die NK-Zellen bei Werten um 300 Zellen/µL, bevor dann ab Tag 250 ein leichter Abschwung zu beobachten ist. In der CD34 angereicherten Gruppe entwickeln sich die CD56 positiven Zellen fast durchweg auf niedererem Niveau. An Tag 400 ist mit 179 (Streuung: 2-1503) Zellen/µL in der CD3/19 Gruppe und 188 (Streuung: 111-329) in der Zellen/µL CD34 Gruppe eine vergleichbare Zellzahl zu messen (Tabelle 22). Insgesamt ist die Entwicklung der CD56 positiven Zellen in beiden Gruppen mit  $p=0,0068$  im Mann-Whitney Test als signifikant unterschiedlich anzusehen.

### Vergleich Median CD56

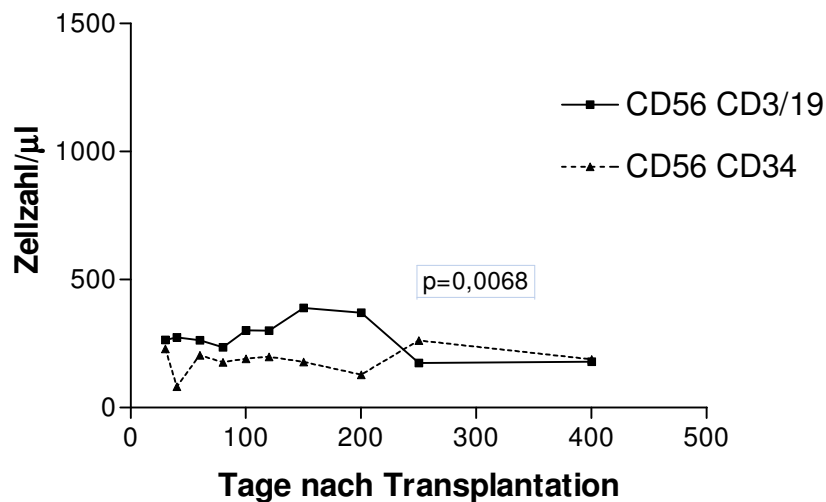


Abbildung 45; Vergleich der Mediane der CD56 positiven Zellen im Verlauf in beiden Gruppen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

Tabelle 22; Vergleich der Median der CD56 positiven Zellen im Verlauf der beiden Gruppen

Tage p. TX	CD3/19		CD34	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
30	264	1 - 534	229	46 - 604
40	274	178 - 1064	82	0 - 886
60	263	110 - 332	204	136 - 703
80	236	3 - 2809	177	62 - 587
100	302	103 - 2541	191	160 - 282
120	301	164 - 1373	198	93 - 724
150	389	87 - 494	178	178 - 178
200	370	80 - 1436	128	30 - 493
250	174	123 - 635	262	257 - 267
400	179	2 - 1503	188	111 - 329

#### 3.5.3.2 Vergleich der Rekonstitution der B-Zellen

Es zeigte sich eine deutlich schnellere Regeneration der B-Zellen in der CD34 angereichert transplantierten Gruppe mit Median-Werten von 265 (Streuung: 77-378) Zellen/µl im Vergleich zu 12 (Streuung: 0-258) Zellen/µl in der CD3/19 Gruppe an Tag 50 (Abbildung 46). Dieser Unterschied zeigte sich mit  $p=0,0093$  im Mann-Whitney Test als signifikant. An Tag 100 lagen in der CD34 Gruppe 256 (Streuung: 8-762) und in der CD3/CD19 Gruppe 57 (Streuung: 0-226) CD19 positive Zellen/µl vor (Abbildung 47). Auch an Tag 100 zeigte sich damit

ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppe ( $p=0,03$  im Mann-Whitney Test)

### CD19+ Zellen an Tag 50

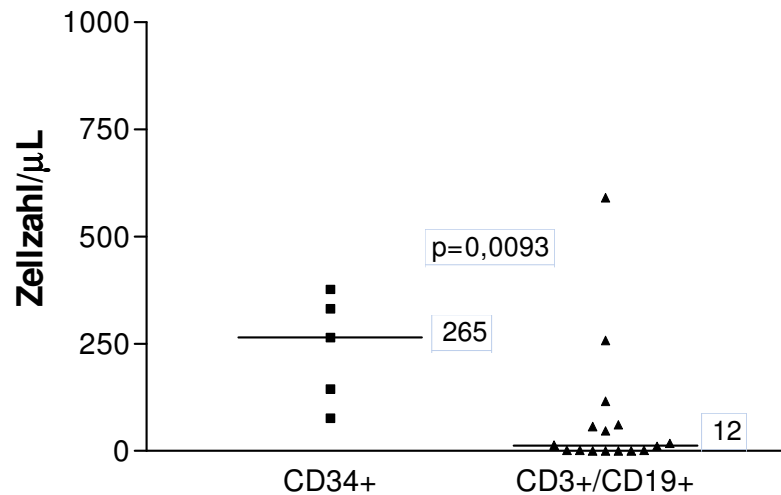


Abbildung 46; Vergleich der Absolutzahlen der CD19 positiven Zellen an Tag 50 (+/- 20). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

### CD19+ Zellen an Tag 100

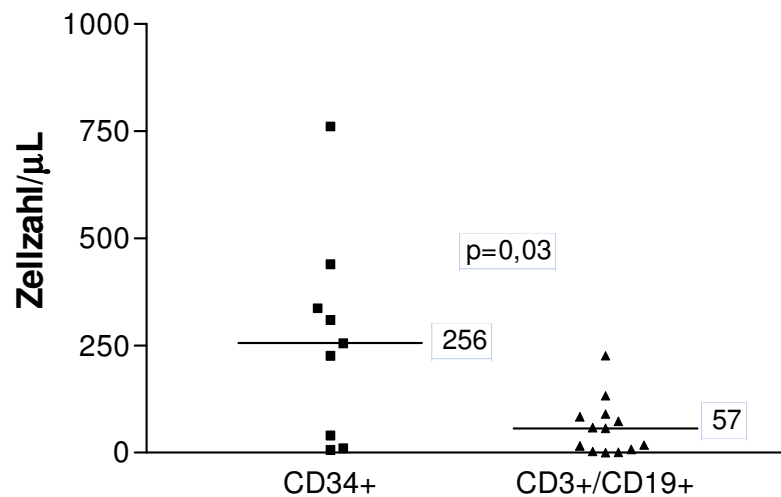


Abbildung 47; Vergleich der Absolutzahlen der CD19 positiven Zellen an Tag 100 (+/- 20). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

Der Verlauf der Immunrekonstitution wurde von Tag 0 bis 400 nach Transplantation beobachtet (Abbildung 48 sowie Tabelle 23). Es zeigt sich eine deutlich schnellere Rekonstitution der CD19/20 Zellen in der CD34 angereicherten Gruppe mit einem Peak an Tag 80 nach Transplantation. In der CD3/19 deple-

tierten Gruppe zeigt sich eine deutlich langsamere Rekonstitution mit niedrigeren Werten in den 400 untersuchten Tagen nach Transplantation. Abgesehen von der anfänglich schnelleren Rekonstitution in der CD34 Gruppe lässt sich ab Tag 200 in beiden Gruppen ein steter Anstieg der Zellen messen, der an Tag 400 in der CD 34+ Gruppe bei 211 (Streuung: 71-343) bzw. in der CD3/CD19 Gruppe bei 82 (Streuung: 2-304) Zellen/ $\mu$ L gipfelt. Der Gesamtverlauf der B-Zellentwicklung nach Transplantation ist in den beiden Gruppen signifikant unterschiedlich im Mann-Whitney Test ( $p=0,0003$ ).

### Vergleich Median CD19/20

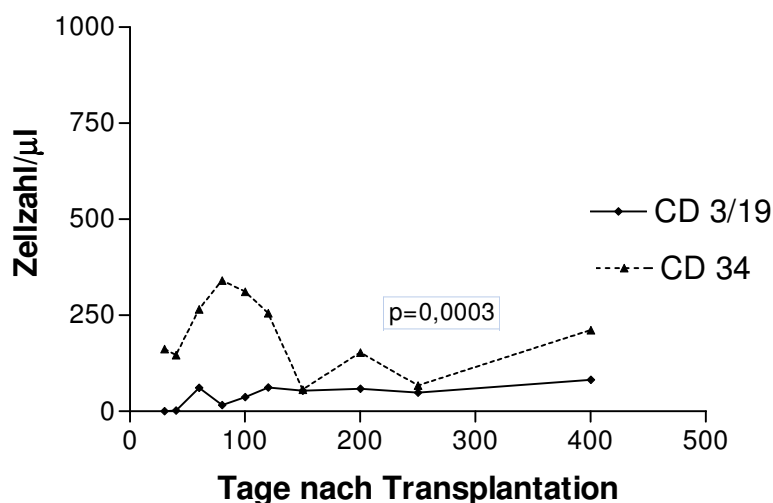


Abbildung 48; Vergleich der Mediane der CD19 positiven Zellen im Verlauf in beiden Gruppen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

Tabelle 23; Vergleich des Verlaufs der CD 19 Immunrekonstitution in medianer Zellzahl/ $\mu$ L

Tage p. TX	CD3/19		CD34	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
30	0	0 - 8	162	0 - 324
40	2	0 - 144	146	146 - 146
60	61	0 - 269	265	77 - 378
80	16	0 - 209	340	3 - 6049
100	37	1 - 226	311	65 - 762
120	62	0 - 220	255	8 - 263
150	54	0 - 166	56	56 - 56
200	59	0 - 266	153	141 - 350
250	49	0 - 377	67	12 - 123
400	82	2 - 304	211	71 - 343

### 3.5.3.3 Vergleich der Rekonstitution der T-Zellen

Wir beobachteten sowohl in der CD3/CD19 depletierten Gruppe als auch in der CD 34 selektionierten Gruppe eine langsame Erholung der T-Zellen. Die Messwerte an Tag 50 und Tag 100 (jeweils +/- 20 Tage) zeigen eine schnellere Rekonstitution in der CD 3/19 depletierten Gruppe. Die Absolutwerten lagen an Tag 50 bei 16 (Streuung: 0-412) T-Zellen/ $\mu$ l in der CD3/19 Gruppe und 2 (Streuung: 0-19) T-Zellen/ $\mu$ l in der CD34 Gruppe (Abbildung 49). Dieser Unterschied zeigte sich als nicht signifikant im Mann-Whitney Test ( $p=0,1427$ ).

An Tag 100 lagen die Werte in der CD3/CD19 Gruppe bei 163 (Streuung: 15-1416) CD3+ Zellen/ $\mu$ l im Vergleich zu bzw. 81 (Streuung: 30-494) CD3+ Zellen/ $\mu$ l in der CD34 angereichert transplantierten Gruppe (Abbildung 50). Dieser Unterschied war, wie schon der Unterschied an Tag 50 im Mann-Whitney Test nicht signifikant ( $p=0,5261$ ).

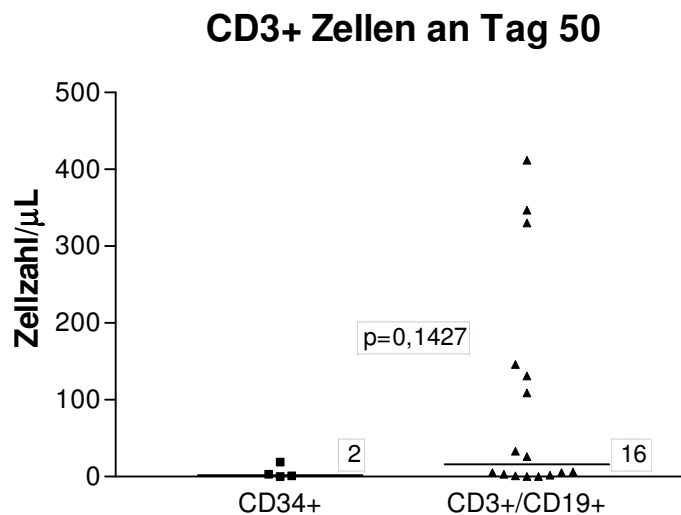
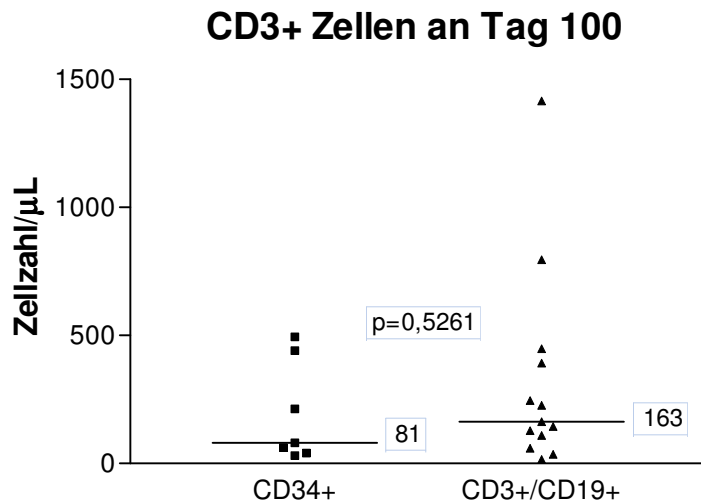


Abbildung 49; Vergleich der Absolutzahlen der CD3 positiven Zellen an Tag 50 (+/- 20). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.



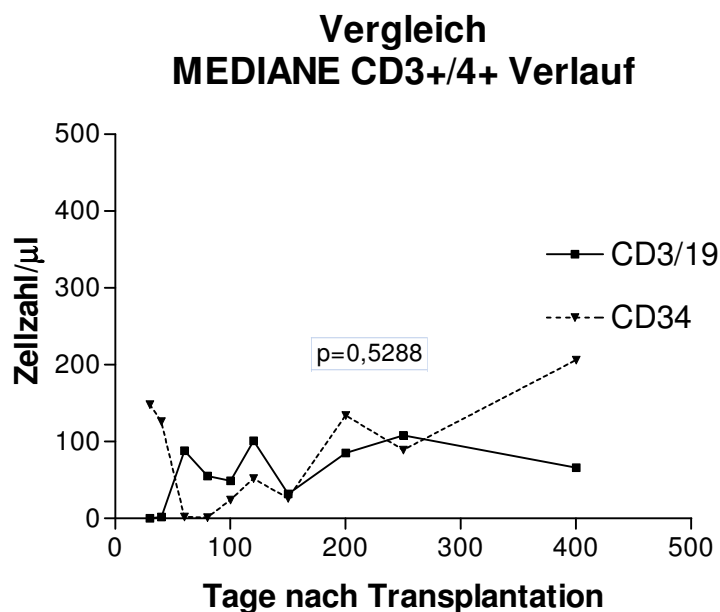


**Abbildung 50; Vergleich der Absolutzahlen der CD3 positiven Zellen an Tag 100 (+/- 20). Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.**

Im Verlauf der ersten 400 Tage wurden die CD3 positiven Zellen differenzierter untersucht, in dem zwischen den Subpopulationen CD3+/CD4+ und CD3+/CD8+ unterschieden wurde. Die Normalwerte bei gesunden Kontrollen liegen für CD4+ T-Zellen zwischen 29 und 59% der Lymphozyten (entspricht 450 – 2000 Zellen/µL) und für CD8+ T-Zellen zwischen 19 und 48% der Lymphozyten (entspricht 250-1700 Zellen/µL). Wir fanden in beiden Gruppen eine verlangsamte Rekonstitution sowohl in der CD8+ als auch in der CD4+ Subpopulation (Abbildung 51 sowie Abbildung 52), jedoch wieder mit höheren Werten in der CD3/19 depletierten Gruppe, wobei zu beachten ist, dass in den ersten 40 Tagen nach Transplantation die Werte in der CD 34 angereichert transplantierten Gruppe deutlich über denen der CD3/19 depletierten Gruppe liegen, bevor sie dann stark abfallen. In der CD3/19 Gruppe ist auffällig, dass die CD3+/4+ Werte zu Beginn höher ausfallen als die CD3/8 und schneller ansteigen. Zwischen Tag 100 und Tag 250 scheinen sich beide Subpopulationen parallel zueinander zu entwickeln, jedoch mit nun niedrigeren Werten in der CD3+/4+ Subpopulation. Ab Tag 250 steigen die CD3+/8+ Zellen stärker an, um sich dann an Tag 400 wieder den CD3+/4+ Zellen anzunähern. In beiden Gruppen ist ein Peak um den Tag 100 nach Transplantation für beide untersuchte Subpopulationen zu beobachten. An Tag 150 nach Transplantation zeigt sich in der CD34 angereicherten Gruppe bei den CD3+/8+ Werten ein steiler

Anstieg, der sich jedoch bis zum Tag 200 wieder normalisiert hat. Von hier an entwickeln sich beide Subpopulationen fast identisch in der CD34 selektionierten Gruppe. An Tag 400 zeigen sich in beiden Subpopulationen höhere Werte in der CD 34 selektionierten Gruppe (Tabelle 24 sowie Tabelle 25).

Sowohl in der CD3+/4+ Subpopulation als auch in der CD3+/8+ Subpopulation zeigten sich im Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney Test. Bei der Entwicklung der CD3+/4+ Subpopulation zeigte sich ein p-Wert von  $p=0,5288$ ; bei der Entwicklung der CD3+/8+ Subpopulation war ein p-Wert von  $p=0,1903$  zu dokumentieren.



**Abbildung 51; Vergleich der Mediane der CD3+/CD4+ Zellen im Verlauf in beiden Gruppen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.**

Tabelle 24; Vergleich des Verlaufs der CD3+/CD4+ Immunrekonstitution in medianer Zellzahl/ $\mu$ L

Tage p. TX	CD3/19		CD34	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
30	0	0 – 15	148	0 - 297
40	2	0 – 81	126	2 - 250
60	88	2 – 303	2	0 - 246
80	55	0 – 277	1	0 - 205
100	49	1 – 306	24	0 - 181
120	101	9 – 192	52	13 - 220
150	32	0 – 189	26	23 - 30
200	85	1 – 230	134	6 - 324
250	108	18 – 198	89	57 - 121
400	66	1 – 211	206	171 - 318

### Vergleich MEDIANE CD3+/8+ Verlauf

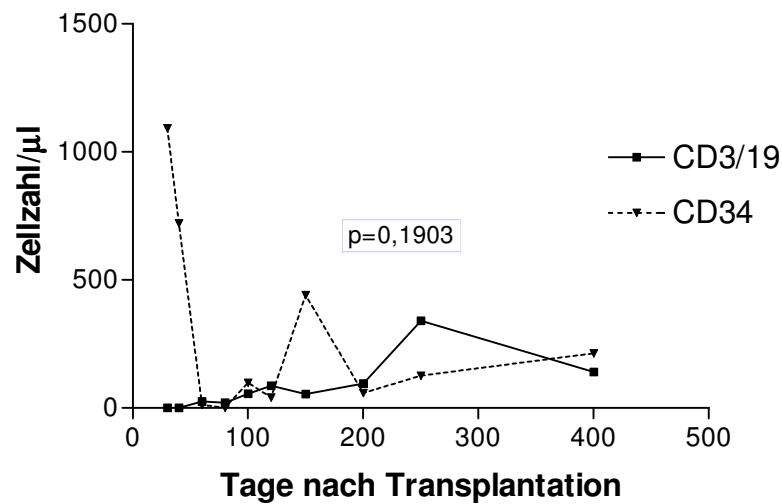


Abbildung 52; Vergleich der Mediane der CD3+/CD8+ Zellen im Verlauf in beiden Gruppen. Die angegebenen Zahlen stellen die Mediane dar.

Tabelle 25; Vergleich des Verlaufs der CD3+/CD8+ Immunrekonstitution in medianer Zellzahl/ $\mu$ L

Tage p. TX	CD3/19		CD34	
	MEDIAN	Streuung	MEDIAN	Streuung
30	1	0 - 94	1092	0 - 2184
40	1	0 - 424	720	1 - 1438
60	26	2 - 111	12	0 - 1180
80	21	0 - 1345	1	0 - 979
100	56	0 - 282	98	0 - 745
120	87	25 - 1227	40	3 - 354
150	54	0 - 359	441	14 - 868
200	96	1 - 422	58	10 - 796
250	341	1 - 707	126	84 - 169
400	140	3 - 612	213	141 - 611

### 3.5.4 Vergleich der Infektionen und GvH-Reaktionen

In beiden Gruppen wurde das Auftreten von Infektionen im ersten Jahr nach Transplantation beobachtet und verglichen (Tabelle 26). Es zeigen sich zwar in der Gesamtsumme in beiden Gruppen je 16 stattgehabte Infektionen, jedoch gilt es hier zu bedenken, dass die untersuchten Gruppen unterschiedlich groß waren. Während sich in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe bei 18 Patienten 16 Infektionen zeigten, fanden sich bei 10 Patienten in der CD34 selektierten Gruppe ebenfalls 16 Infektionen. Dieser Unterschied zeigte sich mit  $p=0,0211$  im Mann Whitney Test als signifikant. In beiden Gruppen waren bakterielle Infektionen führend unter den Ursachen der Infektionen und Pilzinfektionen bildeten die kleinste Gruppe.

Tabelle 26; Vergleich der Infektionshäufigkeit in der CD3/19 depletiert (n=18) und CD34 selektiert (n=10) transplantierten Gruppe im ersten Jahr nach Transplantation

Art der Infektion	Ereignisse CD3/CD19	Ereignisse CD34
Virale Infektion	5	6
Bakterielle Infektion	7	8
Pilzinfektion	1	0
Unbekannte Ursache	3	2
Gesamt	16	16

Neben den stattgehabten Infektionen wurde darüber hinaus das Auftreten von GvH-Reaktionen beobachtet (Tabelle 27). Die GvH-Reaktion wird in 4 Schweregrade unterteilt, wobei sich in der CD3/CD19 Gruppe die schwerste Ausprägung (GvH-Reaktion Grad 4) nur bei einem Patienten zeigte. In der CD3/CD19

depletiert transplantierten Gruppe zeigten sich mehr GvH-Reaktionen der Stufe 2 wohingegen die Ausprägung der GvH-Reaktion in der CD34 selektierten Gruppe sich hauptsächlich auf den Schweregrad 1 beschränken. Insgesamt zeigten sich im Auftreten einer GvH-Reaktion unabhängig vom Schweregrad mit  $p=0,9815$  keine signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney Test.

**Tabelle 27; Vergleich Grade der GvH-Ereignisse in der CD3/19 depletiert (n=18) CD34 selektiert (n=10) transplantierten Gruppe**

Grad der GvH-Reaktion	Ereignisse CD3/CD19	Ereignisse CD34
0	9	3
I	0	6
II	8	1
III	0	0
IV	1	0

## 4. Diskussion

Die allogene HSZT stellt zur Behandlung vieler hämatologische und nicht-hämatologische Erkrankungen die einzige kurative Therapieoption dar. Im Falle eines fehlenden passenden HLA-identen Spenders ermöglicht eine haploidente HSZT die Durchführung dieser Therapieoption. Eine Transplantation unter Inkaufnahme einer 50%igen HLA-Disparität birgt jedoch eine Reihe spezifischer immunologischer Risiken aber auch einige potentielle Vorteile.

Ein großes Risiko stellt die Transplantat-Gegen-Wirt-Reaktion dar, die zu schwerwiegenden Komplikationen führen und den Erfolg einer Transplantation limitieren kann. Da diese Reaktion hauptsächlich T-Zell vermittelt ist, bildet eine ausgeprägte T-Zell Depletion die Grundlage für eine erfolgreiche haploidente Transplantation. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der T-Zell Depletion, die entweder darauf abzielen, gezielt T-Zellen aus dem Transplantat zu entfernen (Negativselektion) oder alle CD34 positiven Zellen aus dem Transplantat zu gewinnen und diese dann zu transplantieren (Positivselektion). Durch die Methode der CD3/CD19 Depletion, die einer Negativselektion entspricht, bleiben im Transplantat für das Engraftment wichtige Zellen enthalten, was eine bessere Immunrekonstitution ermöglichen kann.

Da nun jedoch das alloreaktive Potential der T-Zellen für den wichtigen Transplantat-Gegen-Leukämie-Effekt fehlt, spielen im Setting einer T-Zell depletierten Transplantation die NK-Zellen eine entscheidende Rolle. Die durch sie vermittelte Alloreaktivität ist entscheidend für eine Eradizierung eventuell vorhandener residueller Tumorzellen und die Infektabwehr.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Engraftment und der Immunrekonstitution die Entwicklung der TCR-V $\beta$ -Rezeptor-Subpopulationen und des KIR Repertoires der NK-Zellen in einer CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation untersucht. Abschließend wurde die Immunrekonstitution mit einer CD34 angereichert transplantierten Gruppe verglichen

#### **4.1 Hämatopoetische Rekonstitution**

Der Erfolg einer Stammzelltransplantation nach HDC hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab. Die Zahl der transfundierten Zellen und die Dauer der Aplasie spielen hierbei ebenso eine Rolle, wie die Komplikationen, Infektionen, Blutungen und/oder Abstoßungsreaktionen. Ein zuverlässiges Engraftment ist ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Stammzelltransplantation. Die Granulozytenregeneration dauerte in der CD3/19 depletierten Gruppe im Median 13 Tage (im Bereich von 10-17), die Thrombozyten-rekonstitution war im Median nach 11 Tage (im Bereich von 7-14) abgeschlossen.

In der CD34 Gruppe erholten sich die Granulozyten nach im Median 19 Tagen (im Bereich von 12-42) nach Transplantation, die Thrombozytenzahl lag nach 35 Tagen (im Bereich von 19 bis nicht erreicht) im Normbereich.

Es ließ sich somit ein signifikanter Unterschied beim Engraftment der Granulozyten zwischen beiden Gruppen feststellen ( $p < 0,0001$ ; Log-rank Test) und auch die Thrombozyten Regeneration war bei der CD3/19 Gruppe signifikant schneller als in der CD34 Gruppe ( $p < 0,0001$ ; Log-rank Test), obwohl ein ähnlicher Gehalt an CD34+ Zellen vorlag. Diese signifikanten Unterschiede belegen die Wichtigkeit und den Einfluss der Transplantatzusammensetzung auf das Engraftment. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass bei einer CD34+ Selektion im Gegensatz zu einer Transplantation mit CD3/19 depletierten Stammzellen potentiell für ein Engraftment und den Transplantat Gegen Leukämie Effekt verantwortliche Zellen, wie NK-Zellen, Monozyten, CD34 negative Stammzellen („Facilitating Cells“) und dendritische Zellen nicht mit transplantiert werden. Außerdem erhielt die CD3/CD19 Gruppe eine RIC.

Die CD34 selektionierte Patientenkohorte weist ein deutlich langsames Engraftment auf, als es von Aversa et al. bei CD34+ selektierten haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantationen beschrieben worden ist (11 Tage für eine konstanten absolute Granulozytenzahl  $> 1000/\mu\text{L}$  und 15 Tage bis zu einer konstanten absoluten Thrombozytenzahl  $> 25000/\mu\text{L}$ ) [11]. Erklären lässt sich diese Abweichung hauptsächlich mit den unterschiedlichen verwendeten CD34 Dosen in den beiden Studien. Aversa et al. verwendeten Transplantate mit  $13.8 \times 10^6$  CD34+/kg gegenüber  $8.5 \times 10^6$  CD34+/kg in unserer Ko-

horte. Darüber hinaus waren 16% der Patienten in der italienischen Studie jünger als 20 Jahre. Dosen von mehr als  $10 \times 10^6$  CD34+/kg bei Erwachsenen sind jedoch nur schwer zu erreichen und setzen den Spender womöglich unnötigen Risiken aus.

Wie die Ergebnisse in der CD3/CD19 depletierten Gruppe zeigen, ist ein schnelles Engraftment mit dieser Technik auch bei einer niedrigen CD34-Dosis erreichbar (Median:  $5.2 \times 10^6$  CD34+/kg) und eine erfolgreiche haploidente Stammzelltransplantation auch ohne eine Megadosis an CD34 positiven Zellen möglich. Die in der CD3/CD19 depletierten Gruppe beobachteten Zeiten für das Engraftment lagen mit 13 Tagen für die Granulozyten genau auf und mit 11 Tagen für die Thrombozyten 2 Tage über dem von Lowenthal et al. in einer retrospektiven Analyse von 243 Patienten mit einer malignen hämatologischen Erkrankung nach autologer peripherer Blutstammzelltransplantation publizierten Median [85]. Die Tatsache, dass auch in dieser Studie mitunter deutlich höhere CD34-Dosen als in unserem Kollektiv verwendet wurden (der Median lag bei  $8.8 \times 10^6$  CD34+/kg) bestätigt unsere Annahme, dass durch eine CD3/CD19 depletierte Transplantation bei gleicher CD34+ Zellzahl zu einem deutlich schnelleren Engraftment kommt als nach einer CD34 selektionierten Transplantation. Die Hauptursachen hierfür dürften in den mittransplantierten bereits besprochenen „Facilitating Cells“ liegen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Dauer und der Schweregrad der Aplasie nach Transplantation und die gewählte Art der Konditionierung (RIC oder HDC) direkte Auswirkungen auf das Auftreten von Infektionen in den ersten Wochen nach Transplantation hat [45]. Die Zusammensetzung des Transplantates und die Art und Weise der GvHD Prophylaxe sind weitere wichtige Faktoren, die die hämatopoetische Erholung beeinflussen und demzufolge ebenso das Auftreten und die Schwere der Infektionen in der ersten Zeit nach Transplantation bestimmen können. Darüber hinaus sind noch durch die vorausgegangene Konditionierung gesetzte Mukosaschäden, lokale Pilz und Virusinfektionen sowie das Vorhandensein eines zentralen Venenkatheters als mögliche Risikofaktoren für Infektionen zu nennen. Das Erreichen einer schnellen hämatopoeti-



sche Regeneration mit einer damit verbundenen kürzeren Dauer an Leuko- und Thrombozytopenie stellt damit ein entscheidendes therapeutisches Ziel dar.

Weiterführende Untersuchungen konnten nachweisen, dass die Anzahl an CD34+ Zellen/kg Körpergewicht tatsächlich zuverlässige prädiktive Aussagen über die zu erwartenden hämatopoetische Regeneration zulässt [75]. Ein zuverlässiges Engraftment kann ab einer Schwelle von  $2.00-2.50 \times 10^6$  CD34+ Zellen/kg erwartet werden, jedoch konnte gezeigt werden, dass mit einer höheren Zelldosis auch eine schneller hämatopoetische Rekonstitution einhergeht [154]. Lowenthal et al. konnte neben der Anzahl der im Transplantat enthaltenen CD34+ Zellen auch noch den Gebrauch von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zur Mobilisation als entscheidenden Faktor für ein rasches Engraftment ausmachen [85]. Jedoch konnte eine höhere Stammzelldosis nicht mit einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb der ersten 100 Tage korreliert werden [76].

Durch die heute verwendete Methode der peripheren Blutstammzellentransplantation, die inzwischen weit häufiger als eine herkömmlichen Knochenmarkstransplantation eingesetzt wird [5], wird eine raschere hämatopoetische Rekonstitution erreicht und die Rate infektiöser Komplikationen wird gesenkt [19],[28]. Diese schnellere hämatopoetische Erholung könnte auf die signifikant höhere Gesamtzellzahl kernhaltiger Zellen sowie bereits differenzierte Vorläuferzellen in den Blutstammzellpräparaten im Vergleich zu Knochenmarkstransplantaten zurückzuführen sein. Hierdurch wird das Anwachsen des Transplantates erleichtert [21], [122]. Schon 1989 wurden von Siena et al. [139] die Zahl an im Transplantat enthaltenen CD34 Zellen als möglicher prognostischer Wert für das rekonstruktive Potential der Blutzellen angesehen. Jedoch muss in diesen Vergleich auch die höhere Rate an chronischen GvH-Reaktionen nach PBSCT im Vergleich zur herkömmlichen KM einbezogen werden.

Es wird postuliert, dass schon ausgereifte transplantierte Stammzellen für das schnelle Engraftment (10-30 Tage nach Transplantation) verantwortlich sind,

wohingegen undeterminierte pluripotente hämatopoetische Progenitorzellen für die Langzeithämatopoese (6-12 Monate nach Transplantation) von hauptsächlichster Bedeutung sein sollen [96],[138].

Das deutlich schnellere Engraftment in unserem Vergleich schlägt sich auch in der niedrigeren Transfusionsbedürftigkeit in der CD3/CD19 depletierten Gruppe nieder. Sowohl was die Anzahl der Erythrozytentransfusionen als auch die der Thrombozytentransfusionen angeht, war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu beobachten ( $p=0,0025$  für Erythrozyten und  $p=0,0010$  für Thrombozyten im Mann-Whitney Test). Dies ist ein wichtiger Faktor sowohl in finanzieller Hinsicht aber vor allem Patientensicherheit betreffend. Die Dauer der Transfusionsbedürftigkeit für Erythrozyten unterscheidet sich in beiden Gruppen nicht grundlegend ( $p=0,4205$ , Mann-Whitney Test), ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Unterschied findet sich in der Dauer der Thrombozytentransfusionsbedürftigkeit nach Transplantation ( $p=0,6769$ , Mann-Whitney Test). Eine Untersuchung von Ashihara et al. [6] konnte zeigen, dass eine CD34-Dosis  $>5 \times 10^6$  CD34+/kg mit einer deutlich geringeren Anzahl an Thrombozytentransfusaten einherging (MEDIAN=25) und die Begleit- und Folgekosten der Behandlung nach Transplantation deutlich senken kann. Bei vergleichbarer CD34 Dosis publizierte die japanische Arbeitsgruppe einen Transfusionsbedarf mit einem MEDIAN von 40 (MEDIAN unserer CD34-selektionierten Gruppe=33). Darüber hinaus zeigte sich in der CD3/CD19 depletierten Gruppe mit einem MEDIAN von 11 benötigten Transfusionen ein deutlich niedrigeres Transfusionsbedürfnis.

Das Engraftment kann nur vor dem Hintergrund der vorher stattgehabten Konditionierung wirklich aussagekräftig beurteilt werden. Ziel einer Konditionierungstherapie ist auf der einen Seite die zu Grunde liegende Erkrankung des Patienten zu eradizieren, und auf der anderen Seite ein Anwachsen des Transplantates durch die Unterdrückung des Immunsystems des Patienten zu ermöglichen. Es ist deshalb insbesondere in der CD3/CD19 depletierten Gruppe nicht auszuschließen, dass nicht nur die Transplantatzusammensetzung sondern auch die

eingesetzte dosisreduzierte Konditionierung einen positiven Einfluss auf das Engraftment ausübt.

#### **4.2 Immunrekonstitution und beeinflussende Faktoren**

Der Reifungsprozess transplanteder hämatopoetischer Stammzellen und determinierter Progenitorzellen zu Zellen der spezifischen und der unspezifischen Abwehr wird als Immunrekonstitution bezeichnet. Eine erfolgreiche und möglichst rasche Wiederherstellung der Immunität ist von entscheidender prognostischer Bedeutung für die Patienten nach HSZT, da die verzögerte Immunrekonstitution nach einer haploidenten HSZT eine der Hauptursache für Komplikationen und Todesfälle ist [153].

Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft und Entwicklungswege der einzelnen Zellen des Immunsystems, unterscheidet sich der zeitliche Ablauf der funktionellen und quantitativen Rekonstruktion unterschiedlicher Zellreihen.

Der vorausgegangenen Konditionierung und folgenden Transplantation schließt sich bei komplikationslosem Verlauf eine rasche Rekonstitution des hämatopoetischen Systems und der unspezifischen, zellulären Immunität an. Im Gegensatz zu diesem relativ schnell abgeschlossenen Vorgang (meist innerhalb eines Monats), bedarf die Rekonstitution der spezifischen, zellulären Immunität deutlich mehr Zeit.

Unterschiedlichste Faktoren, sowohl vor als auch nach der Transplantation beeinflussen eine rasche Immunrekonstitution maßgeblich. Diese beeinflussenden Faktoren umfassen krankheits-, patienten- und transplantatbezogene Ursachen. Neben der zugrunde liegenden Erkrankung, dem Alter der Patienten, vorhergegangenen Chemotherapien, Konditionierungstherapie (Chemotherapie und/oder Bestrahlung), der Art der Stammzellgewinnung und der Transplantatbeschaffenheit beeinflussen also auch eine eventuell auftretenden Transplantat Gegen Wirt Reaktion, immunsuppressive Behandlung, Antibiotikagabe oder die Gabe von intravenösen Immunglobulinen die Wiederherstellung des Immunsystems [52]. Wiederum ist bei einem Vergleich der Immunrekonstitution der beiden

Gruppen ein möglicherweise positiver Effekt der dosisreduzierten Konditionierung in der CD3/CD19 Gruppe nicht auszuschließen.

Die Bedeutung der Stammzellenquelle für eine Transplantation wurde in verschiedenen vergleichenden Studien untersucht [7]. Aktuell stehen das Knochenmark, periphere Blutstammzellen (PBSZ) sowie Nabelschnurblut als mögliche Quelle für Stammzellen zur Verfügung. Jedoch ist hier natürlich nicht jede Option für alle Patienten gegeben. Studien von Körbling et al. [78] und Champlin et al. [27] legen den Schluss nahe, dass die Immunrekonstitution nach PBSZT sich durch eine schnellere myeloische und lymphatische Rekonstitution auszeichnen scheint, als nach KMT. Auch zeigten Patienten, die HLA übereinstimmend mit autologen Blutstammzellen von Verwandten transplantiert wurden, eine niedrigere Rate an Pilz- und Bakterieninfektionen und weniger infektionsbezogene Todesfälle verglichen Patienten, die im gleichen Setting mit Knochenmarkstammzellen transplantiert wurden [142].

Beide Stammzellquellen unterscheiden sich zudem, wie oben bereits erwähnt, im Auftreten einer akuten oder chronischen GvH-Reaktion. Zwar konnte beobachtet werden, dass durch die Mobilisierung peripherer Stammzellen eventuell ein therapeutischer Vorteil im Bezug auf akute GvH-Reaktion erreicht werden kann [109], andererseits wird die Entstehung einer chronischen GvH-Reaktion [86] begünstigt.

Neben der Art der Transplantation und der Quelle der Stammzellgewinnung spielen die Zusammensetzung des Transplantates und seine eventuelle Bearbeitung eine entscheidende Rolle. Generell werden wie schon ausgeführt hauptsächlich zwei Arten der Transplantat Manipulation unterschieden. Zum einen die CD34 Selektion, die der Methode der Positivselektion zuzurechnen ist und zum anderen die CD3/CD19 Depletion, die der Methode der Negativselektion angehört. Beides sind Methoden, die ex vivo durchgeführt werden und zum Ziel haben, das Risiko eines Rezidivs zu minimieren und einer GvH-Reaktion vorzubeugen. Bei einer CD34 Selektion werden potentiell viele für ein erfolgreiches Engraftment wichtige Zellen, wie so genannte „facilitating cells“ nicht mit-

transplantiert, da das Transplantat rein CD34 positive Zellen enthält. Nach einer CD34 Selektion wird deshalb eine verzögerte Immunrekonstitution beobachtet. Es wurde nach einer CD34 selektionierten HSZT eine erhöhte Inzidenz von, hauptsächlich viral bedingten, Infektionen beobachtet [131]. Drobyski [43] berichtet darüber hinaus unabhängig von der Art der transplantierten Stammzellen über ein geringeres Auftreten von GvH-Reaktionen nach T-Zell Depletion, da eine verzögerte T-Zell Rekonstitution zu beobachten war. Jedoch ist der Grat zwischen erfolgreicher Verhinderung einer GvH-Reaktion und vermehrten Abstoßungsreaktionen und verzögerter Immunrekonstitution stets sehr schmal. Unsere Daten konnten zeigen, dass eine stattgehabte CD3/CD19 Depletion vor allogener Stammzelltransplantation in Verbindung mit dem Einsatz einer dosisreduzierter Konditionierung mit einem deutlich schnelleren Engraftment und einer schnelleren Immunrekonstitution im Vergleich zu einer Transplantation mit einem CD34 selektionierten Transplantat einhergeht.

Die Wahl der Konditionierung vor einer Stammzelltransplantation kann entscheidend sein für die Durchführbarkeit einer Transplantation (siehe Kapitel Dosisreduzierte Konditionierung) sowie die Entwicklung der Patienten. Klassische Konditionierungsprotokolle, die so genannte Hochdosiskonditionierung, umfassen entweder die Kombination von Cyclophosphamid 60 mg/kg an zwei aufeinander folgenden Tagen und einer anschließenden Ganzkörperbestrahlung mit 12 Gy oder aber die Kombination von Busulfan und Cyclophosphamid. Seit Beginn der 1990er Jahre wurde zunächst im Tiermodell, hier insbesondere durch die Arbeitsgruppe von Storb et al. aus Seattle [132], später auch in der Klinik die so genannte RIC etabliert.

Wie unsere Untersuchungen zeigen konnten, bietet die RIC in Verbindung mit einer ausgeprägten CD3/19 Depletion durchaus erfreuliche und überzeugende Ergebnisse in Hinblick auf das Engraftment. Darüber hinaus lässt eine dosisreduzierte Konditionierung auch Transplantationen bei Patienten zu, deren klinische Situation eine Hochdosischemotherapie nicht mehr zulassen würde. In unserem Setting wurde, basierend auf den positiven Erfahrungen von Handgretinger et al. ein Regime eingesetzt, das die Substanzen Fludarabin, Thiotepa

und Melphalan beinhaltet. Jedoch untersuchen nur wenige klinische Studien den Einfluss der nicht myeloablativen Konditionierung im direkten Vergleich zur myeloablativen Konditionierung im selben Transplantationssetting – auch in den von uns erhobenen Daten ist dieser direkte Vergleich nur schwer möglich, da neben unterschiedlichen Konditionierungsprotokollen eben auch unterschiedliche Transplantatzusammensetzungen verwendet wurden. 2003 untersuchten Maris et al. [91] die Immunrekonstitution nach stattgehabter HLA identischer allogener Stammzelltransplantation bei 51 Patienten nach nicht myeloablative Konditionierung und verglichen diese mit einer Referenzgruppe von 67 Patienten die myeloablative konditioniert wurden. Interessanterweise konnten sie keine signifikanten Unterschiede in der Immunrekonstitution nachweisen. Dennoch wurde in der nicht myeloablative konditionierten Gruppe ein signifikant niederes Auftreten von Infektionen beobachtet. Es scheint sich abzuzeichnen, dass die Vorteile der dosisreduzierten Konditionierung, eine Reduktion der Toxizität und der Myelosuppression, einen positiven Effekt auf die Immunitätslage der Patienten und somit auf den klinischen Verlauf haben.

Die Rekonstitution der T-, B- und NK-Zellen ist jeweils separat zu betrachten und zu bewerten, da sie sich durch verschiedene Entwicklungswege auszeichnen, sowohl in der Ontogenese, als auch nach einer Stammzelltransplantation.

#### **4.2.1 Rekonstitution der natürlichen Killerzellen**

NK-Zellen sind definiert als  $CD3^-CD56^+CD16^+$  Zellen. Da die NK-Zellen die erste nachweisbare Lymphozytensubpopulation in der frühen Phase der Immunrekonstitution sind [68], stellen sie in dieser Zeit die wichtigste und größte Zellpopulation des Immunsystems dar.

NK-Zellen sind bei einer Stammzelltransplantation von zentraler Bedeutung. Da sich die NK-Zellen nach der Transplantation generell deutlich schneller erholen als andere für die Immunität wichtigen Zellen - zum Beispiel T- oder B-Zellen – spielen sie während der frühen Phase nach Transplantation durch ihre MHC-unabhängige Zytotoxizität eine entscheidende Rolle bei der Tumorbekämpfung

und bei Infektionen. Allgemein werden NK-Zellen als „first line of defense“ [110] bezeichnet und sind die Hauptträger der zellvermittelten Immunität.

Eine NK-zellvermittelte Alloreaktivität kann sowohl einen effektiven Transplantatgegen Leukämieeffekt bewirken, als auch eine Transplantatabstoßung verhindern und modulatorisch auf eine Transplantatgegen Wirtreaktion einwirken [129]. Im haploidenten Setting, welches zur Vermeidung einer starken GvH-Reaktion auf eine starke Depletion von T-Zellen angewiesen ist und in dem deshalb der T-Zellvermittelte Transplantatgegen Leukämieeffekt weitgehend fehlt, spielt die Alloreaktivität der NK-Zellen eine entscheidende Rolle [130].

Die Normwerte für die NK-Zellen in gesunden Kontrollen unterliegen einer breiten Streuung und befinden sich zwischen 6 und 29% der Lymphozyten im Normbereich; in absoluten Zahlen zwischen 80-1000 Zellen/ $\mu$ L [59]. Sowohl in der CD34 angereicherten als auch in der CD3/19 depletierten Gruppe zeigte sich ein rasches Engraftment der NK-Zellen (0-2 Monate). Die deutlich höheren Werte in der CD3/19 depletierten Gruppe im Vergleich zur CD34 selektionierten Gruppe lassen sich auf die zahlreich im Graft enthaltenen NK-Zellen zurückführen. Diese Beobachtungen stimmen mit bisher veröffentlichten Studien überein, die die Immunrekonstitution nach KMT [108], allo-PBSZT (HLA-ident) [111] und Haplo-PBSZT [10] untersucht haben. Sich neu entwickelnde NK-Zellen und dendritische Zellen, zeichnen sich durch ein schnelles Engraftment aus [29] und erreichen innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen nach Transplantation Werte, die entweder mit denen von gesunden Kontrollen vergleichbar sind [52], oder die eine deutlich erhöhte NK-Zellzahl bedeuten [8].

Es ist zu beobachten, dass in beiden Gruppen 30 Tage nach Transplantation normal hohe Zellzahlen vorlagen, mit leicht höheren Werten in der CD3/CD19 Gruppe (264 zu 229). Während sich in der CD3/CD19 transplantierten Gruppe die NK-Zellen auf dem Anfangsniveau stabilisieren, tritt in der CD34 Gruppe jedoch ungefähr am Tag 40 eine deutliche Regression ein, so dass hier im Median nur noch 82 NK-Zellen/ $\mu$ L zu finden waren. Diese Beobachtungen decken sich mit von Niederwieser et al. publizierten Daten, dass in der ersten Phase nach einer allogenen Stammzelltransplantation NK-Zellen in deutlich höheren

Prozentzahlen vertreten sind als in gesunden Kontrollen [104]. Diese schnelle und zum Teil überschießende Rekonstitution mit einer relativen NK-Zell-Lymphozytose lässt sich unter Umständen auf die Entwicklung der NK-Zellen aus der hohen Zahl von im Transplantat enthaltenen bereits differenzierten NK-Zellen zurückführen [123]. In der CD3/19 depletierten Gruppe sind die mittransplantierten NK-Zellen im Transplantat sicherlich ausschlaggebend für die anfänglich erhöhten NK-Zellwerte. Lang et al. berichteten 2005 [81] bei einer vergleichenden Untersuchung von HSZT nach CD3/19 Depletion oder nach CD34 Selektion bei pädiatrischen Patienten über ein deutlich schnelleres NK-Zell Engraftment in der CD3/CD19 Gruppe, die sie unter anderem auf den hohen NK-Zellgehalt im Transplantat zurückführten. Interessanterweise findet sich aber auch in der CD34 Gruppe trotz fehlender NK-Zellen im Transplantat eine relativ rasche NK-Zell Rekonstitution. Kook et al. [77] postulierten 1996, dass NK-Zellen resistenter gegen Bestrahlung sind, und somit möglicherweise auch NK-Zellen des Empfängers in der peripheren Zirkulation überleben könnten, wodurch der schnellere NK-Zellanstieg in Transplantationsprotokollen mit Bestrahlung auf diesem Wege zu erklären wäre. Im Verlauf stabilisieren sich in der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe die NK-Zellen bei Werten um 300 Zellen/ $\mu$ L, bevor dann ab Tag 250 ein leichter Abschwung zu beobachten ist. In der CD34 angereicherten Gruppe entwickeln sich die CD56 positiven Zellen fast durchweg auf niedererem Niveau. An Tag 400 ist mit 179 (Streuung: 2-1503) Zellen/ $\mu$ L in der CD3/19 Gruppe und 188 (Streuung: 111-329) in der Zellen/ $\mu$ L CD34 Gruppe eine vergleichbare Zellzahl zu messen. Insgesamt ist die Entwicklung der CD56 positiven Zellen jedoch in beiden Gruppen mit  $p=0,0068$  (Mann-Whitney Test) als signifikant unterschiedlich anzusehen.

Die Arbeitsgruppe um Andrea Velardi, Franco Aversa und Loredana Ruggeri hat sowohl in Transplantatmodellen an Mäusen als auch in klinischen Studien den Einfluss von NK-Zell Alloreaktivität in Spender gegen Empfänger Richtung im Hinblick auf Rezidive, Abstoßungsreaktionen, GvHD und Überleben untersucht und bestimmt. Ausgehend von ihren klinischen Beobachtungen stellten sie die Hypothese auf, dass der GvL Effekt bei einer T-Zell depletierten



Transplantation von den NK-Zellen vermittelt wird. Durch fehlende Expression bestimmter KIR-Liganden auf den Zellen des Empfängers und der daraus resultierenden fehlenden Hemmung der NK-Zellen des Spenders, kommt die Alloreaktivität der Spender NK-Zellen zum Tragen und Zellen des Empfängers, eben auch Tumorzellen werden lysiert [129]. Diese Alloreaktivität kann somit zu einer verstärkten Aktivierung der NK-Zellen führen, was einerseits die Lyse noch vorhandene Tumorzellen unterstützen und zum anderen das Engraftment der NK-Zellen beschleunigen könnte. Im Tiermodell konnte diese Arbeitsgruppe darüber hinaus zeigen, dass der Faktor der NK-Zell Alloreaktivität eng mit dem klinisch Erfolg einer Stammzelltransplantation zusammenhängt [130]. Durch Infusion von alloreaktiven NK-Zellen konnten leukämische Zellen in vivo eradiziert, Mäuse auf eine nicht MHC-idente Knochenmarkstransplantation vorbereitet und das GvH-Risiko durch Elimination antigenpräsentierender Zellen minimiert werden. Die genauen Mechanismen der NK-Zell Alloreaktivität sind aktuell noch nicht bis ins Detail aufgeklärt, jedoch lassen die dargestellten klinischen und tierexperimentellen Ergebnisse den Schluss zu, dass die NK-Zellen einen entscheidend Beitrag für das Gelingen einer haploidenten Transplantation leisten können. Die Rolle des NK-Zell Mismatches wird im folgenden Kapitel noch eingehender diskutiert.

Innerhalb der NK-Zellpopulation lassen sich noch einmal unterschiedliche Subpopulationen unterscheiden, die in unterschiedlicher Geschwindigkeit heranreifen. Jacobs et al. berichteten 1992 [68] erstmalig von unterschiedlichen NK-Zell Subfamilien, die sie nach Markerexpression im FACS in CD56<sup>bright</sup> und in CD56<sup>dim</sup> einteilten. Die in gesunden Kontrollen ungefähr 10% der NK-Zellen bildende Untergruppe der CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen scheint sich in vivo schneller zu entwickeln, als andere Lymphozyten. Die Untergruppe der CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen, die bis zu 90% der NK-Zellen ausmachen, benötigt zur Ausreifung entweder eine längere Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder sie entstehen aus CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> Zellen [34]. Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich gravierend in ihrer Funktionalität. Die kleinere Gruppe der CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen gehört zu den so genannte immunregulatori-

schen NK-Zellen, die in großer Zahl Zytokine produzieren, wohingegen die größere Gruppe der CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> Zellen zytotoxische Funktionen übernehmen [48]. Darüber hinaus werden diese beiden Subpopulationen in unterschiedlicher Art und Weise über Interleukin 2 zur Proliferation angeregt. So tragen die CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> Zellen hoch affine IL-2 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, was sich in einer deutlich höheren Proliferation nach IL-2 Stimulation im Vergleich zu CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> Zellen manifestiert [2]. Interessanterweise findet sich bei leukämischen Patienten ein signifikant verminderter Anteil von CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> an NK-Zellen, was einen deutlich höheren IL-2 Spiegel für die Aktivierung der NK-Zellen voraussetzt [2].

Wir konnten bei 8 Patienten der CD3/19 depletiert transplantierten Gruppe die Entwicklung der beiden NK-Zell Subfamilien untersuchen. An Tag 30 finden sich mit 31,88% CD56<sup>bright</sup> und 67,62% CD56<sup>dim</sup> positiven NK-Zellen Werte, die von denen bei gesunden Kontrollen klar abweichen. Während das Verhältnis von CD56<sup>dim</sup> zu CD56<sup>bright</sup> bei Normalkontrollen zwischen 7 und 9 liegt, findet sich hier eine Ratio von 2,12.

An Tag 60 findet sich in beiden Subpopulationen eine leichte Regression, bevor sich dann an Tag 90 beide Populationen, durch einen deutlichen Anstieg der CD56<sup>bright</sup> Zellen und ein weiteres Abfallen der CD56<sup>dim</sup> Zellen noch stärker angleichen. An Tag 90 findet ein Verhältnis von 57,88% CD56<sup>dim</sup> zu 41,05% CD56<sup>bright</sup> Zellen vor, mit einem Trend zur Umkehr der Verhältnisse wie sie bei Normalkontrollen vorgefunden werden. Es findet sich also eine deutlich höhere Zahl an regulatorischen NK-Zellen zu Beginn der Immunrekonstitution nach haploidenter Stammzelltransplantation, verglichen mit Normalkontrollen.

Wie bereits einleitend erwähnt, wurde 1992 [68] erstmalig von unterschiedlichen NK-Zell Subfamilien berichtet. In dieser Arbeit wurde die Rekonstitution der natürlichen Killerzellen nach Knochenmarkstransplantation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass initial niedere Werte von CD56<sup>bright</sup> Zellen im Verlauf der Immunrekonstitution auf bis zu 70% ansteigen können. Dies deckt sich auch mit

unseren Beobachtungen der Rekonstitution nach haploidenter Blutstammzelltransplantation. Die von uns beobachtete Entwicklung der NK-Zell Subfamilien spiegelt sich auch in der von Chklovskaja et al. 2004 [29] veröffentlichten Arbeit wider, die die NK-Zell Rekonstitution nach allogener, jedoch nicht haploidenter Stammzelltransplantation untersuchte. Auch hier zeigt sich bei einer deutlichen Abnahme der CD56<sup>dim</sup> Zellen ein ständiger Zuwachs an CD56<sup>bright</sup> Zellen, bis sich schließlich ebenfalls an Tag 90 CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Zellen die Waage halten. Unsere Beobachtungen könnten auf die zahlreich im Transplantat enthaltenen NK-Zellen zurückzuführen sein, die nach und nach von neu ausreifenden NK-Zellen ersetzt werden. Dieser Umstand würde die bereits angesprochenen Überlegungen stärken, wonach die CD56<sup>bright</sup> Zellen eine anfänglich schnellere Entwicklung durchlaufen, was den prozentualen Anstieg ab Tag 60 erklären würde, während die vom Spender stammenden überwiegend CD56<sup>dim</sup> positiven Zellen zuerst abnehmen. Hierdurch wäre das gegensätzliche Verhalten der beiden Zellpopulationen zu erklären. Der deutlich höhere Wert in der CD56<sup>dim</sup> Population an Tag 30 könnte auf die noch im Graft vorhandenen ausgereiften NK-Zellen des Spenders zurückzuführen sein.

Um zu belegen, dass die CD56<sup>dim</sup> Zellen aus den CD56<sup>bright</sup> Zellen hervorgehen sind noch längerfristige Untersuchungen der Entwicklung der beiden NK Zell Subpopulationen nötig. Beobachtungen von Platzbecker et al. [115] die eine deutlich dominierende Population an CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen an Tag 21 beschrieben, konnten wir also nicht bestätigen, auch stehen sie im Widerspruch zu den Ergebnissen von Chklovskaja et al. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass Platzbeckers Arbeitsgruppe Patienten nach CD34 angereicherter Stammzelltransplantation untersuchte, wohingegen in unserer Kohorte nur CD3/19 depletiert transplantierte Patienten waren. Die völlig unterschiedliche Zusammensetzung der Transplantate könnte für diesen Unterschied verantwortlich sein.

Auch die Arbeitsgruppe um Ngyuen et al. konnte zeigen, dass sich zwar die NK Zellen in den absoluten Zahlen sehr schnell nach haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation regenerieren [103], jedoch wies auch sie eine

auffällig veränderte Ausdifferenzierung der NK-Zellen, mit deutlich erhöhten CD56<sup>bright</sup> Zellwerten und stark verminderten CD56<sup>dim</sup> Werten nach.

#### **4.2.1.1 Rekonstitution der natürlichen Killerzell-Rezeptoren nach CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Wie bereits ausgeführt, kann ein „Mismatch“ zwischen inhibierenden Rezeptoren des Spenders und dem HLA-Typ des Empfängers eine wichtige Rolle für das Angehen des Transplantates spielen. Doch auch für das Überleben der Patienten scheinen ein KIR Mismatch und die damit verbundene spezifische Transplantat gegen Leukämie Reaktion von vorrangiger Bedeutung zu sein. Die Aktivität von natürlichen Killerzellen wird von inhibitorischen NK-Zellrezeptoren negativ reguliert. Wie bereits erwähnt gibt es HLA-Klasse-I-inhibitorische-NK-Zellrezeptoren und Nicht-HLA-Klasse-I-inhibitorische-NK-Zellrezeptoren. Bei der beschriebenen Alloreaktivität stehen die NK-Zellrezeptoren im Fokus, die sich durch HLA-Klasse-I-Moleküle inhibieren lassen, im Speziellen die KIR. Fehlt nun auf einer Zelle der passende KIR-Ligand um die NK-Zell Aktion zu inhibieren, kommt es zur Lyse. Der positive Effekt eines KIR-Mismatch in Transplantat Gegen Wirt Richtung lässt sich durch die Lyse von noch residuellen Tumorzellen erklären. Diese sind nicht in der Lage, die transplantierten NK-Zellen zu inhibieren und werden demzufolge lysiert. Auf diesem Wege soll also das mismatch zwischen inhibitorischen Rezeptoren auf den Spender NK-Zellen und den MHC-Klasse-I Liganden auf den Zellen des Empfängers den so genannten Transplantat Gegen Leukämie Effekt vermitteln [128], man spricht hierbei von einer NK-Zell Alloreaktivität des Spenders gerichtet gegen den Empfänger („donor vs. recipient NK cell alloreactivity“).

Es konnte gezeigt werden, dass die Effektivität der KIR vermittelten Transplantat gegen Leukämie Reaktion sowohl nach KIR inkompatibler haploidenter [129] aber auch nach fremd-allogener Mismatch Transplantation [54] mit einem deutlich besseren Ergebnis für die Patienten einhergeht. So war laut einer Veröffentlichung von Ruggeri et. al [129] auch bei Hochrisiko AML-Patienten das ereignisfreie Überleben 5 Jahre nach haploidenter Transplantation mit einem KIR

Mismatch deutlich besser als ohne ein solches Mismatch. Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen die zeigen, dass eine KIR Liganden Inkompatibilität nach haploidenter Stammzelltransplantation nicht unbedingt mit einem Überlebensvorteil der Patienten einhergeht [36].

Um in dieser Frage einen entscheidenden Schritt voran zu kommen, sind Studien, die die Rolle der aktivierenden NK-Zellrezeptoren nach Stammzelltransplantation untersuchen, Gegenstand aktueller wissenschaftlichen Arbeit. Bis dato waren solche Untersuchungen aufgrund nicht ausreichend spezifischer Antikörper nur schwer möglich, was sich jedoch mit einer neuen Antikörpergeneration geändert hat. So konnten zum Beispiel Pende et al. 2008 [113] zeigen, dass nicht nur die inhibitorischen sondern auch die aktivierenden NK-Zell Rezeptoren, hier im Besonderen der KIR2DS1, einen entscheidenden Beitrag zu der Alloreaktivität dieser NK-Zellen leisten und damit zur besseren Erkennung und effektiveren Bekämpfung der noch im residuellen Tumorzellen beitragen. Vergleichbare Ergebnisse wurde von Schellekens et al. [133] veröffentlicht, die ein KIR2DS1 mismatch sogar mit einem signifikant erhöhten Überleben bei 83 untersuchten Patienten nach HSZT in Verbindung bringen konnten. Darüber hinaus war bei den von ihnen untersuchten Patienten die Anzahl an aktivierenden KIR signifikant mit einem erhöhten Auftreten von Rezidiven verbunden. Die molekulare Grundlagenarbeit im Bezug auf die aktivierenden NK-Zellrezeptoren und ihren Angriffspunkten wurde von Moesta et al. geleistet, die sich speziell mit dem KIR2DL1 und KIR2DL2/3 auseinandersetzten [98].

NK-Zellen scheinen also bei einer haploidentischen hämatopoetischen Stammzelltransplantation einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Transplantation zu haben. Jedoch wird der Effekt der NK-Zell Alloreaktivität immer noch kontrovers diskutiert, was durch die unterschiedlichen Protokolle der durchgeführten Transplantationen mit unterschiedlich starker T-Zell Depletion bedingt sein dürfte [156]. Velardi et al. konnten sowohl tierexperimentellen als auch im klinischen Versuch nachweisen, dass das Engraftment bei Transplantation mit HLA-Disparität, die eine NK-Zell Alloreaktivität bedingt, deutlich beschleunigt

war [149]. So untersuchten sie in 92 Patienten mit der Diagnose einer akuten Leukämie (AML oder ALL) das Engraftment, indem sie diese Gruppe nach vorliegender und fehlender KIR Liganden Inkompatibilität einteilten. Sie konnten zeigen, dass die beschriebene KIR Liganden Inkompatibilität eng mit der im Empfänger nachgewiesenen Anzahl von Spender NK-Zellen korrelierte und einen positiven Effekt auf Abstoßungsreaktionen, GvHD und Rezidive hatte [129]. Dies wird dadurch erklärt, dass alloreaktive NK-Zellen in der Lage sind, die lymphatischen hämatopoetischen Zellen des Empfängers zu lysieren, was eine Abstoßung des Transplantates verhindern und ein schnelleres Engraftment begünstigen könnte. Deutlich wurde in unseren Untersuchungen hingegen, dass ein vorhandenes KIR-Mismatch im CD3/CD19 depletiertem Setting keinen entscheidenden Einfluss auf das Engraftment der Patienten hatte. Weder im Engraftment, speziell auch nicht innerhalb der NK-Zellen, noch in anderen untersuchten klinischen Parametern konnte ein Unterschied gefunden werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Gruppe an AML erkrankten Patienten, die CD3/CD19 depletiert transplantiert wurden, kein Zusammenhang zwischen KIR-Mismatch und Überleben gesehen werden konnte. Diese Daten decken sich nicht mit den von Velardi veröffentlichten Daten. Der Unterschied zu Velardis Daten lässt sich wie bereits erwähnt unter Umständen mit den unterschiedlichen Transplantezusammensetzungen erklären, was eine direkte Vergleichbarkeit schwer macht.

Wir untersuchten in 8 Patienten die Rekonstitution der wichtigsten NK-Zell Rezeptoren nach einer CD3/CD19 depletierten Stammzelltransplantation. Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in die Untersuchung der aktivierenden und anschließend der inhibitorischen NK-Zell Rezeptoren. Wichtig ist die Berücksichtigung der hohen Anzahl an NK-Zellen im Transplantat bei einer CD3/CD19 depletierten Transplantation.

Wir untersuchten folgende aktivierende zytotoxische Rezeptoren: NKP30, NKP44, NKP46 als die Hauptvertreter der aktivierenden Rezeptoren, sowie den NKG2D Rezeptor. Während NKP30 und NKP46 grundlegend auf ruhenden NK-Zellen exprimiert werden, benötigen NK Zellen zur Expression von NKP44 eine

Stimulation durch IL-2 [100]. In unseren Untersuchungen stieg die Expression der einzelnen Rezeptoren im Schnitt jeweils an. Während über 90% aller NK-Zellen NKP46 exprimierten, fand sich NKP44 auf weniger als 10% der NK-Zellen. Ausgehend von den Beobachtungen, dass sich NKP44 nur auf aktivierten NK-Zellen findet, lässt dies unter Umständen Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad der NK-Zellen zu. Bei der Expression von NKP30 und NKP46 ist in der Zeit nach Transplantation ein deutlicher Anstieg zu beobachten. Unsere Beobachtungen stimmen mit bisherigen Veröffentlichungen überein [103]. Vitale et al. führten im Jahre 2004 eine intensive in vivo Untersuchung der Regeneration und Differenzierung der aktivierenden NK-Zellrezeptoren bei pädiatrischen Patienten nach unmanipulierter Stammzelltransplantation durch [151]. Sie beobachteten, innerhalb des ersten Monats ebenfalls erniedrigte Werte von NKP46 und NKP30. Biassoni et al. konnten zeigen [22], dass eine direkte Korrelation zwischen der Dichte der Oberflächenexpression der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren und der Fähigkeit der NK-Zellen besteht, verschiedene Zielzellen zu lysieren. Da in unserer Arbeit keine funktionellen Tests der NK-Zellrezeptoren durchgeführt wurden, kann diese Aussage von uns weder widerlegt noch bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den beschriebenen natürlichen zytotoxischen Rezeptoren, fällt die Expression von NKG2D bei unseren Patienten in den ersten 90 Tagen von über 80% auf unter 60% deutlich ab. Die gegensätzliche Entwicklung der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren und der NKG2D steht im Einklang mit Arbeiten von Pende [114] und Moretta [100]. Während Pende et al. beschrieben, dass NK-Zellen je nach der Stärke der Ausprägung natürlicher zytotoxischer Rezeptoren in NCR<sup>bright</sup> und NCR<sup>dull</sup> eingeteilt werden können, wiesen Moretta et al. nach, dass eine Beziehung zwischen natürlichen zytotoxischen Rezeptoren und NKG2D Rezeptoren auf NK-Zellen besteht. Sie konnten zeigen, dass NCR<sup>dull</sup> Zellen Tumorzellen in einer NKG2D-abhängigen Art lysieren, was für NCR<sup>bright</sup> Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Es gilt noch zu erwähnen, dass die grundsätzliche Funktionsweise des NKG2D Rezeptors im Aktivierungsprozess der NK-Zellen noch nicht abschließend ge-

klärt ist. In einer 2006 erschienenen Arbeit legt Malarkannan [90] die Theorie dar, dass es zu unterscheiden gilt, zwischen der Aktivierung einer NK-Zelle durch natürliche zytotoxische Rezeptoren aufgrund des Fehlens inhibitorischer Rezeptoren und der Aktivierung einer NK-Zelle durch die, aufgrund stärkere Signale vorrangig gewordene NKG2D vermittelte Aktivierungskaskade - trotz vorhandener inhibitorischer Rezeptoren und adäquaten, hemmenden Liganden.

In der Familie der HLA-Klasse-I-inhibitorischen-Rezeptoren gilt es zwischen den KIR und dem NKG2A-Rezeptor sowie dem CD85j Rezeptor zu unterscheiden. An Tag 30 nach Transplantation war der Prozentsatz an CD94/NKG2A positiven Zellen deutlich höher, als derer, die KIR exprimierten. Während nahezu 70% aller NK-Zellen CD94/NKG2A exprimieren, finden sich die KIRs bei weniger als 40% der NK-Zellen (CD158b) und noch weniger mit CD158a oder CD158e Expression. Vitale et al. konnten in einer 2004 veröffentlichten in vivo Studie [151] zeigen, dass 20 Tage nach Transplantation NK-Zellen CD94/NKG2A+ waren, jedoch kein Nachweis von KIR möglich war, die sich erst zu späteren Zeitpunkten zeigten.

Während im Verlauf die KIR Expression zunimmt, mit Ausnahme von CD158b, nimmt die Expression von CD94/NKG2A entsprechend ab. Auch Nguyen et al. konnten nachweisen, dass innerhalb der ersten 4 Monate nach Transplantation, hier jedoch mit NK-Zell depletierten Transplantaten, die KIR Expression bei Transplantierten niedriger war, als bei den Spendern, mit der größten Differenz für 158a [103]. Auch in unserer Population zeigte 158a nach Transplantation die niederste Ausprägung. Eine völlig gegensätzliche Entwicklung der CD94/NKG2A Expression fand sich sowohl bei Nguyen als auch bei uns. Es scheint fast so, als würde der steile Anstieg der CD94/NKG2A Expression die niedere Expression der KIR ausgleichen. Im Vergleich der Rekonstitution von NKG2A zu der der KIRs wies die Arbeitsgruppe um Xiang-Yu Zhao [156] nach unmanipulierter Stammzelltransplantation sogar eine signifikante inverse Korrelation im Speziellen für CD158b nach, was auch von Cooley et al. [33] belegt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen Überlegungen zu, dass beide Rezeptortypen eventuell einen ähnlichen Zweck erfüllen und auch während der Ent-



wicklung die unterschiedliche Expressivität der NK-Zellen eventuell koordiniert verläuft.

Cooley et al. schlossen in der bereits zitierten Arbeit [33], nach dem Vergleich einer T-Zell depletierten Transplantation mit einer Transplantation mit unmanipuliertem Transplantat, dass die Entwicklung funktioneller NK-Zellen, die ein reifes, vollständiges KIR Repertoire exprimieren, maßgeblich von den T-Zellen im Transplantat bestimmt wird. Cooley et al. ziehen deshalb eine Korrelation mit dem Ausmaß der T-Zell-Depletion, der dadurch eventuell beeinträchtigten NK-Zellentwicklung und dem klinischen Bild und Verlauf stark in Erwägung. Inwiefern sich die T-Zelldepletion jedoch bei haploidenter hämatologischer Stammzelltransplantation unter Umständen negativ auf die NK-Zellentwicklung auswirkt, bedarf noch weiterer Abklärung.

Zur Expression von CD161 lässt sich anmerken, dass dies der am meisten exprimierte, inhibitorische NK-Zellrezeptor in unserer untersuchten Gruppe war. Er gleicht in seinem Verlauf dem NKG2A Rezeptor. Bis dato konnten wir keine Untersuchungen finden, die den Zusammenhang zwischen NKG2A oder den KIR Rezeptoren und CD161 zum Gegenstand hatten.

#### **4.2.2 B-Zell Rekonstitution**

Nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation findet man in den ersten zwei Monaten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation nur sehr geringe B-Zell-Zahlen, teils unter der Nachweisgrenze [52]. Ein bis zwei Jahre nach Transplantation ist mit einer Normalisierung der Zellzahl zu rechnen [77]. Die B-Zell Rekonstitution hängt, wie die der anderen Zellreihen von den unterschiedlichsten Faktoren ab. So wurde zum Beispiel von Locatelli et al. [83] berichtet, dass nach einer Transplantation aus Nabelschnurblut eine schnellere Immunrekonstitution als nach einer Knochenmarktransplantation zu beobachten ist. Darüber hinaus ist die Beschaffenheit des Transplantates als ein prognostischer Faktor für eine erfolgreiche Immunrekonstitution anzusehen. Dies spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wieder. Die Normwerte für die B-Zellen in

gesunden Kontrollen liegen zwischen 7 und 23% der Lymphozyten; in absoluten Zahlen zwischen 100 und 800 Zellen/ $\mu$ L [59]. Die B-Zellrekonstitution in der CD3/CD19 depletierten Gruppe zeigt eine deutliche Verzögerung im Vergleich zu anderen publizierten Ergebnissen nach allogener Stammzelltransplantation [125]. Dies erklärt sich durch die durchgeführte Depletion der CD19+ B-Zellen. Es fällt deshalb schwer, diese Daten mit bisher veröffentlichten Studien zu vergleichen, da die Unterschiede in der Transplantatzusammensetzung zu groß sind, um einen sinnvollen Vergleich zu ermöglichen. Die Bedeutung der Transplantatzusammensetzung wird deutlich, wenn vergleichend die B-Zellrekonstitution in der CD34 angereicherten Gruppe untersucht wird. Wir konnten eine deutlich schnellere Erholung der B-Zellen in der CD34 angereicherten Gruppe mit signifikant höheren Werten feststellen, als sie in der CD3/CD19 Gruppe zu beobachten war ( $p=0,0003$ ; Mann-Whitney Test). So lag zum Beispiel an Tag 100 ( $\pm$  20 Tage) nach Transplantation der Median in der CD34 Gruppe bei 256 Zellen/ $\mu$ L, wohingegen in der CD3/CD19 Gruppe eine signifikant niedrigere Zellzahl von 57 Zellen/ $\mu$ L zu messen war ( $p=0,03$ ; Mann-Whitney Test).

Eine verminderte oder fehlende Regeneration der B-Lymphozyten nach der durchgeführten PBSZT, lässt möglicherweise Rückschlüsse auf eine stark beeinträchtigte oder sehr lange andauernde Ausreifung der B-Zellen im Knochenmark zu. Del Canizo veröffentlichte 1999 die Überlegung, dass eventuell eine nicht suffiziente Zytokinproduktion das Einnisten der Stammzellen in sekundären lymphatischen Organen überdies noch erschweren oder behindern könnte [37]. Ein weiterer Faktor könnte der durch die vorangegangene Hochdosischemotherapie ausgelöste Knochenmarkstromaschaden sein, welcher den für die Ausreifung der Zellen benötigten Zell-Zell-Kontakt zusätzlich beeinträchtigt und somit direkten Einfluss auf die Proliferation als auch auf die Differenzierung der Stammzellen haben kann. In unserer Studie konnte in der CD34-selektionierten Gruppe eine Normalisierung der B-Zellzahl innerhalb der ersten drei Monate erreicht werden, was mit bis dato publizierten Beobachtungen übereinstimmt [140]. In der CD3/19 depletierten Gruppe hingegen waren auch ein Jahr nach Transplantation noch erniedrigte B-Zellwerte zu messen, was ungefähr der B-

Zellrekonstitution nach einer Knochenmarktransplantation entspricht [77]. Dies widerspricht zwar auf den ersten Blick der Aussage von Ottinger et al. [108], wonach bei allogener PBSZT generell höhere CD19+ B-Zellzahlen zu finden wären als nach KMT, jedoch muss hierbei neben der stattgehabten CD19+ Depletion, die bei Ottinger nicht verwendet wurde, auch noch der Faktor der CD3 Depletion beachtet werden, der einen fehlenden Stimulus der B-Zell Differenzierung durch von T-Zellen stammendem Wachstumsfaktor zur Folge haben kann und in einer verzögerten Proliferation und Differenzierung der CD19+ Zellen resultieren könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktionalität der B-Zellen anhand der Ig-Produktion oder dem Immunglobulinspiegel über die quantitative Immunrekonstitution hinaus nicht untersucht werden, da die Patienten routinemäßig mit polyklonalen Immunglobulinen substituiert wurden.

#### **4.2.3 T-Zell Rekonstitution**

T-Zellen sind von essentieller Bedeutung für die zellvermittelte Immunität bei Infektionen mit Pilzen, Viren und Protozoen sowie für die B-Lymphozytenstimulierung und Kontrolle bei intrazellulären Erregern [52]. Bei Betrachtung der T-Zellrekonstitution nach allogener, haploidenter Stammzelltransplantation, sind die einzelnen Lymphozytensubpopulationen getrennt voneinander zu untersuchen, um ein differenzierteres Bild des Immunstatus zu erhalten. Der Normwert für die Gesamtzahl an T-Zellen, gemessen als CD3+ Zellen, liegt in gesunden Kontrollen zwischen 60-85% der Lymphozyten; in absoluten Zahlen zwischen 850 und 3000 Zellen/ $\mu$ L [59]. Wir beobachteten sowohl in der CD3/CD19 depletierten Gruppe als auch in der CD34 selektionierten Gruppe eine langsame Erholung der T-Zellen. Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich weder an Tag 50 ( $p=0,1427$ ) noch an Tag 100 ( $p=0,5261$ ) ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney Test. Diese langsame Erholung lässt sich durch die Zusammensetzung des Transplantates und die ausgeprägte T-Zell Depletion erklären. Zwar beobachteten wir in der CD3/CD19 depletierten Gruppe eine schnellere Rekonstitution der T-Zellen, was einerseits an den im Transplantat

enthaltenen „Facilitating Cells“ liegen könnte, andererseits aber auch an dem etwas höheren T-Zellgehalt im Transplantat. Die Werte liegen jedoch deutlich unter den Ergebnissen bisher publizierter Arbeiten, die eine Stammzelltransplantation mit unbehandeltem Transplantat untersuchten [118]. Unsere Beobachtungen einer beschleunigten T-Zellrekonstitution nach Depletion im Vergleich zu einer CD34 Positivselektion werden durch von Lang et al. im Jahre 2005 publizierte Daten unterstützt und bestätigt, die bei Kindern nach CD3/CD19 Depletion von einer noch schnelleren Erholung der T-Zellen berichten konnten [81]. Jedoch müssen hier die Ergebnisse ebenfalls kritisch betrachtet werden, da die drei untersuchten Gruppen mit unterschiedlichen Konditionierungsprotokollen transplantiert wurden. Die dosisreduzierte Konditionierung in Verbindung mit der CD3/CD19 Depletion scheint auch bei den von Lang et al. untersuchten pädiatrischen Patienten der reinen CD34/CD133 Selektion und der CD3/CD19 Depletion mit klassischem Konditionierungsprotokoll deutlich überlegen zu sein, was wir bei unseren Patienten ebenfalls bestätigen konnten. Die Tatsache, dass im Kindesalter ein noch funktionierender Thymus vorliegt dürfte die Immunrekonstitution der T-Zellen beeinflussen und beschleunigen. Die Regeneration der T-Zellen kann entweder aus der Entwicklung transplan- tierter Stammzellen hervorgehen oder aus im Transplantat enthaltenen Lym- phozyten.

Innerhalb der CD3 Subpopulationen wird übereinstimmend eine schnelle Re- konstitution der CD8+ zytotoxischen T-Zellen beschrieben [106],[118], wohin- gegen die CD4+ T-Helfer-Zellen nur sehr langsam regenerieren und man oft noch Jahre nach Transplantation erniedrigte Werte beobachten kann [52]. Un- sere Werte bestätigen die bisher publizierten Beobachtungen. Die Normalwerte bei gesunden Kontrollen liegen für CD4+ T-Zellen zwischen 29 und 59% der Lymphozyten (entspricht 450 – 2000 Zellen/ $\mu$ L) und für CD8+ T-Zellen zwi- schen 19 und 48% der Lymphozyten (entspricht 250-1700 Zellen/ $\mu$ L) [59].

Die unterschiedliche Entwicklung der T-Lymphozytensubpopulationen spiegelt sich im so genannten CD4/CD8 Ratio wider, in dem beide Subpopulationen di-

rekt miteinander verglichen werden. Im Normalfall liegt dieser Wert zwischen 1,0 und 1,5 [63].

Wir fanden sowohl in der CD34 als auch in der CD3/19 Gruppe eine verlangsamte Rekonstitution sowohl in der CD8+ als auch in der CD4+ Subpopulation, jedoch wieder mit höheren Werten in der CD3/19 depletierten Gruppe. Es zeigten sich aber sowohl in der CD3+/4+ Subpopulation als auch in der CD3+/8+ Subpopulation im Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney Test. Bei der Entwicklung der CD3+/4+ Subpopulation zeigte sich ein p-Wert von  $p=0,5288$ ; bei der Entwicklung der CD3+/8+ Subpopulation war ein p-Wert von  $p=0,1903$  zu dokumentieren. An Tag 100 waren in der CD3/CD19 Gruppe 143 (Streuung: 0-1345) CD8+ T-Zellen/ $\mu\text{L}$  und in der CD34 Gruppe 29 (Streuung: 3-354) CD8+ T-Zellen/ $\mu\text{L}$  zu messen. Bei den CD4+ T-Zellen fanden sich in der CD3/19 Gruppe 100 (Streuung: 1-306) Zellen/ $\mu\text{L}$  und in der CD34 Gruppe 33 (Streuung: 12-181) Zellen/ $\mu\text{L}$ . In beiden Gruppen fanden wir an Tag 100 einen stark erniedrigten CD4/CD8 Quotienten, was die deutlich verlangsamte CD4+ Rekonstitution untermauert. Diese verzögerte Rekonstitution der CD3+/CD4+ T-Lymphozyten wird von Mackall et al. [89] auf einen Regenerationsweg zurückgeführt, der in direkter Korrelation zur Funktionalität des Thymus stehen soll. Im Einklang zu dieser Hypothese stehen andere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe [88], die einen Zusammenhang zwischen der CD4+ T-Zellentwicklung und dem Alter der Patienten sowie dem Ausmaß der Thymusinvolution nach stattgehabter Chemotherapie beschreiben. Ein solcher Zusammenhang ließ sich für die CD8+ T-Zellrekonstitution jedoch nicht finden. Aufgrund der relativ raschen CD3+/CD8+ T-Lymphozyten Rekonstitution ist, bei bekannter Schädigung des Thymus durch die vorangegangene Hochdosischemotherapie, von einer möglichen extrathymischen CD3+/CD8+ T-Lymphozyten Entwicklung auszugehen. So konnten zum Beispiel Schmitt et al im Jahre 2002 [135] zeigen, dass die dreidimensionale Mikrostruktur des Thymus nicht unentbehrlich für die T-Zellentwicklung ist und auch die Tatsache, dass in experimentellen Tierversuchen bei athymischen Mäusen CD8+ T-Zellen in lymphatischen Organen gefunden wurden [60], lässt diese Vermutung zu.

Dulude et al. [44] konnten zeigen, dass bei Knochenmarktransplantierten athymischen Mäusen die T-Zellrekonstitution von der extrathymischen Ausreifung der im Transplantat enthaltenen hämatopoetischen Vorläuferzellen ausgeht. Diese Beobachtungen würden den stark erniedrigten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Quotienten und die hier zu Grunde liegende deutlich verlangsamte CD4<sup>+</sup> Rekonstitution erklären.

Um die Rekonstitution der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten genauer zu untersuchen, wurde in der CD3/CD19 depletierten Gruppe der Verlauf der CD45 Isoformen RO und RA genauer betrachtet. CD45, das als „allgemeines Leukozytenantigen“ bezeichnet wird und sich mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten auf allen hämatopoetischen Zellen findet, ist eine transmembranäre Tyrosinphosphatase, die für die Signalgebung von Rezeptoren in verschiedenen Zellen benötigt wird. Heitger et al. [64] konnten 1997 zeigen, dass zeitnah nach Transplantation der überwiegende Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die CD45RO Isoform exprimieren, wohingegen der Anteil der CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen noch 2 Jahre nach Transplantation stark erniedrigt ist. In dieser Arbeit wurde die bedeutende Rolle des Thymus für die Rekonstitution der T-Zellen untermauert. Auch unsere Ergebnisse decken sich mit den bisher veröffentlichten Arbeiten und wir konnten eine lang anhaltende Suppression der CD45 RA<sup>+</sup> Zellen nach Transplantation belegen.

#### **4.2.3.1 Rekonstitution des T-Zell-Rezeptorrepertoires nach CD3/19 depletierter haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Mit der durchflusszytometrischen Analyse des TCR V $\beta$ -Repertoires ist es möglich, die Expression des T-Zell-Rezeptorrepertoires auf Proteinebene zu untersuchen. Somit lässt sich feststellen, welche TCR V $\beta$ -Familien auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Durch diese rein quantitative Analyse lässt sich eine eventuelle Überexpression einzelner V $\beta$ -Familien nachweisen. Verglichen mit der Methode der CD3R Spekatypisierung, bietet die FACS Analyse des TCR Repertoire einige Vorteile, die einen zunehmenden Einsatz dieser Methode erwarten lassen. So lässt zum Beispiel die Durchflusszytometrie eine schnelle,

einfache und relativ kostengünstige Analyse des V $\beta$ -Repertoires innerhalb einer T-Zell Subpopulation zu und ermöglicht eine präzise Quantifizierung der untersuchten Zellen. Durch ein standardisiertes Kit sind die Ergebnisse problemlos vergleichbar und die reine Detektion funktioneller TCR garantiert eine hohe Spezifität. Die Durchflusszytometrie wird von eventuellen Änderungen der RNA-Levels mit dem physiologischen Status der Zellen nicht beeinflusst, da die Rezeptor-Expression stabil ist. Aufgrund dieser Vorteile kann die durchflusszytometrische Analyse des V $\beta$ -Repertoires als Screeningmethode für überschießende oder klonale V $\beta$  Expressionen genutzt werden, die Rückschlüsse auf eine mögliche maligne T-Zell Erkrankung zulassen kann [148]. Im Vergleich hierzu bietet die CD3R Spekatypisierung den Vorteil der qualitativen Analyse und die Möglichkeit, dass das komplette Repertoire der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten analysiert werden kann, wohingegen die von uns genutzte FACS Analyse knapp 70% des V $\beta$ -Repertoires abdeckt. Um sich ein vollständiges quantitatives und qualitatives Bild des T-Zell-Rezeptor Repertoires zu verschaffen, ist sicherlich die Kombination aus beiden Methoden die optimale Lösung. Da unsere Fragestellung jedoch hauptsächlich auf die quantitative Rekonstitution der T-Zellen abzielt, beschränkten wir uns auf die Methode der durchflusszytometrischen Analyse des T-Zell-V $\beta$ -Repertoires.

Mittels des IO Test Beta Mark (TCR V $\beta$  Repertoire Kit) wurde bei 7 Patienten vor Transplantation und an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation (90, 200, 220, 360 Tage) das TCR V $\beta$  Repertoire der CD3+ T-Zellen untersucht. Da einige Patienten die gewählten Zeitpunkte nicht erreichten, konnten zu den späteren Zeitpunkten entsprechend weniger Patienten untersucht werden. Die Untersuchungen zeigten, dass sich das T-Zell-Repertoire bei den einzelnen Patienten individuell regeneriert und sich in seiner Vielfältigkeit und Entwicklung stark unterscheidet. Zu beobachten war, dass um den Tag 200 der Großteil der Patienten ein sich stark vervollständigendes und normalisierendes Repertoire zeigte. Vereinzelt waren noch stark überexprimierte V $\beta$  Subpopulationen oder Lücken im Rezeptorrepertoire zu beobachten. Die Ergebnisse wur-

den mit Normwerten bei einem Kollektiv von 85 Normalproben verglichen, die die prozentuale Verteilung von 24 V $\beta$ -Ketten charakterisierten.

Die relativ kleine Population in unserer Studie lässt keine statistische Auswertung der Ergebnisse zu. Eine deskriptive Herangehensweise unter Berücksichtigung der Klinik hat sich daher angeboten. Es war zu beobachten, dass sich bei unseren Patienten das Repertoire in den ersten 200 Tagen nach Transplantation noch deutlich reduziert und verändert zeigt. Die Messungen an Tag 90 und Tag 200, sowie die in Einzelfällen noch zwischenzeitlich durchgeführten Messungen wiesen noch lückenhafte T-Zell-Repertoire nach, die durch vereinzelte, prominente V $\beta$  Überexpressionen gekennzeichnet sind. Diese Werte decken sich mit den von Eyrich et al. 2002 durchgeführten Untersuchungen bei Kindern [46], die ebenfalls im ersten Jahr nach Transplantation ein deutlich vermindertes T-Zell-Rezeptorrepertoire beschrieben. Erklärt werden kann diese Beobachtung durch die geringe Zahl an mittransplantierten T-Zellen bei T-Zell depletierter Transplantation, die in beiden Fällen vorlag, zumal in anderen Studien nachgewiesen werden konnte, dass sich die Transplantation von nicht manipuliertem Knochenmark nur durch kleinere Abweichungen im T-Zell-Rezeptor-Repertoire bemerkbar macht [55].

Es konnte, wie schon erwähnt gezeigt werden, dass die überwiegende Mehrzahl der Lymphozyten während der ersten Zeit der Immunrekonstitution hauptsächlich aus der Entwicklung von schon reifen, mittransplantierten T-Zellen hervorgeht, und im Gegensatz dazu naive T-Zellen über viele Monate nach Transplantation hinweg vermindert bleiben. Es ist davon auszugehen, dass bestimmte vom Spender stammende Gedächtnis T-Zell-Klone durch das Antigen Milieu des Empfängers zur Expansion stimuliert werden [87], was das eingeschränkte Repertoire in der Frühphase nach Transplantation erklären könnte. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch von anderen Arbeitsgruppen postuliert [155],[126] dass die Rekonstitution des T-Zell-Rezeptor-Repertoires hauptsächlich stark von der Interaktion zwischen den hämatopoetischen Zellen des Empfängers und denen des Spenders abhängt und somit weniger Gewicht auf den im Transplantat vorhandenen Gedächtnis T-Zellen des Spenders liegt. Jedoch muss hier in Betracht gezogen werden, dass das Patientenkollektiv bei Eyrich



et al. ausschließlich Kinder umfasst, wohingegen die anderen Arbeitsgruppen die Immunrekonstitution bei transplantierten Erwachsenen untersuchten. Friedman et al. zeigten bei einer vergleichende Untersuchung von 9 Patienten nach allogener nicht T-Zell depletierter Stammzelltransplantation [50], von denen 5 Patienten nicht myeloablativ und 4 Patienten myeloablativ konditioniert wurden, dass die der Art der Konditionierung Auswirkungen auf die Rekonstitution und die Komplexität des TCR Repertoires haben kann. So fanden sie mittels CD3 Spektratypisierung, dass bei nicht myeloablativ konditionierten Patienten, unabhängig von der Stammzellquelle (PBSZ oder KM) eine schnellere und komplexere T-Zell Repertoire Rekonstitution stattfindet. Direkte Vergleiche mit unseren Ergebnissen, sind jedoch aufgrund der unterschiedlichen Transplantatzusammensetzung (T-Zell depletiert und Nicht T-Zell depletiert) nicht möglich, jedoch ist es wichtig festzuhalten, dass die nicht myeloablative Konditionierung über die rein quantitative T-Zell Rekonstitution hinaus auch Einfluss auf die qualitative Rekonstitution zu haben scheint.

Ab Tag 200 füllt sich bei unseren Patienten das Repertoire zusehend und die zuvor zu beobachtenden auffällig starken Überexpressionen sind rückläufig. Dies stützt die Theorie, dass die ab Tag 200 neu auftretenden naiven T-Zellen zu einer Vervollständigung und Verbreiterung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires beitragen. Doch ist auch bei unseren Patienten, sofern eine so lange Verlaufsbeobachtung möglich war, noch über ein Jahr nach Transplantation ein verändertes Repertoire im Vergleich zu Kontrollen bei Gesunden festzustellen. Bei einzelnen Patienten zeigten sich auffällige Expressionen einzelner V $\beta$  Familien. Die Betrachtung dieser Expansionen im Hinblick auf stattgehabte klinische Ereignisse wurde durchgeführt. Eine Abhängigkeit beider Beobachtungen kann jedoch nicht zweifelsfrei belegt werden.

Nach einer Stammzelltransplantation sind ein beschränktes T-Zell-Reservoir sowie ein reduziertes oder asymmetrisches T-Zell-Rezeptor-Repertoire direkt mit einem klinisch relevanten Immundefekt assoziiert. Bei gesunden Kontrollen wurde mittels CDR3 Spektratypisierung ein unterschiedliches, polyklonales T-

Zell-Repertoire gefunden, das sich in einer Gaußschen Verteilung widerspiegelt [155]. Bei Patienten mit einer Erkrankung des blutbildenden Systems kann sich ein verändertes T-Zell-Rezeptor-Repertoire schon vor einer Transplantation zeigen; definitiv ist jedoch das T-Zell-Rezeptor Repertoire im ersten Jahr nach Transplantation stark dezimiert und verändert. Verfuerrth et al. [150] berichteten von einem veränderten Repertoire bei transplantierten Patienten in den ersten drei bis sechs Monaten nach Transplantation und zeigten darüber hinaus, dass bei einzelnen Patienten noch bis zu drei Jahre nach der Transplantation kein absolut normales spektratypisch ermitteltes T-Zell-Rezeptorrepertoire nachzuweisen ist. Das individuelle T-Zell-Rezeptorrepertoire nach Transplantation entsteht durch das Zusammenspiel von Infektionen, Transplantat Gegen Wirt Reaktionen und iatrogener Immunsuppression. Hierbei wird eine interessante Wechselwirkung deutlich, da zum einen ein vermindertes Repertoire Infektionen begünstigt, zum anderen jedoch das Repertoire durch den von Infektionen ausgelösten Stimulus geprägt wird. Mehrere Studien konnten den Zusammenhang zwischen einer veränderten, klonalen Expansion einzelner T-Zell-Rezeptoren mit akuten oder chronischen Transplantat Gegen Wirt Reaktionen nachweisen [42].

Der Einfluss akuter und/oder chronischer GvH-Reaktionen auf die Rekonstitution des TCR Repertoires wurde in mehreren Studien untersucht [147],[41],[93]. Da in diesen Arbeiten das Verfahren der Spektratypisierung verwendet wurde, waren hierbei auch Aussagen zur Klonalität der T-Zellen möglich, die uns nicht möglich waren. So wurde zum Beispiel eine klonale Expansion von V $\beta$ 2, V $\beta$ 6, V $\beta$ 16, V $\beta$ 17 und V $\beta$ 23 in Hautproben bei einer GvH-Reaktion übereinstimmend gefunden. Darüber hinaus waren V $\beta$ 7, V $\beta$ 8, V $\beta$ 13b und V $\beta$ 21 in Blutproben bei Patienten mit einer GvH-Reaktion zu finden. Es lässt sich festhalten, dass eine GvH-Reaktion die Rekonstitution des T-Zell-Rezeptor Repertoires stark und vielfältig beeinflussen kann, jedoch eine direkte Korrelation von überexprimiertem V $\beta$  und GVH-Reaktion nur schwer möglich ist. In unserem Kollektiv ging eine Erhöhung von V $\beta$ 5.3 stets mit der Klinik einer GvH-Reaktion einher. Um eine wirkliche Korrelation festzustellen, bedarf es jedoch weiterer Nachforschungen.

### **4.3 Infektionen und GvH-Reaktionen**

Ein großes Problem und einen limitierenden Faktor nach vorangegangener allogener Stammzelltransplantation stellt die auftretende Immunschwäche sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene dar. Die verzögerte und mitunter unvollständige Immunrekonstitution führt zu klinisch bedeutenden Infektionen, die oftmals das Hauptproblem nach stattgehabter Transplantation darstellen. Diese Problematik verstärkt sich bei Patienten, die aufgrund einer auftretenden GvH-Reaktion zusätzlich Immunsuppressiva erhalten. Wie bereits in Kapitel 4.2 ausgeführt, gibt es unterschiedlichste Faktoren die die Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation sowohl positiv als auch negativ beeinflussen und konsekutiv Auswirkungen auf das Auftreten von Infektionen haben können. In den vergangenen Jahren wurden unterschiedliche Vorgehens- und Herangehensweisen auf dem Gebiet der Stammzelltransplantation erprobt, um die Dauer der Immunschwäche so kurz als möglich zu halten und die Infektionen nach Stammzelltransplantation beherrschbarer zu machen. Auch wenn die Mechanismen der Immunrekonstitution und der beeinflussenden Faktoren noch nicht gänzlich verstanden sind, lassen neuere klinische Ergebnisse jedoch durchaus positive Ausblicke zu.

In der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe stellten die bakteriellen Infektionen, gefolgt von den viralen Ereignissen den Hauptanteil der Komplikationen dar. Diese Häufigkeitsverteilung deckt sich mit von Busca et. al. [24] publizierten Beobachtungen der aufgetretenen Infektionen, die bei 32 Patienten nach nicht myeloablativer hämatopoetischer Stammzelltransplantation gezielt infektiöse Komplikationen dokumentierten und diese in die großen Subpopulationen der bakteriellen, der viralen und der pilzbedingten Infektionen einteilten. Der Großteil der Infektionen war mit insgesamt 13 Ereignissen (41% aller infektiösen Komplikationen) bakteriell bedingt. 11 virale Infektionen (34% aller infektiösen Komplikationen), 5 pilzbedingte Infektionen (16% aller infektiösen Komplikationen) und 1 Infektion (3% aller infektiösen Komplikationen) unbekannter Genese ließen sich darüber hinaus nachweisen.

Auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die häufigsten infektiösen Komplikationen nach stattgehabter Stammzelltransplantation auf bakteriellen Ursprung zurückzuführen sind [95],[1].

Ein weiteres großes Problem nach Stammzelltransplantation stellt die Entwicklung einer CMV Infektion beziehungsweise eine CMV Reaktivierung dar. So wurden zum Beispiel in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe 4 von 5 viralen Infektionen durch CMV ausgelöst. Bei der Abwehr gegen das Cytomegalie-Virus nehmen CMV spezifische T-Zellen eine entscheidende Rolle ein. Eine stattgehabte T-Zell Depletion könnte somit das Auftreten einer CMV Infektion begünstigen. Bainton et al. [15] postulierten darüber hinaus, dass die Kombination von Fludarabine und Alemtuzumab (Campath) im Konditionierungsregimen eventuell eine höhere CMV Komplikationsrate nach sich ziehen könnte, im Vergleich zu Patienten die ohne Fludarabine konditioniert wurden. Sie führten diesen Effekt auf eine zusätzliche T-Zell Suppression durch Fludarabine zurück, die in einem Fludarabine freien Setting eventuell ausbleiben könnte. Diese Annahme konnte zwar in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden, jedoch scheint die Verwendung von Alemtuzumab tatsächlich mit einer verlängerten CD4 Lymphozytopenie und daraus resultierend mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer CMV Infektion verbunden zu sein [26]. Cook et al. [32] konnten 2005 in einer großen Studie mit 234 Patienten zeigen, dass eine Transplantation mit NK-KIR Mismatch zu einer signifikant niederen Rate an CMV Reaktivierungen führt, jedoch konnten die genauen zugrunde liegenden Mechanismen für diesen positiven Effekt bis dato nicht eruiert werden.

Eine enge Korrelation mit einer aufgetretenen CMV Infektion und dem Vorkommen invasiver Pilzinfektionen nach Transplantation konnte in mehreren Studien belegt werden. Dieser Zusammenhang ließ sich sowohl nach Stammzelltransplantation [92] als auch nach Transplantation von soliden Organen [65] zeigen. Dieser Zusammenhang wird noch einmal unterstrichen, wenn die Tatsache in Betracht gezogen wird, dass bei nicht myeloablativ transplantierte Patienten sowohl ein deutlich späteres Auftreten von CMV Infektionen als auch von Aspergillosen beobachtet werden konnte [72]. Zusätzlich zur späteren In-

fektion mit CMV stellt insbesondere auch die immunsuppressive Behandlung einer eventuell stattgehabten GvH-Reaktion einen Risikofaktor für Pilzinfektionen dar. Bei den von uns untersuchten Patienten war das Auftreten von Pilzinfektionen eher von untergeordneter Bedeutung und es ließ sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen einer CMV- und einer Pilzinfektion aufzeigen. Dies könnte jedoch der Tatsache geschuldet sein, dass wir nur das erste Jahr nach Transplantation in unsere Beobachtungen einschlossen. Des Weiteren ist der Umstand in Betracht zu ziehen, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von pilzbedingten Infektionen einnehmen könnten, was in dieser Form auch schon von Morrison et al. [102] 2003 in Betracht gezogen wurde. Gerade im haploidenten Setting sind NK-Zellen entscheidend für die Immunitätslage der Patienten, auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht bis ins Letzte aufgeklärt sind. So sind eventuell die beobachteten Unterschiede bei Pilzinfektionen zu gewissen Teilen auch auf die Transplantatzusammensetzung zurückzuführen.

Große Hoffnungen in der Prävention von Infektionen nach Stammzelltransplantation werden in die dosisreduzierte Konditionierung gesetzt, die mit einer besseren funktionellen Immunrekonstitution und einem stärkeren Transplantat Gegen Leukämie Effekt verbunden sein soll. Jedoch wird in allen durchgeführten Studien betont, dass die Auswirkungen einer nicht myeloablativen Konditionierung auf das tatsächliche Auftreten infektiöser Komplikationen bis dato noch nicht abschließend beurteilt werden können, da meist die untersuchte Patientenzahl zu gering ist, um signifikante Unterschiede auf zu zeigen. Es deutet jedoch einiges darauf hin, dass Patienten, die nicht myeloablativ konditioniert wurden, zumindest tendenziell weniger Infektionen nach Transplantation aufweisen, auch wenn dies nicht unbedingt mit einer schnelleren oder besseren Immunrekonstitution verbunden sein muss.

Der Vergleich der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe mit der CD34 angereicherten Gruppe zeigt, dass hier deutliche Unterschiede im Bezug auf die stattgehabten Infektionen zu finden sind. Zwar stellen auch in der CD34 an-

gereicherten Gruppe bakterielle, gefolgt von viralen Infektionen die größte Untergruppe dar, während pilzbedingten Komplikationen nicht beobachtet wurden, jedoch lagen insgesamt deutlich weniger infektiöse Komplikationen in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe vor. Diese Entwicklungen lassen sich unter Umständen direkt auf eine bessere und schnellere NK-Zell Rekonstitution zurückführen – inwiefern sich, wie bereits erwähnt, die unterschiedlichen Konditionierungsprotokolle darüber hinaus eventuell positive auf die Immunkompetenz auswirken, kann in unserer Untersuchung nicht abschließend geklärt werden.

Neben den auftretenden Infektionen sind GvH-Reaktionen eine ernstzunehmende Komplikation nach Stammzelltransplantation. Eine GvH-Reaktion ist definiert als eine hauptsächlich durch transplantierte T-Zellen eines Spenders ausgelöste Reaktion gegen Gewebe des Empfängers. Vornehmlich treten diese Reaktionen an der Haut, der Leber oder dem Gastrointestinaltrakt auf. Klinisch kann sich eine GvH-Reaktion demzufolge durch eine Dermatitis, durch gastrointestinale Beschwerden mit oder ohne Diarrhö, durch Übelkeit und Erbrechen, durch Schwindel oder auch mitunter durch eine Hepatitis manifestieren.

Während bei 18 Patienten in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe insgesamt 9 Ereignisse einer akuten GvH-Reaktion (8 Fälle Grad 2 und 1 Fall Grad 4) auftraten, zeigte sich bei 10 Patienten in der CD34 transplantierten Gruppe 7 akute GvH-Ereignisse (6 Fälle von GvH-Reaktion Grad 1 und 1 Fall von GvH-Reaktion Grad 2). Es zeigten sich somit etwas schwerere Verlaufsformen der GvH-Reaktionen in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe. Diese Ergebnisse stimmen mit den veröffentlichten Daten von Aversa et. al überein. Die Tatsache, dass wir bei unseren Untersuchungen mehr und schwerer ausgeprägte GvH-Reaktionen beobachteten, spiegelt möglicherweise die doch etwas höhere Zahl von im Transplantat enthaltenen T-Zellen nach CD3/CD19 Depletion wieder. Eine zu effektive Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat, kann jedoch auch zur Verminderung des gewünschten GvL Effektes führen [18].

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Die von uns gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Methode der CD3/CD19 depletierten Stammzelltransplantation in Verbindung mit der dosisreduzierten Konditionierung zur Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen ein zuverlässiges Engraftment und eine schnelle Immunrekonstitution zulässt. Diese Form der Transplantation ermöglicht auch Patienten ohne einen passenden HLA-identen Spender die Therapieoption der Stammzelltransplantation und ist laut unseren Daten der Methode der CD34 angereicherten Transplantation überlegen. Auch zeigten sich in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe deutlich weniger infektiöse Komplikationen nach Stammzelltransplantation. Dennoch sind zusätzliche Studien nötig, um diese Methode weiter zu verbessern und ein noch detailliertes Verständnis für die beeinflussenden Faktoren zu gewinnen.

Um eventuelle prädiktive Aussagen zur Klinik der Patienten anhand der Entwicklung der TCR-V $\beta$ -Rezeptoren treffen zu können, sind hier weitere Untersuchungen zur Entwicklung der TCR-V $\beta$ -Rezeptoren-Subpopulationen an größeren Patientenkohorten nötig.

Die Entwicklung der einzelnen NK-Zell-Rezeptoren ist anscheinend eng mit dem Erfolg einer Transplantation korreliert, was sich durch die beschriebene Alloreaktivität erklären lässt. Um diese Korrelation besser zu verstehen, sind weiter Untersuchungen vor allem auf funktioneller Rezeptorebene nötig, durch die sich dann auch eventuell neue Therapieoptionen ergeben könnten.

## 5. Zusammenfassung

Die allogene HSZT stellt eine viel versprechende Therapieoption zur Behandlung zahlreicher hämatologischer und nicht hämatologischer Erkrankungen dar. Die besten Ergebnisse ließen sich nach Transplantation von HLA-identen Verwandten erzielen. Jedoch stellt die Verfügbarkeit eines möglichen passenden verwandten oder unverwandten Spenders oft einen limitierenden Faktor in der Therapie dar. Nur für ca. 30% der Patienten steht ein passender HLA-identer Familienspender und für nur bis zu 70% ein HLA-identer Fremdspender zur Verfügung [94]. Bei ethnischen Minderheiten sind diese Zahlen noch deutlich niedriger. Der mitunter aggressive und rapide Verlauf der zugrunde liegenden Erkrankungen erfordert darüber hinaus eine meist zeitnahe Transplantation. Ausgehend von der Überlegung, dass nahezu jeder Mensch einen potentiell passenden haploidenten verwandten Spender hat, wurde das Konzept der allo-genen haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantation entwickelt. Ein Problem stellt hier die so genannte HLA-Barriere dar, die mit steigendem Grad der HLA-Disparität zunimmt und das Risiko der Transplantatabstoßung beziehungsweise der GvH-Reaktion in sich birgt. Um diese Barriere zu überwinden, wurden verschiedene Transplantationskonzepte entworfen, die hauptsächlich auf eine ausgedehnte T-Zell Depletion abzielten. Nach anfänglich eher enttäuschenden Ergebnissen wurde mit dem Prinzip der Megadosis CD34+ Transplantation eine Methode entwickelt, die die Transplantation über HLA-Barrieren hinweg, bei guten klinischen Ergebnissen ermöglichte. Es zeigten sich aber bei der CD34 Selektion immer noch gravierende Probleme, die hauptsächlich auf das Konditionierungsregime und dessen Toxizität zurückzuführen waren. Vor allem ein langsames Engraftment und eine verzögerte Immunrekonstitution waren zu beobachten. Eine Weiterentwicklung des CD34+ Megadosis Konzeptes unter Zuhilfenahme der CD3/CD19 Depletion, ermöglichte es, viele für das Engraftment wichtige Zellen im Transplantat zu belassen und selektiv die T-Zellen aus dem Transplantat zu entfernen. Wir kombinierten nun die Methode der CD3/CD19 Depletion mit dem Konzept der dosisreduzierten Konditionierung.



Die Verwendung von CD3/CD19 depletierten Transplantaten kombiniert mit der dosisreduzierten Konditionierung führt, wie unsere Ergebnisse zeigen, zu einem schnelleren Engraftment und einer schnelleren Immunrekonstitution. Dies dürfte in der Tatsache begründet liegen, dass im Transplantat auch noch „facilitating cells“, CD34 negative Progenitorzellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen enthalten sind, die sich positiv auf die Entwicklung des Immunsystems auswirken. Folgerichtig zeigte sich unter den CD3/CD19 Patienten ebenfalls eine geringere Transfusionsbedürftigkeit, sowohl was Erythrozyten- als auch was Thrombozytenkonzentrate betrifft.

Wir konnten zeigen, dass sich die T-Zell Rekonstitution nach CD3/CD19 Depletion schneller vollzieht, als nach Transplantation mit CD34 selektierten Transplantaten. Die Gründe hierfür dürften neben den im Transplantat enthaltenen „Facilitating Cells“, in dem leicht höheren T-Zellgehalt des Transplantates in der CD3/CD19 depletierten Gruppe zu suchen sein. In der CD3/CD19 Gruppe untersuchten wir die Rekonstitution des T-Zell-V $\beta$ -Rezeptorrepertoires nach HSZT. Es zeigte sich ein sehr heterogenes, individuelles Bild der Regeneration bei den einzelnen Patienten, das zeitlich teilweise mit stattgehabten klinischen Ereignissen korreliert. Ab Tag 200 nach HSZT füllte sich jedoch bei allen Patienten das Repertoire zusehends.

Die Rekonstitution der B-Zellen vollzog sie sich in der CD34 Gruppe schneller als in der CD3/CD19 Gruppe, die auch eine Verzögerung im Vergleich zu anderen publizierten Ereignissen nach HSZT zeigte. Dies unterstreicht die Bedeutung der Beschaffenheit des Transplantates in diesem Zusammenhang.

In beiden Gruppen fanden wir eine sehr schnelle NK-Zell Rekonstitution, mit deutlich höheren Werten in der CD3/CD19 Gruppe, was sich auf die zahlreichen im Graft enthaltenen NK-Zellen zurückführen lassen dürfte. Die Rekonstitution der natürlichen Killerzell-Rezeptoren wurde in der CD3/CD19 depletiert transplantierten Gruppe untersucht. Hierbei untersuchten wir aktivierende zytotoxische Rezeptoren (NKP30, NKP44, NKP46, NKG2D) und HLA-Klasse-I-inhibitorische Rezeptoren (KIR, NKG2A, CD85j). Wir konnten zeigen, dass ein vorhandenes KIR-Mismatch im CD3/CD19 depletierten Setting keinen ent-

scheidenden Einfluss auf das Engraftment und den klinischen Verlauf der Patienten hat.

Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich ein geringeres Vorkommen von Infektionen in der CD3/CD19 Gruppe. Gegenüber der CD34 Selektion erhöht sich jedoch die Inzidenz einer leicht bis mittelgradigen GvH-Reaktion.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Verwendung von CD3/CD19 depletierten Transplantaten in Verbindung mit einer dosisreduzierten Konditionierung vielen Patienten, die keinen HLA identischen Spender haben, die Möglichkeit einer kurativen Stammzelltransplantation eröffnet. Dieses Vorgehen ermöglicht es sogar, älteren und bereits intensiv vorbehandelten Patienten eine Stammzelltransplantation anzubieten. Es bedarf aber weiterer klinischer Studien mit Beobachtung des Langzeitverlaufes, um abschließende Aussagen über die Auswirkungen der Transplantatzusammensetzung auf den Erfolg dieses Therapiekonzeptes zu treffen.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Paper:

Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, Stelljes M, Vogel W, Hägele M, Handgretinger R, Kanz L (2007)

Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. Blood Cells Mol Dis. 2008 Jan-Feb;40(1):13-9. Epub Sep 14.

Bethge WA, Haegele M, Faul C, Lang P, Schumm M, Bornhauser M, Handgretinger R, Kanz L. (2006)

Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. Exp Hematol. Dec;34(12):1746-52.

Poster:

Birgit Federmann, Matthias Haegele, Christoph Faul, Wichard Vogel, Lothar Kanz and Wolfgang A. Bethge (2008)

Immune Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation: Impact of Reduced Intensity Conditioning and CD3/CD19-Depleted Grafts Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2008;

Birgit Federmann, Matthias Hägele, Christoph Faul, Wichard Vogel, Lothar Kanz, and Wolfgang A. Bethge (2008)

Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation using reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie Okt 2008 in Wien, 2008.

Chiara Gentilini, Matthias Haegele, Arne Muessig, Axel Nogai, Constanze Kliem, Kristina Bartsch, Nadezda Bazara, Wichard Vogel, Christoph Faul, Lothar Kanz, Eckhard Thiel, Dietger W. Niederwieser, Lutz Uharek, and Wolfgang A. Bethge (2007)

NK-Cell Recovery and Immune Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation Using Either CD34 Selected Grafts and Adoptive NK-Cell Transfer or CD3/CD19 Depleted Grafts: Comparison of Two Strategies for NK Cell Based Immunotherapy.

Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2007; 110: 2988.

Matthias Hägele, Christoph Faul, Peter Lang, Michael Schumm, Rupert Handgretinger, Lothar Kanz, and Wolfgang A. Bethge (2005)

Faster Engraftment and Immune Reconstitution after Haploidentical Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation with CD3/CD19 Depleted as Compared to CD34 Selected Grafts.

Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2005; 106: 2200.

## Danksagungen:

PD Dr. Wolfgang Bethge möchte ich für die sehr gute und intensive Betreuung meiner Doktorarbeit ganz herzlich danken. Sein Engagement und seine mitreisende Begeisterung waren mir stets Motivation und ich danke ihm dafür, dass ich sehr viel von ihm lernen durfte.

Den Mitarbeitern des Stammzelllabors der Universitäts Kinderklinik Tübingen möchte ich für die herzliche Aufnahme, die großartige Einarbeitung und die sehr gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank geht hierbei an Michael Schumm, Peter Lang, Matthias Pfeiffer, Susi Schneider, Anja Wolf und Anni Babarin-Dorner.

Bei Birgit Federmann möchte ich mich für eine gute Zusammenarbeit und ein langes und offenes Gespräch bedanken.

Den Mitarbeitern des Chimärismuslabors der Medizinischen Klinik Tübingen möchte ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit danken.

Bei meinen Eltern, Heidi und Herbert Hägele möchte ich mich für uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenslage und viele horizontweiternde Anstöße bedanken.

Meinen Geschwistern Anja und Rainer Hägele gilt mein Dank für die vielen intensiven, anregenden Diskussionen und dafür, dass sie mir oftmals völlig andere Sichtweisen ermöglichen.

Meiner lieben Frau Isabelle, die sicherlich „am nächsten dran war“ beim Entstehungsprozess dieser Arbeit, danke ich für ein immer offenes Ohr, viel Geduld, Zuspruch und Motivation und das tiefgehende Interesse an dieser Arbeit.

Ganz besonders jedoch für die unzählbaren, wunderschönen, gemeinsam erlebten Stunden. Das Leben ist ein Abenteuer, Charlie Brown !

## Literaturverzeichnis

1. Afessa, B. and S.G. Peters, *Major complications following hematopoietic stem cell transplantation*. Semin Respir Crit Care Med, 2006. **27**(3): p. 297-309.
2. Aglietta, M., F. Bertolini, C. Carlo-Stella, A. De Vincentiis, L. Lanata, R.M. Lemoli, A. Olivieri, S. Siena, P. Zanon, and S. Tura, *Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use*. Haematologica, 1998. **83**(9): p. 824-48.
3. Anasetti, C., D. Amos, P.G. Beatty, F.R. Appelbaum, W. Bensinger, C.D. Buckner, R. Clift, K. Doney, P.J. Martin, E. Mickelson, and et al., *Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma*. N Engl J Med, 1989. **320**(4): p. 197-204.
4. Ando, K., *Human CD34- hematopoietic stem cells: basic features and clinical relevance*. Int J Hematol, 2002. **75**(4): p. 370-5.
5. Arai, S. and H.G. Klingemann, *Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood*. Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 545-53.
6. Ashihara, E., C. Shimazaki, A. Okano, M. Hatsuse, A. Okamoto, K. Shimura, R. Takahashi, T. Sumikuma, T. Inaba, N. Fujita, S. Murakami, H. Haruyama, and M. Nakagawa, *Infusion of a high number of CD34+ cells provides a rapid hematopoietic recovery and cost savings in autologous peripheral blood stem cell transplantation*. Jpn J Clin Oncol, 2002. **32**(4): p. 135-9.
7. Auletta, J.J. and H.M. Lazarus, *Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35**(9): p. 835-57.
8. Ault, K.A., J.H. Antin, D. Ginsburg, S.H. Orkin, J.M. Rapoport, M.L. Keohan, P. Martin, and B.R. Smith, *Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation*. J Exp Med, 1985. **161**(6): p. 1483-502.
9. Aversa, F., A. Tabilio, A. Terenzi, A. Velardi, F. Falzetti, C. Giannoni, R. Iacucci, T. Zei, M.P. Martelli, C. Gambelunghe, and et al., *Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum*. Blood, 1994. **84**(11): p. 3948-55.
10. Aversa, F., A. Tabilio, A. Velardi, I. Cunningham, A. Terenzi, F. Falzetti, L. Ruggeri, G. Barbabietola, C. Aristei, P. Latini, Y. Reisner, and M.F. Martelli, *Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype*. N Engl J Med, 1998. **339**(17): p. 1186-93.
11. Aversa, F., A. Terenzi, A. Tabilio, F. Falzetti, A. Carotti, S. Ballanti, R. Felicini, F. Falcinelli, A. Velardi, L. Ruggeri, T. Aloisi, J.P. Saab, A. Santucci, K. Perruccio, M.P. Martelli, C. Mecucci, Y. Reisner, and M.F. Martelli, *Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3447-54.

12. Bachar-Lustig, E., N. Rachamim, H.W. Li, F. Lan, and Y. Reisner, *Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice*. *Nat Med*, 1995. **1**(12): p. 1268-73.
13. Bacigalupo, A., *Third EBMT/AMGEN Workshop on reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem cell transplants (RIC-HSCT), and panel consensus*. *Bone Marrow Transplant*, 2004. **33**(7): p. 691-6.
14. Bader, P., J. Beck, A. Frey, P.G. Schlegel, H. Hebarth, R. Handgretinger, H. Einsele, C. Niemeyer, N. Benda, C. Faul, L. Kanz, D. Niethammer, and T. Klingebiel, *Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT*. *Bone Marrow Transplant*, 1998. **21**(5): p. 487-95.
15. Bainton, R.D., J.L. Byrne, B.J. Davy, and N.H. Russell, *CMV infection following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation using Campath*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3843-4.
16. Barnes, D.W., M.J. Corp, J.F. Loutit, and F.E. Neal, *Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication*. *Br Med J*, 1956. **2**(4993): p. 626-7.
17. Bearman, S.I., F.R. Appelbaum, A. Back, F.B. Petersen, C.D. Buckner, K.M. Sullivan, H.G. Schoch, L.D. Fisher, and E.D. Thomas, *Regimen-related toxicity and early posttransplant survival in patients undergoing marrow transplantation for lymphoma*. *J Clin Oncol*, 1989. **7**(9): p. 1288-94.
18. Beatty, P.G., R.A. Clift, E.M. Mickelson, B.B. Nisperos, N. Flournoy, P.J. Martin, J.E. Sanders, P. Stewart, C.D. Buckner, R. Storb, and et al., *Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings*. *N Engl J Med*, 1985. **313**(13): p. 765-71.
19. Beguin, Y., E. Baudoux, B. Sautois, V. Fraipont, N. Schaaf-Lafontaine, M. Pereira, J.M. Paulus, D. Sondag, and G. Fillet, *Hematopoietic recovery in cancer patients after transplantation of autologous peripheral blood CD34+ cells or unmanipulated peripheral blood stem and progenitor cells*. *Transfusion*, 1998. **38**(2): p. 199-208.
20. Benaim, E., G. Hale, and E. Horwitz, *Rapid engraftment after reduced intensity conditioning (RIC) and transplantation of T-cell depleted large numbers of CD34+ stem and CD56+ natural killer (NK) cells obtained from mobilized haploidentical donors [abstract]*. *Blood*, 2003. **102**: p. 669a.
21. Bensinger, W.I., P.J. Martin, B. Storer, R. Clift, S.J. Forman, R. Negrin, A. Kashyap, M.E. Flowers, K. Lilleby, T.R. Chauncey, R. Storb, and F.R. Appelbaum, *Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(3): p. 175-81.
22. Biassoni, R., C. Cantoni, D. Pende, S. Sivori, S. Parolini, M. Vitale, C. Bottino, and A. Moretta, *Human natural killer cell receptors and co-receptors*. *Immunol Rev*, 2001. **181**: p. 203-14.
23. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, *Pathologie*. Urban & Fischer, 2001. **2. vollständig überarbeitet Auflage**: p. 163-211.
24. Busca, A., F. Locatelli, A. Barbui, V. Ghisetti, D. Cirillo, R. Serra, E. Audisio, and M. Falda, *Infectious complications following nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Transpl Infect Dis*, 2003. **5**(3): p. 132-9.

25. Byrne, J.L. and N.H. Russell, *Peripheral blood stem cell transplants*. J Clin Pathol, 1998. **51**(5): p. 351-5.
26. Chakrabarti, S., S. Mackinnon, R. Chopra, P.D. Kottaridis, K. Peggs, P. O'Gorman, R. Chakraverty, T. Marshall, H. Osman, P. Mahendra, C. Craddock, H. Waldmann, G. Hale, C.D. Fegan, K. Yong, A.H. Goldstone, D.C. Linch, and D.W. Milligan, *High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4357-63.
27. Champlin, R.E., *Peripheral blood progenitor cells: a replacement for marrow transplantation?* Semin Oncol, 1996. **23**(2 Suppl 4): p. 15-21.
28. Chao, N.J., J.R. Schriber, K. Grimes, G.D. Long, R.S. Negrin, C.M. Raimondi, S.J. Horning, S.L. Brown, L. Miller, and K.G. Blume, *Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy*. Blood, 1993. **81**(8): p. 2031-5.
29. Chklovskaya, E., P. Nowbakht, C. Nissen, A. Gratwohl, M. Bargetzi, and A. Wodnar-Filipowicz, *Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3860-8.
30. Classen, M., V. Diehl, and K. Kochsiek, *Innere Medizin*. Urban & Fischer, 2004. **5. Auflage**(Kapitel Hämatologie): p. 665-784.
31. Colucci, F., M.A. Caligiuri, and J.P. Di Santo, *What does it take to make a natural killer?* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 413-25.
32. Cook, M., D. Briggs, C. Craddock, P. Mahendra, D. Milligan, C. Fegan, P. Darbyshire, S. Lawson, E. Boxall, and P. Moss, *Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1230-2.
33. Cooley, S., V. McCullar, R. Wangen, T.L. Bergemann, S. Spellman, D.J. Weisdorf, and J.S. Miller, *KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4370-6.
34. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
35. Dausset, J., *[Iso-leuko-antibodies.]*. Acta Haematol, 1958. **20**(1-4): p. 156-66.
36. Davies, S.M., L. Ruggieri, T. DeFor, J.E. Wagner, D.J. Weisdorf, J.S. Miller, A. Velardi, and B.R. Blazar, *Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3825-7.
37. del Canizo, M.C., N. Lopez, L. Vazquez, M.E. Fernandez, B. Ana, M.D. Caballero, M.L. Amigo, M.V. Mateos, N. Gutierrez, and J.F. San Migue, *Hematopoietic damage prior to PBSCT and its influence on hematopoietic recovery*. Haematologica, 1999. **84**(6): p. 511-6.
38. Despars, G., J. Tan, P. Periasamy, and H.C. O'Neill, *The role of stroma in hematopoiesis and dendritic cell development*. Curr Stem Cell Res Ther, 2007. **2**(1): p. 23-9.

39. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation, D.-K.e., *Dritter Deutscher Konsensus zur immunogenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation*. 2005.
40. Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV, G., *Krebs in Deutschland*. 2006. **5. aktualisierte Auflage**.
41. Dietrich, P.Y., A. Caignard, A. Diu, C. Genevee, J.L. Pico, M. Henry-Amar, J. Bosq, E. Angevin, F. Triebel, and T. Hercend, *Analysis of T-cell receptor variability in transplanted patients with acute graft-versus-host disease*. *Blood*, 1992. **80**(9): p. 2419-24.
42. Dietrich, P.Y., A. Caignard, A. Lim, V. Chung, J.L. Pico, C. Pannetier, P. Kourilsky, T. Hercend, J. Even, and F. Triebel, *In vivo T-cell clonal amplification at time of acute graft-versus-host disease*. *Blood*, 1994. **84**(8): p. 2815-20.
43. Drobyski, W.R., *Evolving strategies to address adverse transplant outcomes associated with T cell depletion*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000. **9**(3): p. 327-37.
44. Dulude, G., S. Brochu, P. Fontaine, C. Baron, M. Gyger, D.C. Roy, and C. Perreault, *Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients*. *Exp Hematol*, 1997. **25**(9): p. 992-1004.
45. Einsele, H., H. Bertz, J. Beyer, M.G. Kiehl, V. Runde, H.J. Kolb, E. Holler, R. Beck, R. Schwerdfeger, U. Schumacher, H. Hebart, H. Martin, J. Kienast, A.J. Ullmann, G. Maschmeyer, W. Kruger, D. Niederwieser, H. Link, C.A. Schmidt, H. Oettle, and T. Klingebiel, *Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)*. *Ann Hematol*, 2003. **82 Suppl 2**: p. S175-85.
46. Eyrich, M., T. Croner, C. Leiler, P. Lang, P. Bader, T. Klingebiel, D. Niethammer, and P.G. Schlegel, *Distinct contributions of CD4(+) and CD8(+) naive and memory T-cell subsets to overall T-cell-receptor repertoire complexity following transplantation of T-cell-depleted CD34-selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1915-8.
47. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. *Blood Rev*, 2006. **20**(3): p. 123-37.
48. Farag, S.S., T.A. Fehniger, L. Ruggeri, A. Velardi, and M.A. Caligiuri, *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. *Blood*, 2002. **100**(6): p. 1935-47.
49. Feuring-Buske, M., W. Hiddemann, and C. Buske, *[Pathogenesis and biology of leukemias]*. *Internist (Berl)*, 2002. **43**(10): p. 1179-89.
50. Friedman, T.M., G. Varadi, D.D. Hopely, J. Filicko, J. Wagner, A. Ferber, J. Martinez, J. Brunner, D. Grosso, L. McGuire, R. Korngold, and N. Flomenberg, *Nonmyeloablative conditioning allows for more rapid T-cell repertoire reconstitution following allogeneic matched unrelated bone marrow transplantation compared to myeloablative approaches*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001. **7**(12): p. 656-64.



51. Gale, R.P., M.M. Horowitz, R.C. Ash, R.E. Champlin, J.M. Goldman, A.A. Rimm, O. Ringden, J.A. Stone, and M.M. Bortin, *Identical-twin bone marrow transplants for leukemia*. *Ann Intern Med*, 1994. **120**(8): p. 646-52.
52. Geddes, M. and J. Storek, *Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(2): p. 329-48.
53. Gianni, A.M., S. Siena, M. Bregni, C. Tarella, A.C. Stern, A. Pileri, and G. Bonadonna, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation*. *Lancet*, 1989. **2**(8663): p. 580-5.
54. Giebel, S., F. Locatelli, T. Lamparelli, A. Velardi, S. Davies, G. Frumento, R. Maccario, F. Bonetti, J. Wojnar, M. Martinetti, F. Frassoni, G. Giorgiani, A. Bacigalupo, and J. Holowiecki, *Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors*. *Blood*, 2003. **102**(3): p. 814-9.
55. Godthelp, B.C., M.J. van Tol, J.M. Vossen, and P.J. van Den Elsen, *T-Cell immune reconstitution in pediatric leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation with T-cell-depleted or unmanipulated grafts: evaluation of overall and antigen-specific T-cell repertoires*. *Blood*, 1999. **94**(12): p. 4358-69.
56. Gordon, M.Y., S.B. Marley, R.J. Davidson, F.H. Grand, J.L. Lewis, D.X. Nguyen, S. Lloyd, and J.M. Goldman, *Contact-mediated inhibition of human haematopoietic progenitor cell proliferation may be conferred by stem cell antigen, CD34*. *Hematol J*, 2000. **1**(2): p. 77-86.
57. Gratwohl, A., R. Brand, F. Frassoni, V. Rocha, D. Niederwieser, P. Reusser, H. Einsele, and C. Cordonnier, *Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time*. *Bone Marrow Transplant*, 2005. **36**(9): p. 757-69.
58. Guillaume, T., D.B. Rubinstein, and M. Symann, *Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 1998. **92**(5): p. 1471-90.
59. Hagemann, O., *Laborlexikon*. <http://www.laborlexikon.de>, 2005.
60. Hakim, F.T., R. Cepeda, S. Kaimei, C.L. Mackall, N. McAtee, J. Zujewski, K. Cowan, and R.E. Gress, *Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells*. *Blood*, 1997. **90**(9): p. 3789-98.
61. Hale, G.A., K.A. Kasow, R. Lovins, J.P. Woodard, W.H. Leung, U. Yusuf, E.M. Horwitz, D.K. Srivastava, X. Tong, E. Benaim, and R. Handgretinger, *CD3 Depleted Hematopoietic Peripheral Blood Stem Cell Grafts in Children with Refractory Hematologic Malignancies Undergoing Transplantation from Mismatched Related Donors*. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2005. **106**(11): p. 5458-.
62. Handgretinger, R., T. Klingebiel, P. Lang, M. Schumm, S. Neu, A. Geiselhart, P. Bader, P.G. Schlegel, J. Greil, D. Stachel, R.J. Herzog, and D. Niethammer, *Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children*. *Bone Marrow Transplant*, 2001. **27**(8): p. 777-83.

63. Hannel, I., F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys, and M. DeBruyere, *Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations*. Immunol Today, 1992. **13**(6): p. 215, 218.
64. Heitger, A., N. Neu, H. Kern, E.R. Panzer-Grumayer, H. Greinix, D. Nachbaur, D. Niederwieser, and F.M. Fink, *Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 1997. **90**(2): p. 850-7.
65. Husni, R.N., S.M. Gordon, D.L. Longworth, A. Arroliga, P.C. Stillwell, R.K. Avery, J.R. Maurer, A. Mehta, and T. Kirby, *Cytomegalovirus infection is a risk factor for invasive aspergillosis in lung transplant recipients*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(3): p. 753-5.
66. Iversen, A.C., P.S. Norris, C.F. Ware, and C.A. Benedict, *Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7568-74.
67. Jacobs, R., G. Hintzen, A. Kemper, K. Beul, S. Kempf, G. Behrens, K.W. Sykora, and R.E. Schmidt, *CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3121-7.
68. Jacobs, R., M. Stoll, G. Stratmann, R. Leo, H. Link, and R.E. Schmidt, *CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation*. Blood, 1992. **79**(12): p. 3239-44.
69. Jacobson, L.O., E.L. Simmons, E.K. Marks, and J.H. Eldredge, *Recovery from radiation injury*. Science, 1951. **113**(2940): p. 510-11.
70. Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, *Immunobiology*. Churchill Livingstone, 2001. **5th Edition**.
71. Jaroszeski, M.J. and G. Radcliff, *Fundamentals of flow cytometry*. Mol Biotechnol, 1999. **11**(1): p. 37-53.
72. Junghanss, C., K.A. Marr, R.A. Carter, B.M. Sandmaier, M.B. Maris, D.G. Maloney, T. Chauncey, P.A. McSweeney, and R. Storb, *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): p. 512-20.
73. Karenberg, A., *Amor, Äskulap & Co - Klassische Mythologie in der Sprache der modernen Medizin*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 2005: p. 47-48.
74. Kärre, K., *Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis*. In "Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity". Academic Press, Orlando, 1985. **Eds: D Callewert and RB Herberman**: p. 81-91.
75. Ketterer, N., G. Salles, M. Raba, D. Espinouse, A. Sonet, P. Tremisi, C. Dumontet, I. Moullet, A. Eljaafari-Corbin, E.M. Neidhardt-Berard, F. Bouafia, and B. Coiffier, *High CD34(+) cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3148-55.

76. Klaus, J., D. Herrmann, I. Breitzkreutz, U. Hegenbart, U. Mazitschek, G. Egerer, F.W. Cremer, R.M. Lowenthal, J. Huesing, S. Fruehauf, T. Moehler, A.D. Ho, and H. Goldschmidt, *Effect of CD34 cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation*. Eur J Haematol, 2007. **78**(1): p. 21-8.
77. Kook, H., F. Goldman, D. Padley, R. Giller, S. Rumelhart, M. Holidia, N. Lee, C. Peters, M. Comito, D. Huling, and M. Trigg, *Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery*. Blood, 1996. **88**(3): p. 1089-97.
78. Korbling, M. and P. Anderlini, *Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?* Blood, 2001. **98**(10): p. 2900-8.
79. Kumar, L., *Haematopoietic stem cell transplantation: current status*. Natl Med J India, 2007. **20**(3): p. 128-37.
80. Lang, P., R. Handgretinger, D. Niethammer, P.G. Schlegel, M. Schumm, J. Greil, P. Bader, C. Engel, H. Scheel-Walter, M. Eyrych, and T. Klingebiel, *Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1630-6.
81. Lang, P., M. Schumm, J. Greil, P. Bader, T. Klingebiel, I. Muller, T. Feuchtinger, M. Pfeiffer, P.G. Schlegel, D. Niethammer, and R. Handgretinger, *A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study*. Klin Padiatr, 2005. **217**(6): p. 334-8.
82. Lizard, G., *Flow cytometry: a multiparameter cytological analysis technic*. Presse Med, 1986. **15**(34): p. 1726-7.
83. Locatelli, F., R. Maccario, P. Comoli, F. Bertolini, G. Giorgiani, D. Montagna, F. Bonetti, P. De Stefano, G. Rondini, G. Sirchia, and F. Severi, *Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children*. Bone Marrow Transplant, 1996. **18**(6): p. 1095-101.
84. Lorenz, E., D. Uphoff, T.R. Reid, and E. Shelton, *Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections*. J Natl Cancer Inst, 1951. **12**(1): p. 197-201.
85. Lowenthal, R.M., C. Faberes, G. Marit, J.M. Boiron, P. Cony-Makhoul, A. Pigneux, P. Agape, G. Vezon, R. Bouzgarou, B. Dazey, D. Fizet, P. Bernard, F. Lacombe, and J. Reiffers, *Factors influencing haemopoietic recovery following chemotherapy-mobilised autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for haematological malignancies: a retrospective analysis of a 10-year single institution experience*. Bone Marrow Transplant, 1998. **22**(8): p. 763-70.
86. MacDonald, K.P., V. Rowe, C. Filippich, D. Johnson, E.S. Morris, A.D. Clouston, J.L. Ferrara, and G.R. Hill, *Chronic graft-versus-host disease after granulocyte colony-stimulating factor-mobilized allogeneic stem cell transplantation: the role of donor T-cell dose and differentiation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(6): p. 373-85.

87. Mackall, C.L., C.V. Bare, L.A. Granger, S.O. Sharrow, J.A. Titus, and R.E. Gress, *Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4609-16.
88. Mackall, C.L., T.A. Fleisher, M.R. Brown, M.P. Andrich, C.C. Chen, I.M. Feuerstein, M.E. Horowitz, I.T. Magrath, A.T. Shad, S.M. Steinberg, and et al., *Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy*. N Engl J Med, 1995. **332**(3): p. 143-9.
89. Mackall, C.L., T.A. Fleisher, M.R. Brown, M.P. Andrich, C.C. Chen, I.M. Feuerstein, I.T. Magrath, L.H. Wexler, D.S. Dimitrov, and R.E. Gress, *Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3700-7.
90. Malarkannan, S., *The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions*. Semin Immunol, 2006. **18**(3): p. 186-92.
91. Maris, M., M. Boeckh, B. Storer, M. Dawson, K. White, M. Keng, B. Sandmaier, D. Maloney, R. Storb, and J. Storek, *Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning*. Exp Hematol, 2003. **31**(10): p. 941-52.
92. Marr, K.A., R.A. Carter, M. Boeckh, P. Martin, and L. Corey, *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4358-66.
93. Martin, P.J., *Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors*. Bone Marrow Transplant, 1991. **8**(3): p. 217-23.
94. Martin, P.J., *Overview of marrow transplantation immunology*. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (eds). Hematopoietic Cell Transplantation, 1999. **Malden, MA, 2nd edn. Blackwell Science**: p. 19-27.
95. Martino, R., M.D. Caballero, C. Canals, J. San Miguel, J. Sierra, M. Rovira, C. Solano, J. Bargay, J. Perez-Simon, A. Leon, J. Sarra, S. Brunet, and R. de la Camara, *Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2001. **28**(4): p. 341-7.
96. Mayol AS, Vital JB, Llodra AG, Flori NM, Sureda MM, Garcia AN, Riera MM, Bach EG, and Garcia PM, *CD34+ cell dose and CD33- subset: collection and engraftment kinetics in autologous peripheral blood stem cell transplantation*. Haematologica, 1998. **83**: p. 489-495.
97. McDonald, G.B., P. Sharma, D.E. Matthews, H.M. Shulman, and E.D. Thomas, *Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors*. Hepatology, 1984. **4**(1): p. 116-22.
98. Moesta, A.K., P.J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer, and P. Parham, *Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3969-79.

99. Mohty, M., K. Bilger, E. Jourdan, M. Kuentz, M. Michallet, J.H. Bourhis, N. Milpied, L. Sutton, J.P. Jouet, M. Attal, P. Bordigoni, J.Y. Cahn, A. Sadoun, N. Ibrah, D. Guyotat, C. Faucher, N. Fegueux, J. Reiffers, D. Maraninchi, and D. Blaise, *Higher doses of CD34+ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation*. *Leukemia*, 2003. **17**(5): p. 869-75.
100. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta, *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 197-223.
101. Moretta, L. and A. Moretta, *Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors*. *EMBO J*, 2004. **23**(2): p. 255-9.
102. Morrison, B.E., S.J. Park, J.M. Mooney, and B. Mehrad, *Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1862-70.
103. Nguyen, S., N. Dhedin, J.P. Vernant, M. Kuentz, A. Al Jijakli, N. Rouas-Freiss, E.D. Carosella, A. Boudifa, P. Debre, and V. Vieillard, *NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4135-42.
104. Niederwieser, D., G. Gastl, H. Rumpold, C. Marth, D. Kraft, and C. Huber, *Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT)*. *Br J Haematol*, 1987. **65**(3): p. 301-5.
105. Novitzky, N. and G.M. Davison, *Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation*. *Cytotherapy*, 2001. **3**(3): p. 211-20.
106. Novitzky, N., G.M. Davison, G. Hale, and H. Waldmann, *Immune reconstitution at 6 months following T-cell depleted hematopoietic stem cell transplantation is predictive for treatment outcome*. *Transplantation*, 2002. **74**(11): p. 1551-9.
107. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science*, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
108. Ottinger, H.D., D.W. Beelen, B. Scheulen, U.W. Schaefer, and H. Grosse-Wilde, *Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow*. *Blood*, 1996. **88**(7): p. 2775-9.
109. Pan, L., J. Delmonte, Jr., C.K. Jalonen, and J.L. Ferrara, *Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease*. *Blood*, 1995. **86**(12): p. 4422-9.
110. Papamichail, M., S.A. Perez, A.D. Gritzapis, and C.N. Baxevanis, *Natural killer lymphocytes: biology, development, and function*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(3): p. 176-86.
111. Pavletic, Z.S., S.S. Joshi, S.J. Pirruccello, S.R. Tarantolo, J. Kollath, E.C. Reed, P.J. Bierman, J.M. Vose, P.I. Warkentin, T.G. Gross, K. Nasrati, J.O. Armitage, A. Kessinger, and M.R. Bishop, *Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies*. *Bone Marrow Transplant*, 1998. **21**(1): p. 33-41.

112. Penack, O., C. Gentilini, L. Fischer, A.M. Asemissen, C. Scheibenbogen, E. Thiel, and L. Uharek, *CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets*. *Leukemia*, 2005. **19**(5): p. 835-40.
113. Pende, D., S. Marcenaro, M. Falco, S. Martini, M.E. Bernardo, D. Montagna, E. Romeo, C. Cognet, M. Martinetti, R. Maccario, M.C. Mingari, E. Vivier, L. Moretta, F. Locatelli, and A. Moretta, *Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity*. *Blood*, 2008.
114. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta, *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. *J Exp Med*, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
115. Platzbecker, U., A. Schulze, U. Oelschlagel, H. Schirutschke, M. Schmitz, G. Ehninger, and M. Bornhauser, *Differences in Reconstitution of NK-Cell Subsets and Expression of Effector Molecules after HLA-Identical and Haploidentical Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with AML*. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2005. **106**(11): p. 1411-.
116. Pozo, D., M. Vales-Gomez, N. Mavaddat, S.C. Williamson, S.E. Chisholm, and H. Reyburn, *CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase*. *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2397-406.
117. Raff, R.F., H.J. Deeg, T.P. Loughran, Jr., T.C. Graham, J.A. Aprile, G.E. Sale, and R. Storb, *Characterization of host cells involved in resistance to marrow grafts in dogs transplanted from unrelated DLA-nonidentical donors*. *Blood*, 1986. **68**(4): p. 861-8.
118. Reimer, P., V. Kunzmann, M. Wilhelm, B. Weissbrich, D. Kraemer, H. Berghammer, and F. Weissinger, *Cellular and humoral immune reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT)*. *Ann Hematol*, 2003. **82**(5): p. 263-70.
119. Reinherz, E.L., S.C. Meuer, K.A. Fitzgerald, R.E. Hussey, J.C. Hodgdon, O. Acuto, and S.F. Schlossman, *Comparison of T3-associated 49- and 43-kilodalton cell surface molecules on individual human T-cell clones: evidence for peptide variability in T-cell receptor structures*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(13): p. 4104-8.
120. Reisner, Y. and M.F. Martelli, *Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells*. *Immunol Today*, 1995. **16**(9): p. 437-40.
121. Remberger, M., O. Ringden, I.W. Blau, H. Ottinger, B. Kremens, M.G. Kiehl, J. Aschan, D.W. Beelen, N. Basara, G. Kumlien, A.A. Fauser, and V. Runde, *No difference in graft-versus-host disease, relapse, and survival comparing peripheral stem cells to bone marrow using unrelated donors*. *Blood*, 2001. **98**(6): p. 1739-45.
122. Roberts, M.M., L.B. To, D. Gillis, J. Mundy, C. Rawling, K. Ng, and C.A. Juttner, *Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 1993. **12**(5): p. 469-75.

123. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-38.
124. Roitt, I.M., J. Brostoff, and D. Male, *Immunologia*. Zanichelli, 1998. **4**.
125. Rondelli, D., F. Re, G. Bandini, D. Raspadori, M. Arpinati, B. Senese, M. Stanzani, F. Bonifazi, S. Falcioni, G. Chirumbolo, and S. Tura, *Different immune reconstitution in multiple myeloma, chronic myeloid leukemia and acute myeloid leukemia patients after allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells*. Bone Marrow Transplant, 2000. **26**(12): p. 1325-31.
126. Roux, E., F. Dumont-Girard, M. Starobinski, C.A. Siegrist, C. Helg, B. Chapuis, and E. Roosnek, *Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2299-303.
127. Ruggeri, L., F. Aversa, M.F. Martelli, and A. Velardi, *Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 202-18.
128. Ruggeri, L., M. Capanni, M. Casucci, I. Volpi, A. Tosti, K. Perruccio, E. Urbani, R.S. Negrin, M.F. Martelli, and A. Velardi, *Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 1999. **94**(1): p. 333-9.
129. Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W.D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M.F. Martelli, and A. Velardi, *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. Science, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
130. Ruggeri, L., A. Mancusi, E. Burchielli, F. Aversa, M.F. Martelli, and A. Velardi, *Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(2): p. 142-7.
131. Rutella, S., L. Pierelli, S. Sica, C. Rumi, and G. Leone, *Transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells: impact of CD34-cell selection on immunological reconstitution*. Leuk Lymphoma, 2001. **42**(6): p. 1207-20.
132. Sandmaier, B.M., P. McSweeney, C. Yu, and R. Storb, *Nonmyeloablative transplants: preclinical and clinical results*. Semin Oncol, 2000. **27**(2 Suppl 5): p. 78-81.
133. Schellekens, J., E.H. Rozemuller, E.J. Petersen, J.G. van den Tweel, L.F. Verdonck, and M.G. Tilanus, *Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation*. Mol Immunol, 2008. **45**(8): p. 2255-61.
134. Schetelig, J., A. Kiani, M. Schmitz, G. Ehninger, and M. Bornhauser, *T cell-mediated graft-versus-leukemia reactions after allogeneic stem cell transplantation*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(11): p. 1043-58.
135. Schmitt, T.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 749-56.
136. Schumm, M., P. Lang, G. Taylor, S. Kuci, T. Klingebiel, H.J. Buhring, A. Geiselhart, D. Niethammer, and R. Handgretinger, *Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device*. J Hematother, 1999. **8**(2): p. 209-18.
137. Sentman, C.L., M.A. Barber, A. Barber, and T. Zhang, *NK cell receptors as tools in cancer immunotherapy*. Adv Cancer Res, 2006. **95**: p. 249-92.

138. Shimazaki, C., T. Sumikuma, and T. Inaba, *CD34+ CD90+ cells and late hematopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation*. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(4): p. 661-8.
139. Siena, S., M. Bregni, B. Brando, F. Ravagnani, G. Bonadonna, and A.M. Gianni, *Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. *Blood*, 1989. **74**(6): p. 1905-14.
140. Small, T.N., C.A. Keever, S. Weiner-Fedus, G. Heller, R.J. O'Reilly, and N. Flomenberg, *B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny*. *Blood*, 1990. **76**(8): p. 1647-56.
141. Snell, G.D., *Methods for the study of histocompatibility genes*. *J Genet*, 1948. **49**(2): p. 87-108.
142. Storek, J., M.A. Dawson, B. Storer, T. Stevens-Ayers, D.G. Maloney, K.A. Marr, R.P. Witherspoon, W. Bensinger, M.E. Flowers, P. Martin, R. Storb, F.R. Appelbaum, and M. Boeckh, *Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation*. *Blood*, 2001. **97**(11): p. 3380-9.
143. Tada, J., M. Omine, T. Suda, and N. Yamaguchi, *A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells*. *Blood*, 1999. **93**(11): p. 3723-35.
144. Thomas, E.D., *Kettering Award Lecture. The role of marrow transplantation in the eradication of malignant disease*. *Cancer*, 1982. **49**(10): p. 1963-9.
145. Thomas, E.D., C.D. Buckner, R.H. Rudolph, A. Fefer, R. Storb, P.E. Neiman, J.I. Bryant, R.L. Chard, R.A. Clift, R.B. Epstein, P.J. Fialkow, D.D. Funk, E.R. Giblett, K.G. Lerner, F.A. Reynolds, and S. Slichter, *Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs*. *Blood*, 1971. **38**(3): p. 267-87.
146. To, L.B., D.N. Haylock, P.J. Simmons, and C.A. Juttner, *The biology and clinical uses of blood stem cells*. *Blood*, 1997. **89**(7): p. 2233-58.
147. Tsutsumi, Y., J. Tanaka, Y. Miura, T. Toubai, N. Kato, F. Fujisaw, N. Toyoshima, S. Ota, A. Mori, M. Yonezumi, K. Chiba, T. Kondo, S. Hasino, R. Kobayashi, N. Masauji, M. Kasai, M. Asaka, and M. Imamura, *Molecular analysis of T-cell repertoire in patients with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(3): p. 481-8.
148. van den Beemd, R., P.P. Boor, E.G. van Lochem, W.C. Hop, A.W. Langerak, I.L. Wolvers-Tettero, H. Hooijkaas, and J.J. van Dongen, *Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls*. *Cytometry*, 2000. **40**(4): p. 336-45.
149. Velardi, A., L. Ruggeri, Alessandro, Moretta, and L. Moretta, *NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(9): p. 438-44.



150. Verfuëth, S., K. Peggs, P. Vyas, L. Barnett, R.J. O'Reilly, and S. Mackinnon, *Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire*. *Blood*, 2000. **95**(12): p. 3990-5.
151. Vitale, C., L. Chiossone, G. Morreale, E. Lanino, F. Cottalasso, S. Moretti, G. Dini, L. Moretta, and M.C. Mingari, *Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(2): p. 455-60.
152. Volpi, I., K. Perruccio, A. Tosti, M. Capanni, L. Ruggeri, S. Posati, F. Aversa, A. Tabilio, L. Romani, M.F. Martelli, and A. Velardi, *Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2514-21.
153. Waller, E.K., C.R. Giver, H. Rosenthal, J. Somani, A.A. Langston, S. Lonial, J.D. Roback, J.M. Li, M.S. Hossain, and I. Redei, *Facilitating T-cell immune reconstitution after haploidentical transplantation in adults*. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. **33**(3): p. 233-7.
154. Weaver, C.H., B. Hazelton, R. Birch, P. Palmer, C. Allen, L. Schwartzberg, and W. West, *An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy*. *Blood*, 1995. **86**(10): p. 3961-9.
155. Wu, C.J., A. Chillemi, E.P. Alyea, E. Orsini, D. Neuberg, R.J. Soiffer, and J. Ritz, *Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism*. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 352-9.
156. Zhao, X.Y., X.J. Huang, K.Y. Liu, L.P. Xu, and D.H. Liu, *Reconstitution of natural killer cell receptor repertoires after unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation: analyses of CD94:NKG2A and killer immunoglobulin-like receptor expression and their associations with clinical outcome*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. **13**(6): p. 734-44.
157. Ziegler, A., S. Lange, and R. Bender, *Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test - Artikel Nr. 17 der Statistik-Serie in der DMW Survival analysis: Log rank test*. Deutsche medizinische Wochenschrift; Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, 2004. **129**: p. T4-T6.