

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie  
(Direktorin: Prof. Dr. med. Claudia Baldus)  
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie  
(Leiter: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE LYMPHOZYTÄRE UND HUMORALE  
IMMUNREKONSTITUTION NACH ALLOGENER  
STAMMZELLTRANSPLANTATION**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anna-Sophie Hartjen

aus Kiel

Kiel 2019

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Andreas Günther

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med Roland Repp

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.12.2019

Gez. Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# I Inhalt

<b>I Inhalt</b> .....	<b>I</b>
<b>II Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>III Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>IV Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	1
1.1.1 Verfahren der Stammzelltransplantation .....	1
1.1.2 Quellen hämatopoetischer Stammzellen.....	1
1.1.3 HLA-Kompatibilität.....	3
1.2 Konditionierungsregime .....	4
1.2.1 Klassische Konditionierung .....	4
1.2.2 Dosisadaptierte Konditionierung .....	5
1.3 Transplantationsassoziierte immunologische Reaktionen .....	6
1.3.1 Graft-versus-Host Disease .....	6
1.3.2 Graft-versus-Leukämie Effekt.....	8
1.4 Infektionen.....	9
1.4.1 Cytomegalievirus .....	10
1.4.2 Epstein-Barr-Virus .....	10
1.5 Die Immunrestitution .....	12
1.5.1 Angeborene Immunantwort.....	13
1.5.2 Adaptive Immunantwort.....	14
1.6 Zielsetzung .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Patientenkollektiv .....	19
2.1.1. Alter und Geschlecht .....	19
2.1.2 Grunderkrankung .....	19
2.1.3 Stammzellquelle und Stammzelltransplantation.....	20
2.1.4 Konditionierungsregime.....	20

---

2.1.5 Prophylaxe der Graft-versus-Host Disease .....	22
2.2 Labormethoden .....	23
2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	23
2.2.2 Immunphänotypisierung .....	23
2.2.3 Quantitative Analyse der Immunglobuline .....	25
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1 Gesamtüberleben.....	27
3.2 Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation .....	28
3.3 Humorale Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation .....	31
3.4.1 Einfluss des Geschlechts des Empfängers .....	32
3.4.2 Einfluss des Alters des Empfängers.....	32
3.4.3 Einfluss der Grunderkrankung des Empfängers .....	36
3.5 Therapieassoziierte Einflussfaktoren auf die regelgerechte Immunrekonstitution .....	40
3.5.1 HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger.....	40
3.5.2 Konditionierungsregime.....	45
3.5.3 Donor-Lymphozyten-Infusionen .....	51
3.6 Verlaufsassoziierte Einflussfaktoren auf die regelgerechte Immunrekonstitution .....	52
3.6.1 GvHD.....	52
3.6.2 Infektionen.....	58
3.6.2 Monoklonale Gammopathien unklarer Signifikanz .....	63
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.1 Lymphozytäre und humorale Immunrekonstitution .....	72
4.2 Patientenassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution .....	74
4.2.1 Patientenalter .....	74
4.3 Therapieassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution .....	76
4.3.1 HLA-Kompatibilität.....	76
4.3.2 Konditionierungsregime.....	77
4.3.3 Donor-Lymphozyten Infusion .....	80
4.4 Verlaufsassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution .....	82
4.4.1 GvHD.....	82

---

4.4.2 Infektionen.....	84
4.4.3 Monoklonaler Gammopathien unklarer Signifikanz.....	85
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>V Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>VI Anhang .....</b>	<b>104</b>
6.1 Danksagung .....	104
<b>VII Veröffentlichungen .....</b>	<b>105</b>
<b>VIII Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>106</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	Acute Graft-versus-Host Disease
AL	Akute Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Allo HSCT	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
BM	Bone Marrow
BMT	Bone Marrow Transplantation
BMPC	Bone Marrow Plasmacells
Bu	Busulfan
CD	Cluster of differentiation
cGvHD	chronic Graft-versus-Host Disease
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CSA	Cyclosporin A
Cy	Cyclophosphamid
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
Eto	Etoposid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Flu	Fludarabin
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GvHD	Graft-versus-host Disease
GvL	Graft-versus-leukaemia
GvT	Graft-versus-tumor
Gy/cGy	Gray/centiGray
HLA	Human leukocyte antigen
HHV	Humanes Herpesvirus
HPE	periphere hemeostatic expansion
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IQR	Interquartilsabstand
KG	Körpergewicht

---

KIR	Killer-Immunglobulin Receptor
MAC	Myeloablative Chemotherapie
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mel	Melphalan
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
MRD	Minimal residual Disease
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NRM	Non relapse mortality = Nicht-Rückfall-Sterblichkeit
OAS	Overall Survival/ Gesamtüberleben
PBSC	Periphere Blutstammzelle
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
RIC	Reduced intensity conditioning
RT-PCR	Real-time-Polymerase chain reaction
SOP	Standard Operating Procedure
TBI	Total body irradiation/ Ganzkörperbestrahlung
Thio	Thiotepa
TRM	Therapy-related-mortality/ Therapieassoziierte Mortalität
Tx	Transplantation
µl	Mikroliter

### III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Opportunistische Infektionen nach HSCT .....	9
Abbildung 2: Die lymphozytäre Immunrekonstitution nach allo HSCT .....	13
Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens innerhalb des Patientenkollektivs	27
Abbildung 4: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener HSCT .....	28
Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Rekonstitution der CD8+ und CD4+ T-Zellen ..	29
Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Rekonstitution der NK- und B-Zellen .....	30
Abbildung 7: Humorale Immunrekonstitution nach allogener HSCT .....	31
Abbildung 8: Altersabhängige Entwicklung der CD8+ T- Lymphozyten im Verlauf .....	34
Abbildung 9: Altersabhängige Entwicklung der CD4+ T- Lymphozyten im Verlauf .....	35
Abbildung 10: Altersabhängige Entwicklung der NK-Zellen im Verlauf.....	35
Abbildung 11: Altersabhängige Entwicklung der B-Zellen im Verlauf .....	36
Abbildung 12: IgG in Abhängigkeit der Grunderkrankung im Verlauf nach allogener HSCT .	38
Abbildung 13: IgM in Abhängigkeit der Grunderkrankung im Verlauf nach allogener HSCT .	39
Abbildung 14: IgA in Abhängigkeit der Grunderkrankung im Verlauf nach allogener HSCT .	39
Abbildung 15: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution CD8+ T-Lymphozyten	42
Abbildung 16: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution CD4+ T-Lymphozyten	43
Abbildung 17: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution der NK-Zellen .....	43
Abbildung 18: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution der B-Zellen .....	44
Abbildung 19: IgG im Verlauf nach allogener HSCT nach differierender Konditionierung .....	46
Abbildung 20: IgM im Verlauf nach allogener HSCT nach differierender Konditionierung .....	47
Abbildung 21: IgA im Verlauf nach allogener HSCT nach differierender Konditionierung .....	47
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve des Patientenüberlebens nach dosisreduzierter und myeloablativer Konditionierung .....	48
Abbildung 23: Rekonstitution der CD8+ T-Lymphozyten nach T-Zell-Depletion.....	49
Abbildung 24: Rekonstitution der CD4+ T-Lymphozyten nach T-Zell-Depletion.....	50
Abbildung 25: Rekonstitution der NK-Zellen nach T-Zell-Depletion .....	50
Abbildung 26: Rekonstitution der B-Zellen nach T-Zell-Depletion .....	51
Abbildung 27: CD8+ T-Lymphozyten bei Patienten mit und ohne cGvHD .....	54
Abbildung 28: CD4+ T-Lymphozyten bei Patienten mit und ohne cGvHD .....	55
Abbildung 29: NK-Zellen bei Patienten mit und ohne cGvHD .....	55
Abbildung 30: B-Zellen bei Patienten mit und ohne cGvHD .....	56
Abbildung 31: IgG-Level von Patienten mit und ohne cGvHD .....	56
Abbildung 32: IgM-Level von Patienten mit und ohne cGvHD .....	57
Abbildung 33: IgA-Level von Patienten mit und ohne cGvHD.....	57
Abbildung 34: CD8+ T-Lymphozyten von Patienten mit und ohne CMV-Infektion .....	59



---

Abbildung 35: CD4+ T-Lymphozyten von Patienten mit und ohne CMV-Infektion .....	60
Abbildung 36: NK-Zellen von Patienten mit und ohne CMV-Infektion.....	60
Abbildung 37: B-Zellen von Patienten mit und ohne CMV-Infektion .....	61
Abbildung 38: IgG-Level von Patienten mit und ohne CMV-Infektion .....	61
Abbildung 39: IgM-Level von Patienten mit und ohne CMV-Infektion .....	62
Abbildung 40: IgA-Level von Patienten mit und ohne CMV-Infektion .....	62
Abbildung 41: Zeitliche Entwicklung der MGUS bei 18 Indexpatienten .....	63
Abbildung 42: CD8+ T-Lymphozyten bei Patienten mit und ohne MGUS .....	66
Abbildung 43: CD4+ T-Lymphozyten von Patienten mit und ohne MGUS .....	67
Abbildung 44: NK-Zellen von Patienten mit und ohne MGUS.....	67
Abbildung 45: B-Zellen von Patienten mit und ohne MGUS .....	68
Abbildung 46: IgG-Level von Patienten mit und ohne MGUS .....	68
Abbildung 47: IgM-Level von Patienten mit und ohne MGUS .....	69
Abbildung 48: IgA-Level von Patienten mit und ohne MGUS .....	69
Abbildung 49: Kaplan-Meier-Kurve des Patientenüberlebens bei Vorhandensein und Fehlen einer MGUS.....	71

## IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz.....	16
Tabelle 2: Absolute und relative Verteilung der Grunderkrankungen .....	19
Tabelle 3: Übersicht der Patientendaten.....	20
Tabelle 4: Konditionierungsregime.....	22
Tabelle 5: Angewandte Immunsuppressiva .....	23
Tabelle 6: Referenzbereich Immunstatus Erwachsene.....	25
Tabelle 7: Referenzwerte Immunglobuline.....	25
Tabelle 8: Altersabhängigkeit der lymphozytären Rekonstitution .....	33
Tabelle 9: Altersabhängigkeit der lymphozytären Rekonstitution .....	33
Tabelle 10: Einfluss des Alters auf die Immunrekonstitution nach allo HSCT .....	34
Tabelle 11: Lymphozytäre Rekonstitution und Grunderkrankung .....	37
Tabelle 12: Lymphozytäre Rekonstitution und Grunderkrankung .....	37
Tabelle 13: Einfluss der Grunderkrankung auf die Immunrekonstitution nach allogener HSCT .....	38
Tabelle 14: Lymphozytäre Rekonstitution und HLA-Kompatibilität .....	41
Tabelle 15: Lymphozytäre Rekonstitution und HLA-Kompatibilität .....	41
Tabelle 16: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Immunrekonstitution nach allogener HSCT .....	42
Tabelle 17: Immunrekonstitution bei HLA-match verwandt und unverwandt.....	44
Tabelle 18: Immunrekonstitution nach differierender Konditionierung .....	46
Tabelle 19: Einfluss der T-Zell-Depletion auf die Immunrekonstitution.....	49
Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung akuter und chronischer GvHD.....	52
Tabelle 21: Lymphozytäre Rekonstitution und cGvHD .....	53
Tabelle 22: Lymphozytäre Rekonstitution ohne stattgehabte cGvHD.....	53
Tabelle 23: Einfluss von cGvHD auf die Immunrekonstitution .....	54
Tabelle 24: Einfluss von CMV auf die Immunrekonstitution.....	59
Tabelle 25: Charakteristika von Patienten mit MGUS.....	64
Tabelle 26: Lymphozytäre Rekonstitution bei Patienten mit MGUS .....	65
Tabelle 27: Lymphozytäre Rekonstitution bei Patienten ohne MGUS .....	65
Tabelle 28: Einfluss von MGUS auf die Immunrekonstitution nach allo HSCT .....	66

# 1 Einleitung

## 1.1 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation

### 1.1.1 Verfahren der Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) bietet eine potentiell kurative Therapieoption in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen. Man unterscheidet zwischen autologer und allogener Stammzelltransplantation. Bei der Hochdosismethode mit anschließender autologer Stammzelltransplantation werden dem Patienten vor Therapie körpereigene Stammzellen entnommen und anschließend kryokonserviert. Zum Zeitpunkt der Entnahme befindet sich der Patient optimalerweise in vollständiger Remission. Nach erfolgter Konditionierungstherapie, die das Ziel der maximalen Tumorreduktion unter vorübergehender radikaler und vollständiger Eradikation des blutbildenden Systems durch Ausschöpfung der maximalen chemotherapeutischen Wirksamkeit hat, werden die zuvor gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen retransfundiert. Vorteil dieser Methode ist das Einbringen genetisch identischen Materials, wodurch eine geringere transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität bei schnellerer immunologischer Rekonstitution und geringerer immunologischer Komplikationsrate erzielt werden kann. Eine allogene Stammzelltransplantation (allo HSCT) wird vorwiegend bei malignen hämatologischen Erkrankungen wie akuten und chronischen Leukämien, malignen Lymphomen oder Erkrankungen aus dem myelodysplastischen oder myeloproliferativen Formkreis angewendet. Sie findet jedoch auch Einsatz in der Behandlung der aplastischen Anämie und hereditärer Erkrankungen wie der Thalassämie und Sichelzellanämie mit dem Absicht der Reetablierung eines funktionsfähigen blutbildenden Systems, nach erfolgloser autologer Stammzelltransplantation oder seltener in der Therapie solider Tumore (Seggewiss and Einsele, 2010). Bei der allogenen HSCT werden hämatopoetische Stammzellen von genetisch verwandten oder unverwandten gesunden Spendern übertragen. Auch hier folgt die Transplantation einer chemotherapeutischen Konditionierungstherapie des Empfängers, die bei diesem Verfahren allerdings neben dem obengenannten Ziel der Eradikation der Empfängerhämatopoese, auch der Vermeidung immunologischer Komplikationen dient.

### 1.1.2 Quellen hämatopoetischer Stammzellen

#### **Knochenmarkspende**

Allogene Stammzellen können durch sterile Punktion und Aspiration aus dem Knochenmarkraum der Spinae iliaca anterioris oder posterioris gewonnen werden. Bei der sogenannten Knochenmarkspende (BMT) werden dem Spender zur Gewinnung von circa  $3 - 4 \times 10^6$  kg

KG kernhaltigen Knochenmarkszellen in Vollnarkose üblicherweise 10 – 15 ml/kg KG Knochenmark (BM) aus dem Beckenkamm entnommen (Lisenko et al., 2016). Dies entspricht einem Volumen von 1000 bis 1200 ml Knochenmark.

### **Periphere Blutstammzellspende**

Die allogene HSCT basiert heute in einem Großteil der Fälle auf der Gewinnung peripherer Blutstammzellen (PBSC) im Rahmen der Leukaphrese. Ein Vorteil dieser Art der Stammzellgewinnung ist die geringere Invasivität sowie die ambulante Anwendbarkeit der Methode, was den Eingriff für Spender deutlich attraktiver macht. Zum anderen haben Studien im Vergleich zur Knochenmarkspende ein schnelleres Engraftment der Spenderhämatopoese, eine schnellere Immunrekonstitution und ein verbessertes Gesamtüberleben bei nicht verwandten HLA-identischen Empfängern ergeben. Letzteres wird vornehmlich auf das erhöhte Risiko von Transplantatabstoßungsreaktionen bei Knochenmarkspende zurückgeführt (Fowler and Gress, 2000, Holtick et al., 2014). Trotz der angeführten Vorteile der Blutstammzellspende bleibt die durch eine größere Anzahl vorhandener T-Lymphozyten im Transplantat vielfach erwähnte höhere Rate an chronischer Transplantat gegen Wirt-Krankheit / chronic Graft versus Host-Disease (cGvHD) im Vergleich zur BM-Spende ein Nebeneffekt dieser Methode (Champlin et al., 2000, Anasetti et al., 2012, Couban et al., 2002, Abrahamsen et al., 2005). Bei der PBSC-Spende wird durch die Verabreichung des Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktors (G-CSF), einem körpereigenen hämatopoetischen Wachstumsfaktor, die Stammzellproduktion des Spenders stimuliert. Die dabei entstandenen Stammzellen werden nach Stimulation vermehrt ins periphere Blut ausgeschwemmt und können mittels Leukaphrese aus dem Spenderblut separiert werden. Im Anschluss erfolgt die Übertragung der gewonnenen Stammzellen in den Blutkreislauf des Empfängers über einen zentralen Venenkatheter.

### **Nabelschnurblutspende**

Eine weitere Option ist die Gewinnung von Nabelschnurblut als Stammzellquelle für die allogene HSCT. Im direkten Anschluss an die Abnabelung des Neugeborenen vom maternalen Kreislauf können etwa 100 ml plazentaren Restbluts aus der Nabelschnurvene gewonnen werden. Mittels Kryokonservierung können die hierbei gewonnenen Stammzellen bis zum Zeitpunkt der Transplantation haltbar gemacht werden. Zwar enthält das Nabelschnurblut eine hohe Anzahl hämatopoetischer Stammzellen, aufgrund der geringen Menge an gewinnbarem Material bleibt diese Art der Stammzellquelle jedoch in der Regel Kindern bis zu einem Gewicht von 50 kg vorenthalten (Munoz et al., 2014, Schonberger et al., 2004, Cohen and Nagler, 2004). Da die Gewinnung von Stammzellen aus

Nabelschnurblut in dieser Studie keine Anwendung fand, wird auf eine weitere Betrachtung der Nabelschnurblutspende verzichtet.

### 1.1.3 HLA-Kompatibilität

Eine erfolgreiche Stammzelltransplantation hängt entscheidend von einer möglichst hohen immunologischen Gewebekompatibilität zwischen Spender und Empfänger ab. Die Auswahl eines Spenders für die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation konzentriert sich vorwiegend auf die Identifikation eines Spenders, der eine möglichst große Übereinstimmung bestimmter Genorte im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes mit dem Empfänger aufweist. Dieser Komplex, der für die sogenannten Major-Histocompatibility-Moleküle (MHC), beim Menschen auch als Humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet, kodiert, liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom Sechs (6p) und umfasst mehrere hundert proteinkodierende Bereiche. Diese bestimmen die immunologische Individualität jeder einzelnen Person und sind im Falle einer Transplantation für die Gewebeverträglichkeit verantwortlich (Warren and Deeg, 2013).

Bekannt sind bisher zwei Klassen von HLA-Molekülen. HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren Fragmente intrazellulär aufbereiteter, körpereigener Proteine. Sie interagieren auf diese Art insbesondere mit CD8+ T-Zellen. Zur Gruppe der HLA-Klasse-I-Moleküle gehören die Subgruppen HLA-A, HLA-B und HLA-C.

HLA-Klasse-II-Moleküle werden auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen exprimiert, zu welchen dendritische Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen zählen. Mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle werden nach Endo- beziehungsweise Phagozytose prozessierte körperfremde Proteine vor allem CD4+ T-Zellen präsentiert (Nash and Storb, 1996). Die Gruppe der HLA-II-Moleküle umfasst HLA-DRB1 und HLA-DQB1. Über den T-Zell-Rezeptor, der auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, kann das Immunsystem sowohl die MHC-Moleküle selbst als auch die durch sie präsentierten Antigene als körpereigen oder körperfremd erkennen. In Bezug auf die allogene Stammzelltransplantation kann dies zur Ausbildung einer Graft-versus-Host Disease (GvHD), einer Immunreaktion von Spenderlymphozyten gegen das Empfängergewebe, aber auch zur Host-versus-Graft Disease (Transplantatabstoßung) durch Reaktion von residualen Lymphozyten des Empfängerorganismus gegen Spenderzellen führen.

Die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger wird anhand obengenannter 10 (2x5) HLA-Moleküle bestimmt.

Eine Übereinstimmung in beiden Allelen aller 5 HLA-Genloci (10/10 Match) ist nach wie vor die favorisierte Spender-Empfänger-Konstellation. Durch die Weiterentwicklung therapeutischer Verfahren wie Optimierung von Konditionierungsregimen und Verbesserungen in der

GvHD-Prophylaxe sowie der Behandlung einer GvHD sind mittlerweile auch HLA-Mismatch Transplantationen wie 9/10-Match als auch Transplantationen mit mehr als einer Allelabweichung (8/10) und die haploidente (5/10) Transplantation möglich. Die Wahrscheinlichkeit eines Transplantatversagens, einer erhöhten TRM oder der Ausbildung einer akuten oder chronischen GvHD steigt dabei mit zunehmender HLA-Inkompatibilität (Petersdorf and Malkki, 2005, Cao et al., 2014).

Obwohl nach heutigem Wissensstand Unterschiede zwischen Spender und Empfänger im Bereich des MHC-Komplexes den bedeutendsten Risikofaktor für die Entwicklung einer GvHD ausmachen, kann eine GVHD auch bei HLA-identischer Transplantation auftreten. Grund dafür sind unter anderem sogenannte Minor Histocompatibility Antigene, auch Nebengewebeverträglichkeitsantigene genannt, die einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und das Ausmaß der GvHD bei ansonsten genetisch identischem MHC-Status ausüben (Warren et al., 2012).

## 1.2 Konditionierungsregime

Unter dem Begriff Konditionierung versteht man eine der Stammzelltransplantation vorangehende und vorbereitende Chemo- beziehungsweise Radiochemotherapie des Empfängers. Es wird zwischen klassischen myeloablativen Konditionierungstherapien (MAC) und dosisadaptierter Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC) unterschieden.

### 1.2.1 Klassische Konditionierung

Lange Zeit ging man davon aus, dass eine hochpotente myeloablative Chemotherapie in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung (TBI) und nachfolgender Stammzelltransplantation die einzige potente Konditionierungstherapie vor allogener HSCT darstellt. Die TBI hat einerseits zum Ziel, die meist höchst strahlensensiblen malignen Klone der zugrunde liegenden Erkrankung vollständig zu eliminieren. Andererseits soll in Kombination mit myeloablativen Substanzen das Knochenmark von Empfängerstammzellen befreit werden, sodass die Spenderzellen optimal anwachsen können. Immunsuppressiv wirksame Komponenten des jeweiligen Regimes sollen darüber hinaus einer Transplantatabstoßung entgegenwirken. Folge dieser hochgradig toxischen Therapie ist eine große Bandbreite therapieassoziiertes Komplikationen. In diesem Zusammenhang kann es zu direkt auftretenden Nebenwirkungen kommen, die von Mukositis, Nausea, Diarrhoe und Alopezie bis hin zu Lebervenenverschlusskrankheit reichen, andererseits ist mit Spätkomplikationen wie dem Sicca-Syndrom, Infertilität durch Azoospermie, chronischer Niereninsuffizienz sowie der Entstehung endokriner Komplikationen wie Hypothyreose und Diabetes mellitus zu rechnen (Mohty et al., 2014, Kersting et al., 2007, Tichelli et al., 1993, Baker et al., 2007). Das häufige Auftreten von Rezidiven führte in den achtziger Jahren zu probatorischen

Dosissteigerungen der Regime. Diese intensivierten Therapieversuche verminderten zwar die Rezidivwahrscheinlichkeit der Grunderkrankung, waren jedoch aufgrund der erhöhten Toxizität der Chemotherapeutika und Bestrahlung mit einer intolerablen therapieassoziierten Mortalität behaftet (Schleuning, 2000, Clift et al., 1990). Als myeloablativ wurde im Rahmen dieser Arbeit neben den klassischen myeloablativen Konditionierungsregimen mit Busulfan (Bu) /Cyclophosphamid (Cy) und der Bestrahlung mit 12Gy/Cy auch ein Regime mit einer Bestrahlungsdosis von 8Gy in Kombination mit Fludarabin aufgefasst. Diese Einteilung wurde vorgenommen, da eine Bestrahlung von 12 Gy für Patienten > 55 Jahren im Rahmen einer allogenen HSCT als zu toxisch gilt, sodass die gewählte Dosis für diese Gruppe als maximal gelten kann.

### **1.2.2 Dosisadaptierte Konditionierung**

Bedingt durch eine therapieassoziierte Morbidität und Mortalität von 10-50% bei Anwendung myeloablativer Regime war die allogene HSCT bis in die 1990er Jahre vorwiegend Patienten mit niedriger Komorbiditätsrate und einem Alter unter 55 Jahren vorbehalten. Demgegenüber stand die Tatsache, dass das mittlere Erkrankungsalter der Patienten, die einer Stammzelltransplantation zugeführt werden, zwischen 65 und 70 Jahren liegt.

Das Bestreben die allogene Stammzelltransplantation auch älteren und multimorbiden Patienten zugänglich zu machen, führte zur Entwicklung neuer Konditionierungsregime mit verminderter Intensität (RIC). Diese wirken durch geringere Strahlen- und Chemotherapieintensität als die bisher angewandte aggressive myeloablative Chemotherapie (MAC) zwar weiterhin toxisch auf Tumor und Stammzellen, weisen jedoch durch die geringere Dosierung toxischer Substrate eine deutlich bessere Verträglichkeit im Vergleich zu klassischen Konditionierungsregimen auf (Bacigalupo, 2002). Durch die geringere Toxizität der RIC-Protokolle wird hierbei auf die vollständige Eradikation der Hämatopoese des Empfängers verzichtet und ein verstärkt immunsuppressiver Ansatz gegen das Immunsystem des Empfängers verfolgt, der das Anwachsen der Spenderzellen ermöglicht. So kann auch bei diesem Therapieregime ein den MAC-Protokollen gleichwertiges vollständiges Engraftment der Spender-Stammzellen erreicht werden. Der zugrundeliegende Ansatz ist hierbei die Zytoreduktion der Tumormasse durch den mittels alloreaktiver Spenderlymphozyten induzierten Graft-versus-Leukämie-Effekts (GvL) (Jimenez et al., 2007, Schleuning, 2000). In Anlehnung an Ergebnisse der European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT) von 2015 werden vier Hauptregime unterscheiden, welche die reduzierten Konditionierungen einteilen. Diese basieren entweder auf einer Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gy oder der Therapie mit Busulfan 8-16 mg/kg KG, Cyclophosphamid 120mg/kg KG oder Melphalan 100-160 mg/m<sup>2</sup> KOF und werden meist in Kombination mit Fludarabin 120-150 mg/m<sup>2</sup> KOF verabreicht (Bacigalupo, 2002,

Sengsayadeth et al., 2015, Bacigalupo et al., 2009). In der hier dargestellten Arbeit werden auch intermediäre Konditionierungsregime mit immunsuppressiver und antineoplastischer Wirkung als dosisreduziert betrachtet, da sie trotz myeloablativer Wirkung eine deutlich geringere Toxizität aufweisen als die maximal dosierten Standardprotokolle. Hierunter fallen Protokolle mit den Komponenten BCNU, Thiopeta und Treosulfan. Die *in vivo* T-Zell Depletion ist ein mittlerweile etabliertes Verfahren bei allogener Stammzelltransplantation und wird ergänzend zu den unterschiedlichen RIC-Protokollen eingesetzt, um den therapieassoziierten Komplikationen der akuten oder chronischen GvHD entgegenzuwirken. Verwendung finden hier insbesondere Alemtuzumab (Campath), ein humanisierter CD52-Antikörper, der über eine Kombination Komplement-abhängiger Zellyse und Antikörpervermittelter zellulärer Zytotoxizität wirkt (Lowenstein et al., 2006, Dyer et al., 1989) sowie Antithymozytenglobulin (ATG). ATG ist ein polyklonales IgG-Antikörpergemisch aus Kaninchen- oder Pferdeserum, welches mit humanen Thymozyten oder humanen T-Zellen immunisiert wurde. Gemeinsam mit der Konditionierungstherapie infundiert, reduzieren sowohl Alemtuzumab als auch ATG die Prävalenz und Intensität von akuter als auch chronischer GvHD (Storek et al., 2014, Mackall et al., 2009). Neben den unterschiedlichen Konditionierungsprotokollen, der konventionellen myeloablativen Konditionierung (MAC) versus der Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC), bilden unter anderem jedoch auch Stammzellquelle, das Maß an Übereinstimmung bestimmter Gewebeverträglichkeitsmerkmale zwischen Spender und Empfänger und Alter von Spender und Empfänger entscheidende Einflussfaktoren auf die Immunrestitution des Patienten.

## **1.3 Transplantationsassoziierte immunologische Reaktionen**

### **1.3.1 Graft-versus-Host Disease**

Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist nach wie vor Hauptursache für Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation (Pagliaro et al 2001, Margolis et al. 2000). Bedingt wird die Entwicklung einer GvHD durch genetische Unterschiede zwischen Spender und Empfänger. Auf zellulärer Ebene wird die GvHD, nach heutigem Wissensstand, durch im Transplantat vorhandene T-Lymphozyten des Spenders vermittelt (Fuchs, 2012, Loschi et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass der Entstehung einer GvHD dabei sowohl bei HLA-identischen als auch -differenten Spender-Empfänger-Paaren durch Applikation einer GvHD-Prophylaxe *post transplantationem* entgegengewirkt werden kann. Mittel der Wahl ist zum aktuellen Zeitpunkt die Kombination aus Cyclosporin A (CSA) und Tacrolimus oder Methotrexat (MTX), wobei CSA und Mycophenolatmofetil (MMF) oder CSA allein ebenfalls routinemäßig eingesetzt werden (Bacigalupo, 2004). Ergänzend zur GvHD-Prophylaxe hat sich die Verwendung T-Zell-depletierter Transplantate in der Prävention der



GvHD als therapeutisch wirksam erwiesen. Eine Limitation widerfuhr dieser Methode jedoch dadurch, dass Empfänger dieser T-Zell-depletierten Spenden eine erhöhte Rate an Transplantatabstoßung und Rezidiven aufwiesen (Fowler and Gress, 2000, Naparstek et al., 1999). Neuere Ansätze konzentrieren sich auf die selektive Depletion CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen. Die Beobachtung, dass eine selektive CD8-Depletion bei gleich bleibender Rezidivrate zu einer geringeren Inzidenz an GvHD führt, weist dabei stark darauf hin, dass die GvH-Effektorzellen insbesondere aus CD8 positiven Lymphozytensubpopulationen bestehen und den GvL-Effekt unangetastet lassen (Nimer et al., 1994, Alyea et al., 1998, Champlin et al., 1990). Da sich jedoch, je nach Studie, weiterhin in bis zu 50% der Fälle nach Stammzelltransplantation eine GvHD entwickelt, sind weitere Forschungsbemühungen nötig, um zu zeigen, ob die CD8-Depletion tatsächlich Überlebensvorteile für die Patienten erbringt. Ein weiterer Zweig moderner Zelltherapie befasst sich damit, mittels genetisch manipulierter Donor-T-Lymphozyten den GvL-Effekt und die Immunrekonstitution nach allogener HSCT zu stärken und gleichzeitig die Auftretenshäufigkeit von GvHD zu verringern. Hierbei sollen die infundierten T-Zellen durch vorherige Einschleusung sogenannter Suizid-Gene im Falle des Auftretens einer GvHD *in vivo* selektiv medikamentös kontrollierbar gemacht werden (Greco et al., 2015). Neuere Studien legen nahe, dass auch den B-Zellen eine potentiell entscheidende Rolle in der Pathogenese der cGvHD zukommt. In diesem Zusammenhang scheinen insbesondere die verstärkte Aktivierung der B-Zellen über den B-Zell aktivierenden Faktor (BAFF) sowie Signaltransduktionswege über den B-Zell-Rezeptor (BCR) wichtig zu sein (Sarantopoulos and Ritz, 2015). CD27-CD11b<sup>+</sup> NK-Zellen wird im Kontext der allogenen HSCT hingegen sowohl eine Relevanz in Bezug auf die Verstärkung von GvL-Mechanismen als auch für die Abmilderung der cGvHD zugeschrieben; die Verstärkung des GvL-Effektes erfolgt dabei über zytotoxische Aktivität der NK-Zellen, wohingegen über Inaktivierung und Proliferationshemmung von Empfänger T-Zellen sowie über immunregulatorische, entzündungshemmende Mechanismen in peripheren Gewebeverbänden GvHD-Effekte abgeschwächt werden (Meinhardt et al., 2015, Cruz and Bollard, 2015). Zeitlich unterscheidet man die akute (aGvHD) von der chronischen GvHD (cGvHD). Definitionsgemäß entsteht eine aGvHD innerhalb der ersten 100 Tage der hämatologischen Rekonstitution, von cGvHD spricht man ab Tag 100 nach HSCT. Die chronische GvHD kann progressiv aus einer akuten Form entstehen, sich nach einem freien Intervall im Anschluss an eine akute GvHD anschließen oder auch *de novo* ohne vorausgegangene akute GvHD einsetzen (Gaziev et al., 2000). Klinisch ähnelt die GvHD einer Autoimmunerkrankung und kann verschiedene Organsysteme, insbesondere jedoch Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt, betreffen. Die akute GvHD wird entsprechend der Seattle Kriterien (Thomas et al., 1975, Glucksberg et al., 1974) in vier Schweregrade eingeteilt, während bei der chronischen

GvHD nach Shulman limitierte und extensive Form unterschieden werden (Shulman et al., 1980).

### 1.3.2 Graft-versus-Leukämie Effekt

Der Graft-versus-Leukämie (GvL) Effekt beschreibt den positiven Einfluss alloreaktiver T-Lymphozyten auf den klinischen Verlauf der Patienten nach allogener HSCT und ist eng mit der GvHD assoziiert. Hierbei richten sich, ähnlich wie bei der GvHD, Spender-T-Lymphozyten gegen Empfängergewebe, wobei im Gegensatz zur GvHD nicht das gesunde Empfängergewebe, sondern vielmehr residuale Tumorzellen adressiert werden. Dies resultiert in einer geringeren Abstoßungshäufigkeit des Transplantats und einer reduzierten Rezidivrate nach allogener Stammzelltransplantation. Der GvL-Effekt ist zudem eng assoziiert mit dem Auftreten und dem Ausprägungsgrad der GvHD (Gratwohl et al., 2002). Diese zusammenhängenden T-Zell-Effekte voneinander zu entkoppeln, den GvL-Effekt zu verstärken, ohne die Auftretenswahrscheinlichkeit der GvHD zu erhöhen, ist Ziel aktueller Forschungsbemühungen. Die Infusion von Spenderlymphozyten (DLI) *post transplantatio-nem* hat sich dabei als erfolgversprechend herausgestellt, obgleich diese Methode einigen therapeutischen Einschränkungen unterliegt. Zwar wird durch den Einsatz von DLI der GvL-Effekt verstärkt, jedoch führt dies auch zu einem gehäuften Auftreten von GvHD. Obwohl die durch DLI ausgelöste GvHD meist milder abläuft als jene direkt nach allogener HSCT, verbietet sich der Einsatz der DLI daher dennoch bei Patienten mit schwerer GvHD und verbleibt ohne Effekt bei Patienten, die überhaupt keine GvHD entwickeln (Bacigalupo, 2004). Eine weitere wichtige Rolle im Rahmen der zukunftsorientierten modernen Zelltherapie kommt dem NK-Zell-vermitteltem GvL-Effekt zu. Hier zielen aktuelle Forschungsbemühungen insbesondere auf die therapeutische Manipulation Killer Immunoglobulin Receptor (KIR)-Ligand-vermittelter Antitumoreffekte der NK-Zellen sowie auf *ex vivo* Expansion der NK-Zellen im Transplantat ab (Cruz and Bollard, 2015).

### 1.4 Infektionen

Zu den wichtigsten Komplikationen nach HSCT zählen neben Rezidiven, der GvHD, sekundären malignen Erkrankungen und behandlungsassoziierten Organschäden, Autoimmunprozesse wie Myasthenia gravis, Hashimoto-Thyreoiditis, IgE-vermittelten Soforttypallergien und vor allem Infektionen (Bosch et al., 2012, Smith et al., 1983, Storek et al., 2011). Letztere werden insbesondere durch die sich der Transplantation direkt anschließende aplastische Phase, einer Phase der absoluten Neutropenie, sowie Störungen der mukosalen Barrierefunktion bedingt. Darüber hinaus zeichnen sich die ersten 100 Tage nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation durch einen Mangel an Vertretern der angeborenen Immunität wie natürlichen Killerzellen (NK) sowie einem Mangel an Vertretern der erworbenen Immunität wie spezifischen T-Lymphozyten aus. Während der ersten 100 Tage nach HSCT sind die Patienten daher insbesondere anfällig für bakterielle Infekte sowie Virus- und Pilzinfektionen (Seggewiss et Einsele, 2010). Ferner erhöhen auch iatrogene Faktoren wie die Behandlung mit Antibiotika und Immunsuppressiva und Störungen der Immunrekonstitution - beispielsweise im Rahmen einer GvHD - das Risiko infektionsbedingter Komplikationen.

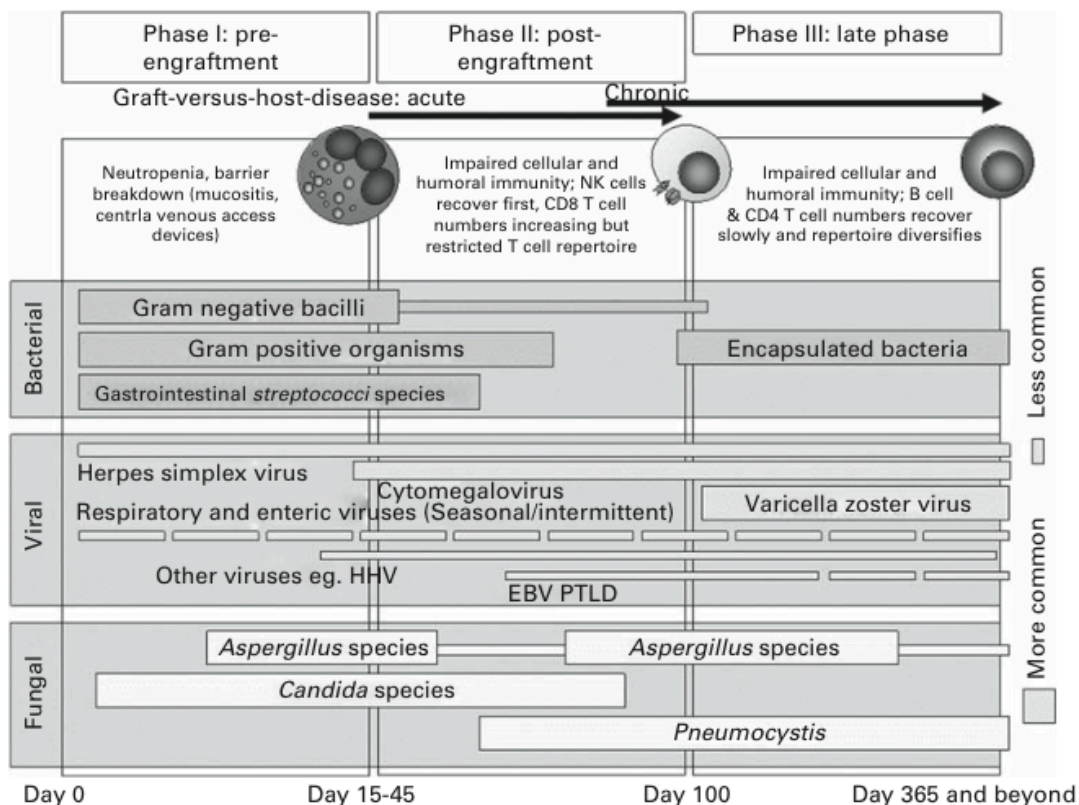


Abbildung 1: Opportunistische Infektionen nach HSCT  
 Dargestellt im zeitlichen Verlauf (Mackall et al., 2009)

### 1.4.1 Cytomegalievirus

Die Infektion mit dem zur Familie der Herpesviren gehörenden Cytomegalievirus (CMV), beziehungsweise die Reaktivierung latenter Infektionen mit diesem, stellt eine häufige frühe Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation dar. Die Infektionsraten in der Allgemeinbevölkerung reichen abhängig von der Region und vom sozioökonomischen Status von 40 bis über 90%. Während sowohl die akute als auch die latente Infektion bei immunkompetenten Personen eine gute Prognose besitzt, kann sie bei Immunkompromittierten zu schwerwiegenden Komplikationen führen (Sylwester et al., 2005, Sinclair, 2008). Klinisch äußert sich die Infektion durch Krankheitsbilder wie Hepatitis, interstitielle Pneumonie oder Enteritis, seltener Retinitis oder Adrenitis; andererseits prädisponiert sie für eine nachfolgende Superinfektion mit Bakterien oder Pilzen. Der CMV-Serostatus von Spender und Empfänger bleibt hierbei nach wie vor der wichtigste prädiktive Faktor in Bezug auf eine spätere CMV-Reaktivierung nach allogener HSCT (George et al., 2010, Ljungman, 2014). CMV-Seropositivität bleibt vor diesem Hintergrund ein entscheidender Risikofaktor für die transplantatbedingte Mortalität (TRM). Seropositive Empfänger, die eine Stammzellspende von seropositiven Spendern (D+/R+) empfangen, weisen hier bessere Überlebensdaten und eine geringere TRM auf als seropositive Patienten, die eine Spende von seronegativen Spendern (D-/R+) erhalten. Dieser Zusammenhang wird durch den fehlenden Transfer CMV-spezifischer Spender T-Lymphozyten über das Transplantat erklärt (Seggewiss and Einsele, 2010). CMV kann ebenso von einem seropositiven Spender auf einen seronegativen Empfänger (D+/R-) übertragen werden. Auch diese Transmission hat eine vergleichsweise schlechte Prognose und schlägt sich in einem verminderten Gesamtüberleben und höheren intermediären Risiken nieder (Nichols et al., 2002, Pergam et al., 2012). In dieser Konstellation spielt insbesondere der immunsuppressive Effekt einer Primärinfektion mit dem Virus auf das nach allogener HSCT geschwächte Immunsystem des Empfängers eine entscheidende Rolle (Ljungman, 2014). Klinische Studien haben gezeigt, dass eine erniedrigte Anzahl an NK-Zellen darüber hinaus eine *de novo* Infektion mit CMV oder eine Reaktivierung dieser sowie die Entstehung einer chronischen GvHD begünstigt (Kheav et al., 2014, Orange, 2002, Biron et al., 1989).

### 1.4.2 Epstein-Barr-Virus

Die lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (PTLD) ist eine seltene, jedoch äußerst bedrohliche Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation und eng assoziiert mit der Reaktivierung einer latenten Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), seltener einer EBV - Neuinfektion. Sie stellt ein Spektrum benigner bis maligner lymphoproliferativer Erkrankungen dar, die vorwiegend durch Infektion von B-Lymphozyten mit EBV hervorgeru-

fen werden. Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine EBV-Reaktivierung des Empfängerorganismus besteht bei Seronegativität des Empfängers für EBV, *in vivo* und *in vitro* T-Zell-Depletion, *Antithymocyte Globulin* (ATG)-haltiger immunsuppressiver Therapie zur Prophylaxe oder Behandlung von Transplantatabstoßung, HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger, ausgeprägter chronischer GvHD und bestehender CMV-Infektion. Weiterhin nimmt die Art der Stammzellquelle Einfluss auf die EBV-Reaktivierung (Catalan and Alba, 2012, Weinstock et al., 2006).

Die antivirale Therapie mit Aciclovir, Ganciclovir, Foscavir und Cidofovir hat sich als Monotherapie in der Behandlung der PTLD als nicht erfolgreich erwiesen. Aciclovir und Ganciclovir wirken als Prodrugs und müssen zur Erlangung ihrer DNA-schädigenden Wirkung durch die virale Thymidinkinase, im Falle von Ganciclovir zusätzlich durch Thymidin-unabhängige Kinasen der CMV-infizierten Zellen in ihre biologisch aktive Form überführt werden; sie sind in ihrer therapeutischen Wirkung folglich direkt abhängig vom lytischen Zyklus des Virus. Die Tatsache, dass latent infizierte B-Lymphozyten keine viralen Proteine exprimieren (Babcock et al., 1998, Decker et al., 1996) erklärt, dass diese Medikamente in der Behandlung der PTLD meist unwirksam sind. Eine bessere Wirksamkeit besitzen in diesem Zusammenhang Foscavir und Cidofovir, da diese die Virus-DNA direkt schädigen. In Kombination mit einer Reduzierung der Immunsuppression als anerkannte First-Line-Therapie finden die besagten antiviralen Medikamente jedoch weiterhin bedingt Anwendung und werden vor Übergang des Virus in die Latenzphase eingesetzt.

Da die Mehrzahl der PTLD durch Infektion von B-Zellen durch das Epstein-Barr-Virus ausgelöst wird, zielen Therapiestrategien auf die Depletion infizierter B-Lymphozyten ab. Ein weitreichender therapeutischer Fortschritt in der Behandlung der EBV-assoziierten PTLD bei stammzelltransplantierten Patienten konnte durch den Einsatz des humanisierten monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab (Mabthera) erreicht werden. Rituximab induziert eine selektive Depletion CD20-positiver B-Zell Subpopulationen, die das CD20-Antigen auf ihrer Zelloberfläche tragen (Tanaka et al., 2014). Zusätzlich zur Therapie mit Rituximab birgt die Kontrolle der EBV-Last im peripheren Blut mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) die Möglichkeit, das Risiko der Entwicklung einer PTLD im Voraus abzuschätzen und durch Einsatz von Rituximab präemptiv tätig zu werden.

## 1.5 Die Immunrekonstitution

Eine erfolgreiche Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation zeigt sich klinisch durch ein vermindertes Auftreten von Infektionen, geringere Rezidivraten und niedrigere Raten sekundär maligner Erkrankungen (Bosch et al., 2012). Der Wiederaufbau eines funktionsfähigen Immunsystems wird dabei durch verschiedenste Faktoren wie der Altersinvolution des Thymus und dem Patientenalter, das angewandte Therapieregime, HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger und transplantationsassoziierten Komplikationen wie Infektionen und GvHD und deren Behandlung beeinflusst (Perales and van den Brink, 2012). Die Entfernung differenzierter Blut- und Knochenmarkzellen aus dem Transplantat führt darüber hinaus zu einer verstärkten Immundefizienz des Empfängerorganismus, was diesen weiter für pathogene Infektionen anfällig macht (Shizuru et al., 2005). Die Infusion differenzierter Spenderlymphozyten (DLI) hingegen, die Verabreichung Granulozyten-stimulierender Faktoren (G-CSF) sowie die routinemäßig angestrebte Impfung der Patienten gegen Pneumokokken wirken dieser Immundefizienz entgegen.

Etwa zehn bis zwanzig Tage nach erfolgter Stammzelltransplantation sind die Spenderzellen im Empfänger Knochenmark angewachsen und beginnen mit der Blutbildung; man spricht vom sogenannten zellulären Engraftment. Der Nadir, die maximale Verminderung der Lymphozyten respektive neutrophilen Granulozyten des Empfängers, wird abhängig vom angewandten Konditionierungsregime zu verschiedenen Zeiten und in unterschiedlicher Ausprägung erreicht. Nach myeloablativer Konditionierung wird hier eine vollständige Eradikation der Empfängerlymphopoese erreicht, während aufgrund der geringeren Toxizität dosisreduzierter Konditionierungsregime Leukozyten und neutrophile Granulozyten im Empfängerorganismus persistieren können. Die Rekonstitution der verschiedenen Zellreihen erfolgt charakteristischerweise in unterschiedlicher zeitlicher Abfolge (vgl. Abb. 2). Der Konditionierungstherapie folgt die aplastische Phase, eine Phase der absoluten Neutropenie, definiert als  $<500$  neutrophile Granulozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, bis erneut neutrophile Granulozyten im peripheren Blut nachweisbar sind. Die ersten 3 Monate nach allogener HSCT zeichnen sich darüber hinaus durch einen Mangel an zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen sowie einem Mangel an spezifischen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten aus (Seggewiss et Einsele, 2010). Im Gegensatz zu den anderen hämatopoetischen Zelllinien, welche sich typischerweise in den ersten Wochen nach HSCT erholen, ist die Regeneration der Lymphozyten ein oft langwieriger Prozess. Die Wiedererlangung einer suffizienten Immunkompetenz benötigt einige Monate; nicht wenige Patienten verbleiben noch Jahre nach HSCT immundefizient (Mackall et al., 2009). Verallgemeinernd lässt sich feststellen, dass NK-Zellen die erste Lymphozytenpopulation ausmachen, die sich erholt. Gefolgt wird die NK-Zell-Rekonstitution nach bisheriger Kenntnis von der Erholung der CD8-positiven T-

Zellen, die innerhalb von zwei bis acht Monaten nach Transplantation häufig sogar erhöhte Zellkonzentrationen erreichen. Als letzte Zellreihen erholen sich die B-Lymphozyten und schließlich die CD4-positive T-Lymphozyten (Storek, 2008, Bosch et al., 2012, Geddes and Storek, 2007). Die nähergehende Betrachtung der phasenhaften Rekonstitution des Immunsystems unter Berücksichtigung ihrer Einflussfaktoren wie dem Empfängeralter, der Spenderselektion, dem Effekt unterschiedlicher therapeutischer Interventionen oder dem Auftreten verlaufsassoziierter Komplikationen wie GvHD und Virusinfektionen ist in diesem Kontext von großer Bedeutung. Die detaillierte Analyse der Rekonstitution der einzelnen lymphozytären Zelllinien unter Berücksichtigung verschiedener patienten-, therapie- und verlaufsassoziierter Faktoren soll vor diesem Hintergrund Gegenstand dieser Arbeit sein.

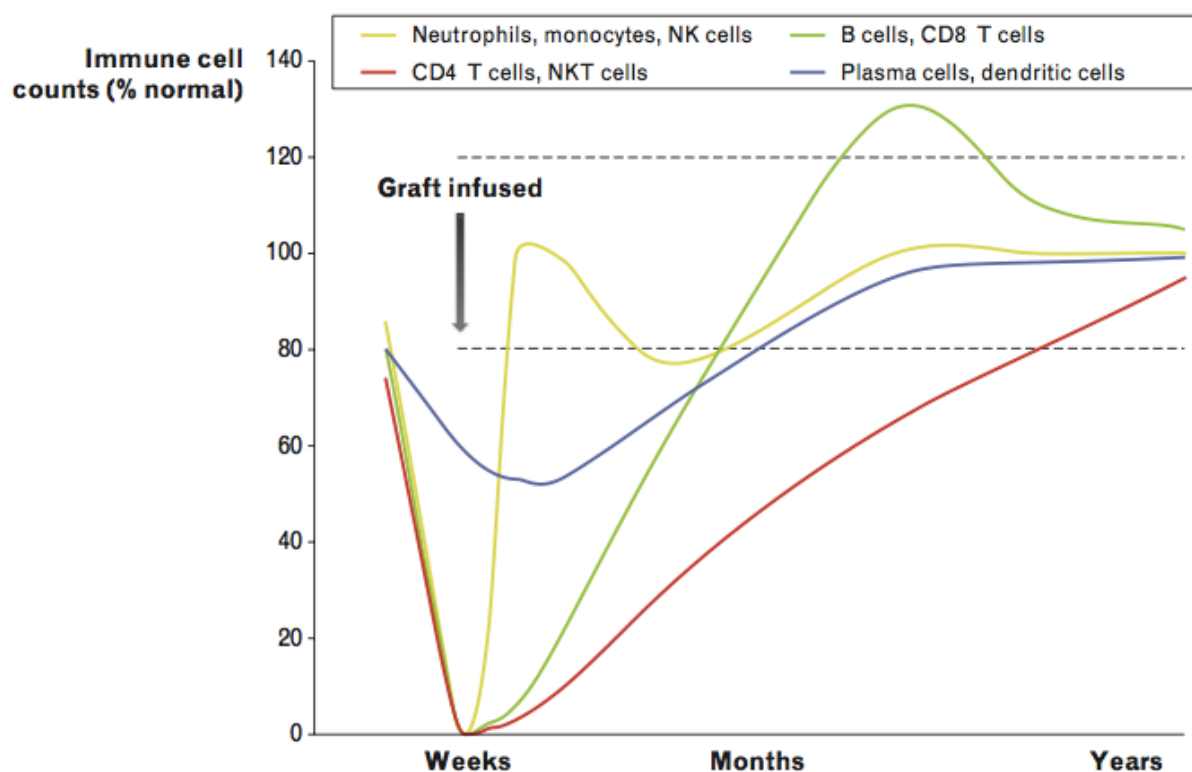


Abbildung 2: Die lymphozytäre Immunrekonstitution nach allo HSCT

Im Vergleich während und nach myeloablativer hämatopoetischer Stammzelltransplantation (Storek, 2008). Im Falle nicht-myeloablativer Konditionierung liegt der Nadir, die maximale Reduktion der Lymphozyten bzw. neutrophilen Granulozyten, aufgrund der Persistenz von Empfänger-Lymphozyten höher und wird gegenüber dieser Darstellung zeitlich verzögert erreicht.

### 1.5.1 Angeborene Immunantwort

#### Neutrophile Granulozyten

Die Erholung der Granulopoese erfolgt circa 14 Tage nach peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSCT), circa 21 Tage nach Knochenmarktransplantation (BMT) und circa 30 Tage nach Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (UCBT) (Storek, 2008). Bei Anwendung myeloablativer Konditionierungstherapie wird während dieser Phase der

immunologischen Rekonstitution gleichzeitig die Mucosa des Gastrointestinaltrakts geschädigt und so der Nährboden für die Ansiedelung pathogener Keime bereitet. Die sich der Transplantation direkt anschließenden infektiösen Komplikationen präsentieren sich in diesem Zusammenhang als febrile Neutropenie und werden in ihrer Intensität bestimmt durch die Dauer und Ausprägung der Neutropenie und die Stärke der mukosalen Schädigung (Mackall et al., 2009).

### **Natürliche Killerzellen**

Die Zellreihe der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erholt sich nach HSCT am schnellsten und erreicht etwa 1-2 Monate nach Transplantation ein normales Niveau. Erstaunlicherweise scheint ihre Erholung nicht wie die der übrigen Zellreihen von Patientenalter, GvHD oder der Anzahl der im Allograft enthaltenen Spender- NK-Zellen beeinflusst zu werden (M.Bosch et al., 2012). Biron *et al.* haben beschrieben, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Herpesviren zukommt (Biron et al., 1989). In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass die Erholung der NK-Zellreihe bei CMV - Seropositivität nach Transplantation schneller erfolgt als bei seronegativen Patienten; zudem übt die im Allograft enthaltene Menge an NK-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die NK-Zell-Rekonstitution aus (Storek, 2008).

## **1.5.2 Adaptive Immunantwort**

### **T-Lymphozyten**

Die T-Zell-Rekonstitution folgt zwei unterschiedlichen Wegen. Sie beruht zunächst auf der peripheren Expansion von T-Gedächtniszellen, der ‚homöostatischen peripheren Proliferation‘ (HPE), bevor es zeitverzögert zur Produktion von naiven T-Zellen im Knochenmark und der Ausreifung T-cell Receptor excision circle (TREC) enthaltenden T-Zellen im Thymus kommt. Studien stellten fest, dass die Thymusfunktion bei gesunden erwachsenen Personen bis zum sechzigsten Lebensjahr erhalten bleibt. Die TREC-Höhe der CD4+ und CD8+ T-Zellen ist allerdings mit zunehmendem Alter rückläufig. Dies ist vermutlich auf eine physiologische Atrophie des thymopoetischen Epithels zurückzuführen, welche eine verminderte Produktionskapazität des Thymusepithels bei Patienten jenseits des sechzigsten Lebensjahres nach sich zieht (Jimenez et al., 2007). Die altersbedingt verzögerte Immunrekonstitution betrifft insbesondere CD4+ T-Zellen, die sich später erholen als CD8+ T-Zellen, da ihre Bildung stärker auf der Produktion im Thymusgewebe beruht. Die frühe CD4+-Zellzahl wird einerseits stark durch die im Allograft enthaltenen Spender-CD4+-Zellen, andererseits durch die Intensität des nach Transplantation angewandten Therapieregimes beeinflusst. Patienten mit schwerer GvHD zeigen eine verzögerte Immunrekonstitution der T-Zelllinie. Zurückzuführen ist dies vermutlich sowohl auf eine



Beeinflussung der HPE als auch der Thymopoese, welche zum einen durch die GvHD selbst, zum anderen durch ihre Behandlung beeinflusst werden (Storek, 2008). Aus bisher unbekanntem Gründen ist die periphere Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich effektiver als die der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, was zu einer umgekehrten Relation des CD4/CD8 - Quotienten führt. So kommt es häufig innerhalb von 6 Monaten zu einer Erholung der CD8<sup>+</sup> T-Zellreihe, wobei eine Assoziation mit der Immunantwort auf Infektionen durch Herpesviren wie CMV und EBV spekuliert wird. Bisweilen führt dies sogar zu einer vorübergehend überschießenden CD8<sup>+</sup> T-Zellproduktion, während die Erholung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mindestens ein Jahr beträgt (Bosch et al., 2012). Häufig verbleibt die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten jedoch dauerhaft unter Normalniveau. Die vorliegende Arbeit soll bezüglich der lymphozytären Rekonstitution Aufschlüsse über den zeitlichen Verlauf der zellulären Rekonstitution geben und gleichzeitig Faktoren offenlegen, welche mit einer vollständigen immunologischen Erholung interferieren.

### **B-Lymphozyten**

Die B-Zell-Rekonstitution nach allogener HSCT folgt der ontogenetischen Entwicklung der Lymphopoese (Geddes and Storek, 2007, Storek et al., 1993). B-Lymphozyten gehen, ähnlich wie NK-Zellen, aus lymphoiden Progenitorzellen im Knochenmark hervor und durchlaufen dort eine negative Selektion, bevor sie als primitive B-Zell Subpopulationen ins periphere Blut ausgeschwemmt werden. Die naiven B-Lymphozyten weisen die durch somatische Rekombination erworbenen Oberflächenantigene IgM und IgD auf. Sie reifen anschließend in den sekundären lymphatischen Organen aus. Nach HSCT sind die B-Zell-Zahlen innerhalb der ersten Monate deutlich erniedrigt und erlangen erst nach 1 bis 2 Jahren das Niveau eines normalen Erwachsenen (Williams and Gress, 2008, Bosch et al., 2012). Die Ausreifung der B-Zellen ist in diesem Zusammenhang in hohem Maße auf ein intaktes spezialisiertes Knochenmarkmilieu angewiesen, welches sehr sensibel auf äußere Einflüsse reagiert. Dieses sogenannte Mikromilieu wird insbesondere durch stromale Zellen wie Fibroblasten, Makrophagen, Adipozyten und Endothelzellen gebildet, die über die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren das Anwachsen der transplantierten Stammzellen ermöglichen. Hier spielen im Hinblick auf die Immunrekonstitution Einflussfaktoren wie Therapieregime und toxische Einflüsse einer möglichen GvHD sowie ihrer Behandlung eine entscheidende Rolle. Während B-Zellen innerhalb von 4 Wochen erneut im peripheren Blut nachweisbar sind, verbleibt ihre Funktion gemessen am Gesamtimmunglobulinlevel im Serum über Monate eingeschränkt. Darüber hinaus haben in den letzten Jahren mehrere Studien über das Auftreten transienter monoklonaler und oligoklonaler Gammopathien nach allogener Stammzelltransplantation sowohl unter myeloablativen als auch unter Konditionierungsregimen mit reduzierter Intensität berichtet (Mitus et al., 1989, Sherer and Shoenfeld, 1998, Lim et al., 2007). Diese sogenannten monoklonalen Gammopathien

unklarer Signifikanz (MGUS) entstehen durch lymphoproliferative Vermehrung eines Plasmazellklons mit entsprechender Produktion eines homologen, monoklonalen Immunglobulins (M-Protein, Paraprotein) oder seiner Leichtketten (Kyle, 1978). Per definitionem besteht eine MGUS bei einer Serum M-Protein Konzentration von  $<3$  g/dl und  $<10\%$  Plasmazellen im Knochenmark (BMPC) ohne Auftreten von Symptomen und Organ- oder Gewebeteilung, die der monoklonalen Gammopathie ursächlich zuzuschreiben sind (Blade et al., 2010a). In der vorliegenden Arbeit werden neben monoklonalen auch biklonale Gammopathien in die Analyse einbezogen. Beide Entitäten werden im Folgenden unter dem Begriff MGUS zusammengefasst.

Tabelle 1: Definition der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz

---

Serum M-Protein $<3$ g/dl
Plasmazellen im Knochenmark $<10\%$
Kein Nachweis anderer proliferativer Erkrankungen der B-Zelllinie
Keine der MGUS zuzuordnende Organ- oder Gewebeschädigung

---

(Kyle et al., 2010)

Der Nachweis einer MGUS allein ist nicht als pathologisch zu werten, allerdings kann sich diese zu einem geringen Prozentsatz in eine maligne lymphoproliferative Erkrankung, Multiple Myelome, eine Waldenström Makroglobulinämie oder eine Amyloidose transformieren (Kyle et al., 2002). Bei Patienten über 50 Jahren liegt die Prävalenz einer MGUS bei circa 3%, bei Patienten über 70 Jahren bei etwa 5% (Kyle et al., 2006). Das Risiko für die Progression einer MGUS beträgt etwa 1% pro Jahr und ist insbesondere abhängig von der Anzahl an immunphänotypisch gesunden BMPC (Perez-Persona et al., 2010, Kyle et al., 2010). Der Zusammenhang zwischen Auftreten klonaler Gammopathien, GvHD und anderen Einflussfaktoren wie der Reaktivierung von Virusinfektionen sowie deren Auswirkung auf das Gesamtüberleben sollte den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit folgend im Rahmen nachfolgender prospektiver Studien weiter analysiert werden. Die Wiedererlangung der vollen humoralen Kompetenz erfordert den Aufbau eines Gedächtniszell-Pools. Dieser entsteht primär durch die Exposition gegenüber pathogenen Umweltkeimen und kann sekundär durch Impfung der Patienten weiter getriggert werden. Die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Gedächtniszellen erfolgt nach Aktivierung der B-Zellen über MHC-Klasse-II und Zytokine durch CD4+-T-Lymphozyten. Dieser Zusammenhang macht deutlich, dass die Erholung der B-Zellreihe eng an die Regeneration der T-Zellpopulationen gekoppelt ist und ohne diese nicht abgeschlossen werden kann (Mackall et al., 2009).

## 1.6 Zielsetzung

Die allogene HSCT hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer etablierten und potentiell kurativen Therapiemethode in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen entwickelt. Hierbei sollen sowohl maligne Erkrankungen wie die akute oder chronische lymphatische oder myeloische Leukämie, maligne Lymphome, myeloproliferative Erkrankungen als auch angeborene Immunschwächen oder aplastische Anämien einer langfristigen Remission oder Heilung zugeführt werden (Mackall et al., 2009). Ziel der allogenen HSCT ist die Implementierung eines funktionsfähigen Immunsystems durch Transplantation pluripotenter, hämatopoetischer Stammzellen, welche durch Anwachsen im Knochenmarkraum, dem sogenannten „Homing“, die Wiedererlangung einer intakten Myelo- und Lymphopoese gewährleisten. Die therapeutische Wirksamkeit der allogenen HSCT beruht zum einen auf der zytotoxischen Wirkung des vor Transplantation angewandten Konditionierungsregimes, zum anderen auf dem durch Spenderlymphozyten bedingten Graft-versus-Leukemia Effekt (GvL) zur Eradikation residueller Leukämiezellen (Schleuning, 2000).

Der Prozess der anschließenden Immunrekonstitution wird hierbei nicht selten durch Rezidive der zugrunde liegenden Krankheit, die Ausbildung einer Graft-versus-Host Disease, schwere opportunistische Infektionen sowie durch Reaktivierung viraler Infektionen verzögert oder gar verhindert. Die Ausbildung und Erholung der immunologischen Funktion und das immunologische Engraftment haben sich in diesem Kontext zu Themenbereichen intensiven Forschungsinteresses entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Prozess der Rekonstitution eines neuen, funktionsfähigen blutbildenden Systems anhand retrospektiver Patientendaten analysiert. Im Vergleich zu anderen Arbeiten birgt diese Dissertationsschrift aufgrund ihrer vielseitigen Analyseparameter neue Aspekte in der Betrachtung der Rekonvaleszenz nach allogener HSCT. Neben verschiedenen Krankheitsentitäten umfasst der Datenpool hierbei Erwachsene eines breiten Altersspektrums; innerhalb des Patientenkollektivs zeigt sich eine hohe Anwendungsrate dosisreduzierter Konditionierungsregime als auch ein breiter Einsatz von Alemtuzumab und ATG bei unverwandter als auch bei verwandter Stammzellspende. Die Auswertung von Einfluss- und Risikofaktoren auf die regelrechte Immunrekonstitution sowie die Ableitung klinisch relevanter Ergebnisse zum Einsatz in der immunmodulatorischen Therapie sollen Ziel dieser Arbeit sein und orientieren sich an folgenden Fragestellungen:

### **Ablauf der lymphozytären und humoralen Immunrekonstitution**

Geht die zelluläre Erholung der B-Zelllinie einher mit einer vollumfänglichen humoralen Kompetenz der rekonstituierten B-Lymphozyten oder verbleibt eine verminderte klonale Variabilität oder Defizienz?

Bedingt eine gestörte zelluläre Rekonstitution die Ausbildung lymphozytär vermittelter autoimmuner Phänome im Sinne einer Transplantat gegen Wirt Reaktion?

### **Patientenassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution**

Wird die erfolgreiche und hinlängliche Immunrekonstitution durch das Lebensalter des Empfängers beeinflusst?

Besitzt die zur Transplantation führende Grunderkrankung des Empfängers einen Einfluss auf die nachfolgende Rekonstitution des Immunsystems?

Verzögert eine fehlende HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger den Ablauf der Immunrekonstitution?

Entspricht ein höheres Patientenalter einem Risikofaktor in Bezug auf die Ausbildung einer Monoklonalen Gammopathie?

### **Therapieassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution**

Welchen Einfluss üben unterschiedliche Konditionierungsregime auf die Immunrekonstitution aus?

Verzögert die Anwendung dosisreduzierter Konditionierungsregime den zeitlichen Verlauf der Immunrekonstitution?

Inwieweit wird die Immunrekonstitution des T-Zellsystems durch eine depletierende Behandlung mittels Alemtuzumab respektive ATG verzögert?

Welche Auswirkungen hat die Infusion von Donor-Lymphozyten auf die Immunrekonstitution?

### **Verlaufsassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution**

Führt das Auftreten einer GvHD nach allogener HSCT zu einer Verzögerung der zellulären oder humoralen immunologischen Konsolidierung?

Welchen Einfluss hat die Reaktivierung latenter CMV-Infektionen auf die lymphozytäre und humorale Rekonstitution nach allogener HSCT?

Welche Effekte hat das Auftreten Monoklonaler Gammopathien unklarer Signifikanz auf die Wiedererlangung der vollen immunologischen Funktion?

Kommt es nach vorangehender Virusinfektion zu einem gehäuften Auftreten Monoklonaler Gammopathien unklarer Signifikanz?

Besteht für Patienten mit vorangehender Monoklonaler Gammopathie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer cGvHD?

Bildet die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer lymphoproliferativen Erkrankung nach Transplantation?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die Daten von 136 erwachsenen Patienten analysiert, die sich zwischen September 2010 und September 2013 in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie der Klinik für Innere Medizin II - Hämatologie und Onkologie - der Universitätsklinik Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen haben.

#### 2.1.1. Alter und Geschlecht

Der Altersmedian zum Zeitpunkt der Transplantation betrug 54 Jahre. Der jüngste transplantierte Patient war 18 Jahre alt, der älteste 73 Jahre. 67 (49%) Patienten waren jünger als 54 Jahre, 69 (51%) Patienten waren 54 Jahre oder älter. 81 (60%) Patienten waren männlich und 55 (40%) Patienten weiblich.

#### 2.1.2 Grunderkrankung

Bei 128 der in die Studie aufgenommenen Patienten wurde die allo HSCT aufgrund einer malignen hämatologischen Erkrankung durchgeführt. Die Erkrankungen zum Diagnosezeitpunkt umfassten 65 Fälle von akuter myeloischer Leukämie/ myelodysplastischem Syndrom, 43 Lymphome, 12 Erkrankungsfälle aus dem chronisch myeloproliferativen Formenkreis und 8 Fälle akuter lymphatischer Leukämien; bei weiteren 8 Patienten waren Graft failure oder Bone marrow failure Grund für die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation. Nähere Informationen zur Häufigkeitsverteilung der Krankheitsentitäten gibt Tabelle 2.

Entität	Diagnose	Häufigkeit
Akute myeloische Leukämie/	AML	51 (38%)
Myelodysplastische Syndrome	MDS	14 (10%)
Lymphome	CLL	11 (8%)
	Non-Hodgkin-Lymphom	16 (12%)
	Multiples Myelom	15 (11%)
	Hodgkin-Lymphom	1 (1%)
Chronisch myeloproferative Syndrome	CML	2 (1%)
	MPS	10 (7%)
Akute lymphatische Leukämie	ALL	8 (6%)
Sonstige	Transplantatversagen	2 (1%)
	Knochenmarkversagen	6 (4%)

Tabelle 2: Absolute und relative Verteilung der Grunderkrankungen  
Aufgelistet innerhalb des Patientenkollektivs.

### 2.1.3 Stammzellquelle und Stammzelltransplantation

In insgesamt sechs Fällen kam eine Knochenmarkspende (BM) zum Einsatz; 130 Patienten erhielten CD34+ mobilisierte periphere Blutstammzellen (PBSC). 26 Patienten erhielten Stammzellen eines Familienspenders, 110 Patienten Stammzellen eines unverwandten Spenders. In 99 Fällen konnte ein HLA-identischer Spender gefunden werden, 37 Patienten wurden HLA-differente Stammzellen transplantiert.

Die Auswahl der Spender erfolgte entsprechend den Kriterien einer klinikinternen Standard Operating Procedure (SOP).

Einen detaillierten Überblick über wichtige klinische Parameter des Patientenkollektivs gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht der Patientendaten

Anzahl der Patienten	n = 136 (100%)
<b>Medianes Alter bei Tx in Jahren (Bereich)</b>	54 (18-73)
<b>Geschlechterverteilung</b>	
Männlich/weiblich	81 (60%) / 55 (40%)
<b>HLA-Kompatibilität</b>	
Familienspender	
HLA-identisch	25 (18%)
HLA-mismatch	1 (1%)
Fremdspender	
HLA-identisch	74 (54%)
HLA-mismatch	36 (26%)
<b>Zellquelle</b>	
PBSC	130 (96%)
BM	6 (4%)
<b>CMV-Status vor Tx</b>	
Pos/Pos	43 (32%)
Pos/Neg	41 (30%)
Neg/Pos	9 (7%)
Neg/Neg	41 (30%)
missing	2 (1%)

Klinische Charakteristika innerhalb des Patientenkollektivs.

### 2.1.4 Konditionierungsregime

Die Konditionierungsregime lassen sich in myeloablativ und dosisreduziert differenzieren. Vorbereitend auf die nachfolgende allogene Stammzelltransplantation wurden elf (11/136, 8%) Patienten des Kollektivs klassisch myeloablativ konditioniert. Innerhalb dieser Kohorte

wurden sieben (7/11, 64%) Patienten mit einer Kombination aus Busulfan und Cyclophosphamid behandelt, vier (4/11, 36%) Patienten erhielten eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 8 bis 12 Gy in Kombination mit Fludarabin oder Cyclophosphamid. Bei 125 Patienten (125/136, 91%) wurden Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität angewendet. Ein Großteil dieser Patienten erhielt auf dem Purinanalogen Fludarabin basierende Konditionierungsregime (111/125, 89%). Dieses wurde unterschiedlichen Protokollen entsprechend mit den alkylierenden Substanzen Melphalan, Thiotepa, Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea (BCNU) und Treosulfan kombiniert. In 18 (18/125, 14%) Fällen erfolgte die Kombination von Fludarabin mit Cyclophosphamid, Busulfan oder einer Kombination aus beiden Substanzen. Acht Patienten (8/125, 6%) wurden nach dem Flamsa-RIC-Protokoll, bestehend aus Fludarabin, Amsacrine, Busulfan und Cyclophosphamid, konditioniert. Sechs (6/125, 5%) Patienten erhielten eine hochdosierte Chemotherapie nach dem BEAM-Protokoll.

Die Konditionierungstherapie wurde mit dem Ziel einer T-Zell-Depletion in 111/136 (82%) Fällen durch das polyklonale Antikörpergemisch ATG Fresenius® (mediane Dosis bei Fremdspendern: 40mg/kg KG aufgeteilt in 3-4 Gaben an aufeinanderfolgenden Tagen; mediane Dosis bei Geschwisterspender: 30 mg/kg KG) erweitert, 24/136 (18%) Patienten erhielten zu diesem Zweck den monoklonalen CD52-Antikörper Alemtuzumab 1H (mediane Dosis 50-100mg absolut, aufgeteilt tägliche Einzeldosen von 10-20 mg). Eine Übersicht über die innerhalb des Patientenkollektivs angewandten Konditionierungsregime gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Konditionierungsregime

Konditionierungsregime	Häufigkeit n (%)
Myeloablativ (MAC)	11 (8)
Busulfan/Cyclophosphamid	7
TBI 12 Gy/Cy	2
TBI 8Gy/Flu	2
Dosisreduziert (RIC)	125 (91)
Fludarabin/Melphalan	15
Fludarabin/BCNU/Melphalan	69
Fludarabin/Treosulfan	4
Fludarabin/Thiotepa	4
Fludarabin/Thiotepa/Treosulfan	1
Fludarabin/Cyclophosphamid	7
Fludarabin/Busulfan	1
Fludarabin/Busulfan/Cyclophosphamid	10
Flamsa-RIC	8
BEAM	6

Konditionierungsregime zur Vorbereitung auf die allogene Stammzelltransplantation und Anwendungshäufigkeit innerhalb des Patientenkollektivs in absoluter und relativer Darstellung.

### 2.1.5 Prophylaxe der Graft-versus-Host Disease

Im Rahmen der GvHD-Prophylaxe wurde bei 134 (99%) Patienten *post transplantationem* eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A eingeleitet. In 116 (85%) Fällen wurde diese mit Mycophenolatmofetil (MMF) kombiniert. Fünf (4%) Patienten erhielten zusätzlich Methotrexat, fünf (4%) weitere Patienten Mycophenolat-Mofetil und Everolimus in konsekutiver Gabe. Bei acht (6%) Patienten wurde für die GvHD-Prophylaxe ausschließlich Cyclosporin A verwendet. Jeweils ein Patient erhielt zur GvHD-Prophylaxe MMF und Everolimus oder MMF und Basiliximab. Einen detaillierten Überblick über die im Patientenkollektiv angewandte GvHD-Prophylaxe enthält Tabelle 5.



Tabelle 5: Angewandte Immunsuppressiva

GvHD- Prophylaxe	Kombination	n (Prozent)
CSA	-	8 (6%)
	Mycophenolat-Mofetil	116 (85%)
	Methotrexat	5 (4%)
	Mycophenolat-Mofetil/Everolimus*	5 (4%)
Everolimus	Mycophenolat-Mofetil	1 (1%)
Basiliximab	Mycophenolat-Mofetil	1 (1%)

Im Rahmen der GvHD-Prophylaxe verwendete Immunsuppressiva und ihre Anwendungshäufigkeit innerhalb des Patientenkollektivs.

\*Everolimus und CSA wurden aufgrund der erhöhten Gefahr thrombotischer Mikroangiopathien konsekutiv gegeben.

## 2.2 Labormethoden

### 2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Erfassung der Reaktivierung latenter CMV-Virusinfektionen mittels quantitativer RT-PCR (Polymerase Chain Reaction nach reverser Transkription) - Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Infektionsmedizin des UKSH, Campus Kiel. Die Resultate wurden entweder als nicht nachweisbar oder mit dem gemessenen Wert als Viruskopien pro  $\mu\text{l}$  Blut angegeben.

### 2.2.2 Immunphänotypisierung

Die immunzytologische Diagnostik mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting) ist ein wichtiges Verfahren in der hämatologischen Diagnostik und ein essentielles Instrument zur Verlaufskontrolle der Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation. Grundlage dieses Verfahrens ist die Analyse von Einzelzellsuspensionen unter Nutzung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften nach Anregung durch einen monochromatischen Laser. Nach internationaler Terminologie werden monoklonale Antikörper, welche die gleichen Leukozytendifferenzierungsantigene erkennen, nach numerisch kategorisierte Gruppen, den sogenannte Differenzierungscluster (CD), definiert. Anhand der unterschiedlichen CD-Expressionsmuster auf der Oberfläche verschiedener Zellklassen lassen sich mithilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper, die komplementäre CD-Oberflächenantigene binden, Lymphozytensubpopulationen quantitativ auftrennen und typisieren. Bei der FACS-Analyse werden zu diesem Zweck die einzelnen fluoreszenzmarkierten Zellen der Suspension in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl an einem monochromatischen Laser vorbeigeleitet. Die dabei emittierten unterschiedlichen Lichtsignale werden separat detektiert und mit Hilfe von Photomultipliern in elektronische Signale

umgewandelt. Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter) gibt Auskunft über die Zellgröße, Seitwärtsstreulicht (Sidescatter) über die Granularität der Einzelzelle. Die Fluoreszenz macht die spezifische Antikörperbindung sichtbar. Anschließend werden die digitalisierten Daten per EDV quantitativ ausgewertet.

Im Rahmen dieser Studie erfolgte zur Verlaufsbeurteilung des immunologischen Engraftments und des Wiederaufbaus einer normalen immunologischen Funktion nach Stammzelltransplantation die Messung der Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  aus dem peripheren Blut mittels Immunphänotypisierung vor Transplantation sowie routinemäßig gemäß klinikinterner SOP am 50., 100. und 360. Tag *post transplantationem*. Je nach individueller klinischer Präsentation der Patienten erfolgten zusätzliche FACS-Analysen. Hierbei wurden folgende Zellpopulationen quantitativ analysiert:

1. CD3+ Zellen (T-Lymphozyten)
2. CD3+/CD4+ Zellen (T-Helferzellen)
3. CD3+/CD8+ Zellen (zytotoxische T-Zellen)
4. CD19+ Zellen (B-Lymphozyten)
5. CD3- / CD16- / CD56+ Zellen (NK Zellen)

Darüber hinaus erfolgte die Erfassung des CD4+/CD8+-Verhältnisses (CD4+/CD8+-Ratio). Anhand dieser Daten wurde über einen Zeitraum von 630 Tagen nach Transplantation die Immunrekonstitution der myeloischen und lymphatischen Zellreihe analysiert. Hierzu erfolgte eine retrospektive Auswertung zu sieben verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, wobei der Tag der Stammzelltransplantation als Tag 0 definiert war:

1. drei Monate nach allo HSCT (Tag +90 +/-30 Tage)
2. sechs Monate nach allo HSCT (Tag +180 +/- 30 Tage)
3. neun Monate nach allo HSCT (Tag +270 +/-30 Tage)
4. zwölf Monate nach allo HSCT (Tag +360 +/- 30 Tage)
5. fünfzehn Monate nach allo HSCT (Tag +450 +/- 30 Tage)
6. achtzehn Monate nach allo HSCT (Tag +540 +/- 30 Tage)
7. einundzwanzig Monate nach allo HSCT (Tag +630 +/- 30 Tage)

Die Interpretation der absoluten Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  orientiert sich an den in nachfolgender Tabelle 6 aufgezeigten Referenzbereichen bei gesunden Probanden.

Tabelle 6: Referenzbereich Immunstatus Erwachsene

Lymphozyten/Subpopulationen	Absolute Zahl/ $\mu$ l	Relative Häufigkeit in %
Gesamtlymphozyten	1000-4800	
CD19+	80-350	6-19
B-Lymphozyten		
CD3+	900-2560	55-83
T-Lymphozyten		
CD3+/CD4+	500-1340	28-57
T4-Lymphozyten		
CD3+/CD8+	160-775	10-39
T8-Lymphozyten		
CD4/CD8- Ratio	0,9-3,6	
CD3-/CD16-56+	35-350	7-31
NK Zellen		

(Quelle: Hämatologie Labor Kiel-Sektion für hämatologische Spezialdiagnostik, UKSH Campus Kiel)

### 2.2.3 Quantitative Analyse der Immunglobuline

Die Begutachtung der qualitativen Rekonstitution der B-Lymphozyten erfolgt in dieser Studie anhand verschiedener, einander ergänzender Analyseverfahren. Eine Störung der humoralen Erholung lässt sich in diesem Zusammenhang unterteilen in einen Antikörpermangel und eine überschießende Produktion an Antikörpern durch einzelne Zellklone, der sogenannten monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS). Die wichtigste Untersuchungsmethode zur Erfassung einer MGUS ist die Serum-Eiweißelektrophorese. Wurde in dieser eine abnorme schmalbasige Erhöhung der Immunglobulinfraktion, ein sogenannter M-Gradient, detektiert, erfolgte die weitergehende Diagnostik mittels Immunfixation zur Bestimmung der freien Leichtketten im Serum und die Erfassung des Verlaufs der Immunglobulinlevel für IgG, IgM und IgA mittels spezifischer Immunturbidimetrie aus dem Patientenserum. Die Interpretation der Immunglobulinfraktionen pro  $\mu$ l orientiert sich an den nachfolgenden in Tabelle 7 aufgezeigten Referenzbereichen bei gesunden Probanden.

Tabelle 7: Referenzwerte Immunglobuline

Immunglobulinfraktion	Referenzwerte in g/l
IgG	7-16
IgM	0,4-2,3
IgA	0,7-4,0

(Quelle: Zentrallabor, UKSH, Campus Kiel)

## 2.3 Statistische Verfahren

Anhand oben genannter Kriterien wurden 136 Patienten in die Studie aufgenommen. Als Beurteilungskriterium für die quantitative und qualitative Immunrekonstitution wurden pro Patient jeweils Zellreihen (CD3+, CD4+, CD8+, [sowie die CD4+/CD8+-Ratio], CD19+, CD56+) und Immunglobulinlevel (IgG, IgM, IgA) als Stichproben zu sieben definierten Zeitpunkten retrospektiv ermittelt: Drei Monate (Tag +90), sechs Monate (Tag +180), neun Monate (Tag +270), zwölf Monate (Tag +360), fünfzehn Monate (Tag +450), achtzehn Monate (Tag+540) und einundzwanzig Monate (Tag +630) nach allogener Stammzelltransplantation. Die absolute Zellzahl wurde pro  $\mu\text{l}$ , die Immunglobulinlevel in g/l peripheren Bluts erfasst. Alle Daten wurden mit Microsoft® Excel® 2008 for Mac (Version 12.1.0.) tabellarisch aufbereitet. Anhand unterschiedlicher Kriterien (Empfängeralter, Empfängergeschlecht, HLA-Kompatibilität, Grunderkrankung, Konditionierungsregime, immunsuppressive oder –supportive Therapie, Rezidiv, Auftreten einer GVHD und CMV-Reaktivierung nach Transplantation, MGUS) wurden die Patienten jeweils Gruppen zugeordnet und in Hinblick auf mögliche Unterschiede in der lymphozytären und humoralen Immunrekonstitution analysiert. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  durchgeführt.  $P = 0,001$  wurde als höchst signifikant eingestuft.

Für die einzelnen Variablen wurden arithmetische Mittel, Mediane und prozentuale Verhältnisse errechnet sowie Signifikanzwerte bestimmt. Die Analyse auf Normalverteilung der Daten durch den Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte nicht-normalverteilte Daten, sodass vergleichende Analysen mit Hilfe nicht-parametrischer Testverfahren durchgeführt wurden. Dabei wurde zum Vergleich zweier Kohorten der Mann-Whitney-U-Test genutzt. Zur Überprüfung von statistischen Zusammenhängen zwischen Variablen und Zielgrößen wurden diese mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert und anschließend mittels linearer Regressionsanalyse multivariat korrigiert. Zur Angabe des Gesamtüberlebens (overall survival, OS) wurde für die jeweilige Patientenkohorte ein Kaplan-Meier-Schätzer erstellt. Das OS wurde vom Transplantationsdatum bis zum Sterbedatum berechnet. Für Patienten, bei denen kein Ereignis (Tod) eingetreten ist, wurde das Datum in die Analyse einbezogen, zu welchem diese zuletzt in der Klinik vorstellig wurden (last Follow-up). Zur näherungsweisen Berechnung der kumulativen Viruslast der ersten 9 Monate wurde die Area under the curve (AUC) aller Virusmessungen über der Nachweisgrenze errechnet. Die statistischen Analysen wurden mittels IBM® SPSS® Statistics Software (Version 20) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft® Word 2008 for Mac Version 12.3.6.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gesamtüberleben

Die Überlebenszeitanalyse ergab 100 Tage nach allogener HSCT ein Gesamtüberleben von 87%. Ein Jahr nach Transplantation waren noch 71% der Patienten am Leben; nach 2 Jahren waren dies noch 65% der in die Analyse aufgenommenen Patienten (vgl. Abb. 3). 18 Todesfälle waren ursächlich der Grunderkrankung, 25 Todesfälle behandlungsassoziierten Gründen zuzuschreiben. Bei 5 Patienten waren andere Gründe todesursächlich. 27 (20%) der Patienten entwickelten innerhalb des Untersuchungszeitraums ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung

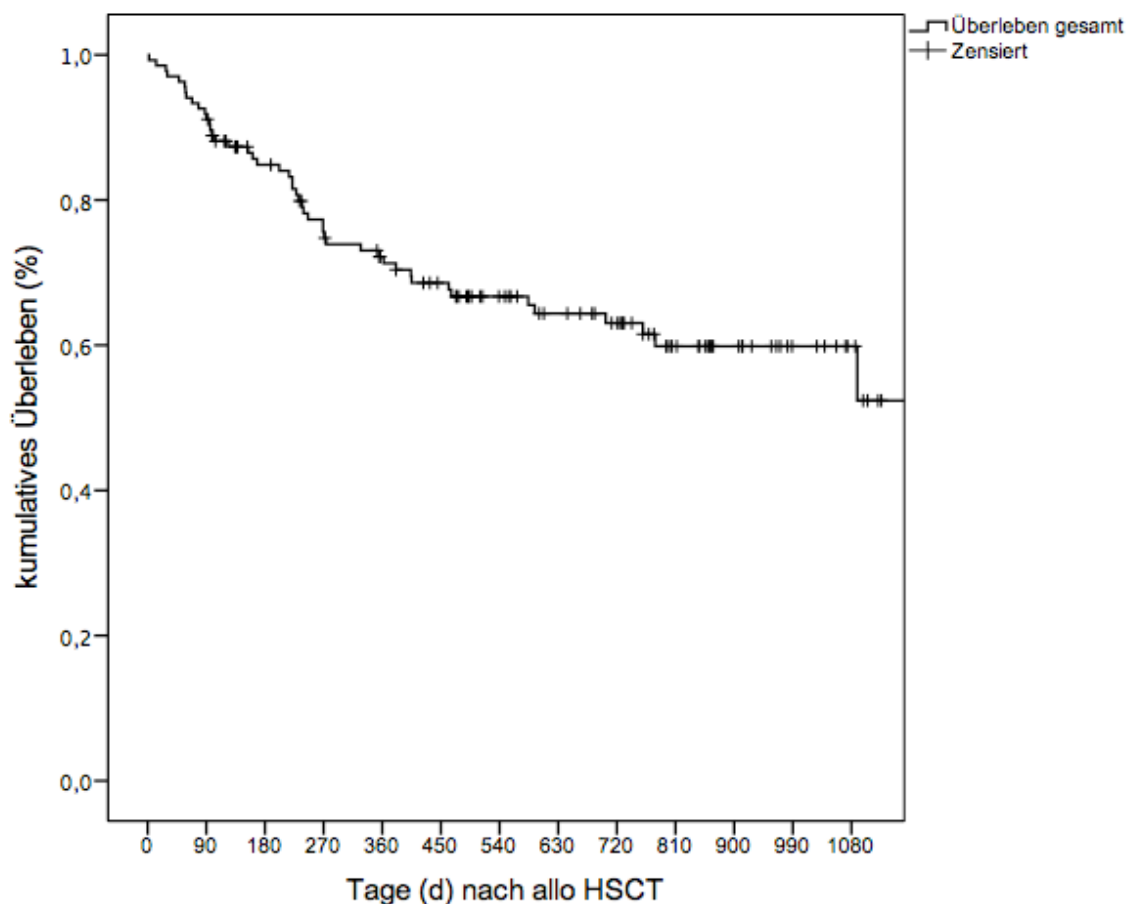
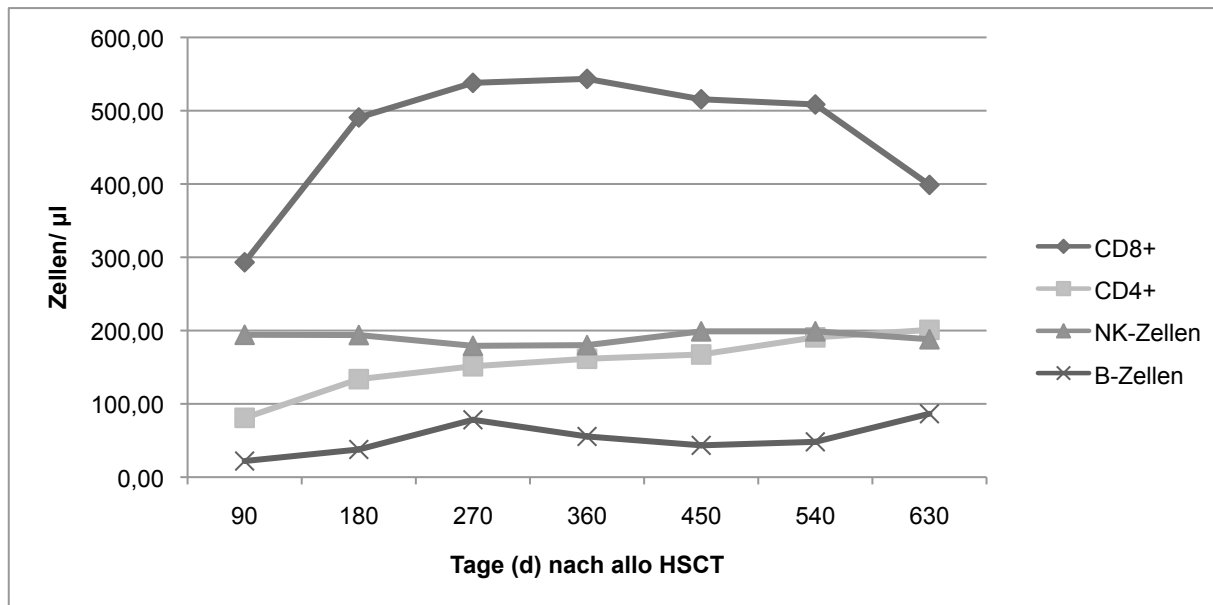


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens innerhalb des Patientenkollektivs

Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit (in %) innerhalb des Gesamtkollektivs die Zeit (in Tagen) nach allogener HSCT zu überleben. Die Zensur markiert eingetretene Todesfälle zum jeweiligen Ereigniszeitraum.

### 3.2 Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

Die zelluläre Immunrekonstitution wurde anhand der mittels FACS-Analyse ermittelten Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  peripheren Bluts ermittelt. Die Errechnung der Mediane erfolgte zu den oben genannten Stichtagen.



Tag	90	180	270	360	450	540	630
Fallzahl (n)	84	89	71	60	29	29	21

Abbildung 4: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener HSCT

Dargestellt sind die Verläufe der Zellzahlen der Lymphozytensubpopulationen anhand der medianen Zellzahl pro  $\mu\text{l}$  Blut bis 21 Monate nach Transplantation (Quelle: Eigene Darstellung).

#### T-Lymphozyten

In Anlehnung an die Grenzwerte der Normwertbereiche für T-Lymphozyten wurde eine normale T-Zell-Rekonstitution als das Vorkommen von 500 bis 1340 CD4+ T-Zellen und 160 bis 775 CD8+ T-Zellen pro  $\mu\text{l}$  peripheren Bluts definiert.

Gemessen an diesen Grenzwerten verblieben CD4+ T-Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum weit unter dem Normbereich (vgl. Abb. 4). Insgesamt erlangten ein Jahr nach Transplantation fünf (8%) Patienten normale CD4+ T-Lymphozytenwerte, 55 (90%) Patienten verblieben unterhalb der unteren Normgrenze, ein (2%) Patient wies erhöhte CD4+ Zellzahlen auf. 21 Monate nach allogener HSCT verblieb die Rekonstitution CD4+ T-Lymphozyten in 80% unvollständig; in nur 20% erreichten CD4+ T-Zellen ihren Normwertbereich (vgl. Abb. 4).

CD8+ T-Lymphozyten zeigten sich im Mittel bereits drei Monate nach allogener HSCT im Normbereich und wiesen innerhalb des ersten Jahres ein nahezu überexponentielles Wachstum auf (vgl. Abb.4). Während an Tag 360 23 Patienten (38%) normwertige CD8+ T-Lymphozyten aufwiesen, zeigt sich die CD8+ Zellzahl bei 25 der Patienten (42%) erhöht und bei zwölf Patienten (20%) erniedrigt. Nach 21 Monaten war die Rekonstitution CD8+ T-Lymphozyten in 85% der Patienten vollständig. 15% der Patienten erreichten den Normwertbereich CD8+ T-Lymphozyten nicht (vgl. Abb. 4).

Die CD4/CD8-Ratio verblieb über den gesamten beobachteten Zeitraum erniedrigt (Median<sub>90</sub> = 0,34, Median<sub>180</sub> = 0,3, Median<sub>270</sub> = 0,28, Median<sub>360</sub> = 0,3, Median<sub>450</sub> = 0,31 Zellen/ $\mu$ l, Median<sub>540</sub> = 0,31, Median<sub>630</sub> = 0,47). Dies lag zum einen in der verzögerten Erholung der CD4+ T-Lymphozyten begründet; darüber hinaus verschärfte sich das inverse Verhältnis durch die vielfach beobachtete überschießende Produktion der CD8+ T-Lymphozyten.

Einen Überblick über die statistische Verteilung der Zellzahlen innerhalb der CD4+ - und CD8+ Zellpopulationen gibt die Abbildung 5.

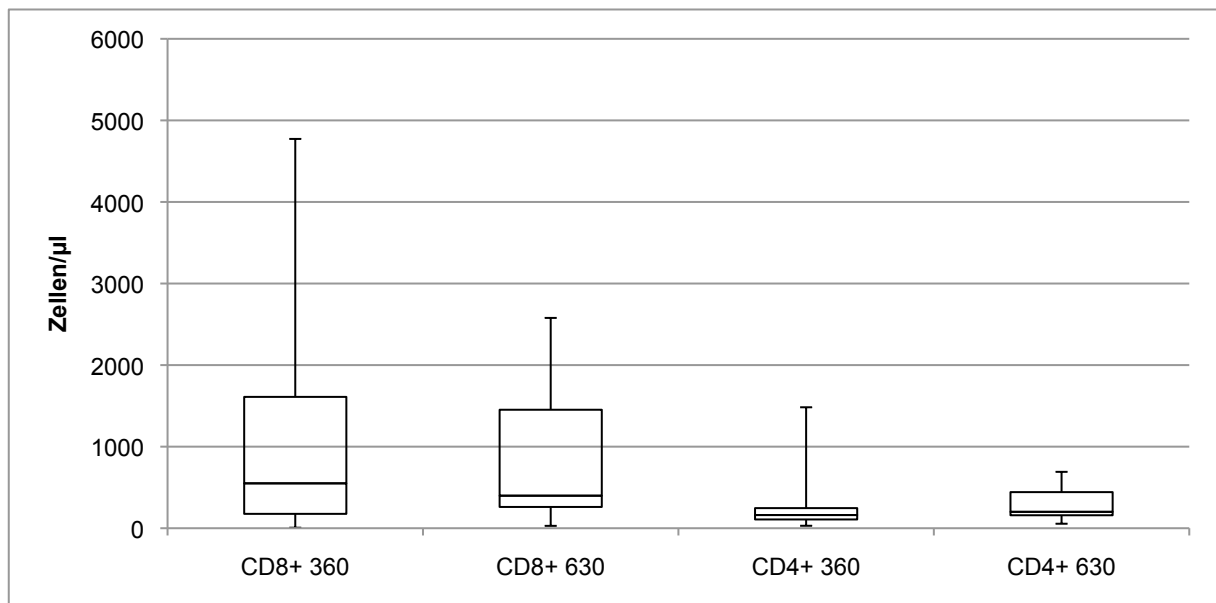


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Rekonstitution der CD8+ und CD4+ T-Zellen

Dargestellt sind Medianwerte, erstes und drittes Quartil sowie Maximal- und Minimalwerte für CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten 12 und 21 Monate nach allogener HSCT. Während die Wachstumstendenz CD8+ T-Lymphozyten im zweiten Jahr rückläufig ist, weisen CD4+ T-Lymphozyten über den gesamten Untersuchungszeitraum eine langsamere, jedoch sukzessive mediane Wachstumstendenz auf und erreichen ihre maximalen Medianwerte erst 21 Monate nach allogener HSCT. Die Spannweite der Zellwerte beider Zellreihen nimmt im zeitlichen Verlauf über 21 Monate jeweils deutlich ab.

## B-Lymphozyten

Eine regelgerechte B-Zellrekonstitution wurde entsprechend oben genannter Normwerttabellen bei Vorhandensein von 80 bis 350 B-Zellen pro  $\mu$ l Blut angenommen. Die CD19+ B-

Zellen verblieben im Mittel während des gesamten Analysezeitraums vermindert; trotz einer generellen Wachstumstendenz wurde die untere Normwertgrenze erst 21 Monate nach Transplantation überschritten (vgl. Abb. 4). Ein Jahr nach allogener HSCT wiesen 21 (36%) Patienten normale B-Zellzahlen auf; bei insgesamt 33 (56%) Patienten waren die B-Zellen erniedrigt, fünf (8%) Patienten wiesen eine überschießende B-Zell-Proliferation auf. 21 Monate nach allogener HSCT erreichten 50% der Patienten Normwerte für B-Lymphozyten.

### NK-Zellen

Die CD56<sup>+</sup> NK-Zellen überschritten bereits an Tag 90 den unteren Schwellenwert von 35 Zellen pro  $\mu\text{l}$  und verblieben über den gesamten Beobachtungszeitraum innerhalb des Normbereiches von 35 bis 350 Zellen pro  $\mu\text{l}$  peripheren Bluts (vgl. Abb. 4). Zusammenfassend zeigen 1 Jahr nach allogener HSCT 43 Patienten normale (73%) Werte für NK-Zellen. Hingegen wiesen zwei (3%) Patienten Zellzahlen unterhalb der Normwertgrenze auf, 14 Patienten (24%) zeigten erhöhte Zellzahlen für NK-Zellen. Am Ende des Untersuchungszeitraumes erreichten alle Patienten den Normwertbereich für NK-Zellen. Einen Überblick über die statistische Verteilung der Zellzahlen innerhalb der NK- und B-Zellpopulationen gibt die Abbildung 6.

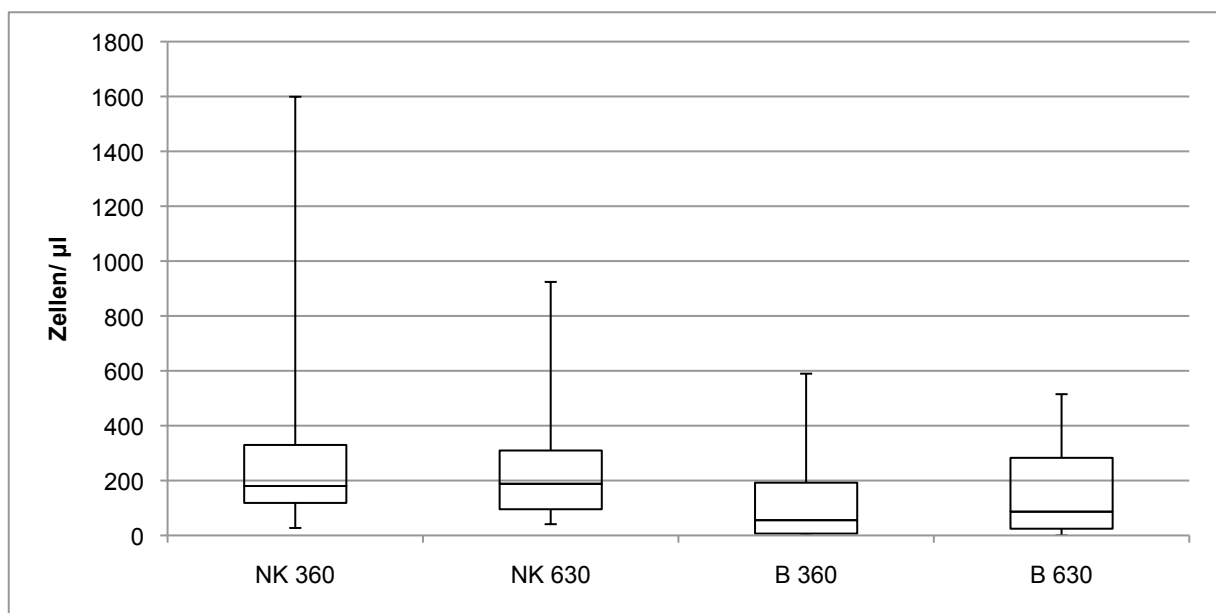
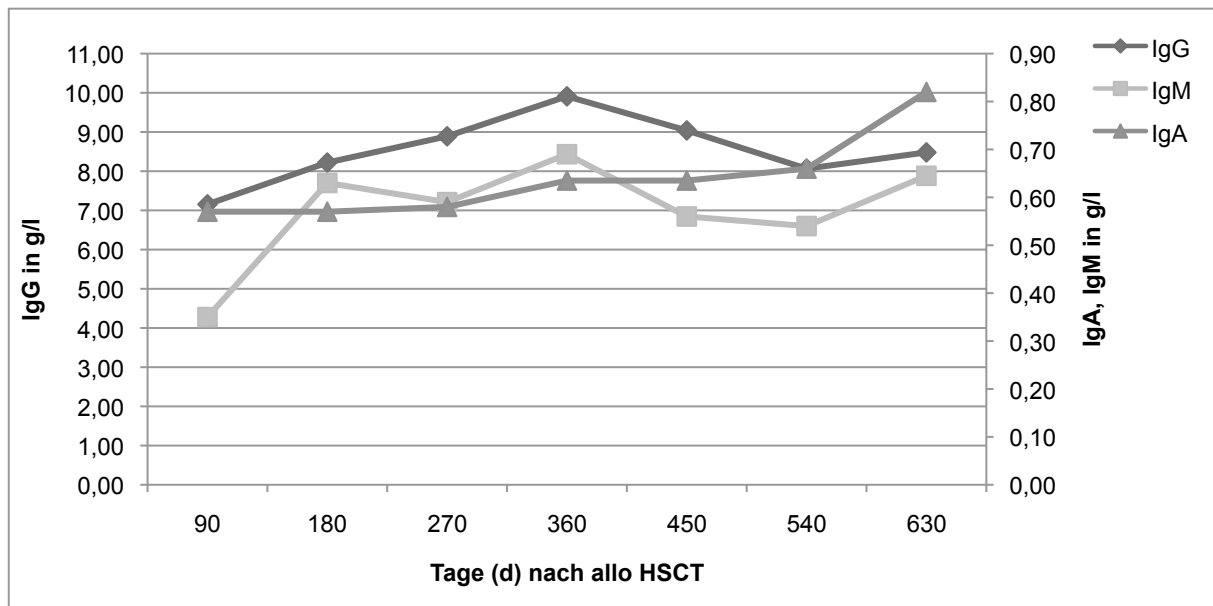


Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Rekonstitution der NK- und B-Zellen

Dargestellt sind Medianwerte, erstes und drittes Quartil sowie Maximal- und Minimalwerte für NK-Zellen und B-Lymphozyten 12 und 21 Monate nach allogener HSCT. Beide Zelllinien zeigen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine positive mediane Zellentwicklung. Die Spannweite der Zellwerte beider Zellreihen nimmt im zeitlichen Verlauf über 21 Monate jeweils deutlich ab.



### 3.3 Humorale Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation



Tag	90	180	270	360	450	540	630
Fallzahl (n)	128	112	100	87	73	56	54

Abbildung 7: Humorale Immunrekonstitution nach allogener HSCT

Dargestellt in g/l Serum nach allogener Stammzelltransplantation in absoluter Darstellung.

Analog zur Beurteilung der zellulären Rekonstitution wurde die funktionelle B-Zell-Rekonstitution anhand der Normwerttabellen für Immunglobuline im peripheren Blut gemessen (vgl. Abb. 7). Die Serumwerte für IgG, IgM und IgA erreichten bei dem überwiegenden Teil der Patienten innerhalb des Untersuchungszeitraums ihren jeweiligen Normbereich. Während sich die Serumwerte für IgG (7-16 g/l) im Mittel bereits nach 90 Tagen normalisierten, war dies bezogen auf IgM (0,4-2,3 g/l) erst nach Tag 180 sowie bezogen auf IgA (0,7-4,0) nach Tag 630 der Fall. Im Einzelnen erreichten bis ein Jahr nach Transplantation 44 Patienten (51%) normale Serumwerte für IgG, 27 Patienten (31%) verblieben unterhalb der unteren Normgrenze. Bei 15 Patienten (17%) ließ sich eine überschießende Produktion von IgG erkennen. Nach 21 Monaten erreichten 67% der Patienten normwertige Serum-Level für IgG. Betrachtet man die Serumwerte für IgM, so erzielten bis 360 Tage nach allogener HSCT 53 Patienten (60%) Normalwerte, während 29 Patienten (33%) unterhalb der unteren Normgrenze verblieben. Eine überschießende Produktion an IgM zeigte sich bei fünf Patienten (6%). Nach 21 Monaten erreichen 100% der Patienten normale Serum-Immunglobulinlevel für IgM. Für IgA sind dies 37 Fälle (44%) normaler Serumwerte, beziehungsweise 46 Patienten (55%) mit unvollständiger Rekonstitution. Ein Patient (1%) wies erhöhte IgA-Serumwerte

auf. 21 Monate nach allogener HSCT lagen die Serumwerte für IgA in 52% der Fälle im Normbereich.

### **3.4 Patientenassoziierte Einflussfaktoren auf die regelrechte Immunrekonstitution**

#### **3.4.1 Einfluss des Geschlechts des Empfängers**

In Hinblick auf die lymphozytäre und humorale Rekonstitution nach allogener HSCT ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten erkennen.

#### **3.4.2 Einfluss des Alters des Empfängers**

Analog zu vergleichbaren Studien erfolgte zur Analyse des Effekts des Empfängeralters auf die lymphozytäre und humorale Rekonstitution eine Untergliederung des Patientenkollektivs entsprechend des Patientenalters anhand des Altersmedians von 54 Jahren. Es konnte gezeigt werden, dass die Patientengruppe der über 54-Jährigen im Median über den gesamten Untersuchungszeitraum nach allogener HSCT höhere Zellwerte für CD8+ T-Lymphozyten erreichten. Im Median erreichten jüngere Patienten ein Jahr nach Transplantation eine Zellzahl von 341 CD8+ T-Zellen/ $\mu$ l peripheren Bluts, wohingegen die mediane Zellzahl in der Kohorte der über 54-jährigen 742 CD8+ T-Lymphozyten betrug.

Ein Jahr nach allogener HSCT erreichten in der Kohorte der unter 54-Jährigen zehn Patienten (43%) normwertige CD8+ T-Lymphozyten von über 160 Zellen/ $\mu$ l peripheren Bluts. acht (35%) Patienten wiesen erhöhte Zellzahlen auf, fünf (22%) Patienten erreichten den Normwertbereich für CD8+ T-Lymphozyten nicht. In der Kohorte der Patienten, die 54 Jahre oder älter waren, erreichten elf (31%) Patienten den Normwertbereich für CD8+ T-Lymphozyten; in sieben (20%) Fällen verblieben die Zellzahlen unterhalb der Normwertgrenze, in 17 (49%) Fällen wurde diese überschritten.

In der Gruppe der unter 54-Jährigen erzielte ein Jahr nach allogener HSCT kein Patient normale Zellzahlen für CD4+ T-Lymphozyten; alle Patienten verblieben bis zu diesem Untersuchungszeitpunkt unterhalb der unteren Normwertgrenze von 500 CD4+ T-Lymphozyten/ $\mu$ l peripheren Bluts. Von den Patienten, die 54 Jahre oder älter waren, überschritten 12 Monate nach Transplantation vier (11%) Patienten die untere Normwertgrenze von 500 Zellen/ $\mu$ l; die übrigen 31 (88%) Patienten erreichten den Normwertbereich für CD4+ T-Lymphozyten ebenfalls nicht (Vgl. Tab. 8 und 9). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergaben sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt.

Während sich die Zellzahl der B-Lymphozyten innerhalb der ersten 12 Monate nach allogener HSCT zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschied, zeigten sich nach Ablauf des 21-monatigen Beobachtungszeitraums in der Gruppe der unter 54-Jährigen signifikant höhere Zellzahlen als in der Gruppe der über 54-jährigen Patienten ( $p= 0,041$ ). Insgesamt erreichten in der Kohorte der unter 54-Jährigen ein Jahr nach allogener HSCT 15 Patienten den Normwertbereich für B-Lymphozyten. In der Gruppe Patienten über 54 Jahre waren dies zehn Patienten. Hier wurde darüber hinaus die obere Normgrenze in drei Fällen überschritten.

Einen Überblick über die altersabhängige lymphozytäre Immunrekonstitution geben Tabelle 8 bis 10 sowie Abbildung 8 bis 11.

Tabelle 8: Altersabhängigkeit der lymphozytären Rekonstitution

Zellpopulation	Normbereich [Zellen/ $\mu$ l]	< 54 Jahre	Fallzahl	Fallzahl	Fallzahl
		Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l] n = 23	unterhalb der Norm n (%)	innerhalb der Norm n (%)	oberhalb der Norm n (%)
CD8+T-Zellen	160-775	341 (1256)	5 (22)	10 (43)	8 (35)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	223 (121)	23 (100)	0 (0)	0 (0)
NK-Zellen	35-350	159 (70)	0 (0)	17 (74)	6 (26)
B-Zellen	80-350	85 (194)	10 (43)	11 (48)	2 (9)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten < 54 Jahren unter Angabe des Medianwertes und Interquartilabstands; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 9: Altersabhängigkeit der lymphozytären Rekonstitution

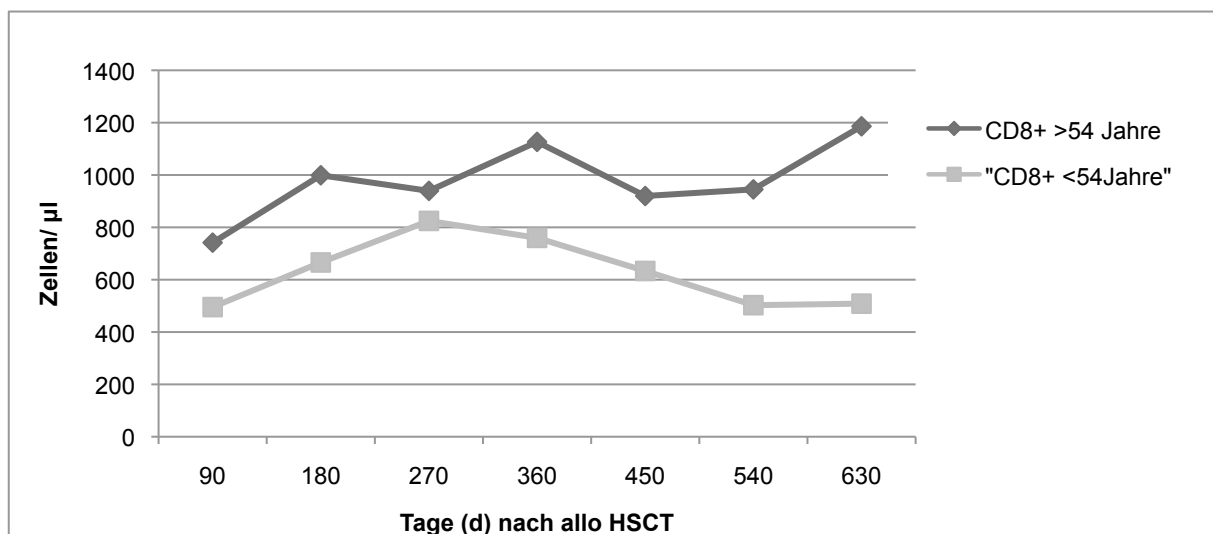
Zellpopulation	Normbereich [Zellen/ $\mu$ l]	>54 Jahre	Fallzahl	Fallzahl	Fallzahl
		Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l] n = 35	unterhalb der Norm n (%)	innerhalb der Norm n (%)	oberhalb der Norm n (%)
CD8+T-Zellen	160-775	341 (1256)	7 (20)	11 (31)	17 (49)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	223 (121)	31 (88)	3 (9)	1 (3)
NK-Zellen	35-350	159 (70)	2 (6)	21 (60)	12 (34)
B-Zellen	80-350	85 (194)	22 (63)	10 (29)	3 (9)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten > 54 Jahren unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 10: Einfluss des Alters auf die Immunrekonstitution nach allo HSCT

Lymphozytenpopulationen	< 54 Jahre	> 54 Jahre	p-Wert
<b>Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>n = 23</b>	<b>n = 35</b>	
CD 8+ T-Lymphozyten	341 (1256)	742 (1521)	0,195
CD 4+ T-Lymphozyten	223 (121)	130 (143)	0,543
NK-Zellen	159 (70)	208 (310)	0,059
B-Zellen	85 (194)	28 (186)	0,604
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
<b>Median (IQR) [g/l]</b>	<b>n = 39</b>	<b>n = 48</b>	
IgG	8,9 (8,2)	10,7 (7,27)	0,292
IgM	0,72 (1,02)	0,64 (1,05)	0,961
IgA	0,64 (0,71)	0,61(0,62)	0,611

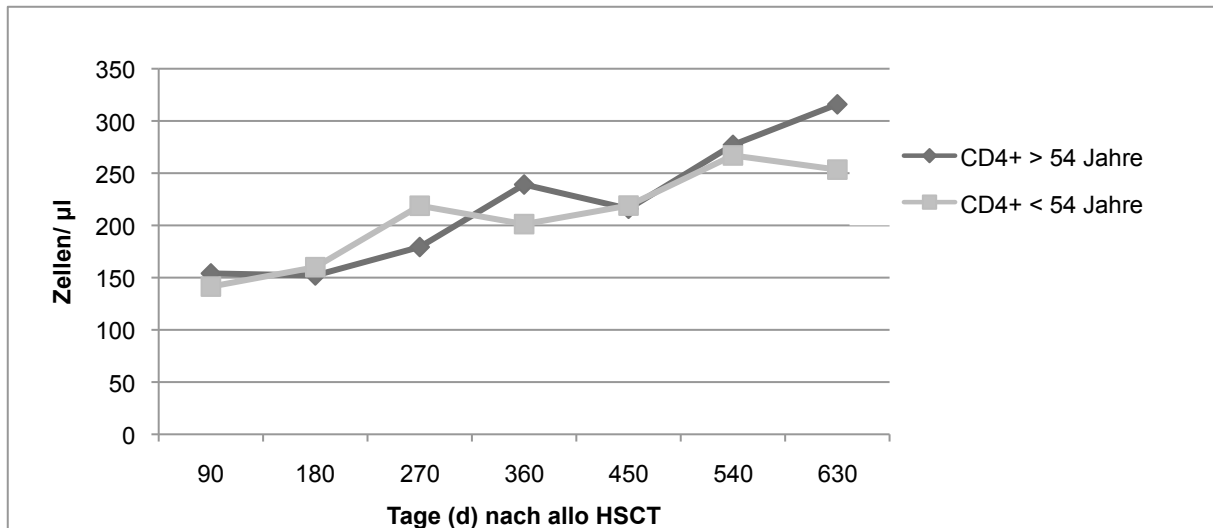
Vergleich der Lymphozytensubpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten jünger und älter als 54 Jahre; dargestellt sind die medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD8+ > 54 Jahre (n)	40	46	42	35	19	21	10
CD8+ < 54 Jahre (n)	42	41	27	23	9	7	10

Abbildung 8: Altersabhängige Entwicklung der CD8+ T- Lymphozyten im Verlauf

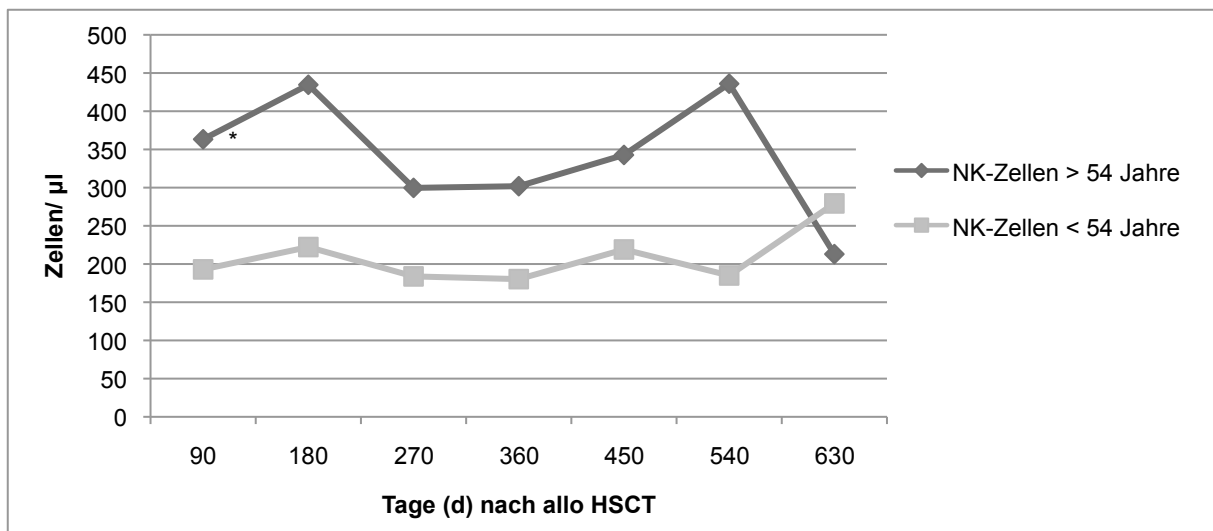
Bis 21 Monate nach allogener HSCT; dargestellt sind die Medianwerte der jeweiligen Zellreihen im Vergleich von Patienten unter und über 54 Jahren (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD4+ > 54 Jahre (n)	40	46	42	35	19	21	10
CD4+ < 54 Jahre (n)	42	41	27	23	9	7	10

Abbildung 9: Altersabhängige Entwicklung der CD4+ T- Lymphozyten im Verlauf

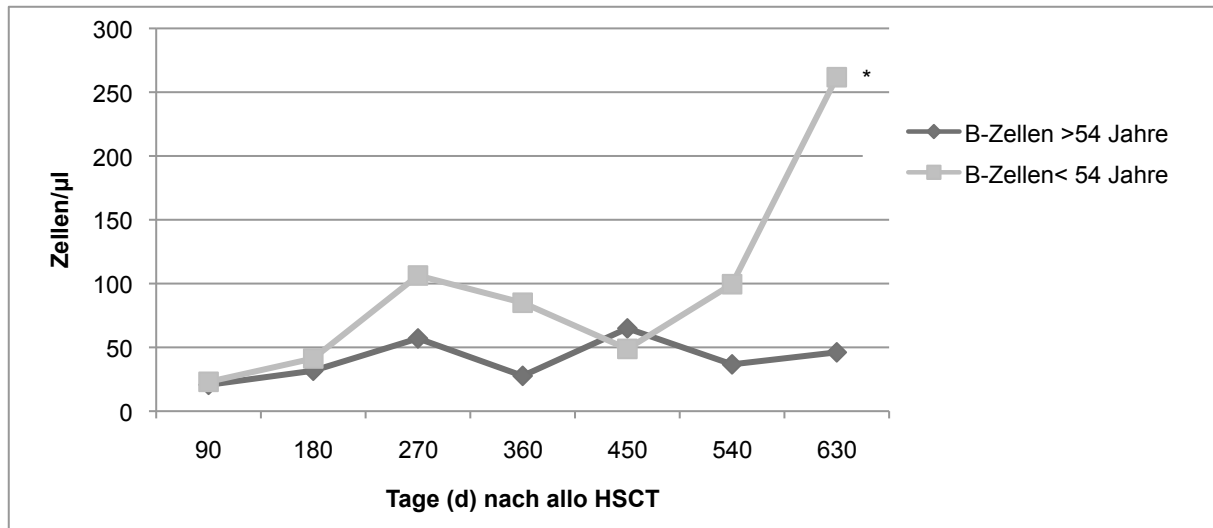
Bis 21 Monate nach allogener HSCT; dargestellt sind die Medianwerte der jeweiligen Zellreihen im Vergleich von Patienten unter und über 54 Jahren (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
NK-Zellen > 54 Jahre (n)	40	46	42	35	19	21	10
NK-Zellen < 54 Jahre (n)	42	41	27	23	9	7	10

Abbildung 10: Altersabhängige Entwicklung der NK-Zellen im Verlauf

Bis 21 Monate nach allogener HSCT; dargestellt sind die Medianwerte der jeweiligen Zellreihen im Vergleich von Patienten unter und über 54 Jahren (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ )



Tag	90	180	270	360	450	540	630
B-Zellen > 54 Jahre (n)	40	46	42	35	19	21	10
B-Zellen < 54 Jahre (n)	42	41	27	23	9	7	10

Abbildung 11: Altersabhängige Entwicklung der B-Zellen im Verlauf

Bis 21 Monate nach allogener HSCT; dargestellt sind die Medianwerte der jeweiligen Zellreihen im Vergleich von Patienten unter und über 54 Jahren (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der humoralen Konsolidierung zwischen den Alterskohorten.

### 3.4.3 Einfluss der Grunderkrankung des Empfängers

Zur Beurteilung des Einflusses der Grunderkrankung auf die immunologische Erholung der Patienten erfolgte zunächst eine Kategorisierung der Krankheitsentitäten in lymphatische und myeloische Erkrankungen. Der Vergleich beider Gruppen ergab einen hoch signifikanten Unterschied in der Bildung des Immunglobulin-Subtyps IgG über den gesamten Analysezeitraum hinweg. Auch die Menge an IgM und IgA lag bei Patienten mit lymphatischen Grunderkrankungen im Mittel unterhalb der Immunglobulinlevel der Vergleichsgruppe (vgl. Tab. 13 und Abb. 12 bis 14). Es konnte kein Zusammenhang zwischen lymphozytärer Rekonstitution und der Grunderkrankung gefunden werden. Tendenziell waren aber auch hier die Zellwerte bei Patienten mit lymphatischen Grunderkranken geringer als in der Vergleichskohorte (Vgl. Tab. 11 und 12).

Tabelle 11: Lymphozytäre Rekonstitution und Grunderkrankung

<b>Zellpopulation</b>	<b>Normbereich [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>lymphatisch Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l] n = 12</b>	<b>Fallzahl unterhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl innerhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl oberhalb der Norm n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	746 (1540)	3 (25)	5 (42)	4 (33)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	179 (175)	12 (100)	0 (0)	0 (0)
NK-Zellen	35-350	180 (262)	0 (0)	10 (83)	2 (17)
B-Zellen	80-350	42 (197)	8 (67)	3 (25)	1 (8)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten mit lymphatischer Grunderkrankung unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 12: Lymphozytäre Rekonstitution und Grunderkrankung

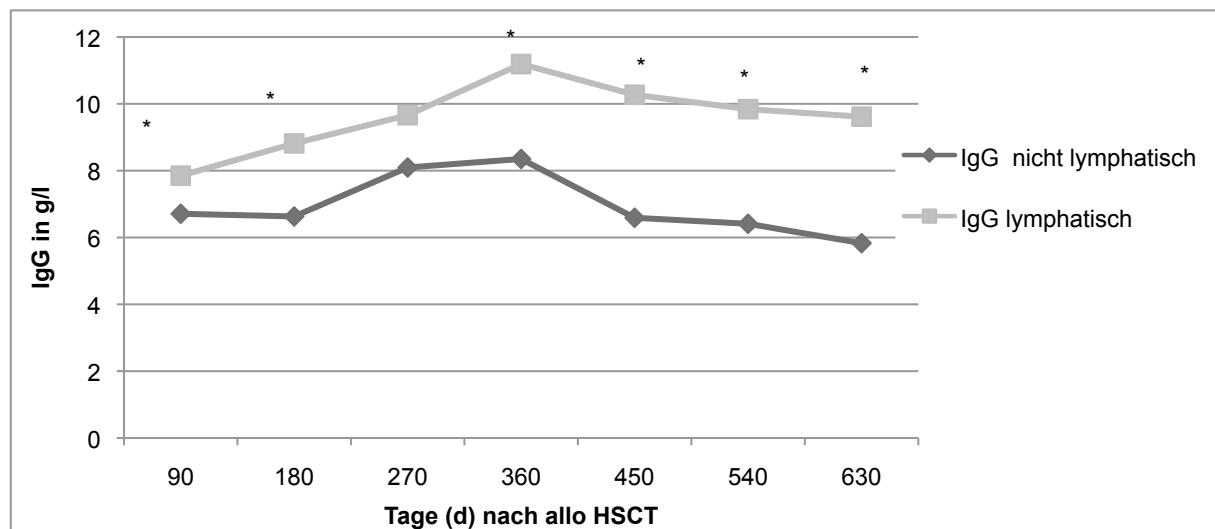
<b>Zellpopulation</b>	<b>Normbereich [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>Nicht lymphatisch Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l] n = 43</b>	<b>Fallzahl unterhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl innerhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl oberhalb der Norm n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	746 (1540)	3 (7)	19 (44)	21 (48)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	179 (175)	39 (91)	3 (7)	1 (2)
NK-Zellen	35-350	180 (262)	2 (5)	30 (70)	11 (26)
B-Zellen	80-350	42 (197)	23 (53)	16 (37)	4 (9)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten mit nicht lymphatischer Grunderkrankung unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 13: Einfluss der Grunderkrankung auf die Immunrekonstitution nach allogener HSCT

<b>Lymphozytenpopulationen</b>	<b>Lymphatische Grunderkrankung</b>	<b>Nicht lymphatische Grunderkrankung</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>n = 12</b>	<b>n = 43</b>	
CD 8+ T-Lymphozyten	184 (1609)	742 (1357)	0,199
CD 4+ T-Lymphozyten	122 (134)	189 (144)	0,237
NK-Zellen	151 (89)	184 (255)	0,870
B-Zellen	26 (122)	69 (192)	0,275
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
<b>Median (IQR) [g/l]</b>	<b>n = 20</b>	<b>n = 60</b>	
IgG	7,94 (6,71)	11,19 (9,0)	0,016*
IgM	0,5 (1,27)	0,65 (0,94)	0,087
IgA	0,77 (0,69)	0,64 (0,74)	0,933

Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen Patienten mit lymphatischen und nicht lymphatischen Grunderkrankungen ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \*=  $p \leq 0,05$ ).

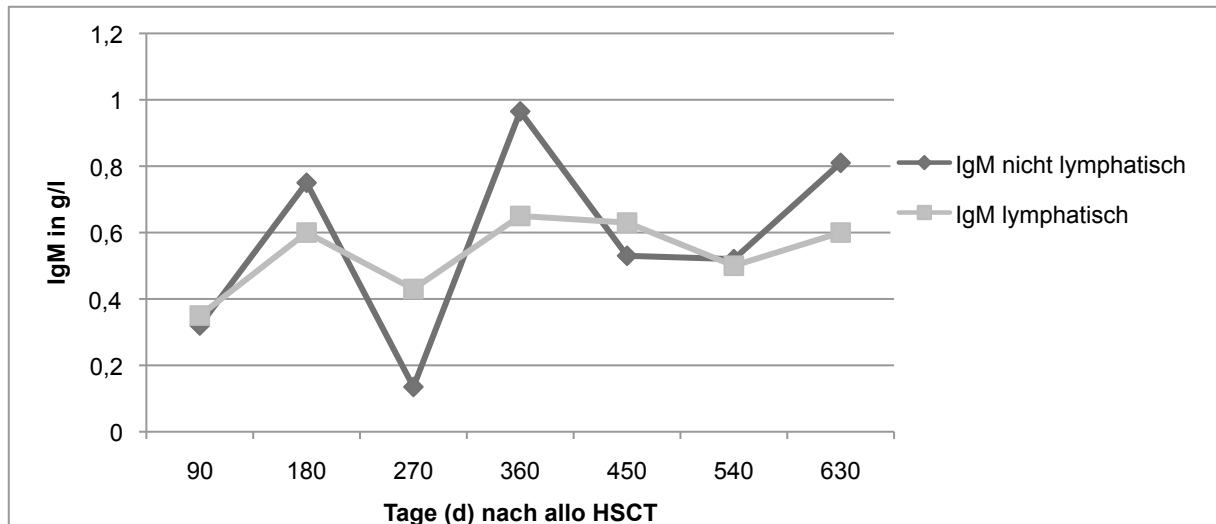


Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgG lymphatisch (n)	31	23	19	18	17	12	12
IgG nicht lymphatisch (n)	88	78	72	60	48	40	35

Abbildung 12: IgG in Abhängigkeit der Grunderkrankung im Verlauf nach allogener HSCT

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit lymphatischer und nicht lymphatischer Grunderkrankung anhand der medianen Immunglobulinlevel in g/l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \*=  $p \leq 0,05$ ).

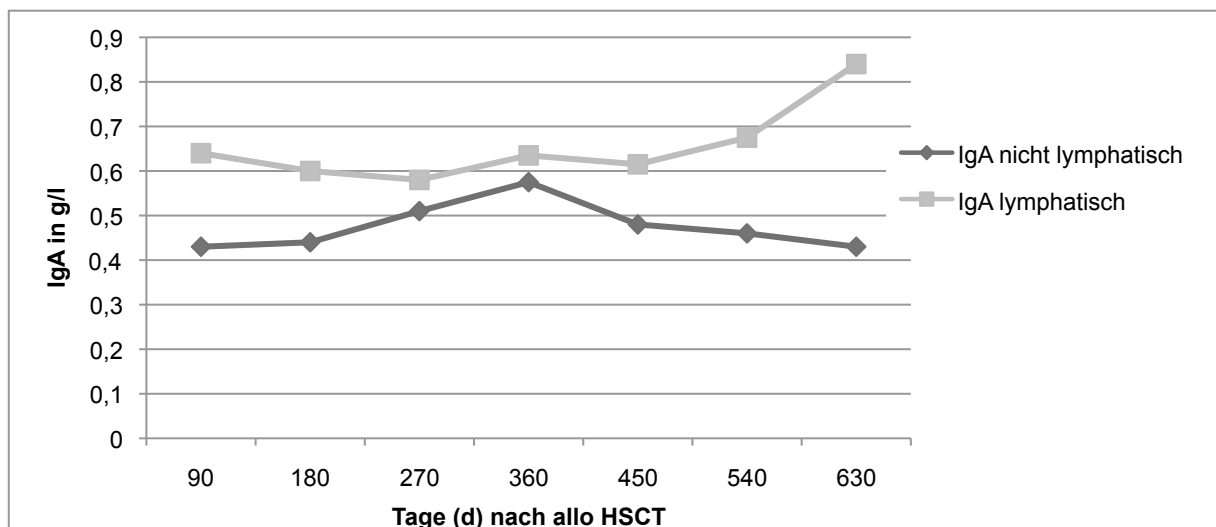




Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgM lymphatisch (n)	31	23	19	18	17	12	12
IgM nicht lymphatisch (n)	88	78	72	60	48	40	35

Abbildung 13: IgM in Abhängigkeit der Grunderkrankung im Verlauf nach allogener HSCT

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit lymphatischer und nicht lymphatischer Grunderkrankung anhand der medianen Immunglobulinlevel in g/l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgA lymphatisch (n)	31	23	19	18	17	12	12
IgA nicht lymphatisch (n)	88	78	72	60	48	40	35

Abbildung 14: IgA in Abhängigkeit der Grunderkrankung im Verlauf nach allogener HSCT

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit lymphatischer und nicht lymphatischer Grunderkrankung anhand der medianen Immunglobulinlevel in g/l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

Ein Jahr nach allogener HSCT war die zelluläre Rekonstitution bei Patienten mit nicht lymphatischen Grunderkrankungen tendenziell weiter vorangeschritten, ohne dass das Signifikanzniveau erreicht wurde (vgl. Tab 11).

### **3.5 Therapieassoziierte Einflussfaktoren auf die regelgerechte Immunrekonstitution**

Ein weiterer Bereich der Analyse umfasste die Bewertung der immunologischen Regeneration nach allogener HSCT vor dem Hintergrund der Anwendung unterschiedlicher Therapieeinflüsse. Hierzu wurde die lymphozytäre und humorale Erholung innerhalb des Patientenkollektivs hinsichtlich der Spender-Empfänger-Relation, des angewendeten Konditionierungsregimes und der Anwendung von ATG und Alemtuzumab zur GvHD-Prophylaxe untersucht. Zusätzlich wurden die Effekte der Vergabe von Donor-Lymphozyten-Infusionen im Hinblick auf die Immunrekonstitution bewertet.

#### **3.5.1 HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger**

Zur Objektivierung des Einflusses der Spenderselektion auf die lymphozytäre und humorale Rekonstitution wurden zunächst HLA-identen und HLA-differente Transplantationskonstellationen einander gegenübergestellt. Die Testung der beiden Kohorten ergab signifikant höhere Zellwerte der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten 3 Monate ( $p = 0,025$ ) nach HLA-identer Transplantation. Die übrigen lymphatischen Zelllinien sowie die Immunglobulinsubtypen zeigten eine zwischen den Untersuchungsgruppen vergleichbare Immunrekonstitution. Ein Jahr nach allogener HSCT zeigte sich in Anlehnung an die Referenzbereiche für Lymphozyten eine tendenziell kongruente B-Zell-Rekonstitution im Vergleich HLA-identer zu HLA-differenter Transplantation; die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten rekonstituierten in den ersten 12 bis 15 Monaten nach HLA-identer HSCT zwar tendenziell schneller, zeigten im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch vergleichbare Zellzahlen wie nach HLA-differenter Transplantation. Nähere Angaben zum Einfluss der HLA-Konstellation auf die zelluläre und humorale Rekonstitution sind den Abbildungen 15 bis 18 sowie Tabelle 14 bis 16 zu entnehmen.

Tabelle 14: Lymphozytäre Rekonstitution und HLA-Kompatibilität

<b>Zellpopulation</b>	<b>Normbereich [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>HLA-match Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l] n = 42</b>	<b>Fallzahl unterhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl innerhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl oberhalb der Norm n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	746 (1540)	7 (22)	14 (43)	21 (35)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	179 (175)	38 (91)	3 (7)	1 (2)
NK-Zellen	35-350	180 (262)	2 (5)	28 (67)	12 (28)
B-Zellen	80-350	42 (197)	25 (60)	11 (26)	6 (14)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten nach HLA-identer HSCT unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 15: Lymphozytäre Rekonstitution und HLA-Kompatibilität

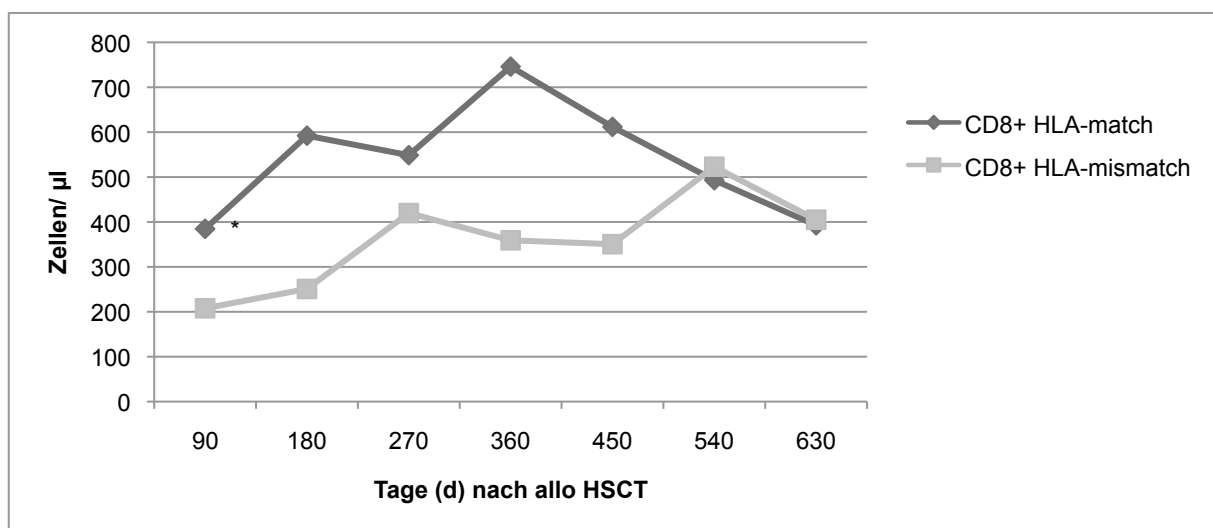
<b>Zellpopulation</b>	<b>Normbereich [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>HLA- mismatch Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l] n = 16</b>	<b>Fallzahl unterhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl innerhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl oberhalb der Norm n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	359 (677)	5 (36)	7 (50)	4 (29)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	125 (120)	16 (100)	0 (0)	0 (0)
NK-Zellen	35-350	177 (141)	0 (0)	14 (86)	2 (14)
B-Zellen	80-350	89 (156)	7 (44)	9 (56)	0 (0)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten nach HLA-differenter HSCT unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 16: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Immunrekonstitution nach allogener HSCT

<b>Lymphozytenpopulationen</b>	<b>HLA-match</b>	<b>HLA-mismatch</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>n = 42</b>	<b>n = 20</b>	
CD 8+ T-Lymphozyten	746 (1540)	359 (676)	0,095
CD 4+ T-Lymphozyten	179 (175)	124 (120)	0,204
NK-Zellen	180 (262)	177 (141)	0,578
B-Zellen	42 (197)	89 (156)	0,595
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
<b>(g/l)</b>	<b>n = 67</b>	<b>n = 20</b>	
IgG	9,91 (7,69)	9,7 (5,67)	0,816
IgM	0,67 (1,13)	0,82 (0,9)	0,972
IgA	0,64 (0,69)	0,59 (0,66)	0,996

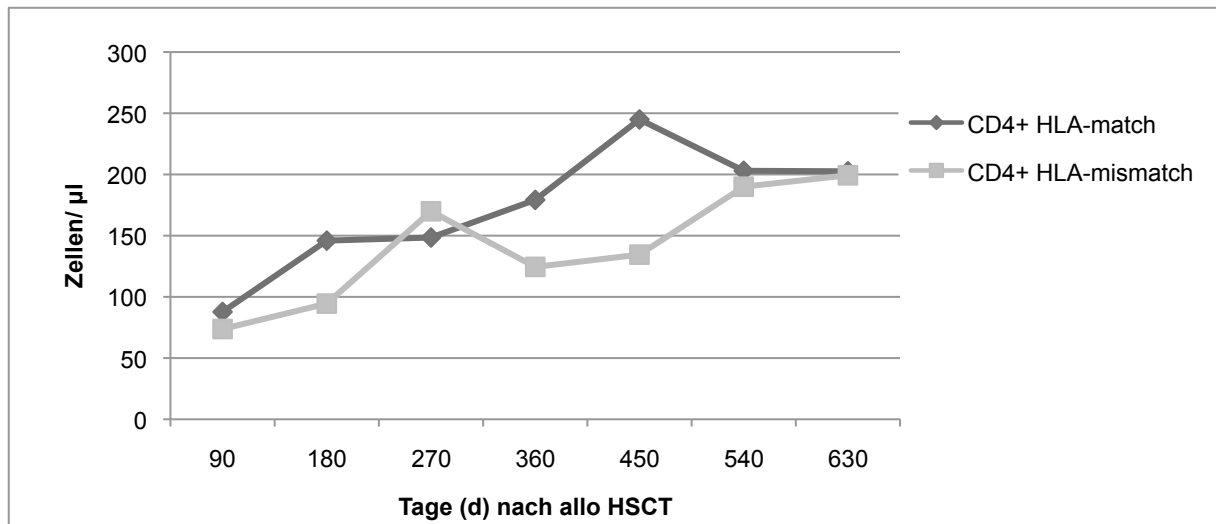
Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen Patienten mit und ohne vollständiges HLA-match ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD8+ HLA-match (n)	60	66	55	42	20	19	15
CD8+ HLA-mismatch (n)	22	21	14	16	8	9	5

Abbildung 15: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution CD8+ T-Lymphozyten

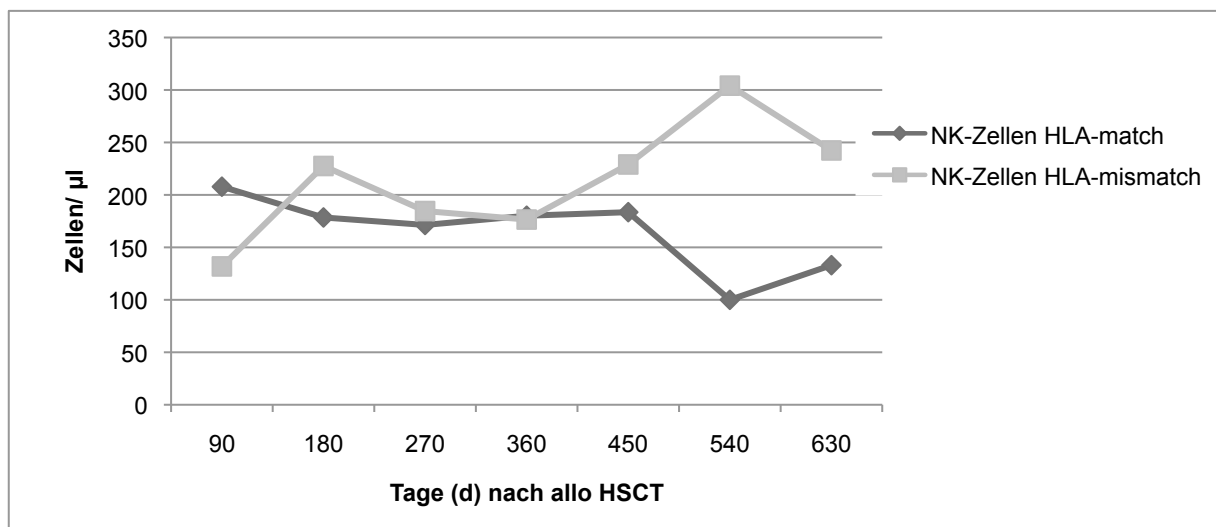
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach HLA-identer und HLA-differenter Stammzelltransplantation anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD4+ HLA-match (n)	60	66	55	42	20	19	15
CD4+ HLA-mismatch (n)	22	21	14	16	8	9	5

Abbildung 16: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution CD4+ T-Lymphozyten

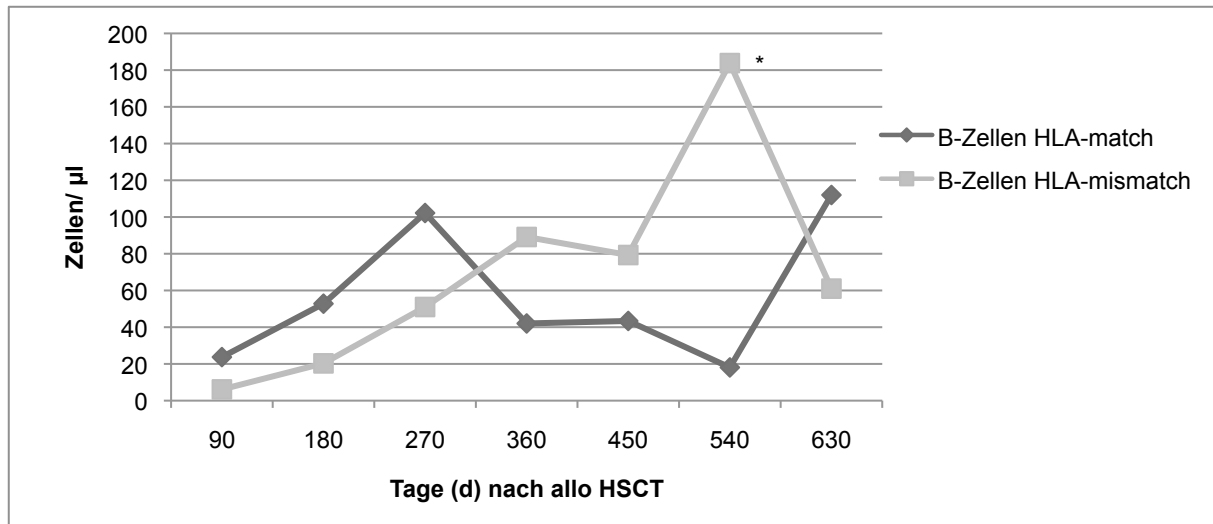
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach HLA-identer und HLA-differenter Stammzelltransplantation anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
NK-Zellen HLA-match (n)	60	66	55	42	20	19	15
NK-Zellen HLA-mismatch (n)	22	21	14	16	8	9	5

Abbildung 17: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution der NK-Zellen

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach HLA-identer und HLA-differenter Stammzelltransplantation anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
B-Zellen HLA-match (n)	60	66	55	42	20	19	15
B-Zellen HLA-mismatch (n)	22	21	14	16	8	9	5

Abbildung 18: Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Rekonstitution der B-Zellen

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach HLA-identer und HLA-differenter Stammzelltransplantation anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 17: Immunrekonstitution bei HLA-match verwandt und unverwandt

Lymphozytenpopulationen Median (IQR) [Zellen/µl]	HLA-match verwandt n = 8	HLA-match nicht verwandt n = 34	p-Wert
	CD 8+ T-Lymphozyten	203 (469)	
CD 4+ T-Lymphozyten	121 (143)	214 (198)	0,162
NK-Zellen	162 (104)	185 (275)	0,347
B-Zellen	29 (167)	53 (205)	0,835
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
(g/l)	n = 17	n = 50	
IgG	9,91 (7,69)	10,62 (8,07)	0,292
IgM	0,67 (1,13)	0,82 (1,25)	0,100
IgA	0,64 (0,69)	0,70 (0,73)	0,124

Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro µl Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen verwandten und nicht verwandten Patienten mit vollständigem HLA-match ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

Ein detaillierter Vergleich verwandter zu nicht verwandter HLA-identer (10/10) Transplantation ergab konstant höhere Zellzahlen in der Gruppe HLA-identer nicht verwandter Spender-Empfänger-Paare (vgl. Tab. 17). In diesem Zusammenhang waren allerdings keine signifi-

kanten Unterschiede zu verzeichnen. Ein statistischer Trend zu höheren Zellzahlen in dieser Gruppe bestand jedoch für CD8+ T-Lymphozyten 9 Monate ( $p = 0,053$ ) und 12 Monate ( $p = 0,066$ ) sowie für CD4+ T-Lymphozyten 9 Monate ( $p = 0,074$ ) nach allogener HSCT.

### 3.5.2 Konditionierungsregime

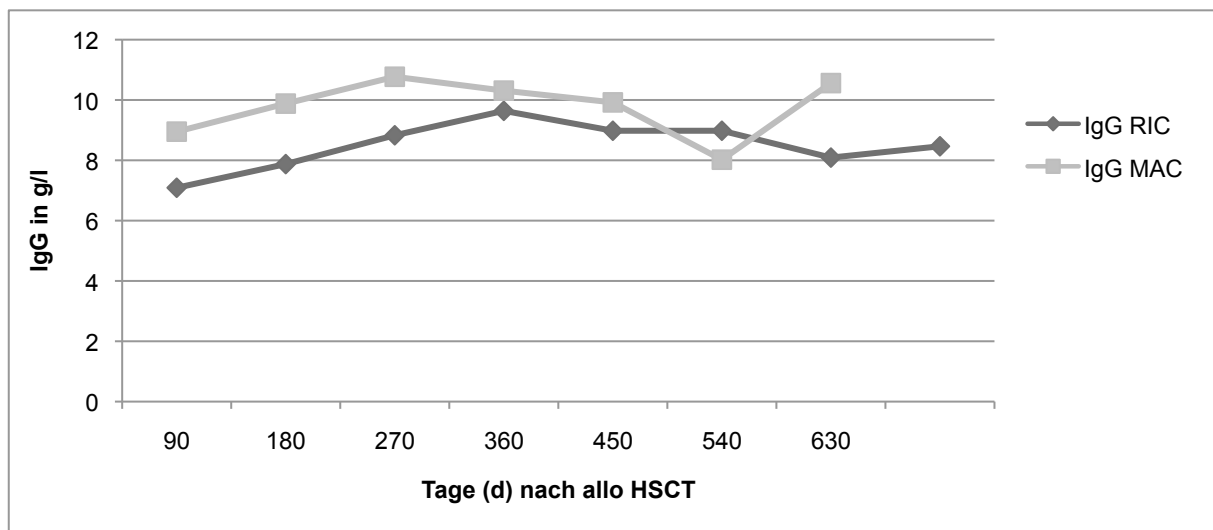
Hinsichtlich der Konditionierungsregime wurden für die statistische Auswertung dosisreduzierte und myeloablative Konditionierungstherapien unterschieden. Unter den myeloablativ behandelten Patienten zeigten sich bis auf in der Population CD8+ T-Lymphozyten ein Jahr nach allogener HSCT im Median höhere Zellzahlen innerhalb aller Lymphozyten-subpopulationen im Vergleich zur Kohorte dosisreduziert behandelter Patienten. Bezogen auf die oben angegebenen Normwertbereiche verblieben die CD4+ T-Lymphozyten in beiden Vergleichsgruppen unterhalb der unteren Normwertgrenze; CD8+ T-Zellen und NK-Zellen lagen jeweils innerhalb des Normwertbereichs. B-Zellen erreichten nur in der Kohorte der myeloablativ behandelten Patienten ihren Referenzbereich (vgl. Tabelle 18). Signifikante Unterschiede in der zahlenmäßigen Rekonstitution der Lymphozytenpopulationen zwischen beiden Kohorten konnten nicht festgestellt werden.

In der humoralen Rekonstitution wurden signifikante Unterschiede in Bezug auf die Immunglobulinsubtypen IgM und IgA gefunden. In der Kohorte myeloablativer Konditionierung war die Immunglobulinproduktion an IgM ein Jahr nach allogener HSCT signifikant höher als in der dosisreduziert behandelten Kohorte ( $p = 0,013$ ). Einen Überblick über die humorale Rekonstitution im Verlauf des Untersuchungszeitraums geben die Abbildungen 19 bis 21.

Tabelle 18: Immunrekonstitution nach differierender Konditionierung

Lymphozytenpopulationen	RIC	MAC	p-Wert
Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l]	n = 55	n = 3	
CD 8+ T-Lymphozyten	557 (1484)	437 (1077)	0,958
CD 4+ T-Lymphozyten	153 (131)	252 (119)	0,200
NK-Zellen	177 (247)	196 (48)	0,847
B-Zellen	47 (193)	98 (110)	0,450
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
(g/l)	n = 81	n = 6	
IgG	9,64 (7,68)	10,31 (4,89)	0,366
IgM	0,65 (0,96)	1,35 (1,61)	0,013*
IgA	0,63 (0,69)	0,78 (1,2)	0,173

Der Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) ein Jahr nach allogener HSCT nach dosisreduzierter und myeloablativer Konditionierung; dargestellt sind die medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l sowie Immunglobuline (in g/l) Blut mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

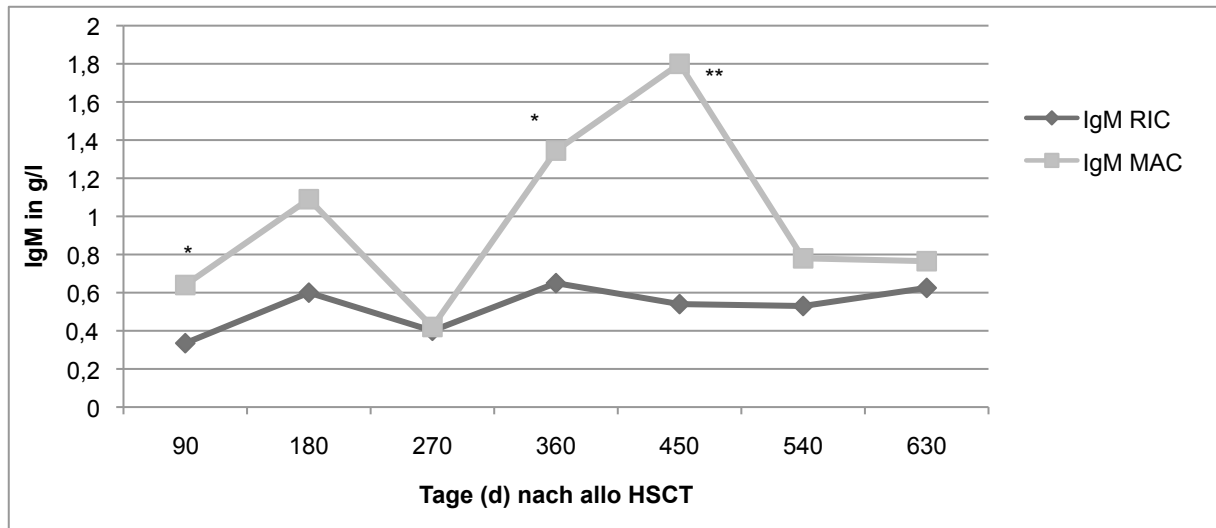


Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgG RIC (n)	117	104	93	81	68	53	50
IgG MAC (n)	11	8	7	6	5	3	4

Abbildung 19: IgG im Verlauf nach allogener HSCT nach differierender Konditionierung

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach reduzierter und myeloablativer Konditionierung anhand der medianen Immunglobulinlevel in g/l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

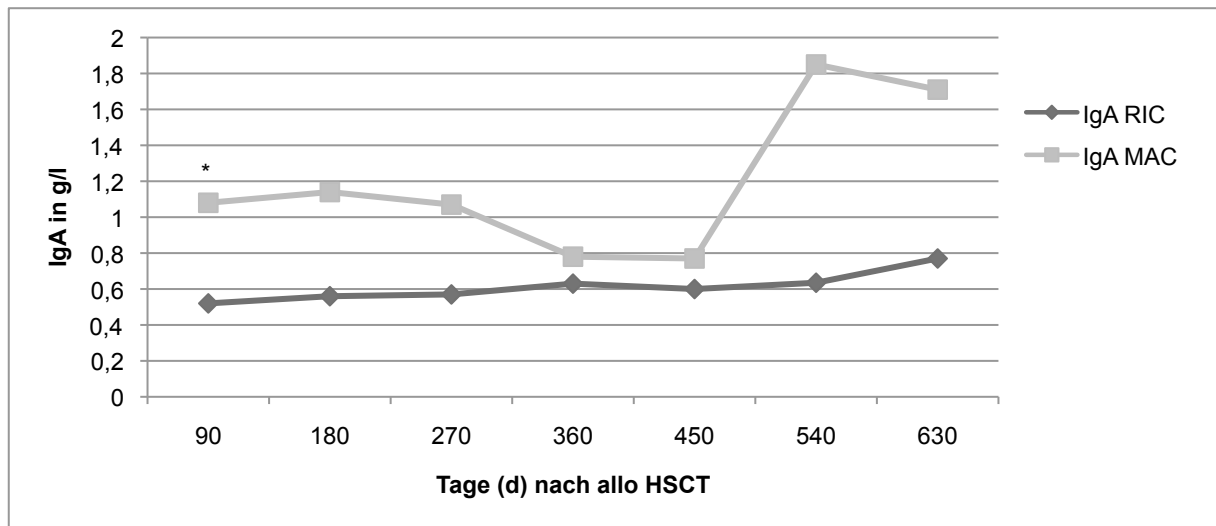




Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgM RIC (n)	117	104	93	81	68	53	50
IgM MAC (n)	11	8	7	6	5	3	4

Abbildung 20: IgM im Verlauf nach allogener HSCT nach differierender Konditionierung

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach reduzierter und myeloablativer Konditionierung anhand der medianen Immunglobulinlevel in g/l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgA RIC (n)	117	104	93	81	68	53	50
IgA MAC (n)	11	8	7	6	5	3	4

Abbildung 21: IgA im Verlauf nach allogener HSCT nach differierender Konditionierung

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach reduzierter und myeloablativer Konditionierung anhand der medianen Immunglobulinlevel in g/l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens wiesen die Vergleichskohorten bis 600 Tage nach HSCT ähnliche Überlebenswahrscheinlichkeiten auf. 100 Tage nach allogener HSCT waren noch 89% der Patienten nach dosisreduzierter Konditionierung am Leben; im Vergleich dazu 92% der Patienten nach Anwendung myeloablativer Konditionierungsregime. Ein Jahr nach allogener HSCT überlebten 67% der reduziert konditionierten und 72% der myeloablativ konditionierten Patienten; 2 Jahre nach Transplantation waren dies 63% der RIC- und 67% der MAC-Kohorte.

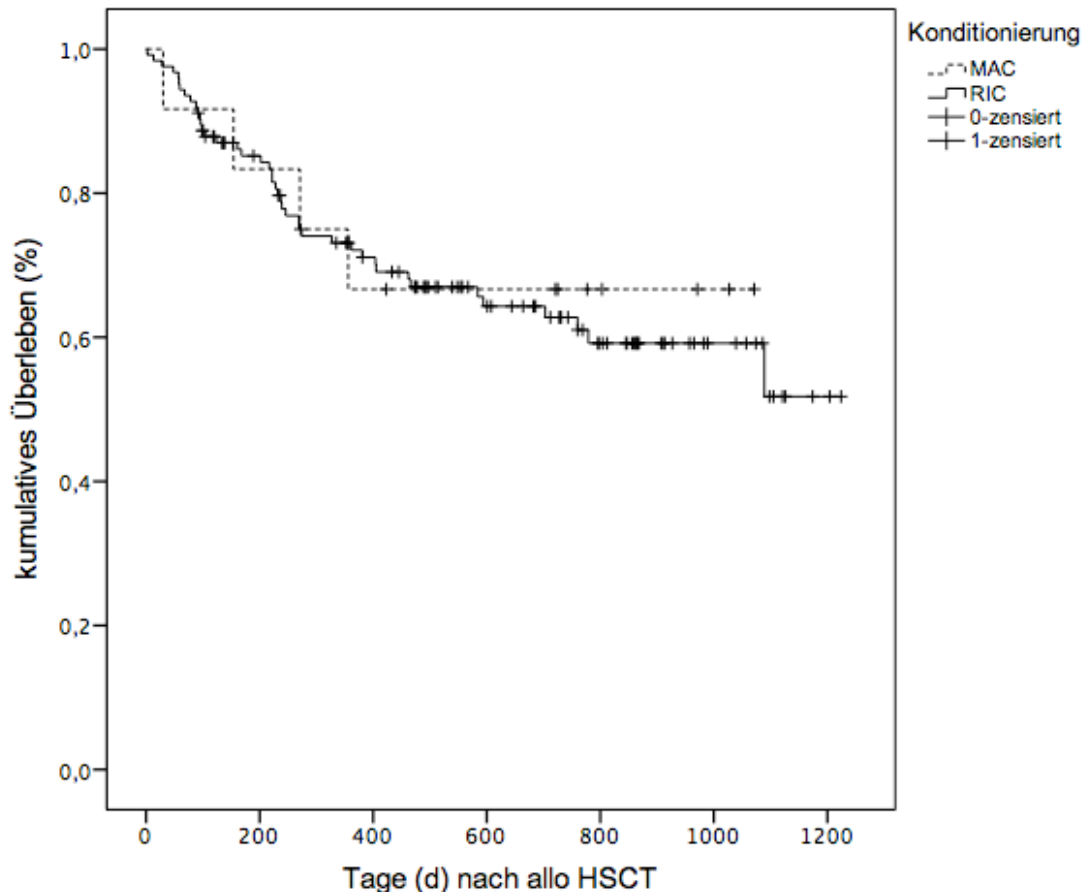


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve des Patientenüberlebens nach dosisreduzierter und myeloablativer Konditionierung

Es wird die Wahrscheinlichkeit aufgezeigt, dass Patienten die Zeit nach allogener HSCT (in Tagen) überleben.

Die unterschiedlichen Konditionierungsregime wurden einander anschließend unter dem Aspekt der Anwendung von ATG (n = 110) und Alemtuzumab (n = 26) zur GvHD-Prophylaxe gegenübergestellt.

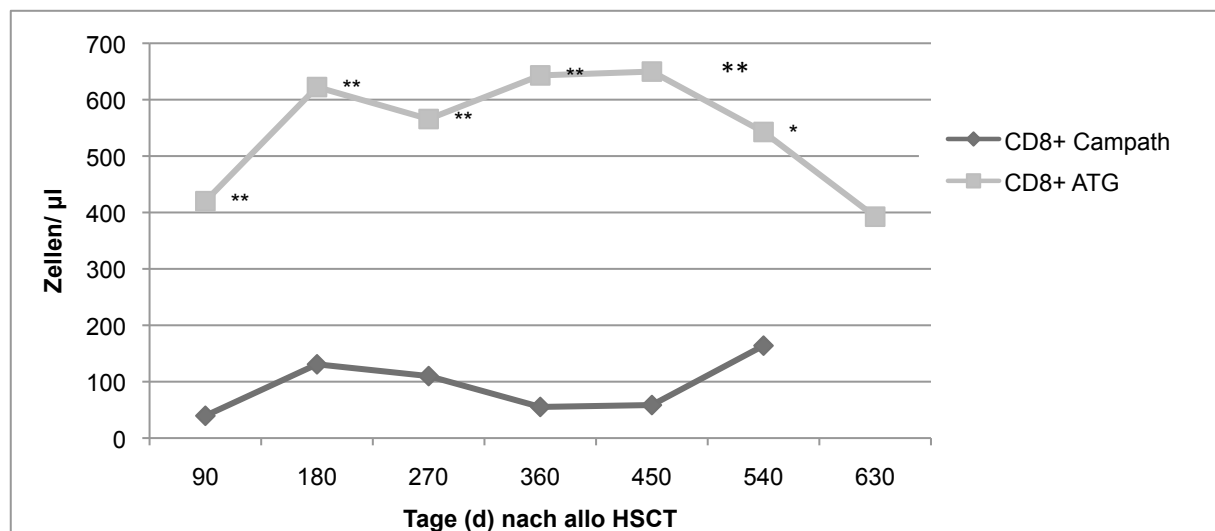
Signifikante Unterschiede ließen sich nur in der Entwicklung der T-Lymphozyten erkennen; Patienten, die während der Konditionierung Alemtuzumab erhielten, zeigten bis 15 Monate nach allogener HSCT signifikant niedrigere CD8+-Zellzahlen als Patienten, die sich einer Behandlung mit ATG unterzogen. Die exakten Werte sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Signifikante Unterschiede innerhalb der übrigen Zellpopulationen durch die Anwendung von ATG oder Alemtuzumab bestanden ebenso wenig wie signifikante Unterschiede in der humoralen Rekonstitution (vgl. Abb. 23 bis 26).

Tabelle 19: Einfluss der T-Zell-Depletion auf die Immunrekonstitution

Lymphozytenpopulationen	Alemtuzumab	ATG	p-Wert
Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l]	n = 6	n = 52	
CD 8+ T-Lymphozyten	55 (310)	643 (1468)	0,003**
CD 4+ T-Lymphozyten	152 (307)	162 (136)	0,740
NK-Zellen	245 (376)	165 (205)	0,261
B-Zellen	10 (330)	59 (183)	0,720
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
(g/l)	n = 10	n = 74	
IgG	7,77 (6,04)	10,15 (6,95)	0,115
IgM	0,86 (1,66)	0,68 (1,00)	0,934
IgA	0,81 (1,96)	0,63 (0,65)	0,228

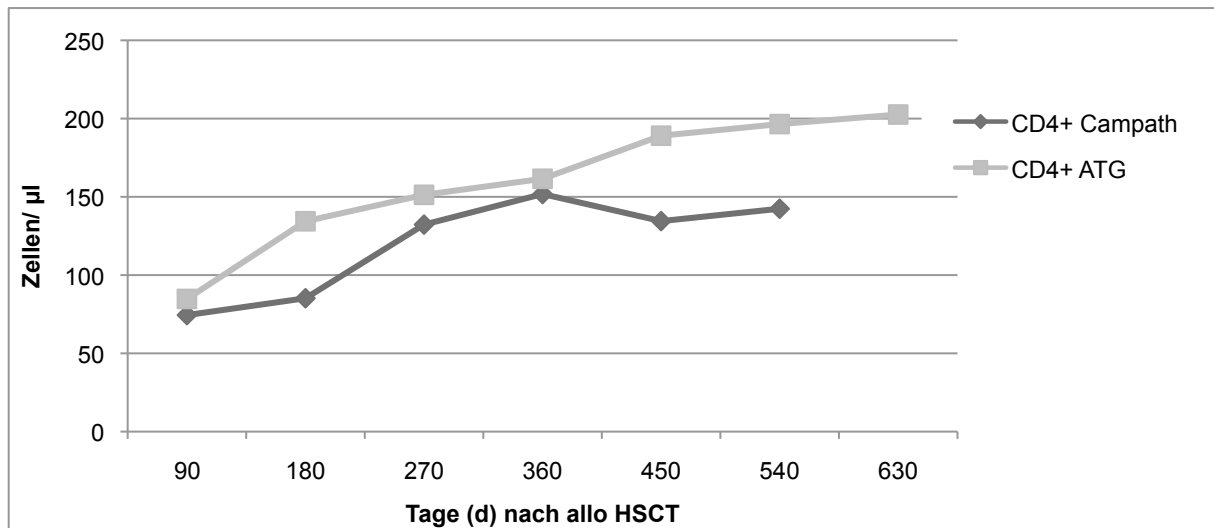
Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen Patienten nach Alemtuzumab- und ATG- haltiger Behandlung ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD8+ Alemtuzumab (n)	15	15	8	6	6	4	1
CD8+ ATG (n)	67	72	61	22	24	24	19

Abbildung 23: Rekonstitution der CD8+ T-Lymphozyten nach T-Zell-Depletion

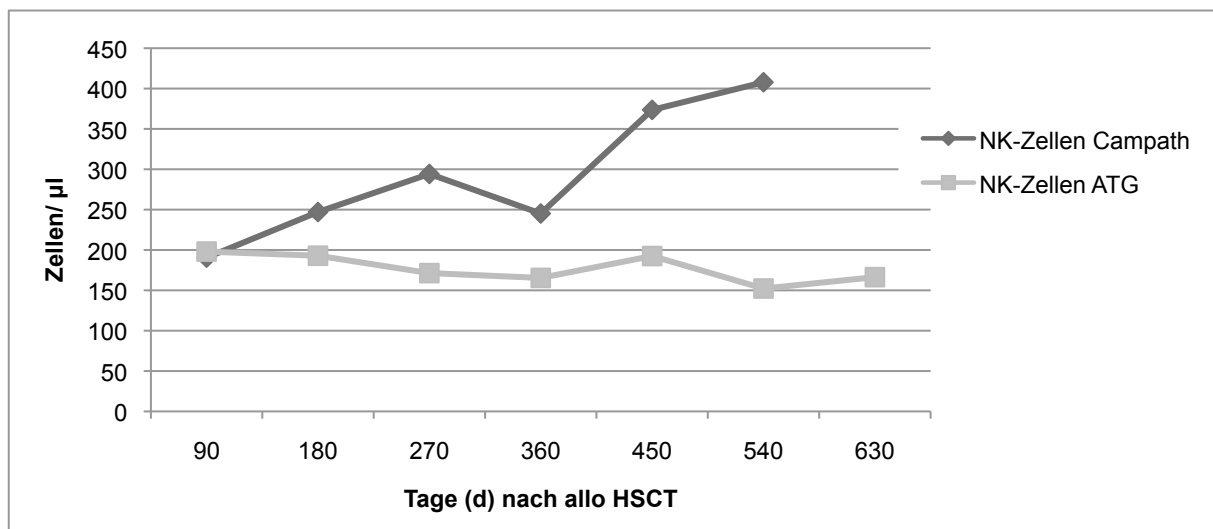
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach Alemtuzumab- und ATG- haltiger Behandlung anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD4+ Alemtuzumab (n)	15	15	8	6	6	4	1
CD4+ ATG (n)	67	72	61	22	24	24	19

Abbildung 24: Rekonstitution der CD4+ T-Lymphozyten nach T-Zell-Depletion

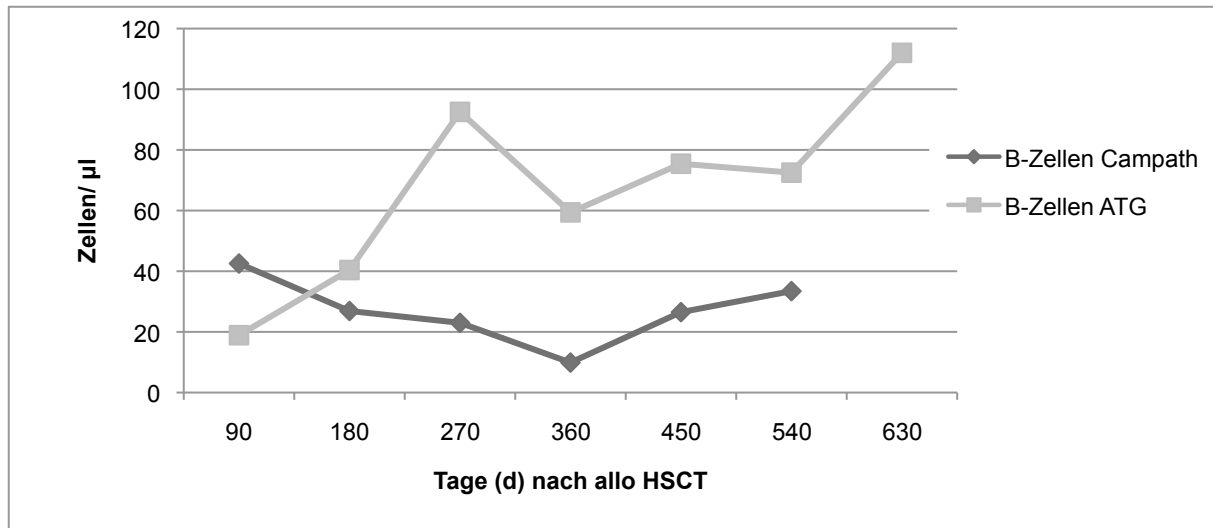
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach Alemtuzumab- und ATG- haltiger Behandlung anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*= p ≤ 0,005, \*p ≤ 0,05).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
NK-Zellen Alemtuzumab (n)	15	15	8	6	6	4	1
NK-Zellen ATG (n)	67	72	61	22	24	24	19

Abbildung 25: Rekonstitution der NK-Zellen nach T-Zell-Depletion

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach Alemtuzumab- und ATG- haltiger Behandlung anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*= p ≤ 0,005, \*p ≤ 0,05).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
B-Zellen Alemtuzumab (n)	15	15	8	6	6	4	1
B-Zellen ATG (n)	67	72	61	22	24	24	19

Abbildung 26: Rekonstitution der B-Zellen nach T-Zell-Depletion

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten nach Alemtuzumab- und ATG- haltiger Behandlung anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

### 3.5.3 Donor-Lymphozyten-Infusionen

Um eine Beeinflussung der Immunrekonstitution durch immunsupportive Therapiemaßnahmen zu analysieren, wurden die Lymphozytenpopulationen und Immunglobulinlevel mit einer zeitlich vorangegangenen Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) korreliert. In 13 der insgesamt 16 Fälle einer Vergabe von DLI wurden diese Patienten mit Rezidiv der Grunderkrankung verabreicht. Hier war ein signifikanter Zusammenhang der CD4+ T-Zellen an Tag 360 und Tag 450 mit der Verabreichung von DLI an Tag 180 zu erkennen. Die Gabe von DLI an Tag 180 war zudem mit der Höhe der Zellzahlen für B-Lymphozyten an Tag 270 und Tag 360 sowie der NK-Zellen an Tag 360 und 630 korreliert. Die Medianwerte der angegebenen Zellpopulationen in der Patientenkohorte, die einer DLI unterzogen wurde, waren zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils signifikant höher als in der Vergleichsgruppe. Korrelationen zwischen der Gabe von DLI und der humoralen Rekonstitution bestanden nicht. Trotz der beschriebenen temporären Beeinflussung der Zellwerte der verschiedenen Lymphozytenpopulationen ergab eine Gegenüberstellung beider Kohorten vergleichbare Ergebnisse der Gesamtrekonstitution nach 21 Monaten.

## 3.6 Verlaufsassoziierte Einflussfaktoren auf die regelgerechte Immunrekonstitution

### 3.6.1 GvHD

86 (63%) Patienten entwickelten nach Transplantation eine akute GvHD. Gemäß der Einteilung nach Glucksberg *et al.* (Glucksberg et al., 1974) lag bei 42 (31%) Patienten eine aGvHD 1°, bei 19 (14%) Patienten eine aGvHD 2° und bei 18 (13%) Patienten eine aGvHD 3° vor; Sieben (5%) Patienten entwickelten im Verlauf eine aGvHD 4°. Eine chronische GvHD wurde bei 40 (39%) Patienten diagnostiziert. Davon entsprachen 12 (12%) Fälle einem limitierten und 26 (25%) Fälle einem extensiven Verlauf. Zwei (2%) Fälle ließen sich in ihrem Ausprägungsgrad nicht näher definieren. 34 Patienten waren einer langfristigen Kontrolle nicht zugänglich (lost of follow-up), sodass diese Fälle aus der Analyse ausgeschlossen wurden (vgl. Tab 20).

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung akuter und chronischer GvHD

<b>Akute GvHD</b>	
Keine	48 (36%)
Grad 1	42 (31%)
Grad 2	19 (14%)
Grad 3	18 (13%)
Grad 4	7 (5%)
<b>Chronische GvHD</b>	
Keine	62 (61%)
Limited	12 (12%)
Extensive	26 (25%)
Ausprägung unbekannt	2 (2%)

GvHD innerhalb des Patientenkollektivs.

Um die Beeinflussung der regelrechten Immunrekonstitution durch das Auftreten einer cGvHD zu evaluieren, wurden die Entwicklung der Lymphozytenpopulationen und der Immunglobulinlevel zwischen Patienten mit und ohne cGvHD verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Rekonstitution des T- und B-Zellsystems bei Patienten mit chronischer GvHD insgesamt latent verzögert ablief. Ein Jahr nach allogener HSCT waren die Zellzahlen aller Lymphozytenpopulationen bei Patienten mit cGvHD gegenüber nicht erkrankten Patienten erniedrigt; gleiches galt für die Immunglobulinfraktionen (vgl. Tab. 23). Reliable signifikante Unterschiede in der zellulären und humoralen Rekonstitution ergaben sich für B-Zellen zu

den Untersuchungszeitpunkten 360, 540 und 630; diese Beobachtung deckt sich mit der signifikant verzögerten Rekonstitution der Immunglobulinfraktionen IgG und IgM bei Patienten mit durchlaufener cGvHD (vgl. Abb. 31 bis 33). Die Rekonstitution der CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen verlief im Gruppenvergleich weitgehend ähnlich (Vgl. Abb. 27 bis 30 sowie Tab. 21 und 22). Eine Korrelation zwischen Auftreten einer cGvHD mit dem Patientenalter oder dem angewandten Konditionierungsregime bestand nicht.

Tabelle 21: Lymphozytäre Rekonstitution und cGvHD

<b>Zellpopulation</b>	<b>Normbereich [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>cGvHD Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l] n = 25</b>	<b>Fallzahl unterhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl innerhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl oberhalb der Norm n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	486 (1534)	7 (28)	7 (28)	11 (44)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	113 (140)	23 (92)	1 (4)	1 (4)
NK-Zellen	35-350	153 (239)	1 (4)	18 (72)	6 (24)
B-Zellen	80-350	13 (92)	16 (64)	16 (32)	1 (4)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten mit cGvHD unter Angabe des Medianwertes und des Interquartilsabstands; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 22: Lymphozytäre Rekonstitution ohne stattgehabte cGvHD

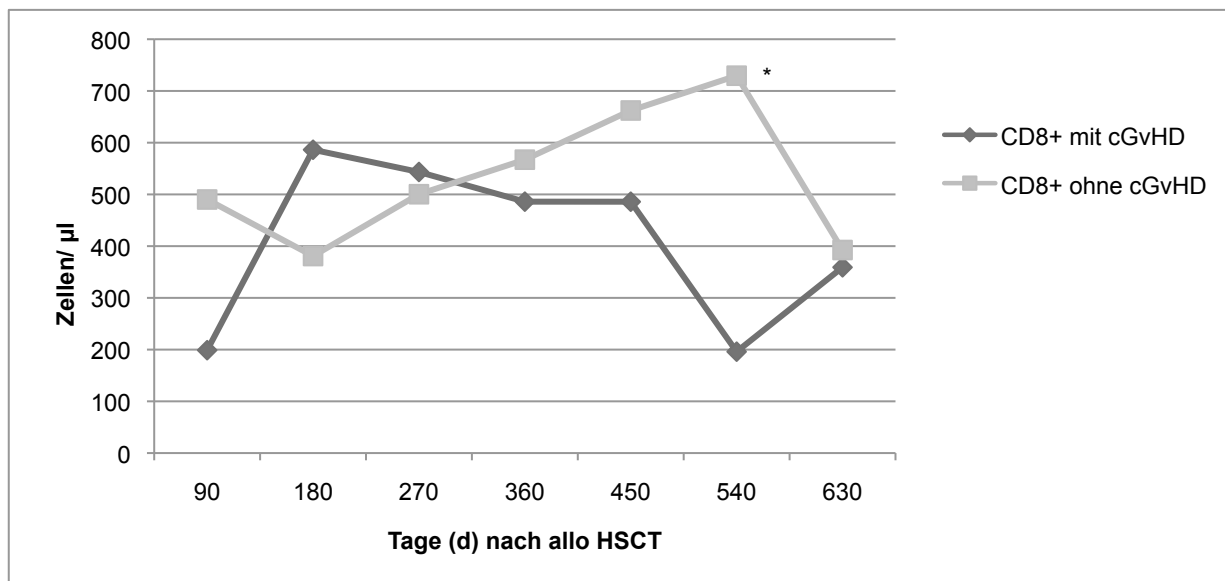
<b>Zellpopulation</b>	<b>Normbereich [Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>Keine cGvHD Median (IQR) [Zellen/<math>\mu</math>l] n = 33</b>	<b>Fallzahl unterhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl innerhalb der Norm n (%)</b>	<b>Fallzahl oberhalb der Norm n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	746 (1540)	5 (15)	14 (42)	14 (42)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	206 (118)	31 (94)	2 (6)	0 (0)
NK-Zellen	35-350	191 (181)	1 (3)	24 (73)	8 (24)
B-Zellen	80-350	567 (1538)	16 (48)	14 (39)	3 (9)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten ohne cGvHD unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 23: Einfluss von cGvHD auf die Immunrekonstitution

Lymphozytenpopulationen	cGvHD	Keine cGvHD	p-Wert
	Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l] n = 25	Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l] n = 26	
CD 8+ T-Lymphozyten	486 (1534)	567 (1538)	0,510
CD 4+ T-Lymphozyten	113 (140)	206 (118)	0,070
NK-Zellen	153 (239)	191 (182)	0,429
B-Zellen	13 (92)	121 (225)	0,005**
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
(g/l)	n = 33	n = 42	
IgG	7,05 (7,94)	10,56 (6,82)	0,033*
IgM	0,34 (1,14)	0,98 (0,81)	0,016*
IgA	0,52 (0,77)	0,65 (0,78)	0,180

Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen Patienten mit und ohne cGvHD ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \*=  $p \leq 0,05$ ).

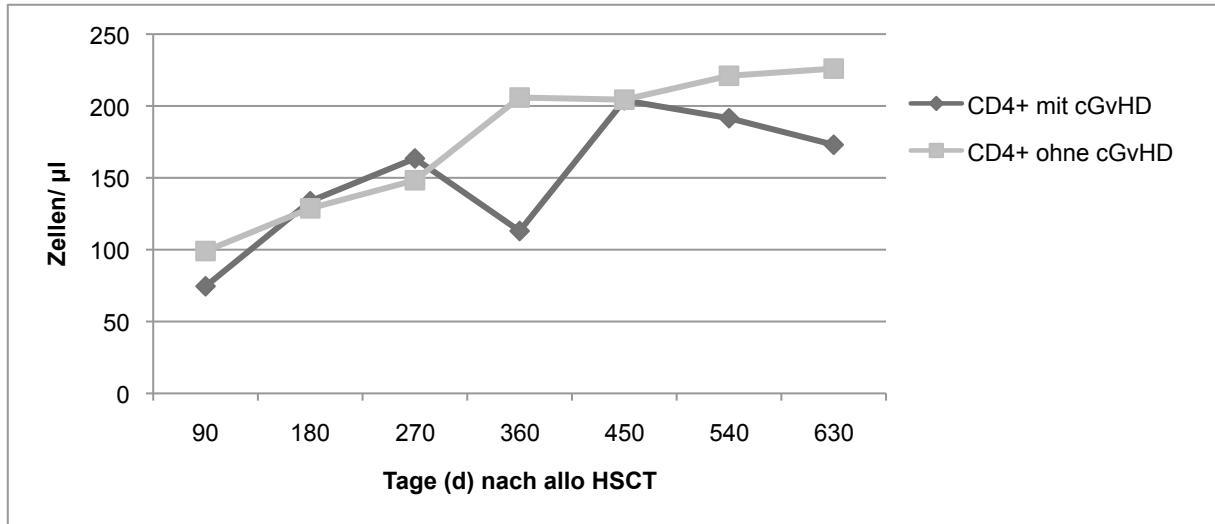


Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD8+ mit cGvHD (n)	26	33	30	25	16	11	10
CD8+ ohne cGvHD (n)	40	42	32	26	8	12	9

Abbildung 27: CD8+ T-Lymphozyten bei Patienten mit und ohne cGvHD

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne cGvHD anhand der mediane Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \*=  $p \leq 0,05$ ).

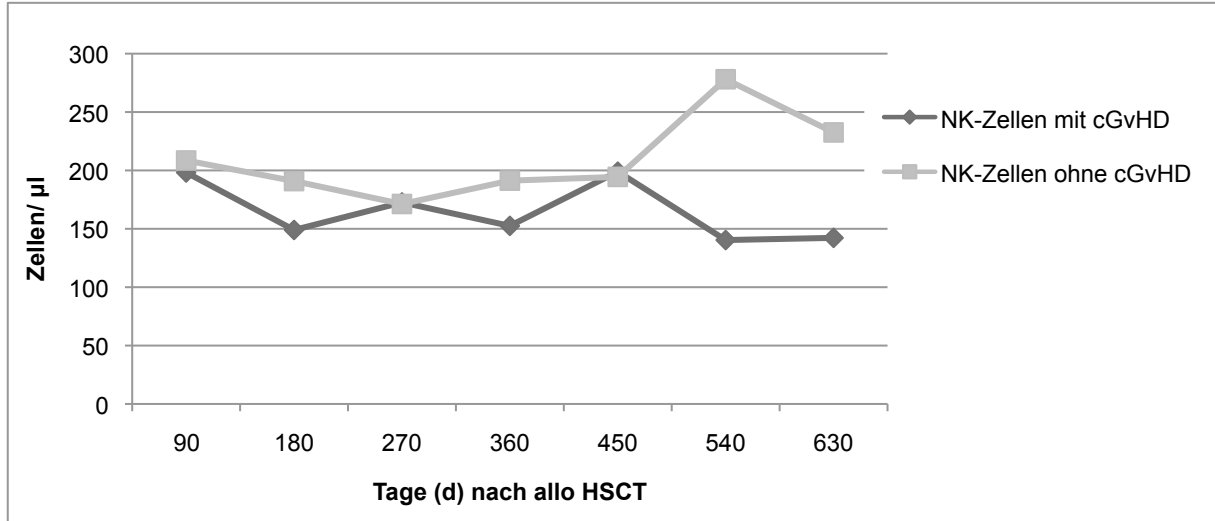




Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD4+ mit cGvHD (n)	26	33	30	25	16	11	10
CD4+ ohne cGvHD (n)	40	42	32	26	8	12	9

Abbildung 28: CD4+ T-Lymphozyten bei Patienten mit und ohne cGvHD

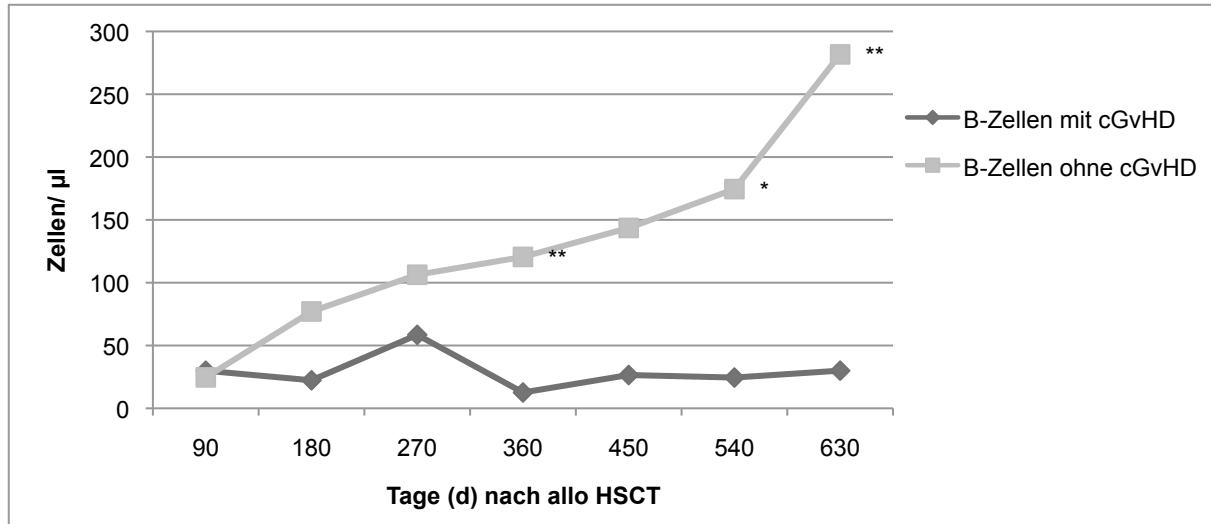
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne cGvHD anhand der mediane Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
NK-Zellen mit cGvHD (n)	26	33	30	25	16	11	10
NK-Zellen ohne cGvHD (n)	40	42	32	26	8	12	9

Abbildung 29: NK-Zellen bei Patienten mit und ohne cGvHD

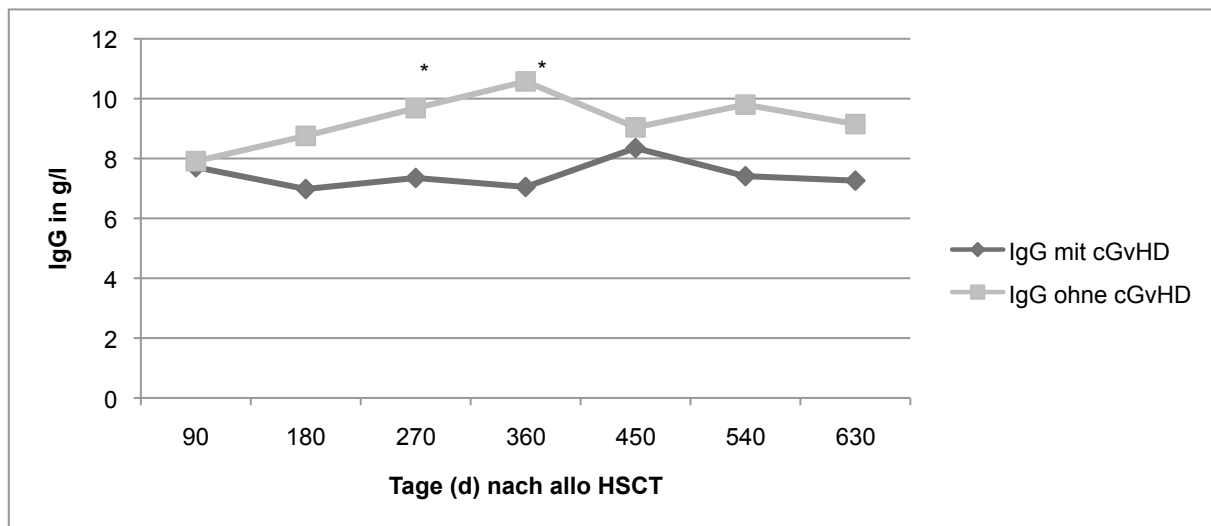
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne cGvHD anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
B-Zellen mit cGVHD (n)	26	33	30	25	16	11	10
B-Zellen ohne cGVHD (n)	40	42	32	26	8	12	9

Abbildung 30: B-Zellen bei Patienten mit und ohne cGVHD

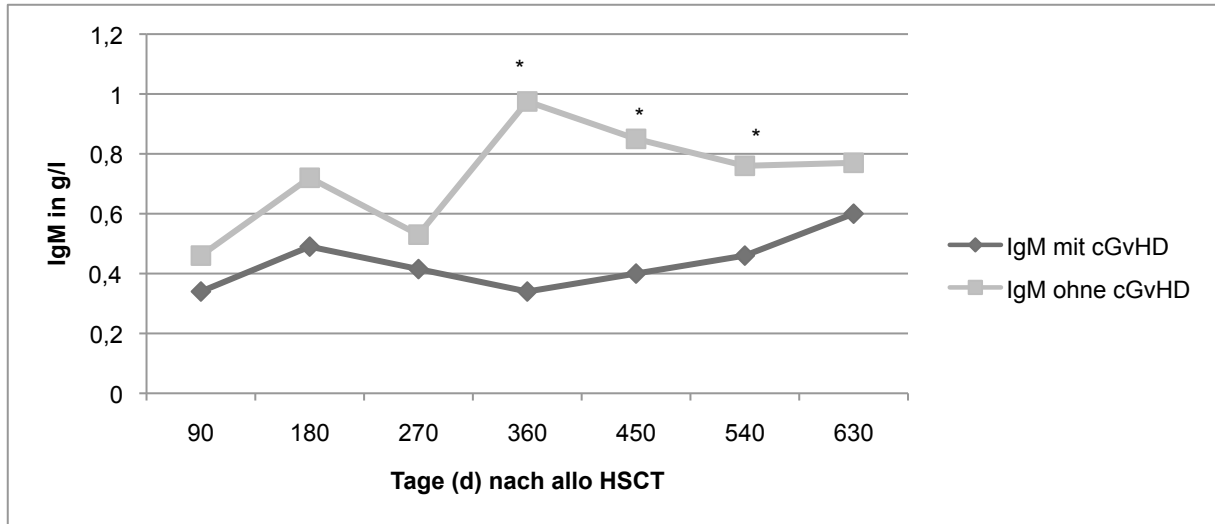
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne cGVHD anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgG mit cGVHD (n)	39	37	36	34	31	25	23
IgG ohne cGVHD (n)	63	60	52	44	35	25	25

Abbildung 31: IgG-Level von Patienten mit und ohne cGVHD

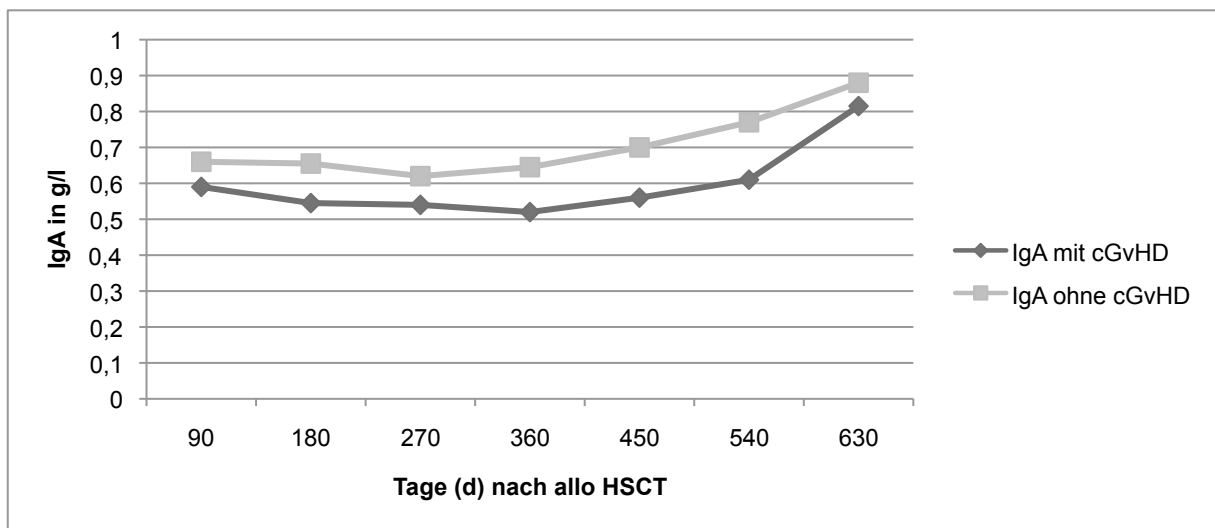
im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgM mit cGvHD (n)	39	37	40	34	31	25	23
IgM ohne cGvHD (n)	63	60	65	44	35	25	25

Abbildung 32: IgM-Level von Patienten mit und ohne cGvHD

im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgA mit cGvHD (n)	38	36	35	33	30	24	22
IgA ohne cGvHD(n)	61	58	51	42	35	25	24

Abbildung 33: IgA-Level von Patienten mit und ohne cGvHD

im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

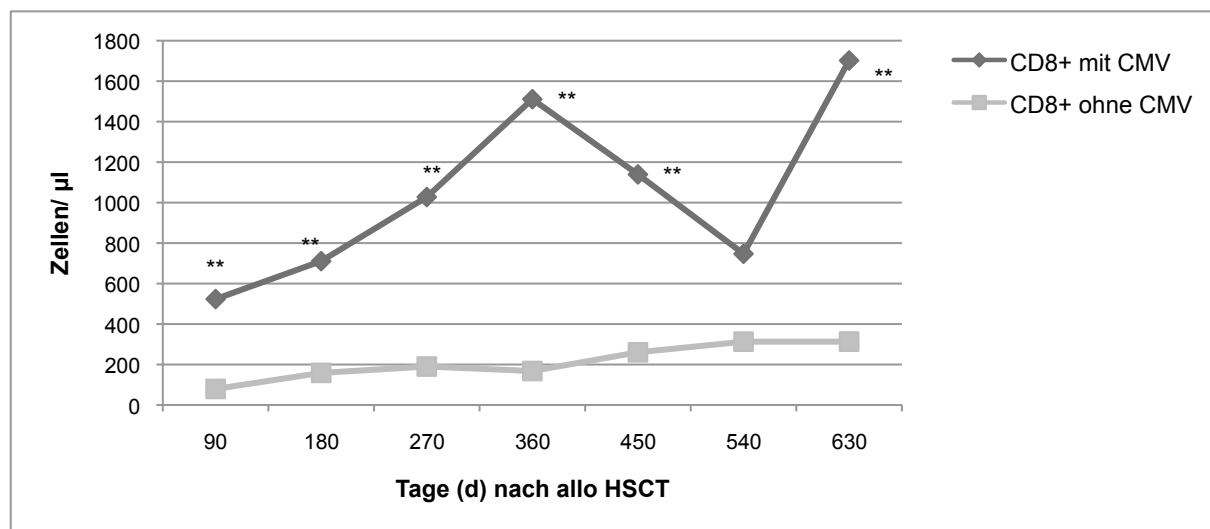
### 3.6.2 Infektionen

Eine CMV Reaktivierung trat bei 96 (71%) Patienten nach Transplantation auf. Vor Transplantation besaßen 85 (63%) Patienten einen positiven CMV-Serostatus; von diesen Patienten entwickelten 79 (93%) eine CMV-Reaktivierung. In 10 Fällen war der Empfänger vor allogener HSCT seronegativ bezüglich CMV. Von diesen 10 Patienten entwickelten 7 (70%) einen positiven CMV-Status. Die Diagnose einer Infektion erfolgte mittels Bestimmung der Viruslast durch RT-PCR aus dem peripheren Blut. Die Gesamtviruslast über die ersten neun Monate nach allogener HSCT lag bei 46 063 358 Kopien/l Blut. Im Rahmen der Analyse des Einflusses einer CMV-Infektion oder der Reaktivierung einer Infektion auf die lymphozytäre Immunrestitution wurden die Lymphozytenwerte und Immunglobulinlevel erkrankter und nicht erkrankter Patienten miteinander verglichen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Patienten, die eine CMV-Infektion durchgemacht haben, innerhalb aller Lymphozytenpopulationen höhere Zellzahlen aufwiesen. Durchgehend signifikant höhere Zellzahlen der CMV-positiven Patienten zeigten sich für CD8+ T-Lymphozyten. Die CD4+ T-Lymphozyten beider Gruppen unterschieden sich zu den Untersuchungszeitpunkten nach 180 bis 270 und nach 450 Tagen signifikant voneinander; insgesamt zeigten sich auch hier höhere Zellzahlen bei CMV-positiven Patienten. Die NK-Zellen waren an den Tagen 90 und 180 signifikant höher als in der CMV-negativen Vergleichsgruppe; für B-Zellen war dies an Tag 180, 270 und 450 der Fall. In der Übersicht der humoralen Reconstitution zeigten sich ebenso durchgehend höhere Immunglobulinlevel der Patienten nach CMV-Infektion im Vergleich zum gesunden Vergleichskollektiv. Die IgG-Werte zeigten sich im Vergleich mit nicht erkrankten Patienten über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant erhöht. Die einzelnen Werte sind Tabelle 24 sowie den Abbildungen 34 bis 40 zu entnehmen. Die weitere Analyse ergab, dass eine CMV-Infektion in den ersten 9 Monaten nach Transplantation signifikant häufiger bei Patienten auftrat, die 54 Jahre oder älter waren. Die Durchseuchung mit CMV in der Gruppe der über 54-Jährigen lag mit 71% deutlich höher als in der Gruppe der unter 54-Jährigen (54%).

Tabelle 24: Einfluss von CMV auf die Immunrekonstitution

Lymphozytenpopulationen	CMV-Infektion	Keine CMV-Infektion	p-Wert
Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l]	n = 23	n = 35	
CD 8+ T-Lymphozyten	1511 (1567)	168 (303)	0,000**
CD 4+ T-Lymphozyten	192 (157)	133 (150)	0,071
NK-Zellen	177 (254)	180 (135)	0,848
B-Zellen	69 (234)	37 (106)	0,127
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
(g/l)	n = 32	n = 55	
IgG	11,63 (7,67)	6,51 (5,6)	0,000**
IgM	0,86 (1,06)	0,59 (0,96)	0,303
IgA	0,64 (0,63)	0,63 (0,75)	0,313

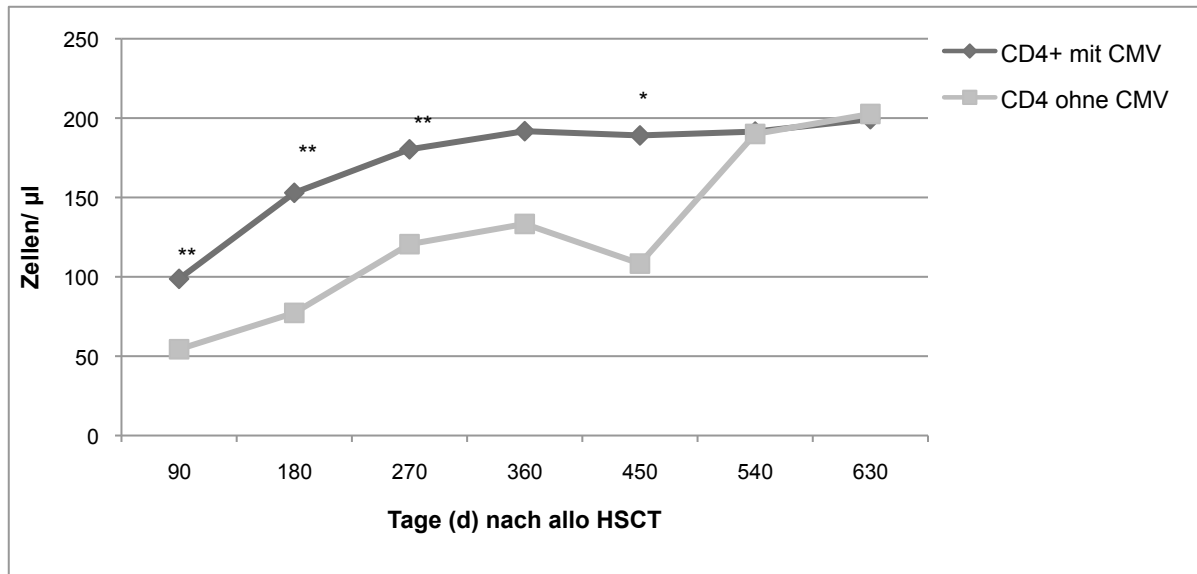
Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen Patienten mit und ohne CMV-Infektion ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut mit zugehörigem Streubereich sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD8+ mit CMV (n)	53	58	42	34	16	17	9
CD8+ ohne CMV (n)	29	29	27	24	12	11	11

Abbildung 34: CD8+ T-Lymphozyten von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

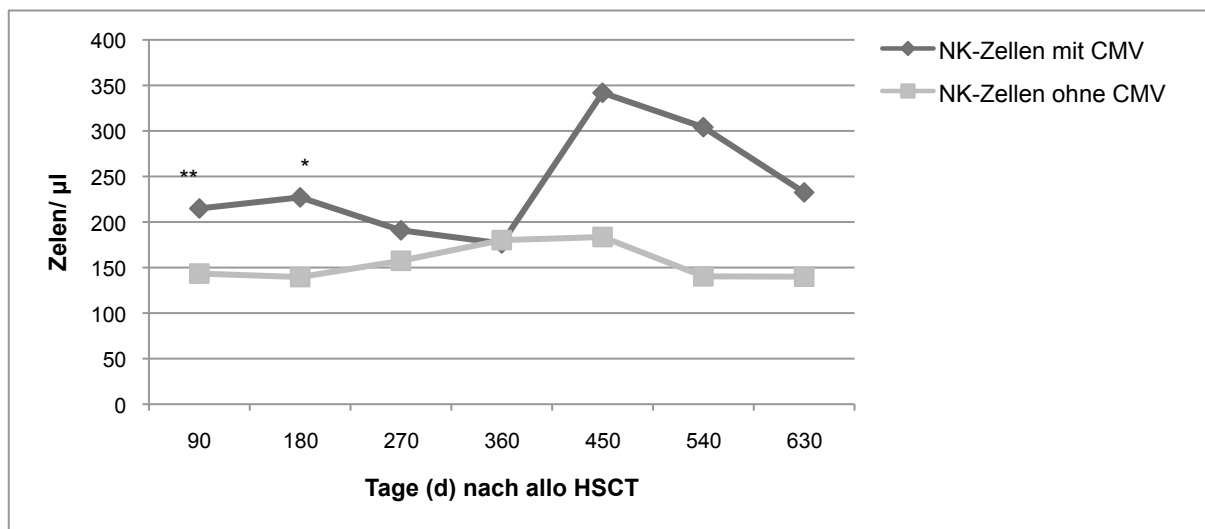
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne CMV-Infektion anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD4+ mit CMV (n)	53	58	42	34	16	17	9
CD4+ ohne CMV (n)	29	29	27	24	12	11	11

Abbildung 35: CD4+ T-Lymphozyten von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

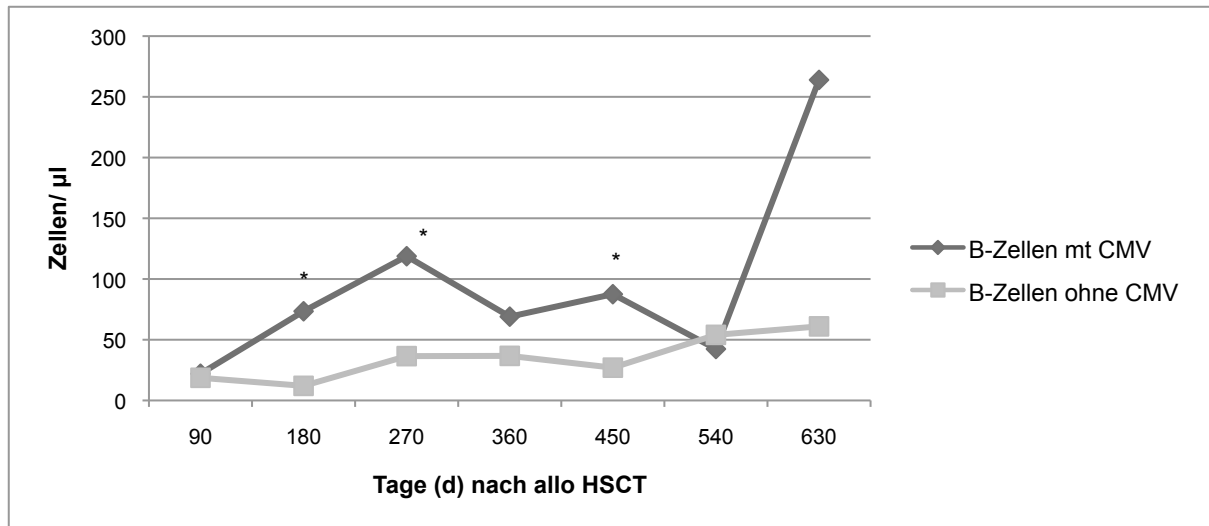
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne CMV-Infektion anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
NK-Zellen mit CMV (n)	53	58	42	34	16	17	9
NK-Zellen ohne CMV (n)	29	29	27	24	12	11	11

Abbildung 36: NK-Zellen von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

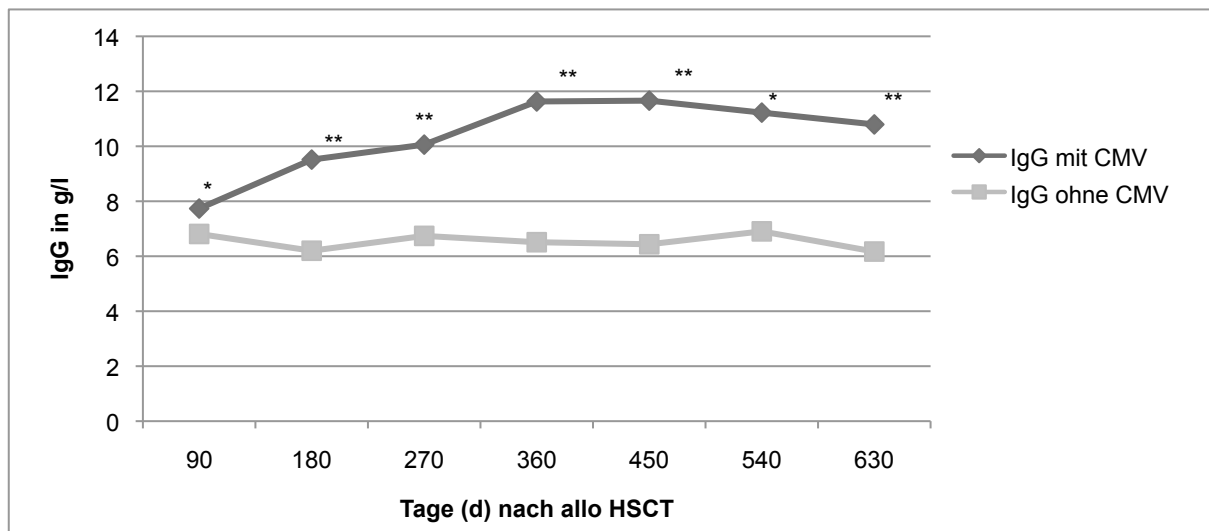
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne CMV-Infektion anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
B-Zellen mit CMV (n)	53	58	42	34	16	17	9
B-Zellen ohne CMV (n)	29	29	27	24	12	11	11

Abbildung 37: B-Zellen von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

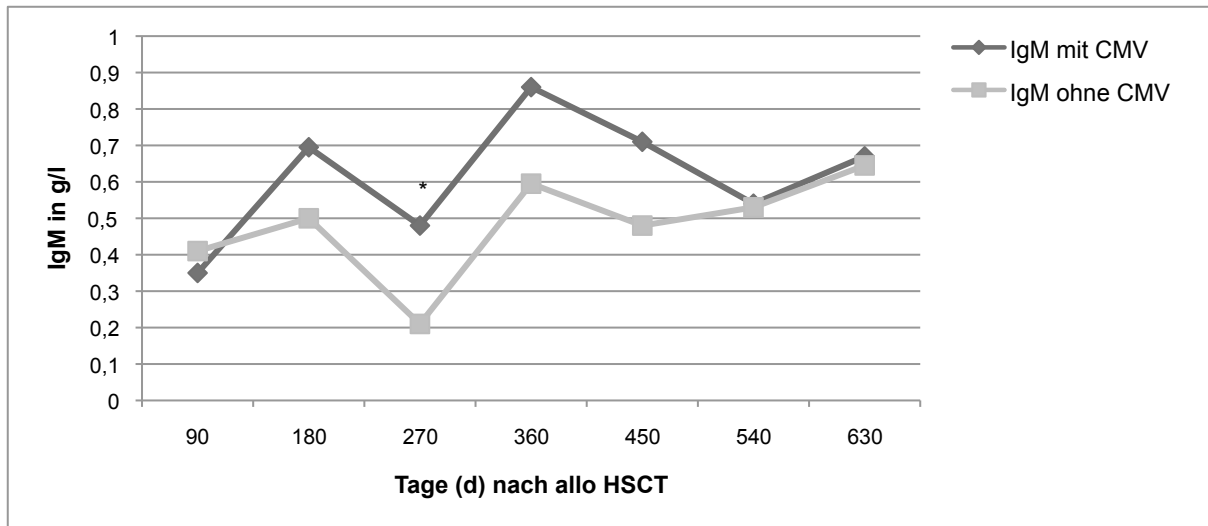
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne CMV-Infektion anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ) (Quelle: Eigene Darstellung).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgG mit CMV (n)	82	74	67	55	45	32	30
IgG ohne CMV (n)	46	38	33	32	28	24	24

Abbildung 38: IgG-Level von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

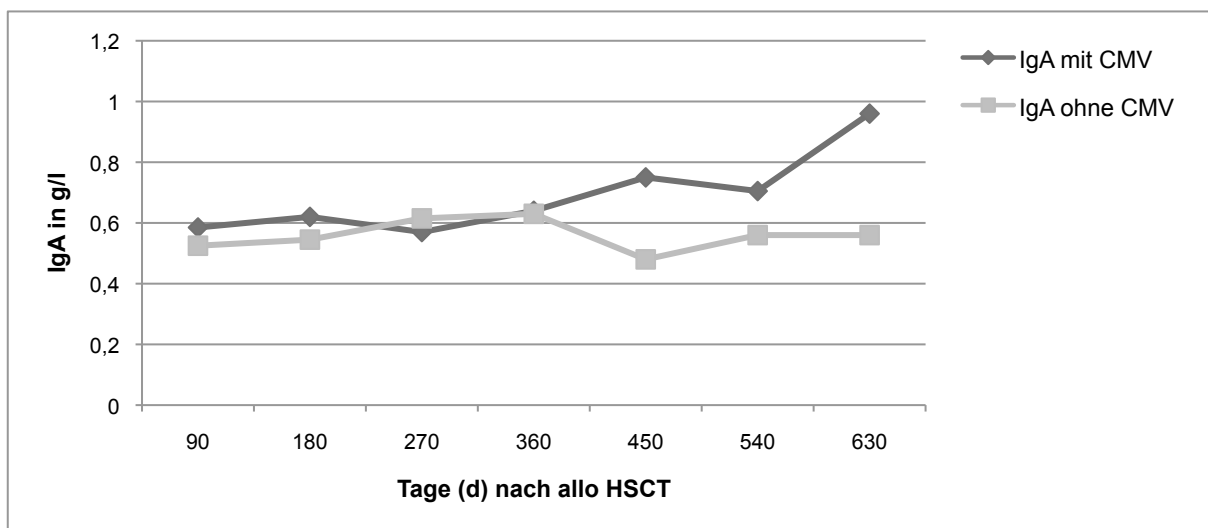
im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgM mit CMV (n)	82	74	85	55	32	32	30
IgM ohne CMV (n)	47	37	49	28	24	24	24

Abbildung 39: IgM-Level von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgA mit CMV (n)	82	74	85	55	32	32	30
IgA ohne CMV (n)	47	37	49	28	24	24	24

Abbildung 40: IgA-Level von Patienten mit und ohne CMV-Infektion

im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



### 3.6.2 Monoklonale Gammopathien unklarer Signifikanz

Monoklonale Gammopathien unklarer Signifikanz (MGUS) werden charakterisiert durch die Produktion eines oder mehrerer klonaler Immunglobuline (M-Proteine) oder ihrer Leichtketten durch einen oder mehrere Plasmazellklone.

In der Studienkohorte trat eine MGUS bei 18 (13%) der Patienten auf (vgl. Tab. 25). In elf (61%) dieser Fälle wurde ein monoklonales Paraprotein vom Typ IgG gebildet, zwei (11%) Patienten bildeten ein monoklonales IgM, bei einem (6%) Patienten wurde ein monoklonales Paraprotein vom Typ IgA nachgewiesen; in vier Fällen (22%) einer Gammopathie bestand eine biklonale Paraproteinämie der Typen IgG und IgM. In 17 Fällen bestand die MGUS vorübergehend, bei einem Patient waren über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg M-Proteine nachweisbar. Im Mittel bestand die MGUS über 2 Monate, wobei interindividuell große zeitliche Unterschiede bestanden (vgl. Abb. 41).

Tag	90	180	270	360	450	540	630
1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Abbildung 41: Zeitliche Entwicklung der MGUS bei 18 Indexpatienten

Dargestellt ist das zeitliche Auftreten Monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten des Analysezeitraums. Die mit Häkchen bezeichneten Kästchen stellen den positiven Nachweis eines entsprechenden M-Proteins dar.

Bei sieben (39%) der 18 Patienten bestand als Grunderkrankung ein Multiples Myelom. Diesen Fällen lag ein Klassenwechsel der Immunglobuline vor, sodass von einer unabhängig von der Grunderkrankung ausgebildeten sekundären MGUS ausgegangen wurde; sechs weitere Fälle von Myelomen, bei denen sich zwar eine Paraproteinämie jedoch kein

Klassenwechsel der Antikörper zeigte, wurden als Rezidiv der Grunderkrankung gewertet und aus der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 25: Charakteristika von Patienten mit MGUS

<b>MGUS</b>	<b>Nicht vorhanden n = 118</b>	<b>vorhanden n = 18</b>
<b>Geschlecht</b>		
männlich/weiblich	68/50	13/5
<b>Medianes Alter in Jahren (Bereich)</b>		
	51 (18-73)	54 (43-68)
<b>Stammzellquelle</b>		
PB	112	18
BM	6	0
<b>Grunderkrankung</b>		
AML	45	5
MDS	12	2
CLL	10	1
Multiples Myelom	9	7
Hodgkin-Lymphom	1	0
NHL	14	2
CML	2	0
MPS	9	1
ALL	8	0
Graft failure	2	0
Bone marrow failure	6	0

Charakteristika von Patienten mit und ohne Entwicklung einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz.

Hinsichtlich der zellulären Rekonstitution ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der MGUS-Kohorte und dem Vergleichskollektiv; tendenziell wurden durchgehend höhere Zellwerte in der T-Zellpopulation der Kohorte der Patienten mit MGUS verzeichnet. Nähere Informationen zur zellulären Rekonstitution von Patienten mit und ohne MGUS geben Tabelle 26 bis 28 und die Abbildungen 42 bis 45. In der humoralen Rekonstitution zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kohorten (Vgl. Abb. 46 bis 48).

Tabelle 26: Lymphozytäre Rekonstitution bei Patienten mit MGUS

<b>Zellpopulation</b> <b>Median (IQR)</b> <b>[Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>Normbereich</b> <b>[Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>MGUS</b> <b>n = 12</b>	<b>unterhalb</b> <b>der Norm</b> <b>n (%)</b>	<b>in der</b> <b>Norm</b> <b>n (%)</b>	<b>oberhalb der</b> <b>Norm</b> <b>n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	828(1540)	2 (17)	3 (25)	7 (58)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	205 (234)	11 (92)	0 (0)	1 (8)
NK-Zellen	35-350	163 (390)	1 (8)	7 (58)	4 (4)
B-Zellen	80-350	51 (280)	6 (50)	4 (33)	2 (17)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten mit MGUS unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 27: Lymphozytäre Rekonstitution bei Patienten ohne MGUS

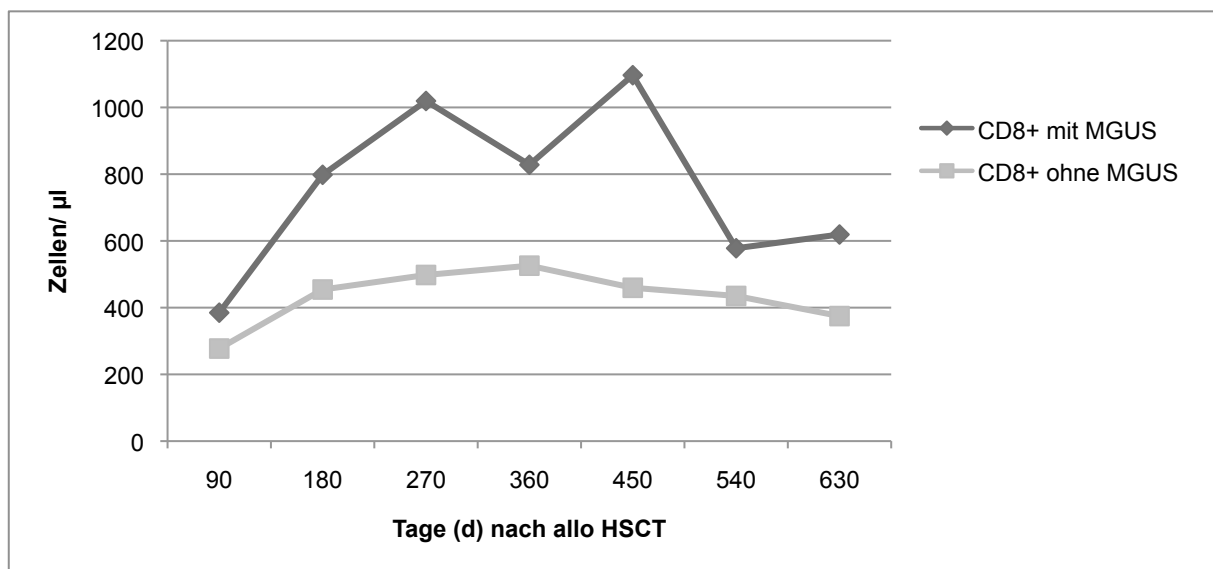
<b>Zellpopulation</b> <b>Median (IQR)</b> <b>[Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>Normbereich</b> <b>[Zellen/<math>\mu</math>l]</b>	<b>Keine</b> <b>MGUS</b> <b>n = 46</b>	<b>unterhalb</b> <b>der Norm</b> <b>n (%)</b>	<b>in der</b> <b>Norm</b> <b>n (%)</b>	<b>oberhalb der</b> <b>Norm</b> <b>n (%)</b>
CD8+T-Zellen	160-775	526 (1441)	11 (24)	17 (37)	18 (39)
CD 4+ T-Zellen	500-1340	148(141)	43 (93)	3 (7)	0 (0)
NK-Zellen	35-350	180 (190)	1 (2)	35 (76)	10 (22)
B-Zellen	80-350	56 (159)	26 (56)	17 (37)	3 (7)

Dargestellt ist die lymphozytäre Rekonstitution ein Jahr nach allogener HSCT bei Patienten ohne MGUS unter Angabe des Medianwertes und Interquartilsabstand; die Häufigkeitsverteilung wird entsprechend der Normwertbereiche der Lymphozytensubpopulationen untergliedert.

Tabelle 28: Einfluss von MGUS auf die Immunrekonstitution nach allo HSCT

Lymphozytenpopulationen	MGUS	Keine MGUS	p-Wert
Median (IQR) [Zellen/ $\mu$ l]	n = 12	n = 46	
CD 8+ T-Lymphozyten	828 (1811)	526 (1451)	0,257
CD 4+ T-Lymphozyten	205 (234)	148 (141)	0,578
NK-Zellen	163 (390)	180 (190)	0,578
B-Zellen	51 (280)	56 (159)	0,833
<b>Serum-Immunglobuline</b>			
(g/l)	n = 16	n = 71	
IgG	12,1 (12,16)	9,7 (6,71)	0,132
IgM	1,15 (1,5)	0,67 (0,9)	0,346
IgA	0,66 (0,87)	0,63 (0,62)	0,991

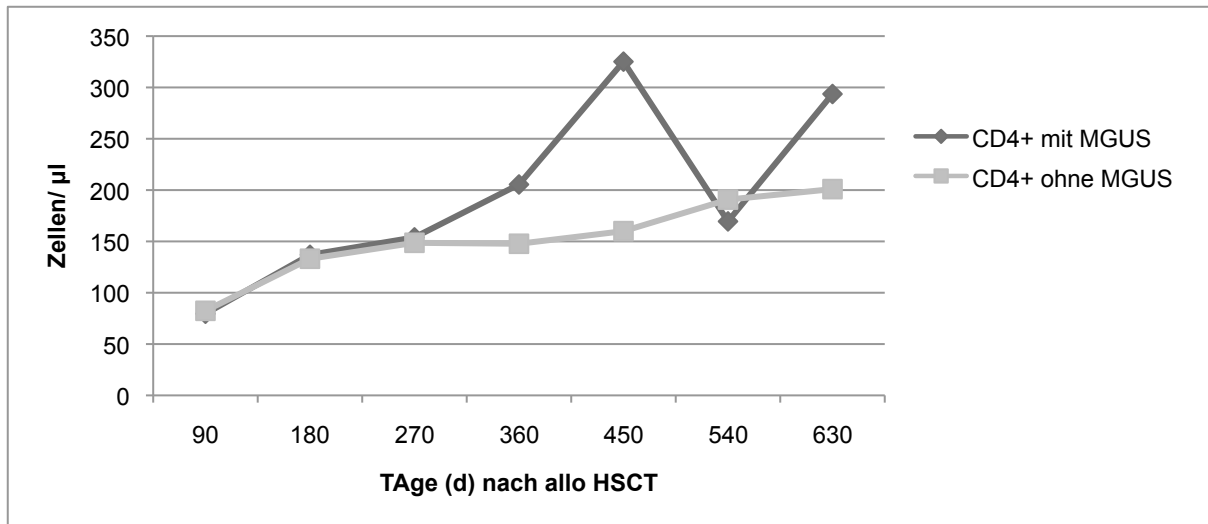
Vergleich der Lymphozytenpopulationen (pro  $\mu$ l Blut) und Immunglobuline (in g/l) zwischen Patienten mit und ohne MGUS ein Jahr nach allogener HSCT; dargestellt sind die medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut mit zugehörigem Interquartilsabstand sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD8+ mit MGUS (n)	14	13	11	12	6	4	4
CD8+ ohne MGUS (n)	68	74	58	46	22	24	16

Abbildung 42: CD8+ T-Lymphozyten bei Patienten mit und ohne MGUS

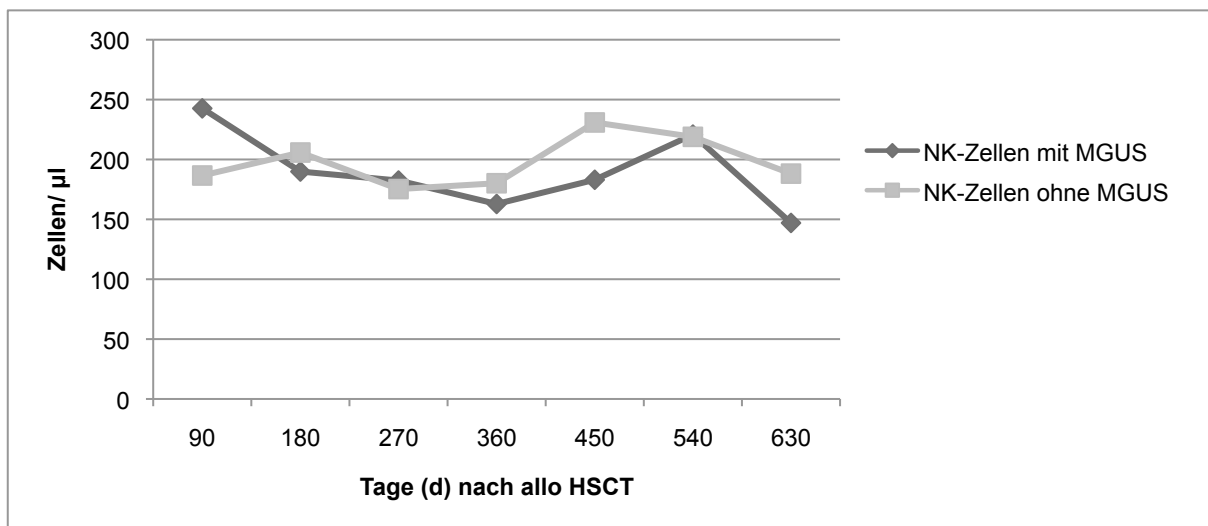
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne MGUS anhand der medianen Zellzahlen pro  $\mu$ l Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
CD4+ mit MGUS (n)	14	13	11	12	6	4	4
CD4+ ohne MGUS (n)	68	74	58	46	22	24	16

Abbildung 43: CD4+ T-Lymphozyten von Patienten mit und ohne MGUS

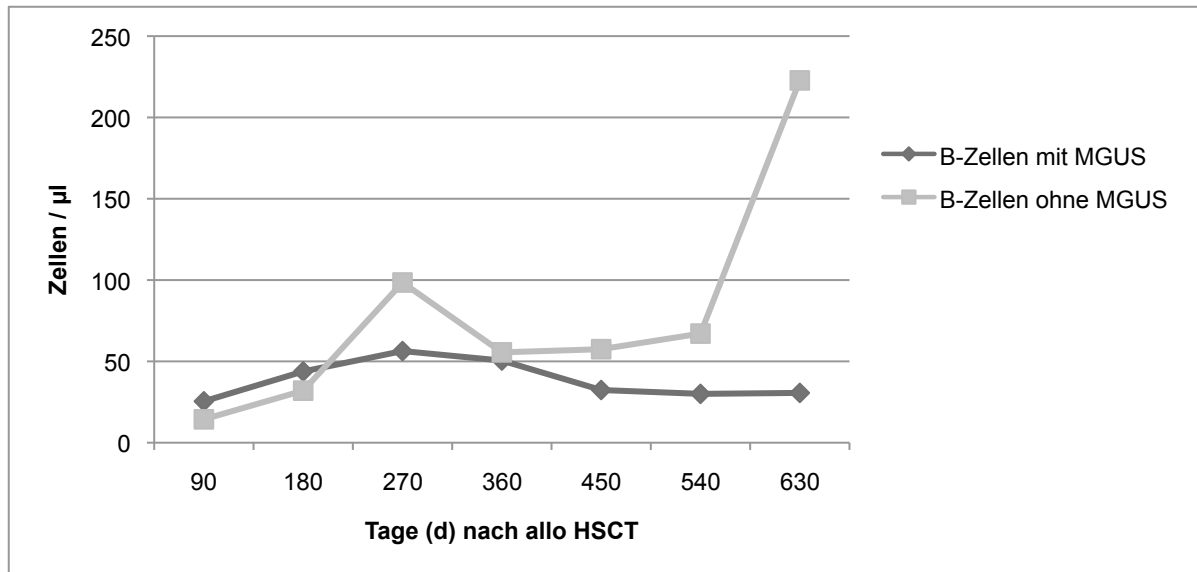
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne MGUS anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
NK-Zellen mit MGUS (n)	14	13	11	12	6	4	4
NK-Zellen ohne MGUS (n)	68	74	58	46	22	24	16

Abbildung 44: NK-Zellen von Patienten mit und ohne MGUS

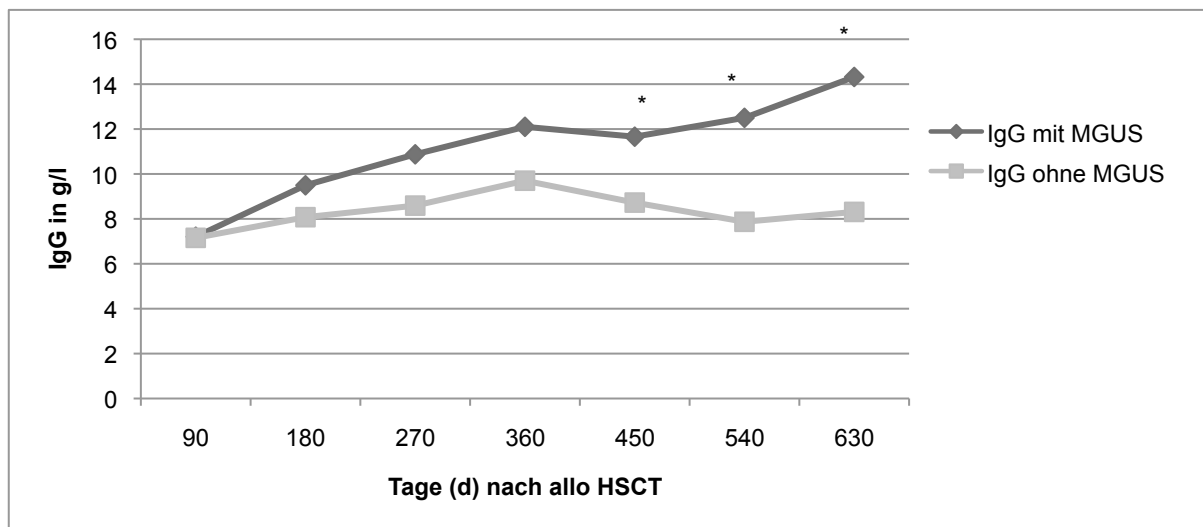
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne MGUS anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
B-Zellen mit MGUS (n)	14	13	11	12	6	4	4
B-Zellen ohne MGUS (n)	68	74	58	46	22	24	16

Abbildung 45: B-Zellen von Patienten mit und ohne MGUS

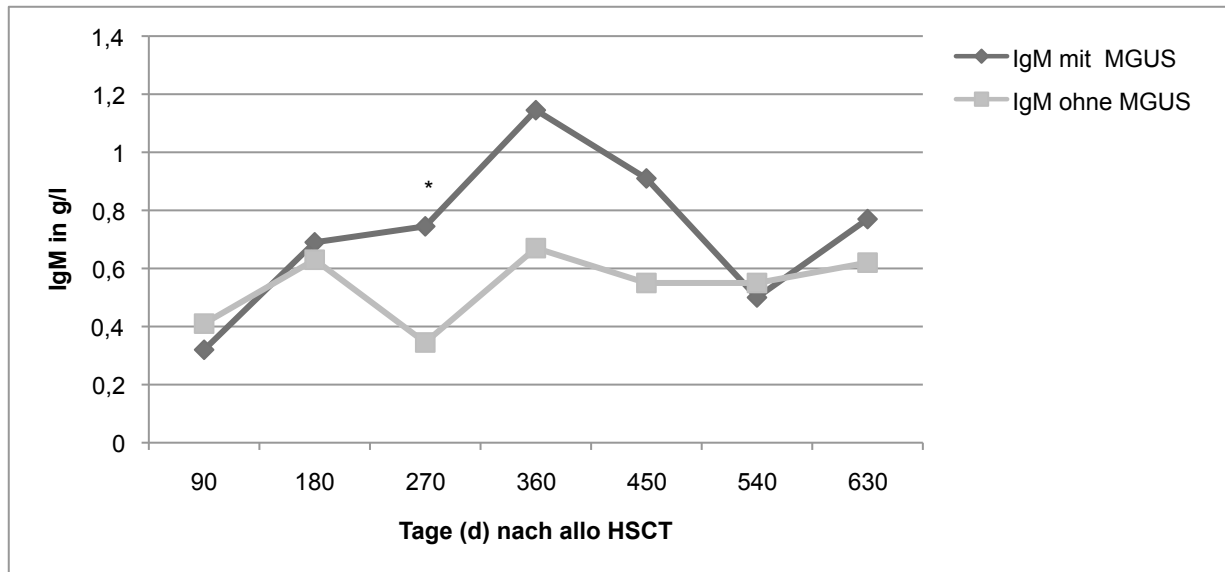
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Patienten mit und ohne MGUS anhand der medianen Zellzahlen pro µl Blut (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgG mit MGUS (n)	18	18	18	16	15	13	11
IgG ohne MGUS (n)	110	94	82	71	58	43	43

Abbildung 46: IgG-Level von Patienten mit und ohne MGUS

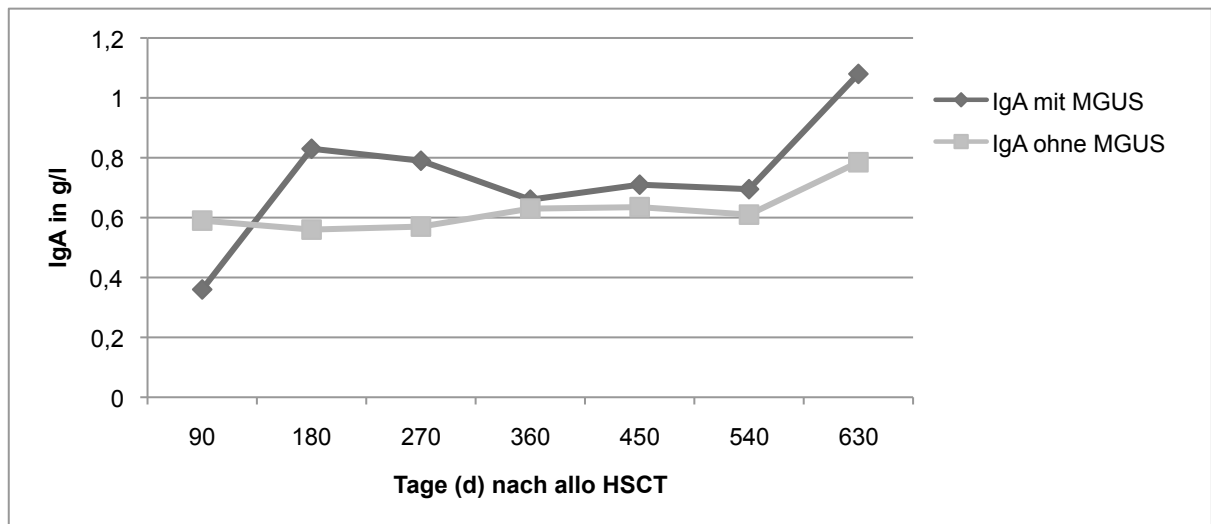
im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgM mit MGUS(n)	18	18	18	16	15	13	11
IgM ohne MGUS(n)	110	94	82	71	58	43	43

Abbildung 47: IgM-Level von Patienten mit und ohne MGUS

im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).



Tag	90	180	270	360	450	540	630
IgA mit MGUS (n)	18	18	18	16	15	13	11
IgA ohne MGUS (n)	110	94	82	71	58	43	43

Abbildung 48: IgA-Level von Patienten mit und ohne MGUS

im zeitlichen Verlauf nach allogener HSCT; dargestellt sind die jeweiligen medianen Immunglobulinlevel in g/l sowie das statistische Signifikanzniveau (\*\*=  $p \leq 0,005$ , \* $p \leq 0,05$ ).

Signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer MGUS mit Alter, Geschlecht, Grunderkrankung, CMV-Reaktivierung oder der Stammzellquelle konnten nicht festgestellt werden. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang bezüglich des Auftretens einer Gammopathie und einer T-Zell depletierenden Behandlung der Patienten mit ATG oder Alemtuzumab. Ein signifikanter Unterschied ergab sich in der Entwicklung einer cGvHD. Patienten, die eine MGUS entwickelten, zeigten signifikant häufiger eine cGvHD, als Patienten der Vergleichsgruppe ( $p = 0,034$ ). In der weiteren Analyse ergab sich eine positiv gerichtete Korrelation zwischen der Ausbildung einer cGvHD und dem Auftreten einer MGUS ( $r = 0,206$ ,  $p=0,038$ ). Durch multivariate Analyse konnte der gezeigte univariate Zusammenhang zwischen Auftreten einer MGUS und einer cGvHD bestätigt werden ( $p=0,006$ ). Wiederum war die MGUS weder mit dem Auftreten einer CMV-Infektion noch mit dem Auftreten eines Rezidivs korreliert.

Die Überlebenszeitanalyse der MGUS-Kohorte im Vergleich zu Patienten, die im Verlauf nach allogener HSCT keine Gammopathie entwickelten, zeigte ein besseres Ein-Jahres-Überleben von Patienten mit MGUS gegenüber Patienten, die keine Paraproteinämie entwickelten (vgl. Abb. 49). Die Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit ergab 100 Tage nach allogener HSCT 100% für Patienten, die eine MGUS entwickelten im Vergleich zu 86,5% für Patienten, die keine MGUS entwickelten; ein Jahr nach Transplantation waren dies 86% für Patienten mit MGUS im Vergleich zu 68% für Patienten der Vergleichsgruppe. Zwei Jahre nach Transplantation näherte sich die Überlebenswahrscheinlichkeit beider Gruppen weiter an und entsprach 61% gegenüber 64%.



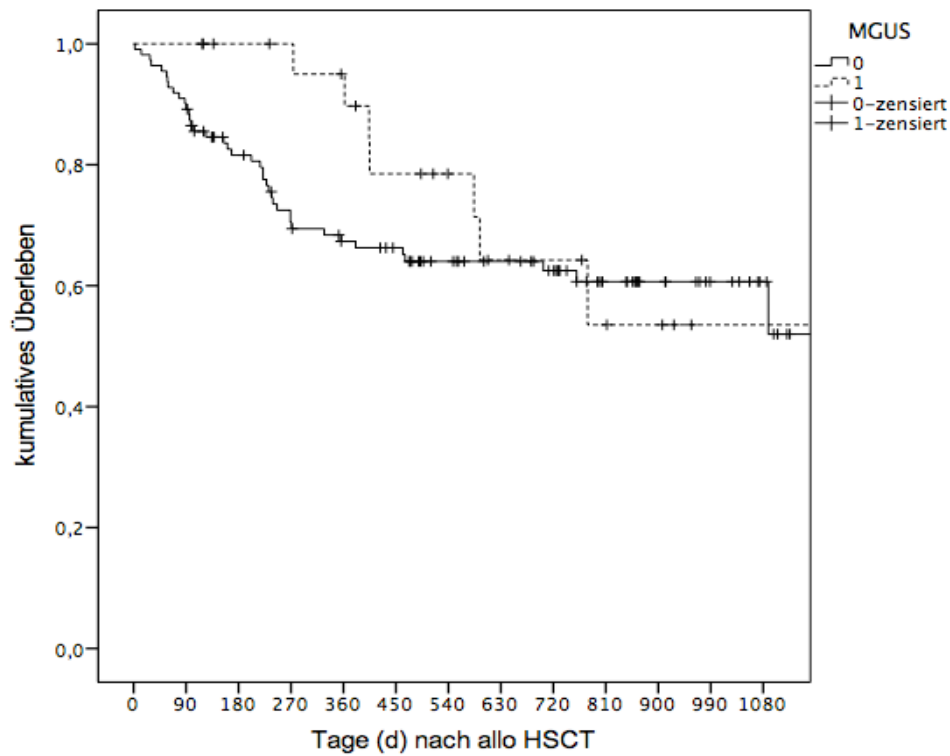


Abbildung 49: Kaplan-Meier-Kurve des Patientenüberlebens bei Vorhandensein und Fehlen einer MGUS

Es wird die Wahrscheinlichkeit aufgezeigt, dass Patienten die Zeit nach allogener HSCT (in Tagen) überleben (1= MGUS, 0= keine MGUS).

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunrekonstitution über einen Gesamtzeitraum von 21 Monaten nach allogener HSCT aus verschiedenen Blickwinkeln beleuchtet. Effekte der unterschiedlichen Behandlungsregime, der Anwendung T-Zell depletierender Therapeutika zur GvHD-Prophylaxe und immunmodulatorischer Interventionen wurden *in vivo* beobachtet und unter dem Aspekt ihrer Auswirkung auf die immunologischen Konsolidierung ausgewertet. Ferner wurden in Analogie zu anderen Arbeiten feststehende patientenbezogene Faktoren wie das Empfängeralter und die HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger sowie sekundäre Komplikationen wie cGvHD und CMV-Infektionen in die Analyse einbezogen. Das Phänomen der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz wurde darüber hinaus unter dem Aspekt möglicher auslösender Faktoren sowie ihres Einflusses auf die Konsolidierung des Immunsystems vertiefend betrachtet.

Problematisierend muss vor dem Hintergrund des retrospektiven Ansatzes dieser Arbeit die statistische Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse diskutiert werden. Zwar können die erhobenen Daten der Hypothesengenerierung für nachfolgende prospektive Studien sowie der Bekräftigung bekannter Evidenzen dienen, eine richtungsweisende Ableitung kausaler Zusammenhänge ist anhand dieser Daten jedoch nicht möglich; des Weiteren ist in diesem Kontext die Existenz potentieller Cofounder kritisch in Betracht zu ziehen. Die Überschätzung der klinischen Relevanz erhobener statistischer Signifikanzen ist in diesem Zusammenhang streng zu vermeiden. Dennoch birgt die hier durchgeführte Datenerhebung und -analyse interessante Aspekte, deren Aufarbeitung und Ergänzung im Rahmen nachfolgender prospektiver Studien wichtige neue Erkenntnisse betreffend der immunologischen Rekonvaleszenz nach allogener HSCT erbringen könnte.

### 4.1 Lymphozytäre und humorale Immunrekonstitution

Verschiedene Studien legen nahe, dass die vollständige lymphozytäre und humorale Erholung interindividuellen Unterschieden unterliegt. Verallgemeinernd lässt sich der Literatur jedoch der Konsens entnehmen, dass die Erholung der B-Zellreihe früher erfolgt als jene der T-Lymphozyten (Storek, 2008, Bosch et al., 2012). Genauere zeitliche Abläufe in der Rekonstitution verbleiben jedoch weiterhin strittig und unterliegen verschiedensten Einflüssen. Während Bosch *et al.* und Seggewiss *et al.* von einer mehr als ein Jahr andauernden Erholungsphase der B-Zellreihe ausgehen (Bosch et al., 2012, Seggewiss and Einsele, 2010), sehen andere Studien eine vollständige Erholung bereits innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation (Bemark et al., 2012, Baumgartner et al., 1988). Differenziert werden muss hier jedoch stark zwischen der rein zellulären Erholung der B-Lymphozyten und der

Wiedererlangung der eigentlichen immunologischen Funktionalität. Bis 12 Monate nach Transplantation sind vorwiegend CD27+/IgD+ naive B-Zellen im peripheren Blut detektierbar. Hingegen fällt die Anzahl klassengewechselter CD27+/IgD- B-Gedächtniszellen - und damit verbunden die Wiedererlangung einer effizienten Immunglobulin-Produktion - deutlich geringer aus als bei gesunden Kontrollpersonen (Avanzini et al., 2005). Die T-Zelllinie verbleibt oft über Jahre vermindert (Williams and Gress, 2008, Geddes and Storek, 2007). Hier fallen spezifische Unterschiede innerhalb der Rekonstitution der Lymphozytensubpopulationen auf. CD8+ T-Lymphozyten rekonstituieren als erste Zellreihen der adaptiven Immunität, wohingegen sich die Erholung der CD4+ T-Lymphozyten oftmals über Jahre bis Jahrzehnte nach HSCT verzögert (Bosch et al., 2012, van Leeuwen et al., 1994). In der Betrachtung der CD4/CD8-Ratio zeigt sich eine deutliche Verschiebung der zellulären Rekonstitution zugunsten der CD8+ T-Lymphozyten (Seggewiss and Einsele, 2010, Gratama et al., 1984). Die frühe Erholung der CD8+ T-Lymphozyten wird am ehesten der peripheren homöostatischen Expansion (HPE) und der Proliferation residualer Empfänger-T-Zellen sowie der Vermehrung im Transplantat enthaltener Spender-T-Zellen zugeschrieben. Der Neubildung von T-Lymphozyten im Thymusgewebe kommt eine geringere Bedeutung zu (Dumont-Girard et al., 1998, Jimenez et al., 2007). Die in dieser Studie erhobenen Daten unterstützen die These eines phasenhaften Verlaufs der Immunrekonstitution nach allogener HSCT. Das T-Zellsystem rekonstituierte in 55% der Fälle innerhalb von 21 Monaten nur unvollständig. Im Mittel kam es bereits innerhalb der ersten 9 Monate nach allogener HSCT zur Erholung der CD8+ T-Lymphozyten, während sich CD4+ T-Lymphozyten bis 21 Monate nach Transplantation in ihrer Absolutzahl verringert darstellten und eine insgesamt langsamere Rekonstitution aufwiesen. Die CD4/CD8 Ratio stellte sich über den gesamten Analysezeitraum invers dar. Insgesamt erreichten nach einem Jahr nur 8% aller Patienten normale Werte für CD4+ T-Lymphozyten, 90% der Patienten wiesen Zellzahlen unterhalb der unteren Normgrenze auf. Das Kompartiment der B-Lymphozyten wies am Ende des Untersuchungszeitraums ebenfalls in ausschließlich 50% der Fälle normale Werte auf. Dahingegen zeigte sich die Zelllinie der NK-Zellen ab Tag 90 nach allogener HSCT bei allen Patienten vollständig rekonstituiert. Mittels Immunturbidimetrie wurden die Immunglobulinlevel der Patienten über den gesamten Untersuchungszeitraum überwacht. Ein Großteil der Patienten erreichte im Verlauf normwertige Serumimmunglobuline. Während die Werte von IgG im Mittel bereits nach drei Monaten im Normwertbereich lagen, benötigte die Konsolidierung von IgM im Mittel circa 6 Monate; Normalwerte für IgA wurden erst nach 21 Monaten erreicht. Im Rahmen verschiedener Studien wird trotz Anwendung effizienter B-Zell depletierender Konditionierungsregime über nur leicht verminderte Serumimmunglobulinspiegel der Patienten berichtet (Baumgartner et al., 1988, Storek et al., 2001). Die im Vergleich zur späten zellulären Rekonstitution frühe humo-

rale Erholung, insbesondere des Serum-IgG, wird einerseits begründet durch die relativ lange Halbwertszeit der Immunglobuline (HWZ IgG = 7-22 Tage, HWZ IgM = 2-6 Tage, HWZ IgA = 2-6 Tage) (Proetzel and Roopenian, 2014), andererseits durch die Persistenz gegenüber den Konditionierungsregimen resistenter, residualer Plasmazellen des Empfängers (Geddes and Storek, 2007, Small et al., 2009, van Tol et al., 1996). Trotz hoher Immunglobulinwerte ist ein Mangel spezifischer Immunglobuline nach Anwendung myeloablativer Regime bekannt; dies führt zur Notwendigkeit einer neuerlichen Impfung der Patienten nach Transplantation. In dieser Studie wurde die humorale Immunität anhand der Titer für IgG, IgM und IgA im Patientenserum gemessen. Ein tieferes Verständnis für die Funktionalität des sich nach allogener HSCT ausbildenden B-Zell-Systems könnte die Analyse spezifischer Antikörpertiter auf entsprechende Impfungen *post transplantationem* geben. Diese Analyse verbleibt Aufgabe nachfolgender prospektiver Forschungsarbeiten. Allerdings weisen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten auf eine gestörte B-Zell-Rekonstitution im Sinne einer reduzierten Anzahl an B-Zellen einerseits und eines erhöhten autoreaktiven Potentials andererseits hin.

Da die Immunfixation für Patienten nach allogener HSCT am Campus Kiel ausschließlich im Falle auffälliger Immunglobulinspiegel indiziert und anschließend der jeweiligen klinischen Einschätzung entsprechend bei Bedarf individuell ergänzt wird, konnte in der Auswertung der FACS- und Immunturbidimetrieanalysen nicht immer von derselben Patientenzahl ausgegangen werden. Die Vergleichbarkeit der ermittelten Werte der verschiedenen Gruppen muss deshalb an aufgeführter Stelle kritisch betrachtet werden.

## **4.2 Patientenassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution**

### **4.2.1 Patientenalter**

Obgleich die allogene Stammzelltransplantation im Zuge der Entwicklung verbesserter Konditionierungs- und Therapieregime auch älteren, multimorbiden Patienten zugänglich geworden ist, bleibt das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation noch immer ein Haupteinflussfaktor auf die Konsolidierung der vollständigen immunologischen Kompetenz des Empfängerorganismus (Eyrich et al., 2005). Nach wie vor sind aufgrund der Historie der allo HSCT aussagekräftige Erfahrungswerte bezüglich der Immunrekonstitution älterer im Vergleich zu jüngeren Patienten limitiert. Dies unterstreicht das weiterhin große Interesse an der intensiven Erforschung der Immunrekonstitution bei Patienten höheren Alters.

Verschiedene Studien legen nahe, dass der Wiederaufbau des neuen, funktionsfähigen Immunsystems im höheren Lebensalter länger dauert und im Vergleich zu jüngeren Patienten oft unvollständig bleibt (Hakim and Gress, 2007). Die Alterseffekte auf die zelluläre Immunität werden neben der therapieassoziierten Toxizität der Chemotherapeutika auf eine

physiologische Altersinvolution des Thymusgewebes zurückgeführt, welche mit einer verminderten thymischen Produktionskompetenz assoziiert ist (Douek et al., 1998, Seggewiss and Einsele, 2010, Krenger et al., 2011). Darüber hinaus haben Signer *et al.* im Mausmodell beschrieben, dass die Fähigkeit des Knochenmarks zur Lymphopoese der B-Zellen mit zunehmenden Alter abnimmt (Signer et al., 2007, Dorshkind et al., 2009, Ademokun et al., 2010). Min *et al.* beschreiben diesbezüglich ebenfalls intrinsische Veränderungen der im Knochenmark ansässigen Progenitorzellen der T- und B-Zellreihe: Veränderungen im Mikromilieu von sowohl Knochenmark als auch Thymus wird eine kausale Rolle für das verminderte lymphoproliferative Potential und die abnehmende Geschwindigkeit der immunologischen Erholung zugeschrieben (Min et al., 2005). Ferner betonen sie hormonelle Einflüsse auf die Immunrekonstitution und unterstreichen insbesondere die Effekte von Sexualhormonen, Wachstumshormonen und Insulin-like growth factor-1 auf die lymphatische Rekonstitution. In der hier dargelegten Analyse ließen sich entgegen dieser Ausführungen erstaunlicherweise keine altersassoziierten Effekte der Immunrekonstitution nachweisen. Eindrucksvoll waren jedoch die deutlich höheren Zellzahlen für CD8+ T-Zellen bei untersuchten Patienten jenseits des vierundfünfzigsten Lebensjahrs; diese Auffälligkeit ließe sich mit der signifikant höheren Rate an CMV-Infektionen innerhalb der ersten 9 Monate nach allogener HSCT bei älteren Patienten erklären. Deutliche Unterschiede der zellulären Erholung zeigten sich überdies in der Rekonstitution der NK-Zellen, deren Zellzahlen bei Patienten höheren Lebensalters im ersten Jahr höher als bei jüngeren Patienten lagen.

Die humorale Immunrekonstitution muss gesondert betrachtet werden. Die altersabhängige Erholung der humoralen Kompetenz führt zu verschiedenen klinischen Problemen in der Behandlung älterer Patienten. Zum einen kommt es zu einer Abschwächung der Immunantwort; die Impfantwort älterer im Vergleich zu jüngeren Patienten fällt geringer aus, der Impfschutz ist verkürzt und die Affinität der Antikörper zur entsprechenden antigenen Struktur ist vermindert. Zum Anderen entwickeln ältere Patienten vergleichsweise häufig Autoimmunerkrankungen (Hakim and Gress, 2007). Die Abnahme der Lymphopoese der B-Zelllinie führt zu einer Verschiebung der B-Zellen hin zu B-Gedächtniszellen mit höherem autoimmunem Potenzial. Die Theorie, dass eine verzögerte lymphozytäre Rekonsolidierung, das heißt eine verminderte zellulären Rekonstitution, zu einem vermehrten Auftreten von Autoimmunität führt, deckt sich mit dem hohen Anteil monoklonaler Gammopathien im untersuchten Patientenkollektiv. Im Mausmodell präsentiert sich die Kompetenz lymphoider Vorläuferzellen zur Differenzierung zu pro - B-Zellen in höherem Lebensalter deutlich vermindert (Miller and Allman, 2005, Min et al., 2006). In dieser Arbeit wurden hinsichtlich der humoralen Rekonstitution keine signifikanten Unterschiede in der altersabhängigen Analyse der Antikörpertiter festgestellt. Die Annahme, dass bei im Alter steigender Auto- und Alloreaktivi-

tät von Lymphozyten auch die Neigung zur Ausbildung immunologischer Phänomene wie dem der MGUS potenziert wird, konnte im Rahmen dieser Studie erstaunlicherweise nicht bestätigt werden. Die erwähnte differenzierte Analyse spezifischer Impfantworten sowie die tiefere Betrachtung unterschiedlicher B-Zell-Populationen könnte diesbezüglich jedoch zu weiteren Erkenntnissen führen. In der Betrachtung der cGvHD-Rate im Vergleich älterer zu jüngeren Patienten ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. Dieser Umstand lässt sich zum einen durch die bessere immunologische Verträglichkeit neuer Konditionierungstherapien, zum anderen durch die breite Anwendung von ATG respektive Alemtuzumab zur GvHD-Prophylaxe erklären.

## **4.3 Therapieassoziierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution**

### **4.3.1 HLA-Kompatibilität**

Aus Sicht der immunologischen Verträglichkeit ist der ideale Stammzellspender ein eineiiger Zwilling des Empfängers (syngene Transplantation); trotz der sehr geringer Raten an aGvHD und cGvHD stellt – neben der geringen Spenderverfügbarkeit – die hohe Rezidivrate nach syngener Transplantation jedoch einen limitierenden Faktor dieser Methode dar.

Die eingeschränkte Verfügbarkeit einer optimalen Spender-Empfänger-Konstellation im Sinne einer HLA-identischen Familienspende führt zur vermehrten Transplantation HLA-disparater Stammzellen. In den letzten Jahren hat sich das Überleben von Patienten nach unverwandter allogener HSCT durch Optimierung der molekularen Typisierung der Genloci für HLA I und II deutlich verbessert (Sierra et al., 2008, Arora et al., 2009). In Anbetracht der breiter werdenden therapeutischen Anwendbarkeit der allogenen HSCT ist die Frage nach Unterschieden in der Rekonstitution des Immunsystems im Vergleich von verwandten zu nicht verwandten Stammzellspenden sowie von HLA-identischen zu HLA-differenten Spenden von großem Interesse. Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede der Rekonstitution zwischen HLA-identischen Familien- und Fremdspendern; die CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten rekonstituierten nach HLA-identischer Fremdspende im Vergleich zu HLA-identischer Familienspende im Trend besser. Der Vergleich HLA-identischer zu HLA-differenter Stammzellspende zeigte eine anfänglich deutliche zahlenmäßige – wenn auch nicht durchgehend signifikante – verzögerte Rekonstitution des T-Zellsystems HLA-different transplantiert gegenüber HLA-identisch transplantierten Patienten. In der Gesamtzeitanalyse sprechen die Ergebnisse der angestellten Betrachtungen jedoch für eine die Immunrekonstitution betreffend weitgehend äquivalente Anwendbarkeit der verschiedenen HLA-Konstellationen unter Anwendung entsprechender sich an die Transplantation anschließender Therapiemaßnahmen.

Die haploidente allogene Stammzelltransplantation (haploidente HSCT) bildet vor dem Hintergrund der begrenzten Verfügbarkeit HLA-identer oder partiell HLA-differentierender Spender eine weitere potentiell kurative Therapieform. Hier bildet vor allem die Stärke der T-Zell-Antwort von Spender und Empfänger auf allogene HLA-Moleküle eine der weiterhin größten Herausforderungen (Fuchs, 2012). Im Studienmodell gelang es hier jüngst, über die Verabreichung von Hochdosis-Cyclophosphamid *post transplantationem* (PT/Cy) eine effektive Depletion autoreaktiver Spender- als auch Empfänger-T-Zellen zu bewirken und auf diese Weise die Rate an aGvHD und cGvHD sowie die Häufigkeit von Rezidiven und NRM deutlich zu senken (Luznik et al., 2010, Fuchs, 2012). Zusammenfassend bietet die haploidente HSCT die Möglichkeit einer schnellen und fast universellen Spenderverfügbarkeit und ist darüber hinaus mit einem möglicherweise stärkeren GvL-Effekt assoziiert, als dieser im Rahmen einer HLA-identen Transplantation auftritt. Die Beschleunigung der Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation, insbesondere bei HLA-differenten Spender-Empfänger-Paaren, bleibt jedoch weiterhin eine der wichtigsten zu lösenden Aufgaben der modernen Transplantationsmedizin.

#### 4.3.2 Konditionierungsregime

Abdul Wahid *et al.* haben in einer jüngst veröffentlichten Metaanalyse die Stammzelltransplantation unter nicht-myeloablativer, reduzierter Konditionierungstintensität (RIC) mit der Anwendung konventioneller myeloablativer (MAC) Konditionierungsregime vor allogener Stammzelltransplantation verglichen. Anhand der Daten von 15.258 erwachsenen Patienten wurden beide Therapieansätze in Hinblick auf das Gesamtüberleben nach Transplantation ausgewertet. Trotz des höheren Alters und einer erhöhten Komorbiditätsrate der RIC-Patienten, zeigten sich hier gegenüber der MAC-Kohorte 2 bis 6 Jahre nach Intervention vergleichbare Überlebensdaten. Während Komplikationen wie die akute und chronische GvHD reduziert waren und sich das progressionsfreie Überleben verbessert darstellte, wies die RIC-Kohorte allerdings eine signifikant erhöhte Rezidivrate auf (Abdul Wahid et al., 2014).

Couriel *et al.* berichten ebenfalls über eine signifikant niedrigere Inzidenz an Grad II bis IV aGvHD und cGvHD bei Patienten, die sich einer nicht-myeloablativen Therapie unterzogen. Dieser Beobachtung liegt weitreichend belegt der Umstand zugrunde, dass die akute GvHD zu großen Teilen durch eine Zytokinausschüttung bedingt wird, die in direktem Zusammenhang mit der höheren Toxizität myeloablativer Regime steht (Couriel et al., 2000). Sie hoben des Weiteren hervor, dass das rezidivfreie Überleben bei älteren Patienten, die mit dosisreduziertem Regime therapiert wurden, erstaunlicherweise vergleichbar war mit jungen Patienten, die sich einer aggressiven MAC unterzogen hatten (Couriel et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden 125 Patienten des Gesamtkollektivs einer dosisreduzierten Konditionierung unterzogen. Bei 11 Patienten wurden myeloablativere Verfahren angewen-

det. Die oben aufgezeigte Kaplan-Meier-Kurve (vgl. Abb. 22) zeigt bis Tag 600 nach allogener HSCT annähernd gleiche Überlebenswahrscheinlichkeiten im Vergleich beider Konditionierungsregime. Als Grund für die Abnahme des kumulativen Überlebens der RIC-Kohorte nach dem 600. Tag wäre das tendenziell höhere Lebensalter sowie die altersbedingt höhere Komorbiditätsrate innerhalb dieses Kollektivs denkbar. Neben dem Vergleich der Kohorten hinsichtlich des Outcomes und des rezidivfreien Überlebens nimmt diese Arbeit zusätzlich Bezug auf die therapeutische Beeinflussung der zellulären und humoralen Rekonstitution. Analog zu dieser Betrachtung beleuchten Douek *et al.*, Petersen *et al.* und Schulenburg *et al.* den Einfluss unterschiedlicher Therapieregime auf die Immunrekonstitution nach allogener HSCT (Douek *et al.*, 1998, Petersen *et al.*, 2003, Schulenburg *et al.*, 2005). Douek *et al.* und Petersen *et al.* berichten vor diesem Hintergrund von einer deutlich beschleunigten Erholung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten unter Anwendung dosisreduzierter Therapieregime. Nach Petersen *et al.* erholten sich CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach 3 Monaten, während innerhalb von 9 Monaten eine Normalisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erreicht werden konnte. Im Gegensatz zu diesen Daten konnte ein vergleichbarer Effekt dosisreduzierter Therapieregime auf die Konsolidierung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der hier durchgeführten Analyse nicht gefunden werden. Sowohl unter dosisreduzierten als auch unter myeloablativen Regimen wurde der Normwertbereich für CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten über den gesamten Analysezeitraum nicht erreicht. Ferner zeigten sich ähnlich wie bei Müller-Hepburn (Müller-Hepburn, 2014) unter myeloablativer Konditionierung tendenziell höhere Zellzahlen als nach dosisreduzierter Konditionierung; signifikante Unterschiede in der zellulären Rekonstitution ergaben sich allerdings nicht. Die humorale Konsolidierung erbrachte in der Betrachtung der Immunglobuline IgM und IgA signifikant höhere Werte nach myeloablativer Konditionierung. Kritisch anzumerken ist an dieser Stelle allerdings die stark differierende Kohortengröße innerhalb all dieser Vergleiche, die eine differenzierte Interpretation der zellulären und humoralen Erholung unter Umständen verzerren kann.

Der Einsatz von ATG oder Alemtuzumab in der Konditionierungstherapie vor allogener HSCT hat die Depletion von sowohl Spender- als auch Empfänger- T-Lymphozyten zum Ziel, wodurch sowohl Inzidenz als auch Ausprägung einer GvHD und die Häufigkeit der Transplantatabstoßung vermindert werden sollen (Buggins *et al.*, 2002, Mohty, 2007). Das polyklonale Antikörpergemisch ATG wirkt über verschiedene Mechanismen immunsuppressiv. Während über T-Zell spezifische Antikörper (CD2, CD3, CD4, CD5, CD25) eine rasche und intensive T-Zell-Suppression erzielt wird, richten sich B-Zell- spezifische Antikörper gegen aktivierte B-Zellen. Alemtuzumab (Campath) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der mit dem CD52-Antigen auf der Oberfläche von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen, Makrophagen sowie eosinophilen Granulozyten interagiert; der therapeutische Fokus in der Anwendung beider Medikamente liegt, wie beschrieben, auf



dem Effekt der T-Zell-Depletion als zentraler Komponente der modernen GvHD-prophylaktischen Therapie.

Die induktive T-Zell-Depletion mit ATG respektive Alemtuzumab zur präemptiven Therapie der GvHD findet in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie am Campus Kiel breite Anwendung; in der vorliegenden Arbeit wurden 82% mit ATG, weitere 18% mit Alemtuzumab behandelt.

In der Literatur wird der Einsatz von polyklonalen Antikörpern als Induktionstherapie vor dem Hintergrund der Beeinflussung eines Krankheitsrezidivs weiterhin kontrovers diskutiert. Verschiedene Analysen belegen, dass die Induktionstherapie mit ATG in der Behandlung solider Tumoren mit einem verminderten Risiko für eine akute Abstoßung und einer signifikanten Erhöhung des Transplantatüberlebens einhergeht (Szczzech et al., 1997). Langzeitdaten zeigen allerdings keinen signifikanten Vorteil für das Transplantatüberleben im Verhältnis zu Patienten ohne polyklonale Antikörperinduktionstherapie (Belitsky et al., 1991). Im Rahmen der allogenen HSCT haben Datenanalysen gezeigt, dass die *in vivo* T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert ist und über eine verzögerte Rekonstitution naiver T-Zellen zu erhöhten Raten opportunistischer Infektionen und TRM führt (Baron et al., 2012, Novitzky et al., 2013). Andererseits führt eben diese kompetente T-Zell-Depletion zu einer deutlichen Verbesserung des Transplantatanwachsens (Chakraverty et al., 2001). Dies betont die Wichtigkeit der Spender T-Lymphozyten für den GvL-Effekt. Obwohl die Wirkmechanismen von Alemtuzumab weitestgehend bekannt sind, gestaltet sich die Festlegung der optimalen Antikörperkonzentration bezogen auf die Zelldichte des Transplantats weiterhin schwierig. Bei Anwendung zu niedriger Dosen von Alemtuzumab *ex vivo* zeigte sich in Studien eine unzureichende Depletion von Lymphozyten verbunden mit einer zu geringen Menge freier Antikörper im Transplantat. Zudem werden zu hohen Dosen Alemtuzumabs mit konsekutiv erhöhter Konzentration löslicher Antikörper in der Zellsuspension eine mögliche totale Spender-T-Zelldepletion *in vivo* zugeschrieben. Dies birgt wiederum die Gefahr des non-Engraftments durch Antikörper-vermittelte Apoptose peripherer Blutstammzellen (Novitzky et al., 2013). Im Gegensatz dazu besteht keine Assoziation zwischen der Anwendung von ATG mit dem Anstieg der Rezidivhäufigkeit (Westphal et al., 2014); mehr noch scheint ATG neben der T-Zell depletierenden Wirkung über Komplement-unabhängige Apoptose von Leukämiezellen einen Anti-Tumor-Effekt zu bewirken (Grulich et al., 2009, Liu et al., 2012). Durch die fast ausnahmslose Behandlung aller Patienten des Patientenkollektivs mit ATG oder Alemtuzumab war eine vergleichbare Analyse im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Während die im oberen Abschnitt beschriebene mangelhafte Erholung der CD4+ T-Lymphozyten ebenfalls durch die breite Anwendung T-Zell-depletierender Therapien bedingt sein kann, unterstreicht die niedrige Gesamtrate an cGvHD von 40%

im hier untersuchten Patientenkollektiv den Erfolg der präemptiven Therapiestrategie in Bezug auf die GvHD-Prophylaxe.

Im Rahmen der statistischen Analyse wurden ATG und Alemtuzumab hinsichtlich ihrer Effekte auf die Immunrestitution weiter gegenübergestellt. Interessanterweise konnten signifikant unterschiedliche Auswirkungen beider Medikamente auf die Reconstitution des T-Zell-Systems gezeigt werden. Dem entgegen muss berücksichtigt werden, dass die angewandte mediane Dosis von 50 mg/kg KG Alemtuzumab in der Therapie von T-Zell Non Hodgkin Lymphomen eine höhere biologische Aktivität besitzt als die verabreichte mediane Dosis von 40 mg/kg KG Fresenius ATG.

Wie so bislang nicht berichtet, zeigte sich bei prinzipiell gleicher Wirkung von ATG und Alemtuzumab auf CD4+ T-Lymphozyten eine deutlich stärker depletierende Wirkung von Alemtuzumab auf CD8+ T-Lymphozyten. Der übereinstimmenden Annahme anderer Autoren, die aufgrund der ausgeprägten Expression von CD52 auf der Oberfläche von CD4+ T-Lymphozyten von einer stärkeren Wirkung von Alemtuzumab auf CD4+ T-Zellen ausgehen, muss auf dieser Grundlage widersprochen werden (Lowenstein et al., 2006). Über die Ursachen der unterschiedlich stark ausgeprägten depletierenden Wirkung auf CD8+ T-Lymphozyten lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nur spekulieren; sie spräche gegebenenfalls für einen prolongierten dosisunabhängigen Therapieeffekt von Alemtuzumab im Vergleich zu ATG (Lowenstein et al., 2006); diese Annahme könnte über eine Analyse der Halbwertszeiten von Alemtuzumab und ATG, sowie die Überprüfung ihrer minimalen Wirkstoffkonzentration objektiviert werden. Unter der Annahme, dass eine effiziente T-Zell-Depletion nach Therapie mit Alemtuzumab respektive ATG durch Verringerung alloreaktiver Prozesse im Rahmen einer GvHD die virusspezifische Immunrestitution beschleunigt (Sellar et al., 2015), kann die tiefergehende Analyse von CMV-Infektionen und -Reaktivierungen im Sinne eines biologischen Tests interessante neue Aspekte betreffend der Therapieeffizienz beider Medikamente erbringen.

#### **4.3.3 Donor-Lymphozyten Infusion**

Donor-Lymphozyten-Infusionen werden genutzt, um den GvL-Effekt der allogenen Stammzelltransplantation auf residuale Tumorzellen (MRD) in Patienten zu verstärken (Ho et al., 2014, Zeidan et al., 2014). Zudem bildet die Gabe von Spenderlymphozyten ein effektives therapeutisches Instrument bei Auftreten von Rezidiven nach HSCT (Huang et al., 2007). Mehr noch können die infundierten Lymphozyten das Immunsystem des Empfängers stärken und auf diese Weise die Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation günstig beeinflussen. Dieser positive Effekt von DLI konnte auch in dieser Studie nachgewiesen werden: Sowohl die Populationen der CD4+ T-Lymphozyten, der B-Lymphozyten als auch der NK-Zellen präsentierten sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe im Mittel 6

Monate nach DLI mit signifikant höheren Zellzahlen. Laut EBMT von 2004 birgt die Infusion von Donor-Lymphozyten jedoch auch Risiken. So sei die Vergabe bei Patienten mit großer, schnell zunehmender Tumormasse ineffizient, bei Patienten mit schweren Formen der GvHD sogar kontraindiziert (Bacigalupo, 2004). Interessanterweise scheint jedoch eine milde Aktivierung des Empfängerimmunsystems vor Verabreichung von DLI nötig zu sein. So zeigen DLI bei Patienten ohne GvHD keinen Effekt (Bacigalupo, 2004). Dass DLI eine akute GvHD auslösen beziehungsweise eine bestehende GvHD verstärken können, ist allgemein anerkannt. Yan *et al.* haben vor diesem Hintergrund eine immunsuppressive Behandlung 6-8 Wochen nach DLI auf Effektivität und Auswirkungen auf das Immunsystem des Empfängers untersucht. Sie berichteten, dass durch eine derartige Immunsuppression die sich der DLI anschließenden aGvHD behandeln lasse, ohne den erwünschten GvL-Effekt abzumildern (Yan et al., 2014). Greco *et al.* verweisen im Kontext der DLI auf die jüngsten Fortschritte der adaptiven Immuntherapie: Hier berge insbesondere die Gentherapie neue Möglichkeiten, Donor-Lymphozyten-vermittelte GvL-Effekte zu verstärken und so die Immunrekonstitution zu beschleunigen. Gleichzeitig könne über eingeschleuste Suizid-Gene die Steuerbarkeit alloreaktiver T-Lymphozyten ermöglicht werden und so das Auftreten von GvHD verhindert oder zumindest effektiv kontrolliert werden (Greco et al., 2015). Aktuell ist hier der Transfer von Herpes simplex Thymidin- Kinase (HSV-TK) Suizid-Genen der am besten erforschte und verheißungsvollste *in vivo* Ansatz (Lupo-Stanghellini et al., 2010). Neueste vielversprechende Strategien zielen zudem auf eine direkte Elimination von Tumorzellen ab. Diese soll durch Infusion Tumor-spezifischer T-Lymphozyten mit hoch-selektiven tumorspezifischen T-Zellrezeptoren (Robbins et al., 2008) oder chimären Antigenrezeptoren (CAR) (Grupp et al., 2013, Maude et al., 2014) gegen tumorassoziierte Antigene erreicht werden.

Buhmann *et al.* berichten im Zusammenhang der tumorspezifischen Immuntherapie von erfolgversprechenden Ergebnissen einer Phase I/II Studie, in welcher bei therapierefraktären Hoch- und Niedrigrisiko-Lymphomen sowie NHL über einen bispezifischen anti-CD20 anti-CD3 Antikörper (trAb) FBTA05 eine deutliche Dominanz von GvL- gegenüber GvHD-Effekten erzielt werden konnte (Buhmann et al., 2013).

Im Zusammenspiel mit gentechnologischen Verfahren birgt die Anwendung von DLI im Rahmen der allogenen HSCT großes Potential. Sowohl in Bezug auf die Immunrekonstitution, als auch auf die Vermittlung von Anti-Tumor Effekten und die Reduzierung von intermediären Risiken wie der GvHD. Dass eine spezifische Immuntherapie durch DLI die Immunrekonstitution nach allogener HSCT kurzfristig positiv zu unterstützen vermag, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Ob derartige Verfahren die immunologische Rekonvaleszenz *post transplantationem* langfristig beschleunigen können obliegt der Überprüfung durch nachfolgende Studien.

## **4.4 Verlaufsassozierte Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution**

### **4.4.1 GvHD**

Noch während der 1980er Jahre war die Stammzelltransplantation bei unvollständiger Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger aufgrund von Transplantatversagen und schwersten Formen der GvHD unmöglich (Anasetti et al., 1989). Das Transplantatversagen wird dabei verschiedenen Studien zufolge verursacht durch residuale Vorläuferzellen zytotoxischer T-Zellen des Empfängers, die nicht durch die angewandten Therapieregime erreicht werden (Kernan et al., 1987, Reisner et al., 1986), während im Transplantat enthaltene Spender T-Zellen für die Ausbildung der GvHD verantwortlich gemacht werden. Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der cGvHD hingegen ist in weiten Teilen noch unverstanden. Verbesserte Konditionierungsregime konnten zwar eine Verminderung der Transplantatabstoßung erreichen, die GvHD verbleibt jedoch nach wie vor eine schwerwiegende Komplikation nach allogener HSCT. Die standardmäßige Applikation einer GvHD-Prophylaxe nach Transplantation in Form von CSA, MMF und MTX sowie die Verabreichung hoch dosierter Kortikosteroide in der Initialbehandlung der GvHD können Ansprechraten von bis zu 30-70% erzielen. Nach wie vor existieren allerdings keine festen Therapierichtlinien für die Kortikosteroid-refraktäre GvHD. Immunsuppressive Therapieansätze mit T-Zell-depletierten Stammzellspenden durch Anwendung von Alemtuzumab konnten zwar in bis zu 95% der Fälle zu einer Eindämmung der steroidrefraktären cGvHD führen, sind dafür jedoch weiterhin limitiert durch hohe Raten viraler Reaktivierungen und opportunistischer Infektionen (Meunier et al., 2014, Schub et al., 2011). Neben der Tatsache, dass sich nahezu alle Patienten zu irgendeinem Zeitpunkt nach HSCT einer immunsuppressiven Therapie unterziehen, variiert die Dauer und Intensität der Immunsuppression jedoch von Fall zu Fall. Insbesondere bei Patienten mit cGvHD, bei denen die immunsuppressive Therapie wie bereits oben beschrieben zur Standardtherapie zählt, muss konsekutiv eine therapieassoziierte verzögerte Immunrekonstitution angenommen werden. Zusätzlich zu dem offensichtlichen Einflussfaktor der immunsuppressiven Therapie auf die Erholung des Immunsystems, spielen weitere sich wechselseitig bedingende Faktoren wie die Schädigung des für die Immunrekonstitution so wichtigen Mikromilieus des Knochenmarkraums sowie die Beeinflussung der peripheren lymphoiden Expansion durch die cGvHD eine entscheidende Rolle (Mackall et al., 2009). In der untersuchten Kohorte zeigten sich ebenfalls Zusammenhänge zwischen cGvHD und einer verzögerten Immunrekonstitution. Die Zelllinien der CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen rekonstituierten sich bei Patienten mit cGvHD leicht verzögert gegenüber Patienten ohne Ausbildung einer cGvHD; insgesamt wurden zum Ende des Untersuchungszeitraumes jedoch weitestgehend vergleichbare Zellzahlen erreicht. Im Unterschied dazu verblieben die B-Lymphozyten bei Patienten mit cGvHD deutlich unterhalb des

Zellniveaus, das von Patienten ohne cGvHD erreicht wurde. Diese Beobachtung ist vor allem vor dem Hintergrund der noch wenig bekannten Rolle der B-Lymphozyten für die Pathogenese der cGvHD von großem Interesse. Die Veränderungen in der B-Zell-Proliferation könnten in einer erhöhten Konzentration von Zell-Zyklus aktivierenden Faktoren wie dem B-Zell-aktivierenden Faktor (BAFF) sowie einer Apoptose-Resistenz der B-Lymphozyten von cGvHD-Patienten begründet liegen (Sarantopoulos et al., 2009, Allen et al., 2012). Im Maus-Modell fördert die erhöhte Konzentration von BAFF in Abwesenheit kompetenter naiver B-Zellen die Ausbildung autoreaktiver B-Zellen (Lesley et al., 2004). Diese und andere Studien implizieren, dass der BAFF-medierte B-Zell-Toleranz eine Schlüsselrolle in der Verhinderung der Ausbildung von B-Zell-vermittelter Autoreaktivität zukommt (Thien et al., 2004). Andererseits legt die Tatsache, dass Patienten mit cGvHD eine vergleichsweise niedrige Anzahl naiver B-Zellen aufweisen, die Vermutung nahe, dass bei diesen Patienten eine Störung der B-Zell-Homöostase auf Ebene des Mikromilieus des Knochenmarks besteht (Storek et al., 1993). Darüber hinaus belegen neuere Studien eine gesteigerte Antwort der B-Zellen auf Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR). Als ursächlich hierfür wird eine erhöhte Expression der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine B-cell linker protein (BLNK) und Syk diskutiert (Allen et al., 2014, Sarantopoulos and Ritz, 2015, Munchel et al., 2011). Die signifikant niedrigeren Immunglobulinlevel bei Patienten mit stattgehabter cGvHD decken sich einerseits mit dem nachgewiesenen quantitativen Mangel an B-Lymphozyten, lassen sich jedoch andererseits auch als verminderte qualitative Rekonstitution der B-Lymphozyten interpretieren. Darüber hinaus könnte ebenso das Phänomen der MGUS, die Produktion monoklonaler Antikörper durch B-Zell-Klone, als Ausdruck einer gestörten B-Zell-Rekonstitution im Sinne eines erworbenen autoreaktiven Potentials angesehen werden. Die insgesamt niedrige Rate an GvHD von 39% innerhalb des Patientenkollektivs könnte auf die breite Anwendung von ATG und Alemtuzumab zurückzuführen sein; gleiches gilt für die erstaunlicherweise vergleichbare Rate an cGvHD im Vergleich von älteren zu jüngeren Patienten. Di Ianni *et al.* berichten darüber hinaus, dass die adaptive Immuntherapie mit frisch gewonnenen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen und konventionellen T-Zellen der Entwicklung einer GvHD entgegenwirken kann. Ferner würden durch diesen Ansatz die lymphatische Rekonstitution unter Beibehaltung des Graft-versus-Leukämie Effekts beschleunigt und Abwehrmechanismen gegen opportunistische Erreger verbessert (Di Ianni et al., 2011). Die Frage, welchen Einfluss die adaptive Immuntherapie im Vergleich zu der zum Teil standardmäßig angewandten T-Zell-Depletion tatsächlich auf die Immunrekonstitution der Patienten besitzt, bedarf weiterer Forschung.

#### 4.4.2 Infektionen

Bei immunkompetenten Empfängern führt die Infektion mit CMV zu einer lebenslangen immunologischen Auseinandersetzung des Immunsystems, insbesondere des T-Zell-Kompartiments, mit dem Virus (Sylwester et al., 2005). Den CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten kommt hierbei die Aufgabe der andauernden Repression der viralen Replikation und damit der Verhinderung einer klinischen Progression der Erkrankung zu (Reddehase, 2002, Einsele et al., 2002). Wenngleich weitreichende Fortschritte in der Prävention und Behandlung von CMV-Infektionen erzielt werden konnten, bilden diese gemeinsam mit der GvHD eine der Hauptkomplikationen in der frühen Phase nach allogener Stammzelltransplantation und stellen bei Immunkompromittierten einen wesentlichen Einflussfaktor in Bezug auf die transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität dar (Bosch et al., 2012, Hakki et al., 2003, Lugthart et al., 2014). Während die virusspezifische Immunität nach allogener HSCT weitreichend erforscht ist, ist der Langzeiteffekt einer Infektion auf die Rekonstitution des T-Zell-Kompartiments weitestgehend unklar. In dieser Studie wurde die CMV-Infektion als Einflussvariable auf eine erfolgreiche Immunrekonstitution *post transplantationem* über 21 Monate betrachtet. Die durchgeführten Analysen zeigten einen deutlichen Effekt der CMV-Infektion auf die langfristige lymphozytäre Rekonstitution. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg wiesen Patienten nach stattgehabter CMV-Infektion signifikant höhere CD8+ T-Lymphozyten gegenüber nicht erkrankten Patienten auf. Losgelöst von der direkten Reaktion des Immunsystems auf die akute Reaktivierung beziehungsweise Neuinfektion, konnte durch diese Arbeit eine dauerhafte positive Beeinflussung der Entwicklung der CD8+ T-Zellen durch eine frühe Virusinfektion gezeigt werden. Die Untersuchung der Konsolidierung von CD4+ T-Lymphozyten hingegen ergab mit dem nicht erkrankten Patientenkollektiv vergleichbare Werte. Diese Beobachtung leitet zu der Hypothese, dass die latente CMV-Infektion transiente subklinische Virusreaktivierungen nach sich zieht und den Ausgangspunkt für eine Expansion und Differenzierung virusspezifischer CD8+ T-Lymphozyten bildet. Ob dies nach erfolgreicher Auseinandersetzung des Empfängerorganismus mit Virusantigenen gegebenenfalls zu einer verbesserten Immunrekonstitution und Nebeneffekten wie einer potentiellen Verstärkung des GvL-Effekts durch erhöhte Anzahl CD8+ Effektorzellen führen könnte, bleibt an dieser Stelle unklar. Eine nähere Betrachtung der Zusammensetzung des CD8+-Zell-Kompartiments wäre zur Klärung vorangehender Hypothese von weiterem Interesse und obliegt nachfolgenden Untersuchungen. Auch bedarf in diesem Rahmen die Frage nach dem Einfluss des zeitlichen Auftretens der CMV-Infektion nach allogener HSCT, der Kinetik des Infektionsverlaufs und der Auswirkung der interindividuell unterschiedlich hohen Viruslast und ihrer Auswirkung auf die Immunrekonstitution weiterer Abklärung. Espigado *et al.* vermuten in diesem Zusammenhang, dass insbesondere der Zeitpunkt einer suffizienten virusspezifischen T-Zell-Antwort

Rückschlüsse auf die erfolgreiche Rekonsolidierung und das Gesamtüberleben von Patienten nach allogener HSCT zulassen könnte (Espigado et al., 2014). Inwieweit der Höhe der Viruslast innerhalb des individuellen Infektionszeitraums eine relevante Rolle in Bezug auf das Ausmaß der T-Zell-Rekonstitution, das OAS und die TRM zukommt, kann im Rahmen der hier diskutierten Arbeit jedoch nur spekuliert werden. Dem B-Zellsystem wird in der Literatur bezüglich der Kontrolle der CMV eine untergeordnete Rolle beigemessen. Auch die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben keine signifikanten Reaktionen des B-Zell-Kompartiments auf eine stattgehabte CMV-Reaktivierung.

Vor dem Hintergrund eines geschätzten positiven EBV-Serostatus bei gesunden Erwachsenen von etwa 50% (Cohen, 2000, Glaser et al., 1997), besteht insbesondere bei immunkompromittierten Patienten nach allogener HSCT ein erhöhtes Risiko der Reaktivierung einer latenten EBV-Infektion. Besondere Bedeutung kommt der Erforschung der Auswirkungen einer EBV-Infektion aufgrund des Risikos der Entwicklung einer EBV-assoziierten Lymphoproliferativen Erkrankung nach Transplantation (PTLD) als schwerwiegende Komplikation nach allogener HSCT zu. Im Gegensatz zur CMV-Infektion wird eine EBV-Infektion jedoch ausschließlich im Falle der Ausbildung einer PTLD klinisch relevant und ist mit einer Inzidenz von 1-2% eine vergleichsweise seltene Komplikation. Bei Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren wie einer durchgeführten T-Zell-Depletion, starken Abweichungen in der HLA-Konstellation zwischen Spender und Empfänger, EBV-mismatch sowie einer verstärkten Immunsuppression zur Behandlung einer GvHD kann die Inzidenz innerhalb des Risikokollektivs jedoch auf bis zu 10-20% ansteigen (Rouce et al., 2014, Uhlin et al., 2014). Da die Erhebung der EBV-Viruslast aufgrund der oben angeführten Gründe am UKSH Kiel bisher nur in begründeten Einzelfällen erfolgt und im hier untersuchten Patientenkollektiv kein Fall von PTLD existiert, wurde die EBV-Reaktivierung als Einflussvariable der Immunrekonstitution nach allogener HSCT in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Die Analyse der Auswirkungen einer EBV-Reaktivierung auf die Immunrekonstitution nach allogener HSCT bleibt so nachfolgenden Arbeiten vorbehalten und findet in der weiteren Diskussion keine Berücksichtigung.

#### **4.4.3 Monoklonaler Gammopathien unklarer Signifikanz**

Sowohl nach autologer als auch nach allogener Stammzelltransplantation, nach Anwendung klassischer myeloablativer sowie nicht-myeloablativer Konditionierungsregime wurde über das Auftreten klonaler Gammopathien berichtet (Mitus et al., 1989, Hammarstrom and Smith, 1987, Nagashima et al., 2004). Bisher blieben Ursachen, detaillierte Auswirkungen und klinische Relevanz dieses immunologischen Phänomens jedoch weitgehend unklar (Blade et al., 2010b). Festzustellen ist, dass nach heutigem Wissensstand die sekundäre monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz ein benignes Phänomen darstellt, welches nicht mit ei-

nem Krankheitsrezidiv oder Krankheitsprogress zu verwechseln ist. Definitionsgemäß besteht eine MGUS bei einer Serum M-Protein Konzentration von  $<3$  g/dl bei  $<10\%$  Plasmazellen im Knochenmark (BMPC) ohne Auftreten von Symptomen und Organ- oder Gewebeteilung, die der monoklonalen Gammopathie ursächlich zuzuschreiben sind (Blade et al., 2010a). Wie erwähnt, besteht ein Risiko des Übergangs der MGUS in oben benannte Folgeerkrankungen (vgl. Abschnitt 1.5.2) von  $1\%$  pro Jahr. Verschiedene Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass nahezu allen Fällen Multipler Myelome eine MGUS vorausgeht (Landgren et al., 2009, Weiss et al., 2009). Die Höhe und Art des M-Proteins zum Diagnosezeitpunkt, Anzahl der Plasmazellen im Knochenmark und das Kappa/Lambda-Verhältnis sind in diesem Kontext wichtige diagnostische Marker, um Hochrisikopatienten zu identifizieren; die Entwicklung der M-Protein Konzentration im ersten Jahr nach Diagnosestellung wird dabei als wichtigster Prädiktor eines Krankheitsprogresses der Grunderkrankung angesehen (Rosinol et al., 2007). Patienten, welche ein monoklonales Immunglobulin vom Typ IgA oder IgM bilden, scheinen hier ein höheres Progressionsrisiko zu besitzen als Patienten mit M-Protein vom Typ IgG. An dieser Stelle erscheint es darüber hinaus wichtig, die MGUS vom asymptomatischen (smouldering) Multiplen Myelom (SMM) zu differenzieren. Das SMM ist definiert als Serum M-Protein Konzentration  $>3$  g/dl und/oder  $>10\%$  BMPC in Abwesenheit von Organ- oder Gewebeteilung durch eine MGUS (Blade et al., 2010b). Im Vergleich zur MGUS, welche bei Patienten nach allogener HSCT ein meist passageres Phänomen darstellt, lässt sich das Risiko des Übergangs in ein Multiples Myelom beim SMM auf  $10\%$  pro Jahr beziffern (Kyle et al., 2010).

Schmitz *et al.* untersuchten in einer Single Center Studie 138 Myelompatienten, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen. Für  $39,6\%$  der Patienten stellte die allogene HSCT die Behandlung der Grunderkrankung dar,  $60,4\%$  wurden aufgrund eines Rezidivs der Grunderkrankung behandelt. Innerhalb dieses Patientenkollektivs entwickelten  $48,2\%$  eine MGUS. Diese trat nach einer medianen Latenz von  $6,9$  Monaten *post transplantationem* auf. Schmitz *et al.* zu Folge bestand eine im Vergleich mit HLA-identen unverwandten Spendern erhöhte Inzidenz von MGUS bei HLA-identen Familienspendern (Schmitz et al., 2014). Im Gegensatz dazu wurde in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie zunächst die Art des M-Proteins hinsichtlich der Grunderkrankung des Patienten analysiert, um die MGUS streng von einem Rezidiv der Grunderkrankung zu trennen: Zeigte sich bei Patienten in der Betrachtung der MGUS das gleiche M-Protein, welches auch im Rahmen eines zuvor bestehenden Myeloms diagnostiziert wurde, wurde dies als Rezidiv der Grunderkrankung gewertet. Die entsprechenden Patienten wurden nachfolgend aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. War im Vergleich zur Grunderkrankung hingegen ein Klassenwechsel des Paraproteins nachweisbar, wurde von einer nicht Myelom-abhängigen, tatsächlichen MGUS ausgegangen. Auf diese Weise ergab sich eine Häufigkeit klonaler Gammopathien von  $13\%$



im vorliegenden Patientenkollektiv, wobei keine Korrelation zur HLA-Konstellation zwischen Spender und Empfänger nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich der lymphozytären Gesamtrekonstitution nach einem Jahr entwickelten sich Patienten nach Ausbildung einer MGUS im Median weitestgehend ähnlich wie Patienten, welche im Verlauf nach allogener HSCT keine MGUS ausbildeten. Interessanterweise lag der Entwicklung einer MGUS in 39% der Fälle ein Multiples Myelom zugrunde. Im Unterschied zu oben genannter Arbeit von Schmitz *et al.* umfasste das in dieser Studie beobachtete MGUS-Kollektiv neben dem Multiplen Myelom auch andere Krankheitsentitäten. Betrachtet man die 15 Fälle von Multiplen Myelomen des Gesamtkollektivs gesondert, ergäbe sich eine MGUS-Rate von 47% innerhalb der Myelomgruppe. Zudem muss beachtet werden, dass die MGUS innerhalb der beobachteten Kohorte in 83% der Fälle ein ausschließlich limitiertes, temporäres Phänomen darstellt. Nur 3 Patienten zeigte nach der erstmaligen Diagnose eine dauerhafte Erhöhung monoklonaler Immunglobuline im Serum. Der Unterschied im Studienaufbau kann die Häufigkeitsabweichungen zur Arbeit von Schmitz *et al.* folglich erklären und lässt den Schluss zu, dass die MGUS ein seltenes Phänomen ist, welches jedoch eine deutliche relative Häufung bei Myelompatienten zeigt.

Im Hinblick auf Pathogenese und Progress der MGUS scheinen neben zytogenetischen Mutationen auf Ebene der Plasmazellen Veränderungen im Mikromilieu des Knochenmarks wie Induktion von Angiogenese und parakrine Signaltransduktion über z.B. IL-6 eine ursächliche Rolle zu spielen (Rajkumar, 2009). Während bisher abwartende Therapiestrategien bis zum Auftreten eines klinisch manifesten MM als Standard galten, scheinen zukünftig das Mikromilieu des Knochenmarks modifizierende Therapiestrategien erfolgversprechend in Bezug auf die Prävention eines Fortschreitens der MGUS in ein MM zu sein. Während Therapieversuche mit Bisphosphonaten, Thaledomid und Melphalan bisher erfolglos verblieben, erbringen ersten Studien unter Anwendung von Lenalidomid und Dexamethason bei Patienten mit Hochrisiko MGUS bzw. SMM erste Erfolge (Mateos and San Miguel, 2013, Caers et al., 2016).

Nicht-myeloablative Regime mit reduzierter Intensität basieren auf einer verstärkten Immunsuppression zur Gewährleistung eines vollständigen Engraftments von Spenderzellen; das Auftreten von GvHD soll verringert und gleichzeitig der Graft-versus-Leukämie Effekt als effizientes Mittel gegen eine MRD aufrechterhalten werden (Meunier et al., 2014). Die Wirkmechanismen und Effekte einer T-Zell depletierenden Behandlung mit ATG respektive Alemtuzumab wurden im oberen Abschnitt diskutiert. Schmitz *et al.* berichteten in diesem Zusammenhang von einer geringeren Inzidenz an MGUS nach Anwendung von Alemtuzumab oder ATG in der Konditionierungstherapie (Schmitz et al., 2014).

Lim *et al.* hingegen untersuchten ein Kollektiv von 138 Patienten mit malignen myeloischen Erkrankungen, die sich nach vorangegangener Konditionierung mit FBC (Fludarabin, Busulfan, Alemtuzumab) einer allogenen HSCT unterzogen. Innerhalb dieser Kohorte entwickelten 36% der Patienten eine klonale Gammopathie. IgG bildete den vorherrschenden Immunglobulin-Isotyp. Im Vergleich zu Patienten, die keine sekundäre Gammopathie entwickelten, bestand innerhalb der MGUS-Kohorte eine signifikant höhere Inzidenz chronischer GvHD (Lim *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation zwischen dem Auftreten einer MGUS und der Anwendung T-Zell depletierender Medikamente festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch - analog zur Arbeit von Lim *et al.* - ein signifikanter bivariater Zusammenhang zwischen dem Auftreten MGUS und dem Auftreten einer cGvHD ( $p = 0,031$ ). Dieser Zusammenhang konnte nachfolgend mittels multivariater Analyse bestätigt werden ( $p=0,006$ ). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hier dargelegten Untersuchung (vgl. Abschnitt 3.6.1.) beschreiben Serantopoulos *et al.* wie auch Widmer *et al.* eine verzögerte B-Zell-Rekonstitution bei Patienten mit cGvHD. Gleichzeitig wiesen sie eine stark erhöhte Konzentrationen von B-Zell-aktivierendem Faktor (BAFF) bei Patienten mit cGvHD nach. Die Überstimulation des B-Zell-Rezeptors durch BAFF bei insgesamt erniedrigter Anzahl naiver B-Zellen resultiere ihren Annahmen nach in einem erhöhten Risiko zur Ausbildung einer pathologischen Allo- und Autoreaktivität von B-Zellen sowie einer verlängerten Überlebenszeit von Plasmazellen bei Patientin mit cGvHD (Sarantopoulos *et al.*, 2009, Widmer *et al.*, 2017). Diese Hypothese könnte ein Erklärungsmodell für die bei Patienten mit GvHD beobachtete erhöhte Produktion aberrierender Immunglobuline darstellen (vgl. Abschnitt 4.4.1).

Ableitend aus diesen Studien lässt sich die Vermutung anstellen, dass sowohl MGUS als auch cGvHD Folge einer gestörten B-Zell-Rekonstitution respektive einer inkompetenten, klonal restringierten B-Zell-Antwort sind. Vor dieser Annahme könnte der häufigere Einsatz von Serum-Eiweißelektrophorese und Immunfixation die Möglichkeit bieten, den Nachweis einer neu aufgetretenen MGUS als Indikator einer drohenden cGvHD zu nutzen.

Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft die Assoziation zwischen einer Reaktivierung latenter Virusinfektionen und dem Auftreten von Gammopathien. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Analyse betrachtete hinsichtlich dieses Zusammenhangs stellvertretend die CMV-Infektionsrate gemessen an der Anzahl der DNA Kopien pro  $\mu\text{l}$  Blut; die Infektion mit EBV wurde nicht berücksichtigt. Die Hypothese einer erhöhten Rate an MGUS bei Patienten mit nach Transplantation aufgetretener CMV-Infektion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Lim *et al.* sehen ebenso keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Auftreten einer Gammopathie und einer vorangegangenen Virusinfektion, wohingegen Babel *et al.* einen direkten Zusammenhang zwischen stattgehabter EBV-Infektion und dem Auftreten klonaler Gammopathien annehmen, da EBV, anders als CMV, zu einer polyklonalen B-

Zell-Expansion führt. Ihnen zufolge steigt das Risiko der Entwicklung einer MGUS mit zunehmender Viruslast. Patienten mit monoklonaler Gammopathie zeigen ihnen zufolge eine deutlich höhere EBV-Viruslast als Patienten, die keine Gammopathie entwickeln. MGUS-Patienten mit hoher EBV-Viruslast wird dieser Studie zufolge zudem eine höhere Neigung zur Ausbildung einer PTLD zugeschrieben (Babel et al., 2004).

Die genauere Betrachtung der EBV-Viruslast im Kontext einer MGUS im Rahmen sich dieser Arbeit anschließender prospektiver Studien könnte in diesem Punkt neue Ergebnisse liefern. Zudem ist zu prüfen, ob eine engmaschige Kontrolle der Viruslast bei EBV-positiven MGUS-Patienten der Früherkennung der PTLD dienlich sein kann. Auch in diesem Zusammenhang sollte eine eventuelle Korrelation zwischen der Reaktivierung einer latenten EBV-Infektion und dem zeitlich begrenzten Phänomen der MGUS (vgl. Abb. 39) berücksichtigt werden.

## 5. Zusammenfassung

Der Prozess der Immunrestitution nach allogener HSCT ist komplex und bis heute nicht vollständig verstanden; gleichwohl sind der Genesungsprozess und das Überleben von Patienten nach Stammzelltransplantation in hohem Maße abhängig von der Wiedererlangung einer vollumfänglichen immunologischen Funktion. Diese Dissertationsschrift untersucht vor diesem Hintergrund die Immunrestitution des zellulären und humoralen Systems bei 136 erwachsenen Stammzellempfängern 3 bis 21 Monate nach allogener HSCT unter Berücksichtigung verschiedener Einflussnehmender Faktoren.

Bis Ende des Untersuchungszeitraumes erreichte die Reconstitution des T-Zellsystems in 45%, die des B-Zellkompartiments in 50% der Fälle ihren jeweiligen Normwertbereich; die Reconstitution der CD8+ T-Lymphozyten war dabei deutlich erfolgreicher als die CD4+ T-Lymphozyten. Die NK-Zelllinie erreichte nach 21 Monaten zu 100% normale Werte. Im Gegensatz zu der in Teilen defizitären zellulären Erholung wies ein Großteil der Patienten 21 Monate nach allogener HSCT normwertige Serum-Immunglobuline auf.

Nach der Analyse verschiedener Parameter auf die Immunrestitution ließ sich eine frühe CMV-Infektion als stärkste Einflussvariable auf die Immunrestitution nach allogener HSCT identifizieren. Insbesondere die Wachstumsrate CD8+ T-Lymphozyten sowie der Immunglobuline wurde durch die Infektion langfristig erhöht, wobei die Spezifität mit den eingesetzten Methoden nicht geklärt werden konnte. Bei einer Prävalenz von 40% kam der chronischen GvHD im Kontext der zellulären und humoralen Rekonvaleszenz erstaunlicherweise eine untergeordnete Rolle zu; herauszustellen verbleibt an dieser Stelle jedoch die gestörte B-Zellrestitution bei stattgehabter cGvHD. Während sich der Einsatz dosisreduzierter Regime in Bezug auf die Immunrestitution im Rahmen dieser Arbeit als weitestgehend gleichrangig gegenüber klassisch myeloablativen Konditionierungsregimen erwies und Alterseffekte ebenfalls nur schwach ausgeprägt waren, soll an dieser Stelle die erfolgreiche Immunrestitution bei älteren Patienten als Resultat moderner intensitätsreduzierter Konditionierungen betont werden. Ferner, und bisher in dieser Form nicht beschrieben, konnte der Einsatz von Alemtuzumab gegenüber ATG als nachhaltiger Einflussfaktor auf die Reconstitution CD8+ T-Lymphozyten ermittelt werden.

Die Ausbildung einer Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz hatte keinen Einfluss auf die lymphozytäre und humorale Reconstitution nach allogener HSCT. Auch konnte trotz einer relativen Häufung bei Myelompatienten kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer MGUS und der zur Transplantation führenden Grunderkrankung gefunden werden. Insgesamt zeigten Patienten mit MGUS jedoch ein signifikant erhöhtes Vorkommen an cGvHD. Eine CMV-Reaktivierung als Auslöser einer MGUS konnte ausgeschlossen werden.

## V Literaturverzeichnis

- ABDUL WAHID, S. F., ISMAIL, N. A., MOHD-IDRIS, M. R., JAMALUDDIN, F. W., TUMIAN, N., SZE-WEI, E. Y., MUHAMMAD, N. & NAI, M. L. 2014. Comparison of reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Stem Cells Dev*, 23, 2535-52.
- ABRAHAMSEN, I. W., SOMME, S., HELDAL, D., EGELAND, T., KVALE, D. & TJONNFJORD, G. E. 2005. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*, 90, 86-93.
- ADEMOKUN, A., WU, Y. C. & DUNN-WALTERS, D. 2010. The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology*, 11, 125-37.
- ALLEN, J. L., FORE, M. S., WOOTEN, J., ROEHRS, P. A., BHUIYA, N. S., HOFFERT, T., SHARF, A., DEAL, A. M., ARMISTEAD, P., COGHILL, J., GABRIEL, D. A., IRONS, R., ESSENMACHER, A., SHEA, T. C., RICHARDS, K., CUTLER, C., RITZ, J., SERODY, J., BALDWIN, A. S. & SARANTOPOULOS, S. 2012. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood*, 120, 2529-36.
- ALLEN, J. L., TATA, P. V., FORE, M. S., WOOTEN, J., RUDRA, S., DEAL, A. M., SHARF, A., HOFFERT, T., ROEHRS, P. A., SHEA, T. C., SERODY, J. S., RICHARDS, K. L., JAGASIA, M., LEE, S. J., RIZZIERI, D., HORWITZ, M. E., CHAO, N. J. & SARANTOPOULOS, S. 2014. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood*, 123, 2108-15.
- ALYEA, E. P., SOIFFER, R. J., CANNING, C., NEUBERG, D., SCHLOSSMAN, R., PICKETT, C., COLLINS, H., WANG, Y., ANDERSON, K. C. & RITZ, J. 1998. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood*, 91, 3671-80.
- ANASETTI, C., AMOS, D., BEATTY, P. G., APPELBAUM, F. R., BENSINGER, W., BUCKNER, C. D., CLIFT, R., DONEY, K., MARTIN, P. J., MICKELSON, E. & ET AL. 1989. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*, 320, 197-204.
- ANASETTI, C., LOGAN, B. R., LEE, S. J., WALLER, E. K., WEISDORF, D. J., WINGARD, J. R., CUTLER, C. S., WESTERVELT, P., WOOLFREY, A., COUBAN, S., EHNINGER, G., JOHNSTON, L., MAZIARZ, R. T., PULSIPHER, M. A., PORTER, D. L., MINEISHI, S., MCCARTY, J. M., KHAN, S. P., ANDERLINI, P., BENSINGER, W. I., LEITMAN, S. F., ROWLEY, S. D., BREDESON, C., CARTER, S. L., HOROWITZ, M. M. & CONFER, D. L. 2012. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*, 367, 1487-96.
- ARORA, M., WEISDORF, D. J., SPELLMAN, S. R., HAAGENSON, M. D., KLEIN, J. P., HURLEY, C. K., SELBY, G. B., ANTIN, J. H., KERNAN, N. A., KOLLMAN, C., NADEMANEE, A., MCGLAVE, P., HOROWITZ, M. M. & PETERSDORF, E. W. 2009. HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 27, 1644-52.
- AVANZINI, M. A., LOCATELLI, F., DOS SANTOS, C., MACCARIO, R., LENTA, E., OLIVERI, M., GIEBEL, S., DE STEFANO, P., ROSSI, F., GIORGIANI, G., AMENDOLA, G., TELLI, S. & MARCONI, M. 2005. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell

- transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp Hematol*, 33, 480-6.
- BABCOCK, G. J., DECKER, L. L., VOLK, M. & THORLEY-LAWSON, D. A. 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 9, 395-404.
- BABEL, N., SCHWARZMANN, F., PRUSS, A., VOLK, H. D. & REINKE, P. 2004. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is associated with an increased frequency of Epstein-Barr Virus (EBV) latently infected B lymphocytes in long-term renal transplant patients. *Transplant Proc*, 36, 2679-82.
- BACIGALUPO, A. 2002. Second EBMT Workshop on reduced intensity allogeneic hemopoietic stem cell transplants (RI-HSCT). *Bone Marrow Transplant*, 29, 191-5.
- BACIGALUPO, A. 2004. Third EBMT/AMGEN Workshop on reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem cell transplants (RIC-HSCT), and panel consensus. *Bone Marrow Transplant*, 33, 691-6.
- BACIGALUPO, A., BALLEEN, K., RIZZO, D., GIRALT, S., LAZARUS, H., HO, V., APPERLEY, J., SLAVIN, S., PASQUINI, M., SANDMAIER, B. M., BARRETT, J., BLAISE, D., LOWSKI, R. & HOROWITZ, M. 2009. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15, 1628-33.
- BAKER, K. S., NESS, K. K., STEINBERGER, J., CARTER, A., FRANCISCO, L., BURNS, L. J., SKLAR, C., FORMAN, S., WEISDORF, D., GURNEY, J. G. & BHATIA, S. 2007. Diabetes, hypertension, and cardiovascular events in survivors of hematopoietic cell transplantation: a report from the bone marrow transplantation survivor study. *Blood*, 109, 1765-72.
- BARON, F., LABOPIN, M., NIEDERWIESER, D., VIGOUROUX, S., CORNELISSEN, J. J., MALM, C., VINDELOV, L. L., BLAISE, D., JANSSEN, J. J., PETERSEN, E., SOCIE, G., NAGLER, A., ROCHA, V. & MOHTY, M. 2012. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia*, 26, 2462-8.
- BAUMGARTNER, C., MORELL, A., HIRT, A., BUCHER, U., FORSTER, H. K., DORAN, J. E., MATTER, L., BRUN DEL RE, G. & WAGNER, H. P. 1988. Humoral immune function in pediatric patients treated with autologous bone marrow transplantation for B cell non-Hodgkin's lymphoma. The influence of ex vivo marrow decontamination with anti-Y 29/55 monoclonal antibody and complement. *Blood*, 71, 1211-7.
- BELITSKY, P., MACDONALD, A. S., COHEN, A. D., CROCKER, J., HIRSCH, D., JINDAL, K. & LAWEN, J. 1991. Comparison of antilymphocyte globulin and continuous i.v. cyclosporine A as induction immunosuppression for cadaver kidney transplants: a prospective randomized study. *Transplant Proc*, 23, 999-1000.
- BEMARK, M., HOLMQVIST, J., ABRAHAMSSON, J. & MELLGREN, K. 2012. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol*, 167, 15-25.
- BIRON, C. A., BYRON, K. S. & SULLIVAN, J. L. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*, 320, 1731-5.
- BLADE, J., CIBEIRA, M. T., FERNANDEZ DE LARREA, C. & ROSINOL, L. 2010a. Multiple myeloma. *Ann Oncol*, 21 Suppl 7, vii313-9.
- BLADE, J., DIMOPOULOS, M., ROSINOL, L., RAJKUMAR, S. V. & KYLE, R. A. 2010b. Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *J Clin Oncol*, 28, 690-7.
- BOSCH, M., KHAN, F. M. & STOREK, J. 2012. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol*, 19, 324-35.

- BUGGINS, A. G., MUFTI, G. J., SALISBURY, J., CODD, J., WESTWOOD, N., ARNO, M., FISHLOCK, K., PAGLIUCA, A. & DEVEREUX, S. 2002. Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. *Blood*, 100, 1715-20.
- BUHMANN, R., MICHAEL, S., JUERGEN, H., HORST, L., PESCHEL, C. & KOLB, H. J. 2013. Immunotherapy with FBTA05 (Bi20), a trifunctional bispecific anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion (DLI) in relapsed or refractory B-cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation: study protocol of an investigator-driven, open-label, non-randomized, uncontrolled, dose-escalating Phase I/II-trial. *J Transl Med*, 11, 160.
- CAERS, J., FERNANDEZ DE LARREA, C., LELEU, X., HEUSSCHEN, R., ZOJER, N., DECAUX, O., KASTRITIS, E., MINNEMA, M., JURCZYSZYN, A., BEGUIN, Y., WASCH, R., PALUMBO, A., DIMOPOULOS, M., MATEOS, M. V., LUDWIG, H. & ENGELHARDT, M. 2016. The Changing Landscape of Smoldering Multiple Myeloma: A European Perspective. *Oncologist*, 21, 333-42.
- CAO, T., LI, Y., WANG, Q., LI, H., BO, J., ZHAO, Y., JING, Y., WANG, S., ZHU, H., DOU, L., JIA, B., GAO, C., YU, L. & HUANG, W. 2014. Outcomes of peripheral blood stem cell transplantation in patients from human leukocyte antigen matched or mismatched unrelated donors. *Chin Med J (Engl)*, 127, 2612-7.
- CATALAN, P. & ALBA, A. 2012. [Prophylaxis against Epstein Barr disease in pediatric and adult patients undergoing solid organ and hematopoietic stem cells transplantation]. *Rev Chilena Infectol*, 29 Suppl 1, S29-31.
- CHAKRAVERTY, R., ROBINSON, S., PEGGS, K., KOTTARIDIS, P. D., WATTS, M. J., INGS, S. J., HALE, G., WALDMANN, H., LINCH, D. C., GOLDSTONE, A. H. & MACKINNON, S. 2001. Excessive T cell depletion of peripheral blood stem cells has an adverse effect upon outcome following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 28, 827-34.
- CHAMPLIN, R., HO, W., GAJEWSKI, J., FEIG, S., BURNISON, M., HOLLEY, G., GREENBERG, P., LEE, K., SCHMID, I., GIORGI, J. & ET AL. 1990. Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 76, 418-23.
- CHAMPLIN, R. E., SCHMITZ, N., HOROWITZ, M. M., CHAPUIS, B., CHOPRA, R., CORNELISSEN, J. J., GALE, R. P., GOLDMAN, J. M., LOBERIZA, F. R., JR., HERTENSTEIN, B., KLEIN, J. P., MONTSERRAT, E., ZHANG, M. J., RINGDEN, O., TOMANY, S. C., ROWLINGS, P. A., VAN HOEF, M. E. & GRATWOHL, A. 2000. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*, 95, 3702-9.
- CLIFT, R. A., BUCKNER, C. D., APPELBAUM, F. R., BEARMAN, S. I., PETERSEN, F. B., FISHER, L. D., ANASETTI, C., BEATTY, P., BENSINGER, W. I., DONEY, K. & ET AL. 1990. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood*, 76, 1867-71.
- COHEN, J. I. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, 343, 481-92.
- COHEN, Y. & NAGLER, A. 2004. Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood Rev*, 18, 167-79.
- COUBAN, S., SIMPSON, D. R., BARNETT, M. J., BREDESON, C., HUBESCH, L., HOWSON-JAN, K., SHORE, T. B., WALKER, I. R., BROWETT, P., MESSNER, H. A., PANZARELLA, T. & LIPTON, J. H. 2002. A randomized multicenter comparison of bone marrow and

- peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood*, 100, 1525-31.
- COURIEL, D. R., HICKS, K., GIRALT, S. & CHAMPLIN, R. E. 2000. Role of tumor necrosis factor-alpha inhibition with infliximab in cancer therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol*, 12, 582-7.
- COURIEL, D. R., SALIBA, R. M., GIRALT, S., KHOURI, I., ANDERSSON, B., DE LIMA, M., HOSING, C., ANDERLINI, P., DONATO, M., CLEARY, K., GAJEWSKI, J., NEUMANN, J., IPPOLITI, C., RONDON, G., COHEN, A. & CHAMPLIN, R. 2004. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10, 178-85.
- CRUZ, C. R. & BOLLARD, C. M. 2015. T-cell and natural killer cell therapies for hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: enhancing the graft-versus-leukemia effect. *Haematologica*, 100, 709-19.
- DECKER, L. L., KLAMAN, L. D. & THORLEY-LAWSON, D. A. 1996. Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol*, 70, 3286-9.
- DI IANNI, M., FALZETTI, F., CAROTTI, A., TERENCE, A., CASTELLINO, F., BONIFACIO, E., DEL PAPA, B., ZEI, T., OSTINI, R. I., CECCHINI, D., ALOISI, T., PERRUCCIO, K., RUGGERI, L., BALUCANI, C., PIERINI, A., SPORTOLETTI, P., ARISTEI, C., FALINI, B., REISNER, Y., VELARDI, A., AVERSA, F. & MARTELLI, M. F. 2011. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, 117, 3921-8.
- DORSHKIND, K., MONTECINO-RODRIGUEZ, E. & SIGNER, R. A. 2009. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*, 9, 57-62.
- DOUEK, D. C., MCFARLAND, R. D., KEISER, P. H., GAGE, E. A., MASSEY, J. M., HAYNES, B. F., POLIS, M. A., HAASE, A. T., FEINBERG, M. B., SULLIVAN, J. L., JAMIESON, B. D., ZACK, J. A., PICKER, L. J. & KOUP, R. A. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396, 690-694.
- DUMONT-GIRARD, F., ROUX, E., VAN LIER, R. A., HALE, G., HELG, C., CHAPUIS, B., STAROBINSKI, M. & ROOSNEK, E. 1998. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood*, 92, 4464-71.
- DYER, M. J., HALE, G., HAYHOE, F. G. & WALDMANN, H. 1989. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood*, 73, 1431-9.
- EINSELE, H., ROOSNEK, E., RUFER, N., SINZGER, C., RIEGLER, S., LOFFLER, J., GRIGOLEIT, U., MORIS, A., RAMMENSEE, H. G., KANZ, L., KLEIHAUER, A., FRANK, F., JAHN, G. & HEBART, H. 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99, 3916-22.
- ESPIGADO, I., DE LA CRUZ-VICENTE, F., BENMARZOUK-HIDALGO, O. J., GRACIA-AHUFINGER, I., GARCIA-LOZANO, J. R., AGUILAR-GUISADO, M., CISNEROS, J. M., URBANO-ISPIZUA, A. & PEREZ-ROMERO, P. 2014. Timing of CMV-specific effector memory T cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int*, 27, 1253-62.
- EYRICH, M., WOLLNY, G., TZARIBASCHEV, N., DIETZ, K., BRUGGER, D., BADER, P., LANG, P., SCHILBACH, K., WINKLER, B., NIETHAMMER, D. & SCHLEGEL, P. G. 2005. Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially



- regulated after stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11, 194-205.
- FOWLER, D. H. & GRESS, R. E. 2000. Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 38, 221-34.
- FUCHS, E. J. 2012. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 230-6.
- GAZIEV, D., GALIMBERTI, M., LUCARELLI, G. & POLCHI, P. 2000. Chronic graft-versus-host disease: is there an alternative to the conventional treatment? *Bone Marrow Transplant*, 25, 689-96.
- GEDDES, M. & STOREK, J. 2007. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20, 329-48.
- GEORGE, B., PATI, N., GILROY, N., RATNAMOHAN, M., HUANG, G., KERRIDGE, I., HERTZBERG, M., GOTTLIEB, D. & BRADSTOCK, K. 2010. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis*, 12, 322-9.
- GLASER, S. L., LIN, R. J., STEWART, S. L., AMBINDER, R. F., JARRETT, R. F., BROUSSET, P., PALLESEN, G., GULLEY, M. L., KHAN, G., O'GRADY, J., HUMMEL, M., PRECIADO, M. V., KNECHT, H., CHAN, J. K. & CLAVIEZ, A. 1997. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*, 70, 375-82.
- GLUCKSBERG, H., STORB, R., FEFER, A., BUCKNER, C. D., NEIMAN, P. E., CLIFT, R. A., LERNER, K. G. & THOMAS, E. D. 1974. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 18, 295-304.
- GRATAMA, J. W., NAIPAL, A., OLJANS, P., ZWAAN, F. E., VERDONCK, L. F., DE WITTE, T., VOSSSEN, J. M., BOLHUIS, R. L., DE GAST, G. C. & JANSEN, J. 1984. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood*, 63, 1416-23.
- GRATWOHL, A., BRAND, R., APPERLEY, J., V. BIEZEN, A., BANDINI, G., DEVERGIE, A., SCHATTEBERG, A., FRASSONI, F., GUGLIELMI, C., IACOBELLI, S., MICHALLET, M., KOLB, H.-J., RUUTU, T. & NIEDERWIESER, D. 2002. Graft-versus-host disease and outcome after HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 100, 3877-3886.
- GRECO, R., OLIVEIRA, G., STANGHELLINI, M. T., VAGO, L., BONDANZA, A., PECCATORI, J., CIERI, N., MARKTEL, S., MASTAGLIO, S., BORDIGNON, C., BONINI, C. & CICERI, F. 2015. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front Pharmacol*, 6, 95.
- GRULLICH, C., ZIEGLER, C. & FINKE, J. 2009. Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15, 173-82.
- GRUPP, S. A., KALOS, M., BARRETT, D., APLENC, R., PORTER, D. L., RHEINGOLD, S. R., TEACHEY, D. T., CHEW, A., HAUCK, B., WRIGHT, J. F., MILONE, M. C., LEVINE, B. L. & JUNE, C. H. 2013. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 368, 1509-18.
- HAKIM, F. T. & GRESS, R. E. 2007. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens*, 70, 179-89.

- HAKKI, M., RIDDELL, S. R., STOREK, J., CARTER, R. A., STEVENS-AYERS, T., SUDOUR, P., WHITE, K., COREY, L. & BOECKH, M. 2003. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*, 102, 3060-7.
- HAMMARSTROM, L. & SMITH, C. I. 1987. Frequent occurrence of monoclonal gammopathies with an imbalanced light-chain ratio following bone marrow transplantation. *Transplantation*, 43, 447-9.
- HO, V. T., KIM, H. T., KAO, G., CUTLER, C., LEVINE, J., ROSENBLATT, J., JOYCE, R., ANTIN, J. H., SOIFFER, R. J., RITZ, J., AVIGAN, D. & ALYEA, E. P., 3RD 2014. Sequential infusion of donor-derived dendritic cells with donor lymphocyte infusion for relapsed hematologic cancers after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*, 89, 1092-6.
- HOLTICK, U., ALBRECHT, M., CHEMNITZ, J. M., THEURICH, S., SHIMABUKURO-VORNHAGEN, A., SKOETZ, N., SCHEID, C. & VON BERGWELT-BAILDON, M. 2014. Comparison of bone marrow versus peripheral blood allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in adults-a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*.
- HUANG, X. J., LIU, D. H., LIU, K. Y., XU, L. P., CHEN, H. & HAN, W. 2007. Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA-mismatched/haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 92, 414-7.
- JIMENEZ, M., ERCILLA, G. & MARTINEZ, C. 2007. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia*, 21, 1628-37.
- KERNAN, N. A., FLOMENBERG, N., DUPONT, B. & O'REILLY, R. J. 1987. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor alloctotoxic T lymphocytes. *Transplantation*, 43, 842-7.
- KERSTING, S., HENE, R. J., KOOMANS, H. A. & VERDONCK, L. F. 2007. Chronic kidney disease after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13, 1169-75.
- KHEAV, V. D., BUSSON, M., SCIEUX, C., PEFFAULT DE LATOUR, R., MAKI, G., HAAS, P., MAZERON, M. C., CARMAGNAT, M., MASSON, E., XHAARD, A., ROBIN, M., RIBAUD, P., DULPHY, N., LOISEAU, P., CHARRON, D., SOCIE, G., TOUBERT, A. & MOINS-TEISSERENC, H. 2014. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*.
- KRENGER, W., BLAZAR, B. R. & HOLLANDER, G. A. 2011. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 117, 6768-76.
- KYLE, R. A. 1978. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*, 64, 814-26.
- KYLE, R. A., DURIE, B. G., RAJKUMAR, S. V., LANDGREN, O., BLADE, J., MERLINI, G., KROGER, N., EINSELE, H., VESOLE, D. H., DIMOPOULOS, M., SAN MIGUEL, J., AVET-LOISEAU, H., HAJEK, R., CHEN, W. M., ANDERSON, K. C., LUDWIG, H., SONNEVELD, P., PAVLOVSKY, S., PALUMBO, A., RICHARDSON, P. G., BARLOGIE, B., GREIPP, P., VESCIO, R., TURESSON, I., WESTIN, J. & BOCCADORO, M. 2010. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*, 24, 1121-7.

- KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F., OFFORD, J. R., DISPENZIERI, A., KATZMANN, J. A. & MELTON, L. J., 3RD 2006. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354, 1362-9.
- KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F. & MELTON, L. J., 3RD 2002. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 346, 564-9.
- LANDGREN, O., KYLE, R. A., PFEIFFER, R. M., KATZMANN, J. A., CAPORASO, N. E., HAYES, R. B., DISPENZIERI, A., KUMAR, S., CLARK, R. J., BARIS, D., HOOVER, R. & RAJKUMAR, S. V. 2009. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113, 5412-7.
- LESLEY, R., XU, Y., KALLED, S. L., HESS, D. M., SCHWAB, S. R., SHU, H. B. & CYSTER, J. G. 2004. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*, 20, 441-53.
- LIM, Z. Y., INGRAM, W., BRAND, R., AKTHARI, M., MILOJKOVIC, D., HO, A. Y., DEVEREUX, S., PAGLIUCA, A., DUARTE, R. F. & MUFTI, G. J. 2007. Clonal gammopathies following alemtuzumab-based reduced intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation: association with chronic graft-versus-host disease and improved overall survival. *Bone Marrow Transplant*, 40, 747-52.
- LISENKO, K., STADTHER, P., BRUCKNER, T., PAVEL, P., HEILIG, C. E., SCHMITT, A., PUTHENPARAMBIL, J., BRANDT, J., HO, A. D., DREGER, P., WITZENS-HARIG, M. & WUCHTER, P. 2016. Bone Marrow Harvesting of Allogeneic Donors in an Outpatient Setting: A Single-Center Experience. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 470-4.
- LIU, H., QIN, Y., WANG, X., XIE, K., YANG, Y., ZHU, J., ZHAO, C. & WANG, C. 2012. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin induces apoptosis and has cytotoxic effects on human leukemic cells. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 12, 345-54.
- LJUNGMAN, P. 2014. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*, 21, 466-9.
- LOSCHI, M., PORCHER, R., PEFFAULT DE LATOUR, R., VANNEAUX, V., ROBIN, M., XHAARD, A., SICRE DE FONTEBRUNE, F., LARGHERO, J. & SOCIE, G. 2015. High number of memory t cells is associated with higher risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21, 569-74.
- LOWENSTEIN, H., SHAH, A., CHANT, A. & KHAN, A. 2006. Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. *Transpl Int*, 19, 927-36.
- LUGTHART, G., VAN OSTAIJEN-TEN DAM, M. M., JOL-VAN DER ZIJDE, C. M., VAN HOLTEN, T. C., KESTER, M. G., HEEMSKERK, M. H., BREDIUS, R. G., VAN TOL, M. J. & LANKESTER, A. C. 2014. Early cytomegalovirus reactivation leaves a specific and dynamic imprint on the reconstituting T cell compartment long-term after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20, 655-61.
- LUPO-STANGHELLINI, M. T., PROVASI, E., BONDANZA, A., CICERI, F., BORDIGNON, C. & BONINI, C. 2010. Clinical impact of suicide gene therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Gene Ther*, 21, 241-50.
- LUZNIK, L., JONES, R. J. & FUCHS, E. J. 2010. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol*, 17, 493-9.

- MACKALL, C., FRY, T., GRESS, R., PEGGS, K., STOREK, J., TOUBERT, A., CENTER FOR INTERNATIONAL, B., MARROW TRANSPLANT, R., NATIONAL MARROW DONOR, P., EUROPEAN, B., MARROW TRANSPLANT, G., AMERICAN SOCIETY OF, B., MARROW, T., CANADIAN, B., MARROW TRANSPLANT, G., INFECTIOUS DISEASE SOCIETY OF, A., SOCIETY FOR HEALTHCARE EPIDEMIOLOGY OF, A., ASSOCIATION OF MEDICAL, M., INFECTIOUS DISEASES, C., CENTERS FOR DISEASE, C. & PREVENTION 2009. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant*, 44, 457-62.
- MATEOS, M. V. & SAN MIGUEL, J. F. 2013. New approaches to smoldering myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*, 8, 270-6.
- MAUDE, S. L., FREY, N., SHAW, P. A., APLENC, R., BARRETT, D. M., BUNIN, N. J., CHEW, A., GONZALEZ, V. E., ZHENG, Z., LACEY, S. F., MAHNKE, Y. D., MELENHORST, J. J., RHEINGOLD, S. R., SHEN, A., TEACHEY, D. T., LEVINE, B. L., JUNE, C. H., PORTER, D. L. & GRUPP, S. A. 2014. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 371, 1507-17.
- MEINHARDT, K., KROEGER, I., BAUER, R., GANSS, F., OVSIY, I., ROTHAMER, J., BUTTNER, M., ATREYA, I., WALDNER, M., BITTRICH, M., LEHMANN, C. H., RIEGER, M. A., BEILHACK, A., ZEISER, R., EDINGER, M., DUDZIAK, D., MACKENSEN, A., REHLI, M. & ULLRICH, E. 2015. Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft--leukemia- and reducing graft--host-effects. *Oncoimmunology*, 4, e981483.
- MEUNIER, M., BULABOIS, C. E., THIEBAUT-BERTRAND, A., ITZYKSON, R., CARRE, M., CARRAS, S., GARBAN, F. & CAHN, J. Y. 2014. Alemtuzumab for severe steroid-refractory gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20, 1451-4.
- MILLER, J. P. & ALLMAN, D. 2005. Linking age-related defects in B lymphopoiesis to the aging of hematopoietic stem cells. *Semin Immunol*, 17, 321-9.
- MIN, H., MONTECINO-RODRIGUEZ, E. & DORSHKIND, K. 2005. Effects of aging on early B- and T-cell development. *Immunol Rev*, 205, 7-17.
- MIN, H., MONTECINO-RODRIGUEZ, E. & DORSHKIND, K. 2006. Effects of aging on the common lymphoid progenitor to pro-B cell transition. *J Immunol*, 176, 1007-12.
- MITUS, A., STEIN, R., RAPPEPORT, J., ANTIN, J., WEINSTEIN, H., ALPER, C. & AL, E. 1989. Monoclonal and oligoclonal gammopathy after bone marrow transplantation. *Blood*, 45, 2764-2768.
- MOHTY, M. 2007. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*, 21, 1387-94.
- MOHTY, M., MALARD, F. & SAVANI, B. N. 2014. High-Dose Total Body Irradiation and Myeloablative Conditioning before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Time to Rethink? *Biol Blood Marrow Transplant*.
- MÜLLER-HEPBURN, J. 2014. *Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation*. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
- MUNCHEL, A., KESSERWAN, C., SYMONS, H. J., LUZNIK, L., KASAMON, Y. L., JONES, R. J. & FUCHS, E. J. 2011. Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Pediatr Rep*, 3 Suppl 2, e15.
- MUNOZ, J., SHAH, N., REZVANI, K., HOSING, C., BOLLARD, C. M., ORAN, B., OLSON, A., POPAT, U., MOLLDREM, J., MCNIECE, I. K. & SHPALL, E. J. 2014. Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. *Stem Cells Transl Med*, 3, 1435-43.

- NAGASHIMA, T., MUROI, K., KAWANO-YAMAMOTO, C., KOMATSU, N. & OZAWA, K. 2004. Paraproteinemia After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Leukemia & Lymphoma*, 45, 135-137.
- NAPARSTEK, E., DELUKINA, M., OR, R., NAGLER, A., KAPELUSHNIK, J., VARADI, G., STRAUSS, N., CIVIDALLI, G., AKER, M., BRAUTBAR, C., WALDMANN, H., HALE, G. & SLAVIN, S. 1999. Engraftment of marrow allografts treated with Campath-1 monoclonal antibodies. *Exp Hematol*, 27, 1210-8.
- NASH, R. A. & STORB, R. 1996. Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL. *Curr Opin Immunol*, 8, 674-80.
- NICHOLS, W. G., COREY, L., GOOLEY, T., DAVIS, C. & BOECKH, M. 2002. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*, 185, 273-82.
- NIMER, S. D., GIORGI, J., GAJEWSKI, J. L., KU, N., SCHILLER, G. J., LEE, K., TERRITO, M., HO, W., FEIG, S., SELCH, M. & ET AL. 1994. Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation*, 57, 82-7.
- NOVITZKY, N., DAVISON, G., ABDULLA, R. & MOWLA, S. 2013. Definition of the variables affecting efficacy of immunodepletion ex vivo of peripheral blood progenitor cell grafts by alemtuzumab (Campath in the bag). *Biol Blood Marrow Transplant*, 19, 1753-9.
- ORANGE, J. S. 2002. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*, 4, 1545-58.
- PERALES, M. A. & VAN DEN BRINK, M. R. 2012. Immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: is it time to revisit how patients are monitored? *Biol Blood Marrow Transplant*, 18, 1617-9.
- PEREZ-PERSONA, E., MATEO, G., GARCIA-SANZ, R., MATEOS, M. V., DE LAS HERAS, N., DE COCA, A. G., HERNANDEZ, J. M., GALENDE, J., MARTIN-NUNEZ, G., BAREZ, A., ALONSO, J. M., MARTIN, A., LOPEZ-BERGES, C., ORFAO, A., SAN MIGUEL, J. F. & VIDRIALES, M. B. 2010. Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol*, 148, 110-4.
- PERGAM, S. A., XIE, H., SANDHU, R., POLLACK, M., SMITH, J., STEVENS-AYERS, T., ILIEVA, V., KIMBALL, L. E., HUANG, M. L., HAYES, T. S., COREY, L. & BOECKH, M. J. 2012. Efficiency and risk factors for CMV transmission in seronegative hematopoietic stem cell recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18, 1391-400.
- PETERSDORF, E. W. & MALKKI, M. 2005. Human leukocyte antigen matching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Semin Hematol*, 42, 76-84.
- PETERSEN, S. L., RYDER, L. P., BJORK, P., MADSEN, H. O., HEILMANN, C., JACOBSEN, N., SENGELOV, H. & VINDELOV, L. L. 2003. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant*, 32, 65-72.
- PROETZEL, G. & ROOPENIAN, D. C. 2014. Humanized FcRn Mouse Models for Evaluating Pharmacokinetics of human IgG Antibodies. *Methods (San Diego, Calif.)*, 65, 148-153.
- RAJKUMAR, S. V. 2009. Prevention of Progression in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15, 5606-5608.

- REDDEHASE, M. J. 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol*, 2, 831-44.
- REISNER, Y., BEN-BASSAT, I., DOUER, D., KAPLOON, A., SCHWARTZ, E. & RAMOT, B. 1986. Demonstration of clonable alloreactive host T cells in a primate model for bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4012-5.
- ROBBINS, P. F., LI, Y. F., EL-GAMIL, M., ZHAO, Y., WARGO, J. A., ZHENG, Z., XU, H., MORGAN, R. A., FELDMAN, S. A., JOHNSON, L. A., BENNETT, A. D., DUNN, S. M., MAHON, T. M., JAKOBSEN, B. K. & ROSENBERG, S. A. 2008. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J Immunol*, 180, 6116-31.
- ROSINOL, L., CIBEIRA, M. T., MONTOTO, S., ROZMAN, M., ESTEVE, J., FILELLA, X. & BLADE, J. 2007. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc*, 82, 428-34.
- ROUCE, R. H., LOUIS, C. U. & HESLOP, H. E. 2014. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplant. *Curr Opin Hematol*, 21, 476-81.
- SARANTOPOULOS, S. & RITZ, J. 2015. Aberrant B-cell homeostasis in chronic GVHD. 125, 1703-7.
- SARANTOPOULOS, S., STEVENSON, K. E., KIM, H. T., CUTLER, C. S., BHUIYA, N. S., SCHOWALTER, M., HO, V. T., ALYEA, E. P., KORETH, J., BLAZAR, B. R., SOIFFER, R. J., ANTIN, J. H. & RITZ, J. 2009. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 113, 3865-74.
- SCHLEUNING, M. 2000. Adoptive allogeneic immunotherapy--history and future perspectives. *Transfus Sci*, 23, 133-50.
- SCHMITZ, M. F., OTTEN, H. G., FRANSSSEN, L. E., VAN DORP, S., STROOISMA, T., LOKHORST, H. M. & VAN DE DONK, N. W. 2014. Secondary monoclonal gammopathy of undetermined significance after allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Haematologica*, 99, 1846-53.
- SCHONBERGER, S., NIEHUES, T., MEISEL, R., BERNBECK, B., LAWS, H. J., KOGLER, G., ENZMANN, J., WERNET, P., GOBEL, U. & DILLOO, D. 2004. Transplantation of haematopoietic stem cells derived from cord blood, bone marrow or peripheral blood: a single centre matched-pair analysis in a heterogeneous risk population. *Klin Padiatr*, 216, 356-63.
- SCHUB, N., GUENTHER, A., SCHRAUDER, A., CLAVIEZ, A., EHLERT, C., GRAMATZKI, M. & REPP, R. 2011. Therapy of steroid-refractory acute GVHD with CD52 antibody alemtuzumab is effective. *Bone Marrow Transplant*, 46, 143-7.
- SCHULENBURG, A., FISCHER, M., KALHS, P., MITTERBAUER, M., RABITSCH, W., GREINIX, H. T. & LEITNER, G. 2005. Immune recovery after conventional and non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, 46, 1755-60.
- SEGGEWISS, R. & EINSELE, H. 2010. Immune reconstitution after allogeneic and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*, 115, 3861-3867.
- SELLAR, R. S., VARGAS, F. A., HENRY, J. Y., VERFUERTH, S., CHARROT, S., BEATON, B., CHAKRAVERTY, R., QUEZADA, S. A., MACKINNON, S., THOMSON, K. J. & PEGGS, K. S. 2015. CMV promotes recipient T-cell immunity following reduced-intensity T-cell-depleted HSCT, significantly modulating chimerism status. *Blood*, 125, 731-9.
- SENGSAYADETH, S., SAVANI, B. N., BLAISE, D., MALARD, F., NAGLER, A. & MOHTY, M. 2015. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a

- review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica*, 100, 859-69.
- SHERER, Y. & SHOENFELD, Y. 1998. Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 22, 873-81.
- SHIZURU, J. A., NEGRIN, R. S. & WEISSMAN, I. L. 2005. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med*, 56, 509-38.
- SHULMAN, H. M., SULLIVAN, K. M., WEIDEN, P. L., MCDONALD, G. B., STRIKER, G. E., SALE, G. E., HACKMAN, R., TSOI, M. S., STORB, R. & THOMAS, E. D. 1980. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*, 69, 204-17.
- SIERRA, J., MARTINO, R., SANCHEZ, B., PINANA, J. L., VALCARCEL, D. & BRUNET, S. 2008. Hematopoietic transplantation from adult unrelated donors as treatment for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 41, 425-37.
- SIGNER, R. A., MONTECINO-RODRIGUEZ, E., WITTE, O. N., MCLAUGHLIN, J. & DORSHKIND, K. 2007. Age-related defects in B lymphopoiesis underlie the myeloid dominance of adult leukemia. *Blood*, 110, 1831-9.
- SINCLAIR, J. 2008. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol*, 41, 180-5.
- SMALL, T. N., ROBINSON, W. H. & MIKLOS, D. B. 2009. B cells and transplantation: an educational resource. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15, 104-13.
- SMITH, C. I., AARLI, J. A., BIBERFELD, P., BOLME, P., CHRISTENSSON, B., GAHRTON, G., HAMMARSTROM, L., LEFVERT, A. K., LONNQVIST, B., MATELL, G. & ET AL. 1983. Myasthenia gravis after bone-marrow transplantation. Evidence for a donor origin. *N Engl J Med*, 309, 1565-8.
- STOREK, J. 2008. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation –its relation to the contents of the graft *Expert Opinion Biological Therapie*, 8(5), 583-597.
- STOREK, J., FERRARA, S., KU, N., GIORGI, J. V., CHAMPLIN, R. E. & SAXON, A. 1993. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant*, 12, 387-98.
- STOREK, J., JOSEPH, A., ESPINO, G., DAWSON, M. A., DOUEK, D. C., SULLIVAN, K. M., FLOWERS, M. E., MARTIN, P., MATHIOUDAKIS, G., NASH, R. A., STORB, R., APPELBAUM, F. R. & MALONEY, D. G. 2001. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 98, 3505-12.
- STOREK, J., MOHTY, M. & BOELENS, J. J. 2014. Rabbit ATG in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*.
- STOREK, J., VLIAGOFTIS, H., GRIZEL, A., LYON, A. W., DALY, A., KHAN, F., BOWEN, T., GAME, M., LARRATT, L., TURNER, R. & HUEBSCH, L. 2011. Allergy transfer with hematopoietic cell transplantation from an unrelated donor. *Bone Marrow Transplant*, 46, 605-6.
- SYLWESTER, A. W., MITCHELL, B. L., EDGAR, J. B., TAORMINA, C., PELTE, C., RUCHTI, F., SLEATH, P. R., GRABSTEIN, K. H., HOSKEN, N. A., KERN, F., NELSON, J. A. & PICKER, L. J. 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 202, 673-85.
- SZCZECHE, L. A., BERLIN, J. A., ARADHYE, S., GROSSMAN, R. A. & FELDMAN, H. I. 1997. Effect of anti-lymphocyte induction therapy on renal allograft survival: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol*, 8, 1771-7.

- TANAKA, T., TAKIZAWA, J., MIYAKOSHI, S., KOZAKAI, T., FUSE, K., SHIBASAKI, Y., MORIYAMA, M., OHSHIMA, K., TOBA, K., FURUKAWA, T., SONE, H. & MASUKO, M. 2014. Manifestations of fulminant CD8 T-cell post-transplant lymphoproliferative disorder following the administration of rituximab for lymphadenopathy with a high level of Epstein-Barr Virus (EBV) replication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Intern Med*, 53, 2115-9.
- THIEN, M., PHAN, T. G., GARDAM, S., AMESBURY, M., BASTEN, A., MACKAY, F. & BRINK, R. 2004. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity*, 20, 785-98.
- THOMAS, E. D., STORB, R., CLIFT, R. A., FEFER, A., JOHNSON, L., NEIMAN, P. E., LERNER, K. G., GLUCKSBERG, H. & BUCKNER, C. D. 1975. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med*, 292, 895-902.
- TICHELLI, A., GRATWOHL, A., EGGER, T., ROTH, J., PRUNTE, A., NISSEN, C. & SPECK, B. 1993. Cataract formation after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med*, 119, 1175-80.
- UHLIN, M., WIKELL, H., SUNDIN, M., BLENNOW, O., MAEURER, M., RINGDEN, O., WINIARSKI, J., LJUNGMAN, P., REMBERGER, M. & MATTSSON, J. 2014. Risk factors for Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 99, 346-52.
- VAN LEEUWEN, J. E., VAN TOL, M. J., JOOSTEN, A. M., WIJNEN, J. T., VERWEIJ, P. J., KHAN, P. M. & VOSSSEN, J. M. 1994. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood*, 83, 3059-67.
- VAN TOL, M. J., GERRITSEN, E. J., DE LANGE, G. G., VAN LEEUWEN, A. M., JOL-VAN DER ZIJDE, C. M., OUDEMAN-GRUBER, N. J., DE VRIES, E., RADL, J. & VOSSSEN, J. M. 1996. The origin of IgG production and homogeneous IgG components after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 87, 818-26.
- WARREN, E. H. & DEEG, H. J. 2013. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens*, 81, 183-93.
- WARREN, E. H., ZHANG, X. C., LI, S., FAN, W., STORER, B. E., CHIEN, J. W., BOECKH, M. J., ZHAO, L. P., MARTIN, P. J. & HANSEN, J. A. 2012. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood*, 120, 2796-806.
- WEINSTOCK, D. M., AMBROSSI, G. G., BRENNAN, C., KIEHN, T. E. & JAKUBOWSKI, A. 2006. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant*, 37, 539-46.
- WEISS, B. M., ABADIE, J., VERMA, P., HOWARD, R. S. & KUEHL, W. M. 2009. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113, 5418-22.
- WESTPHAL, S., BRINKMANN, H., KALUPA, M., WILKE, A., SEITZ-MERWALD, I. & PENACK, O. 2014. Anti-tumor effects of anti-T-cell globulin. *Exp Hematol*, 42, 875-82.
- WIDMER, C. C., BALABANOV, S., SCHANZ, U. & THEOCHARIDES, A. P. A. 2017. Transient paraproteinemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is an underexplored phenomenon associated with graft versus host disease. *Oncotarget*, 8, 106333-106341.



- WILLIAMS, K. M. & GRESS, R. E. 2008. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 21, 579-96.
- YAN, C., XU, L., LIU, D., CHEN, H., WANG, Y., LIU, K. & HUANG, X. 2014. Immunosuppression for 6-8 weeks after modified donor lymphocyte infusion reduced acute graft-versus-host disease without influencing graft-versus-leukemia effect in haploidentical transplant. *Chin Med J (Engl)*, 127, 3602-9.
- ZEIDAN, A. M., FORDE, P. M., SYMONS, H., CHEN, A., SMITH, B. D., PRATZ, K., CARRAWAY, H., GLADSTONE, D. E., FUCHS, E. J., LUZNIK, L., JONES, R. J. & BOLANOS-MEADE, J. 2014. HLA-haploidentical donor lymphocyte infusions for patients with relapsed hematologic malignancies after related HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20, 314-8.

## VI Anhang

### 6.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Martin Gramatzki für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner Leitung in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie des UKSH Kiel durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. Andreas Günther gilt ganz besonderer Dank für die Erarbeitung der Themenstellung dieser Arbeit, die hervorragende Betreuung des Arbeitsprozesses und die stets anregenden, kritischen und fruchtbaren Diskussionen, welche den erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation ermöglicht haben. Vielen Dank für die vielen hilfreichen und produktiven Anregungen, die wertvollen Denkanstöße, die stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Frau Marianne Helweg danke ich für die tatkräftige Unterstützung und hilfsbereite Art zur Lösung technischer Fragestellungen.

Bei meinem guten Freund und Kollegen Herrn Dr. med. Jan-Paul Gundlach und meinem Bruder möchte ich mich ganz herzlich für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und die stets motivierenden Gespräche und Ratschläge bedanken.

Ein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, ohne deren fortwährende Unterstützung, Motivation und Glaube an meine Fähigkeiten der erfolgreiche Abschluss des Studiums und die Beendigung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

## VII Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hartjen A.S., Krumbholz A., Thieme F., Bulduk M., Humpe A., Gramatzki M.,  
Günther A.

**Immunoreconstitution after allogeneic stem cell transplantation: Impact of reduced conditioning regimen, alemtuzumab, anti-thymocyte and CMV infections**

Poster:

41st Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation,  
Istanbul, Türkei, 21. - 25. März 2015

Hartjen A.S., Krumbholz A., Thieme F., Bulduk M., Humpe A., Gramatzki M.,  
Günther A.

**CMV infection plays a crucial role in the immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation**

Vortrag:

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, der Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinischer Onkologie, der Schweizerischen Gesellschaft für Medizinische Onkologie und der Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie, Basel, Schweiz, 9. bis 13. Oktober 2015

A.S. Hartjen, A. Krumbholz, F. Thieme, N.Schub, A. Humpe,<sup>4</sup>M. Brüggemann, M. Gramatzki,  
A. Günther

**Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation – a systematic single center survey**

Blood (2017), Vol. 130, Suppl 1, S.5490

Paperpublikation in Bearbeitung

## VIII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Die lymphozytäre und humorale Immunrekonstitution nach allogener  
Stammzelltransplantation“**

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Stellen der Arbeit, einschließlich der Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall kenntlich gemacht und die Herkunft nachgewiesen.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde auch nicht veröffentlicht.

\_\_\_\_\_  
Datum, Ort

\_\_\_\_\_  
Unterschrift