

# DIPLOMARBEIT

## **Immunrekonstitution nach haploidenter hämatopoietischer Stammzelltransplantation bei Kindern**

**eingereicht von**  
Gernot Ortner

**zur Erlangung des akademischen Grades**  
Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)

**an der**  
**Medizinischen Universität Graz**

**durchgeführt an der**  
klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. Christian Urban**  
**Univ.-Prof Dr. Wolfgang Schwinger**

**Graz, am 25.08.2015**

## ***Eidesstattliche Erklärung***

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 25.08.2015

Gernot Ortner eh

## **Vorwort**

Da Stammzelltransplantationen im heutigen klinischen Alltag immer mehr an Bedeutung gewinnen – man beachte nur die Gesamtzahl der jährlich Transplantierten - war es mir ein großes Anliegen eine Diplomarbeit verfassen zu können, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzt. Da nicht für jede Patientin und jeden Patienten immer eine geeignete Spenderin bzw. ein geeigneter Spender zur Verfügung steht und es Alternativen geben muss, um auch solchen Patientinnen und Patienten eine Transplantation anbieten zu können, hat mich vor allem die Thematik der haploidenten Stammzelltransplantation dazu bewegt, mich mit dem Thema näher auseinanderzusetzen. Die vorliegende Arbeit soll vor allem auf die Probleme und Vorteile der haploidenten Stammzelltransplantation als alternative, schnell zur Verfügung stehende Ressource eingehen und in einen klinischen Kontext bringen.

Es soll anhand der vorliegenden Patientinnen- und Patientendaten der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie eine Analyse der bereits transplantierten Patientinnen und Patienten erfolgen und diese mit dem in der Literatur zur Verfügung stehenden Wissen diskutiert werden.

Da die haploidente Stammzelltransplantation für viele Patientinnen und Patienten mit vor allem hämatologischen Grunderkrankungen, aber auch kongenitalen Immunodefizienzsyndromen und pädiatrischen soliden Tumoren schon zahlreiche klinische Erfolge aufgezeigt hat, hat sie sich an einigen Zentren dieser Erde schon fest im klinischen Alltag etabliert. Basierend auf zahlreichen Forschungsarbeiten der letzten Jahre und Jahrzehnte bietet sie eine hoffnungsvolle Variante für die Zukunft, mit einem sehr großen Potential, für hoffentlich noch viele Kinder und Erwachsene im Kampf um Leben und Tod eine langfristige, kurative Therapie darzustellen.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei meinen Betreuern an erster Stelle bedanken. Sie haben es mir ermöglicht, einen tieferen Einblick in die Welt der pädiatrischen Hämato-Onkologie zu gewinnen und mich mit einem derart interessanten Thema näher zu beschäftigen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Urban sei an dieser Stelle für seine Unterstützung während der gesamten Arbeit und für die zur-Verfügung-Stellung der wissenschaftlichen Literatur gedankt.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schwinger für sein großes Engagement, seine Geduld und vor allem für die Unterstützung während der gesamten Arbeit – auch über die Ozeane dieser Welt hinweg.

Danken möchte ich außerdem Frau BSc. Andrea Raicht, für die es selbstverständlich war, mir bei auch noch so banalen Fragestellungen stets mit ihrem fachlichen Wissen weiterzuhelfen und mir bei der Sammlung, Auswertung und grafischen Darstellung der Daten eine große Hilfe war.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir es ermöglicht haben ein Studium zu absolvieren und mich immer bestmöglich unterstützt haben.

Meinen Großeltern möchte ich dafür danken, dass sie immer hinter mir standen und oft eine moralische Stütze waren. Durch euch habe ich viele wichtige Werte vermittelt bekommen, die ein Leben lebenswert machen! Danke!

Auch meinen Geschwistern möchte ich ein Dankeschön aussprechen. Danke dafür, dass ihr - obwohl wir so verschieden sind - immer zu mir gehalten habt.

Ein ganz großer Dank geht vor allem an meine allerbesten Freunde. Danke dafür, dass ich mit euch die wahrscheinlich beste Zeit meines Lebens verbringen durfte, dass ihr immer da wart wenn man euch am meisten brauchte und ich zahlreiche unglaubliche Momente mit euch verbringen durfte. Ich hoffe, dass unsere Freundschaften auch über lange Zeit und ohne Rücksicht auf geographische Grenzen weiter so bestehen, wie sie sind und uns auch im hohen Alter noch die ein oder andere Anekdote aus der Studienzeit ein Schmunzeln ins Gesicht zaubern wird.

# **Inhaltsverzeichnis**

A	Glossar und Abkürzungen .....	VIII
B	Abbildungsverzeichnis.....	XI
C	Tabellenverzeichnis.....	XII
D	Zusammenfassung.....	XIII
E	Abstract.....	XIV
1	Das Immunsystem.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Funktion .....	1
1.3	Aufbau.....	2
1.4	Das angeborene Immunsystem.....	2
1.4.1	Funktion .....	2
1.4.2	Bestandteile des angeborenen Immunsystems .....	2
1.5	Das adaptive Immunsystem .....	11
1.5.1	Knochenmark, Thymus und lymphatisches Gewebe .....	12
1.5.2	T-Zellen.....	13
1.5.3	TCR (T-cell-receptor) .....	13
1.5.4	Antigenerkennung durch den TCR .....	15
1.5.5	B-Zellen.....	15
1.5.6	BCR (B-cell-receptor).....	15
1.5.7	Antigenerkennung durch den BCR.....	16
2	Die HLA-Barriere .....	17
2.1	MHC-System.....	17
2.1.1	HLA-Genlocus.....	17
2.2	MHC-Proteine .....	19
2.2.1	MHC-I .....	19
2.2.2	MHC-II.....	21
2.2.3	Nicht klassische HLA-Moleküle .....	23
3	Stammzelltransplantation .....	24

3.1	Stammzellen .....	24
3.2	Die hämatopoietische Stammzelle .....	25
3.3	Die haploidente hämatopoietische Stammzelltransplantation .....	26
3.4	Die Suche nach alternativen Ressourcen .....	28
3.4.1	Vor- und Nachteile alternativer Ressourcen .....	28
3.5	Die Wahl der Ressource .....	33
3.6	GvM-Effekt .....	35
3.7	Myeloablative HFD HSCT (MAC) vs. non-myeloablative HFD HSCT (RIC) und Graftselektion.....	35
3.8	T-Zell Depletion.....	37
3.9	GvHD .....	38
3.10	Immunsuvveillance nach HFD HSCT .....	39
3.11	DLI – Donor Lymphocyte Infusion .....	41
4	Patientinnen/Patienten, Material und Methoden .....	42
4.1	Patientinnen-/Patientenkollektiv.....	42
4.2	Material und Methoden.....	45
4.2.1	Durchflusszytometrische Analyse.....	45
4.2.2	SNP Chimärismusanalyse aus WBC.....	46
4.2.3	SNP Chimärismusanalyse aus Subtypen .....	49
4.2.4	TREC Analyse.....	51
4.2.5	Spectratyping – Analyse der TCR-Diversität .....	53
4.3	Messzeitpunkte und Messdaten .....	57
4.4	statistische Auswertung.....	57
5	Ergebnisse .....	59
5.1	quantitative Immunrekonstitution.....	59
5.1.1	Leukozyten absolut .....	59
5.1.2	CD3+.....	61
5.1.3	CD19+.....	62
5.1.4	CD3/4+.....	64
5.1.5	CD3/8+.....	65

5.1.6	CD3/56+ .....	67
5.1.7	CD3/56- .....	68
5.1.8	CD14+ .....	70
5.1.9	CD3/4/RA45+ .....	71
5.1.10	CD3/8/45RA+ .....	73
5.1.11	CD3/Ki67+ .....	74
5.2	Spenderinnen- und Spenderchimärismusanalyse .....	76
5.3	TREC-Analyse .....	79
5.4	Spectratyping-Analyse .....	80
5.5	Statistische Tests .....	83
5.6	Infektionsmonitoring .....	84
5.7	GvHD .....	85
5.8	Mortalität .....	86
6	Diskussion .....	87
6.1	Diskussion der Ergebnisse .....	87
6.2	RIC + CD3/19 – Depletion .....	91
6.3	NK-Alloreaktivität, KIR-Ligand mismatching, DSA, TREGs, MSCs, spezifische Tumorthherapie, selektive T-Zell-Depletion .....	94
6.4	Mismatching auf das nicht vererbte maternale Antigen .....	98
6.5	Spezifische Immuntherapie .....	99
6.6	Solide Tumoren und Hochrisikomalignome .....	101
6.7	Spenderinnen- bzw. Spenderwahl .....	102
7	Conclusio .....	103
F	Literaturverzeichnis .....	105
G	Buchzitate .....	123

## A GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN

<b>AMV</b>	<b>avian myeloblastosis virus</b>
<b>Ag</b>	Antigen
<b>aGVHD</b>	acute graft versus host disease
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ALL</b>	akute lymphatische Leukämie
<b>ALPS</b>	autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
<b>AML</b>	akute myeloische Leukämie
<b>ANC</b>	absolute neutrophil count
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>APC</b>	antigene presenting cell
<b>ATG</b>	Antithymozytenglobulin
<b>BCR</b>	B-cell receptor
<b>BSA</b>	bovine serum albumin
<b>CCR5</b>	chemokine receptor 5
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>CDR</b>	complementarity determining region
<b>cGVHD</b>	chronic graft versus host disease
<b>CLL</b>	chronische lymphatische Leukämie
<b>CML</b>	chronische myeloische Leukämie
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>CS</b>	complexity score
<b>DFS</b>	disease free survival
<b>DLI</b>	donor lymphocyte infusion
<b>DNA</b>	deoxynucleic acid
<b>DSA</b>	donorspezifische HLA-Antikörper
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>ECD</b>	energy coupled dye
<b>EDN</b>	eosinophil-derived neurotoxin
<b>EFS</b>	event free survival
<b>EPO</b>	eosinophil peroxidase
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FAM</b>	6-Carboxyfluorescein
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FM-CSF</b>	granulocyte macrophage colony stimulating factor
<b>FR</b>	framework region
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase
<b>GvHD</b>	graft versus host disease
<b>HFD</b>	haplo-identical family donor
<b>HFD HSCT</b>	haploidentical family donor hematopoietic stem cell transplantation
<b>HHV-6</b>	humanes Herpesvirus 6

<b>HHV-7</b>	humanes Herpesvirus 7
<b>HLA</b>	human leucocyte antigen
<b>HSCT</b>	hematopoietic stem cell transplantation
<b>ICAM</b>	intracellular adhesion molecule
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF</b>	Interferon
<b>IS</b>	Immunsystem
<b>ITAM</b>	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>ITIM</b>	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
<b>kgKG</b>	Kilogramm Körpergewicht
<b>KIR</b>	killer immunoglobuline-like receptor
<b>LCA</b>	leucocyte common antigen
<b>LFA</b>	leucocyte function associated antigen
<b>MACS</b>	magnetic cell separation
<b>MAK</b>	Membran-Angriffs-Komplex
<b>MBP</b>	major basic protein
<b>MDS</b>	myelodysplastisches Syndrom
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex
<b>MMF</b>	Mikofenolat Mofetil
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cell
<b>MTX</b>	Methotrexat
<b>MUD</b>	matched unrelated donor
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NRM</b>	non-relapse mortality
<b>OD</b>	optical density
<b>PAF</b>	platelet activating factor
<b>PAMP</b>	pathogen associated molecular pattern
<b>PBS</b>	phosphat buffered saline
<b>PBSC</b>	peripheral blood stem cells
<b>PC5</b>	Phycoerythrin-Cytochrom 5
<b>PC7</b>	Phycoerythrin-Cytochrom 7
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>POP-4</b>	Performance optimized polymer-4
<b>PRR</b>	pattern recognition receptor
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>RNI</b>	reactive nitrogen intermediate
<b>ROI</b>	reactive oxygen intermediate
<b>RRT</b>	regimen related toxicity
<b>rtPCR</b>	real time polymerase chain reaction
<b>SCID</b>	severe combined immunodeficiency

<b>sjTREC</b>	signal joint t-cell-receptor excision circles
<b>SNP</b>	single nucleotid polymorphism
<b>STZ</b>	Stammzelle
<b>TAMRA</b>	Tetramethylrhodamin
<b>TAP</b>	transporter associated with antigen processing
<b>TBI</b>	total body irradiation
<b>TCR</b>	T-cell receptor
<b>TLR</b>	toll like receptor
<b>TNC</b>	total nucleated cells
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TRAIL</b>	tumor necrosis factor-related aptoptosis-inducing ligand
<b>TREC</b>	t-cell-receptor excision circles
<b>TREG</b>	regulatorische T-Zelle
<b>TRM</b>	transplant related mortality
<b>UCB</b>	umbilical cord blood
<b>UCBT</b>	umbilical cord blood transfusion
<b>URD</b>	unrelated volunteer donor
<b>URD BMT</b>	unrelated volunteer donor bone marrow transplantation
<b>URD HSCT</b>	unrelated volunteer donor hematopoietic stem cell transplantation
<b>VZV</b>	Varizella-Zoster-Virus
<b>WBC</b>	white blood cells

## **B**    **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: TCR incl. Co-Faktoren und ITAM-Sequenzen	13
Abbildung 2: VDJ-Rekombination	14
Abbildung 3: MHC-I Komplex	20
Abbildung 4: MHC-II Komplex	22
Abbildung 5: Hämatopoese	25
Abbildung 6: Leukozytenrekonstitution	60
Abbildung 7: Leukozytenrekonstitution im Bezug auf Konditionierung und Selektion	61
Abbildung 8: Die CD3+-Zellzahl im Verlauf	61
Abbildung 9: CD3+-Rekonstitution im Vergleich von MAC und RIC	62
Abbildung 10: Die CD19+-Rekonstitution nach HFD HSCT über den Zeitverlauf	63
Abbildung 11: B-Zell-Rekonstitution im Vergleich von MAC und RIC	64
Abbildung 12: Verlauf der T-Helferpopulation	64
Abbildung 13: CD4-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion	65
Abbildung 14: CD8+-Rekonstitution im Zeitverlauf	66
Abbildung 15: CD8-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion	67
Abbildung 16: NK-Zellanstieg über den Zeitverlauf nach HFD HSCT	67
Abbildung 17: CD56-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion	68
Abbildung 18: Rekonstitution der CD56-negativen Zellen	69
Abbildung 19: Rekonstitution der CD56- - Zellen im Vergleich zu Konditionierung und Selektion	70
Abbildung 20: Immunrekonstitution der CD14-positiven Leukozyten	70
Abbildung 21: CD14-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion	71
Abbildung 22: zeitlicher Verlauf der naiven T-Helferzellen	72
Abbildung 23: Die Rekonstitution naiver T-Helferzellen in Vergleich von Konditionierung und Selektion	73
Abbildung 24: zeitlicher Verlauf der Rekonstitution der naiven T-Killerzellen	73
Abbildung 25: Die Rekonstitution naiver T-Killerzellen im Verlauf	74
Abbildung 26: Verlauf der T-Zellteilung	75
Abbildung 27: Teilungsrate der T-Zellen im Vergleich von Konditionierung und Selektion	76
Abbildung 28: Spenderchimärismusverlauf	77
Abbildung 29: Chimärismusanalyse im Vergleich von Konditionierung, Selektion und Ressource	78
Abbildung 30: TREC-Analyse im Zeitverlauf	79
Abbildung 31: TREC-Analyse im Vergleich von Konditionierung und Selektion	80
Abbildung 32: Spectratyping des TCR der CD4+-Zellen	81
Abbildung 33: Spectratyping des TCR der CD8+-Zellen	81
Abbildung 34: CS des CD4+-TCR im Bezug auf Konditionierung und Selektion	82
Abbildung 35: Complexity Scale des CD8+-TCR im Bezug auf Konditionierung und Selektion	83

## C TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der alternativen STZ-Ressourcen .....	34
Tabelle 2: Übersicht über das Patientenkollektiv mit absoluten und relativen Häufigkeiten .....	43
Tabelle 3: Übersicht über das Patientenkollektiv incl. bereites verstorbener Patienten .....	44
Tabelle 4: Oligonukleotide für die SNP-Chimärismusanalyse.....	49
Tabelle 5: TAQMAN-PROBES (3'-TAMRA,5'-FAM) für die SNP-Chimärismusanalyse .....	49
Tabelle 6: Oligonukleotide für die TREC-Analyse .....	53
Tabelle 7: TAQMAN-PROBES (3'-TAMRA,5'-FAM) für die TREC-Analyse.....	53
Tabelle 8: Oligonukleotide für die Analyse der TCR V $\beta$ -Diversität.....	57
Tabelle 9: Modifiziertes Oligonukleotid (5' FAM) für die Analyse der TCR V $\beta$ -Diversität .....	57
Tabelle 10: Oberflächenantigene und zugehöriger Zelltypus .....	59
Tabelle 11: Leukozytenrekonstitution über den Zeitverlauf .....	600
Tabelle 12: T-Zell-Rekonstitution über den Zeitverlauf.....	62
Tabelle 13: B-Zell-Rekonstitution im Zeitverlauf.....	63
Tabelle 14: Die T-Helferpopulation im quantitativen Verlauf .....	65
Tabelle 15: Quantitative Rekonstitution der T-Killerzellen im Zeitverlauf .....	66
Tabelle 16: Quantitativer NK-Zellrekonstitution im Zeitverlauf .....	68
Tabelle 17: Quantitativer Zeitverlauf der CD56-negativen Zellen .....	69
Tabelle 18: Quantitativer Zeitverlauf der CD14+ Zellen .....	71
Tabelle 19: Quantitativer Verlauf der naiven T-Helferzellen.....	72
Tabelle 20: Quantitativer Verlauf der Rekonstitution von naiven T-Killerzellen .....	74
Tabelle 21: Quantitativer Verlauf der T-Zellteilung .....	75
Tabelle 22: Quantitative Übersicht über den Spenderchimärismusübergang .....	77
Tabelle 23: Quantitativer Verlauf der TREC-Analyse.....	80
Tabelle 24: CS für den CD4+-TCR .....	82
Tabelle 25: CS für den CD8+-TCR .....	82
Tabelle 26: Quantitativer Erregernachweis in der Patientengruppe aller überlebenden Patienten (n=8) .....	85
Tabelle 27: Übersicht über Anzahl und Schweregrad der aufgetretenen GvHDs. ....	85
Tabelle 28: Übersicht über die Kombination aus Konditionierungsverfahren und Selektion .....	87

## D ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** Da nicht für jede Patientin und jeden Patienten eine HLA-identische Spenderin bzw. ein HLA-identischer Spender – sei es seitens Geschwistern oder HLA-identischen Spendern aus Datenbanken – zur Verfügung steht, stellt die haploidente Stammzelltransplantation (HFD HSCT) eine mittlerweile etablierte Alternative dar. Vor allem durch die schnelle Verfügbarkeit, ständige Verbesserungen der klinischen Outcomes innerhalb der letzten Jahre und Jahrzehnte und einigen noch relativ jungen immunologischen Erkenntnissen, welche sich durch das Überschreiten der HLA-Barriere ergeben haben, stellt die HFD HSCT für immer mehr Patientinnen und Patienten eine mehr als akzeptable Wahl dar. Da die Rekonstitution des Immunsystems nach HFD HSCT nur sehr langsam von statten geht und Komplikationen wie Graftversagen, Rezidiv, Infektionen und GvHD in diesem Zeitraum keine Seltenheit sind, können mittels spezifischem Monitoring solche Ereignisse möglichst früh detektiert und eine Therapie möglichst früh eingeleitet werden.

**Patientinnen/Patienten und Methoden:** 8 überlebende pädiatrische Patientinnen und Patienten mit den Grunderkrankungen ALL (n=3), ALPS (n=1), AML (n=1), Mb. Hodgkin (n=1), Neuroblastom (n=1), SCID (n=1) wurden zwischen 2004 und 2015 haploident transplantiert. Das Monitoring der Immunrekonstitution erfolgte durch die quantitative Messung der Gesamtleukozyten und einzelner Subpopulationen. Es wurde zusätzlich eine Spenderinnen- und Spenderchimerismusanalyse sowie spezifische Analysen der T-Zell-Population betrieben.

**Resultate:** Es konnten durch das sehr kleine Patientenkollektiv keine statistisch signifikanten Unterschiede der immunologischen Rekonstitution im Vergleich der verwendeten Konditionierungsregimen und Graftselektionsmethoden ermittelt werden. Die Kombination aus myeloablativem Konditionierungsregimen (MAC) und CD3/19-Depletion zeigte sich für die Rekonstitution einzelner Zellreihen tendenziell jedoch gegenüber einem Konditionierungsverfahren mit reduzierter Intensität (RIC) als vorteilhaft. Ein Engraftment von T- und B-Zellen trat im Falle von MAC erst zwischen den Tagen 90 und 120 und im Falle von RIC am Tag 60 nach HFD HSCT ein. Infektionen traten gehäuft auf und wurden mittels spezifischer Immunsurveillance relativ früh detektiert. Virale Erreger waren dabei am häufigsten für Infektionen verantwortlich. Eine akute GvHD trat bei 3 Patienten (37,5%) auf, 2 davon (25%) erlitten eine GvHD S I-II, ein Patient (12,5%) eine GvHD max. S III. 2 Patienten (25%) entwickelten im Verlauf eine chronische GvHD.

**Schlussfolgerung:** Ein penibles quantitatives Monitoring der immunologischen Rekonstitution zusammen mit einer möglichst frühzeitigen Erkennung von Infektionen und GvHD ist essentiell für das klinische Outcome nach HFD HSCT. Komplikationsträchtige Ereignisse nach HFD HSCT noch früher zu erkennen und zu therapieren, kann helfen, die klinischen Outcomes nach haploidenter Stammzelltransplantation noch weiter zu verbessern und die HFD HSCT noch breiter zum Einsatz bringen.

## **E ABSTRACT**

**Background:** Not every patient has a HLA-identical donor – either siblings or HLA-identical unrelated donors. Thus the use of haploidentical stem cell transplants (HFD HSCT) is considered to be a good alternative in the lack of a suitable donor. Due to the fast accessibility of this resource, ongoing improvements of clinical outcomes in the past years and certain immunological discoveries which have turned out while trying to cross the HLA-barrier, the HFD HSCT can be a more than acceptable option for more and more patients. Immune reconstitution following HFD HSCT is considered to be a very slow event and complications such as graft failure, relaps, infections and GvHD during this period are common. A specific monitoring of immune reconstitution can detect the occurrence of those events at an early stage and therapy can be started immediately.

**Patients and Methods:** 8 pediatric patients who survived HFD HSCT were transplanted between 2004 and 2015. The diagnosis were ALL (n=3), ALPS (n=1), AML (n=1), Mb. Hodgkin (n=1), Neuroblastom (n=1) and SCID (n=1). Monitoring of immune reconstitution included quantitative measurement of leucocytes and special sub-populations as well as analysis of donor chimerism and specific analysis of t-cell-population.

**Results:** Due to the small amount of patients included in the study no substantial differences of immune reconstitution between conditioning regimens and graft selection methods could be shown. The combination of a myeloablative conditioning regimen (MAC) and CD3/19-depleted grafts could however show a tendency of better reconstitution when compared to reduced intensity conditioning (RIC). Engraftment of T- and B-cells occurred between days 90 and 120 after HFD HSCT in the case of MAC while the use of RIC showed engraftment of these cells on day 60 after HFD HSCT. Infections were a frequent complication after HFD HSCT and could be detected early by the use of specific immune surveillance. Viral pathogens were responsible for most of the infections. Acute GvHD was shown in 3 patients (37,5%), 2 of them (25%) developed GvHD G I-II and one Patient (12,5%) developed GvHD max. G III. 2 patients (25%) developed chronic GvHD.

**Conclusion:** Exact quantitative monitoring of immune reconstitution together with early detection of infections and GvHD is essential for the clinical outcome following HFD HSCT. Detecting complications and events which can lead to complications earlier and initiating therapy at an early stage can further improve clinical outcomes following HFD HSCT and make HFD HSCT accessible to more patients.

# 1 DAS IMMUNSYSTEM

## 1.1 EINFÜHRUNG

Das menschliche Immunsystem ist eines der komplexesten Organsysteme des Menschen. Es unterliegt einem ständigen Wandel und fortwährender Adaptierung. Die teilweise sehr komplexen Mechanismen, die für die Funktion des Immunsystems notwendig sind, sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden, erfreuen sich aber großem Interesse in der Forschung. Ständig werden neue Funktionen und Wechselwirkungen entdeckt und somit auch Krankheiten neu verstanden und Krankheitsmechanismen entschlüsselt. Die Immunologie bezeichnet die Lehre von den Grundlagen der Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten und deren Stoffwechselprodukte mit denen wir täglich in Berührung kommen. Weiters inkludiert sie auch die Thematik der Störung und Fehlfunktion von solchen Abwehrmechanismen, was sich klinisch mit verschiedensten Manifestationen und Pathologien zeigt. (Rink, Immunologie für Einsteiger 2015, 2-4)

## 1.2 FUNKTION

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, Infektionen zu erkennen und eine Immunantwort, also eine Bekämpfung der eingedrungenen Pathogene, zu bewirken. Dies passiert genauer gesagt in folgenden 4 Schritten (K. Murphy 2012, 3-4):

### IMMUNOLOGISCHE ERKENNUNG

Jede präsente Infektion muss erkannt werden. Dies passiert sowohl über den humoralen als auch über den zellulären Teil des Immunsystems. Das angeborene Immunsystem stellt bei der Erkennung von Pathogenen den schnell agierenden Teil der Reaktion dar und wird erst nach einiger Zeit vom erworbenen Immunsystem unterstützt. (K. Murphy 2012, 3-4)

### DROSSELUNG BZW. ELIMINIERUNG DER INFEKTION

Der weitaus wichtigste Teil für die Bekämpfung einer Infektion besteht aus der Eliminierung der eingedrungenen Pathogene oder der Begrenzung der Infektion. Dies passiert anhand von Effektorfunktionen, wie z.B. dem Komplementsystem, von Lymphozyten produzierten Antikörpern und der phagozytierenden bzw. lysierenden Komponente des zellulären Immunsystems. (K. Murphy 2012, 3-4)

### IMMUNREGULATION

Neben der Bekämpfung der Infektion muss auch eine überschießende Immunantwort verhindert werden, die zu einer Bekämpfung von körpereigenem Gewebe führen könnte. Fehler in einer solchen Selbstregulation führen zu Zuständen die als Allergien bzw. Autoimmunerkrankungen bezeichnet werden. (K. Murphy 2012, 3-4)

## WIEDERERKENNUNG EINES PATHOGENS

Das Immunsystem ist in der Lage bei einer neuerlichen Infektion mit demselben Pathogen, schneller und effizienter auf den Eindringling zu reagieren. Dies basiert auf dem s.g. immunologischen Gedächtnis, einer Funktion des Immunsystems, die eine protektive Immunität hervorruft. (K. Murphy 2012, 3-4)

### 1.3 AUFBAU

Grundsätzlich wird zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem stellt die wenig dynamische aber dafür schnell aktivierbare Komponente des Immunsystems dar. Es besteht aus phagozytierenden Leukozyten und dem Komplementsystem. Das erworbene oder adaptive Immunsystem ist wie der Name schon sagt der Teil, der sich dynamisch auf verschiedenste Krankheitserreger und Pathogene einstellen kann. Es wird erst später als das angeborene Immunsystem aktiviert und beinhaltet die klonale Expansion von Lymphozyten und Antikörperproduktion. (Gordon MacPherson 2012, 5-7) (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 9-10) Die einzelnen zellulären und humoralen Bestandteile und Mechanismen werden im Weiteren kurz besprochen.

### 1.4 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

#### 1.4.1 FUNKTION

Die Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystems besteht in der Elimination von Infektionen vor dem Einschalten der adaptiven Komponente. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem besitzt es keine Spezifität, ist aber in der Lage körpereigenen von körperfremd zu unterscheiden. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 9) Diese Unterscheidung erfolgt jedoch auf komplett unterschiedliche Weise. Für das angeborene Immunsystem steht eine limitierte Anzahl an Rezeptoren und sekretierten Proteinen zur Verfügung, die es möglich macht, Erreger bzw. Veränderungen an Zelloberflächen zu erkennen. Das angeborene Immunsystem unterscheidet effektiv zwischen Pathogenen und körpereigene Zellen und ist in der Lage Pathogene zu eliminieren. Desweiteren ist es auch für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems wichtig, die bei einer protrahierten Infektion bzw. der Unfähigkeit der Elimination von einer Infektion erfolgt. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 9-10) (K. Murphy 2012, 5-7)

#### 1.4.2 BESTANDTEILE DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS

Im Wesentlichen setzt sich das angeborenen Immunsystem aus folgenden Teilen zusammen: (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 9-12)

- barrierebildende Epithelzellen

- zirkulatorische und gewebsständige Immunzellen
- verschiedenste Plasmaproteine (Opsonine, Defensine, Lysozyme, Komplementfaktoren)

### EPITHELBARRIERE

Physikalische Barrieren für eindringende Erreger stellen Hautepithel, Lunge und Atemwegsepithel, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt mit zugehöriger schleimhautassoziierter Immunbarriere und Flora dar. Die Zellen dieser Organe haben verschiedenste Funktionen (z.B. sekretorische Funktion und pH im Magen, Flimmerepithel in den Atemwegen, Schleimsezernierung und Peristaltik im Darm), die es Pathogenen erschweren, in den Organismus einzudringen. Intrazelluläre tight junctions erschweren es pathogenen Erregern zusätzlich in die Blutbahn sowie subepithelialen Gewebe einzudringen. Epithelzellen sind außerdem in der Lage Pathogene auf chemisch/antimikrobieller Ebene mittels verschiedenster sezernierter Stoffe zu zerstören (Defensine, Surfactant-Proteine, Lysozym, Fettsäuren) (1) (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 9-10) Falls Erreger dennoch diese Barriere überwinden sollten, werden sie in der Regel von Komplement sowie Fresszellen über Lysierung, Opsonierung bzw. Phagozytose abgebaut.

### KOMPLEMENTSYSTEM

Das Komplementsystem ist ein Überbegriff für verschiedenste im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten präsente Proteine, das als Aufgabe entweder eine direkte Lysierung von Erregern oder eine Opsonierung für den späteren Abbau durch phagozytierende Zellen hat. Es besteht aus mehr als 30 verschiedenen Proteinen, die hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden und in inaktiver Form im Plasma zirkulieren, um bei einer Infektion aktiviert zu werden. Es gibt 3 verschiedene Pathways um das Komplementsystem zu aktivieren, die stark ineinander verstrickt sind.

Der Antikörper vermittelte Pfad wird als klassischer Pathway bezeichnet, da er als erstes entdeckt wurde (Jules Bordet 1890) und kann über bereits vorhandene im Plasma zirkulierende Antikörper aktiviert werden.

Der zweite Pfad wird als alternativer Pathway bezeichnet und kann durch die alleinige Anwesenheit des Pathogens aktiviert werden.

Der dritte und am spätesten entdeckte Pathway wird als Lectin-Pathway bezeichnet, welcher durch Mannose-bindendes Lectin bzw. Ficoline, die auf der Zelloberfläche vorkommende pathogene Kohlenhydratketten erkennen, aktiviert wird. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 12-14)

## MONOZYTEN/MAKROPHAGEN

Makrophagen kommen in fast jedem Gewebe vor und bilden einen wichtigen Mediator zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die im Blut zirkulierenden precursor Varianten werden als Monozyten bezeichnet und werden im Knochenmark gebildet. Nach dem Eintritt der Monozyten ins Gewebe werden diese als Makrophagen bezeichnet. Die gewebsständigen Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung der angeborenen Immunantwort. Durch s.g. PRRs können Makrophagen körperfremde, pathogene Muster erkennen und so Eindringlinge entweder durch Phagozytose eliminieren oder durch die Sezernierung bestimmter Cytokine (TNF- $\alpha$  und Chemokine) andere Immunzellen (weitere Makrophagen, neutrophile Granulozyten...) anlocken, um so eine effektive Bekämpfung des Pathogens einzuleiten. Bei der Phagozytose werden Makrophagen durch s.g. PAMPs über den PRR aktiviert und das Pathogen im Phagosom durch ROIs, RNIs (Delves 2011, 13) und verschiedenen Verdauungsenzymen abgebaut. (2) (Gordon MacPherson 2012, 13, 15-16) (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 21-22)

## DENTRITISCHE ZELLEN

Dentritische Zellen haben ihren Namen aufgrund ihrer morphologisch charakteristischen bäumchenartigen Zellfortsätze und kommen hauptsächlich im peripheren Gewebe und auch im lymphatischen Gewebe vor. Dentritische Zellen sind wohl das wichtigste Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. (Gordon MacPherson 2012, 22-23) Unreife dentritische Zellen verfügen über PRRs, die bei vielen Pathogenen vorkommende Muster erkennen. Die Bindung von PAMP zu Rezeptor initiiert die Phagozytose des Pathogens im Phagosom und den intrazellulären Abbau. Desweiteren nehmen dentritische Zellen über den Mechanismus der Makropinozytose andauernd Pathogene wie Viruspartikel oder Bakterien auf. Außerdem sezernieren sie Cytokine, die wiederum das angeborene und adaptive Immunsystem beeinflussen. Hauptaufgabe der dentritischen Zelle ist nicht die Phagozytose per se, vielmehr wird die Zelle bei der Aufnahme eines Pathogens dazu veranlasst, von der Peripherie über die Lymphe in die sekundären lymphatischen Organe (LKN) zu wandern um dort naive T-Zellen zu aktivieren. Während dieser Wanderung differenziert die naive dentritische Zelle zu einer hocheffizienten antigenpräsentierenden Zelle und beginnt Antigenteile über MHC-II Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und Proteine die als Co-Faktoren bei der Aktivierung naiver T-Zellen notwendig sind in die Zellmembran einzubauen. Dentritische Zellen sind somit ein essentieller Bestandteil der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. (Gordon MacPherson 2012, 22-23) (K. Murphy 2012, 7)

## NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

Neutrophile Granulozyten machen mit 70% den größten Anteil an weißen Blutkörperchen im Blut aus und sind mit über 95% der größte Bestandteil der Granulozytenfraktion. Sie werden wie alle Blutzellen im KM gebildet und gelangen hauptsächlich als segmentkernige Granulozyten ins Blut, wo sie nach einer Lebenszeit von ca. 1-2 Tagen absterben. Dies erklärt auch den hohen Umsatz, wobei im KM ständig neue Zellen produziert werden müssen. (K. Murphy 2012, 7) Sie sind nicht im Gewebe präsent, wandern aber bei einer akuten Entzündungsreaktion durch von Makrophagen und dendritischen Zellen sezernierte Cytokine bzw. chemotaktische Komplementfragmente ins Gewebe ein (Migration). (Kenneth M. Murphy 2014, 114) (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 22-23)

Neutrophile Granulozyten sind ein Hauptbestandteil der ersten Barriere gegen Pathogene und sind vor allem gegen pyogene Bakterien wie Staphylokokken und Streptokokken aber auch Pilze phagozytotisch wirksam. Eine wichtige Zweitaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht darin, apoptotische Zellen sowie deren Fragmente zu verdauen bevor eine Entzündungsreaktion gestartet werden kann. Im Gegensatz zu Makrophagen besitzen neutrophile Granulozyten mehrere Mechanismen, um Pathogene abzutöten. Sie besitzen im Cytoplasma eine Vielzahl an Granula – die auch für ihren Namen verantwortlich sind – die bei der Phagozytose von Pathogenen mit dem Phagosom verschmelzen und ihren antimikrobiellen Effekt durch ROIs und eine Vielzahl bakterizider Proteine, die ca. 40 % des Phagosominhaltes füllen, entfalten. (Gordon MacPherson 2012, 17)

Neutrophile Granulozyten sind jedoch auch in der Lage Pathogene extrazellulär- also ohne Phagozytose – abzutöten. Sie sezernieren hierfür die Granulainhalte samt proteolytischer Enzyme in den extrazellulären Raum. Durch die antimikrobiellen Agenzien und proteolytischen Enzyme wird auch das umliegende Gewebe zerstört, was sich vor allem bei hartnäckigen Keimen durch die destruirende Wirkung der Granulainhalte bemerkbar macht. (Gordon MacPherson 2012, 16)

## EOSINOPHILE GRANULOZYTEN

Der Anteil an eosinophilen Granulozyten beträgt normalerweise 1-3% der gesamten Leukozytenpopulation im Blut. Ihren Namen verdanken sie den verschiedenen großen eosinophilen Granula die im Cytoplasma der Zellen bei saurer Färbung zum Vorschein treten. Sie sind mit parasitären Infektionen (z.B. Helminthen) und allergischen Reaktionen assoziiert und stehen bezüglich ihres Effektes in Verwandtschaft mit den Mastzellen. (Gordon MacPherson 2012, 17-18)

Sie können direkt gegen Erreger vorgehen, sind aber auch fähig mit Mastzellen und T-Zellen in Kommunikation zu treten. Sie bleiben normalerweise für ca. 24h in der Zirkulation und migrieren dann ins Gewebe, wandern aber im Falle einer Infektion durch von Mastzellen

sezernierte Chemokine (PAF) und Cytokine (IL-3, IL-5, GM-CSF) zum Ort der Entzündung. (3) Da die zu beseitigenden Pathogene für eine Phagozytose zu groß sind, ordnen sich eosinophile Granulozyten um den Eindringling herum an und sezernieren ihre Granulainhalte in den Extrazellulärraum. Die Inhalte der Granula bestehen aus MBP, EPO und EDN welche den Erreger unschädlich machen sollen. Die sezernierten Enzyme und Proteine induzieren unter anderem eine gesteigerte Schleimproduktion in den Schleimhäuten was zusätzlich ein Eindringen des Pathogens in die epithelialen Strukturen verhindern soll. (Gordon MacPherson 2012, 19)

### **BASOPHILE GRANULOZYTEN**

Basophile Granulozyten verdanken ihren Namen den großen cytoplasmatischen Granula die durch Tüpfelungen in der basischen Färbung auffallen. Sie machen maximal 1% der Leukozytenpopulation im Blut aus und kommen normalerweise nicht im Gewebe vor. (Gordon MacPherson 2012, 18) Sie sind den Mastzellen ähnlich und kommen auch vorwiegend in Kombination mit Mastzellen und eosinophilen Granulozyten vor. Basophile Granulozyten werden ähnlich wie eosinophile Granulozyten durch von Mastzellen ausgehende Chemotaxis an den Ort der Entzündung manövriert. Dort können sie durch IgE-Stimulation am FcεRI-Rezeptor intragranuläres Histamin und Leukotriene freisetzen. (Rink, Immunologie für Einsteiger 2012, 58)

Basophile Granulozyten können auch mit B-Zellen interagieren und dadurch die Produktion von IgE fördern (durch Produktion von IL-4 und IL-13 und dem Liganden CD40) (4). Fraglich ist jedoch die Fähigkeit in den LKN einzuwandern und alleinig naive T-Zellen durch präsentierte Antigene und IL-4 Sezernierung zu TH2-Zellen zu differenzieren und dadurch eine parasitenspezifische TH2-Antwort zu veranlassen. Dies hat sich experimentell in Maus-Modellen gezeigt, wird aber kontrovers diskutiert. (5)

### **MASTZELLEN**

Mastzellen sind gewebständige Zellen in den Schleimhäuten und im lockeren Bindegewebe. Ihre Funktion besteht darin, infektiöse Antigene und Pathogene bzw. Gewebsschäden zu erkennen und daraufhin eine Entzündung zu triggern. (Gordon MacPherson 2012, 17-18) Mastzellen werden wie fast alle Zellen des angeborenen Immunsystems über ihre PRRs bzw. über kleine Moleküle – wie Komplementfragmente (C3a/4a über den C3a/4a Rezeptor, C5a über den C5a Rezeptor) (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 16) – aktiviert.

Ein klinisch relevanter Rezeptor ist der Fcε-R1 Rezeptor der IgE Antikörper binden kann, die bei einer allergischen Reaktion gebildet werden. Der Inhalt ihrer cytoplasmatischen Granula, der vorwiegend aus Histamin und verschiedenen Enzymen (Tryptase, Chymase, Cathepsine, Metalloproteasen etc.) besteht, wird bei ihrer Aktivierung sehr rasch entleert. Durch das

enleerte Histamin, das ein vasoaktives Amin darstellt, werden die umliegenden Gefäße dilatiert, die Permeabilität gesteigert und die glatte Muskulatur kontrahiert. Freigesetzte Proteasen (Trypsin, Cathepsin G etc.) führen über eine proteolytische Spaltung extrazellulärer Bereiche von PARs (Protease-aktivierbare Rezeptoren) am Endothel zur Vasodilatation, Extravasation und Schmerzen. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 101-102) Aktivierte Mastzellen synthetisieren nach der Aktivierung sekundäre Mediatoren wie Cytokine (IL-4, IL-13) und Lipid-Mediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, PAF), welche für die Kontraktion der glatten Muskulatur, Schleimbildung und eine zusätzliche Erhöhung der Gefäßpermeabilität verantwortlich sind und chemotaktisch auf Leukozyten wirken. IL-4 und IL-13 bewirken eine Aufrechterhaltung der Aktivierung von TH-2 Zellen und daher eine zunehmende Produktion von IgE durch B-Zellen. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 100) Mastzellen sind daher vor allem für ihre Rolle, die sie bei der Entstehung von Allergien und allergischen Reaktionen spielen, bekannt. (Gordon MacPherson 2012, 17)(6)

#### NATÜRLICHE KILLERZELLEN

NK-Zellen entwickeln sich zusammen mit den Lymphozyten aus der lymphatischen Stammzelle, sind aber dennoch Teil des angeborenen Immunsystems. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen haben sie keine spezialisierten Rezeptoren gegen Antigene, die durch Genrekombination dynamisch veränderbar sind. Sie haben vielmehr Rezeptoren, die entweder pathogene Zielzellen erkennen und dadurch die cytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen aktivieren, oder solche, die inhibierend wirken, um intakte Zellen vor einer Zerstörung zu schützen. (Gordon MacPherson 2012, 18-19)

Ob sie nun protektiv oder destruktiv wirken, hängt von der Summe aller Einzelsignale der beiden Rezeptortypen ab. Um ihre lytischen Eigenschaften zu erreichen müssen NK-Zellen durch verschiedene Cytokine, (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-15) (7), welche von Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems (aktivierte Makrophagen, TH1-Zellen, dendritische Zellen (8,9)) ausgeschüttet bzw. selbst synthetisiert werden (IFN $\gamma$ ), aktiviert werden. (10,11) Dadurch wird die Expressierung von aktivierenden Rezeptoren hochreguliert.

Zusätzliche Stimulation durch IL-12, IL-18 bzw. TNF- $\alpha$ - $\beta$  schöpft das maximale antipathogene Potential aus. Diese Cytokine werden v.a. bei viralen Infektionen durch infizierte Zellen und Zellen des Immunsystems ausgeschüttet. Die Interaktion von NK-Zelle und Zielzelle erfolgt über eine s.g. immunologische Synapse (12), welche über Adhäsionsmoleküle (LFA-1 seitens der NK-Zelle bzw. ICAM-1/-2/-3/-4 seitens der Zielzelle) (13) und aktivierenden bzw. inaktivierenden Rezeptoren mit deren Liganden auf der Zielzelle (wenn vorhanden) hergestellt wird. Die Liganden auf der Oberfläche der Zielzelle und deren Affinität zu inhibierenden bzw. aktivierenden Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche bestimmen die Reaktivität der NK-Zelle – ebenso wie die Anzahl an aktivierenden und inaktivierenden Rezeptoren selbst. Wenn

inaktivierende Signale der immunologischen Synapse überwiegen, löst sich die NK-Zelle von der Zielzelle und kann neue Zielzellen prüfen. Überwiegen aktivierende Signale, degranuliert die NK-Zelle und leitet die Zerstörung der Zielzelle ein. (Rink, Immunologie für Einsteiger 2012, 55-56)

Für eine geordnete und kontrollierte NK-Zell-Antwort auf ein Pathogen sind deshalb aktivierende und inaktivierende Rezeptoren von großer Bedeutung (14). Die Zerstörung erfolgt über die Sezernierung von in Granula gespeicherten cytotoxischen Proteinen und Enzymen, die die Zellmembran der Zielzelle durchdringen und die Apoptose auslösen. (T. W. Murphy 2012, 123)

Man kann NK-Zellen aufgrund ihrer Rezeptorexpression grundsätzlich in 2 Typen von Zellsubsets einteilen:

- NK-Zellen: diese sind als konventionelle NK-Zellen bekannt. Sie verfügen über die Möglichkeit durch ihre intrazellulär gespeicherten Granula Erreger abzutöten und können Pathogene aufgrund ihrer Oberflächenrezeptoren erkennen und eine Immunreaktion auslösen.
- NKT-Zellen: sie stellen den viel kleineren Anteil der NK-Zellen dar und haben eine viel engere Verwandtschaft zu naiven T-Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie haben zusätzlich die Fähigkeit einen TCR zu exprimieren und diesen an ihrer Oberfläche einzubauen.

Im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen sind NKT-Zellen aber nicht in der Lage das für den TCR kodierende Genpool zu rekombinieren. Es gibt jedoch auch ein T-Zell-Subset, welches einen den NKT-Zellen ähnlichen TCR exprimiert – die  $\gamma\delta$ -T-Zellen. NKT-Zellen können Cytokine sezernieren, die die Differenzierung von B- und T-Zellen unterstützen, was ein neuerliches Beispiel für die Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem darstellt.(15)

### **AKTIVIERENDE NK-REZEPTOREN**

Die Aktivierung der NK-Zellen passiert durch Veränderung der MHC-I Expression bzw. dem Fehlen von MHC-I Molekülen auf Zielzellen. (T. W. Murphy 2012, 125) (Rink, Immunologie für Einsteiger 2012, 56) Fehlende MHC-I Moleküle an der Oberfläche der Zielzelle werden von NK-Zellen als missing self erkannt, führen aber noch nicht zu einer Eliminierung dieser. Durch die Bindung von LFA-1 an den ICAM-Liganden werden die cytoplasmatischen Granula in der NK-Zelle in der Nähe der immunologischen Synapse konzentriert, um eine bevorstehende Sezernierung vorzubereiten. Für eine definitive Degranulierung sind weitere Liganden notwendig, die von aktivierenden Rezeptoren erkannt werden. Da eine detaillierte

Beschäftigung mit diesen aktivierenden Rezeptoren zu sehr ins Detail gehen würde, werden hier nur die wichtigsten Rezeptorfamilien besprochen (16) (W.Mak 2006, 527-529):

**Natural cytotoxicity receptors (NCRs):** NKp44, NKp46 und NKp30. Diese 3 Rezeptoren sind hauptverantwortlich für die Abtötung von Tumorzellen und binden Influenzavirus- und Sendaivirushemagglutinin

**Aktivierende Mitglieder der NKG2-Rezeptorfamilie:** CD94/NKG2C und NKG2D. Ersterer bindet an ITAM-spezifische Signalketten am HLA-E Antigen. Im Gegensatz zum sehr ähnlichen CD94/NKG2A Rezeptor, der inhibierend wirkt, ist der NKG2D Rezeptor einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren und bindet MICA (MHC-I chain related A) und MICB (MHC-I chain related B). MICA und MICB sind transmembrane stressinduzierte Proteine und werden bei Virusinfektionen und bei einigen Tumorzellen hochreguliert. Durch die Aktivierung über NKG2D können sogar inhibitorische Rezeptorsignale überschrieben werden, was den Rezeptor sehr potent macht.(17)

**KAR-Familie:** KAR p50 vermittelt die cytotoxische Wirkung der NK-Zelle

**Fcy-RIII (CD16):** ist ein niedrigaffiner IgG Rezeptor der Antikörper gegen pathogene Strukturen bindet. Durch Aktivierung kommt es zur Degranulation – dieser Prozess wird als ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) bezeichnet.

**Kostimulierende Rezeptoren:** Es gibt einige kostimulatorisch wirkende Rezeptoren, die selbst nicht cytotoxisch auf die Zielzelle wirken, jedoch den cytotoxischen Effekt bei einer Aktivierung eines aktivierenden Rezeptors verstärken. Der Vollständigkeit halber werden diese Rezeptoren hier erwähnt, jedoch ist wenig über ihre Liganden und die intrazellulär vermittelten Effekte bekannt. Die wichtigsten kostimulierenden Rezeptoren sind 2B4, LAG-3, CD2, CD69 und NK 1.1.

Aktivierende Rezeptoren verfügen an ihrer intrazellulären Domäne über ITAM Sequenzen, die über bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden die Degranulierung auslösen. (Rink, Immunologie für Einsteiger 2012, 57)

### INAKTIVIERENDE NK-REZEPTOREN

Generell ist über die Funktion und Zusammenhänge der inaktivierenden Rezeptoren viel mehr bekannt als über die aktivierenden Gegenspieler. Wiederum ist das MHC-I Molekül der wichtigste inaktivierende Ligand der NK-Zellen. Verfügt eine Zelle über eine ausreichende MHC-I Konzentration an ihrer Oberfläche und sind diese MHC-I Moleküle nicht verändert, wird sie vom Immunsystem als körpereigen erkannt. Fehlen diese jedoch, erkennen NK-Zellen die Zelle als fremd und leiten eine Immunreaktion ein – missing-self-theory (W.Mak 2006, 529).

Es gibt 3 Hauptgruppen von Rezeptoren, die inhibitorische Signale vermitteln können (18-20) (Rink, Immunologie für Einsteiger 2012, 57) (W.Mak 2006, 529-530):

**C-type lectin-like Familie:** Zu dieser Familie gehören Ly-49, CD94/NKG2A und CD94/NKG2B. Ly-49 wird nur auf murinen NK-Zellen und NK-Zellen niedriger Primaten exprimiert, da das Gen durch eine Punktmutation bei höheren Primaten und Menschen abgeschaltet wurde. (21,22) CD94 ist ein Typ-II Glycoprotein und Mitglied der C-type lectin Superfamilie. Es wird vorwiegend auf NK-Zellen und einigen T-Zellen exprimiert. Da dem Glycoprotein der cytoplasmatische Schwanz fehlt, kann es selbst kein inhibitorisches Signal über den NKG2A bzw. NKG2B Rezeptor einleiten und so ist der heterodimere CD94/NKG2A/B Rezeptor auf eine HLA-E Bindung für die Inaktivierung angewiesen.

**KIR:** KIRs gehören zur Immunoglobulinsuperfamilie und binden sehr schnell und mit hoher Affinität an MHC-I präsentierte Peptidfragmente in der  $\alpha$ 1-Helix des MHC-I Rezeptors. Es sind 14 verschiedene humane KIR-Gene bekannt, die in einer 150 kb Region auf dem Chromosom 19 gebündelt vorkommen. (T. W. Murphy 2012, 126) Die Gensequenzen, die für KIR-Rezeptoren im humanen Genom kodieren, sind zwischen Individuen sehr variabel. (23)

Die Expressionsmuster der verschiedenen KIR-Moleküle werden durch Methylierung der nicht exprimierten KIR-Gene an die Tochterzelle weitergegeben und es besteht eine hohe alternative Splicingrate. Dies erzeugt einen großen Polymorphismus zwischen den einzelnen NK-Zellen (24,25) (W.Mak 2006, 531) und hat eine enorm hohe Anzahl an KIR-Rezeptor-Haplotypen in der Population zur Folge, welche durch die Evolution stetig zugenommen hat. (W.Mak 2006, 531) Die meisten der KIR-Rezeptoren sind inaktivierend, es gibt jedoch auch einige wenige die aktivierend wirken.(26)

Die KIR-Gene kodieren für mindestens 2 KIR-Proteine (KIR-2D, KIR-3D). Diese beiden Proteine unterscheiden sich in der Anzahl an Ig-Domänen - KIR-2D Rezeptoren tragen 2 und KIR-3D Rezeptoren tragen 3 Ig-Domänen im Protein. Zwischen diesen beiden Familien wird zwischen S (short) und L (long) unterschieden, wobei die Suffixe für die Länge der intrazellulären Domäne stehen. L-Rezeptoren tragen 2 ITIMs und wirken als klassisch inhibitorische Rezeptoren. S-Rezeptoren tragen hingegen keine ITIMs und sind vermeintliche Aktivatoren. (Rink, Immunologie für Einsteiger 2012, 57)

Einige wichtige KIR-Rezeptoren sind:

- p58: ist ein KIR-2DL Rezeptor mit dem Molekulargewicht von 58 kDa welcher spezifisch HLA-C Moleküle binden kann.
- NKB1 (NK receptor for HLA-B): ist ein KIR-3DL Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 70 kDa welcher HLA-B bindet. Der Rezeptor kann auch als Heterodimer

vorkommen (140 kDa) und ist dann spezifisch für HLA-A Segmente.

- KIR-2DL4: dieser Rezeptor ist spezifisch für HLA-G Antigene, welche auf Trophoblasten vorkommen. Die Bindung von HLA-G Antigenen an den auf maternalen NK-Zellen vorkommenden inaktivierenden Rezeptor wird als Schutz für den allogenen Fetus während der Schwangerschaft angesehen (27).

Inhibitorische KIRs sind generell dominant und verhindern so, dass NK-Zellen autologe Zellen angreifen. NK Zellen, die KIR-2DL1 exprimieren werden von HLA-C Gruppe 2, welche eine Asn77-Lys80 Abfolge auf der  $\alpha$ 1-Helix des HLA-C haben, inhibiert. KIR-2DL2 und KIR-2DL3 erkennen Ser77-Asn80 auf HLA-C Gruppe 1 Komplexen, wogegen KIR-3DL1 spezifisch für HLA-Bw4 ist. (W.Mak 2006, 531)

Die Frequenzen der HLA-I KIR-Liganden - HLA-C Gruppe 1, HLA-C Gruppe 2 und HLA-Bw4 – betragen unter Kaukasierninnen und Kaukasiern ca. 80%, 65% und 55%. (28) Patientinnen und Patienten nach HFD-HSCT, welche keine KIR-Liganden für die inhibitorischen allogenen KIR-Rezeptoren exprimieren, unterliegen einer höheren Wahrscheinlichkeit einer alloreaktiven NK-Zell-Antwort. (receptor-ligand-mismatch model) (29-31)

**ILTs (immunoglobuline like transcripts) bzw. LIRs (leucocyte Ig-like receptor):** ILTs sind inhibierende Rezeptoren die bis auf den ILT2-Rezeptor (LIR1) auf nicht-NK-Zellen exprimiert werden (T-/B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten...). Der ILT2 Rezeptor ist ein Glycoprotein und enthält 4 extrazelluläre Ig-like Domänen und der cytoplasmatische Schwanz trägt mehrere ITIMs. Er bindet an die  $\alpha$ 3-Domäne des MHC-I Komplexes von HLA-A, -B, -E, -G aber nicht HLA-C. Der Genpool für die ILT-Rezeptoren liegt in der Nähe des Genpools der KIR-Rezeptoren auf Chromosom 19.

Auf menschlichen NK-Zellen können Rezeptoren aller Rezeptorfamilien gleichzeitig vorkommen, eine Co-Exprimierung von mehr als einem KIR bzw. C-type lectin-like Rezeptor auf einer einzelnen NK-Zelle ist gängig. Im Schnitt exprimieren NK-Zellen zwischen 4 und 5 verschiedene Rezeptoren aus allen erwähnten Klassen. (W.Mak 2006, 529)

## 1.5 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

Das erworbene Immunsystem schaltet sich immer dann in die Infektionsbekämpfung ein, wenn die Abwehr durch das angeborene Immunsystem nicht ausgereicht bzw. fehlgeschlagen hat. Es zeichnet sich vor allem durch die enorm hohe Diversität und die Fähigkeit spezifisch auf ein bestimmtes Antigen eine Immunantwort hervorrufen zu können aus.

Die Hauptkomponenten stellen dabei B- und T-Lymphozyten und die von B-Lymphozyten bzw. deren enddifferenzierter Stufe (Plasmazellen) sezernierten Antikörper, welche spezifisch

Antigene binden und somit die Elimination des Pathogens erleichtern, dar. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 29-30)

T-Zellen können mit Hilfe von TCRs bestimmte Peptidfragmente, die von der Wirtszelle zur Antigenpräsentation mit Hilfe von MHC-I-Molekülen an die Oberfläche gebracht werden, erkennen und so eine direkte, zelluläre Immunantwort auslösen. Man unterscheidet zwischen zytotoxischen (CD8) T-Zellen und T-Helfer Zellen (CD4). CD8 Zellen erkennen von MHC-I Molekülen präsentierte Peptidfragmente und können die infizierte Zelle direkt abtöten. CD4 Zellen wiederum binden mit ihren Rezeptoren an MHC-II Komplexe und aktivieren Makrophagen (TH1-Zellen), B-Zellen (TH2-Zellen), und neutrophile Granulozyten oder Epithelzellen (TH17-Zellen) bzw. regulatorische T-Zellen (TREGs).

TREGs sind in der Lage die Immunantwort zu regulieren und eine überschießende Reaktion zu verhindern, indem sie APCs modulieren und mit ihren ausgeschütteten antiinflammatorischen Cytokinen die Immunantwort direkt inhibieren. Ein weiteres prägendes Merkmal des erworbenen Immunsystems ist die Fähigkeit auf ein bestimmtes Pathogen über Gedächtniszellen bei einer zweiten Infektion schneller zu reagieren und somit eine wirksamere Immunreaktion hervorzurufen. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 29-31) (Gordon MacPherson 2012, 5-12) (Rink, Immunologie für Einsteiger 2015)

#### 1.5.1 KNOCHENMARK, THYMUS UND LYMPHATISCHES GEWEBE

Lymphozyten zirkulieren im Blut und den Lymphen und können desweiteren in großer Anzahl im lymphatischen Gewebe und den lymphatischen Organen gefunden werden. Diese lymphatischen Organe können grob in zentrale oder primäre lymphatische Organe, in denen Lymphozyten generiert werden und in periphere oder sekundäre lymphatische Organe, in denen reife naive Lymphozyten vorkommen und die adaptive Immunantwort gestartet wird, eingeteilt werden. Die zentralen Organe bilden dabei das KM und der Thymus.

Die peripheren lymphatischen Organe können in LKN, Milz und Schleimhaut von Verdauungstrakt, Nase und Respirationstrakt, Urogenitaltrakt und Schleimhäute weiterer Organe eingeteilt werden. LKN sind über ein System von lymphatischen Gefäßen (Lymphbahnen) verbunden, welche extrazelluläre Flüssigkeit aus dem Gewebe über die LKN zurück ins Blut drainieren.

B- und T-Zellen haben ihren Ursprung im KM, jedoch sind es ausschließlich die B-Zellen (B für bone-marrow), welche dort heranreifen. Die Precursor T-Zellen migrieren im Laufe der Entwicklung in den Thymus und reifen dort heran. Sobald B- und T-Zellen einen reifen Endzustand erreicht haben, treten sie als naive Lymphozyten in die Blutbahn ein und zirkulieren auch in den peripheren lymphatischen Organen. (T. W. Murphy 2012, 14-16)



der T-Zelle verankert – siehe Abbildung 1. Eine Disulfidbrücke stabilisiert die Struktur der beiden Ketten. (Kenneth M. Murphy 2014, 157-158)

Die variablen Segmente des TCR setzen sich aus den Segmenten V und J in der  $\alpha$ -Kette und den Segmenten V, D und J in der  $\beta$ -Kette zusammen – insgesamt also 5 Segmente – welche auch die Antigenbindungsstelle und somit auch den polymorphen Teilbereich des Rezeptors

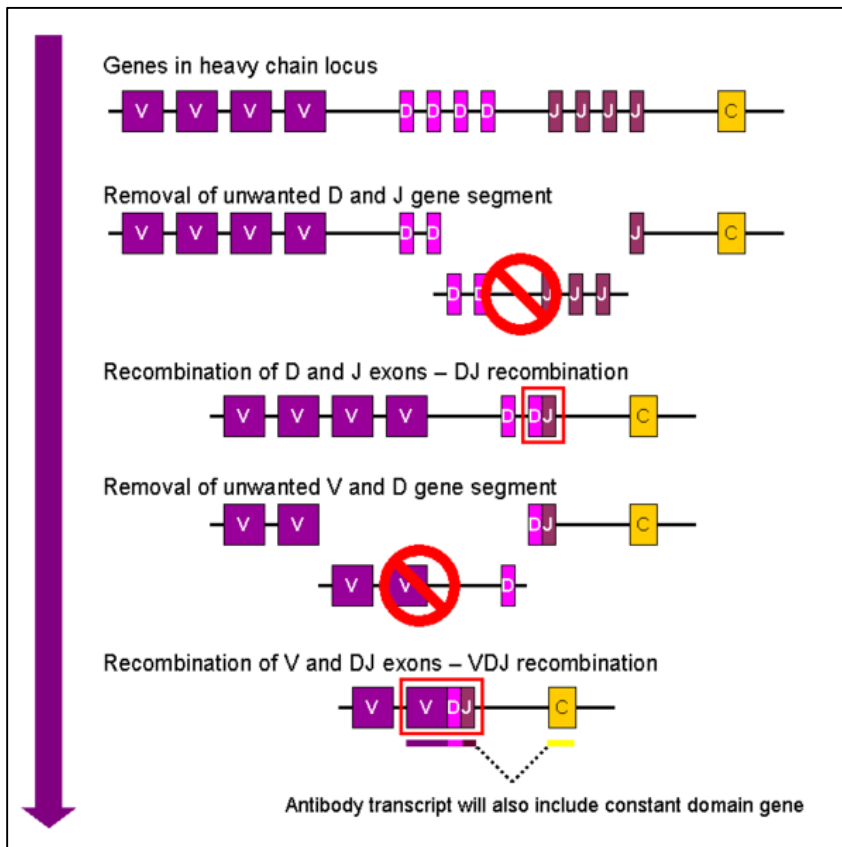


Abbildung 2: VDJ-Rekombination, Quelle: Gusatvo Carra, GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) via Wikimedia Commons

bilden. Für die einzelnen variablen Segmente verteilt sich die genetische Information auf circa 50 V- $\alpha$  und 70 J- $\alpha$  Teilgene der  $\alpha$ -Kette, sowie circa 30 V- $\beta$ , 12 J- $\beta$  und 2 D- $\beta$  Teilgene der  $\beta$ -Kette. Da sich die variablen Abschnitte somatisch rekombinieren (VDJ-Rekombination) – siehe Abbildung 2 -, ergibt sich eine enorme Vielfalt an Antigenbindungsstellen, welche eine spezifische Immunantwort ermöglichen.

(32) Hunkapillar und Hood haben berechnet, dass für den V- $\beta$ -Teil der  $\beta$ -kette

alleine  $4,4 \times 10^{13}$  und für den V- $\alpha$ -Teil der  $\alpha$ -Kette  $6,5 \times 10^{12}$  verschiedene Kombinationen möglich sind. Daraus folgt, dass durch diese enorme Vielfalt der beiden Teilketten insgesamt circa  $2,9 \times 10^{20}$  verschiedene TCRs exprimiert werden können. (33)

Diese enorme Variabilität ist vor allem in kurzen Sequenzen am TCR konzentriert, die als CDRs (complementary determining regions) oder auch hypervariable Regionen (HVRs) bezeichnet werden. Es gibt für jeden variablen Teil des Heterodimers – also V- $\alpha$  und V- $\beta$  – jeweils 3 dieser CDRs – CDR1, CDR2 und CDR3. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 45-46) Diese Regionen werden dabei von s.g. framework regions (FRs) eingerahmt. FRs sind relativ konserviert und dienen als strukturelles Gerüst der CDRs. Damit eine erfolgreiche Signalübertragung nach Antigenerkennung passiert, ist der TCR auf Co-Faktoren angewiesen, die für diese Signalübertragung verantwortlich sind und die T-Zellen aktivieren können. Für TCR dienen dazu die Proteine CD3 und die  $\zeta$ -Kette. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 45)

Diese Co-Faktoren besitzen Tyrosinaktivierungssequenzen, s.g. ITAMs – immunoreceptor tyrosine-based activation motifs – an ihren cytosolischen Enden. Sobald ein Antigen an den TCR bindet, rücken diese Co-Faktoren durch die Ausbildung von Aggregaten (crosslinking) in die Nähe der Rezeptoren. Tyrosinkinase, welche rezeptorständig vorhanden sind, phosphorylieren daraufhin die ITAMs und es kann eine Kaskade von Kinase-Aktivierungen eingeleitet werden, welche schlussendlich entsprechende Signale in den Kern der T-Zelle weiterleiten und so die T-Zelle aktivieren. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 45-46)

#### 1.5.4 ANTIGENERKENNUNG DURCH DEN TCR

T-Zellen erkennen Antigene durch die Präsentation von Peptidfragmenten über den MHC-Komplex der Wirtszelle. Vor allem die CDRs des TCR erkennen dabei bestimmte Sequenzen des Peptids, sowie auch einzelne polymorphe Bereiche des MHC-I. Reife T-Zellen exprimieren Co-Rezeptoren (CD4 bzw. CD8), welche bei der Erkennung von Peptiden die über die MHC-Komplexe präsentiert werden, eine Stabilisierung bewirken. Zytotoxische T-Zellen exprimieren dabei den CD8 Co-Rezeptor und können intrazelluläre Peptide erkennen, die über den MHC-I-Komplex an der Zelloberfläche präsentiert werden. T-Helferzellen exprimieren CD4 als Co-Rezeptor und können deshalb Peptide extrazellulärer Natur erkennen, die über den MHC-II-Komplex präsentiert werden. Es können über den TCR nicht nur Peptide sondern auch einige Kohlenhydratstrukturen und auch Toxine (Superantigene) erkannt werden. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 48)

#### 1.5.5 B-ZELLEN

B-Zellen erkennen Antigene über den BCR, der an der Oberfläche der Zellen verankert ist. Durch die Bindung eines Antigens an den BCR wird intern eine Signalkaskade induziert, die die B-Zelle dazu veranlasst, zu proliferieren und sich in eine Plasmazelle zu differenzieren. Plasmazellen stellen die Effektorzellen naiver B-Zellen dar und sind für die Antikörperproduktion verantwortlich. Diese Antikörper sind spezifisch für ein Pathogen, gegen das die B-Zellen aktiviert wurde. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 44-45)

#### 1.5.6 BCR (B-CELL-RECEPTOR)

BCRs sind membranständige Immunglobuline und sind dem TCR sehr ähnlich. Im Gegensatz zum TCR kann der BCR in eine schwere und eine leichte Kette (heavy und light chain) unterteilt werden, wobei es für beide der Ketten wiederum eine konstante und eine variable Region gibt – Ch, Cl und Vh, Vl. Die beiden Ketten werden im Gegensatz zum TCR durch 2 Disulfidbrücken in ihrer 3-dimensionalen Struktur stabilisiert.

Gleich wie beim TCR gibt es beim BCR für den antigenerkennenden Teil der variablen-Regionen wieder jeweils 3 CDRs, die durch 4 FRs verbunden und somit stabilisiert werden.

Die enorme Vielfalt der BCRs wird genau nach dem gleichen Prinzip wie beim TCR erreicht – durch die somatische Rekombination der verschiedenen V-, D- und J- Gensegmente- siehe Abbildung 2. Genau wie beim TCR gibt es für den BCR auch Co-Faktoren, die für die Signaltransduktion in den Zellkern und somit für die Aktivierung verantwortlich sind – Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$ . Die beiden Co-Faktoren besitzen ebenfalls wie beim TCR ITAMs. Die Aktivierung der B-Zelle erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie beim TCR. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 44-47)

### 1.5.7 ANTIGENERKENNUNG DURCH DEN BCR

Der BCR erkennt mittels der CDRs s.g. Epitope auf Antigenen. Epitope stellen dabei kleine Bereiche eines Peptids dar. Abhängig von der Größe des Peptids werden kleine Peptide in den Taschen bzw. Furchen und größere auf der Oberfläche der CDRs gebunden. Diese Bindung ist im Allgemeinen reversibel und beruht auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen CDRs und Antigen (elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waal'sche Kräfte und hydrophobe Kräfte). Wie stark ein Antigen am BCR gebunden wird hängt von der Affinität zum Antigen – der Gesamtheit der Bindungskräfte – ab.

Die Summe der Affinitäten wird als Avidität bezeichnet – sie ist bei BCRs die in Form von IgM-Molekülen vorliegen am größten, da das IgM-Molekül eine pentamere Struktur vorweist. Als Kreuzreaktivitäten werden Ereignisse bezeichnet, in denen 2 oder mehrere verschiedenen Antigene durch eine einheitliche Determinante auf ihnen von einem einzelnen Rezeptor erkannt werden können. Im Gegensatz zu den T-Zellen können B-Zellen durch die s.g. somatische Hypermutation Punktmutationen in den V-Regionen nach Antigenstimulation hervorrufen, welche zu einer Erhöhung der Antigenaffinität führen können. (Vollmar/Zündorf/Dingermann 2012, 48-49)

## 2 DIE HLA-BARRIERE

### 2.1 MHC-SYSTEM

In den 1930er Jahren wurden von Peter Gorer erste Experimente angestellt, die herausfinden sollten, warum es transplantierten Tumoren von einer Maus auf die andere nicht möglich war im neuen Organismus weiterzuwachsen und der transplantierte Tumor abgestoßen bzw. vernichtet wurde. Er fand dabei heraus, dass die Tumoresistenz in der Empfängermaus mit der Präsenz von spezifischen Antikörpern verbunden war, die bestimmte Antigene des gespendeten Transplantates binden konnten. Gorer nannte dieses Antigen „antigen II“ und fand dabei in Zusammenarbeit mit George Snell heraus, dass das Antigen auf einem bestimmten Genlocus exprimiert wurde, den sie als H2 (histocompatibility 2) benannten.

Dies begründete die intensive Forschung nach neuen Erkenntnissen des bislang noch unbekannt adaptiven Immunsystems. Viele weitere bahnbrechende Publikationen, in welchen eine Theorie durch die nächste wieder abgelöst wurde, begründeten schlussendlich das heutige Verständnis über das MHC-System und die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems (BCR, TCR). (W.Mak 2006, 248-250)

Der MHC ist bei Menschen auch unter HLA bekannt und ist ein multilokulärer, polymorpher Gencluster am humanen Chromosom 6, der für die Expressierung der MHC-Proteine verantwortlich ist, die auf allen humanen Zellen zu finden sind. Er ist nach heutiger Erkenntnis ausschließlich bei Vertebraten zu finden, wenn auch in unterschiedlicher Art und Weise. (W.Mak 2006, 248-255)

#### 2.1.1 HLA-GENLOCUS

Die für den HLA-Komplex notwendigen Gene befinden sich mit Ausnahme des MHC-I beteiligten  $\beta$ 2-Mikroglobulins, dessen Gene sich am Chromosom 15 befinden, am humanen Chromosom 6. Die Region umfasst etwa 3500 kb und enthält viele Gengruppen die für die jeweiligen MHC-I bzw. MHC-II Proteine kodieren. Gene die für die MHC-I  $\alpha$ -Kette kodieren werden unter HLA-A, HLA-B und HLA-C zusammengefasst.

Gene für MHC-II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten kodieren in der HLA-DP, HLA-DQ, und HLA-DR Region am Chromosom 6. Multiple Gene in der DM- und DO Region sowie einzelne Gene auf der HLA-E, HLA-F und HLA-G Region kodieren für die nicht-klassischen MHC-Ib und MHC-IIb Proteine. Es gibt auch einen s.g. MHC-III-Genlocus der ebenso am Chromosom 6 liegt und für Komplement- und Heat-Shock-Proteine sowie TNF und LT kodiert. (W.Mak 2006, 255)

Für jedes dieser MHC-Loci gibt es zwei verschiedene Allele, jeweils eines am maternalen und eines am paternalen Chromosom. (W.Mak 2006, 257)

## MULTIPLIZITÄT UND POLYMORPHISMUS AM MHC-LOCUS

Normalerweise kodiert ein funktionelles Gen für ein Protein, das eine spezifische Funktion ausführt. Während der Evolution hat sich durch verschiedene Mechanismen (Genduplikation etc.) am MHC-Locus eine Multiplizität eingestellt, was soviel heißt wie, dass es mehrere Genloci im Genom gibt, welche jeweils für ein MHC-I bzw. MHC-II Polypeptid kodieren, diese Peptide jedoch funktionell unterschiedlich sind. (W.Mak 2006, 272)

Je nach synthetisierter  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette werden die Genabschnitte mit Suffixen belegt, die über die produzierten Polypeptide Auskunft geben. DP-A kodiert z.B. für eine  $\alpha$ -Kette in der DP-Region, wobei DP-B für eine  $\beta$ -Kette derselben Region kodiert. Normalerweise werden MHC-II Proteine aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten derselben Region zusammengesetzt, was so viel heißt wie, dass eine Kombination aus z.B. DP-A und DQ-B sehr selten vorkommt. (W.Mak 2006, 255-257)

Die meisten aller Proteine die von Vertebraten synthetisiert werden sind monomorph (>90%), was so viel bedeutet, als dass bei über 90% der Individuen einer Spezies die gleiche Nukleotidsequenz am gleichen Genlocus vorkommt, die schlussendlich für das Peptid kodiert. (W.Mak 2006, 256)

MHC-Loci sind jedoch eine der polymorphesten Strukturen im Genom von Vertebraten, d.h. es gibt in einer Population für einen Genlocus einige verschiedene Allele, die sich nur leicht in der Nukleotidsequenz unterscheiden, aber schlussendlich ein funktionell identisches Protein hervorrufen. (W.Mak 2006, 256)

Im menschlichen Genom gibt es für das HLA-A Gen mehr als 290, für das HLA-B Gen über 550 und für das HLA-C Gen über 140 verschiedene Allele. (W.Mak 2006, 256)

Zwei verschiedenen Individuen exprimieren daher wahrscheinlich geringgradig verschiedene MHC-I Proteine die sich nur in wenigen Aminosäuresequenzen unterscheiden werden. (W.Mak 2006, 257)

Der Fakt, dass die MHC-Gene unabhängig voneinander bzw. co-dominant exprimiert werden, erhöht die Vielfalt an Endprodukten noch weiter. Das heißt so viel, als dass Gene sowohl auf dem maternalen als auch auf dem paternalen Chromosom exprimiert werden können, die für HLA-A-, HLA-B-, HLA-C- $\alpha$ -Ketten sowie auch für HLA-DP-, HLA-DQ- und HLA-DR- $\alpha$ / $\beta$ -Ketten kodieren. Beispielhaft ist somit festzustellen, dass für das HLA-DP Molekül 2 verschiedene  $\alpha$ - und 2 verschiedene  $\beta$ -Ketten exprimiert werden können, was insgesamt 4 verschiedene Heterodimere kombinatorisch möglich macht. (W.Mak 2006, 257)

Diese Vielfalt kann sich am Beispiel von HLA-DR sogar erhöhen, da es auf diesem Locus mehr als nur ein DR-B-Gen gibt. (W.Mak 2006, 257)

Durch die Kombination aus Multiplizität, Polymorphismus und unabhängigen bzw. co-dominanten Expressionsmustern entsteht eine enorme Vielfalt an HLA-Proteinen innerhalb einer Population. Diese enorme Variabilität ist wahrscheinlich eine evolutionäre Sicherung

einer Population. Auch bei einem noch so pathogenen Erreger bzw. einer drastischen Neumutation ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass zumindest ein Teil der Population eine Immunantwort auf das Pathogen initiieren kann, was zum Überleben der Spezies führen würde. (W.Mak 2006, 272-273)

### ALLOREAKTIVITÄT

Durch diese Tatsache kann ein MHC-Allel eines Individuums einer Population von einem anderen Individuum als „fremd“ erkannt werden, was zu einer alloreaktiven Immunantwort führen würde. Im Gegensatz dazu tritt bei syngeneten Individuen – wie z.B. eineiigen Zwillingen – keine Immunantwort auf. Genau dieser Fakt ist im Bezug auf eine potentielle Spenderin bzw. einen potentiellen Spender bei STZ-Transplantationen von besonderer Bedeutung und maßgebend für die Intensität der GvHD verantwortlich. (W.Mak 2006, 273)

## 2.2 MHC-PROTEINE

Die MHC Klasse I und Klasse II Proteine sind in ihrer tertiären Struktur gleich. Sie sind beide heterodimere, transmembranöse Komplexe, die eine extrazelluläre, N-terminale Peptidbindungsstelle beinhalten. Zusätzlich bestehen sie aus Ig-like extrazellulären Regionen, einem hydrophoben transmembranen Teil und einer relativ kurzen C-terminalen cytoplasmatischen Endung. Die Bindung zwischen MHC-Molekül und Peptid verfügt über eine relativ schwache Affinität. (W.Mak 2006, 260)

### 2.2.1 MHC-I

MHC-I Proteine werden von allen kernhaltigen Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert. Dabei verfügt jede Zelle normalerweise über eine gemischte MHC-I Population, die aus den verschiedenen MHC-I Genen (HLA-A, HLA-B, HLA-C) resultiert, wobei bis zu 250.000 MHC-I Proteine jedes Gens auf der Zelloberfläche auftreten können. Die Peptide die an das MHC-Protein gebunden sind werden im Zellinneren durch Proteindegradation synthetisiert und zusammen mit dem HLA-Komplex an die Zelloberfläche transportiert. Die Aufgabe des MHC ist es nicht zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden, sondern die Peptidfragmente an der Zelloberfläche zu präsentieren. Die Entscheidung, ob das Peptid ein Produkt aus eigenem oder fremdem Genom ist, wird über die Bindung des TCR der CD8-exprimierenden Lymphozyten gefällt. (W.Mak 2006, 260)

## STRUKTURELLER AUFBAU DES MHC-I

Eine große  $\alpha$ -Kette und eine kleine  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Kette ( $\beta$ 2m) bilden den MHC-I-Komplex, wobei die  $\beta$ 2m-Kette dabei nicht kovalent an das distale Ende der  $\alpha$ -Kette bindet. Die  $\alpha$ -Kette

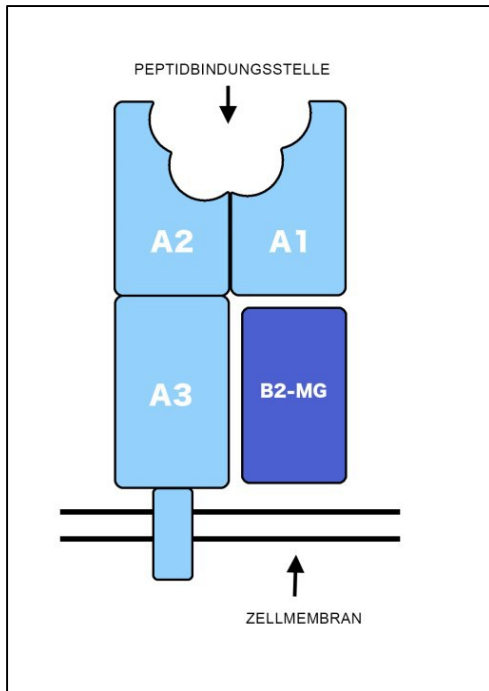


Abbildung 3: MHC-I Komplex, Die Peptidbindungsstelle wird durch die  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 Untereinheit der  $\alpha$ -Kette gebildet, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Michael Schinagl, Graz, Österreich

besteht aus 350 Aminosäuren, die von 3 extrazellulären, globulären Domänen mit je ca. 90 Aminosäuren gebildet wird. Die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne bilden dabei am N-terminalen Ende die Peptidbindungsstelle, die  $\alpha$ 3-Domäne bindet hingegen nicht kovalent an die  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Kette und bildet die Ig-like Region – siehe Abbildung 3 (W.Mak 2006, 260-261).

Die  $\alpha$ 3-Kette bildet dabei ebenfalls den transmembranen Teil, der aus etwa 40 Aminosäuren besteht, und den cytoplasmatischen Schwanz mit den restlichen 30 Aminosäuren.  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 2m- und  $\alpha$ 3-Domäne tragen eine interne Disulfidbrücke die das Molekül 3-dimensional stabilisiert, wogegen die  $\alpha$ 1-Domäne ohne eine solche Verbindung auskommt. Die  $\alpha$ 3- und  $\beta$ 2m-Domänen verfügen über Disulfidverbindungen die sich in der eigenen Domäne

ausbilden. Zusätzlich gibt es zwischen  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne eine stickstoffgebundene Oligosaccharidkette. (W.Mak 2006, 261) Die meisten Polymorphismen kommen auf der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne vor, wobei die  $\alpha$ 3-Domäne hingegen wenig polymorph ist und auch die Bindungsstelle für den CD8-Korezeptor der T-Lymphozyten bildet. Das  $\beta$ 2m-Protein besteht aus 99 Aminosäuren und wurde aufgrund seiner Löslichkeit als Serumglobulin im Urin identifiziert. (W.Mak 2006, 261)

Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Domänen weist das Protein unter Menschen keinen Polymorphismus auf und kann als Prototyp der Ig-Superfamilie bezeichnet werden. Die  $\beta$ 2m-Domäne hat weder Kontakt zur Zellmembran, noch ist sie über eine Peptidbindung mit der  $\alpha$ -Domäne verbunden, sie stabilisiert vielmehr selbst und zusammen mit der  $\alpha$ 3-Domäne den gesamten Komplex. Dabei bilden  $\beta$ 2m- und  $\alpha$ 3-Domäne - die als antiparallele  $\beta$ -Faltblätter zueinander angeordnet sind - eine immunglobulinähnliche Faltstruktur aus. (W.Mak 2006, 261)

## PEPTIDBINDUNG IM MHC-I

HLA-I-Komplexe können nur sehr kleine Peptidfragmente in ihrem Spalt aufnehmen. (W.Mak 2006, 261-262) Antigene müssen daher vor der Präsentation im Zellinneren zu Peptidfragmenten prozessiert werden, um in der kleinen Peptidbindungstasche des HLA-I-

Komplexes Platz zu haben. Die Bindungstasche des MHC-I ist groß genug für 8-10 Aminosäuren, wobei dabei die Enden des Peptids verankert werden und der Mittelteil nach oben hin ausgedellt wird. (W.Mak 2006, 261-262)

Den Boden der Bindungstasche erzeugen 8 antiparallel verlaufende  $\beta$ -Faltblätter, die von der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne stammen. Die Seitenwände der Bindungstasche werden jeweils aus einer  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-stammenden parallel verlaufenden  $\alpha$ -Helix erzeugt. Durch den Boden der Bindungstasche kann die  $\beta$ 2m-Domäne die Bindungsaffinität zum Peptid erhöhen. (W.Mak 2006, 261-262) Der Komplex hat also mit der Peptidbindung die höchste Stabilität eingenommen. Die Affinität vom TCR zum Peptid bzw. MHC hängt vom Ausmaß des Hervortretens des Peptids aus der Bindungstasche des MHC-I ab, wobei Peptide, die größer als 10 Aminosäuren sind zwar schwerer vom MHC-I gebunden werden, aber eine stärkere Bindung mit dem TCR herstellen können. (W.Mak 2006, 261-262)

Durch die unterschiedlichen Bindungstaschengrößen der HLA-I Subtypen (-A/-B/-C) und der unterschiedlichen Allele eines MHC-I Gens kann trotz der Größenlimitation eine sehr hohe Variabilität im Bezug auf die Peptidpräsentation für den TCR erreicht werden. Wasserstoffbrücken und eine Reihe anionischer Verbindungen sowie eine geringgradig mögliche Konformationsänderung des HLA-I-Komplexes stellen weitere Mechanismen dar, um das Peptid passend in der Bindungstasche fixieren und präsentieren zu können. (T. W. Murphy 2012, 166)

### 2.2.2 MHC-II

Die Expression von MHC-II ist um einiges restriktiver als die des MHC-I und so sind es nur primär professionelle APCs wie Makrophagen, dendritische Zellen und naive B-Zellen, die den Komplex an ihrer Oberfläche ausbilden. (W.Mak 2006, 262)

Peptide, die sich in der Bindungstasche des MHC-II befinden, werden von CD4-tragenden T-Zellen (T-Helferzellen) erkannt, welche so aktiviert werden können. Diese Peptide sind aber im Gegensatz zu den von MHC-I-Komplexen präsentierten Peptiden exogenen Ursprungs und werden normalerweise über Phagozytose durch die APCs aufgenommen und im Zellinneren abgebaut. (W.Mak 2006, 262)

## STRUKTURELLER AUFBAU DES MHC-II

Der MHC-II besteht aus einer  $\alpha$ -Kette, die nicht kovalent mit einer  $\beta$ -Kette verbunden ist. Beide bestehen jeweils aus einem N-terminalen Teil, einer extrazellulären Ig-like Region, einer hydrophoben, transmembranen Region und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanzteil – siehe Abbildung 4 (W.Mak 2006, 263). Die  $\alpha$ -Kette kann in eine  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ - Domäne unterteilt werden. Die N-terminale  $\alpha 1$ -Kette ist wiederum der polymorphe Teil des Komplexes und macht

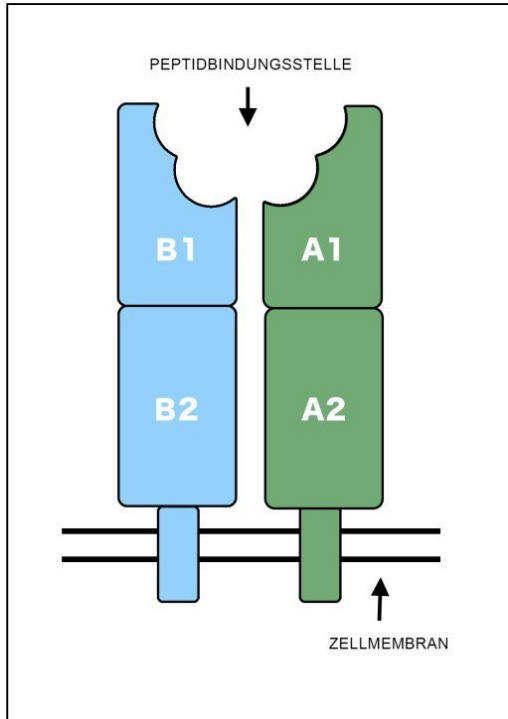


Abbildung 4: MHC-II Komplex, Die Peptidbindungsstelle wird durch die  $\alpha 1$  und  $\beta 1$  Untereinheiten gebildet, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Michael Schinagl, Graz, Österreich

mit einer Länge von ca. 90 Aminosäuren die halbe Peptid-Bindungsstelle aus. Die  $\alpha 2$ -Domäne ist auch ca. 90 Aminosäuren lang und wird durch eine interne Disulfidbrücke kugelförmig ausgestülpt. (W.Mak 2006, 263) Wie beim MHC-I Komplex weist dieser Anteil eine immunglobulin-ähnliche Faltungsstruktur auf, ist jedoch nicht Teil der Peptid-Bindungsstelle. Beide Domänen weisen eine N-terminal gebundene Oligosaccharidkette auf. (W.Mak 2006, 263) Die  $\beta$ -Kette wird ebenfalls in eine  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Domäne unterteilt, wobei die  $\beta 1$ -Domäne mit wiederum einer Länge von 90 Aminosäuren die andere Hälfte der Peptidbindungsstelle formt. Im Gegensatz zur  $\alpha 1$ -Kette wird sie aber durch eine interne Disulfidbrücke stabilisiert und trägt im Gegensatz zur  $\beta 2$ -Domäne ein N-gebundenes Oligosaccharid. (W.Mak 2006, 263) Die durch eine interne Disulfidbrücke immunglobulin-ähnlich konformierte  $\beta 2$ -Domäne

formt die Bindungsstelle für den CD4 Co-Rezeptor. (W.Mak 2006, 263) Im Gegensatz zum MHC-I Molekül sind beide Domänen des MHC-II Moleküls transmembranös verankert, wobei die dreidimensionale Struktur von  $\alpha 2$ - und  $\beta 2$ -Kette des MHC-II Moleküls stark der Struktur von  $\alpha 3$ - und  $\beta 2m$ -Kette des MHC-I Moleküls ähnelt. (W.Mak 2006, 263)

## PEPTIDBINDUNG IM MHC-II

Die MHC-II Peptidbindungstasche ist der des MHC-I sehr ähnlich, wobei beim MHC-II-Komplex die Bindungstasche aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne geformt wird. Ein gravierender Unterschied besteht jedoch in der spaltbildenden Struktur. Im Gegensatz zur im MHC-I-Komplex geschlossenen Bindungstasche ist sie am MHC-II geöffnet, kann somit viel längere Peptide - bis ca. 30 Aminosäuren - binden und ist somit für die Peptidpräsentation leichter zugänglich. (W.Mak 2006, 263) In der Regel sind präsentierte Peptide zwischen 13 und 18 Aminosäuren lang. (W.Mak 2006, 263) Die Bindung zwischen der Aminostrangstruktur und

den MHC-II Seitenketten wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert und dadurch in der Bindungstasche zwischen kommunizierenden Teilen des MHC-II-Komplexes und Peptidteilen eine polyprolin-ähnliche Sekundärstruktur ausgebildet. (W.Mak 2006, 263) Dadurch weist der MHC-II Komplex eine geringere Variabilität in Bezug auf mögliche verschiedene Peptidfragmente, die gebunden werden können, auf, ist aber im Gegensatz zum MHC-I Komplex aufgrund der offenen Bindungstasche nicht auf eine gewisse Struktur der Ankeraminosäuren angewiesen, um diese im Komplex festhalten und präsentieren zu können. (W.Mak 2006, 263) Verschiedene MHC-II Gene und MHC-II Allele bilden unterschiedliche Bindungstaschen und Wandstrukturen der Tasche aus, welche wiederum verschiedene Spezifitäten für die zu präsentierenden Peptidketten aufweisen. (W.Mak 2006, 263) Die polymorphen Anteile befinden sich wie beim MHC-I-Komplex auch beim MHC-II-Komplex im Bereich der Bindungstasche und betreffen deshalb die  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1- Domäne. Die Antigenpezifität des Peptides wird durch die aus der Bindungstasche nach oben zum TCR hinausstehenden Peptidseitenketten gewährleistet. (W.Mak 2006, 263)

### 2.2.3 NICHT KLASSISCHE HLA-MOLEKÜLE

#### HLA-IB

Dazu gehören HLA-X, -E, -J, -G, -F und HFE (auch HLH-H). Sie werden auch als nicht klassische MHC-I Produkte bezeichnet. (W.Mak 2006, 268) Ihre genaue Funktion ist relativ unklar. Die Gene haben die gleiche Struktur wie andere MHC-I Gene, ihnen fehlt aber der Polymorphismus. (W.Mak 2006, 268) Einige dieser HLA-Ib Produkte werden zusammen mit der  $\beta$ 2m-Domäne auf der Zelloberfläche exprimiert und könnten an der Antigenpräsentation beteiligt sein, wobei die meisten Sequenzen am HLA-Ib-Genlocus wohl eher nicht funktionelle Pseudogene darstellen. (W.Mak 2006, 268)

#### HLA IIb

Sind Gene in der DO bzw. DM Region des HLA-Genlocus, die für Polypeptide kodieren, die den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des klassischen MHC-II-Komplexes sehr ähnlich sind. (W.Mak 2006, 268) Sie bilden ebenso wie der MHC-II-Komplex Heterodimere, tragen aber keinen Polymorphismus und werden generell nicht auf der Zelloberfläche exprimiert. Sie sind nur indirekt in der Antigenpräsentation beteiligt. (34) (W.Mak 2006, 268-269)

#### HLA III

Zwischen HLA-I und HLA-II Genlocus liegen Gene der HLA-III Region, die eine wichtige immunologische Rolle spielen. Auf diesem Locus kodieren vor allem Komplementproteine und inflammatorische Proteine (TNF- $\alpha$ , LTA, LTB etc.). (W.Mak 2006, 269)

## 3 STAMMZELLTRANSPLANTATION

### 3.1 STAMMZELLEN

Die wichtigsten Eigenschaften von Stammzellen lassen sich in folgende 3 unterteilen (R. Lüllmann-Rauch 2012, 88):

- sie besitzen die Fähigkeit sich selbst zu reproduzieren, d.h. einen lebenslangen Vorrat an STZ aufrecht zu erhalten
- sie unterlaufen einen Zellzyklus, der sehr langsam von statten geht (seltene Teilung)
- STZ besitzen wenige Differenzierungsmerkmale und können deshalb als niedrig differenzierte Progenitorzellen bezeichnet werden

Stammzellen teilen sich asymmetrisch, was so viel heißt, dass bei der Teilung einer STZ zwei ungleiche Tochterzellen hervorgehen. Dabei bleibt eine Tochterzelle im STZ-Vorrat vorhanden und behält die Eigenschaften der Mutterzelle bei. Die zweite Tochterzelle entwickelt sich zur Progenitorzelle (Vorläuferzelle). Aus dieser Progenitorzelle entsteht später eine Population aus Transit-Amplifizierungszellen (TAZs), jedoch verliert diese Tochterzelle die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Die TAZs durchlaufen einige Teilungszyklen, stellen an einem gewissen Punkt ihre Mitose ein und differenzieren sich. (35) (Lüllmann-Rauch 2012, 88) Man kann Stammzellen generell nach Hierarchien und ihrer Fähigkeit, sich in verschiedene Gewebetypen differenzieren zu können, einteilen (Lüllmann-Rauch 2012, 88):

- totipotente STZ: ist die STZ bis zum 8-Zell Stadium des Embryos. Sie kann sich in alle Gewebetypen einschließlich der Plazenta differenzieren (Entoderm, Ektoderm, Mesoderm)
- pluripotente STZ: im frühen Embryo. Aus ihr können alle Gewebetypen ausschließlich der Plazenta entstehen
- multipotente STZ: im postnatalen Organismus. Aus ihr können viele verschiedene – aber bei Weitem nicht alle – Gewebe- und Zelltypen eines Keimblattes entstehen (Bsp: mesenchymale STZ, hämatopoietische STZ...)
- oligopotente/unipotente STZ: diese STZ können sich nur in wenige Zelltypen bzw. nur einen Zelltyp differenzieren

Stammzellen kommen im adulten Organismus hauptsächlich im KM vor und bilden dabei eine relativ kleine Zellpopulation. Die Entscheidung, ob eine STZ sich bei Teilung für den Pfad der Selbsterneuerung oder den Pfad der Differenzierung entscheidet bzw. welchen Differenzierungsweg diese einschlägt, ist ein stochastisches Ereignis. Die hoch integrierten Prozesse, die zu dieser Entscheidung beitragen, unterstehen verschiedenen Mechanismen

welche in intrazelluläre (Protoonkogene, Tumorsuppressorgene, Transkriptionsfaktoren, regulatorische Moleküle des Zellzyklus) und extrazelluläre (regulatorische Moleküle, Mikroumgebung) unterteilt werden können. (36) Regulatorische Moleküle können in positive (hämatopoietische Wachstumsfaktoren – z.B. G-CSF) und negative (Interferone, TGF- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ ) Faktoren unterteilt werden, die in einem komplexen Zusammenspiel miteinander agieren. Als Mikroumgebungseinflüsse verstehen sich direkte Zell-Zell-Interaktionen, Interaktionen mit Molekülen der Extrazellulärmatrix und Interaktionen mit löslichen Wachstumsfaktoren. (36)

### 3.2 DIE HÄMATOPOIETISCHE STAMMZELLE

Die Hämatopoese bezeichnet die Bildung der verschiedenen Zelltypen des Blutes. (E.-J. Speckmann 2013, 321) Im heranreifenden Fetus beginnt diese in den mesenchymalen Blutinseln und dem Dottersack. Sie erreicht dort bereits im ersten Fetalmonat das Maximum. Kurz danach wird die Hämatopoese von der fetalen Leber und Milz übernommen, wo sie im 5ten Fetalmonat das Maximum erreicht. Zu dieser Zeit erfolgte bereits allmählich die Verlagerung der Blutzellproduktion ins KM. Nach der Geburt finden sich die Vorläuferzellen von roten und weißen Blutzellen nur noch im roten KM, das beim Erwachsenen etwa 1,7l ausmacht und ca.  $10^6$ - $10^7$  hämatopoietische Stammzellen enthält. (E.-J. Speckmann 2013, 321) Aus den sogenannten Colony Forming Units (CFUs) entstehen durch Differenzierung und Proliferation die Zellen der hämatopoetischen Reihe – Erythrozyten (E), Granulozyten (G), Monozyten (M), Megakaryozyten (M) und Lymphozyten (L) – siehe Abbildung 5.

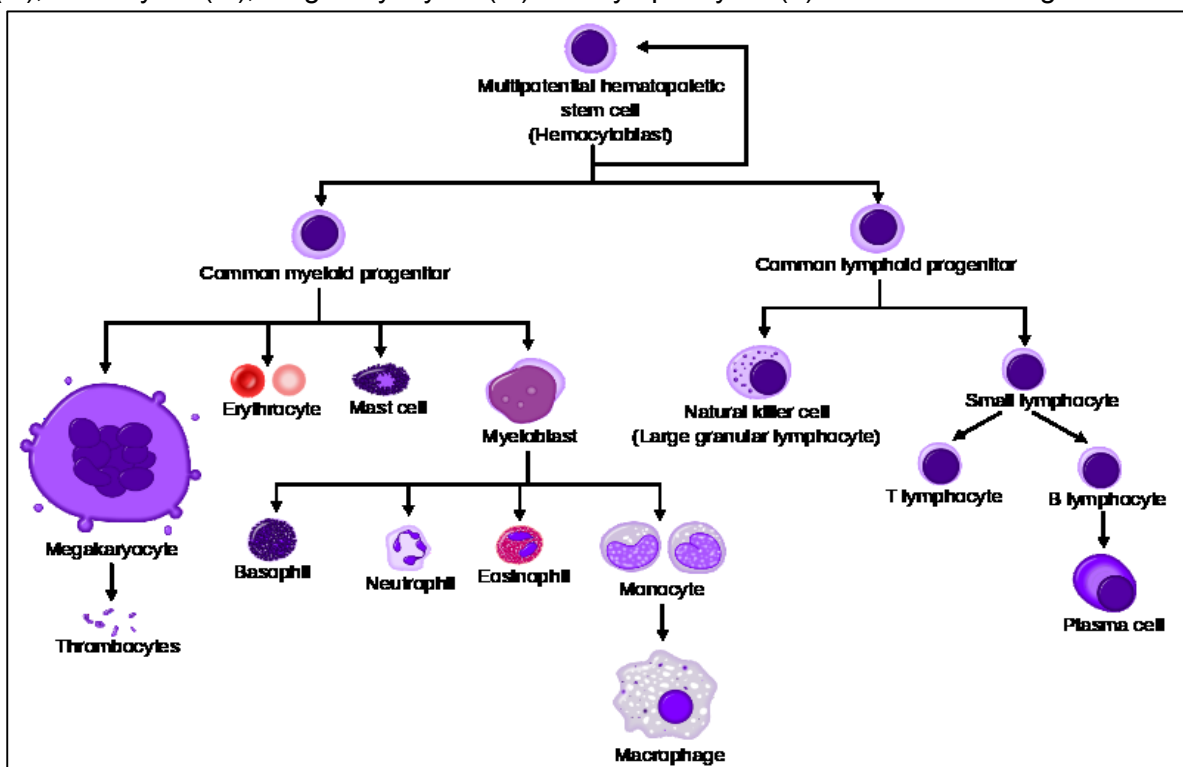


Abbildung 5: Hämatopoese, Quelle: Mikael Häggström: GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>), via Wikimedia Commons

Die entsprechenden Vorläuferzellen werden als CFU-E, CFU-GM, CFU-M usw. bezeichnet.

Die übergeordnete Vorläuferzelle, aus der sich alle spezifischen CFUs entwickeln können, wird als CFU-GEMML (oder auch nur GEMML) bezeichnet, weil sich aus ihr die verschiedenen spezifischen CFUs entwickeln können (zelltypenspezifisch anhand des Suffixes) (E.-J. Speckmann 2013, 321).

Die Hämatopoese lässt sich weiters grob in 2 Reihen einteilen: die myeloische und die lymphatische Reihe. Aus der myeloischen Reihe mit der Vorläuferzelle CFU-GEMM entstehen Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten. Aus der lymphatischen Reihe entstehen über die lymphatische Vorläuferzelle, die sich aus der CFU-GEMML entwickelt, über verschiedene Zwischenstufen reife B-Zellen, T-Zellen, NK -Zellen und dendritische Zellen. Schematisch ist dies in Abbildung 5 dargestellt. (E.-J. Speckmann 2013, 321-323)

So genannte Colony Stimulating Factors (CSF) sind für die Proliferation und Differenzierung von myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen zu deren Zell-Endprodukten verantwortlich. Sie sind kleine parakrine Peptide die unter anderem aus Makrophagen im KM freigesetzt werden und lokal auf die Vorläuferzellen wirken. Ebenso haben IL-2, IL-5 und klassische Hormone (Katecholamine, Steroidhormone – Stimulation durch Androgene, Hemmung durch Östrogene, Schilddrüsenhormone, Wachstumshormone) einen großen Einfluss auf die Hämatopoese. (E.-J. Speckmann 2013, 321-323)

### 3.3 DIE HAPLOIDENTE HÄMATOPOIETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION

Die erste erfolgreiche HLA-matched KM-Transplantation wurde in den 60er Jahren im Zuge von primären Immunodefizienzsyndromen durchgeführt. (37) Aus diesen Erfahrungen heraus und der Idee, dass auch haploidenten Spenderinnen und Spender nach Entfernung von Spender-T-Zellen, die eventuell eine mögliche Alloreaktivität im Sinne einer GvHD hervorrufen, für Immunodefizienzsyndrome als kurative Therapie zur Verfügung stehen könnten, wurden in den 1980er Jahren erste haploidente Transplantationen bei SCID und Wiskott-Aldrich Syndromen durchgeführt. (38,39) Die Hauptprobleme am Anfang der HFD HSCT bestanden in der hohen Rate an schweren (oft hyperakuten) GvHDs und Graftabstoßungen. (40) Desweiteren wurden hohe frühe Mortalitätsraten durch Multiorganversagen beobachtet, oftmals verursacht durch eine inflammatorische Zytokinantwort zum Engraftmentzeitpunkt, als auch durch eine hohe Rate an opportunistischen Infektionen. (40) Eine retrospektive Analyse die 1985 von Beatty et al. publiziert wurde, zeigte, dass Patientinnen und Patienten die ein HLA-2- bzw. HLA-3-Antigen-mismatched Transplantat erhielten, viel schlechtere Outcomes hatten, als jene, die nur ein HLA-1-Antigen-mismatched Transplantat erhielten – in dieser Gruppe waren die Überlebensraten vergleichbar mit einer HLA-matched related donor Transplantation. (41) Dies unterstrich das hohe Risiko von Transplantationen mit einem HLA-mismatch > 1. (41)

Diese Probleme waren die immunologische Konsequenz, die HLA-Barriere überwinden zu wollen und führten aufgrund der schlechten Outcomes dazu, dass sich nur wenige Zentren weltweit mit der HFD HSCT weiter beschäftigten und die Fortschritte auf dem Gebiet der HFD HSCT nur zögerlich waren. (42) Durch die ersten Versuche der T-Zell-Depletion bei HLA-identen Spenderinnen und Spendern konnte die Rate an GvHD verringert werden, jedoch zu Gunsten einer größeren Wahrscheinlichkeit der Graftabstoßung, eines möglicherweise kleineren GvL-Effekts, höherer Rezidivrate und größerer Inzidenz an Infektionen. (43)

Reisner et al. haben mit der megadose-CD34+ HFD HSCT gezeigt, dass die HLA-Inkompatibilität bei HFD HSCT durch die hohe Anzahl an Stammzellen durchbrochen werden kann und ein stabiles Engraftment auftritt. (44) Aversa et al. haben ebenso mit der Verwendung von Hochdosis-CD34+-Grafts an Patientinnen und Patienten, die eine myeloablative Konditionierung erhielten, die Machbarkeit einer HFD HSCT mit stabilem Engraftment aufgezeigt. (45-47) Die mittlere Zahl an CD34+-Zellen im Graft sollte dabei über  $10 \times 10^6$  Zellen/kgKG und die Zahl an CD3+ weniger als  $5 \times 10^4$  Zellen/kgKG sein. (48) Eine profundere T-Zell-Depletion war nötig, wenn ATG nicht im Konditionierungsregimen beinhaltet war. (49) Bei pädiatrischen Patientinnen und Patienten wurde gezeigt, dass eine größere Anzahl an CD34+-Zellen/kgKG in einer schnelleren Immunrekonstitution resultierte. (50) In den letzten Jahren wurde ein großer Aufwand betrieben um die Hauptprobleme der HFD HSCT umgehen zu können (51):

- die HLA-Barriere für ein stabiles Engraftment zu überwinden
- eine GvHD mit der T-Zell-Depletion in-vitro und/oder in-vivo zu verhindern
- die durch die intensiven hoch-toxischen Konditionierungsregimen langsame Immunrekonstitution und hohe TRM nach HFD HSCT zu reduzieren

Durch Fortschritte auf dem Gebiet der GvHD-Prävention haben sich die Outcomes nach HFD HSCT weiter verbessert und es konnten somit neue Strategien entwickelt werden. (52-57) Diese Strategien, welche sich in den letzten Jahren etabliert haben, beinhalten nach neuen weniger toxischen Konditionierungsregimen (RIC) auch ex-vivo T-Zell-Depletion des Grafts, in-vivo T-Zell-Depletion mit ATG und Alemtuzumab, energische pharmakologische GvHD-Prophylaxe, potentere antivirale und antimykotische Medika, DLI, adaptiver zellulärer Immuntherapie, KIR-Ligand-Mismatch und Vielem mehr. (42) Durch diese Fortschritte hat sich die HFD HSCT als attraktive Option für eine alternative Spende etabliert und sich wieder in den Blickpunkt der Forschungsarbeiten gestellt.

### 3.4 DIE SUCHE NACH ALTERNATIVEN RESSOURCEN

Da für nur ca. 25% aller Kinder, die eine STZ benötigen würden, HLA-identische Geschwister zur Verfügung stehen (58), haben sich in den letzten Jahrzehnten verschiedene alternative Ressourcen durchgesetzt.

Diese Alternativen beschränken sich in der Regel auf:

- nicht-verwandte freiwillige Spenderinnen und Spender, bei denen eine HLA-Kompatibilität besteht – URD HSCT
- haploidente Spenderinnen und Spender in der Familie – HFD HSCT
- nicht-verwandte Nabelschnurblut-Spenderinnen und -Spender – URD UCBT

Die potentielle Verwendung dieser alternativen Ressourcen ermöglicht es heutzutage für annähernd jedes Kind, eine Spenderin bzw. einen Spender zu finden. (58)

#### 3.4.1 VOR- UND NACHTEILE ALTERNATIVER RESSOURCEN

##### **URD HSCT-UNRELATED VOLUNTEER DONOR HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

Diese Option der alternativen Ressource hat in den letzten Jahren wohl die meiste klinische Erfahrung und Anwendung genossen. Über 40 Jahren wurden Tausende Kinder mit lebensbedrohlichen Erkrankungen einer URD HSCT erfolgreich unterzogen. (59) Die Ergebnisse der Anfangsjahre waren denen von HLA-identischen Geschwister-Spenderinnen und -Spendern vor allem aufgrund von hohen Raten eines non-Engraftments und von GvHD signifikant unterlegen. (60) Die neuesten Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die Wahl eines URD mittlerweile der der – wenn verfügbar – Geschwister-Spenderin bzw. der des Geschwister-Spenders nicht mehr unterlegen ist. Dies wird vor allem mit den verbesserten HLA-Typisierungsmethoden, den verbesserten Konditionierungstherapien und der besseren klinischen Nachbetreuung erklärt. (61) Der größte Vorteil einer Transplantation mittels URD HSCT ist vor allem die große klinische Expertise, die Transplantationszentren durch die Erfahrungen der letzten Jahrzehnte mit dieser Ressourcenwahl gewonnen haben. Weitere wichtige Vorteile betreffen die reproduzierbare Qualität des verwendeten Stammzellprodukts, ein geringes Risiko für die Spenderin bzw. den Spender während der Spende, die Möglichkeit einer erneuten Stammzellspende bzw. DLI bei graft failure und sinkendem Chimärismus sowie Rezidiv. (58)

Die Nachteile der Spende mittels URD HSCT beziehen sich vor allem auf die Wahrscheinlichkeit der Verfügbarkeit einer passenden Spenderin bzw. eines passenden Spenders und der Zeit, die nötig ist, um ein passendes Allograft zu gewinnen (Spenderinnen-

bzw. Spenderidentifizierung über internationale Datenbanken, Kontaktaufnahme, Entnahme, Übermittlung...). (58)

Die Verfügbarkeit einer Spenderin bzw. eines Spenders wird vor allem durch die Ethnizität der Patientinnen und Patienten bestimmt und liegt für Kaukasierinnen und Kaukasier bei ca. 50-60% und für bestimmte ethnische Gruppen bei ca. 10% und weniger. (42,62,63) Zwischen 1988 und 2007 wurden für 1586 österreichische Patientinnen und Patienten internationale Suchanfragen für MUDs getätigt. Man konnte aus einer Querschnittsanalyse dieser Zahlen erkennen, dass die Wahrscheinlichkeit eines verfügbaren MUDs zwischen 1988 bis 1995 bei 53,4%, zwischen 1996 und 2003 bei 71,3% und zwischen 2004 und 2007 bei 76,7% lag und somit ständig zunahm. Auch die Zeit für die Identifizierung eines geeigneten MUDs konnte von anfangs 7,7 Monaten auf 1,7 Monate für den Zeitraum zwischen 2004 und 2007 gesenkt werden. Die höchste Wahrscheinlichkeit eine passende Spenderin bzw. einen passenden Spender zu finden, hatten Patientinnen und Patienten, die einen häufigen HLA-Typ aufwiesen. Die wichtigsten Faktoren für eine Transplantation nach Identifizierung einer Spenderin bzw. eines Spenders waren Herkunft der Patientin bzw. des Patienten und Zeitraum zwischen Diagnose und Start der Spenderinnen- bzw. Spendersuche, wobei die Wahrscheinlichkeit einer Transplantation höher war, wenn die Suche zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte. (64) Weitere Probleme bei der Gewinnung eines Allografts stellen auch die medizinische Qualifikation und eine eventuelle Willensänderung der potentiellen Spender dar. (58) Durch die Verwendung des high-resolution-HLA-typings können sehr eng gematchte Spenderinnen und Spender gefunden werden und das klinische Outcome dadurch gesteigert werden. (61) Leider sinkt dabei auch die Wahrscheinlichkeit der Verfügbarkeit einer passenden Spenderin bzw. eines passenden Spenders. In letzter Zeit wurde deshalb vor allem in den USA versucht, die Transplantationsregister im Bezug auf selten vertretene ethnische Gruppen zu erweitern, um diesem Problem entgegenzusteuern. (65) Der Zeitraum zwischen Beginn der Spenderinnen- und Spendersuche und Entnahme von Stammzellen beträgt zur Zeit etwa 4 Monate (60,66) oder länger (67).

Für einige Patientinnen und Patienten mit malignen Grunderkrankungen stellt dieser Zeitraum eine zu lange Wartezeit dar, da sie an ihrer Grunderkrankung sterben bzw. rückfällig werden könnten (68,69) bzw. könnten Patientinnen und Patienten mit nicht-malignen Grunderkrankungen Komplikationen entwickeln, die sich ungünstig auf den Transplantationserfolg auswirken. (70,71) Die höchste Limitation einer Spende mittels URD HSCT stellt wohl die große Anzahl an GvHD, welche hauptverantwortlich für die Morbidität und Mortalität nach URD HSCT ist, dar. Die Verwendung von T-depleted Grafts kann die Anzahl an GvHD verringern, jedoch geht dies mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des non-Engraftments (72) und Rezidivs (73) einher, was keinen Gesamtüberlebensvorteil im Vergleich mit der non-T-depleted Spende bringt. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass die

Verwendung von streng gematchten URDs und eine Optimierung im Hinblick auf Prophylaxe (Infektion...) das Auftreten von akuter GVHD (74) und den Outcome verbessern können. (61) Die GVHD stellt vor allem im nicht-malignen Setting, in dem kein GvM-Effekt für ein besseres Gesamtüberleben gebraucht wird, eine noch immer große Herausforderung dar. Insgesamt ist die URD HSCT aber noch immer die erste Wahl, wenn keine geeigneten HLA-identen Geschwister als Spenderinnen bzw. Spender zur Verfügung stehen und keine Dringlichkeit der Spende besteht. Die Limitationen der URD HSCT haben dazu geführt, alternative Methoden für die Spende zu finden – vor allem dann, wenn nicht genug Zeit zur Verfügung steht und keine passende Spenderin bzw. kein passender Spender gefunden werden kann, wie es etwa bei ethnisch wenig repräsentierten Gruppen oft der Fall ist. (58)

#### **HFD HSCT – HAPLOIDENTICAL FAMILY DONOR HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

Die Verwendung der haploidenten Ressource hat vor allem durch die in den letzten 20 Jahren immensen klinischen Fortschritte im pädiatrisch onkologischen Setting einen hohen Stellenwert. (51,75,76) Das größte Problem einer haploidenten Spenderin bzw. eines haploidenten Spenders stellt dabei die HLA-Barriere dar, welche sich vor allem in den Anfangstagen der haploidenten Transplantation im Rahmen von GVHD und non-Engraftment zeigte. (40,41,77)

Durch die Entfernung von alloreaktiven T-Zellen aus dem Graft ist die Inzidenz der GVHD mittlerweile derjenigen nach matched URD HSCT ähnlich. (78-81) Die Rate an non-Engraftment konnte durch die Entwicklung neuer Konditionierungstherapien und durch die Verwendung von G-CSF-stimulierten mobilisierten PBSC (81) deutlich verringert werden. Sie wird mit einem primären Engraftment bei über 90% der Patientinnen und Patienten beschrieben. (54,78,82)

Durch diese - im Vergleich zu den Anfängen der haploidenten Transplantation - deutliche Verringerung an GVHD und non-Engraftment, konnten jüngst ermutigende Resultate im Bezug auf DFS bei ausgewählten malignen und nicht-malignen Erkrankungen gezeigt werden. (75,80,83-86) Aufgrund des regen Forschungsinteresses bezüglich einer weniger toxischen Konditionierungstherapie (RIC) konnte in den letzten Jahren herausgefunden werden, dass auch ohne myeloablative Konditionierung und trotz Überschreiten der HLA-Barriere ein primäres Engraftment unter Verwendung bestimmter Immunsuppressiva erreicht werden kann, was zu einer beschleunigten Immunrekonstitution und einer Verringerung des post-transplant Immunodefizienzintervalls geführt hat, wobei eine tolerable Inzidenz an akuter GVHD aufgetreten ist. (87-89)

Der Vorteil der RIC besteht darin, dass auch Kinder und Erwachsene mit signifikanten Co-Morbiditäten, welche eine hochtoxische myeloablative Konditionierung nicht überstehen würden, Zugang zu einer STZ bekommen können. (58) Für nicht maligne Grunderkrankungen

besteht der Vorteil darin, dass eine Transplantation erleichtert werden kann, da kein anti-Tumor Effekt der myeloablativen Konditionierung notwendig ist. (58)

Desweiteren kann nach RIC HFD HSCT auch eine post-transplant Immunotherapie im Sinne eines STZ-Boost und daraus resultierendem höheren GvM-Effekt erzielt werden, was vor allem für Chemotherapie-refraktäre maligne Grunderkrankungen einen Überlebensvorteil bringen kann. (52,89,90) Insgesamt können die Vorteile einer HFD HSCT damit beschrieben werden, dass fast alle Kinder sofort eine geeignete Spenderin bzw. einen geeigneten Spender zur Verfügung haben, ein Engraftment mit einer nur kurzen neutropenischen Episode schnell eintritt und die Spenderin bzw. der Spender im Falle von non-Engraftment, fallendem Chimärismus und Rezidiv für eine weitere Transplantation wieder zur Verfügung steht. (58) Der limitierende Faktor der HFD HSCT besteht in der langsamen Immunrekonstitution mit erhöhtem Rezidivrisiko und höherer Wahrscheinlichkeit an einer opportunistischen Infektion zu erkranken. (54,91)

Deshalb ist im haploidenten Setting eine genaue Überwachung bezüglich Infektionen und eine vorzeitige Behandlung dieser unverzichtbar. (92) In letzter Zeit sind einige Arbeiten publiziert worden, die sich insbesondere mit dem Thema der präemptiven anti-infektiösen Therapie beschäftigen. Die Verabreichung von spezifischen anti-viralen bzw. anti-mykotischen T-Zellen (v.A. anti-CMV und anti-Aspergillus CD4+ Zellen) (92,93), die Gabe von allo-depleted Spenderinnen- bzw. Spender-Lymphozyten (94) und die Injektion von immunmodulierenden MSCs zur Steigerung des primären Engraftments (95,96) stehen dabei im aktuellen Forschungsinteresse. Durch eine beschleunigte Immunrekonstitution nach HFD HSCT und neuen anti-infektiösen Therapievarianten könnte diese alternative Ressource der STZ somit noch viel breiter zum klinischen Einsatz kommen. (58)

#### **URD UCBT – UNRELATED DONOR UMBILICAL CORD BLOOD TRANSFUSION**

Durch die ersten Erfolge nach related donor UCBT (97,98) wurden Nabelschnurblut-Banken errichtet um auch eine Plattform für die URD UCBT zu schaffen. (99-101) Bis heute wurden über 10000 UCBTs durchgeführt. Nabelschnurblut zeigt im Vergleich zu adulten hämatopoietischen STZ einzigartige Charakteristiken, die sich vor allem in schlechtem Engraftment, längerer Neutropeniezeit und vor allem einer geringeren Rate und Ausprägung an akuter und chronischer GHVD zeigen. (58) Durch vor allem Letztere ist es möglich eine weniger strenge HLA-Übereinstimmung durchzuführen, wobei die Rezidivwahrscheinlichkeit und die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit nach UCBT denen der URD HSCT gleichzustellen sind. (102-104)

Der bestimmende Parameter im Bezug auf Engraftment (105-107), EFS/overall survival (105,106) und TRM (106) ist die transplantierte Zellzahl – entweder TNC-Zahl (105,107) oder CD34+ Zellmenge (106). Es scheint dabei eine bestimmte Schwelle von ca.  $2-3 \times 10^7$

TNC/kgKG bzw.  $2 \times 10^5$  CD34+/kgKG zu geben, die bei Überschreitung mit einem zufriedenstellenden klinischen Outcome korreliert. (105-107) Der HLA-Match selbst ist ebenso ein entscheidender Faktor für das Outcome. Mit Zunahme an Mismatches steigt die Inzidenz an non-Engraftment (105,106), TRM (105) und es sinkt die Gesamtüberlebenschance.(106)

Es ist außerdem gezeigt worden, dass mit einer Zunahme der Zelldosis an transfundierten Zellen den negativen Auswirkungen des HLA-Mismatch entgegengesteuert werden kann, obgleich sie nicht zur Gänze beseitigt werden können.(108) Die großen Vorteile der UCBT bestehen in der schnellen Verfügbarkeit von Spenderinnen- und Spenderzellen (66), keinem Risiko für die Spenderin bzw. den Spender, keiner klinischen Auswirkung für die Spenderin bzw. den Spender, der Möglichkeit bestimmte unterrepräsentierte ethnische Minderheiten über den Spenderinnen- und Spenderpool besser abdecken zu können und einem nachgewiesenen GvM-Effekt. (58)

Die großen Nachteile der UCBT zeigen sich im schlechten Engraftment mit langem Neutropenieintervall nach Transplantation und der notwendig hohen Zellzahl. Um dem entgegenzuwirken wurde versucht die Zellzahl mittels Co-Infusion von haploidenten CD34+ selektierten PBSCs (109) bzw. ex-vivo expandierten Nabelschnurblutzellen (110) zu steigern und das Homing mittels direkter intraossärer Injektion von Nabelschnurzellen (111,112) zu verbessern. Eine Multicenter-Studie aus Japan hat gezeigt, dass das 5 Jahres-DFS nach single myeloablativer UCBT bei Patientinnen und Patienten mit akuter Leukämie auf 60-70% gesteigert werden konnte. (113,114) Diese Erfolge haben in Japan dazu geführt, dass die UCBT als primäre alternative Ressource sogar der fully matched URD BMT vorgezogen wird. Die kleine Patientinnen- und Patientenzahl, die genetische Homogenität der Population und die Patientinnen- und Patientenauswahlkriterien könnten allerdings zum Erfolg dieser Studien beigetragen haben. Es sind in letzter Zeit sehr viele neue Arbeiten auf dem Gebiet der UCBT publiziert worden, die sich vor allem mit verschiedenen Konditionierungstherapien (single myeloablative UCBT, single RIC UCBT, double myeloablative UCBT, double RIC UCBT) und verfeinerten Selektionierungskriterien (auf das nicht-vererbte maternale Allel gematchte UCBTs haben die gleiche Überlebenschance wie Patientinnen und Patienten nach fully matched UCBT (115,116)) beschäftigt haben. Barker et al. haben gezeigt, dass die Co-Infusion von zwei verschiedenen UCB-Units aus 2 verschiedenen Spenderinnen bzw. Spendern unter Berücksichtigung einer gewissen HLA-Kompatibilität möglich ist, um eine Zellzahl zu erreichen die für ein Engraftment ausreichend ist (117,118)

Die Rate an Grad II-IV akuter GvHD ist jedoch bei der Verwendung von 2 UCB-Units höher als bei der Verwendung einer einzigen. (119) Die Frage, ob dies tatsächlich eine höhere Alloreaktivität und größeren GvM-Effekt mit sich bringt und ob die Verwendung von 2 UCB-Units im pädiatrischen Setting möglich ist, liegt momentan im Interesse der aktuellen

Forschungsarbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit würde es aber zu weit gehen, diese Thematik genauer zu erläutern.

### 3.5 DIE WAHL DER RESSOURCE

Da nur 30% aller Patientinnen und Patienten einen matched-sibling-donor zur Verfügung haben, ist klar, dass in vielen Fällen alternative Ressourcen in Anspruch genommen werden müssen, um den Bedarf einer HSCT gerecht zu werden. (42) Tabelle 1 soll einen zusammenfassenden Überblick über die einzelnen Vor- und Nachteile der alternativen STZ-Ressourcen geben.

Durch die zur Verfügung stehenden Alternativen ist es in fast jedem Fall möglich, eine passenden Spenderin bzw. einen passenden Spender für die STZ zu finden. Die Entscheidung, welche Form bzw. Ressource der STZ zur Anwendung kommen soll hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab (58):

- Dringlichkeit der Spende
- Wahrscheinlichkeit eine passende Spenderin bzw. einen passenden Spender zu finden (Donorpool)
- Dauer bis zur Akquirierung des Grafts
- Risiko für die Spenderin bzw. den Spender
- Grunderkrankung der Patientin bzw. des Patienten
- Qualität des Stammzellgrafts (Variabilität)
- Engraftmentkinetik
- Graftabstoßung
- GvHD Risiko
- Dynamik der Immunrekonstitution
- GvM/GvL Effekt
- Risiko der Infizierung der Empfängerin bzw. des Empfängers durch den Graft (virale Infektionen...)
- Risiko der Übertragung kongenitaler Erkrankungen (UCBT)
- Konditionierungstherapie (RIC, MAC, keine Konditionierung)
- T-Zell Depletion
- mögliche alternative Therapien
- Kosten

Da bei einer HFD HSCT eine geeignete Spenderin bzw. ein geeigneter Spender in über 90% der Fällen sofort zur Verfügung steht, ist sie Mittel der Wahl bei sehr dringlichen Spenden, wenn es keine HLA-identen Geschwister gibt. Die Risiken für die Spenderin bzw. den Spender sind bei der UCBT nicht vorhanden, bei der HFD HSCT und URD BMT relativ gering. Für eine

eventuelle Re-Transplantation fällt die UCBT als Alternative weg, da sie nur einmal zur Verfügung steht. Die URD BMT bietet hingegen eine Möglichkeit für eine erneute Spende, jedoch ist dies mit einem relativ hohen Aufwand verbunden, wogegen eine Re-Transplantation bei der HFD HSCT relativ unkompliziert von statten gehen kann. Die Qualität und Zellzahl von einer Nabelschnurblutspende ist im Gegensatz zu den anderen beiden Alternativen variabel. (58)

Ein Engraftment tritt nach HFD HSCT am schnellsten ein, wogegen die Immunrekonstitution sehr langsam im Vergleich zur UCBT und URD BMT verläuft (58), was die hohe Rate an Infektionen und Rezidiven nach Transplantation zeigt. (54,91) Es ist aber erforscht worden, dass die Geschwindigkeit der Immunrekonstitution nach HFD HSCT unter Verwendung von CD3/19 selektierten Grafts (Negativselektion) in Kombination mit RIC gesteigert werden kann und eine TRM weniger oft auftritt. Der Grund hierfür scheint die Co-Transfusion von alloreaktiven NK-Zellen, Granulozytenvorstufen, Monozyten und einer größeren Anzahl an alloreaktiven T-Zellen durch die Negativselektion zu sein.(84)

	URD BMT	URD UCBT	CD34+ HAPLOIDENTICAL PBSC
<b>AVAILABLE POOL</b>	> 11 million	> 250.000	-
<b>LIKELIHOOD OF SUITABLE DONOR</b>	10/10 = 40%, ≥9/10 = 70%, ethnic minority = 20%	≥5/6 = 40%, ≥4/6 = 70%	>90%
<b>SPEED OF ACCESS</b>	3-4 months	2-3 weeks	immediate
<b>COST OF OBTAINING GRAFT</b>	high	high	low
<b>RISK TO DONOR</b>	low	none	low
<b>ABILITY TO RE-ARRANGE INFUSION DATE</b>	may be difficult	easy	easy
<b>RE-ACCESS</b>	possible	no	yes
<b>QUALITY OF PRODUCT</b>	assured	variable	assured
<b>SPEED OF ENGRAFTMENT</b>	moderate	slow	fast
<b>GRAFT REJECTION</b>	low	moderate	moderate
<b>GVHD RISK</b>	high	moderate	low
<b>SPEED OF IMMUNE RECONSTITUTION</b>	moderate	moderate	very slow
<b>SPEED TO GVL EFFECT</b>	moderate	moderate	very slow
<b>RISK OF VIRAL TRANSMISSION</b>	yes	no	yes
<b>RISK OF TRANSMISSION OF CONGENITAL DISEASES</b>	no	yes	no

*Tabelle 1: Vor- und Nachteile der alternativen STZ-Ressourcen aus Hough R, Cooper N, Veys P. Allogeneic haemopoietic stem cell transplantation in children: what alternative donor should we choose when no matched sibling is available? Br J Haematol 2009;147(5):593*

Die URD BMT hat ein sehr großes Risiko an einer GvHD zu erkranken (67), was zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führt (59) , bei der UCBT wird dieses Risiko als moderat und bei der HFD HSCT mit T-Zell Depletion als gering beschrieben, wobei die HFD HSCT mit T-Zell Depletion eine sehr langsame Immunrekonstitution aufweist. (58)

Die Kosten zur Graftakquirierung sind im Falle der UCBT (zwischen 20000 und 30000 US \$) (42) und auch URD BMT relativ hoch, wogegen die HFD HSCT mit geringen Kosten verbunden ist. (58)

### 3.6 GvM-EFFEKT

Einige Studien haben demonstriert, dass mittransplantierte allogene NK-Zellen fähig sind, eine verbesserte Tumorzelllyse hinsichtlich einiger bestimmter solider Tumorentitäten zu induzieren. (120) NK-Zell-mediierte, alloreaktive GLV-Effekte (121) haben gezeigt, dass durch die Verwendung von alloreaktiven donor-versus-receipient NK-Zellen die Rezidivrate bei leukämischen Krankheitsbildern und die Graftabstoßungsrate signifikant reduziert werden kann (29,120,122), jedoch eine erhöhte Inzidenz an vor allem akuter GvHD besteht. (122) Der Grad der NK-Zell Alloreaktivität scheint dabei stark mit der Anzahl von fehlenden inhibitorischen KIR-Rezeptor Liganden zu korrelieren (donor-receipient-inhibitory-mismatch) (123,124). Die Exprimierung aktivierender KIR-Rezeptoren durch allogenen NK-Zellen könnte dabei den Grad der alloreaktiven Komponente noch zusätzlich verstärken. (124) Diese alloreaktive NK-Zellantwort ist leider nur bis einige Monate nach HFD HSCT vorhanden. (125) Hypothetisch wird der zeitlich begrenzte Effekt mit der Exprimierung von inhibierenden KIR-Rezeptoren als Toleranzmechanismus des Empfängerinnen- bzw. Empfänger-HLA-Systems beschrieben. Desweiteren gibt es Hinweise auf einen GvM-Effekt für solide Tumoren nach allogener Stammzelltransplantation. (126) Diese Fälle betreffen vor allem Kinder mit metastasierten und rezidivierten, fortgeschrittenen malignen Erkrankungen – Ewing-Sarkom (127), Neuroblastom (120,128), Melanom (129), Hepatoblastom (130) und anderen Malignomen. Der KIR-mismatch könnte somit ein determinierender Faktor für den anti-Tumor-Effekt nach HFD-HSCT im pädiatrischen Setting sein. Diese These wird auch durch Fortschritte auf dem Gebiet der hämatologischen Erkrankungen sowohl im pädiatrischen Setting (AML, ALL) (131) seitens der Memphis-Gruppe, als auch im adulten Setting (AML) (29,132) von der Perugia-Gruppe unterstützt.

### 3.7 MYELOABLATIVE HFD HSCT (MAC) VS. NON-MYELOABLATIVE HFD HSCT (RIC) UND GRAFTSELEKTION

Durch die intensive myeloablative Konditionierung (MAC) mittels TBI und chemotherapeutischer Therapie wurde die Basis für das Engraftment eines neuen Immunsystems geschaffen, ohne dass dabei eine hohe Anzahl an Graftabstoßungen auftrat. (133) Die myeloablative Hochdosis-Konditionierung mit nachgehender CD34+ - Selektion war lange Standard in der HFD HSCT. (133) Trotz der geringen Rate an GvHD war sie mit einer hohen RRT, einem langsamen Engraftment und einer verspäteten Immunrekonstitution verbunden, was zu einer erhöhten TRM führte. (134)

Neuere Transplantationsmethoden, die eine reduzierte Intensität des Konditionierungsregime (RIC) zusammen mit einer CD3/CD19 Negativselektion des Grafts beinhalten, haben zu einer niedrigeren RRT und einem schnelleren Engraftment geführt. (134)

Die Graftkomposition nach CD3/19 Negativselektion beinhaltet nicht nur CD34+ STZ, sondern auch CD34- Progenitorzellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und anderen APCs. (134) Jüngst erschien auch eine Studie zu einer relativ neu entwickelten Negativselektion, die jener der CD3/19-Negativselektion sehr ähnlich ist, aber eine selektivere T-Lymphozyten-Entfernung aus dem Graft vornimmt – die  $\alpha/\beta$ /CD19-Depletion (135). Bei dieser Selektion werden möglich alloreaktive  $\alpha\beta$ -T-Zellen und B-Zellen aus dem Graft entfernt und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen, und andere Leukozyten im Graft belassen.  $\gamma\delta$ -T-Zellen stehen nicht im Verdacht an einer GvHD beteiligt zu sein, haben dem Anschein nach aber einen positiven Einfluss auf den GvM-Effekt und anti-infektiöse Eigenschaften. (136) Lang et al. haben in ihrer Studie zur  $\alpha/\beta$ /CD19-Negativselektion gezeigt, dass eine schnellere Immunrekonstitution durch diese neue Methode erzielt werden kann und durch die Co-Transfusion einer hohen Zahl an  $\gamma\delta$ -T-Zellen ( $11.0 \times 10^6/\text{kg}$ ) keine übermäßige Zunahme an GvHD Grad II-IV im Vergleich zu anderen Studien auftritt (135). Ob diese relativ neue Selektionsmethode die Rate an schweren Infektionen und TRM reduzieren kann, wird in einer laufenden, prospektiven Multicenterstudie evaluiert. Eine intensive Konditionierungstherapie (MAC) ist vor allem für bereits geschwächte Patientinnen und Patienten mit einer hohen Anzahl an Co-Morbiditäten ein Problem, sodass die TRM für diese Patientinnen und Patienten hoch ist. (133)

Basierend auf Maus-Modellen (137,138) wurden Studien zu non-myeloablativen Konditionierungstherapien durchgeführt, wobei eine Toxizitätsreduktion der Konditionierungstherapie und die Verhinderung einer GvHD durch in-vivo und ex-vivo T-Zell-Depletion angenommen wurde. (139) Dabei konnte herausgefunden werden, dass der induzierte, gemischte Chimärismus nach RIC (52,140) die Basis für eine DLI darstellen kann, welche im Mausmodell zu einem potenteren GvM-Effekt als nach DLI bei komplettem Chimärismus führte. (138) Verantwortlich dafür waren noch vorhandene APCs der Empfängerin bzw. des Empfängers, die einen GvL-Effekt förderten. (141) Die Gründe für den Einsatz eines RIC-Protokolls vor HFD HSCT können durch folgenden 3 Punkte am besten beschrieben werden:

- RIC korreliert mit geringerer transplant-related-toxicity und geringerer früher Mortalität, was es auch erlaubt älteren Patientinnen und Patienten mit signifikanten Co-Morbiditäten eine Transplantation anzubieten (142-145)
- durch verschiedene Mechanismen (weniger proinflammatorische Zytokinproduktion, Erhaltung von regulatorischen hämatopoietischen

Empfängerinnen- bzw. Empfängermechanismen etc.) werden RIC HFD HSCTs mit einer kleineren Inzidenz an GvHD assoziiert (146)

- es kann ein potenter GvM-Effekt nach DLI-induzierter Konvertierung von einem gemischten in einen vollen Chimärismus erzielt werden (137,144)

Die heute verwendeten Strategien für eine HFD HSCT können grob in folgende drei untergliedert werden (42):

- myeloablative Konditionierung mit ex-vivo T-Zell-Depletion (gewöhnlich CD34+ Positivselektion) – megadose HFD HSCT
- RIC mit ex-vivo und/oder in-vivo T-Zell-Depletion und post-transplant Pharmakoprophylaxe oder Cyclophosphamid
- myeloablative Konditionierung mit in-vivo T-Zell-Depletion und non-ex-vivo T-Zell-Depletion unter Verwendung von post-transplant GvHD-Pharmakoprophylaxe

### 3.8 T-ZELL DEPLETION

Da die hohe Anzahl an T-Zellen im Graft hauptverantwortlich für das Entstehen einer GvHD und TRM ist, wurde nach Strategien gesucht, um die Entstehung der GvHD zu verhindern. Aus dieser Motivation heraus entstand die T-Zell-Depletion als Anwendung in der HSCT. Es wurde gezeigt, dass die Inkludierung einer T-Zell-Depletion im Konditionierungsschema zu einer erhöhten Inzidenz von graft-failure, Rezidiv und einer verzögerten Immunrestitution mit erhöhtem Risiko von Infektionskomplikationen führt. (147)

Durch die Einführung spezifischer Verfahren zur T-Zell-Depletion – grob kann man diese in Positiv- (CD34+) und Negativselektionen (CD3, CD3/19) einteilen – konnte die Wahrscheinlichkeit von allogenen Immunreaktionen im Sinne einer GvHD deutlich gesenkt werden, jedoch zu Lasten von Graftversagen und Rezidivwahrscheinlichkeit. (43)

Drobyski et al. haben in einer Studie, welche das Outcome nach Transplantation von T-Zell-depletierten URD HLA-matched-, URD 1-antigen-mismatched- und HFD-HSCT KM verglich, gezeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede bezüglich Engraftmentraten und kumulativer Inzidenz von akuter und chronischer GvHD zwischen den einzelnen Gruppen gab. (147) Es bestand jedoch eine höhere kumulative 2-Jahres-Inzidenz nach T-Zell-depletierter HFD HSCT an einem Rezidiv zu erkranken. Die TRM war im Vergleich zur URD HLA-matched Spende bei der URD 1-antigen-mismatched Spende und HFD HSCT erhöht. Das Gesamtüberleben war bei der HLA-matched URD Spende signifikant höher als bei den beiden anderen Varianten. (147)

### 3.9 GvHD

Die GvHD bezeichnet ein Phänomen, bei welchem immunkompetente Zellen, die in einem Graft enthalten sind, eine Immunantwort in der graft-versus-host Richtung mit klinischer Ausprägung auslösen können. Der individuelle Fingerprint – das HLA-System – bzw. die Ungleichheit von Spenderinnen- bzw. Spender- und Empfängerinnen- bzw. Empfänger-HLA-System spielt dabei eine entscheidende Rolle. (148) Das GvHD-Phänomen wurde als erstes bei bestrahlten Mäusen, in welchen Splenozyten injiziert wurden, beobachtet (149). Desweiteren verstarben bestrahlte Mäuse nach Transplantation von allogenen KM trotz Erholung von Bestrahlungsschäden und KM-Aplasie an einem Syndrom bestehend aus Diarrhoe, Gewichtsverlust, Hautveränderungen und Leberabnormalitäten – ein Syndrom, das den Namen GvHD bekommen sollte (149). Billingham formulierte 1966 die notwendigen Voraussetzungen für das Entstehen einer GvHD (150):

- der Graft muss immunkompetente Zellen enthalten
- die Empfängerin bzw. der Empfänger muss Gewebsantigene exprimieren, die in der Spenderin bzw. im Spender nicht vorhanden sind
- die Empfängerin bzw. der Empfänger darf nicht in der Lage sein eine ausreichende Immunantwort zu entwickeln um transplantierte immunogene Zellen der Spenderin bzw. des Spenders zu zerstören

Gowans erkannte, dass diese immunkompetenten Zellen, die die GvHD verursachten, kleine Lymphozyten waren (151) und McGregor zeigte, dass diese Progenitorzellen dem KM abstammten (152). Heute ist klar, dass die verantwortlichen Lymphozyten reife T-Zellen sind, die ihren Ursprung im KM haben. (153) Die Inzidenz der GvHD hängt unter anderem vom Grad der Histoinkompatibilität, der Anzahl an T-Zellen im Graft, dem Patientinnen- und Patientenalter und der prophylaktischen Therapie ab. (154) Typische Manifestationsorte sind das Immunsystem, Haut, Leber, Gastrointestinaltrakt und Lunge. (155) Die akute GvHD tritt am Anfang vor allem cutan in Form juckender, makulopapulärer Exantheme – oft an Händen, Füßen und Ohren – auf, kann auf den ganzen Körper übergehen und die epidermal-dermale Grenze bis hin zur Desquamation hin überschreiten. Gastrointestinale Manifestationen und Lebermanifestationen treten oft später auf und sind selten das erste Symptom einer GvHD. Intestinale Symptome reichen über Anorexie, Nausea, Diarrhoe (oft blutig), abdominalen Schmerzen bis hin zum paralytischen Ileus. Die Lebermanifestation tritt klinisch in Form von Hyperbilirubinämien, erhöhter AP und erhöhten Aminotransferasewerten auf. In schweren Fällen kann ein Leberversagen mit Aszites bis hin zur hepatischen Enzephalopathie auftreten. Eine verzögerte Immunrestitution und eine Immunodefizienz bilden die immunologische Manifestation der GvHD. (148)

Die chronische GvHD kann einer akuten GvHD folgen, nach Abklingen einer akuten GvHD oder de-novo auftreten. (155) Die Hauptmanifestationsorgane der chronischen GvHD sind Haut (Dyspigmentation, neu aufgetretene Alopezie, Poikilodermie...), Nägel (Nageldystrophie), Mund (Xerostomie, Ulcerationen, Sklerose), Augen (trockene Augen, Sicca-Syndrom, Konjunktivitis), Muskeln, Faszien und Gelenke (Fascitis, Myositis, Gelenksbeschwerden), Genitale (Vaginasklerose, Ulcerationen), GI-Trakt (Anorexie, Gewichtsverlust, Ösophagusstrikturen...), Leber (Ikterus, Transaminasenerhöhung), Lungen (restriktive und obstruktive Störungen, Bronchiolitis obliterans, Pleuraerguss), Niere (nephrotisches Syndrom), Herz (Pericarditis) und KM (Thrombozytopenie, Anämie, Neutropenie). Die Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen GvHD sind das Patientenalter und eine vergangene akute GvHD. (156,157) Weiters korreliert die Inzidenz der GvHD auch mit der Intensität der T-Zell-Depletion. (158) Neueste Studien haben herausgefunden, dass eine KIR-Alloreaktivität nach HFD HSCT einen günstigen Einfluss auf die Rezidivrate hat, die Inzidenz der GvHD jedoch ansteigt. (122)

Oft verwendete Pharmaka zur Prävention einer GvHD sind unter anderem: ATG, Cyclosporin, MTX und MMF. (159)

Ji et al. haben gezeigt, dass die Inzidenz der akuten GvHD G II-IV unter Einbeziehung von Basiliximab (anti-CD25 AK) in ihre prophylaktische Standardtherapie mit ATG, Cyclosporin, MTX und MMF im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Basiliximab signifikant ( $p=0,046$ ) verringert werden konnte. (159) Ob dieses Resultat auch damit begründbar ist, dass G-CSF-mobilisiertes KM anstatt PBSC – welches oft eine vielfach höhere Anzahl an reifen T-Zellen beinhaltet (160) – verwendet wurde, muss in Diskussion bleiben. Ebenso wurde demonstriert, dass bei Verwendung eines non-inherited maternal Ag-mismatched sibling donors die Inzidenzen von akuter GvHD und TRM im Vergleich zur Verwendung eines maternalen, paternalen oder non-inherited paternal Ag-mismatched sibling donors am kleinsten sind. (161,162)

### 3.10 IMMUNSUVREILLANCE NACH HFD HSCT

Trotz Prophylaxe und präemptiver Therapie bleiben *Aspergillus fumigatus* und CMV die 2 Hauptursachen bezüglich Morbidität und Mortalität nach HFD HSCT. (163,164) Ein Grund hierfür ist auch, dass manifeste *Aspergillus*-Infektionen nicht hinreichend auf antimykotische Therapien ansprechen. (93,165) Weiters werden s.g. late-onset *Aspergillus*-Infektionen häufig auch dann beobachtet, wenn bereits eine Neutrophilenschwelle überschritten wurde, insbesondere dann wenn eine GvHD mit konsekutiver Immunsuppression auftritt. (165,166) Patientinnen und Patienten, die eine *Aspergillose* überlebt haben, zeigen eine signifikante antigenspezifische Proliferation von IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen. (167) CMV Seropositivität der Empfängerin bzw. des Empfängers ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung

einer manifesten CMV Infektion nach HFD HSCT. (93) Bis CMV-spezifische T-Zellen nach HFD HSCT in der Empfängerin bzw. im Empfänger detektierbar sind, vergehen einige Monate in denen CMV Infektionen oft fatale Pneumonien, Encephalitiden, und Enteritiden verursachen. Der CMV Virus selbst wirkt auf die Funktion dendritischer Zellen hemmend (168). Desweiteren verursachen antivirale Medikamente Leukopenien und T-Zell-Immunsuppression. (169) Die prophylaktische Behandlung nach haploidenter Transplantation umfasst die antivirale und antimykotische Therapie. Dabei kommen als antivirale Therapie vor allem Acyclovir und Gancyclovir nach gewissen Schemata bis zum Erreichen einer bestimmten CD4+-Zellzahl ( $\text{idR} > 200 \text{ CD4+}/\mu\text{l}$ ) und eine vom Autor abhängige antimykotische und antibiotische Prophylaxe zum Einsatz. (170) Andere Autoren verwenden als prophylaktische antivirale Therapie Acyclovir in Kombination mit Gancyclovir (prä-transplant) und Foscavir (post-transplant) bei CMV-Seropositivität, Ribavirin zur Adenovirusprophylaxe und Itraconazol/Voriconazol, Co-Trimoxazol, Metronidazol und Defibrotide (20mg/kg/d) als antibakterielle und antimykotische Therapie. (120)

Nach Bunjes et al. ist eines der Hauptrisiken nach haploidenter Transplantation die CMV-Reaktivierung bei seropositiven Empfängerinnen und Empfängern, welche von moderater bis hochgradiger CMV-Virämie reicht. (170) Bei 6 seropositiven Patientinnen und Patienten traten in 5 Fällen klinische CMV Manifestationen (CMV interstitielle Pneumonie (n=4), CMV Hepatitis (n=1)) auf. Zerebrale Aspergillose (n=1), Toxoplasmose (n=1) sowie chronische Sinusitiden (n=3) waren weitere beschriebene Infektionskomplikationen. (170) Den signifikantesten und wichtigsten Hauptrisikofaktor bzw. Prädiktor für Infektionen stellt die CD4+-Zellzahl dar, welche vor allem nach HFD HSCT durch die langsame Immunrekonstitution für ein Monitoring extrem wichtig ist. (171) Lang et al. führten in Ihrer Pilotstudie wöchentliches PCR-Screening auf CMV, Antigen detektion und PCR von Stuhlmaterial auf Adenovirus und bei positivem Ergebnis eine PCR von Vollblut auf Adenovirus durch. Die zusätzliche antivirale Therapie wurde bei Positivität auf CMV und Adenovirus durchgeführt. (120) In Studien zur HFD HSCT wurde festgestellt, dass die frühe Immunrekonstitution von NK-Zellen abhängt, die für die ersten Wochen nach Transplantation die bei weitem quantitativ größte Zellpopulation ausmachen. (124) Die Rolle der adaptiven Immunotherapie mit ex-vivo-expandierten Virus-spezifischen cytotoxischen Lymphozyten ist im Blickpunkt der klinischen Forschung. Die Infusion von allogenen CMV-spezifischen T-Zellklonen zur Prävention bzw. Behandlung einer CMV-Infektion hat vielversprechendes therapeutisches Potential gezeigt ohne dabei eine GvHD zu induzieren. (172-174) Der gleichen Strategie wurde auch im Bezug auf EBV-Infektionen mit vielversprechenden Resultaten nachgegangen. (175,176) Die virale Last (Adenovirus, CMV, EBV) im peripheren Blut nach CD3-depletierter (und in-vivo CD20-depletierter) HFD HSCT ist signifikant niedriger als bei CD34+ HFD HSCT (87) und kann dadurch zu einer Verringerung von tödlichen Infektionen führen. (88) Amrolia et al. zeigten,

dass eine adaptive Immuntherapie mittels allo-depleted Spenderinnen- bzw. Spender-T-Zellen die Immunrekonstitution nach HFD HSCT je nach infundierter Dosis an T-Zellen signifikant steigern kann und trotz größerer Zahl an T-Zellen eine akute und chronische GvHD relativ selten auftritt. (94) Die erhöhte Menge an T-Zellen kann dabei vor allem in den ersten Monaten nach HFD-HSCT aufgrund der langsamen Rekonstitution als anti-Infektionsprophylaxe dienen. (94)

### 3.11 DLI – DONOR LYMPHOCYTE INFUSION

Die DLI wurde als erstes an Patientinnen und Patienten mit rezidivierter CML durchgeführt. (177) Man fand heraus, dass DLIs für Patientinnen und Patienten mit rezidivierter CML nach allogener HSCT eine mögliche Option darstellen, um wieder eine Remissionsphase zu erlangen. (177-179) Die Wahrscheinlichkeit zur Erlangung einer Remission hängt dabei vom Krankheitsfortschritt ab und genau deshalb sollten Patientinnen und Patienten nach Transplantation einem cytogenetischen Monitoring (Chimärismusanalyse mittels SNP...) unterzogen werden, um vorzeitig mittels DLI einschreiten und ein Rezidiv verhindern zu können. (180) Für die DLI bei CML-Patientinnen und -Patienten besteht zwar wahrscheinlich die größte Erfahrung; sie kam aber auch für andere rezidivierende Grunderkrankungen – multiples Myelom, AML/ALL und Lymphome – schon erfolgreich zur Anwendung (181-184), wobei die Erfolge für diese Entitäten (vor allem ALL) eher ernüchternd waren und deshalb oft Chemotherapien zur Rezidivtherapie bevorzugt werden. (185) Bei Auftreten von autologen T-Zellen nach HFD HSCT kann eine DLI zusammen mit dem Absetzen der Immunsuppression einen gemischten Chimärismus wieder in einen kompletten Chimärismus des allogenen Systems überführen, wobei die verwendete Anzahl an T-Zellen für die DLI vom Autor abhängt. (120) Die Hauptkomplikationen nach DLI betreffen GvHD und Aplasie. Eine GvHD entwickelt sich dabei in etwa 50-60% aller Patientinnen und Patienten, die eine DLI erhalten. (186,187) Es scheint dabei keinen Zusammenhang zwischen der Grunderkrankung und der Entwicklung einer GvHD zu geben. Die Entwicklung einer GvHD als immunologische Antwort nach DLI korreliert desweiteren mit einem längeren DFS. (188) Die Entwicklung einer GvHD ist dosisabhängig, was zeigt, dass circa 50% der Patientinnen und Patienten eine GvHD entwickeln, wenn die Dosis an T-Zellen bei DLI höher als  $1 \times 10^8$  T-Zellen/kgKG ist und weniger als 10% der Patientinnen und Patienten eine GvHD entwickeln, wenn die T-Zellzahl weniger als  $1 \times 10^7$ /kgKG bei DLI beträgt. (185)

## 4 PATIENTINNEN/PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 PATIENTINNEN-/PATIENTENKOLLEKTIV

Es wurden die Daten von allen zum Zeitpunkt der Durchführung der Diplomarbeit überlebenden, seit dem Jahr 2004 an der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie am Universitätsklinikum Graz haploident transplantierten, pädiatrischen Patientinnen und Patienten analysiert. Die klinischen Daten wurden aus den Patientinnen- und Patientenakten während des Follow-up gewonnen und in bestimmten Zeitabständen digital übertragen. Insgesamt wurden 8 Patientinnen und Patienten in die Arbeit eingeschlossen, welche ein Durchschnittsalter von  $9,4 \pm 7,98$  Jahren bei Transplantation aufwiesen. Die jüngste Patientin bzw. der jüngste Patient bei HSCT war dabei 3,5 Monate, die älteste Patientin bzw. der älteste Patient 21,2 Jahre alt. Das Patientinnen- und Patientenkollektiv war trotz des sehr kleinen Datensatzes bezüglich Geschlecht homogen auf Mädchen (n=4) und Jungen (n=4) aufgeteilt. Die Grunderkrankungen bei HSCT lassen sich in ALL (n=3), ALPS (n=1), AML (n=1), Mb. Hodgkin (n=1), Neuroblastom (n=1) im Stadium IV und SCID (T-/B-/NK+) (n=1) unterteilen. Die Grunderkrankungen können weiters in Leukämien (n=4), Lymphome (n=1), angeborene Immunopathien (n=2) und solide Tumoren (n=1) eingeteilt werden. Davon können maligne (n=6) und benigne (n=2) Grunderkrankungen abgegrenzt werden. Die häufigste Grunderkrankungen war dabei ALL (n=3), wobei 2 Patientinnen bzw. Patienten an einem high risk ALL und eine Patientin bzw. eine Patient an einem ALL in der bereits 3ten Remissionsphase litten. Bei insgesamt 4 Patientinnen und Patienten wurde aufgrund von fallendem Chimärismus (n=2) und Graftversagen (n=1) ein Stammzellboost im Verlauf durchgeführt. Für eine Patientin bzw. einen Patienten gab es diesbezüglich keine Daten. Die für die haploidente Transplantation verwendeten Stammzellressourcen teilten sich in KM (n=2), PBSC (n=6) - welche durch Gabe von G-CSF zuerst mobilisiert wurden - auf. Die Konditionierung vor Transplantation erfolgte mit RIC (n=6) und MAC (n=2). Die verwendeten RIC-Regime bestanden vorzugsweise aus der Kombination Fludarabin/Thiotepa/Melphalan (n=2), wobei eine Patientin bzw. ein Patient zusätzlich OKT3 und eine andere Patientin bzw. ein anderer Patient zusätzlich Cytotec erhielten. Eine weitere Patientin bzw. ein weiterer Patient wurde unter der Kombination aus Fludarabin/Thiotepa/Treosulfan und ATG (n=1) konditioniert. Eine Patientin bzw. ein Patient unter RIC wurde nur mittels ATG konditioniert (n=1). Für zwei Patientinnen bzw. Patienten (n=2) gab es keine digitalen Aufzeichnungen. Eine Patientin bzw. ein Patient, der unter einem MAC-Regime konditioniert wurde, erhielt die Kombination aus Fludarabin/Thiotepa/Treosulfan und ATG (n=1). Für die zweite Patientin bzw. den zweiten Patienten, der unter einem MAC-Regime konditioniert wurde, gab es wiederum keine digitalen Aufzeichnungen (n=1). Die für die Transplantationen verwendeten Selektionen der Stammzellen teilten sich in CD3/CD19 depleted (n=3), CD34+ (n=3) und unmanipulierte Grafts (n=2) auf. Die mittlere Zahl an transplantierten CD34+ Zellen betrug  $14,5575 \times 10^6 \pm$

18,326503 x 10<sup>6</sup> pro kgKG, wobei für eine Patientin bzw. einen Patienten keine initialen Daten zur Verfügung standen. Diese enorm große Standardabweichung entsteht aufgrund sehr großer Differenzen der transplantierten Zellzahlen bei den unterschiedlichen Patientinnen und Patienten und unterschiedlichem Körpergewicht. Die erste HFD HSCT erfolgte am 03.05.2004 bei einer damals 3,5 Monate alten Patientin bzw. einem damals 3,5 Monate alten Patienten, die letzte HFD HSCT erfolgte am 27.09.2011 bei einer damals 6,9 Jahre alten Patientin bzw. einem damals 6,9 Jahre alten Patienten. Zur Veranschaulichung des Patientinnen- und Patientenkollektivs, der unterschiedlichen hämato-onkologischen bzw. soliden Grunderkrankungen sowie der Transplantationsdaten (Ressource, Selektion, Konditionierung, mittlere Zahl von CD 34+ /kgKG) soll Tabelle 2 dienen.

		n	hi (%)
Geschlecht	männlich	4	50
	weiblich	4	50
Differentialdiagnose	ALL	3	37,5
	ALPS	1	12,5
	AML	1	12,5
	Mb. Hodgkin	1	12,5
	NB	1	12,5
	SCID	1	12,5
STZ Ressource	KM	2	25
	PBSC	6	75
Konditionierung	MAC	2	25
	RIC	6	75
Selektion	CD 3/CD 19 depleted	3	37,5
	CD 34 +	3	37,5
	unmanipuliert	2	25

*Tabelle 2: Übersicht über das Patientenkollektiv mit absoluten und relativen Häufigkeiten*

Insgesamt sind für die Arbeit nur Daten von zum Zeitpunkt der Erstellung noch lebenden Patientinnen und Patienten verwendet worden, es werden aber im Auswertungsteil auch Bezüge zum gesamten haploident transplantierten Patientinnen- bzw. Patientenkollektiv aufgezeigt, welches bereits verstorbene Patientinnen und Patienten beinhaltet. Zur Erläuterung soll Tabelle 3 dieses näher beschreiben. Die Gruppe incl. verstorbener Patientinnen und Patienten beinhaltet insgesamt 16 Patientinnen bzw. Patienten welche ein Durchschnittsalter von 10,67 ± 7,1 Jahren bei Transplantation aufwiesen. Die jüngste Patientin bzw. der jüngste Patient bei Transplantation war dabei 3,5 Monate alt, die älteste Patientin bzw. der älteste Patient bei Transplantation 21,2 Jahre. Die Grunderkrankungen lassen sich dabei in ALL (n=4) - wobei 2 Patientinnen bzw. 2 Patienten an einem high risk ALL und eine Patientin bzw. ein Patient an einem ALL in der bereits 3ten Remmissionsphase litten -, ALPS (n=1), AML (n=3), Keimzelltumor (n=1), Mb. Hodgkin (n=1), Medulloblastom (n=1),

Neuroblastom (n=4) – alle im Stadium IV - und SCID (T-/B-/NK+) (n=1) unterteilen. Die Grunderkrankungen können in Leukämien (n=7), Mb. Hodgkin (n=1), solide Tumoren (n=6) und angeborene Immunopathien (n=2) eingeteilt werden. Davon können benigne (n=2) und maligne (n=14) Grunderkrankungen unterschieden werden. Insgesamt ist zu sagen, dass die zusätzlichen, breites verstorbenen Patientinnen und Patienten in diesem Kollektiv allesamt hochmaligne, teilweise mehrfach rezidierte und zum Teil sehr ausgeprägt metastasierte Grunderkrankungen aufwiesen, welche allesamt chemorefraktär waren. Die für die

		n	hi (%)
<b>Geschlecht</b>	männlich	8	50
	weiblich	8	50
<b>Grunderkrankungen</b>	ALL	4	25
	ALPS	1	6,3
	AML	3	18,8
	Keimzelltumor	1	6,3
	Mb. Hodgkin	1	6,3
	Medulloblastom	1	6,3
	Neuroblastom	4	25
SCID	1	6,3	
<b>STZ Ressource</b>	KM	2	12,5
	PBSC	14	87,5
<b>Konditionierung</b>	MAC	2	12,5
	RIC	13	81,3
	keine	1	6,3
<b>Selektion</b>	$\alpha/\beta/CD19$ depleted	7	43,8
	CD3/CD19 depleted	3	18,8
	CD34+	3	18,8
	unmanipuliert	3	18,8

*Tabella 3: Übersicht über das Patientenkollektiv incl. bereites verstorbener Patienten mit absoluten und relativen Häufigkeiten*

haploidente Transplantation verwendeten Stammzellressourcen dieses Kollektivs teilten sich in KM (n=2) und PBSC (n=14), welche durch Gabe von G-CSF zuerst mobilisiert wurden, auf. Die Konditionierung vor Transplantatoin erfolgte mit RIC (n=13) und MAC (n=2). Eine Patientin bzw. ein Patient erhielt keine Konditionierung (n=1). Die für die Transplantationen verwendeten Selektionsmethoden teilten sich in  $\alpha/\beta/CD19$  depleted (n=7), CD3/CD19 depleted (n=3), CD34+ (n=3) und unmanipulierte Grafts (n=3) auf. Die mittlere Zahl an transplantierten CD34+ Zellen betrug  $24,9815 \times 10^6 \pm 25,579 \times 10^6$  pro kgKG. Für diese Berechnung standen nur Werte von 13 Patientinnen und Patienten zur Verfügung, da bei 3 Patientinnen und Patienten keine initialen Aufzeichnungen über die transfundierte Menge an CD34+-Zellen vorhanden waren. Die enorm große Standardabweichung entsteht hierbei wiederum aus den sehr großen Differenzen von transplantierten Zellen bei den unterschiedlichen Patientinnen und Patienten und

unterschiedlichem Körpergewicht. Zwei Patientinnen bzw. Patienten aus diesem Kollektiv wurde insgesamt 2 mal haploident transplantiert und ein gesamter Follow-up erstellt, weshalb auch beide Transplantationen seperat in die Daten einbezogen wurden. Die erste HFD HSCT im Patientinnen- bzw. Patientenkollektiv mit einbezogenen verstorbenen Patientinnen und Patienten erfolgte am 03.05.2004 bei einer damals 3,5 Monate alten Patientin bzw. einem damals 3,5 Monate alten Patienten, die letzte HFD HSCT erfolgte am 10.07.2013 bei einer damals 8,8 Jahre alten Patientin bzw. einem damals 8,8 Jahre alten Patienten. Insgesamt bedeutet dies also, dass 14 verschiedene Patientinnen und Patienten eine HFD HSCT erhielten, 2 Patientinnen und Patienten davon jeweils 2 HFD HSCTs und insgesamt 6 Patientinnen und Patienten verstarben.

## 4.2 MATERIAL UND METHODEN

### 4.2.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

#### PRINZIP

Die Funktion der Durchflusszytometrie besteht darin, die verschiedensten Zellen im Blut zu quantifizieren. Dies erfolgt über die Beugungs- und Brechungseigenschaften von Zellen, die sie aufgrund ihrer natürlichen Architektur und Morphologie erhalten. Granulozyten streuen aufgrund ihrer intrazellulären Vesikel und rauhen Architektur Licht viel mehr als eher glatt konfigurierte Lymphozyten. Es wird zwischen forward scatter (Vorwärtsstreulicht) und side scatter (seitliches Streulicht) unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit dem Volumen einer Zelle und wird bei sehr flachen Einstrahlungswinkel gemessen. Das seitliche Streulicht korreliert hingegen mit der Granularität einer Zelle (Zellkernmorphologie, Vesikel...) und wird in einem Winkel von 90 Grad zur Zelle gemessen. Durch diese 2 Parameter kann schon eine grobe Einteilung und Quantifizierung der Blutbestandteile erfolgen. Um eine genauere Klassifizierung der Zellreihen durchführen zu können, bedient man sich der Tatsache, dass bestimmte Zelltypen auf ihrer Oberfläche bestimmte Oberflächenantigene exprimieren, welche durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper markiert werden können. Durch die zusätzliche Farbkomponente des gestreuten Lichts können somit die Zellen sehr genau klassifiziert und quantifiziert werden.

#### DURCHFÜHRUNG

Nach 12minütiger Erythrozytenlyse mit einem Ammoniumchlorid-Puffer (pH 7,3) werden die Zellen 10 min mit 1.300 rpm zentrifugiert und das Zellpellet nach Dekantieren des Überstandes einmal mit PBS (Gibco) gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes wird die Zellzahl mit PBS/10% Schafserum (Gibco) auf ca.  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt und unspezifische Bindungen 15 min auf Eis blockiert. Die 20minütige Inkubation der Zellen mit Antikörpern wird im Kühlschrank durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind anti-mouse IgG, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8,

anti-CD14, anti-CD19, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD45RA, anti-CD56, anti-TCR  $\alpha,\beta$ , anti-TCR  $\gamma,\delta$  gekoppelt mit den Farbstoffen FITC, PE, ECD, PC5, PC7 (Beckman) und anti-CD62L FITC (BD). Nach Ablauf der Inkubationszeit werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 1 ml HUGO (PBS/0,1% Natrium-Azid, BSA) entfernt und das Zellpellet in 200  $\mu$ l HUGO resuspendiert. Zur Intrazellulärfärbung mit anti-Ki-67 PE (BD) werden die Zellen nach der Extrazellulärfärbung 15 min mit Reagenz 1 des IntraPrep™ Leucocytic Permeabilization Reagent Kits (Beckman) fixiert, 5 min mit 300 x g zentrifugiert, mit Reagenz 2 desselben Kits 5 min permeabilisiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur und dunkel mit dem Antikörper inkubiert. Nach Waschen mit 1 ml PBS und Zentrifugation für 5 min mit 300 x g werden die Zellen in 200  $\mu$ l 1X IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter) resuspendiert und müssen innerhalb von 2 Stunden gemessen werden. Die durchflusszytometrische Messung erfolgt am FC500 (Beckman Coulter). Die Auswertung mit der Software CxP.

#### 4.2.2 SNP CHIMÄRISMUSANALYSE AUS WBC

##### PRINZIP

Die SNP Analyse hat die Aufgabe, bestimmte kurze DNA Abschnitte (Oligonucleotide) zu analysieren und aufzuzeigen, ob die analysierte DNA vom ein und dem selben Organismus stammte oder nicht. Dabei werden bestimmte Sequenzen im menschlichen Genom genauer betrachtet. Genetische Analysen haben gezeigt, dass genau diese Sequenzen oft dazu tendieren, an einzelnen Basen eine Mutation aufzuweisen. Durch die Amplifikation dieser Sequenzen mit konventionellen Primern und rtPCR kann die Menge an vervielfältigter DNA gemessen werden. Im Falle der Chimärismusanalyse heißt das so viel, dass vor der HSCT sowohl Spenderin bzw. Spender, als auch Empfängerin bzw. Empfänger auf eine bestimmte Menge an SNPs untersucht werden, um Genabschnitte zu detektieren, an denen sich Spenderin bzw. Spender und Empfängerin bzw. Empfänger durch einzelne Mutationen unterscheiden. Wird beispielsweise mit einem Primer A nur die Spenderinnen- bzw. Spender-DNA amplifiziert, nicht aber die Empfängerinnen- bzw. Empfänger-DNA, heißt das, dass Spenderin bzw. Spender und Empfängerin bzw. Empfänger für diesen Genlocus heterogen sind und ein SNP vorliegt. Da nicht nur ein einzelner Genabschnitt sondern eine Vielzahl an Genloci auf diese SNPs getestet werden, ist es möglich im Vorhinein ein SNP-Profil von Spenderin bzw. Spender und Empfängerin bzw. Empfänger anzulegen. Dadurch kann nach HFD HSCT nach Vorhandensein von Empfängerinnen- bzw. Empfänger-DNA, die für z.B. einen T-Zell-Oberflächenmarker kodiert, gesucht werden und berechnet werden, wie groß der vorhandene allogene Anteil an Immunzellen nach Transplantation ist. Dies ist besonders für die Frage nach einer möglichen Graftabstoßung und für das Monitoring der hämatologischen

Grunderkrankung enorm wichtig. (189) Tabellen 4 und 5 sollen eine Übersicht über die verwendeten DNA-Abschnitte zur Detektion der SNPs geben.

### DNA EXTRAKTION

DNA wird aus Peripherblut bzw. Knochenmark mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) lt. Herstellervorschrift extrahiert. Dabei wird das Probenmaterial mit Proteinase und einem Lysepuffer bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Nach DNA-Fällung mit absolutem Ethanol wird die Probe auf eine Säule aufgetragen, zweimal gewaschen und mit einem Elutionspuffer aus der Säule gelöst.

### KONZENTRATIONSMESSUNG

Die Probe wird nach Extraktion 1:10 mit Aqua dest. (Promega) verdünnt und mit dem Biophotometer plus (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} \times 50 \times 10/1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Die Ratio ( $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ ) soll für DNA zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

### REAL TIME PCR SNP

Nach Verdünnung der DNA auf 50ng/μl erfolgt der PCR-Ansatz in der Laminar Air Flow. Je SNP bzw. Gapdh werden eine Negativkontrolle, eine Empfängerinnen- bzw. Empfänger-Kalibrator-DNA, eine Spenderinnen- bzw. Spender-Kalibrator-DNA und die Probe im Doppelansatz pipettiert. Eingesetzt werden 600nM Forward-Primer, 600nM Reverse-Primer und 200nM FAM-TAMRA-Sonde (Ingenetix), 1X LightCycler 480 Probesmaster (Roche) und 250 ng DNA. Nach einer 10 minütigen Denaturierung bei 95°C folgen 50 Zyklen mit 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 45 Sekunden. PCR und Analyse werden am LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt.

### BERECHNUNG

Die Berechnung der Ergebnisse wird mit MS-Excel durchgeführt. Es werden die Ct-Werte herangezogen (Threshold-Cycle):

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{\text{Sample}} &= Ct_{\text{SNP d. Probe}} - Ct_{\text{GAPDH d. Probe}} \\ \Delta Ct_{\text{Calibrator}} &= Ct_{\text{SNP d. Kalibrators}} - Ct_{\text{GAPDH d. Kalibrators}} \\ \Delta \Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{Calibrator}} - \Delta Ct_{\text{Sample}} \\ \text{SNP in \%} &= 2^{-\Delta \Delta Ct} * 100\end{aligned}$$

Name	5' - 3'
<i>S1a F</i>	GGT ACC GGG TCT CCA CAT GA
<i>S1b F</i>	GTA CCG GGT CTC CAC CAG G
<i>S1 R</i>	GGG AAA GTC ACT CAC CCA AGG
<i>S3 F</i>	CTT TTG CTT TCT GTT TCT TAA GGG C
<i>S3 R</i>	TCA ATC TTT GGG CAG GTT GAA
<i>S4F</i>	CTG GTG CCC ACA GTT ACG CT
<i>S4a R</i>	AAG GAT GCG TGA CTG CTA TGG
<i>S4b R</i>	AGG ATG CGT GAC TGC TCC TC
<i>S5a F</i>	AAA GTA GAC ACG GCC AGA CTT AGG
<i>S5b F</i>	AGT TAA AGT AGA CAC GGC CTC CC
<i>S5 R</i>	CAT CCC CAC ATA CGG AAA AGA
<i>S6 F</i>	CAG TCA CCC CGT GAA GTC CT
<i>S6 R</i>	TTT CCC CCA TCT GCC TAT TG
<i>S7 F</i>	TGG TAT TGG CTT TAA AAT ACT GGG
<i>S7 R</i>	TGT ACC CAA AAC TCA GCT GCA
<i>S8a F</i>	CTG GAT GCC TCA CTG ATC CA
<i>S8b F</i>	GCT GGA TGC CTC ACT GAT GTT
<i>S8 R</i>	TGG GAA GGA TGC ATA TGA TCT G
<i>S9 F</i>	GGG CAC CCG TGT GAG TTT T
<i>S9 R</i>	TCA GCT TGT CTG CTT TCT GGA A
<i>S10a F</i>	GCC ACA AGA GAC TCA G
<i>S10b F</i>	TTA GAG CCA CAA GAG ACA ACC AG
<i>S10 R</i>	TGG CTT CCT TGA GGT GGA AT
<i>S11a F</i>	TAG GAT TCA ACC CTG GAA GC
<i>S11b F</i>	CCC TGG ATC GCC GTG AA
<i>S11 R</i>	CCA GCA TGC ACC TGA CTA ACA
<i>Gapdh F</i>	GGA CTG AGG CTC CCA CCT TT
<i>Gapdh R</i>	GCA TGG ACT GTG GTC TGC AA
<i>PECAM1 F</i>	GGA TCT ATG ACT CAG GGA CAT ATA AAT G
<i>PECAM1a R</i>	GAC TCA CCT TCC ACC AAC CCG
<i>PECAM1b R</i>	GGA CTC ACC TTC CAC CAA CCT C
<i>ICAM1 F</i>	GCA CTT TCC CAC TGC CCA T
<i>ICAM1a R</i>	AGA GCA CAT TCA CGG TCA CCC AC
<i>ICAM1b R</i>	AGA GCA CAT TCA CGG TCA CCA TT
<i>HA1 F</i>	TGC TGG CGG ACG TGG
<i>HA1a R</i>	GCT CTC ACC GTC ACG CAA
<i>HA1b R</i>	GCT CTC ACC GTC ATG CCG
<i>MLH1 F</i>	GAG ACC CAG CAA CCC ACA GA
<i>MLH1a R</i>	TCG TGC TCA CGT TCT TCC TCC

MLH1b R	TCG TGC TCA CGT TCT TCC ATT
SUR1 F	GTC TTC CAG AGT CCC CGA CAG
SUR1a R	TGC CAC CCT CCC TCC CTA C
SUR1b R	TGC CAC CCT CCC TCC CTA T
G42863 F	TGG CAC ATC TGG CAA AAT CTC
G42863a R	GCT TGT GGA TGA AGG AGA A
G42863b R	GGC TTG TGG AAT GAA GGA GTC
G42888 F	TTG GTG CTG CTG TAA TCA CTT TTC AT
G42888a R	GGG AGG GGA GGA AGA GAC T
G42888b R	GGG AGG GGA GGA AGA GAG C
SRY F	TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC
SRY R	CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T

Tabelle 4: Oligonukleotide für die SNP-Chimärismusanalyse

Name	5'-3'
S1 P	CTG GGC CAG AAT CTT GGT CCT CAC A
S3 P	CAT ACG TGC ACA GGG TCC CCG AGT
S4 P	TCC TGG CAG TGT GGT CCC TTC AGA A
S5 P	CCT GGA CAC TGA AAA CAG GCA ATC CT
S6 P	CCC ATC CAT CTT CCC TAC CAG ACC AGG
S7 P	TCC TCA CTT CTC CAC CCC TAG TTA AAC AG
S8 P	CTC CCA ACC CCC ATT TCT GCC TG
S9 P	TGG AGG ATT TCT CCC CTG CTT CCA GAC AG
S10 P	CAG TGT CCC ACT CAA GTA CTC CTT TGG A
S11 P	CAA GGC TTC CTC AAT TCT CCA CCC TTC C
Gapdh P	CAT CCA AGA CTG GCT CCT CCC TGC
PECAM1 P	TGT GAA CAA CAA AGA GAA AAC CAC TGC AGA GT
ICAM1 P	CAG TGA CTG TCA CTC GAG ATC TTG AGG GC
HA1 P	CCG CTT CGC TGA GGG CCT TGA
G42863 P	ACA GGG AGA GTG ATG TTG GAG CTG GGT
G42888 P	TTC TCT CTC GGG ATT TTC TGG GAA TCA AAA
MLH1 P	ATT CAA GCT GTC CAA TCA ATA GCT GCC G
SUR1 P	CAG GTG GGC TGC GGC AAG TCC
SRY P	AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA

Tabelle 5: TAQMAN-PROBES (3'-TAMRA, 5'-FAM) für die SNP-Chimärismusanalyse

#### 4.2.3 SNP CHIMÄRISMUSANALYSE AUS SUBTYPEN

##### DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION

Nach Verdünnung des Probenmaterials mit PBS (Gibco) im Verhältnis 1:3 und der Vorlage von 15 ml Ficoll (GE Healthcare) für ein Ficoll-Probenverhältnis 1:3 wird dieser mit der Probe vorsichtig überschichtet. Nach der Zentrifugation mit 2.000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur und ohne Bremse kann die Intermediärzellschicht, die alle mononukleären Zellen enthält, abgehoben werden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird die Zellzahl mikroskopisch ermittelt.

## GRANULOZYTENSELEKTION

Nach Dichtegradientenzentrifugation und Abheben der Intermediärzellschicht wird die Granulozytenschicht (weiße Schicht zwischen Erythrozyten und Ficoll) abgehoben. Die vorhandenen Erythrozyten werden mittels Ammoniumchloridpuffers für 12 min lysiert, 10 min mit 1.300 rpm zentrifugiert, das Granulozytenpellet ad 50 ml mit PBS aufgefüllt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Das Pellet wird dann mit 1 ml PBS resuspendiert.

## SELEKTION DER SUBTYPEN CD3+, CD19+, CD14+, CD56+

Die Selektion wird mit den entsprechenden MicroBeads (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Dabei werden die mononukleären Zellen mit Antikörpern, die mit magnetischen Partikeln gekoppelt sind, inkubiert. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen werden 20  $\mu$ l Antikörper und 80  $\mu$ l autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) verwendet. Nach 15 minütiger Inkubation im Kühlschrank werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit autoMACS Running Buffer und Zentrifugation (10 min mit 300 x g) entfernt und das Zellpellet in 500  $\mu$ l autoMACS Running Buffer resuspendiert. Pro Probe wird eine Säule (Miltenyi Biotec) in den Magneten eingespannt, mit 500  $\mu$ l autoMACS Running Buffer äquilibriert und die markierte Probe aufgetragen, wobei die magnetisch markierten Zellen in der Säule bleiben und die unmarkierten Zellen durchfließen. Nach dreimaligem Waschen mit autoMACS Running Buffer wird die Säule aus dem Magneten entfernt und die Probe mit einem Stempel und 1 ml autoMACS Running Buffer durchgedrückt. Um die Zellen anzureichern, werden sie 10 min mit 300 x g zentrifugiert und das Pellet in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert.

## ANALYSE DER REINHEIT DER POPULATION

Je Probe werden 50  $\mu$ l entnommen und mit einem Antikörperstockmix, bestehend aus anti-CD14 FITC, anti-CD56 PE, anti-CD45 ECD, anti-CD20 PC5 und anti-CD3 PC7 (Beckman Coulter) 20 min im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 1 ml HUGO (PBS/0,1% Natrium-Azid, BSA) entfernt und das Zellpellet in 200  $\mu$ l HUGO resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgt am FC500 (Beckman Coulter). Die Auswertung mit der Software CxP. Die Angabe der Reinheit erfolgt in Prozent der Gesamtzellen.

## DNA EXTRAKTION

DNA wird aus den Subtypenpopulationen mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) lt. Herstellervorschrift extrahiert. Dabei wird das Probenmaterial mit Proteinase und einem Lysepuffer bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Nach DNA-Fällung mit absolutem Ethanol wird

die Probe auf eine Säule aufgetragen, zweimal gewaschen und mit einem Elutionspuffer aus der Säule gelöst.

### KONZENTRATIONSMESSUNG

Die Probe wird nach Extraktion 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit dem Biophotometer plus (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} \times 50 \times 10/1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Die Ratio ( $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ ) soll für DNA zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

### REALTIME PCR SNP

Nach Verdünnung der DNA auf 50ng/μl erfolgt der PCR-Ansatz in der Laminar Air Flow. Je SNP bzw. Gapdh werden eine Negativkontrolle, eine Empfängerinnen- bzw. Empfänger-Kalibrator-DNA, eine Spenderinnen- bzw. Spender-Kalibrator-DNA und die Probe im Doppelansatz pipettiert. Eingesetzt werden 600nM Forward-Primer, 600nM Reverse-Primer und 200nM FAM-TAMRA-Sonde (Ingenetix), 1X LightCycler 480 Probesmaster (Roche) und 250 ng DNA. Nach einer 10 minütigen Denaturierung bei 95°C folgen 50 Zyklen mit 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 45 Sekunden. PCR und Analyse werden am LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt.

### BERECHNUNG

Die Berechnung der Ergebnisse wird mit MS-Excel durchgeführt. Es werden die Ct-Werte herangezogen (Threshold-Cycle):

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{\text{Sample}} &= Ct_{\text{SNP d. Probe}} - Ct_{\text{GAPDH d. Probe}} \\ \Delta Ct_{\text{Calibrator}} &= Ct_{\text{SNP d. Kalibrators}} - Ct_{\text{GAPDH d. Kalibrators}} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{Calibrator}} - \Delta Ct_{\text{Sample}} \\ \text{SNP in \%} &= 2^{-\Delta\Delta Ct} * 100\end{aligned}$$

## 4.2.4 TREC ANALYSE

### PRINZIP

Die TREC-Analyse hat die Aufgabe, das Vorhandensein von circulärer DNA, die bei der VDJ-Rekombination des TCR im Thymus entsteht zu detektieren. Die bei der Rekombination

zwischen den einzelnen VDJ-Elementen abgespalten DNA-Bruchstücke werden als circuläre DNA-Fragmente ins Blut abgegeben. Indirekt kann somit auf die Aktivität im Thymus geschlossen werden. Ein hohe Zahl von diesen im Blut zirkulierenden TRECs weist somit auf eine hohe Thymusaktivität hin. Dies ist besonders wichtig um die Aktivität des Empfängerinnen- bzw. Empfängerthymus nach Transplantation einem Monitoring zu unterziehen und frühzeitig erkennen zu können, ob eigene T-Zellen heranreifen welche wiederum für eine Graftrejection verantwortlich sein können. (190) Die TRECs können aus dem peripheren Blut mittels PCR amplifiziert und gemessen werden. Die verwendeten Oligonukleotide für die TREC-Analyse können aus den Tabellen 6 und 7 entnommen werden.

### **DNA-EXTRAKTION**

DNA wird aus Peripherblut mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) lt. Herstellervorschrift extrahiert. Dabei wird das Probenmaterial mit Proteinase und einem Lysepuffer bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Nach DNA-Fällung mit absolutem Ethanol wird die Probe auf eine Säule aufgetragen, zweimal gewaschen und mit einem Elutionspuffer aus der Säule gelöst.

### **KONZENTRATIONSMESSUNG**

Die Probe wird nach Extraktion 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit dem Biophotometer plus (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} \times 50 \times 10/1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Die Ratio ( $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ ) soll für DNA zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

### **REALTIME PCR TREC**

Nach Verdünnung der DNA auf 50ng/μl erfolgt der PCR-Ansatz in der Laminar Air Flow. Jeweils für TREC und CCR5 werden eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle mit bekannter Kopienzahl und die Probe im Doppelansatz pipettiert. Eingesetzt werden 900nM Forward-Primer, 900nM Reverse-Primer, 200nM FAM-TAMRA-Sonde (Ingenetix), 1X LightCycler 480 Probesmaster (Roche) und 250 ng DNA). Nach einer 10 minütigen Denaturierung bei 95°C folgen 50 Zyklen mit 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 45 Sekunden. PCR und Analyse werden am LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt.

### **BERECHNUNG**

Anhand einer Standardkurve wird von der LightCycler-Software die Kopienanzahl errechnet.

Name	5' - 3'
TREC-112F	CAC ATC CCT TTC AAC CAT GCT
TREC-219R	GGG TGC AGG TGC CTA TGC
CCR5F	CAT GAC TGA CAT CTA CCT GCT CAA
CCR5R	CAC TGG GCG GCA GCA T

Tabelle 6: Oligonukleotide für die TREC-Analyse

Name	5' - 3'
TREC-134T	ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC AC
CCR5T	TCC TTC TTA CTG TCC CCT TCT GGG CTC AC

Tabelle 7: TAQMAN-PROBES (3'-TAMRA,5'-FAM) für die TREC-Analyse

#### 4.2.5 SPECTRATYPING – ANALYSE DER TCR-DIVERSITÄT

##### PRINZIP

Die Spectratyping Analyse hat die Aufgabe zu erkennen, ob eine klonale Expansion eines T-Zellklons vorliegt. Die Grundlage für die Erkennung einer Expansion bildet wiederum der TCR. Dieser heterodimere Rezeptor besteht aus einem  $\alpha$ - und einem  $\beta$ -Fragment, welche jeweils wiederum aus einem konstanten und einem variablen Teil bestehen. Bei der VDJ-Rekombination wird der variable Teil mittels verschiedener CDRs an das Joining (J) – Element angehängt. Dabei hat sich gezeigt, dass vor allem das 3te CDR-Element (CDR3) die meisten Variationen beinhaltet. (191) Die Länge des CDR3-Elements variiert je nachdem wie viele Nukleotide bei der VDJ-Rekombination eingebaut wurden und an welche Position die Verknüpfungen gebracht wurden. Beim TCR wird diese Längendifferenz des CDR3-Elements mittels verschiedener bekannter Primer für V $\beta$  (insgesamt 25 bekannte Familien) und Primer für die C $\beta$  (C $\beta$ 1 / C $\beta$ 2, bispezifischer Primer) durch die PCR ermittelt. Nach der Messung werden die Daten der PCR (Fluoreszenzintensität) über die Fragmentlänge des CDR3-Teils aufgetragen. Im normalen Organismus sollte diese Kurve einer Gauß'schen Glockenkurve entsprechen. Bei einer Expansion eines bestimmten T-Zell-Klons hingegen können einzelne Peaks in der Kurve sichtbar werden, welche auf die pathologische Vermehrung dieses Zellklons schließen lassen. Mit Hilfe dieser Methode können pathologisch vermehrte T-Zell-Klone detektiert werden, welche an einer GvHD beteiligt sein können (192). Die verwendeten Oligonukleotide für die TREC-Analyse können aus den Tabellen 8 und 9 entnommen werden.

##### DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION

Nach Verdünnung des Probenmaterials mit PBS (Gibco) im Verhältnis 1:3 und der Vorlage von 15 ml Ficoll (GE Healthcare) für ein Ficoll-Probenverhältnis 1:3 wird dieser mit der Probe vorsichtig überschichtet. Nach der Zentrifugation mit 2.000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur und ohne Bremse kann die Intermediärzellschicht, die alle mononukleären Zellen enthält, abgehoben werden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird die Zellzahl mikroskopisch ermittelt.

### SELEKTION DER SUBTYPEN CD3+/4+ UND CD3+/8+

CD3+ T-Lymphozyten werden durch Depletion von non-T Zellen (Negativselektion mit dem Pan T Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec) gewonnen. Non-T Zellen werden 10 min im Kühlschrank mit einem Cocktail von Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gebunden (CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, Glycophorin A). Pro  $10^7$  Zellen werden 10  $\mu$ l Antikörper-Mix und 40  $\mu$ l autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) verwendet. Diese werden danach für 15 min im Kühlschrank an MicroBeads konjugiert. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen werden 20  $\mu$ l Antikörper und 30  $\mu$ l autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) verwendet. Überschüssige Antikörper werden durch Waschen mit autoMACS Running Buffer und Zentrifugation (10 min mit 300 x g) entfernt und das Zellpellet in 500  $\mu$ l autoMACS Running Buffer resuspendiert. Pro Probe wird eine Säule (Miltenyi Biotec) in den Magneten eingespannt, mit 500  $\mu$ l autoMACS Running Buffer äquilibriert und die markierte Probe aufgetragen, wobei die magnetisch markierten Zellen in der Säule bleiben und die unmarkierten Zellen durchfließen. Nach dreimaligem Waschen mit autoMACS Running Buffer werden die ungebundenen Zellen auf 2 Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt und 10 min mit 300 x g zentrifugiert. Die Pellets werden in 80  $\mu$ l autoMACS Running Buffer und 20  $\mu$ l CD4- bzw. CD8-MicroBeads (Miltenyi Biotec) / $10^7$  Zellen resuspendiert und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit autoMACS Running Buffer und Zentrifugation (10 min mit 300 x g) entfernt und das Zellpellet in 500  $\mu$ l autoMACS Running Buffer resuspendiert. Pro Probe wird eine Säule (Miltenyi Biotec) in den Magneten eingespannt, mit 500  $\mu$ l autoMACS Running Buffer äquilibriert und die markierte Probe aufgetragen, wobei die magnetisch markierten Zellen in der Säule bleiben und die unmarkierten Zellen durchfließen. Nach dreimaligem Waschen mit autoMACS Running Buffer wird die Säule aus dem Magneten entfernt und die Probe mit einem Stempel und 1 ml autoMACS Running Buffer durchgedrückt. Um die Zellen anzureichern, werden sie 10 min mit 300 x g zentrifugiert.

### ANALYSE DER REINHEIT DER POPULATIONEN

Je Probe werden 50  $\mu$ l entnommen und mit einem Antikörperstockmix, bestehend aus anti-CD3 FITC, anti-CD34 PE, anti-CD45 ECD, anti-CD8 PC5 und anti-CD4 PC7 (Beckman Coulter) 20 min im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 1 ml HUGO (PBS/0,1% Natrium-Azid, BSA) entfernt und das Zellpellet in 200  $\mu$ l HUGO resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgt am FC500 (Beckman Coulter). Die Auswertung mit der Software CxP. Die Angabe der Reinheit erfolgt in Prozent der Gesamtzellen.

## RNA-EXTRAKTION

RNA wird mittels RNeasy Mini Kit (QIAGEN) lt. Herstellervorschrift extrahiert. Dabei wird das Probenmaterial mit einem Lysepuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol vermischt und durch eine QIAshredder-Säule (QIAGEN) zentrifugiert. Nach RNA-Fällung mit 70% Ethanol (Merck) wird die Probe auf eine Säule aufgetragen, dreimal gewaschen und mit einem Elutionspuffer aus der Säule gelöst.

## KONZENTRATIONSMESSUNG

Die Probe wird nach Extraktion 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit dem Biophotometer plus (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$OD_{260\text{nm}} \times 40 \times 10/1000 = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$

Die Ratio ( $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ ) soll für RNA über 1,8 liegen.

## REVERSE TRANSKRIPTION

Die Reverse Transkription der RNA zu cDNA wird mittels First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) lt. Herstellervorschrift durchgeführt. Zu 1X Puffer, 5mM  $MgCl_2$ , 1mM dNTPs, 1,6 $\mu$ g Primer oligo (dT)15, 0,01mg/ml Gelatin, 50 Units RNase Inhibitor und 20 Units AMV Reverse Transkriptase wird 1  $\mu$ g RNA pipettiert. Die Reverse Transkription erfolgt für 10 min bei 25°C und 60 min bei 42°C, gefolgt von einer Denaturierung von 5 min bei 99°C. Anschließend werden die Proben für 2 min auf Eis gekühlt.

## PCR

Für die PCR der 25 TCR-Familien wird die cDNA 1:5 mit Aqua dest verdünnt. Der PCR-Ansatz beinhaltet 1X PCR Gold Buffer (Applied Biosystems), 2,5mM  $MgCl_2$  (Applied Biosystems), 0,4mM dNTP Polymerisation Mix (GE Healthcare), 0,5 $\mu$ M TCR V  $\beta$  Primer (Ingenetix), 0,5 $\mu$ M TCR C  $\beta$  Primer mit FAM (Ingenetix), 1,25 Units AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (Applied Biosystems) und 1  $\mu$ l verdünnte cDNA.

Nach einer 6 minütigen Denaturierung bei 94°C folgen 35 Zyklen von 94°C für 1 min, 59°C für 1 min und 72°C für 1 min. Abschließend folgt eine 7 minütige Inkubation bei 72°C. Bis zur Fragmentanalyse werden die PCR-Produkte dunkel im Kühlschrank gelagert.

## FRAGMENTANALYSE

1  $\mu$ l PCR-Produkt werden mit 0,5 $\mu$ l GeneScan™-500 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystems) und 12  $\mu$ l HI-DI™ Formamid (Applied Biosystems) vermischt. Die

Fragmentanalyse erfolgt am ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mit der Software 310 Data Collection unter Verwendung von POP-4 und 1X Genetic Buffer (Applied Biosystems) bei 60°C.

## AUSWERTUNG

Die Auswertung der Fragmente erfolgt mit der Software 310 GeneScan® 3.1. Alle weiteren Berechnungen werden mit MS Excel durchgeführt. Dazu werden alle Peakflächen eingetragen und die relative Peakintensität und die Complexity Scores berechnet.

Die relative Peakintensität ist der prozentuelle Anteil des Einzelpeaks an der Gesamtpeakfläche einer TCR V  $\beta$ -Familie. Festgelegt wurden folgende Definitionen:

**polykonal:** Das Profil der TCR V  $\beta$  Diversität ähnelt der Gauß'schen Glockenkurve.

**polyklonal mit dominanten Klonen:** Vorhandensein von mindestens 2 Peaks, deren relative Peakintensität größer ist als 20 %.

**oligoklonal:** Vorhandensein von 2 bis 3 Peaks, deren relative Peakintensität größer ist als 30 %.

**monoklonal in polyklonalem Hintergrund:** Vorhandensein von 1 dominantem Peak, dessen relative Peakintensität größer ist als 40 %.

**monoklonal:** Vorhandensein von 1 dominantem Peak, dessen relative Peakintensität größer ist als 80 %.

**fehlend:** Keine einzeln vorhandenen Peaks im 3-Basen-Abstand.

Der Complexity Score beinhaltet die Anzahl der Peaks und kann pro TCR V  $\beta$ -Familie max. 5 betragen („1“ für 1 Peak, „2“ für 2 Peaks, „3“ für 3 Peaks, „4“ für 4 Peaks, „5“ für 5 oder mehr Peaks). Das ergibt insgesamt einen höchstmöglichen Wert von 125 für eine Probe.

Name	5' - 3'
BV1	CAA CAG TTC CCT GAC TTG CAC
BV2	TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT
BV3	TCT AGA GAG AAG AAG GAG CGC
BV4	CAT ATG AGA GTG GAT TTG TCA TT
BV5.1	TTC AGT GAG ACA CAG AGA AAC
BV5.2	CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG
BV6	AGG CCT GAG GGA TCC GTC TC
BV7	CTG AAT GCC CCA ACA GCT CTC
BV8	TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG
BV9	AAA TCT CCA GAC AAA GCT CAC
BV10	CTC CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT
BV11	ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG
BV12	GAC AAA GGA GAA GTC TCA GAT

BV13.1	GAC CAA GGA GAA GTC CCC AAT
BV13.2	GTT GGT GAG GGT ACA ACT GCC
BV14	GTC TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT
BV15	GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT
BV16	GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC
BV17	CAC AGA TAG TAA ATG ACT TTC AG
BV18	GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA
BV19	TCC TCT CAC TGT GAC ATC GGC CA
BV20	TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC
BV21	GAT ATG AGA ATG AGG AAG CAG
BV22	CAG AGA AGT CTG AAA TAT TCG A
BV23	TCA TTT CGT TTT ATG AAA AGA TGC
BV24	AAA GAT TTT AAC AAT GAA GCA GAC

Tabelle 8: Oligonukleotide für die Analyse der TCR V  $\beta$ -Diversität

Name	5' - 3'
BC-R	CTT CTG ATG GCT CAA ACA C

Tabelle 9: Modifiziertes Oligonukleotid (5'FAM) für die Analyse der TCR V  $\beta$ -Diversität

### 4.3 MESSZEITPUNKTE UND MESSDATEN

Für sämtliche quantitative Messungen der einzelnen Zellreihen, die TREC-Analyse und SNP-Analyse wurden die Tage 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 540 und 720 nach HFD HSCT als Messzeitpunkte definiert. Für die Analyse der Diversität des TCRs mittels Spectratyping wurden die Tage 60, 120, 240, 360, 540 und 720 nach HSCT als Messzeitpunkte definiert.

### 4.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für sämtliche statistischen Auswertungen wurde die Software IBM SPSS Statistics 20 und Microsoft Excel 2010 verwendet. Die graphischen Darstellungen erfolgten unter Verwendung von Microsoft Excel 2010 sowie der Software GraphPad Prism 5.

#### PROBLEM DES KLEINEN DATENSATZES UND DER VERTEILUNG

Da es sich um ein sehr kleines Patientinnen- und Patientenkollektiv (n=8) handelte, war es höchst unwahrscheinlich, dass irgendwelche statistischen Tests eine Aussagekraft tragen könnten. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung mit der visuellen Dateninspektion unter Verwendung des QQ-Plots und rechnerisch mittels Shapiro Wilk Test ( $p < 0,05$  galt als Grenze für die Annahme auf Normalverteilung) geprüft. Sämtliche Datensätze waren dabei nicht normalverteilt weshalb im Anschluss auch nur mehr nicht parametrische Tests zur Anwendung kommen konnten. Zur genaueren Analyse der Daten wurde eine deskriptive Analyse mit Berechnung von Mittelwert, Median, Standardabweichung, Standardfehler, 25ter und 75ter Perzentile, Minimum und Maximum durchgeführt. Die Analyse der Daten ergab,

dass sehr viele Datensätze große Ausreißer enthielten, weshalb angenommen wurde, dass statistische Analysen mittels Mittelwert keine brauchbaren Resultate liefern konnten. Es wurde stattdessen für sämtliche statistischen Analysen und Tests sowie Graphiken der Median verwendet.

### STATISTISCHE TESTS

Als statistischer Test bei 2 unabhängigen Stichproben wurde der verteilungsfreie Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen. Zusätzlich wurde zur Vermeidung eines  $\alpha$ -Fehlers durch multiples Testen eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Als statistischer Test bei mehr als 2 unabhängige Gruppen wurde der verteilungsfreie Kruskal-Wallis-Test angewendet. Das statistische Signifikanzniveau wurde ebenfalls wieder mit  $p < 0,05$  definiert. Zur Vermeidung eines  $\alpha$ -Fehlers durch multiples Testen wurden die Ergebnisse wiederum einer Bonferroni-Korrektur unterzogen.

### ANMERKUNG

Da es sich beim Patientinnen- und Patientenkollektiv welches nur alle überlebenden Patientinnen und Patienten beinhaltete um eine sehr kleine Gruppe ( $n=8$ ) handelte, wurde auch versucht statistische Signifikanzen mittels der größeren Gruppe ( $n=16$ ), welche auch bereits verstorbene Patientinnen und Patienten beinhaltete, aufzuzeigen. Da durch die verfrüht ausgeschiedenen Patientinnen und Patienten in dieser Gruppe vollständige Daten nur zu den frühen Messzeitpunkten vorhanden waren, wurden statistische Tests nur für diese Zeitpunkte durchgeführt. Zudem wurde auch versucht mittels graphischer Unterteilung in Subgruppen Trends aufzuzeigen und diese zu diskutieren.

## 5 ERGEBNISSE

Die Hauptkernfragen der Arbeit beschäftigten sich mit der dynamischen Immunrestitution nach haploidenter Transplantation bzw. der Engraftmentkinetik. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die 11 gemessenen Oberflächenantigene und deren Zuordnung zu den jeweiligen Zelltypen. Zusätzlich wurde der Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus per SNP-Analyse, Bestimmung der TCR Diversität mittels Spectratyping und Monitoring der Thymusfunktion mittels TREC-Analyse durchgeführt. Die genaue Methodik hierzu kann dem Methoden-Teil im Kapitel 4 entnommen werden. Für sämtliche Analysen und Tests wurde wegen der Verteilungsvariation und Ausreißer der Median verwendet.

Oberflächenantigen	Zelltyp
<b>Leukozyten absolut</b>	Leukozyten absolut
<b>CD3+ absolut</b>	TCR Co-Rezeptor, T-Lymphozyten
<b>CD19+ absolut</b>	B-Zellen
<b>CD3+/4+ absolut</b>	T-Helferzellen
<b>CD3+/8+ absolut</b>	cytotoxische T-Zellen
<b>CD3+/56+ absolut</b>	NK-Zellen
<b>CD3+/56- absolut</b>	phenotypisch und funktionell abnormale NK-Zellen, Marker für chronische Infektionen (193)
<b>CD14+ absolut</b>	Monozyten und Makrophagen
<b>CD3/8/45RA+ absolut</b>	LCA Isoform für naive T-Killer-Zellen
<b>CD3/4/45RA+ absolut</b>	LCA Isoform für naive T-Helfer-Zellen
<b>CD3/Ki67+ absolut</b>	sich teilende Lymphozyten, mit AK vs. Ki67 intrazellulär während Zellteilung auf der Chromosomenoberfläche markiert (194)

*Tabelle 10: Oberflächenantigene und zugehöriger Zelltypus*

### 5.1 QUANTITATIVE IMMUNREKONSTITUTION

Im nachfolgenden Bereich werden die gesammelten Ergebnisse numerisch und graphisch (Verlauf von Median und Mittelwert) für jede einzelne der 11 gemessenen Zellreihen für alle zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit überlebenden Patientinnen und Patienten (n=8) dargestellt.

#### 5.1.1 LEUKOZYTEN ABSOLUT

Abbildung 6 und Tabelle 11 zeigen die Engraftmentkinetik der Gesamtleukozyten. Man sieht, dass der Medianwert fast an allen Messzeitpunkten unter dem Mittelwert liegt. Am Tag 300 nach HSCT gibt es einen Mittelwertpeak, welcher mit dem temporären Anstieg der Leukozytenzahl einer Patientin bzw. eines Patienten erklärbar ist und zum nächsten Messzeitpunkt bereits wieder mit den Werten der anderen Patientinnen und Patienten

korrelierte. Der Anstieg der Gesamtleukozytenzahl erfolgte bereits in den ersten Tagen nach HFD HSCT und erreichte ab dem Tag 150 bis zum Tag 720 ein relativ konstantes Niveau von circa 5000 Zellen/ul. Die hohe Standardabweichung lässt sich aufgrund großer Ausreißer des sehr heterogenen Patientinnen- und Patientenkollektivs erklären. Statistische Tests konnten keine signifikante Überlegenheit von Konditionierungsverfahren und Selektionen zeigen, jedoch scheint es einen Trend zu geben, der vor allem in den letzten 180 Tagen des Follow-up MAC + CD3/19 Selektion vorteilhaft erscheinen lässt – siehe Abbildung 7.

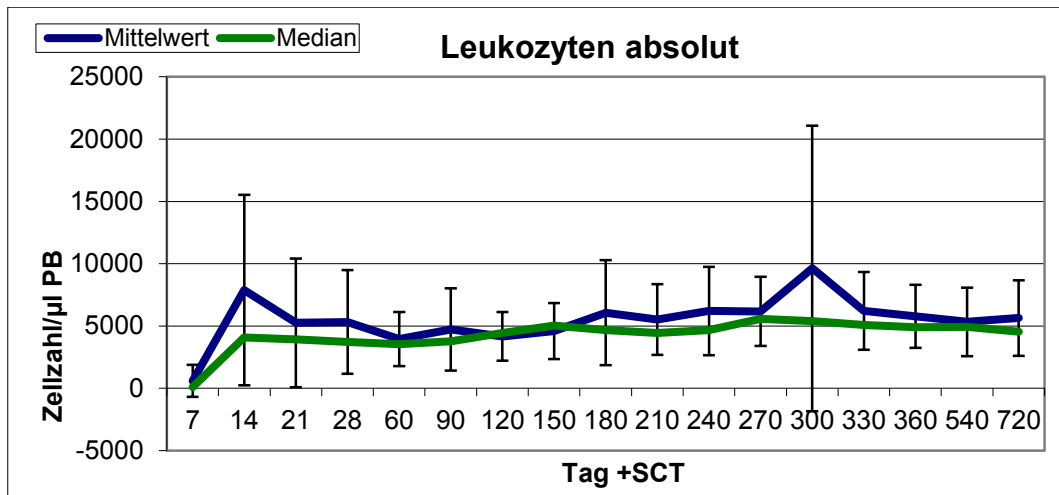


Abbildung 6: Leukozytenrekonstitution. Dargestellt sind Mittelwert, Median und Standardfehler.

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
	7	8						0	993
14	8	0	7161	3700	8884	900	28110	2023	8473
21	8	0	4310	2605	4788	1000	15790	1873	4448
28	8	0	6495	5250	5036	1600	17050	2805	9108
60	8	0	3295	2460	2339	1330	8180	1475	4553
90	8	0	5070	2980	4161	1100	12200	2098	9343
120	8	0	3805	3445	2457	830	7740	1398	6043
150	8	0	5240	5835	2220	1100	8270	3565	6500
180	8	0	6819	5795	5151	2110	17970	2750	8965
210	7	1	6236	5760	3602	2000	11270	3850	11030
240	8	0	6316	4675	3719	3200	14210	3705	8398
270	8	0	6079	5580	2857	2600	10560	3735	9063
300	7	1	12533	5400	15260	3200	45550	3670	16150
330	8	0	6534	5520	3171	3490	11980	4140	9735
360	7	1	6627	5560	2569	4020	10660	4330	9360
540	8	0	5578	4940	2785	1880	10120	3583	8203
720	8	0	6346	4975	2996	3560	10720	3843	9973

Tabelle 11: Leukozytenrekonstitution über den Zeitverlauf mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

## Gesamtleukozytenrekonstitution

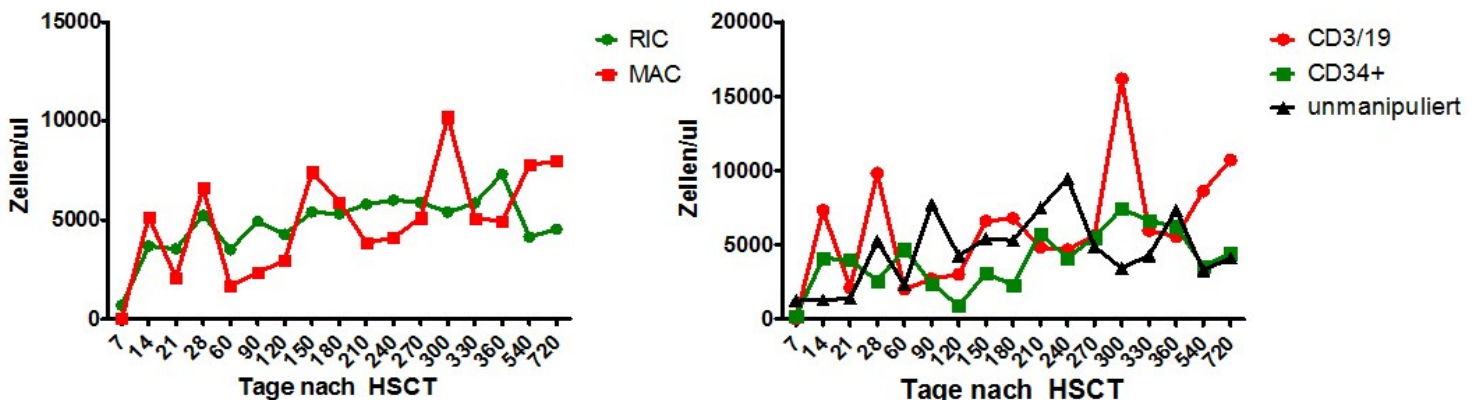


Abbildung 7: Leukozytenrekonstitution im Bezug auf Konditionierung und Selektion. Dargestellt sind die median-Werte der Subpopulationen. Die vielen Ausreißer sind vor allem durch Schwankungen der Patienten in den einzelnen sehr kleinen Subpopulationen verursacht.

### 5.1.2 CD3+

Abbildung 8 und Tabelle 12 zeigen die T-Zellzahl im Verlauf. Die Rekonstitution verlief in den ersten Wochen nach Transplantation sehr langsam und erreichte erst ab dem Tag 150 nach Transplantation eine median-Zellzahl von über 500/ul. Ein sehr großer relativer Zuwachs trat zwischen dem Tag 270 und 300 nach HFD HSCT auf – es waren über 1000 CD3+/ul detektierbar. Es gab keine statistischen Signifikanzen zwischen Konditionierungen und Selektionen, jedoch war graphisch ein Trend erkennbar, der MAC gegen Ende des Follow-up besser abschneiden ließ, obwohl unter der Verwendung eines MAC-Regime CD3+-Zellen erst später detektierbar waren, dafür aber im Vergleich zum RIC-Regime einen schnelleren Anstieg aufwiesen – siehe Abbildung 9. Der spätere Zellzahlanstieg unter MAC ist damit zu erklären, dass die beiden unmanipuliert KM-Transplantierten unter RIC konditioniert wurden und durch Weglassen der Selektion initial höhere CD3-Zellzahlen aufwiesen. Bezüglich der Konditionierungsverfahren war kein Trend feststellbar, jedoch schienen die unmanipuliert KM-Transplantierten anfangs überlegen.

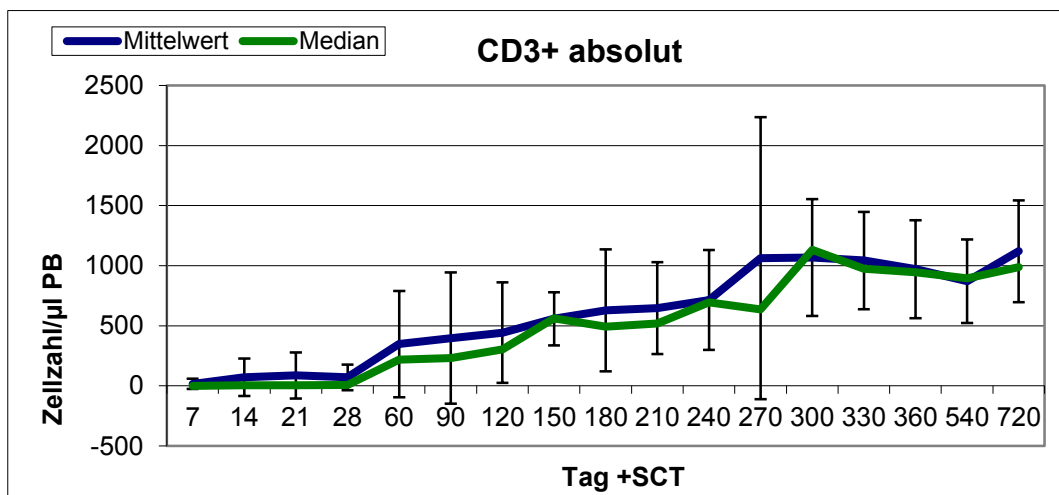


Abbildung 8: Die CD3+-Zellzahl im Verlauf dargestellt mittels Mittelwert, Median und Standardfehler.

### CD3+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	8	0	16,2	,3	42,8	,0	121,9	,0	4,4
14	8	0	70,8	4,3	155,1	,3	445,8	2,1	76,2
21	8	0	86,7	6,0	192,1	,6	551,7	,9	90,9
28	8	0	71,0	6,3	106,7	2,0	277,2	4,5	163,9
60	8	0	347,5	218,3	443,2	,0	1322,1	36,6	552,2
90	8	0	397,7	230,7	546,5	15,9	1703,2	67,7	397,5
120	8	0	442,4	304,0	418,4	85,9	1332,4	119,1	621,1
150	8	0	557,9	562,3	221,9	170,3	932,6	443,7	675,2
180	8	0	627,3	493,0	507,8	163,5	1775,3	325,2	790,2
210	7	1	647,5	519,6	381,6	229,9	1186,7	416,9	1179,8
240	8	0	714,2	695,0	416,3	237,3	1525,2	363,2	881,3
270	8	0	1062,7	635,9	1174,3	320,1	3833,9	365,5	1267,3
300	7	1	1068,5	1131,8	485,9	462,4	1949,5	711,8	1235,5
330	8	0	1043,0	975,2	405,5	544,1	1773,6	680,0	1343,0
360	7	1	970,9	945,2	407,3	541,9	1591,3	543,5	1415,6
540	8	0	870,2	895,9	347,6	325,2	1389,3	558,3	1138,0
720	8	0	1120,2	986,9	422,6	727,7	2004,9	796,6	1327,7

Tabelle 12: T-Zell-Rekonstitution über den Zeitverlauf mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

### CD3-Rekonstitution

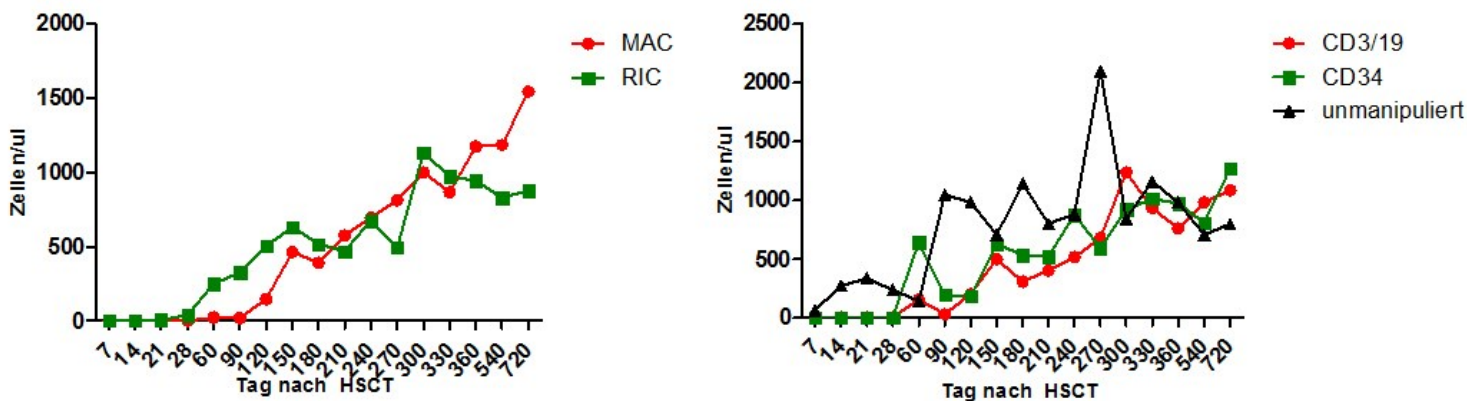


Abbildung 9: CD3+-Rekonstitution im Vergleich von MAC und RIC. Dargestellt sind die median-Werte der Subpopulationen. Es zeigt sich gegen Ende des Follow-up ein Trend der besseren Rekonstitution, wenn MAC als Konditionierungsverfahren verwendet wurde.

#### 5.1.3 CD19+

Abbildung 10 und Tabelle 13 zeigen den Zeitverlauf der B-Zell-Rekonstitution. In den ersten 60 Tagen waren nahezu keine B-Zellen detektierbar. Nach Anstieg der B-Zellzahl ab dem Tag 60 nach HFD HSCT tendierte der weitere Verlauf bis auf einen Ausreißer am Tag 210 (es fehlte hier ein Messwert einer Patientin bzw. eines Patienten – der Mittelwert korreliert an diesem Zeitpunkt besser mit dem Verlauf) relativ stetig nach oben. Es lassen sich zwar keine

signifikanten Unterschiede im Bezug auf Konditionierungsverfahren und Selektion feststellen, jedoch besteht eine graphische Tendenz eines besseren Abschneidens der MAC und CD3/19-Negativselektion – siehe Abbildung 11. Die MAC scheint auch tendenziell für die größere Patientinnen- und Patientengruppe von Vorteil gewesen zu sein – dies ist jedoch schwer interpretierbar, da einige Patientinnen und Patienten zu verschiedenen Messzeitpunkten bereits verstorben waren.

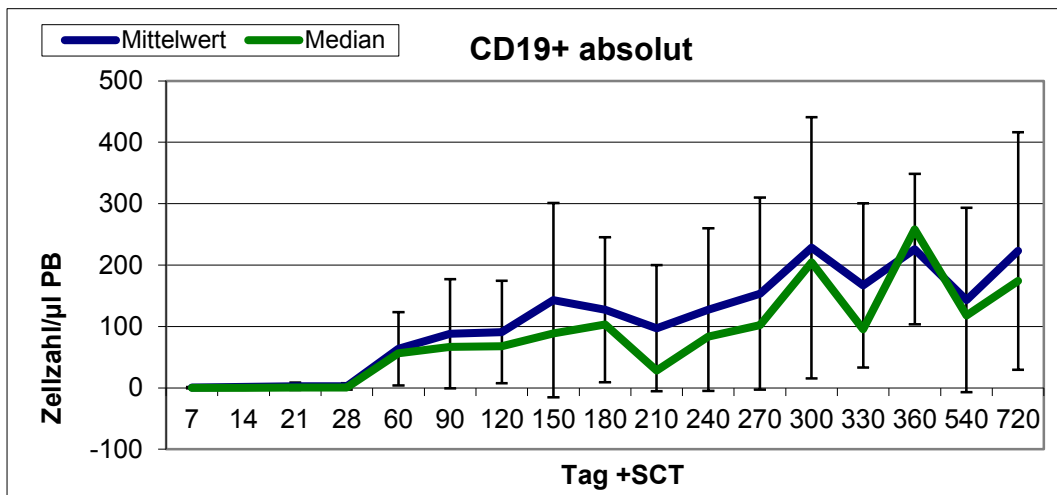


Abbildung 10: Die CD19+-Rekonstitution nach HFD HSCT über den Zeitverlauf. Dargestellt sind der Verlauf von Mittelwert und Median sowie Standardfehler.

#### CD19+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	8	0	,38	,00	,89	,00	2,55	,00	,36
14	8	0	1,40	,30	3,18	,00	9,24	,00	,70
21	8	0	2,70	,47	6,10	,00	17,67	,00	1,90
28	8	0	2,59	,71	5,21	,00	15,34	,04	1,99
60	8	0	63,80	56,40	59,71	,00	157,87	6,41	124,60
90	8	0	87,96	66,62	88,89	,48	202,38	2,93	188,89
120	8	0	90,99	67,68	83,36	1,00	232,97	19,88	168,78
150	8	0	142,84	88,70	158,39	2,78	444,18	13,06	270,77
180	8	0	127,28	103,07	118,21	17,00	346,29	22,01	214,92
210	7	1	97,23	28,40	102,83	16,13	282,88	18,75	159,39
240	8	0	127,51	83,39	132,57	15,48	380,26	19,60	224,59
270	8	0	153,54	102,33	156,42	18,18	448,61	21,96	262,45
300	7	1	228,26	204,53	212,55	28,48	576,56	30,46	387,18
330	8	0	167,05	95,51	133,72	31,98	351,05	65,43	318,83
360	7	1	225,88	257,97	122,57	65,79	379,56	101,71	356,40
540	8	0	143,15	117,70	150,35	3,20	462,87	23,52	207,28
720	8	0	222,98	173,96	193,35	25,92	644,74	77,55	285,55

Tabelle 13: B-Zell-Rekonstitution im Zeitverlauf mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

## B-Zell-Rekonstitution

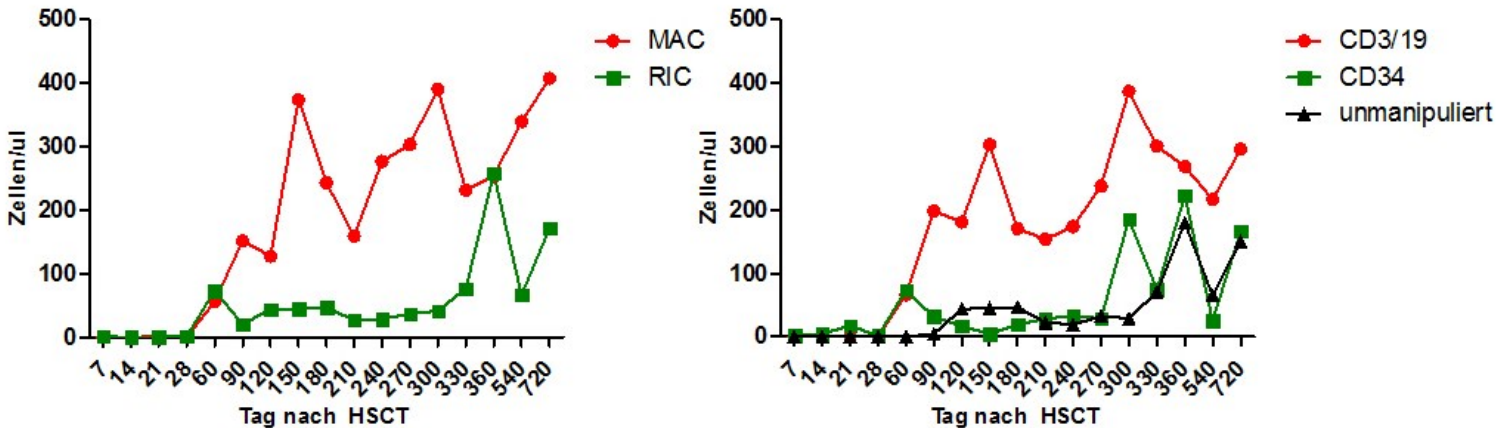


Abbildung 11: B-Zell-Rekonstitution im Vergleich von MAC und RIC. Dargestellt sind die median-Werte der Subpopulationen. Es lässt sich graphisch erkennen, dass die MAC tendenziell besser abschneidet als die RIC. Der RIC-Peak am Tag 360 nach HFD HSCT kommt durch einen fehlenden Messwert in der RIC-Gruppe zustande.

### 5.1.4 CD3/4+

Abbildung 12 und Tabelle 14 zeigen die CD4+-Rekonstitution. Ähnlich den B-Zellen waren T-Helferzellen erst ab dem Tag 60 nach HFD HSCT detektierbar. Der weitere Verlauf nach Tag 60 nach HFD HSCT zeigte relativ kontinuierlich nach oben, obwohl gegen Ende des Follow-up noch ein Knick zu verzeichnen war. Es gab keine statistischen Signifikanzen zwischen Konditionierungen und Selektionen, jedoch besteht ein graphischer Trend zur Überlegenheit von MAC und CD3/19-Negativselektion – siehe Abbildung 13. Der gleiche Trend scheint auch in der größeren Patientinnen- und Patientengruppe (n=16) zu bestehen. Ebenso wie bei der CD3-Rekonstitution sind CD4+-Zellen unter MAC viel später als unter RIC detektierbar, zeigen aber im weiteren Verlauf einen schnelleren Anstieg. Der spätere Zellzahlanstieg unter MAC ist damit zu erklären, dass die beiden unmanipuliert KM-Transplantierten unter RIC konditioniert wurden und durch Weglassen der Selektion höhere CD3-Zellzahlen aufwiesen. Darauf begründet sich auch das scheinbar initial bessere Abschneiden der unmanipulierten Selektion.

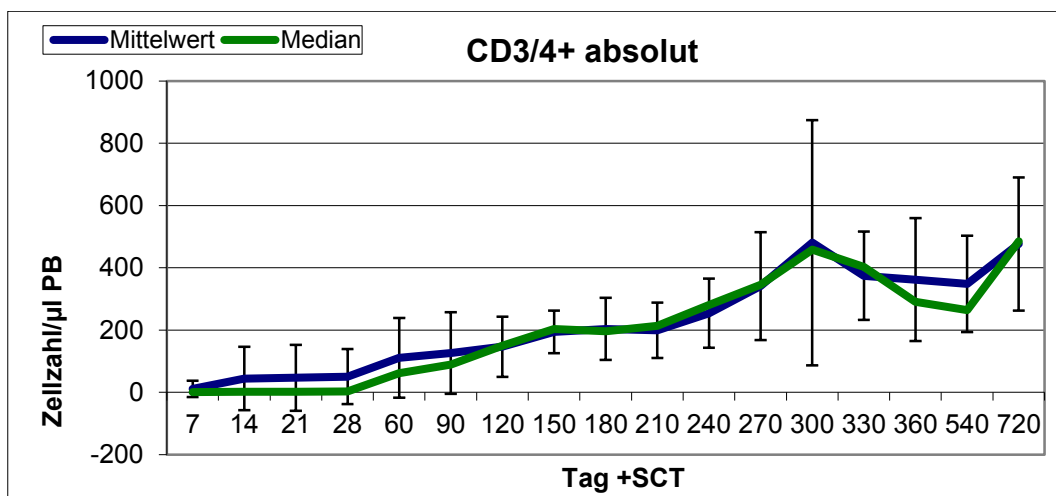


Abbildung 12: Verlauf der T-Helferpopulation. Dargestellt sind Mittelwert, Median und Standardfehler.

### CD4+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	7	1	10,8	,7	26,2	,0	70,2	,0	3,4
14	8	0	44,4	2,1	101,7	,3	293,1	,9	36,9
21	8	0	46,9	2,1	105,7	,0	303,7	,4	46,4
28	8	0	50,7	3,2	88,7	,5	256,0	2,1	77,1
60	8	0	111,0	61,9	128,1	,0	338,1	8,8	224,8
90	8	0	126,3	89,5	131,2	4,2	395,0	16,6	196,1
120	8	0	146,6	149,9	96,5	25,6	287,2	62,7	219,1
150	8	0	194,2	203,4	68,3	73,9	288,6	140,9	244,2
180	8	0	203,9	196,8	100,0	50,3	382,1	131,8	265,6
210	7	1	199,1	214,0	89,1	80,6	339,2	93,0	234,6
240	8	0	254,1	280,4	110,8	65,8	365,1	146,6	352,1
270	8	0	341,1	345,3	173,4	70,0	592,8	204,6	485,6
300	7	1	480,8	458,5	393,7	97,7	1280,0	214,1	563,2
330	8	0	374,5	403,0	141,9	127,1	533,1	242,9	485,8
360	7	1	362,2	291,0	197,6	167,4	665,5	189,1	599,4
540	8	0	348,3	264,2	154,9	201,1	563,0	221,3	534,1
720	8	0	476,4	484,8	214,0	218,2	879,3	275,8	594,8

Tabelle 14: Die T-Helferpopulation im quantitativen Verlauf mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

### CD4-Rekonstitution

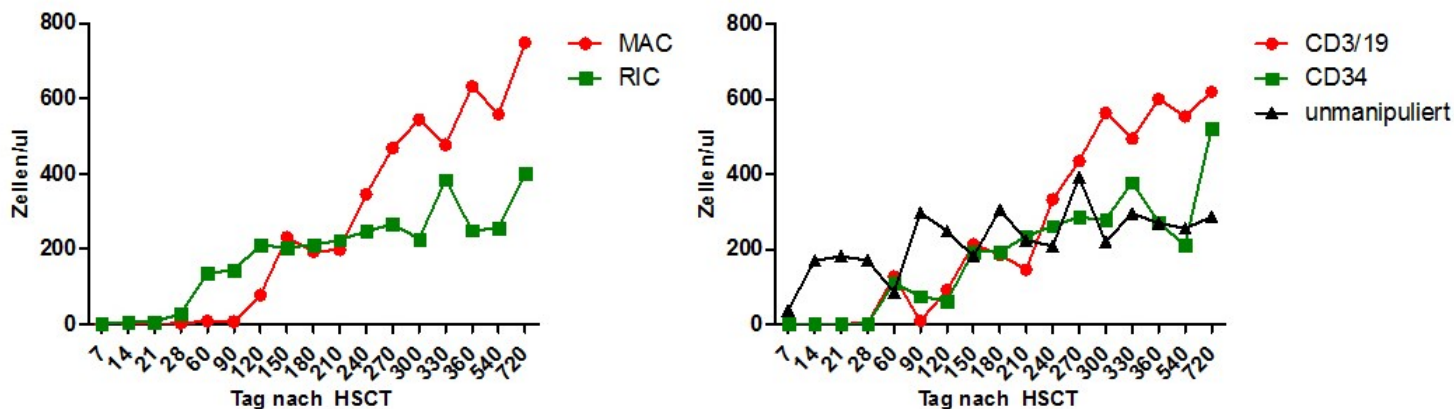


Abbildung 13: CD4-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion. Dargestellt sind die median-Werte der Subpopulationen. Es scheint eine graphische Tendenz zu einer effektiveren Rekonstitution unter Verwendung von MAC + CD3/19 zu geben.

#### 5.1.5 CD3/8+

Abbildung 14 und Tabelle 15 zeigen den Verlauf der CD8+-Rekonstitution. Wie bei den CD19+- und CD4+-Zellen trat auch der Anstieg der T-Killer-Population erst ab dem Tag 60 nach HFD HSCT ein. Die median CD8+-Zellzahl erfuhr an den Tagen 240 und 270 einen Einbruch. An diesen beiden Messzeitpunkten korreliert die Kurve eher mit dem Mittelwert, da an den Tagen 210 und 300 nach HFD HSCT die Messung für jeweils eine Patientin bzw. einen

Patienten fehlt. Im Bezug auf die Subpopulationen gab es keine statistischen Signifikanzen, jedoch zeigte sich graphisch ein Trend zum besseren Abschneiden von MAC, welcher auch in der größeren Patientinnen- und Patientengruppe (n=16) vorhanden war – siehe Abbildung 15. Im Bezug auf die Selektion schienen die beiden unmanipulierten KM-Grafts anfangs tendenziell überlegen, wogegen gegen Ende des Follow-up keine Trends mehr graphisch feststellbar waren.

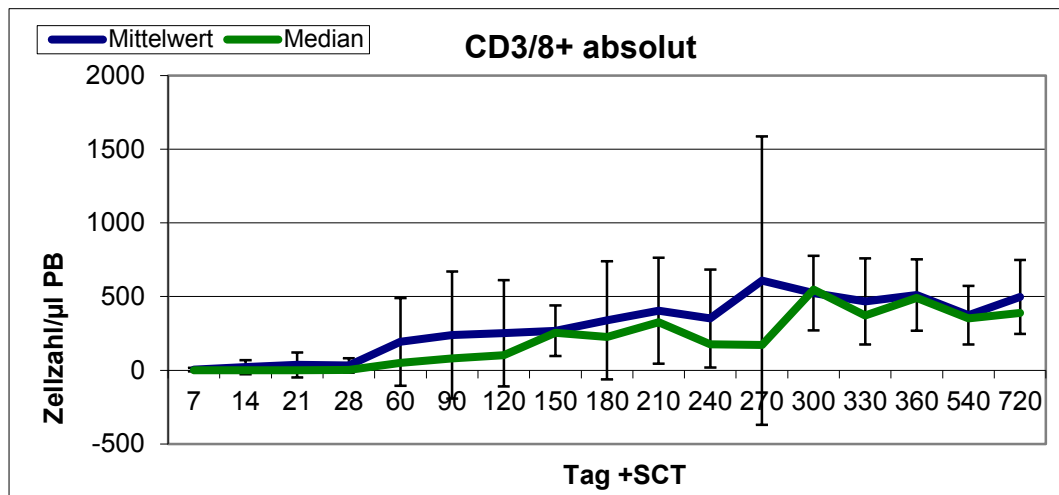


Abbildung 14: CD8+-Rekonstitution im Zeitverlauf. Dargestellt sind der Verlauf von Mittelwert und Median sowie Standardfehler.

#### CD8+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	7	1	5,0	,0	11,9	,0	31,9	,0	1,8
14	8	0	21,4	1,1	47,7	,0	137,0	,4	21,9
21	8	0	36,8	,8	85,1	,4	243,7	,4	34,9
28	8	0	33,1	3,2	49,4	,0	134,8	,3	65,4
60	8	0	192,6	51,0	296,6	,0	759,3	20,2	443,5
90	8	0	239,4	81,5	431,2	1,4	1281,0	18,1	252,4
120	8	0	251,5	102,6	360,9	16,3	1097,5	38,7	309,9
150	8	0	268,2	254,0	171,0	26,7	575,3	133,3	372,0
180	8	0	338,8	226,8	400,4	51,8	1253,4	64,5	455,0
210	7	1	403,8	325,7	359,1	74,4	966,3	114,1	848,6
240	8	0	351,3	176,8	332,6	105,2	1077,8	142,5	513,6
270	8	0	608,0	171,2	978,4	67,6	2953,5	120,2	710,6
300	7	1	523,7	546,6	253,9	161,3	912,0	247,7	649,2
330	8	0	468,0	372,1	292,3	249,4	1139,8	271,6	542,0
360	7	1	510,7	491,2	242,0	228,7	856,2	258,3	786,7
540	8	0	373,7	352,4	199,6	117,4	730,4	216,6	530,6
720	8	0	498,0	389,6	250,2	307,0	980,0	332,8	709,8

Tabelle 15: Quantitative Rekonstitution der T-Killerzellen im Zeitverlauf mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

## CD8-Rekonstitution

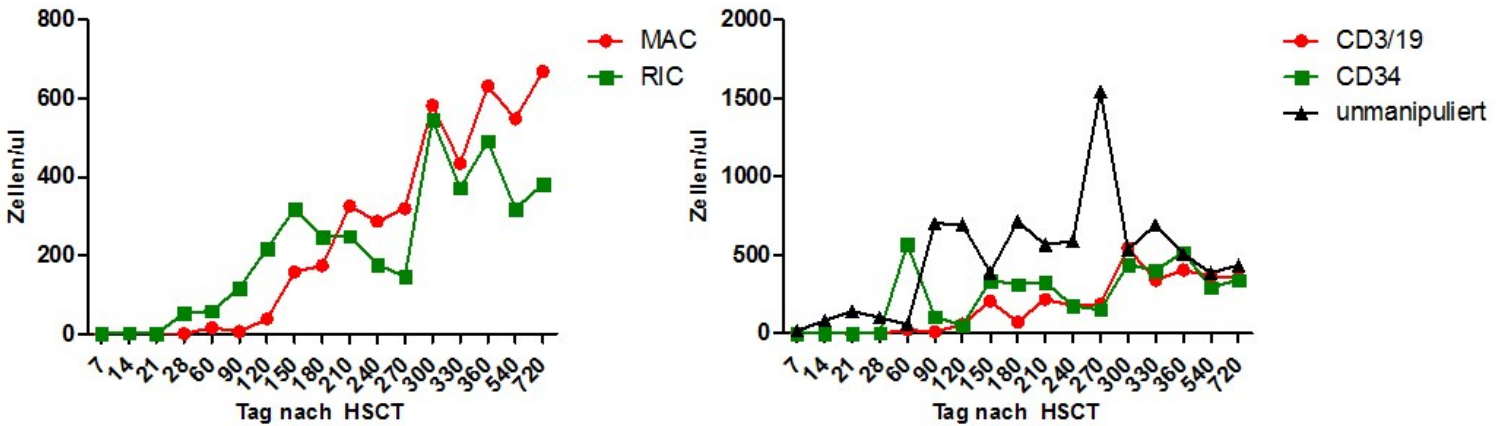


Abbildung 15: CD8-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion. Es sind die median-Werte der Subpopulationen dargestellt. Die MAC scheint der RIC graphisch gegen Ende des Follow-up überlegen zu sein.

### 5.1.6 CD3/56+

Abbildung 16 und Tabelle 16 veranschaulichen die zeitliche Rekonstitution der NK-Zellen, welche ebenfalls sehr langsam verlief. Zwischen den Messzeitpunkten am Tag 120 und 150 ließ sich ein relativer Anstieg verzeichnen, wobei die NK-Zellzahl erst gegen Ende des Beobachtungszeitraums zu steigen schien. Für eine Patientin bzw. einen Patienten der 8 Patientinnen und Patienten war nur ein Messwert an einem Messzeitpunkt vorhanden, für alle anderen Messzeitpunkte fiel diese Patientin bzw. dieser Patient aus dem Kollektiv. Im Bezug auf Konditionierung und Selektion konnten keine statistischen Signifikanzen festgestellt werden, graphisch zeigt sich aber ein Trend zur Überlegenheit von RIC und CD34+-Selektion – siehe Abbildung 17. Der gleiche Effekt ist auch in der größeren Patientinnen- und Patientenpopulation (n=16) - dort sogar noch deutlicher - zu erkennen. In dieser Gruppe wurde die RIC jedoch bevorzugt mit der  $\alpha/\beta/19$ -Depletion kombiniert, welche dort auch graphisch den anderen Selektionen leicht überlegen zu sein scheint.

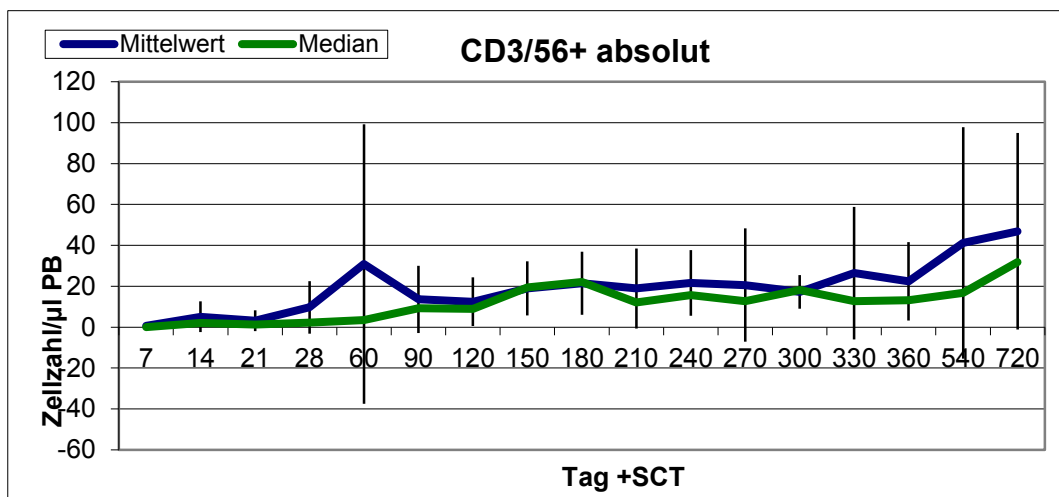


Abbildung 16: NK-Zellanstieg über den Zeitverlauf nach HFD HSCT. Dargestellt sind der Verlauf von Mittelwert und Median sowie Standardfehler.

### CD3/56+ Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	5	3	,58	,01	1,28	,00	2,86	,00	1,44
14	6	2	5,02	2,00	7,52	,00	19,89	,66	8,97
21	6	2	3,10	1,25	5,09	,00	13,40	,60	4,76
28	6	2	9,63	2,27	12,88	,00	27,88	,74	25,27
60	7	1	30,83	3,40	68,40	,00	185,26	,40	18,81
90	7	1	13,56	9,22	16,42	,55	48,77	1,39	15,00
120	7	1	12,40	8,93	11,92	,60	36,77	5,20	16,25
150	7	1	18,90	19,46	13,21	2,64	40,48	4,14	26,82
180	7	1	21,40	22,00	15,41	3,04	40,42	7,19	36,08
210	6	2	18,93	12,06	19,58	5,39	56,35	5,73	30,50
240	7	1	21,61	15,62	15,99	1,43	39,64	8,53	39,40
270	7	1	20,58	12,67	27,75	4,13	82,27	5,09	17,08
300	7	1	17,15	18,22	8,22	5,44	27,53	9,69	24,67
330	8	0	26,38	12,65	32,39	4,79	102,50	8,04	32,11
360	7	1	22,40	13,10	19,12	3,90	51,90	7,23	45,32
540	8	0	41,16	16,71	56,60	3,10	167,29	7,10	66,72
720	8	0	46,89	31,77	48,01	8,00	154,03	15,02	66,52

Tabelle 16: Quantitativer NK-Zellrekonstitution im Zeitverlauf mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

### CD56-Rekonstitution

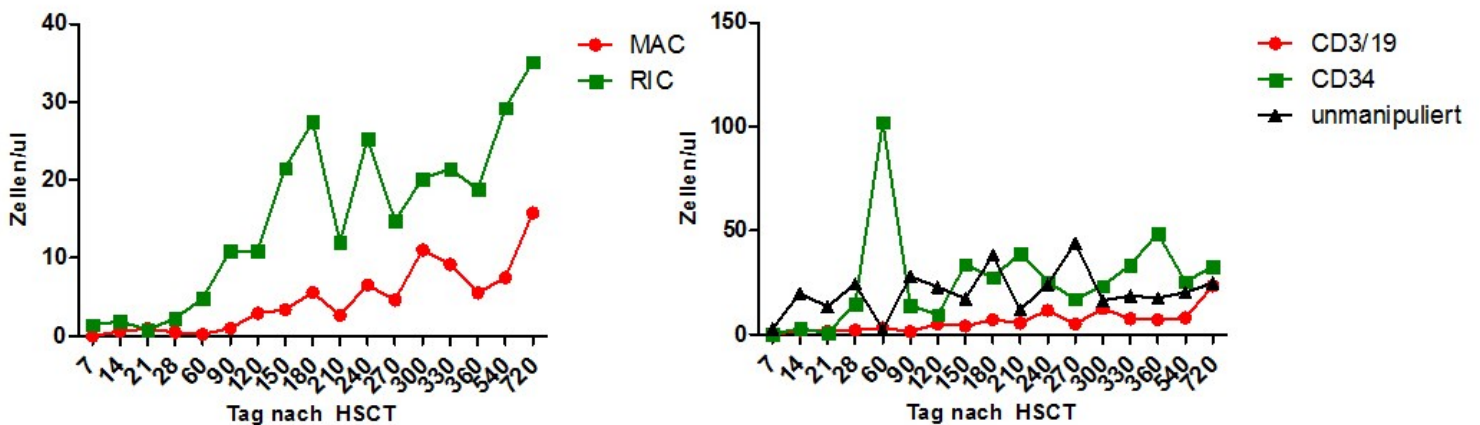


Abbildung 17: CD56-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion. Es wurden die median-Werte der Subpopulationen dargestellt. Man erkennt eine graphische Überlegenheit der RIC. Hinsichtlich der Konditionierung scheint es keine Vorteile zu geben.

#### 5.1.7 CD3/56-

Der CD3/56- - Verlauf hatte am Tag 14 nach HFD HSCT seinen Gipfel erreicht und wies danach relativ stetig nach unten – siehe Abbildung 18 und Tabelle 17. Einige Patientinnen und Patienten zeigten während des Follow-up vom ein auf den anderen Messpunkt einen enormen Anstieg der CD56-negativen Zellen, was im klinischen Kontext ein Hinweis auf eine Infektion sein konnte und so zum individuellen Monitoring verwendet werden konnte. Außerdem ist zu sagen, dass für eine Patientin bzw. einen Patienten nur ein Messwert an einem einzigen

Zeitpunkt vorhanden war und generell Messwerte für verschiedene Patientinnen und Patienten fehlten. Zwischen Konditionierung und Selektion ergaben sich keine statistisch Signifikanzen. Für die Konditionierung ließ sich weder für MAC noch für RIC eine graphische Tendenz bestimmen, man kann aber dennoch sagen, dass die Zahl an CD56- Zellen über den Verlauf stetig abnahm – siehe Abbildung 19. Es traten zwei Zellpeaks nach CD34+ Selektion auf, wobei je ein Peak mit je einer Patientin bzw. je einem Patienten korreliert der RIC + CD34+ über PBSC erhielt. Beide Patientinnen bzw. beide Patienten erhielten auch Stammzellboosts.

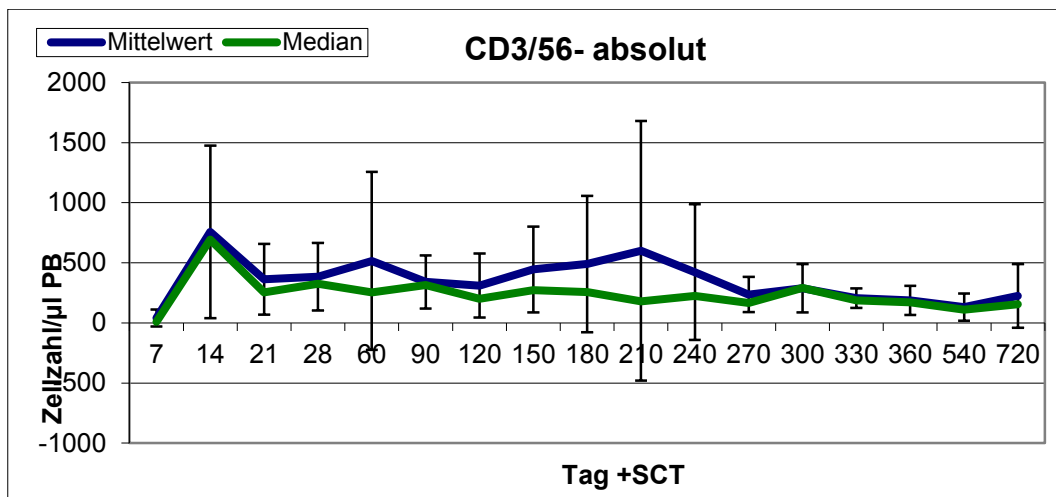


Abbildung 18: Rekonstitution der CD56-negativen Zellen. Dargestellt sind Mittelwert, Median und Standardfehler.

CD3/56- - Rekonstitution in Zellen/ul									
Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	5	3	41,16	8,08	71,41	,00	167,42	1,31	97,55
14	6	2	756,57	693,31	718,10	95,68	2094,20	152,06	1117,61
21	6	2	362,13	254,95	294,14	70,10	746,53	116,90	721,91
28	6	2	384,80	325,48	281,01	128,80	736,03	130,89	680,08
60	7	1	516,04	254,52	739,63	30,19	2090,80	50,49	781,19
90	7	1	340,94	315,86	221,96	98,70	735,23	149,80	494,76
120	7	1	310,54	201,43	265,84	62,08	839,16	145,23	469,04
150	7	1	444,61	271,92	355,97	82,93	1037,89	143,21	759,65
180	7	1	490,03	257,54	568,09	106,60	1748,08	239,01	514,10
210	6	2	600,54	179,02	1080,56	62,63	2801,72	100,86	900,88
240	7	1	422,71	223,68	565,50	68,01	1692,25	185,77	334,70
270	7	1	236,60	165,79	145,94	123,51	522,48	135,00	335,99
300	7	1	289,18	292,07	200,66	45,51	665,03	138,56	389,34
330	8	0	206,20	188,02	81,14	72,59	342,77	169,24	267,67
360	7	1	187,61	172,36	121,50	35,57	380,85	60,76	279,65
540	8	0	132,24	109,55	113,49	21,20	365,00	31,92	186,73
720	8	0	225,22	155,41	264,68	26,34	859,74	84,94	221,30

Tabelle 17: Quantitativer Zeitverlauf der CD56-negativen Zellen mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

## CD3/56- - Rekonstitution

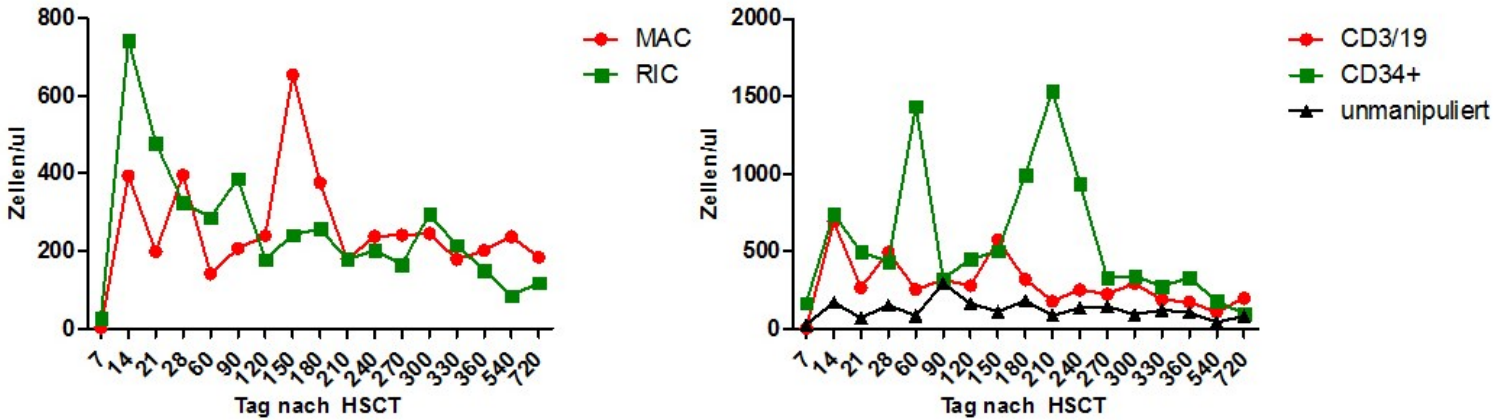


Abbildung 19: Rekonstitution der CD56- - Zellen im Vergleich zu Konditionierung und Selektion. Es wurden die median-Werte der einzelnen Subpopulationen verwendet. Es lassen sich einzelne Peaks für die CD34+ Selektion erkennen.

### 5.1.8 CD14+

Abbildung 20 und Tabelle 18 zeigen den zeitlichen Verlauf der Monozyten- und Makrophagen-Rekonstitution. Der Anstieg der Zellen erfolgte sehr rasch und war bereits am Tag 14 nach HFD HSCT mit einer median-Zellzahl von 485 CD14+/ul detektierbar. Im weiteren zeitlichen Verlauf hielt sich dieser Wert relativ stabil. Im Vergleich von Konditionierung und Selektion konnten weder statistische Signifikanzen noch eine graphische Überlegenheit festgestellt werden, wobei die CD14-Zellzahl unter RIC einen stabileren Verlauf ohne grobe Schwankungen wie bei MAC aufzuweisen schien – siehe Abbildung 21.

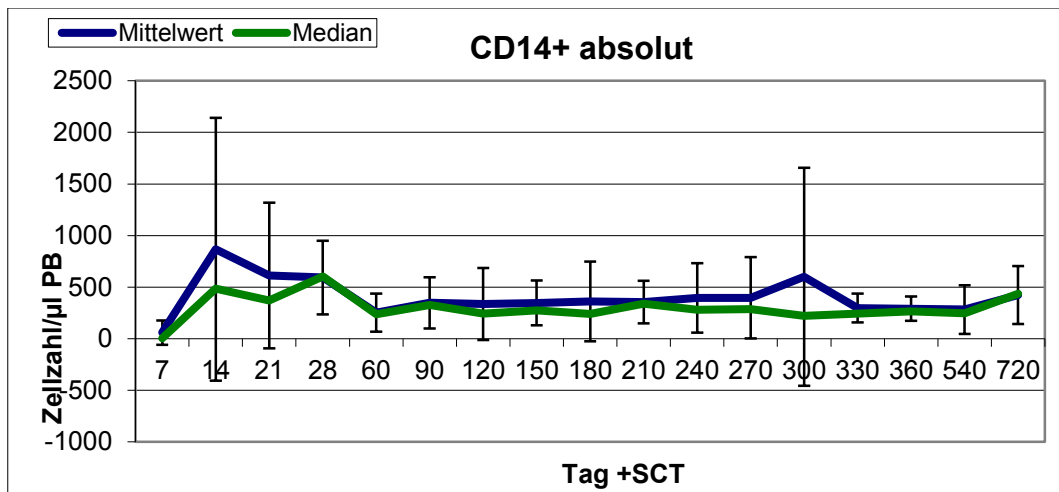


Abbildung 20: Immunrekonstitution der CD14-positiven Leukozyten. Dargestellt sind der Verlauf von Mittelwert und Median sowie Standardfehler.

### CD14+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	7	1	58,95	4,32	117,69	,00	319,77	1,16	70,33
14	8	0	866,87	485,06	1272,80	57,87	3949,46	198,75	786,95
21	8	0	612,03	369,46	706,33	177,56	2322,71	265,01	604,28
28	8	0	592,60	602,42	356,55	185,60	1155,99	226,01	907,94
60	8	0	253,67	236,08	184,71	36,18	642,94	109,56	299,86
90	8	0	348,08	325,39	248,13	100,69	871,42	147,60	445,45
120	8	0	335,38	241,77	349,55	29,71	1157,90	158,54	363,34
150	8	0	347,01	275,06	218,53	113,74	807,86	228,38	469,57
180	8	0	360,64	239,60	386,28	125,00	1292,04	153,27	366,12
210	7	1	354,63	340,35	205,75	40,43	686,02	209,00	491,99
240	8	0	395,35	279,20	336,39	104,85	1009,25	141,35	706,59
270	8	0	396,30	287,74	394,59	162,02	1355,90	185,89	353,13
300	7	1	600,32	221,61	1057,87	45,90	2988,08	110,72	358,53
330	8	0	296,60	243,10	140,41	148,16	524,72	177,42	437,55
360	7	1	290,79	263,89	118,76	197,78	542,59	208,58	321,98
540	8	0	282,44	246,77	235,62	64,44	794,42	103,64	358,26
720	8	0	423,11	436,78	282,06	117,00	1006,61	168,73	501,24

Tabelle 18: Quantitativer Zeitverlauf der CD14+ Zellen mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

### CD14-Rekonstitution

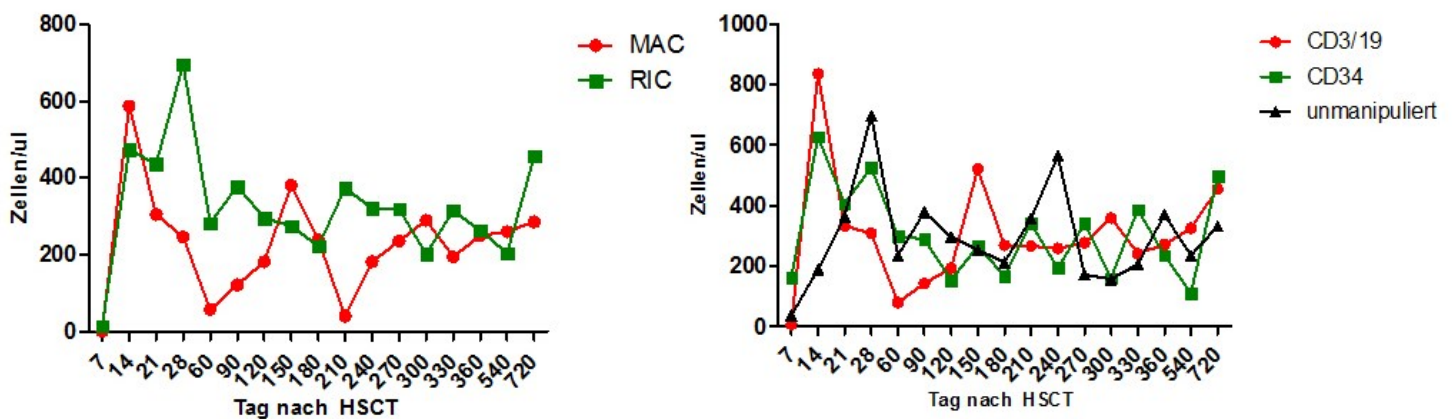


Abbildung 21: CD14-Rekonstitution im Vergleich von Konditionierung und Selektion. Es wurden die median-Werte der Subpopulationen verwendet. Es können keine eindeutigen Trends dargestellt werden, wobei die CD14-Zahl im Mittel bei RIC höher zu sein scheint.

#### 5.1.9 CD3/4/RA45+

Abbildung 22 und Tabelle 19 zeigen den Verlauf der Rekonstitution der naiven T-Helferzellen. Man bemerkt, genauso wie bei der CD3-, CD4-, CD8- und CD19-Dynamik, dass ein relativer Anstieg erst am Tag 60 nach HFD HSCT erfolgte. Der weitere Verlauf zeigte trotz Schwankungen relativ stetig nach oben. Für die beiden Patientinnen bzw. Patienten, die ein unselektiertes KM-Transplantat erhielten, war die CD3/4/RA45+-Zellzahl in den ersten 60 Tagen nach HFD HSCT viel höher als bei allen anderen Patientinnen und Patienten, jedoch

stieg ab dem Tag 60 nach HFD HSCT auch bei allen anderen Patientinnen und Patienten die Zellzahl und überschritt teilweise jene der KM-transplantierten Patientinnen und Patienten. Im Vergleich von Konditionierung und Selektion wiesen MAC und CD3/19-Negativselektion eine graphische Überlegenheit auf – siehe Abbildung 23. Der spätere Anstieg der MAC-Zellpopulation gegenüber jener unter RIC ist damit zu erklären, dass die beiden KM-Transplantierten wie weiter oben besprochen unter RIC konditioniert wurden und bei ihnen anfangs höhere Zellzahlen als bei den anderen Patientinnen und Patienten zu verzeichnen waren.

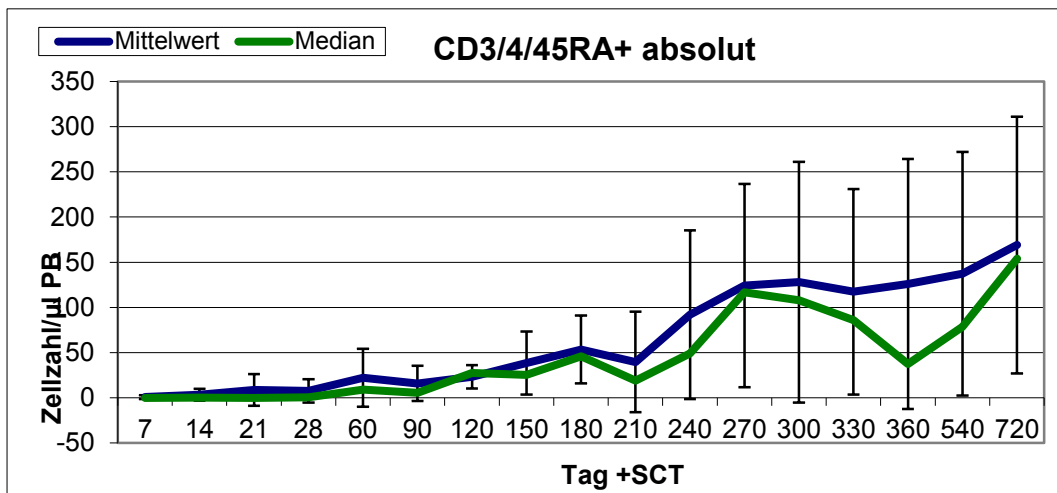


Abbildung 22: zeitlicher Verlauf der naiven T-Helferzellen. Dargestellt sind der Verlauf von Mittelwert und Median sowie Standardfehler.

CD4/RA45+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	7	1	,85	,00	2,15	,00	5,72	,00	,24
14	8	0	3,43	,21	6,54	,00	17,91	,00	6,52
21	8	0	8,83	,00	17,57	,00	49,50	,00	14,29
28	8	0	7,60	,67	12,80	,00	30,40	,07	20,20
60	8	0	22,23	9,09	31,99	,00	88,34	,15	43,70
90	8	0	15,91	5,38	19,52	,60	53,62	1,89	31,91
120	8	0	23,27	27,48	12,89	2,41	38,70	11,06	33,24
150	8	0	38,42	25,47	34,86	15,50	120,74	17,08	42,74
180	8	0	53,44	45,73	37,66	8,99	122,36	23,76	84,23
210	7	1	39,55	19,06	55,64	,00	157,00	5,85	61,99
240	8	0	92,07	49,01	93,34	6,58	237,12	16,49	196,24
270	8	0	124,09	116,89	112,39	10,47	340,12	15,94	186,87
300	7	1	127,92	108,00	133,29	11,39	385,15	14,08	206,72
330	8	0	117,33	86,02	113,64	4,79	283,31	12,19	230,56
360	7	1	126,00	37,28	138,45	4,68	323,59	23,72	311,76
540	8	0	137,31	78,61	134,85	7,08	369,77	27,83	269,70
720	8	0	169,14	153,79	142,05	10,72	414,48	34,91	276,56

Tabelle 19: Quantitativer Verlauf der naiven T-Helferzellen mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum,

Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

### CD3/4/45RA+-Rekonstitution

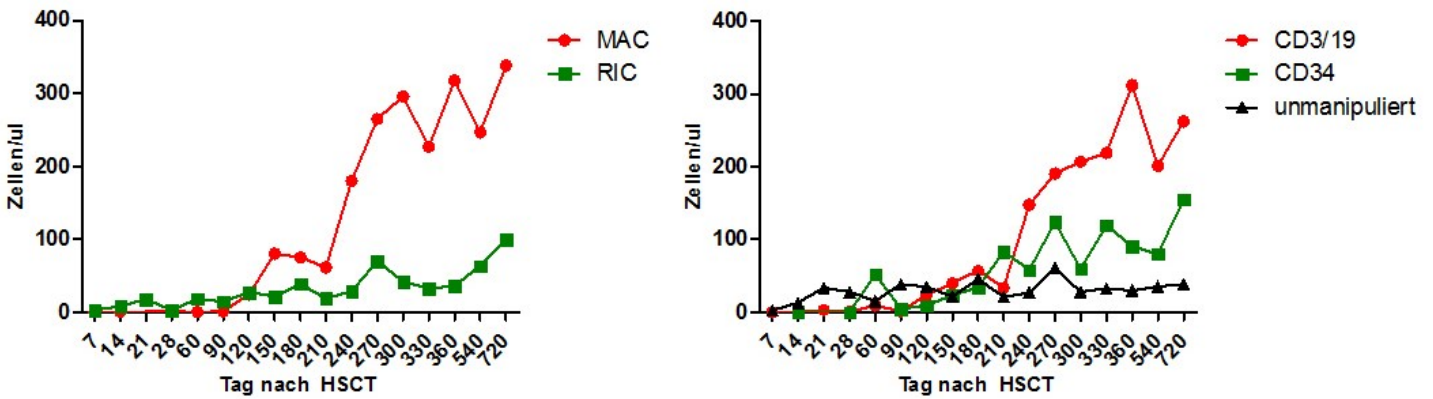


Abbildung 23: Die Rekonstitution naiver T-Helferzellen in Vergleich von Konditionierung und Selektion. Es wurden die median-Werte der Subpopulationen verwendet. Es zeigt sich eine graphische Überlegenheit von MAC und CD3/19-Selektion.

#### 5.1.10 CD3/8/45RA+

Abbildung 24 und Tabelle 20 zeigen den Verlauf der Rekonstitution von naiven T-Killerzellen. Der cut-off-point lag ebenfalls wieder am Tag 60 nach HFD HSCT. Der weitere Verlauf wies kontinuierlich nach oben. Die beiden KM-Transplantierten zeigten vor allem in den ersten 4 Wochen nach HFD HSCT im Vergleich zu den anderen Patientinnen und Patienten eine höhere Zellzahl an naiven T-Killerzellen. Die hohe Standardabweichung am Tag 270 nach HFD HSCT ist mit einem vorübergehenden Anstieg der Zellzahl einer Patientin bzw. eines Patienten, der KM als Transplantat erhielt, zu erklären. Im Vergleich von Konditionierung und Selektion konnten keine statistischen Signifikanzen festgestellt werden, jedoch zeigte sich eine graphische Tendenz zur Überlegenheit von MAC- siehe Abbildung 25. Der verspätete Zellzahlanstieg unter MAC lässt sich ebenfalls wieder durch die beiden KM-Transplantierten erklären. Im Bezug auf die Selektion konnte keine wirkliche graphische Tendenz festgestellt werden, jedoch war an einigen Messzeitpunkten die unmanipulierte Selektion überlegen.

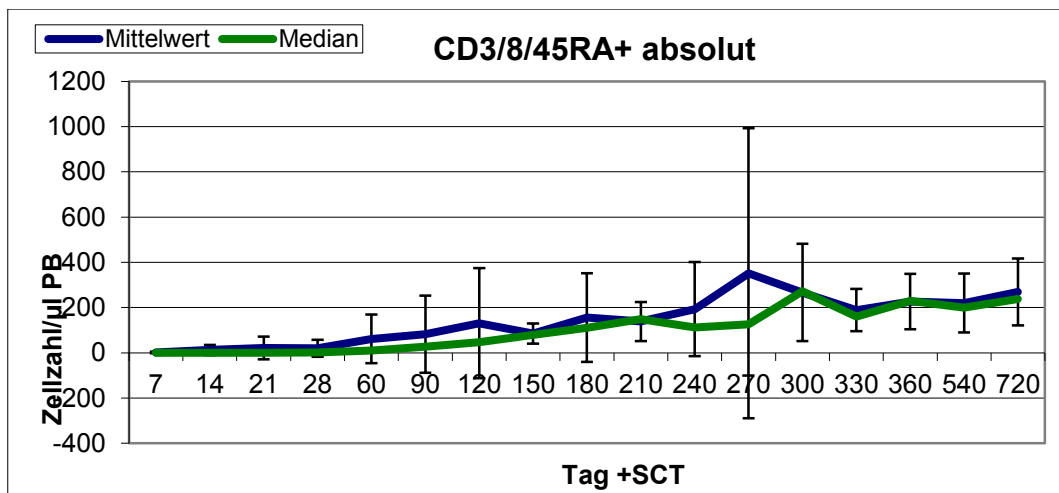


Abbildung 24: zeitlicher Verlauf der Rekonstitution der naiven T-Killerzellen. Dargestellt sind der Verlauf von

**CD8/RA45+ - Rekonstitution in Zellen/ul**

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	7	1	1,4	,0	3,4	,0	9,1	,0	,5
14	8	0	12,4	,6	23,1	,0	65,8	,0	19,9
21	8	0	21,5	,9	50,5	,0	145,1	,1	17,7
28	8	0	20,7	1,9	37,5	,0	101,6	,1	41,9
60	8	0	61,7	10,9	107,7	,0	312,8	4,1	91,5
90	8	0	82,4	27,1	170,1	,6	500,7	4,0	52,9
120	8	0	131,3	47,3	243,9	5,9	728,3	14,1	97,1
150	8	0	85,0	80,2	44,4	22,4	159,7	47,8	120,6
180	8	0	156,1	110,6	196,6	12,6	624,4	36,9	160,8
210	7	1	138,5	149,4	86,6	48,6	285,1	53,6	192,7
240	8	0	193,4	112,2	208,2	42,6	685,2	89,6	227,4
270	8	0	351,4	125,8	641,1	44,4	1928,0	63,1	229,6
300	7	1	266,9	272,4	215,1	21,8	662,4	68,8	363,4
330	8	0	189,2	160,5	93,9	82,7	354,6	128,7	276,6
360	7	1	226,5	230,3	122,1	76,8	437,6	101,3	298,5
540	8	0	220,4	199,9	129,5	79,1	389,0	94,4	360,3
720	8	0	269,7	238,4	147,8	98,6	588,0	179,6	327,2

Tabelle 20: Quantitativer Verlauf der Rekonstitution von naiven T-Killerzellen mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

### CD3/8/45RA+-Rekonstitution

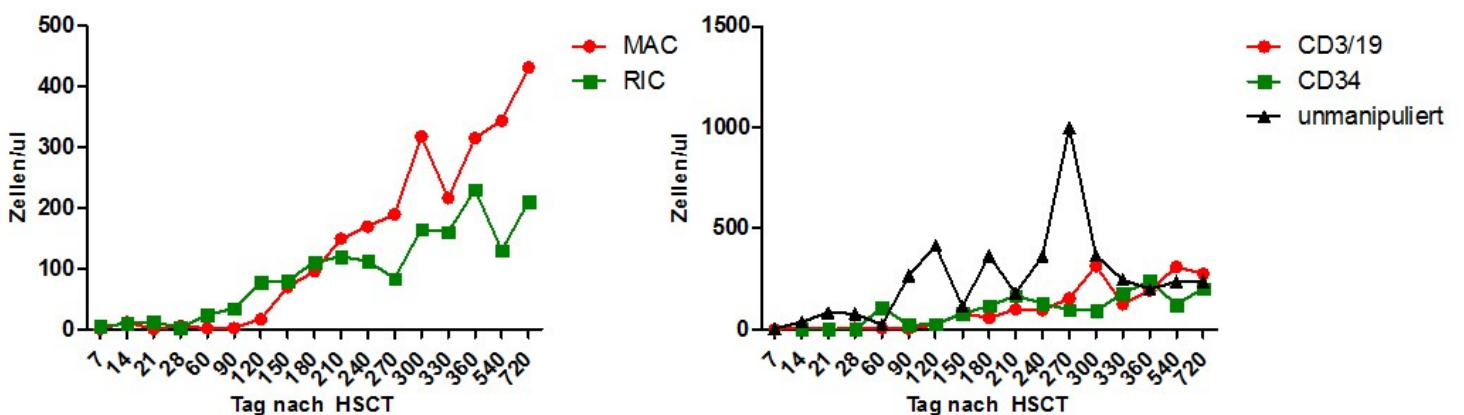


Abbildung 25: Die Rekonstitution naiver T-Killerzellen im Verlauf. Es wurden die median-Werte der Subpopulationen verwendet. Man erkennt eine graphische Überlegenheit der MAC.

#### 5.1.11 CD3/Ki67+

Für den Verlauf der T-Zellteilung ergab sich der cut-off-point ebenfalls wieder am Tag 60 nach HFD HSCT – siehe Abbildung 26 und Tabelle 21. Der weitere Verlauf war sehr großen

Schwankungen unterworfen und kommt dadurch zustande, dass bei 4 Patientinnen und Patienten bis zum Tag 180 nach HFD HSCT keine Messwerte vorhanden waren und danach auch an einigen Messzeitpunkten Messwerte für verschiedene Patientinnen und Patienten fehlten. Bezüglich Konditionierung und Selektion konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch war es nicht möglich einen graphischen Trend für die Subpopulationen, die vielen Schwankungen unterlagen, zu erkennen – siehe Abbildung 27. Dies ist auch damit zu begründen, dass für viele Patientinnen und Patienten zu vielen Messzeitpunkten keine Messungen vorhanden waren.

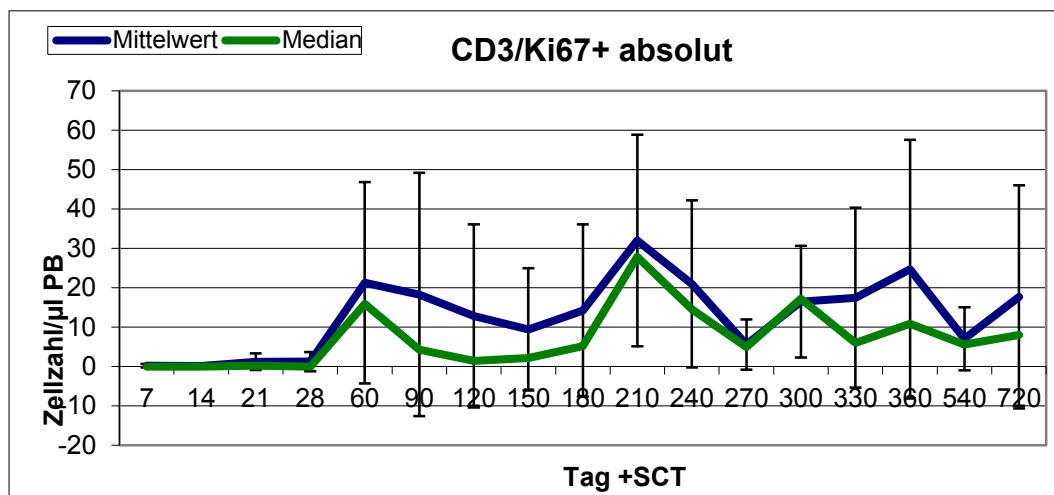


Abbildung 26: Verlauf der T-Zellteilung. Dargestellt sind Mittelwert, Median und Standardfehler.

#### CD3/Ki67+ - Rekonstitution in Zellen/ul

Tag nach HSCT	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Perzentile	
	Gültig	Fehlend						25	75
7	4	4	,21	,00	,41	,00	,82	,00	,62
14	4	4	,15	,00	,30	,00	,60	,00	,45
21	4	4	1,20	,21	2,13	,00	4,39	,00	3,40
28	4	4	1,23	,00	2,46	,00	4,91	,00	3,68
60	4	4	21,25	15,92	25,56	,00	53,17	,30	47,54
90	4	4	18,27	4,28	30,90	,00	64,51	1,00	49,53
120	4	4	12,82	1,40	23,25	,77	47,69	,91	36,14
150	4	4	9,41	2,17	15,51	,66	32,65	,96	25,11
180	4	4	14,21	5,17	21,89	,00	46,51	,34	37,13
210	4	4	32,02	27,80	26,86	9,36	63,11	9,47	58,79
240	6	2	20,97	14,49	21,23	,36	53,94	3,79	41,70
270	7	1	5,55	4,96	6,37	,00	18,98	,46	6,28
300	6	2	16,45	17,23	14,18	1,28	34,56	1,53	28,73
330	7	1	17,47	5,99	22,82	,35	62,20	,60	31,82
360	7	1	24,71	10,85	32,85	1,07	95,79	5,62	31,18
540	8	0	7,01	5,54	7,99	,00	21,18	,00	11,95
720	8	0	17,68	7,98	28,34	1,07	86,00	2,04	17,21

Tabelle 21: Quantitativer Verlauf der T-Zellteilung mit Berechnung von Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen. Es wurde der Median zur graphischen Visualisierung herangezogen.

## CD3/Ki67-Rekonstitution

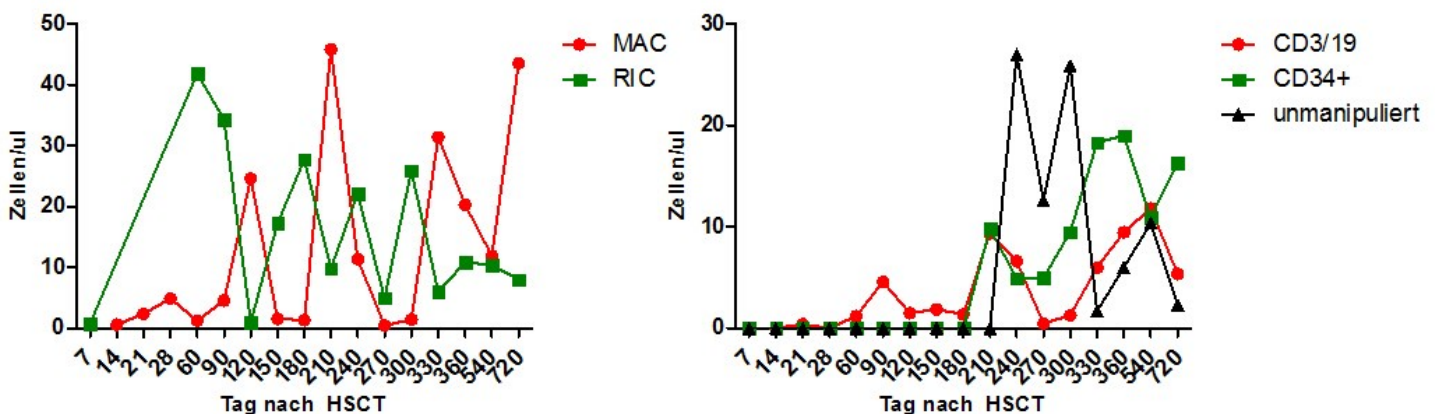


Abbildung 27: Teilungsrates der T-Zellen im Vergleich von Konditionierung und Selektion. Es wurden die median-Werte der Subpopulationen verwendet. Man kann deutliche Schwankungen in beiden Grafiken ohne eindeutigen Trend erkennen.

## 5.2 SPENDERINNEN- UND SPENDERCHIMÄRISMUSANALYSE

Die Chimärismusanalyse wurde parallel zu den Quantifizierungen der einzelnen Zellreihen an den gleichen Messzeitpunkten durchgeführt. Abbildung 28 und Tabelle 22 geben einen Überblick vom Gesamtchimärismusverlauf des Patientinnen- und Patientenkollektivs. Unter der Kombination MAC + CD3/19-Negativselektion aus PBSC (n=2) trat ein nahezu voller Chimärismus (>95%) bereits in den ersten 2-3 Wochen ein. Die Chimärismuskonversion in einen nahezu vollen Chimärismus erfolgte unter der Kombination RIC + CD34+ (n=3) bzw. CD3/19 (n=1) ebenfalls relativ rasch, jedoch nicht so rasch wie unter MAC + CD3/19. Der Grund hierfür ist, dass eine Patientin bzw. ein Patient, der eine HFD HSCT mit RIC + CD34+ über PBSC erhielt trotz Stammzellboost im gesamten Follow-up bei Weitem keinen kompletten Chimärismus zeigte (Höchstwert von 44% am Tag 720 nach HFD HSCT) obwohl auch ATG im Konditionierungsschema enthalten war. Dies ist auch der Grund dafür, dass im Verlauf der Mittelwert generell dem Median unterliegt. Die Kombination von RIC + unmanipuliertem KM zeigte ebenfalls einen sehr raschen Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismusübergang, wobei dieser nicht so schnell wie unter den zuvor genannten Varianten vonstatten ging. Zum Ende des Follow-up (Tag 720 nach HSCT) wiesen alle Patientinnen und Patienten - bis auf die erwähnte Patientin bzw. den erwähnten Patienten, die bzw. der die große Ausnahme bildete – einen Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus von zumindest 97% auf, wobei 5 Patientinnen und Patienten einen 100%igen Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus vorzeigen konnten. Abbildung 29 gibt einen Überblick über den Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismusübergang im Vergleich von Konditionierung, Selektion und Ressource.

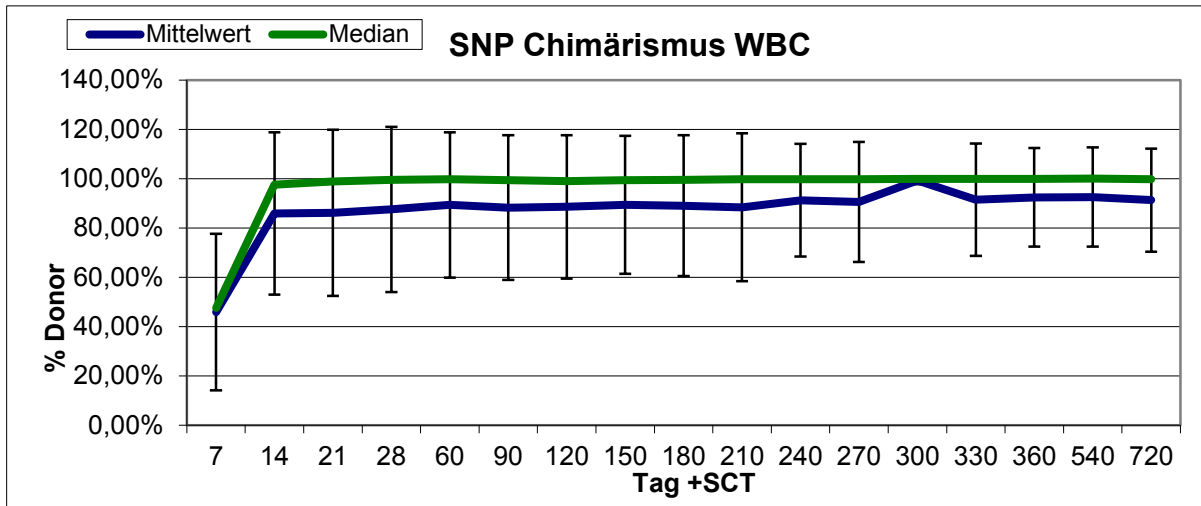


Abbildung 28: Spenderchimärismusverlauf. Der Mittelwert ist durch den Patienten, der über den ganzen Verlauf keinen vollen Chimärismus zeigte nach unten verschoben.

Tag nach HSCT	N		Mean	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum
	Valid	Missing					
7	8	0	,45888	,47600	,317829	,017	,796
14	8	0	,85850	,97600	,329414	,046	1,000
21	8	0	,86113	,98900	,336999	,029	1,000
28	8	0	,87550	,99600	,335262	,046	1,000
60	8	0	,89363	,99800	,294822	,164	1,000
90	8	0	,88288	,99350	,292977	,160	1,000
120	8	0	,88550	,98950	,291201	,165	,997
150	8	0	,89375	,99400	,279634	,202	1,000
180	8	0	,89063	,99550	,285327	,185	1,000
210	7	1	,88414	,99800	,299926	,204	1,000
240	8	0	,91300	,99800	,228151	,349	1,000
270	8	0	,90563	,99750	,243390	,304	1,000
300	7	1	,99314	,99900	,015561	,958	1,000
330	8	0	,91475	1,00000	,227578	,352	1,000
360	8	0	,92388	,99850	,200201	,429	1,000
540	8	0	,9259	1,0000	,20204	,43	1,00
720	7	1	,9130	,9980	,20974	,44	1,00

Tabelle 22: Quantitative Übersicht über den Spenderchimärismusübergang. Es sind Mittelwert, Median, SD, Minimum und Maximum zu den einzelnen Messzeitpunkten dargestellt.

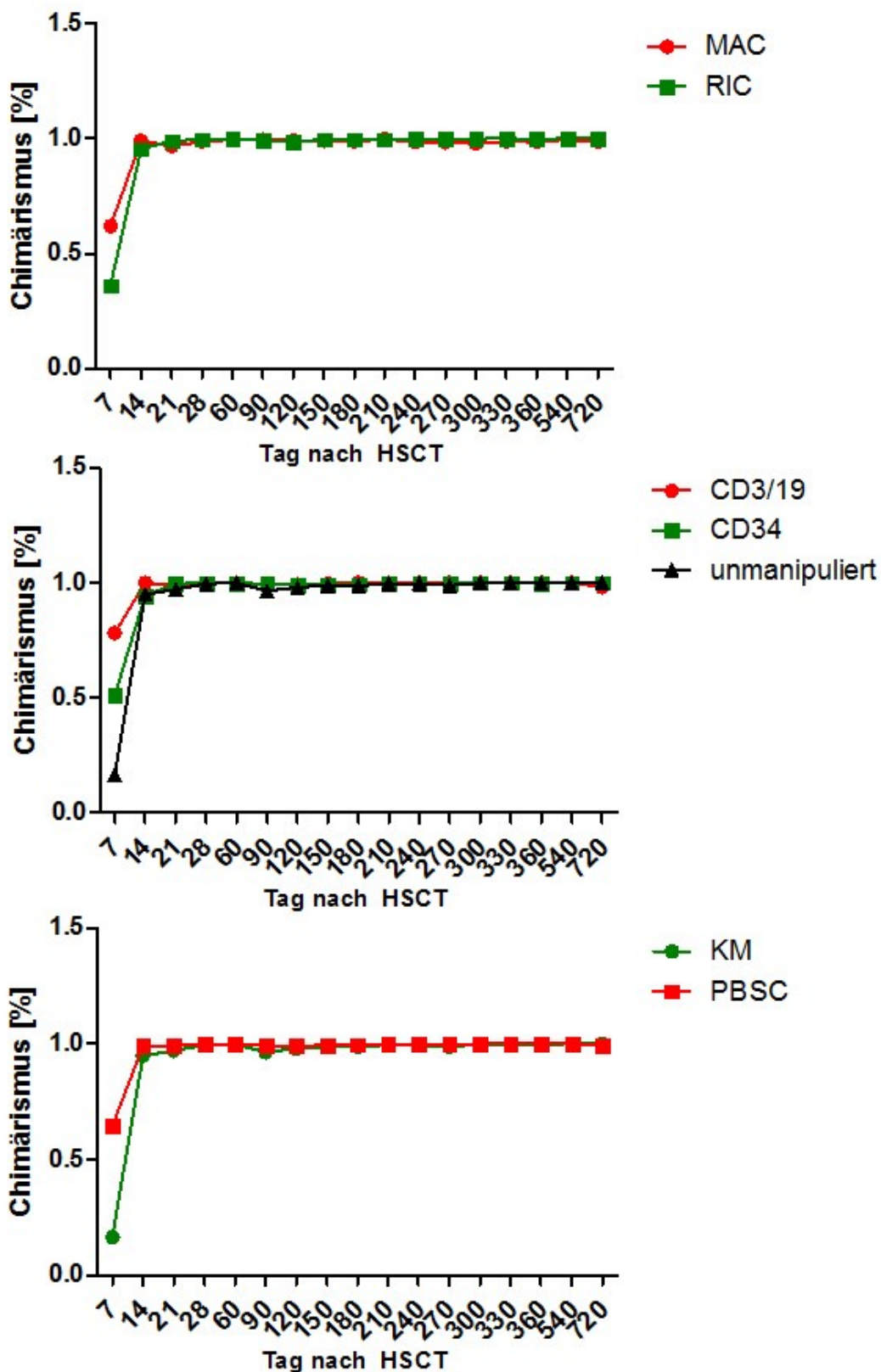


Abbildung 29: Chimärismusanalyse im Vergleich von Konditionierung, Selektion und Ressource. Die Konvertierung in einen kompletten Chimärismus erfolgte unter MAC schneller als unter RIC. Die CD3/19-Negativselektion erwies sich ebenfalls als günstig im Verlauf. PBSC erwies sich außerdem als vorteilhaft, wobei 100% der MAC-Patienten mit PBSC und CD3/19-Negativselektion kombiniert wurden.

### 5.3 TREC-ANALYSE

Die TREC-Analyse erfolgte an allen Messzeitpunkten parallel zur Quantifizierung der Zellsubtypen. Abbildung 30 und Tabelle 23 zeigen den zeitlichen Verlauf der TREC-Analyse. Der Median ist in diesem Fall unbrauchbar, da einige Patientinnen und Patienten keinen bzw. sehr geringe TREC-Werte verzeichneten. Drei Patientinnen bzw. Patienten wiesen im gesamten Follow-up keine detektierbaren TRECs im Blut auf. Eine bzw. einer dieser Patientinnen und Patienten wurde mittels RIC + CD3/19-Negativselektion und PBSC transplantiert, zwei andere mittels unmanipuliertem-KM unter RIC. Bei den anderen Patientinnen und Patienten war im gesamten Verlauf zumindest ein positiver TREC-Wert zu detektieren. Die beiden Patientinnen bzw. Patienten die mit MAC + CD3/19-Negativselektion transplantiert wurden, wiesen dabei die höchsten TREC-Werte auf – siehe Abbildung 31. Obwohl statistisch kein signifikanter Unterschied im Bezug auf Konditionierung und Selektion feststellbar war (die p-Werte für den Vergleich von MAC vs. RIC erreichten im unabhängigen Mann-Whitney U Test annähernd statistische Signifikanz [0,07-0,091 für die Messpunkte am Ende des Follow-up]), kann man mittels graphischer Inspektion feststellen, dass es einen Trend zu erhöhten TREC-Werten bei der Verwendung von MAC und CD3/19 gibt. Der gleiche Trend lässt sich auch in der größeren Patientinnen- bzw. Patientengruppe (n=16) darstellen, obwohl hier auch hohe TREC-Werte unter der  $\alpha/\beta/19$ -Depletion feststellbar waren. Diese wurden aber vor allem durch eine einzige Patientin bzw. einen einzigen Patienten erzielt bzw. war das Follow-up für viele Patientinnen und Patienten unter  $\alpha/\beta/19$ -Depletion zu kurz und sie verstarben verfrüht.

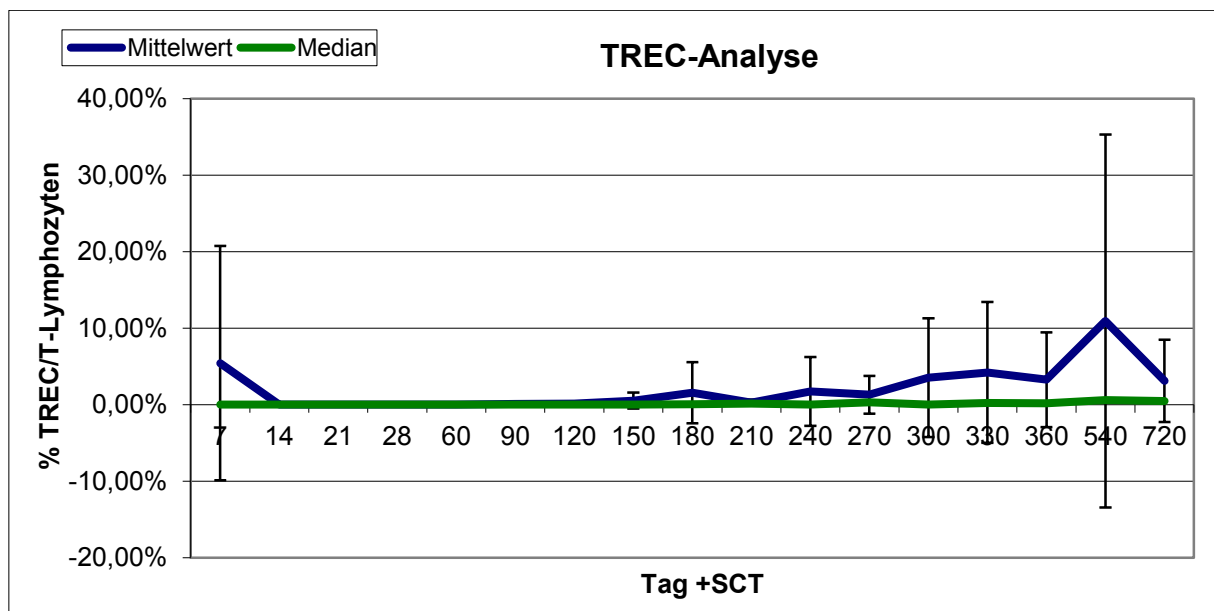


Abbildung 30: TREC-Analyse im Zeitverlauf. Es wurden Mittelwert und Median aufgetragen. Der Median ist für eine Aussage in diesem Fall unbrauchbar, da einige Patientinnen keinen TREC-Anstieg zeigten.

TREC-T-Lymphozyten [%]/100							
Tag nach HSCT	N		Mean	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum
	Valid	Missing					
7	8	0	,054	,000	,152	,000	,430
14	8	0	,000	,000	,000	,000	,000
21	8	0	,000	,000	,000	,000	,000
28	8	0	,000	,000	,000	,000	,000
60	8	0	,000	,000	,000	,000	,000
90	8	0	,001	,000	,004	,000	,010
120	8	0	,001	,000	,004	,000	,010
150	8	0	,006	,000	,011	,000	,030
180	8	0	,014	,000	,039	,000	,110
210	7	1	,003	,000	,005	,000	,010
240	8	0	,018	,000	,046	,000	,130
270	8	0	,013	,000	,024	,000	,070
300	7	1	,034	,000	,078	,000	,210
330	8	0	,041	,000	,091	,000	,260
360	7	1	,033	,000	,063	,000	,170
540	8	0	,110	,010	,244	,000	,700
720	8	0	,031	,005	,054	,000	,140

Tabelle 23: Quantitativer Verlauf der TREC-Analyse. Es sind Mittelwert, Median, SD, Minimum und Maximum dargestellt.

### TREC-Analyse

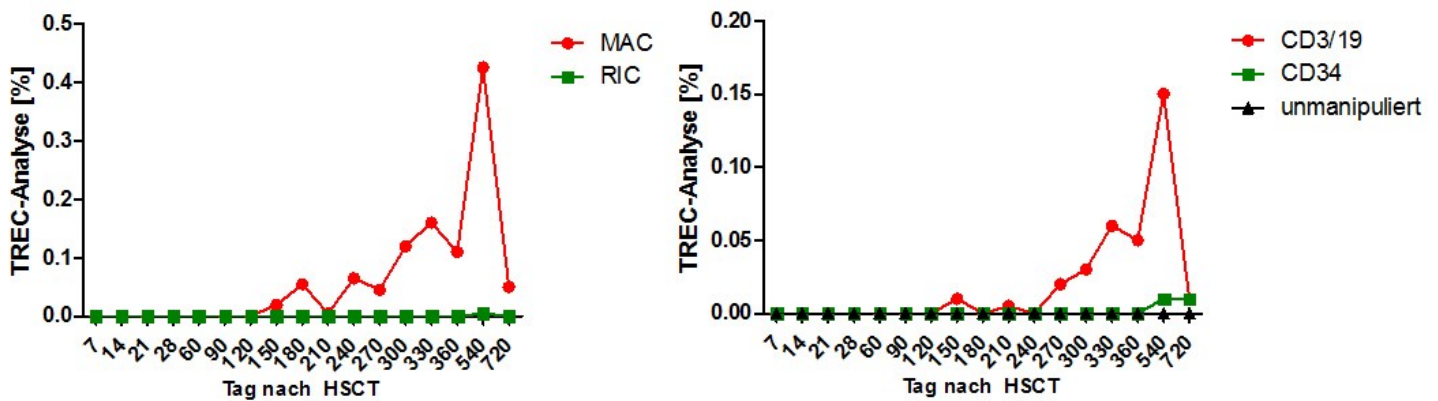


Abbildung 31: TREC-Analyse im Vergleich von Konditionierung und Selektion. Es sind die Werte in [%] für die TREC-Lymphozyten angegeben. Man erkennt, dass MAC und CD3/19 graphisch überlegen erscheinen.

### 5.4 SPECTRATYPING-ANALYSE

Die Spectratyping-Analyse erfolgte an den Tagen 60, 120, 240, 360, 540 und 720 nach HFD HSCT. Es wurde ein Complexity Scale für die Vβ-Familie des TCR errechnet um auf eine mono-, oligo- oder polyklonale Vermehrung von T-Zellklonen rückschließen zu können und somit ein Monitoring bezüglich Infektionen etc. betreiben zu können. Abbildungen 32 und 33 und Tabellen 24 und 25 zeigen den zeitlichen Verlauf des CS für den TCR der CD4+- und CD8+-Zellen. Die Unterschiede zwischen Median und Mittelwert für den TCR der CD8+-Zellen

ergeben sich durch fehlende Messwerte bzw. Abweichungen vom polyklonalen Muster der Gauß'schen Glockenkurve für einzelne Patientinnen und Patienten, was ein Hinweis auf monoklonale Expansion war und möglicherweise einer Infektion bzw. GvHD zu Grunde lag. Dies untermauern die Daten einer Patientin bzw. eines Patienten, welcher einen drastischen Abfall des CS für sowohl CD4- als auch CD8-TCR ca. 1 Jahr nach HFD HSCT erfuhr. In der Patientinnen- bzw. Patientengeschichte zeigte sich genau zu diesem Zeitpunkt eine manifeste Ausprägung einer cGvHD mit akuten Teilverläufen, was das Absinken des CS aufgrund einer monoklonalen Lymphozytenexpansion erklären könnte. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Bezug auf Konditionierung und Selektion festgestellt werden, wobei graphisch tendentiell der CS nach MAC und CD3/19-Negativselektion schneller zunimmt als nach RIC, obwohl er initial unter dem von RIC liegt – siehe Abbildungen 34 und 35. Dass der CS von RIC initial über dem von MAC liegt, liegt wahrscheinlich daran, dass bei RIC mehr residuale T-Zellen im Graft mittransplantiert werden und der Score dadurch höher ausfällt. Da für eine Patientin bzw. einen Patienten der 2 KM-Transplantierten Werte für den CS sowohl für den CD4+- als auch CD8+-TCR fehlten, kann die graphische Analyse für unmanipuliertes KM nicht interpretiert werden.

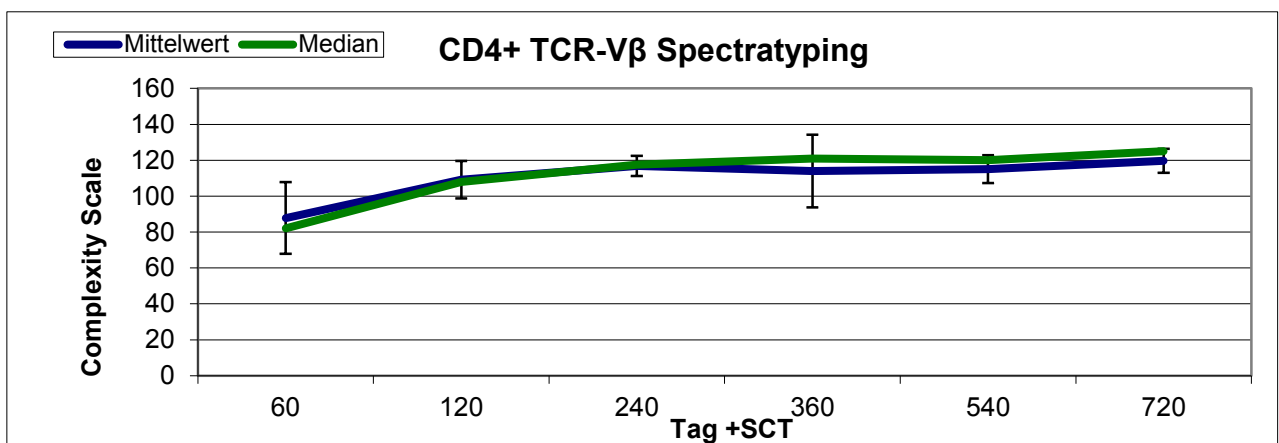


Abbildung 32: Spectratyping des TCR der CD4+-Zellen. CS mittels Mittelwert und Median dargestellt. Man sieht einen relativ stetigen Verlauf nach oben, was einer polyklonalen Gesamtverteilung entspricht.

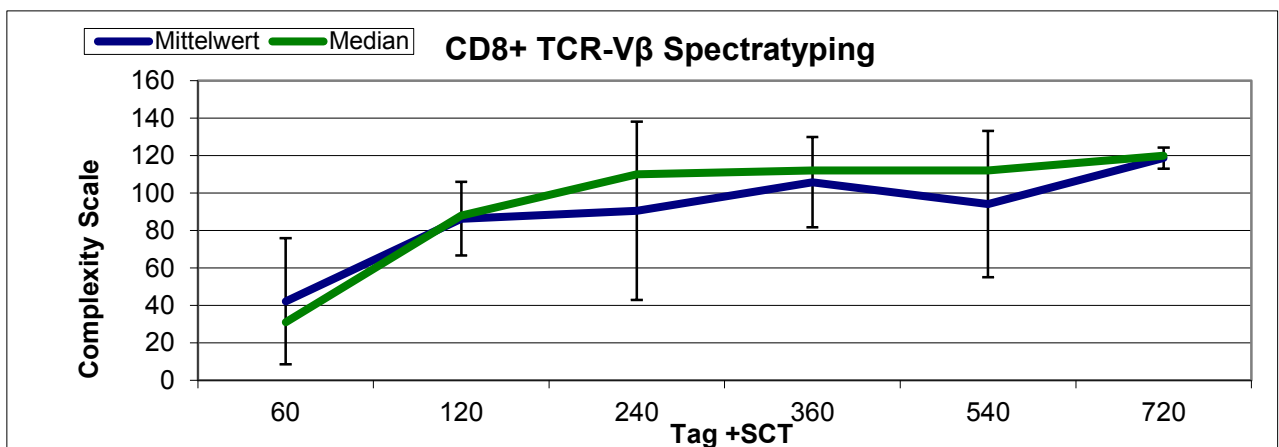


Abbildung 33: Spectratyping des TCR der CD8+-Zellen. CS mittels Mittelwert und Median dargestellt. Man sieht, dass sich sowohl Mittelwert als auch Median stetig Richtung polyklonaler Gesamtverteilung orientieren.

### CS-CD4+

	N		Mean	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles	
	Valid	Missing						25	75
60	8	0	54,88	71,00	47,89	,00	113,00	,00	97,00
120	8	0	81,88	105,00	51,29	,00	122,00	23,75	117,00
240	6	2	116,83	117,50	5,64	110,00	125,00	110,75	121,25
360	6	2	114,00	121,00	20,24	73,00	125,00	107,50	125,00
540	7	1	186,43	120,00	184,23	105,00	604,00	113,00	123,00
720	8	0	104,75	120,00	42,78	,00	125,00	111,25	125,00

Tabelle 24: CS für den CD4+-TCR. Es wurden Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen errechnet.

### CS-CD8+

Tag nach HSCT	N		Mean	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles	
	Valid	Missing						25	75
60	8,00	,00	26,38	15,50	33,56	,00	93,00	,00	49,75
120	8,00	,00	64,75	76,50	43,28	,00	117,00	15,50	93,50
240	6,00	2,00	90,50	110,00	47,65	,00	125,00	57,00	122,75
360	6,00	2,00	105,83	112,00	24,19	61,00	125,00	90,25	125,00
540	7,00	1,00	94,14	112,00	39,02	14,00	125,00	76,00	120,00
720	8,00	,00	103,88	120,00	42,30	,00	125,00	109,75	122,25

Tabelle 25: CS für den CD8+-TCR. Es wurden Mittelwert, Median, SD, Minimum, Maximum und Perzentilen errechnet.

### Complexity Scale, CD4+

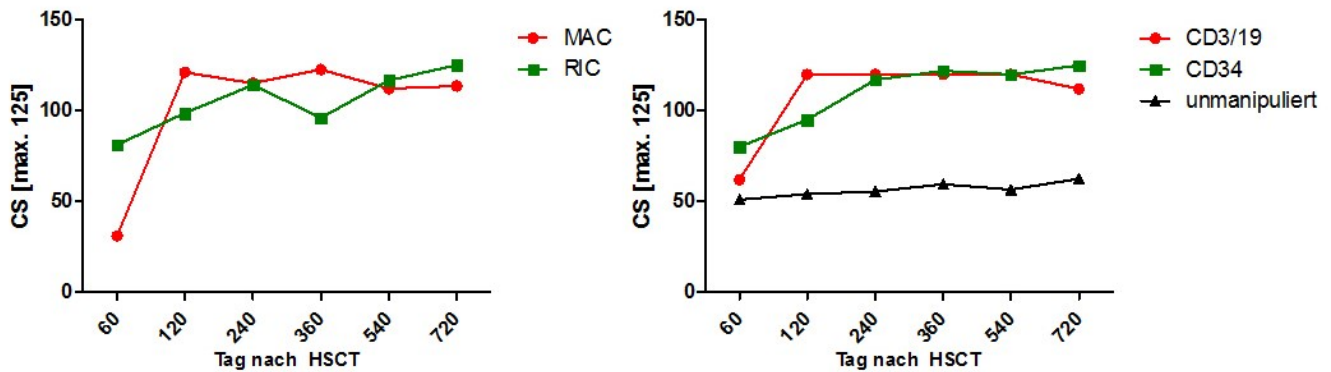


Abbildung 34: CS des CD4+-TCR im Bezug auf Konditionierung und Selektion. Der CS nach MAC ist anfangs eindeutig niedriger als jener nach RIC, steigt aber schnell an und liegt danach tendenziell über dem CS nach RIC. Gleiches gilt für CD3/19- und CD34 Selektion

## Complexity Scale, CD8+

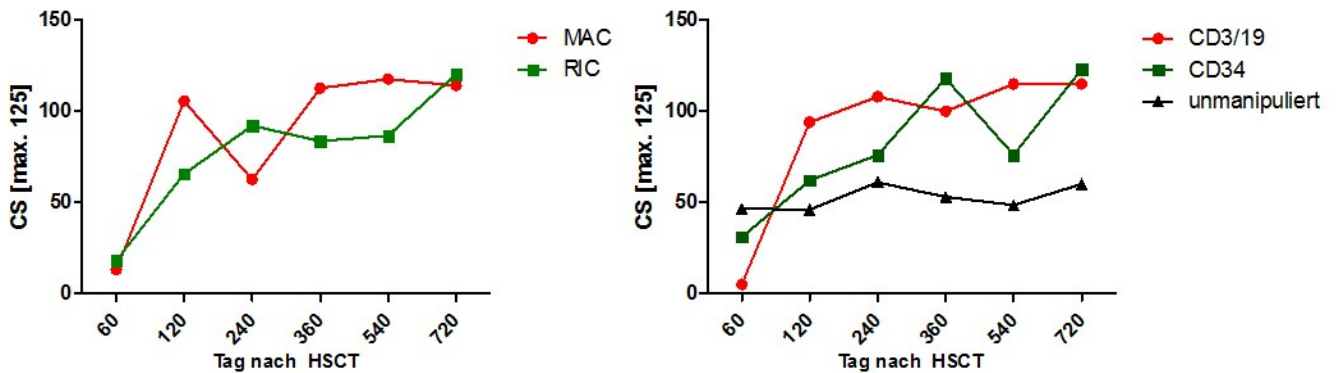


Abbildung 35: Complexity Scale des CD8+-TCR im Bezug auf Konditionierung und Selektion. Der CS für MAC und CD3/19 liegt initial unter dem nach RIC, jedoch steigen beide schneller an als die Kurve für RIC. Gleiches gilt für CD3/19 und CD34 Selektion.

## 5.5 STATISTISCHE TESTS

Trotz begrenzter Verwendbarkeit und Verwertbarkeit statistischer Tests bei einem sehr kleinen Patientinnen- und Patientenkollektiv (n=8) wurde versucht, die Subgruppen (Konditionierung, Selektion, verwendete Ressource) auf signifikante Überlegenheiten zu testen und wenn vorhanden, diese zu diskutieren.

### KONDITIONIERUNG

Zum Vergleich der beiden Konditionierungstherapien (RIC, MAC) wurde der unabhängige Mann-Whitney U Test verwendet. Statistisch konnte weder für die Gesamtleukozytenrekonstitution noch für einzelne Zellreihen signifikante ( $p < 0,05$ ) Überlegenheiten festgestellt werden. Auch der Chimärismus mittels SNP, TREC-Count und CS (CD4+, CD8+) des TCR waren im Vergleich der beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

### SELEKTION

Es konnte am Tag 28 für die CD8+-Rekonstitution ein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Selektionen (CD3/19-Negativselektion, CD34+, unmanipuliert) festgestellt werden ( $p=0,42$ , unabhängiger Kruskal-Wallis Test).

### RESSOURCE

Im unabhängigen Mann-Whitney U Test ergaben sich statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede zwischen KM und PBSC weder für die Gesamtleukozytenrekonstitution noch für einzelne Zellreihen. Auch der Chimärismus mittels SNP, TREC-Count und CS (CD4+, CD8+) des TCR waren im Vergleich der beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

## 5.6 INFEKTIONSMONITORING

Alle überlebenden Patientinnen und Patienten sind im Follow-up regelmäßig auf das Auftreten von Infektionen kontrolliert worden. Virale Infektionen wurden mittels PCR-Screening detektiert, Pilzinfektionen per Antigennachweis und bakterielle Infektionen mittels Kultur nachgewiesen. Anhand der Patientinnen- und Patientenakten wurde versucht so gut wie möglich eine Zusammenfassung über klinisch aufgetretene Erreger zu erstellen, wobei für 2 von 8 Patientinnen und Patienten keine digitalen Patientinnen- bzw. Patientenakten zur Verfügung standen. Erreger sowie quantitatives Auftreten in der Patientinnen- bzw. Patientengruppe sind in Tabelle 26 dargestellt. 2 Patientinnen und Patienten waren Adenovirus-positiv, wobei dieser bei einer Patientin bzw. einem Patienten im Blut mittels PCR und bei der anderen Patientin bzw. beim anderen Patienten im Rachenspülwasser detektiert worden war. 2 Patientinnen und Patienten waren BK-Virus-positiv, wobei eine Patientin bzw. ein Patient eine BK-positive Cystitis mit latenter BK-Besiedelung und eine andere Patientin bzw. ein anderer Patient wiederholten Nachweis von BK-Virus im Blut und Harn aufweisen konnte. Zweitere Patientin bzw. zweiterer Patient litt an rezidivierenden Harnwegsinfekten. Beide Patientinnen mit BK-Infektion waren weiblichen Geschlechts. Eine CMV-Reaktivierung trat bei einer Patientin bzw. bei einem Patienten auf, konnte aber erfolgreich mit Gancyclovir behandelt werden. EBV und HHV-6 konnten bei jeweils einer Patientin bzw. bei einem Patienten nachgewiesen werden. HHV-7 konnte bei 2 Patientinnen und Patienten nachgewiesen werden und trat klinisch in Form von Ösophagitis (n=1) und bei einer gastroduodenalen SH-Biopsie (n=1) auf. HSV war bei einer Patientin bzw. einem Patienten der Grund für eine Infektion der oberen Luftwege. Noroviren waren bei insgesamt 2 Patientinnen und Patienten für eine Gastroenteritis verantwortlich, welche in einem Fall während eines kurzen stationären Aufenthaltes behandelt werden musste. Parvovirus konnte bei 2 Patientinnen und Patienten detektiert werden und war bei einer Patientin bzw. bei einem Patienten in Kombination mit einer HHV-7 Infektion als klinisches Bild einer Ösophagitis vertreten. Rotavirus war bei 2 Patientinnen und Patienten für Gastroenteritiden verantwortlich. Staphylococcus aureus konnte bei insgesamt 3 Patientinnen und Patienten detektiert werden. Eine Patientin bzw. ein Patient erlitt eine Port-a-Cath Infektion (zusammen mit Staphylococcus epidermidis) und entwickelte eine septische Arthritis des linken Knie zusammen mit einer Osteomyelitis des distalen Femur welche nach Punktion PCR-positiv für Staphylococcus aureus waren. Eine andere Patientin bzw. ein anderer Patient erkrankte an einer Otitis media. VZV trat als Herpes zoster bei 2 Patientinnen und Patienten jeweils in thorakalen Segmenten auf.

		n	hi[%]
<b>Erregernachweis</b>	Adenovirus	2	25%
	BK-Virus	2	25%
	CMV	1	12,50%
	EBV	1	12,50%
	HHV-6	1	12,50%
	HHV-7	2	25%
	HSV	1	12,50%
	Norovirus	2	25%
	Parvovirus	2	25%
	Rotavirus	2	25%
	Staph. Aureus	3	37,50%
	Staph. Epidermidis	1	12,50%
	VZV	2	25%

Tabelle 26: Quantitativer Erregernachweis in der Patientengruppe aller überlebenden Patienten (n=8)

## 5.7 GvHD

Die Daten über die Entwicklung und den Verlauf einer GvHD wurden ebenfalls den digitalen Patientinnen- und Patientenakten entnommen. Für 2 Patientinnen und Patienten waren keine Aufzeichnungen vorhanden. Es wurde versucht so gut wie möglich eine Klassifizierung der GvHD in Form einer Stadieneinteilung zu treffen. Einen Überblick gibt Tabelle 27.

		n	hi [%]
<b>GHVD</b>	akut	S I-II	2 25%
		S III-IV	1 12,50%
	chronisch	alle Stadien	2 25%

Tabelle 27: Übersicht über Anzahl und Schweregrad der aufgetretenen GvHDs.

Eine akute GvHD Stadium I-II trat bei 25% der Patientinnen und Patienten auf, wobei sich diese primäre als cutane Manifestation in Form eines makulopapulären Exanthems äußerte. Eine akute GvHD Stadium III-IV konnte bei einer Patientin bzw. bei einem Patienten beobachtet werden. Diese setzte sich aus einer cutanen GvHD Stadium I-II, welche mit Steroiden gut therapiert werden konnte und einer GvHD Stadium II des Darms zusammen. Eine Patientin bzw. ein Patient entwickelte eine chronische GvHD in Form eines Vitiligo, wobei das Auftreten desselben nicht klar von anderen Einflüssen abgrenzbar war und es erst relativ spät im Follow-up ohne weitere klinische Hinweise einer GvHD auftrat. Diese Patientin bzw. dieser Patient konnte mit topischen Steroiden gut behandelt werden. Eine andere Patientin bzw. ein anderer Patient entwickelte eine chronische GvHD von Leber, Gastrointestinaltrakt, respiratorischem Trakt und zusätzlich eine Keratoconjunctivitis sicca. Diese Patientin bzw. dieser Patient wurde initial durch eine immunsuppressive Therapie mit Ciclosporin und Steroiden behandelt, sowie eine Anpassung der Therapie im Verlauf vorgenommen.

## 5.8 MORTALITÄT

Von 6 verstorbenen Patientinnen und Patienten starben mindestens 5 an einer Tumorprogression und eine Patientin bzw. ein Patient aus einem kombinierten Ereignis aus TRM (GvHD) und Tumorprogression. Alle der verstorbenen Patientinnen und Patienten litten an hochmalignen, teilweise mehrfach rezidierten, chemotherapieresistenten Grunderkrankungen, wobei 5 von 8 Patientinnen und Patienten an soliden Tumoren litten. Während der individuellen Verläufe nach HFD HSCT traten viele komplikationsträchtige Ereignisse wie – GvHD assoziierte capillary leak Aszites, Mukositis, Neurotoxizität, Verwirrtheit, Tremor, Thrombozytopenie, Gastroenteritiden, interstitielle Pneumonien, hyperakute GvHD der Lunge, Pleuraergüsse, GvHD der Haut, Keratoconjunctivitis sicca, GvHD-Hepatopathien, chronische GvHD, schwerwiegende Infektionen etc. – auf, die teilweise einen Aufenthalt auf der Intensivstation mit durchgehendem Monitoring und hochtoxischer immunsuppressiver Therapie bei GvHD bzw. Absetzen der toxischen Medikation bei RRT nötig machten. Viele dieser Ereignisse konnten auch mit den hochtoxischen Konditionierungsschemata und oftmaligen DLIs assoziiert werden und waren der limitierende Faktor in der Therapie. Obwohl für einige dieser 6 Patientinnen und Patienten temporäre Remission nach HFD HSCT erreicht werden konnte, war die HFD HSCT eher als experimentelle Therapie nach Ausschöpfung aller möglichen anderen Maßnahmen zu betrachten.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die größte Schwierigkeit eine Aussage bezüglich Immunrekonstitution zu treffen, stellt das sehr kleine Patientinnen- und Patientenkollektiv (n=8) dar, das durch die Grunderkrankungen unterschiedlicher Ausprägung, verabreichte Zahl an CD34+- bzw. CD3+-Zellen bei HSCT, die verschiedenen verwendeten Ressourcen (KM, PBSC), Konditionierungsverfahren (MAC, RIC), Selektionen (CD3/19, CD34, unmanipuliert), erhaltene STZ-Boosts und auch Patientinnen- und Patientenalter äußerst heterogen aufgeteilt war. Die so entstandenen Untergruppen waren nur sehr schwer bis gar nicht auf irgendwelche Überlegenheiten überprüfbar. Deshalb wurde versucht, Trends – auch mit Hilfe der größeren Patientinnen- und Patientengruppe (n=16), die zusätzlich auch verstorbene Patientinnen und Patienten beinhaltet – zu erkennen und graphisch zu veranschaulichen. Eine Eigenheit des Patientinnen- und Patientenkollektivs am Universitätsklinikum Graz stellt die Kombination der Konditionierungstherapien (MAC/RIC) mit der Selektionswahl (CD3/19-, CD34+, unmanipuliert) dar. Von 8 überlebenden Patientinnen und Patienten erhielten 2 Patientinnen und Patienten eine Kombination aus MAC + CD3/19, nur eine Patientin bzw. nur ein Patient die weit verbreitete Kombination aus RIC + CD3/19, 3 Patientinnen und Patienten die etwas unübliche Kombination aus RIC + CD34 und 2 Patientinnen und Patienten die Kombination aus RIC + unmanipuliertem Graft – in beiden Fällen KM. Zur Veranschaulichung der Kombinationen soll Tabelle 28 dienen.

Konditionierung	Selektion	N
MAC	CD3/19	2
RIC	CD3/19	1
	CD34+	3
	unmanipuliert	2

*Tabelle 28: Übersicht über die Kombination aus Konditionierungsverfahren und Selektion der 8 Patienten*

Es ist leider nicht möglich, die Anzahl an verabreichten CD34+- und CD3+-Zellen bei HSCT in Bezug auf die Kombinationen aus Konditionierung und Selektion anzugeben, da nicht für alle Patientinnen und Patienten Daten vorhanden waren und eine Nicht-berücksichtigung der fehlenden Datensätze bei einem derart kleinen Kollektiv wohl zu einer Fehlinterpretation führen würde. Im Rahmen der Auswertung konnte man einen Trend erkennen, in dem die Kombination aus MAC + CD3/19-Negativselektion für einige Zellreihen die schnellste Immunrekonstitution nach HFD HSCT aufwies. Dies ist nicht überraschend, da auch in der Literatur die CD3/19 Negativselektion durch die vermehrte Anzahl an infundierten T-Zellen, NK-Zellen und anderen Leukozyten in Bezug auf die Immunrekonstitution vorteilhaft zu sein scheint. (134) Einzig die Kombination mit einem myeloablativen Konditionierungsverfahren ist etwas untypisch, schien aber im Hinblick auf das Patientinnen- und Patientenkollektiv der

pädiatrischen Abteilung für Hämato-Onkologie des Universitätsklinikum Graz eine gute Variante darzustellen. Natürlich berücksichtigt werden, dass diese Aussage durch die Heterogenität der Gruppe und die niedrige Anzahl an Patientinnen und Patienten nur begrenzt vertretbar ist. Man konnte einen ähnlichen Trend einer schnelleren Immunrestitution allerdings auch für die größere Patientinnen- und Patientengruppe inkl. verstorbener Patientinnen und Patienten (n=16) erkennen. Hier schien die Kombination aus MAC + CD3/19 vorteilhaft gegenüber den anderen Kombinationen (RIC +  $\alpha/\beta/19$ -Depletion, RIC + CD34+, RIC + unmanipulierter Graft) zu sein. Dies ist insofern etwas überraschend, als die  $\alpha/\beta/19$ -Negativselektion der CD3/19-Negativselektion sehr ähnlich ist (135). Jedoch waren die Grunderkrankungen in der  $\alpha/\beta/19$ -Gruppe nicht rein hämatologischen Ursprungs. 4 der insgesamt 6 Patientinnen und Patienten waren an einem soliden Malignom (Keimzelltumor n=1, Medulloblastom n=1, Neuroblastom n=2) erkrankt, welche teilweise chemorefraktär waren. Es kann angenommen werden, dass diese Patientinnen und Patienten bereits im Vorhinein eine schlechtere Prognose aufgewiesen haben als jene der CD3/19-Gruppe (ALL n=2, Mb. Hodgkin n=1). Die vermeintlich schwerwiegenderen Grunderkrankungen könnten auch dazu geführt haben, dass alle 6 Patientinnen und Patienten, welche eine  $\alpha/\beta/19$ -Negativselektion erhielten, zum Zeitpunkte der Erstellung der Arbeit bereits verstorben waren.

Beide Patientinnen bzw. Patienten die KM als Ressource für die HFD HSCT in Kombination mit einer RIC-Konditionierung und unmanipuliertem Graft erhielten, mussten aufgrund eines fallenden Chimärismus mittels STZ-Boost behandelt werden, wobei beide Patientinnen bzw. Patienten am Ende des zweijährigen Beobachtungsintervalls einen 100%igen Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus aufwiesen.

Auffallend war, dass die Kombination aus MAC + CD3/19-Negativselektion für einige Zellreihen im Verlauf tendentiell eine schnellere, quantitativ bessere Reconstitution aufwies, jedoch anfangs den Patientinnen und Patienten, die eine RIC-Konditionierung erhielten, im Sinne eines verzögerten Engraftments unterlegen war. Dies traf für die Gesamt-T-Zellen (CD3+), T-Helferzellen (CD4+) und sich entwickelnden naiven T-Helferzellen (CD4RA45+), T-Killerzellen (CD8+) und sich entwickelnden naiven T-Killerzellen (CD8RA45+) zu. Es schien hierfür einen cut-off-point zwischen Tag 90 und 120 nach HFD HSCT zu geben, an dem die Reconstitution dieser Zellgruppen unter MAC + CD3/19-Negativselektion begann. Für die Patientinnen und Patienten, die unter einem RIC-Regime konditioniert wurden, lag dieser cut-off-point für diese Zellgruppen circa am Tag 60 – ein Engraftment bzw. die Reconstitution trat also früher ein. Dies lag daran, dass die unter einem RIC-Regime KM-transplantierten Patientinnen und Patienten ein unselektiertes Graft erhielten, welches a priori mehr Lymphozyten enthielt. Es ist aber trotzdem verwunderlich, dass durch die CD3/19-

Negativselektion in den ersten 90-120 Tagen keine T-Zellen detektierbar waren bzw. diese Zellreihen ein sehr spätes Engraftment erfuhren, was in der Literatur anders dargestellt wird. (134) Anstatt von MAC + CD3/19-Negativselektion könnte die Kombination aus RIC + CD3/19-Negativselektion (134) bzw. RIC +  $\alpha\beta$ /CD19-Negativselektion (135) zu einer schnelleren Immunrekonstitution und höheren initialen Zellzahlen führen. Wäre dies der Fall, könnte man darauf schließen, dass ein myeloablatives Konditionierungsregime zusammen mit der durch die CD3/19-Negativselektion erhöhten Anzahl an CD3+-Zellen im Graft einen schlechteren Rekonstitutionsverlauf aufweist als ein Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität, worauf auch die Daten aus der größeren Patientinnen- und Patientengruppe (n=16), die unter RIC +  $\alpha\beta$ /CD19-Negativselektion transplantiert wurden, hinweisen. Zur Untermauerung dieser These bräuchte es aber auf jeden Fall eine Studie, die MAC + CD3/19-Negativselektion und RIC + CD3/19-Negativselektion in größeren, homogeneren Patientinnen- und Patientenkollektiven direkt miteinander vergleicht.

Anstatt von MAC + CD3/19-Negativselektion könnte die Kombination aus RIC + CD3/19-Negativselektion – sowie in der Literatur beschrieben (134) – bzw. RIC +  $\alpha\beta$ /CD19-Negativselektion (135), welche in Graz an einigen, verstorbenen Patientinnen und Patienten durchgeführt wurde, einen Benefit bezüglich der Rekonstitution und vor allem eine viel höhere Zahl an Immunzellen während der ersten 60 Tage mit sich bringen. Zudem kommen einige Forschungsarbeiten zu dem Schluss, dass diese Kombinationen ein schnelleres Engraftment, weniger Infektionen (vor allem in der Zeit unmittelbar nach HFD HSCT), niedrigere Raten an GvHD und einen verstärkten GvM-Effekten nach sich ziehen. (134,135) Gerade bei Patientinnen und Patienten mit rezidivierenden Grunderkrankungen und zahlreichen Chemotherapiezyklen in der Vorgeschichte könnte durch diese Aspekte und aufgrund der weniger toxischen Konditionierungsregimes ein Benefit gewonnen werden.

Die Rekonstitution der B-Zellen zeigte hingegen keinen zeitlichen Unterschied des Engraftments im Vergleich von Konditionierung und Selektion, jedoch trat ein Zellzahlenanstieg generell erst ab Tag 60 nach HFD HSCT ein. Dies ist etwas erstaunlich, da durch die CD3/19-Negativselektion auch mehr B-Zellen als bei CD34+-Selektion mittransplantiert werden sollten. (134) Im Verlauf zeigte sich aber die Verwendung von MAC + CD3/19-Negativselektion als vorteilhaft gegenüber den anderen Varianten. Der Grund hierfür ist wohl in der Selektion zu sehen und das Resultat ist wahrscheinlich nicht durch das verwendete Konditionierungsregime begründbar. (134)

Bei der NK-Zellrekonstitution ist bemerkenswert, dass die Verwendung eines RIC-Regime einem MAC-Regime und die Verwendung einer CD34+-Selektion einer CD3/19-

Negativselektion überlegen schien. Dies wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig anders dargestellt und besagt, dass CD3/19-depletierte Grafts zu einer höheren NK-Zellzahl führen. (134)

Für Monozyten und Makrophagen ergab sich kein Unterschied zwischen Konditionierung und Selektion, was insofern interessant ist, als die Verwendung der CD3/19-Negativselektion ebenfalls zu einer höheren Zahl an transplantierten CD14+-Zellen führen sollte (134), was sich in diesem Patientinnen- und Patientenkollektiv allerdings nicht zeigte.

Eine Konvertierung in einen nahezu kompletten Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus nach Transplantation erfolgte unter MAC (+ CD3/19-Negativselektion) schneller als unter RIC (+ CD3/19-Negativselektion, + CD34+-Selektion, + unmanipuliertem Graft), was mit den Daten aus der Literatur korreliert. (195) DLIs können zum Erreichen eines nahezu kompletten bzw. kompletten Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus nach RIC beitragen und sollen auch einen größeren GvM-Effekt hervorrufen. (52,138,140,141)

Die TREC-Analyse zeigte einen deutlichen Unterschied zu Gunsten einer myeloablativen Konditionierung und vor allem einer CD3/19-Negativselektion. Zusammen mit dem steilen Anstieg der T-Zell-Populationen unter MAC + CD3/19-Negativselektion könnte dies ein Hinweis sein, dass die Rekonstitution der T-Zellen durch die Beibehaltung von T-Zellen im Graft mittels CD3/19-Negativselektion besser vonstatten geht als unter CD34+-Selektion.

Mittels Spectratyping konnte gezeigt werden, dass initial nach Transplantation unter RIC-Regime und CD34+-Selektion ein höherer CS erreicht wird, dieser aber durch einen raschen Anstieg des CS nach Transplantation unter MAC-Regime und CD3/19-Negativselektion nach einiger Zeit überschritten wird. Gegen Ende des Follow-up zeigten beide Varianten ein polyklonales Muster des TCR. Dass der CS unter MAC + CD3/19-Negativselektion initial unterlegen war, könnte mit der Negativselektion im Graft - und möglicherweise vermehrt klonal expandierten, transplantierten Spenderinnen- und Spenderlymphozyten - zu tun haben. Der individuelle Verlauf des CS war aber für das Monitoring wichtiger als der Gesamtverlauf aller Patientinnen und Patienten, da eine monoklonale Expansion eines T-Zell-Klons und konsekutive Abnahme des CS hinweisend auf eine Infektion und GvHD sein konnte und somit zum raschen Handeln veranlassen musste. (192)

Eine aktive Immunsurveillance wurde mittels Screening auf Infektionen regelmäßig betrieben. Es traten im Verlauf gehäuft Infektionen verschiedenster Natur bei einigen Patientinnen und

Patienten auf, welche adäquat therapiert werden mussten. Dazu wird an dieser Stelle auf Kapitel 5.6 verwiesen.

Die Inzidenz einer akuten GvHD S I-IV hielt sich mit 37,5 % (n=3) in Grenzen und trat nur bei einer Patientin bzw. bei einem Patienten als akute GvHD max. S III auf. Eine chronische GvHD entwickelte sich bei 25% (n=2) der Patientinnen und Patienten. Die Hauptmanifestation war eine cutane GvHD. Für nähere Informationen wird an dieser Stelle auf Kapitel 5.7 verwiesen.

Insgesamt verstarben 6 Patientinnen und Patienten, wobei 2 dieser Patientinnen und Patienten zweimalig mittels HFD HSCT transplantiert wurden. Der Haupttodesgrund war eine Tumorprogression bzw. bei einer Patientin bzw. bei einem Patienten ein kombiniertes Ereignis aus Progression und TRM in Form einer GvHD. Zudem muss berücksichtigt werden, dass alle dieser Patientinnen und Patienten an hochmalignen, teilweise mehrfach rezidierten, chemotherapieresistenten Grunderkrankungen litten, unter denen sich auch solide Tumore befanden. Die HFD HSCT schien für diese Patientinnen und Patienten ein mehr oder weniger experimenteller Ansatz in Form einer ultima ratio zu sein. Temporär wurde für einige dieser 6 Patientinnen und Patienten eine Remission erreicht, die Tumorprogression konnte aber auch durch zahlreiche DLIs und hochtoxische medikamentöse Therapien nicht verhindert werden. Eine Limitation der medikamentösen Therapie stellten zahlreiche GvHD-assoziierte Komplikationen und Nebenwirkungen der teilweise hochtoxischen Konditionierungsschemata und DLIs in teilweise sehr hohen Dosierungen dar.

Außerdem muss erwähnt werden, dass in diesem Patientinnen- und Patientenkollektiv kein explizites KIR-Ligand mismatching bzw. mismatching auf das nicht vererbte maternale Antigen durchgeführt wurde. Warum dies einen Einfluss auf den Verlauf und Outcome haben hätte können, wird in den Kapiteln 6.3 und 6.4 noch näher besprochen.

Im Folgenden sollen einige wichtige Erkenntnisse aus zahlreichen aktuelleren Publikationen diskutiert werden, die für das Outcome einer haploidenten Transplantation höchst relevant erscheinen und wegweisend für zukünftige HFD HSCTs sein sollten.

## 6.2 RIC + CD3/19 – DEPLETION

Lang et al. haben in ihrem Vergleich von 3 verschiedenen Graftmanipulationsarten – CD34+ (n=39), CD34+/133+ (n=14) und CD3/19-Negativselektion (n=11) – gezeigt, dass ein primäres Engraftment unter CD3/19-Negativselektion mit höherer Wahrscheinlichkeit (91%) auftritt als bei beiden anderen Varianten (CD34+: 85%, CD34+/133+: 72%) (84) Die Inzidenz an GvHD Grad II-IV war jedoch bei Patientinnen und Patienten, die ein CD3/19-depletiertes Graft

erhielten, höher (27%) als jene bei CD34+- (3%) und CD34+/133+-Selektion (7%). Das Konditionierungsregime für die CD3/19-Gruppe war entweder TBI-basiert (n=5) oder mit reduzierter Intensität (RIC, n=6) mit Melphalan (140mg/m<sup>2</sup>), Fludarabine (160mg/m<sup>2</sup>), Thiotepa (10mg/kgKG) und OKT-3. Patientinnen und Patienten, die eine T-Zellzahl von > 2,5 x 10<sup>4</sup>/kgKG im Graft erhielten, wurden zusätzlich mit Cyclosporin A (CSA) oder MMF als pharmakologische GvHD-Prophylaxe behandelt. Mittels indirekter T-Zell-Depletion (CD34+, CD133+) wurde eine median T-Zellzahl von 1 x 10<sup>4</sup>/kg erreicht. Die Grafts, welche mittels Negativselektion von CD3/19 transplantiert wurden, enthielten eine median T-Zellzahl von 3,2 x 10<sup>4</sup>/kg und eine sehr hohe Anzahl an NK-Zellen (median 86 x 10<sup>6</sup>/kg) sowie dendritische Zellen, Monozyten und Granulozyten. Die Immunrestitution der CD3+-Zellen verlief in der Gruppe mit CD3/19-Negativselektion unter RIC-Konditionierung schneller als in den Gruppen mit CD34+, CD34+/133+ und CD3/19-Negativselektion unter TBI-basierter Konditionierung. Das 3-Jahres-EFS betrug 48%, wobei Patientinnen und Patienten, die bei Transplantation nicht in Remission waren (>5% Blasten im KM), generell nicht gerettet werden konnten. Jedoch konnte für die CD3/19-Gruppe, die hauptsächlich Patientinnen und Patienten mit refraktären Erkrankungen bzw. zweiter Transplantation beinhaltete, trotz des enorm hohen Rezidivrisikos ein DFS (median follow up 8 Monate, Range 3-15 Monate) von 40% (3/7) für AML und 50% (2/4) für ALL erreicht werden. Alle verstorbenen Patientinnen und Patienten der CD3/19-Gruppe erlitten ein Rezidiv. Es gab keine TRM. Diese Studie von Lang et al. war eine der ersten, die auf die Vorteile einer RIC-Konditionierung und CD3/19-Negativselektion als Graftmanipulation für Patientinnen und Patienten mit refraktären malignen Erkrankungen aufmerksam machte.

Betghe et al. haben in ihrer Studie unter RIC-Konditionierung und CD3/19-Negativselektion bei adulten Patientinnen und Patienten ebenfalls gezeigt, dass ein Engraftment schneller als unter Verwendung einer CD34+-Selektion unter MAC auftritt und die RRT niedrig gehalten werden kann. (134) Ihr RIC-Regime schloss TBI und ATG aus, beinhaltete Fludarabine (150-200 mg/m<sup>2</sup>), Thiotepa (10 mg/kgKG), Melphalan (120 mg/m<sup>2</sup>) und OKT-3 (5 mg/d an Tagen - 5 bis +14) und keine weitere post-transplant Immunsuppression. Der Median an transplantierten CD34+-Zellen betrug 7,6 x 10<sup>6</sup> Zellen/kgKG, 4,4 x 10<sup>4</sup> an transplantierten CD3+T-Zellen/kgKG und 7,2 x 10<sup>7</sup> an transplantierten CD56+-Zellen/kgKG. Ein KIR-Ligand mismatch wurde in GvH-Richtung bei 19 von 29 Patientinnen und Patienten gefunden. Die Inzidenz an akuter GvHD Grad II-IV betrug 48%, wobei sich diese in GII (n=10), GIII (n=2) und G IV (n=2) aufteilte. Eine Patientin bzw. ein Patient, der die höchste Dosis an infundierten T-Zellen nach Transplantation erhielt, entwickelte eine letale GvHD Grad IV. Die TRM in den ersten 100 Tagen nach Transplantation betrug 6/29 (20%). Diese unterteilte sich wiederum in idiopathisches Pneumoniesyndrom (n=1), Mucomycosis (n=1), Pneumonien (n=3) und GvHD

(n=1) unterteilte. Das Gesamtüberleben nach einem median Follow-up von 241 Tagen (112 – 1271 Tage) betrug 31%. Die Todesgründe waren Infektionen (n=7), GvHD (n=1) und Rezidive (n=12). Dabei muss beachtet werden, dass in dieser Studie nur „high-risk“ Patientinnen und Patienten eingeschlossen wurden – entweder mit refraktärer Grunderkrankung oder Rezidiv nach vorangegangener HSCT. Die Wahl der RIC-Konditionierung zusammen mit einer CD3/19- Depletion stellt also eine vielversprechende Variante für Hochrisikopatientinnen und -patienten dar, denen eine HLA-idente Spenderin bzw. ein HLA-identer Spender fehlt. (134)

In einer weiteren Studie von Chen et al. wurden 22 pädiatrische Patientinnen und Patienten mit refraktären hämatologischen, malignen Grunderkrankungen unter einem RIC-Protokoll und CD3-Depletion mittels Verwendung von Fludarabine, Thiotepa, Melphalan und OKT3, jedoch ohne Verwendung von TBI und ATG behandelt. Dabei wurde beobachtet, dass die Immunrekonstitution im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unter MAC-Konditionierung deutlich schneller vonstatten ging. (87) 91% der Patientinnen und Patienten, die mit diesem Protokoll behandelt wurden, erreichten vollen Spenderinnen- bzw. Spenderchimerismus und zeigten dabei im Vergleich zur Gruppe mit myeloablativem Konditionierungsregime ein schnelleres Anwachsen von CD3+-Zellen, hohe TRECs, eine hohe Zahl an NK-Zellen und eine hohe Diversität des TCR $\beta$ -Repertoires während der ersten 4 Monate nach Transplantation. Die Inzidenz und das Ausmaß an Virämien war im Vergleich zur Kontrollgruppe limitiert und es traten keine letalen Infektionen auf. Alle Patientinnen und Patienten wurden mindestens wöchentlich auf CMV, EBV und Adenovirus für die ersten 100 Tage nach Transplantation gescreent. Adenovirus- und EBV-Last wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels rt-PCR bestimmt. Die CMV-Last wurde über einen COBAS AMPLICOR CMV MONITOR TEST aus dem Blut quantifiziert. Insgesamt wurde bei 16 von 22 Patientinnen und Patienten (73%) der RIC-Gruppe und bei 11 von 12 Patientinnen und Patienten (92%) der MAC-Gruppe eine Virämie entdeckt. In der RIC-Gruppe waren 10 Patientinnen und Patienten auf einen und 6 Patientinnen und Patienten auf 2 Virustypen positiv. In der MAC-Gruppe hingegen waren 4 Patientinnen und Patienten auf alle 3, 6 Patientinnen und Patienten auf 2 und eine Patientin bzw. ein Patient auf einen Virustyp positiv. Die virale Last (copies/ml) in den ersten 4 Monaten war in der MAC-Gruppe signifikant höher (CMV p=0,0486, EBV p < 0,0001, ADV p=0,0018). In den weiteren 8 Monaten nach HFD HSCT war in der RIC-Gruppe keine Adenoviruslast mehr detektierbar und die EBV-Last war weit unter der Grenze (2000 copies/ug mononukleärer Zellen) an der eine antivirale Therapie eingeleitet werden hätte müssen. Nur 9% der Patientinnen und Patienten der RIC-Gruppe entwickelten eine akute GvHD Grad III, wogegen jeweils 27% der Patientinnen und Patienten eine akute GvHD Grad I und II entwickelten. Diese Inzidenzen sind im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Inzidenzen niedriger. (134,196) Der gleichzeitige Anstieg von sjTRECs mit dem Auftreten

eines vollen Spenderinnen- bzw. Spenderchimärismus in der RIC-Gruppe, lässt darauf schließen, dass die sich entwickelnden T-Zellen von Spenderinnen- und Spenderprecursor-Zellen abstammten. Das schnelle Anwachsen von T-Zellen (thymus-derived-t-cells) nach HFD HSCT hängt unter anderem auch von der Thymusfunktion vor Transplantation ab. (197) Da in dieser Studie aber nur Kinder mit refraktären, hämatologischen, malignen Grunderkrankungen eingeschlossen wurden, welche in 59% eine schlechte Thymusfunktion (gemessen anhand prä-transplant sjTREC-Zahl) aufwiesen, könnte das verwendete RIC-Protokoll ohne Verwendung von TBI und ATG einen Einfluss auf die Thymusfunktion bzw. eine geringere Toxizität auf precursor T-Zellen nach Transplantation haben, da alle Patientinnen und Patienten nach Transplantation hohe sjTRECs aufwiesen. Die NK-Zellzahl der RIC-Gruppe in dieser Studie stieg im ersten Monat stark an und blieb zwischen den Monaten 2-11 relativ stabil. Dies ließ darauf schließen, dass sich die NK-Population sowohl aus donor-derived NK-Zellen als auch aus unreifen NK-Zellen – welche sich aus Spenderinnen- und Spenderstammzellen regeneriert haben – zusammensetzte. Die schnelle NK-Rekonstitution war zusammen mit der schnellen T-Zellrekonstitution wahrscheinlich auch maßgebend an der im Vergleich zur MAC-Gruppe geringen Rate an Virämien und kleineren Viruslast verantwortlich. Zudem könnte die schnelle NK-Zell-Rekonstitution durch das Weglassen von ATG erklärbar sein, welches eine cytotoxische Eigenschaft auf NK-Zellen haben könnte. (198,199). Die schnelle T-Zell-Rekonstitution und Retention von allogenen NK-Zellen im Graft zusammen mit der Induktion von low-grade GvHD könnte auch zu einem verstärkten GvM-Potential beitragen. (200) Insgesamt entwickelten 5 Patientinnen und Patienten aus der RIC-Gruppe eine chronische GvHD (die kumulative Inzidenz im Vergleich zur MAC-Gruppe war nicht erhöht). Das Auftreten einer chronischen GvHD kann aber wiederum die Inzidenz eines Rezidivs verringern. (201) Zusammen mit dem Auftreten einer akuten GvHD könnte das die Überlebenschance jener Hochrisikopatientinnen und -patienten verbessern, die an einem chemo-refraktären Malignom leiden. Das DFS 2 Jahre nach Transplantation betrug in der RIC-Gruppe  $31,8\% \pm 10,7\%$  und  $25,5\% \pm 9,8\%$  in der MAC-Gruppe. Das Gesamtüberleben, DFS und die niedrigere Rezidivrate sind vielversprechend für zukünftige Studien mit dieser Kombination.

### 6.3 NK-ALLOREAKTIVITÄT, KIR-LIGAND MISMATCHING, DSA, TREGs, MSCs, SPEZIFISCHE TUMORTHERAPIE, SELEKTIVE T-ZELL-DEPLETION

Pérez-Martínez et al. haben gezeigt, dass für Patientinnen und Patienten mit metastasierten, soliden, chemo-refraktären Tumoren, welche keine andere evidenzbasierten Therapiestrategien mehr zur Verfügung haben, die HFD HSCT mit einem möglichst hohen KIR-inhibitory-mismatch und hoher cytotoxischer allogener NK-Zellaktivität eine mögliche kurative Therapie sein kann. (124) Ein fehlender KIR-HLA mismatch mit einer geringen Anzahl

an aktivierenden KIR-Rezeptoren hat wahrscheinlich einen negativ prädiktiven Einfluss auf Progression und Prognose. Zusätzlich zum inhibitorischen KIR-mismatch scheint die Aktivität des GvM-Effekts nach HFD HSCT mit der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen der Spenderin bzw. des Spenders (202), dem Erkrankungsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation, der Anzahl an aktivierenden KIR-Rezeptoren (KIR2DS1, KIR2DS3 und KIR3DS1) und möglicherweise mit dem Vorhandensein einer aktivierenden KIR3DS1-HLA-Bw4 Interaktion zu korrelieren.

Ciurea et al. haben unter RIC-Konditionierung (Fludarabine, Melphalan, Thiotepa, ATG) und CD34+-Selektion bei 28 Patientinnen und Patienten mit hauptsächlich AML/MDS (79%) als Grunderkrankung, welche größtenteils nicht in Remission waren, gezeigt, dass ein primäres Engraftment bei 78% der Patientinnen und Patienten nach 13 Tagen (median) eintrat. (133) Dabei trat bei 6 Patientinnen und Patienten eine primäres non-Engraftment auf. In dieser Studie wurde auch ein HLA-typing (HLA-A, -B, -C, DRB1, DRB3/4/5 und DQB1) und HLA-matching (HLA-A, -B, -C, DRB1, DQB1) und KIR-ligandmismatching durchgeführt. Die Transplantationspaare wurden anhand des Ergebnisses in 2 Kategorien eingeteilt: Paare mit 2 mismatches und Paare mit  $\geq 3$  mismatches im Bezug auf die HLA-Loci. KIR-mismatching wurde in GvH- und HvG-Richtung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine anti-HLA Antikörperbestimmung (DSA) bei 16 Patientinnen und Patienten. 4 von 6 Patientinnen und Patienten, die kein Engraftment zeigten waren unter diesen 16 getesteten Patientinnen und Patienten, wobei bei 3 dieser 4 Patientinnen und Patienten HLA-Antikörper (DSA) nachgewiesen werden konnten ( $p=0,001$ ). Bis auf eine größere Anzahl an ABO-mismatches in der non-Engraftment-Gruppe ( $p=0,04$ ) konnten keine weiteren signifikanten Faktoren zwischen der non-Engraftment-Gruppe ( $n=4$ ) und der Engraftment-Gruppe ( $n=12$ ) der Subpopulation festgestellt werden. Die Infektionsprophylaxe nach Transplantation bestand aus anti-bakterieller, anti-mykotischer und anti-viraler Medikation mit Pentamidine oder Atovaquone, Foscarnet, Gancyclovir oder Valacyclovir und Voriconazol oder Caspofungin. 5 Patientinnen und Patienten entwickelten nach Transplantation eine akute GvHD (19%), wobei nur eine Patientin bzw. ein Patient eine akute GvHD Grad II (7%) entwickelte. Keine Patientin bzw. kein Patient erlitt eine akute GvHD Grad III-IV. Die Konditionierung unter RIC wurde relativ gut vertragen. Infektionen waren der Hauptgrund für Morbidität und NRM - wahrscheinlich aufgrund der tiefen T-Zell-Depletion mittels CD34+-Selektion. (88) 75% der Patientinnen und Patienten entwickelten zumindest eine Grad III Infektion nach Transplantation. Pneumonie ( $n=19$ ) und Bakteriämien ( $n=14$ ) waren dabei die Hauptkomplikationen. 12 Patientinnen und Patienten (44%) erlitten nach 72 Tagen (median Follow-up) ein Rezidiv, wobei die Grunderkrankung bei allen Patientinnen und Patienten rezidierte, die zum Zeitpunkt der Transplantation eine aktive Erkrankung aufwiesen.

Maßgeben für das Überleben der Patientinnen und Patienten war der Erkrankungsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation verantwortlich. 5 von 12 Patientinnen und Patienten (42%) mit AML/MDS in Remission bzw. mit niedriger Tumorprogression ( $\leq 15\%$  Blasten im KM) wiesen im Vergleich zu den Patientinnen und Patienten mit großer Tumorprogression bzw. Rezidiv ( $\geq 15\%$  Blasten im KM) ein besseres Langzeitüberleben auf ( $p=0,03$ ). Alle Patientinnen und Patienten, die in dieser Studie überlebten, wiesen einen KIR-Ligand mismatch in GvH-Richtung und einen maternal mismatched-Haplotyp als HFD HSCT Ressource auf. Statistisch konnten jedoch keine Signifikanzen in Bezug auf das Überleben festgestellt werden, da die Größe des Patientinnen- und Patientenkollektivs wohl zu klein war.

Shi et al. haben demonstriert, dass durch die Infusion von haplo-identen KIR-Ligand gemismatchten NK-Zellen bei Patientinnen und Patienten mit rezidiviertem multiplen Myelom unter chemotherapeutischer Vortherapie und vorausgegangener autologer HSCT ein Benefit bezüglich erneutem Rezidiv im Vergleich zur Rezidivtherapie ohne NK-Zell-Injektion erzielt werden konnte, wobei die Anzahl an inkludierten Fällen wohl zu gering war, um eine definitive Aussage treffen zu können. (7) Dabei fand die Gruppe auch heraus, dass durch die Injektion der NK-Zellen kein verschlechtertes Engraftment nach autologer HSCT sowie keine GvHD auftraten. Die Zahl von alloreaktiven KIR-Ligand gemismatchten NK-Zellen nach Infusion war hinsichtlich der Gesamt-NK-Zahl jedoch sehr gering und einer hohen Variabilität unter den Patientinnen und Patienten unterzogen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der KIR-Genotyp durch allelischen Polymorphismus und epigenetischem Silencing nicht direkt mit dem KIR-Phänotyp korreliert. (203-206)

Der KIR-Ligand mismatch in GvH-Richtung nach T-Zell-depletierter HFD HSCT wird mit einer größeren Alloreaktivität der Spenderinnen- bzw. Spender-NK-Zellen assoziiert, welche zu deutlich weniger Rezidivraten bei Patientinnen und Patienten mit AML, einer niedrigeren Inzidenz von Graftabstoßung und einer Reduktion von GvHD führt. (207) Die niedrigere Rate an Graftabstoßung könnte mit der NK-medierten Dezimierung von Antigen-präsentierenden Zellen der Empfängerin bzw. des Empfängers, die für das Priming von alloreaktiven Spenderinnen- bzw. Spender-T-Zellen und dadurch auch für die Pathogenese der GvHD kritisch sind, zusammenhängen. (29,125,208) Da die sehr langsame Immunrekonstitution nach HFD HSCT eines der größten Probleme darstellt, sind neue Strategien in Erprobung, die zu einer beschleunigten Wiederherstellung des Immunsystems führen sollen und so die Rezidivrate und auch die oftmals infausten Infektionskomplikationen verringern sollen. (209) Damit soll ein verbessertes Engraftment und eine Reduktion an GvHD erreicht werden, während der GvM-Effekt erhalten bleibt. (210-212)

Forschungen basierend auf der Verwendung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) und NK-T-Zellen (NK/Tregs) haben bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt. So wurde etwa im Mausmodell gezeigt, dass die Verwendung von Tregs und NK/Tregs das Auftreten einer akuten GvHD verhindern können. (209-211)

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind multipotente, nicht-hämatopoietische Progenitorzellen, machen nur ca. 0,001% der kernhaltigen Zellen im menschlichen KM aus und stehen aufgrund ihrer regenerativen und immunmodulierenden Eigenschaften in regem Interesse der klinischen Forschung. (213) Humane MSCs haben eine hohes in-vitro Proliferationspotential und können in verschiedene mesenchymale Gewebetypen wie Knochen, Knorpel, Muskel und Fett differenzieren. (95) Es wurde gezeigt, dass MSCs alloreaktive T-Zellen inhibieren können (214-217), einen graft-failure reduzieren bzw. verhindern (95) und auch die Abstoßungsrate von Haut-Allografts (214) vermindern können. Ball et al. haben gezeigt, dass ein hämatopoietisches Engraftment unter Verwendung von MSCs nach HFD HSCT bei ihren 14 Patientinnen und Patienten zu 100% auftrat und keine vermehrten Infektionen nach Transplantation stattfanden, wogegen die historische Kontrollgruppe ohne MSCs eine graft-failure-Rate von 15% aufwies. (95) Ex vivo-expandierte MSCs haben zudem das Potential, eine akute GvHD nach HLA-matched und HLA-mismatched Transplantation zu verhindern (218,219). Der zugrundeliegende Mechanismus der immunmodulatorischen Funktion von MSCs konnte noch nicht genau geklärt werden. Allerdings wurden Hinweise gefunden, die darauf hindeuten, dass durch eine Inhibierung der IFN- $\gamma$ -Sekretion von TH-1-Zellen und NK-Zellen, einer erhöhten IL-10 Sekretion von Tregs und einer erhöhten Sekretion von IL-4 durch TH-2-Zellen ein daraus resultierender TH-1 zu TH-2 Shift für die immunmodulierende Wirkung verantwortlich sein könnte. (217)

Außerdem stehen auch lösliche Faktoren (IL2, IL18, IL7, post-transplant G-CSF etc.) im Blickfang der klinischen Forschung um die klinischen Outcomes nach HFD HSCT im Bezug auf GvHD, Immunrekonstitution, Engraftment und GvM-Effekt noch weiter zu verbessern. (209)

Die erfolgreiche ex-vivo Generierung von Leukämie-spezifischen Spenderinnen- bzw. Spender-T-Zellen gegen PR1 – ein Molekül, das von CML- und AML-Tumorzellen exprimiert wird – könnte im klinischen Setting zu einem erweiterten GvL-Effekt führen. (220)

Die nicht-selektive T-Zell-Depletion des Allograft vor Transplantation verhindert eine schwere akute GvHD, ist aber prädisponierend für einen Graftverlust, ein Rezidiv und ein erhöhtes Infektionsrisiko. Diese Problematik hat dazu geführt, Ansätze zu einer selektiveren T-Zell-

Depletion zu entwickeln, welche alloreaktive T-Zellen, die eine GvHD induzieren können, aus dem Graft entfernen und GvM-mediierende T-Zellen im Graft beibehalten sollen. (209) Dazu wurde bereits über einige Methoden berichtet, die auf dem Prinzip beruhen, dass mit mononukleären Zellen aus dem Empfängerinnen- bzw. Empfängerblut stimulierte Spenderinnen- bzw. Spender-T-Zellen ex-vivo in Lymphozyten-Reaktionskulturen reagieren, über die Expression der Aktivierungsmarker (CD25, CD69, CD71) identifiziert und durch verschiedene Methoden entfernt werden können. (209) In-vitro haben selektive Allodepletionsmethoden zu einer Reduktion der Alloreaktivität von 70-95% und einer Beibehaltung der Immunantwort gegen fremde Antigene, infektiöse Pathogene und auch GvL-Effekt geführt. (221-223) Es werden aber noch weitere detaillierte Studien notwendig sein, um diese Effekte für den klinischen Alltag bestätigen zu können. (209)

Die Verwendung von selektiv depletierten Megadosis-PBSC-Allografts in Kombination mit einem RIC-Regime könnte somit eine schnellere Immunrekonstitution zur Folge haben, wobei die Rate an akuter GvHD maximal reduziert werden könnte. Eine adaptive zelluläre Immuntherapie (Tregs, NK/Tregs), die Verwendung von MSCs und Spenderinnen- bzw. Spender-expandierten NK-Zellen sowie löslichen Faktoren und eine eventuelle DLI zur Konvertierung eines gemischten in einen kompletten Chimärismus und folglich höherem GvM-Effekt könnte das Outcome bezüglich optimalem GvM-Effekt und einer möglichst niedrigen Rate an GvHD verbessern und die HFD HSCT für noch viel mehr Patientinnen und Patienten zugänglich machen (209).

#### 6.4 MISMATCHING AUF DAS NICHT VERERBTE MATERNALE ANTIGEN

Tamaki et al. haben durch eine retrospektive Analyse von HFD HSCTs in Japan demonstriert, dass bei der Verwendung maternaler anstatt paternaler Grafts die 5-Jahres-Überlebensrate (60% vs. 32%,  $p=0,006$ ) und die Inzidenz von non-relaps TRM signifikant besser bzw. niedriger war, wobei kein signifikanter Unterschied in Bezug auf eine akute GvHD (> Grad III) und Rezidiv bestand. (224) Der einzige statistisch signifikante Faktor für das Gesamtüberleben war dabei die Wahl der Spenderressource (Mutter oder Vater). Dabei wurde festgestellt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit nach maternaler HFD HSCT scheinbar besser größer war ( $p=0,08$ ), wenn die Transplantation zwischen einem HLA-mismatched Paar (noninherited maternal Ag-mismatched sibling donors) stattfand. (224) Begründet werden diese Erkenntnisse mit der Immuntoleranz zwischen Fetus und Mutter während der Gestation - eine Art bilaterale Toleranz. Studien haben gezeigt, dass maternale Lymphozyten auch noch einige Monate nach Geburt immunologisch inaktiv gegen kindliche Lymphozyten waren. (225) Andererseits entwickeln etwa die Hälfte der Patientinnen und Patienten, die im adulten Alter multiple Bluttransfusionen erhalten, keine Antikörper gegen nicht-vererbte maternale HLA-

Antigene, was ein Hinweis für eine erworbene Persistenz einer fehlenden B-Zell-Immunantwort auf maternale Antigene ist. (226) Es ist auch gezeigt worden, dass noch einige Jahre nach Geburt fetale semi-allogene hämatopoietische Zellen im mütterlichen Blut auffindbar sind, was ebenfalls eine lebenslange maternale Toleranz auf fetale HLA-Antigene suggerieren lässt. (227-230)

Die Resultate der Studie von Tamaki et. al werden auch von anderen Studien bestätigt. (161,162) In einer großen Analyse des Center for International BMT Registry (CIBMTR) wurde demonstriert, dass die Inzidenz einer akuten GvHD signifikant kleiner ist, wenn ein non-inherited maternal Ag-mismatched sibling donor (Geschwisterchen, das in Bezug auf das nicht vererbte maternale Antigen heterozygot ist) als Spenderin bzw. Spender verwendet wird. (161) Bei einem non-inherited paternal Ag-mismatched sibling donor (Geschwisterchen, welches im Bezug auf das nicht vererbte paternale Allel heterozygot ist) ist die Inzidenz einer akuten GvHD signifikant größer. (161) Die TRM war nach Transplantation von einer maternalen Spenderin oder einem paternalen Spender im Vergleich zu einem non-inherited maternal Ag-mismatched sibling donor ebenfalls höher. Das Outcome nach HFD HSCT wurde von beiden Gruppen, van Rood et al. und Ruggeri et al. als besser beschrieben, wenn eine maternale Spenderin einem paternalen Spender bevorzugt wurde. (161,162) Das verbesserte overall survival nach einer HFD HSCT mit der Mutter als Spenderin lässt sich vor allem durch die geringere Inzidenz an Reziden erklären, was darauf schließen lässt, dass maternale Grafts einen potenteren alloreaktiven Effekt auf leukämische Zellen haben und zusätzlich keine höhere Inzidenz an GvHD auftritt. (231)

## 6.5 SPEZIFISCHE IMMUNTHERAPIE

Perruccio et al. haben erstmals gezeigt, dass eine adaptive Immuntherapie mittels in-vitro generierten, spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zell-Klons der Spenderin bzw. des Spenders gegen CMV und Aspergillus unter konsekutiver Allopeptation eine weitreichende Protektion und T-Zell-Immunantwort gegen CMV und Aspergillus erzeugt, ohne – unter Berücksichtigung einer Maximaldosis an spezifischen T-Zellen – eine GvHD zu triggern, eine Graftabstoßung, Zytopenie oder Nebeneffekte hervorzurufen. (93) In ihrer Studie entwickelte von 35 Patientinnen und Patienten, die eine spezifische T-Zell anti-CMV- oder anti-Aspergillus-Therapie erhielten, nur eine Patientin bzw. ein Patient eine akute GvHD Grad II, welche mit Steroiden kontrolliert werden konnte. Diese Patientin bzw. dieser Patient erhielt eine CD4<sup>+</sup>-Zelldosis von  $3 \times 10^6$  anti-CMV Zellen/kgKG, die übrigen Patientinnen und Patienten erhielten Dosen von  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  anti-CMV- bzw. anti-Aspergillus-Zellen/kgKG. Deshalb wurde die sichere Dosis für eine spezifische Immunotherapie seitens der Perugia-Gruppe mit maximal  $1 \times 10^6$  Zellen/kgKG definiert. Die kumulative Inzidenz der Gesamtinfektionsmortalität (invasive

Aspergillose, CMV, andere Infektionen) nach einem median Follow-up von 24 Monaten in dieser Studie betrug in der anti-CMV-/anti-Aspergillus-Gruppe 0,41 im Gegensatz zu 0,53 in der Kontrollgruppe, die keine Immuntherapie erhielt. Die Haupttodesgründe in der anti-CMV-/anti-Aspergillus-Gruppe waren dabei EBV- und HHV-6-Infektionen sowie Rezidiv. Als Marker für einen CMV-/Aspergillusinfektionsschutz wurde der IFN- $\gamma$ /IL-10 Zytokinlevel definiert. Protektiv zeigte sich ein hoher IFN- $\gamma$ -Level und ein niedriger IL-10-Level der Gruppe welche eine Immuntherapie erhielt (Typ-1-Zytokinpattern). Im Gegensatz dazu wies die Gruppe, die keine Immuntherapie erhielt einen niedrigen IFN- $\gamma$ - und hohen IL-10-Level (Typ-2-Zytokinpattern) auf. Das Typ1-Zytokinpattern wurde mit einer frühen, lang andauernden Wiederherstellung und quantitativ ausreichendem Anwachsen von pathogen-spezifischen T-Zellen assoziiert. Perruccio et al. konnten in ihrer Studie außerdem zeigen, dass durch die Infusion von Aspergillus-spezifischen Typ 1 CD4+-Zellen in 9 von 10 Patientinnen und Patienten mit invasiver-Aspergillose eine Aspergillus-Antigenämie kontrolliert und die invasive Aspergillose beseitigt werden konnte. Weiters wurde durch die Infusion von CMV-spezifischen CD4+-Zellklonen eine CMV-Reaktivierung weitgehend verhindert und die CMV-Mortalität gesenkt. Da für die Virusbekämpfung CD8+-Zellen verantwortlich sind (232,233), kam man zu dem Schluss, dass infundierte, spezifische CD4+-Zellen APCs angeregt haben könnten (234), um schon durch die Transplantation in geringen Mengen vorhandenen CD8+-spezifischen anti-CMV-Zellen zur klonalen Expansion zu stimulieren und so einen CMV-Schutz zu entwickeln. Begründet wurde dies mit einem Anstieg an anti-CMV-spezifischen CD8+-Zellen nach Infusion von anti-CMV-spezifischen CD4+-Zellen, welcher in der Kontrollgruppe nie detektierbar war. Die erfolgreiche Strategie bezüglich CMV-Infektionen in dieser Studie könnte unter anderem auch damit zusammenhängen, dass CMV-Antigene aus allen Phasen des Viruszyklus (frühe und späte Antigene, nukleäre Antigene, zytoplasmatische Antigene, Struktur- und nicht-Strukturproteine) verwendet wurden, um die Spenderinnen- und Spender-CD4+-Zellen zu generieren. Weiters konnte in dieser Studie erfolgreich gezeigt werden, dass auch CD4+-Zellen der Empfängerin bzw. des Empfängers selbst (Grundvoraussetzung war das Fehlen von neoplastischen Zellen im peripheren Blut) bei HFD HSCT von einer CMV-negativen Spenderin bzw. von einem CMV-negativen Spender auf eine CMV-positive Empfängerin bzw. auf einen CMV-positiven Empfänger verwendet werden können, um eine anti-CMV-spezifische Wirkung zu entwickeln und nach Transplantation infundiert werden können. Dadurch kann das sehr hohe Risiko eine CMV-Virämie mit letalem Ausgang nach HFD HSCT von CMV-negativer Spenderin bzw. CMV-negativem Spender auf CMV-positive Empfängerin bzw. CMV-positiven Empfänger umgangen werden. Ob die Infusion von anti-CMV und anti-Aspergillus spezifischen CD4+-Zellen einen Einfluss auf die generelle Immunrekonstitution nach HFD HSCT hat, wurde in dieser Studie allerdings nicht gezeigt.

## 6.6 SOLIDE TUMOREN UND HOCHRISIKOMALIGNOME

Lang et al. haben gezeigt, dass auch für pädiatrische Patientinnen und Patienten mit refraktären, metastasierten soliden Tumoren die HFD HSCT eine Option sein kann. (120) Sie schlossen dabei 6 Patientinnen und Patienten – Neuroblastom (n=4), Rhabdomyosarcom (n=1), Ewing-Sarkom (n=1) – in ihre Studie ein, die nach autologer HSCT eine CD3/CD19-depletierte HFD HSCT mit einer median Anzahl von  $16 \times 10^6/\text{kg}$  Stammzellen,  $167 \times 10^6/\text{kg}$  NK-Zellen und  $5,4 \times 10^4/\text{kg}$  residualen T-Zellen erhielten und einem Mephalan-basierten RIC-Regime unterzogen wurden. Trotz prä-transplant Chemotherapie wurden alle Patientinnen und Patienten unter massiver Tumorzunahme transplantiert und es trat ein primäres Engraftment bei allen Patientinnen und Patienten ein. Die hämatopoietische Erholung nach Transplantation trat rasch ein (ANC  $> 0,5 \times 10^9/\text{l}$  in 11 Tagen [median], Unabhängigkeit von Thrombozytenkonzentraten nach 8 Tagen [median]). 4 Patientinnen und Patienten entwickelten eine akute GvHD GII. Eine limitierte chronische GvHD wurde bei 2 Patientinnen und Patienten beobachtet. Es trat keine TRM auf. 4 Patientinnen und Patienten starben an einer Progression, 2 Patientinnen und Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstellung des Papers am Leben (median Überlebenszeit 6 Monate (2-11)). Die Analyse der post-transplant NK-Zellfunktion erfolgte mittels zytotoxischem Assay und zeigte eine stabile zytotoxische Aktivität gegen K562-targets (Erythroleukämiezellen), wogegen die Aktivität gegen Neuroblastomzellen niedrig war. Die zytotoxische Aktivität gegen die K562-Zelllinie war nach Transplantation sogar höher als vor der Transplantation, was die Aussage zulässt, dass eine B-/T-Zell-Depletion die Alloreaktivität der NK-Zellen nicht verschlechtert. NK-Zellen scheinen eine wichtige Rolle im Kampf um das Überleben von Patientinnen und Patienten mit soliden metastasierten Tumoren zu spielen, vor allem bei jenen Tumoren und Tumorzelllinien, welche – wie das Neuroblastom – HLA-I Moleküle vermindert exprimieren. In-vitro wurde in dieser Studie gezeigt, dass durch eine Stimulation mittels IL-2 bzw. Beimengung von anti-Neuroblastom-Antikörpern die spezifische Zellyse gegen Neuroblastomzellen gesteigert werden kann.(235-237) Der dadurch gesteigerte NK-Zell medierte anti-Tumor-Effekt könnte der Ausgangspunkt für weitere Studien mit soliden metastasierten Tumoren bilden. Insgesamt konnte die Studie nachweisen, dass die HFD HSCT für Patientinnen und Patienten mit refraktären, soliden, metastasierten Malignomen eine Alternative in der Therapie darstellen kann, vor allem unter Verwendung eines RIC-Regime, das ein stabiles Engraftment, eine schnellere Immunrekonstitution, niedrigere TRM und größeren GvL/GvM-Effekt aufweist und dabei die Rate an akuter GvHD akzeptabel bleibt. (120)

Für diese Patientinnen- und Patientengruppe könnten die jüngsten Erkenntnisse und Entwicklungen bezüglich GvM eine ohnehin sehr schlechte Prognose und Überlebenschance weiter verbessern und Hoffnung für eine kurative Therapie geben. (238)

## 6.7 SPENDERINNEN- BZW. SPENDERWAHL

Hough et al. haben in ihrem Review versucht, die Frage nach der Wahl der passenden Ressource für hämatologische maligne Grunderkrankungen, primäre Immunodefizienzsyndrome (v.A. SCID), kongenitale Stoffwechselerkrankungen und bone marrow failure syndroms zu erläutern, wenn keine passende HLA-idente Spenderin bzw. kein passender HLA-identer Spender zur Verfügung steht. (58) Dabei kamen sie zu dem Schluss, dass es durch die Entwicklungen der letzten Jahre heute für nahezu jede Patientin und jeden Patienten eine passende Spenderin bzw. einen passenden Spender gibt – sei es durch HFD HSCT, UCBT oder URD BMT. Die Schwierigkeit bei der Wahl einer Spenderin bzw. eines Spenders bezieht sich vor allem auf die klinischen Erfahrungen mit der verwendeten Strategie. Die Frage, welche Ressource (KM, PBSC, UCB), welche Konditionierung (RIC, MAC), welche Selektion (CD34+, CD133+, CD13/19-Negativselektion) etc. für welche Pathologie und welche Patientin bzw. welchen Patienten am besten verwendet werden kann, kann nur durch zahlreiche Studien beantwortet werden. Zudem stehen durch viele Studien bereits Hinweise auf präferenzielle Strategien zur Verfügung. Die Entscheidung muss schlussendlich von der Ärztin bzw. vom Arzt, der die Transplantation durchführt, im Konsens mit der Patientin bzw. dem Patienten gefällt werden, was wohl eine der schwierigsten Angelegenheiten im hämato-onkologischen Alltag ist.

## 7 CONCLUSIO

Die HFD HSCT stellt dadurch, dass fast jede Patientin und jeder Patient eine potentielle Spenderin bzw. einen potentiellen Spender besitzt, eine mittlerweile gängige Alternative dar, wenn ansonsten keine passende Spenderin bzw. kein passender Spender gefunden werden kann. Durch zahlreiche Forschungsarbeiten der letzten Jahre und Jahrzehnte konnte die Inzidenz von Graftversagen, GvHD, TRM und Rezidiven deutlich reduziert werden. Vor allem durch die Entwicklung von Konditionierungsregimes mit reduzierter Intensität konnten die RRT und TRM deutlich reduziert werden. Durch die Verwendung von Negativselektionen (CD3/19,  $\alpha\beta$ /CD19) und die dadurch erhöhte Menge an mittransplantierten Leukozyten haben sich bereits viele Vorteile im klinischen Alltag ergeben. Insgesamt hat sich die HFD HSCT als machbare Alternative etabliert und weist für einige hämato-onkologische aber auch solide Malignome bereits sehr gute Daten auf.

Durch das gewonnene Wissen aus den zahlreichen Studien über die HFD HSCT können die wichtigsten Kriterien für den optimalen Outcome nach HFD HSCT folgend formuliert werden:

- Eine Konditionierung mit reduzierter Intensität in Kombination mit einer Negativselektion sollte einer myeloablativen Konditionierung vorgezogen werden (längeres DFS, besserer Outcome für rezidivierende Malignome, niedrigere RRT, kleinere TRM, besseres Engraftment, vertretbarer Anstieg von GvHD Grad II-IV, geringere Inzidenz von Infektionen und Virämien, bessere Thymuswiederherstellung nach vorangegangener Chemotherapie, schnellere T-Zell-Rekonstitution, höherer GvM-/GvL-Effekt) (84,133,134,207,239)
- Die Transplantation sollte in Remission durchgeführt werden, da der Outcome besser ist (124)
- Ein inhibitorisches KIR-Ligand mismatching sollte vorgenommen werden, wobei Anzahl und Art des mismatch-Paares, eventuell vorhandene aktivierende KIR-Rezeptoren und die natürliche Cytotoxizität der NK-Zellen positiv mit dem Transplantationserfolg korrelieren (weniger Rezidive, höherer GvM-Effekt) (31,124,132,240)
- Ein KIR-Typing sollte generell erfolgen (206)
- Wenn möglich sollte für die HFD HSCT ein auf das maternale nicht vererbte Antigen heterozygoten Geschwisterchen als Spenderin bzw. Spender dienen und wenn nicht vorhanden, ein maternaler einem paternalen Graft bevorzugt werden (kleinere Inzidenz an GvHD, höherer GvM-Effekt und weniger Rezidive) (116,161,162,224)
- Ein DSA-Screening sollte generell erfolgen, da das Vorhandensein von HLA-

Antikörpern mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Graftversagens einhergeht (241)

- Zur Senkung von GvHD, Graftversagen und möglicherweise größerem GvM-Effekt können alloreaktive NK-Zellen, MSCs und regulatorische T-Zellen (Tregs) hilfreich sein (95,209,210,214,216-219)
- Ex-vivo generierte spezifische T-Zellen können einen GvM-/GvL-Effekt steigern (220)
- Über eine selektivere T-Zell-Depletion können alloreaktive T-Zellen, welche eine GvHD vermitteln können, aus dem Graft entfernt werden und T-Zellen, die einen GvM-Effekt medieren, im Graft belassen werden (209)
- Mittels spezifischer Immuntherapie (CMV, Aspergillus, EBV...) kann die Inzidenz von Infektionen und TRM gesenkt werden (93)
- Eine hohe Anzahl von alloreaktiven NK-Zellen kann für solide Tumoren mit schlechter Prognose eine kurative Therapie darstellen (120,124)
- Es sollte eine penible Infektionssurveillance betrieben werden, um durch frühzeitiges Erkennen einer Infektion eine adäquate Therapie einleiten zu können

## F LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Siems W, Bremer A, Przyklenk J. Das Immunsystem. Allgemeine Krankheitslehre für Physiotherapeuten: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 235-244.
- (2) Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.
- (3) Hamilton JA, Anderson GP. Mini Review GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004;22(4):225-231.
- (4) Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010 2;125(2, Supplement 2):S73-S80.
- (5) Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr Opin Immunol* 2010 12;22(6):814-820.
- (6) Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997 Oct;77(4):1033-1079.
- (7) Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, et al. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2008;143(5):641-653.
- (8) Gerosa F. Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *J Exp Med* 2002;195(3):327 <last\_page> 333.
- (9) Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004 Oct;5(10):996-1002.
- (10) Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y, Kumagai K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 1983 Feb;130(2):988-992.
- (11) Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981;291(5813):335 <last\_page> 338.
- (12) Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol* 2008 Oct;20(5):597-605.
- (13) Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987;5:223-252.
- (14) Robbins SH, Brossay L. NK cell receptors: emerging roles in host defense against infectious agents. *Microbes Infect* 2002 Dec;4(15):1523-1530.
- (15) Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997 Nov 28;91(5):661-672.
- (16) Lanier LL. Turning on natural killer cells. *J Exp Med* 2000 Apr 17;191(8):1259-1262.
- (17) Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003 Oct;3(10):781-790.

- (18) Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004 Jan 28;23(2):255-259.
- (19) Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-393.
- (20) Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2002 Feb;38(9):637-660.
- (21) Mager DL, McQueen KL, Wee V, Freeman JD. Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons. *Curr Biol* 2001 Apr 17;11(8):626-630.
- (22) Takei F, McQueen KL, Maeda M, Wilhelm BT, Lohwasser S, Lian RH, et al. Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution. *Immunol Rev* 2001 Jun;181:90-103.
- (23) Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-251.
- (24) Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 2002 Oct 15;169(8):4253-4261.
- (25) Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 2003 Jan 20;197(2):245-255.
- (26) Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol* 2005 Jan;35(1):10-15.
- (27) Favier B, LeMaout J, Carosella ED. Functions of HLA-G in the immune system. *Tissue Antigens* 2007 Apr;69 Suppl 1:150-152.
- (28) Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 2007;39(9):1114-1119.
- (29) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002 Mar 15;295(5562):2097-2100.
- (30) Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature Reviews Immunology* 2003;3(2):108-122.
- (31) Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002 Sep 15;100(6):1935-1947.
- (32) Hägele M. Immunrekonstitution nach haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation: Einfluss eines CD3/CD19 depletierten gegenüber einem CD34 selektionierten Transplantat 2009.
- (33) Hunkapiller T, Hood L. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 1989;44:1-63.

- (34) Alfonso C, Karlsson L. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 2000;18:113-142.
- (35) Alenzi FQ, Alenazi BQ, Ahmad SY, Salem ML, Al-Jabri AA, Wyse RK. The haemopoietic stem cell: between apoptosis and self renewal. *Yale J Biol Med* 2009 Mar;82(1):7-18.
- (36) Carlo-Stella C, Tabilio A. Stem cells and stem cell transplantation. *Haematologica* 1996 Nov-Dec;81(6):573-587.
- (37) Bach F, Albertini R, Joo P, Anderson J, Bortin M. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *The Lancet* 1968;292(7583):1364-1366.
- (38) Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, Roberts JL, Markert ML, Peters W, et al. Haploidentical bone marrow stem cell transplantation in human severe combined immunodeficiency. *Semin Hematol* 1993 Oct;30(4 Suppl 4):92-101; discussion 102-4.
- (39) Friedrich W, Vetter U, Heymer B, Reisner Y, Goldmann S, Fliedner T, et al. Immunoreconstitution in severe combined immunodeficiency after transplantation of HLA-haploidentical, T-cell-depleted bone marrow. *The Lancet* 1984;323(8380):761-764.
- (40) Powles R, Kay H, Clink H, Barrett A, Depledge M, Sloane J, et al. Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. *The Lancet* 1983;321(8325):612-615.
- (41) Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med* 1985;313(13):765-771.
- (42) Ballen K, Spitzer T. The great debate: haploidentical or cord blood transplant. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(3):323-329.
- (43) Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991 Oct 15;78(8):2120-2130.
- (44) Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Cunningham-Rundles S, Dupont B, et al. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood* 1983 Feb;61(2):341-348.
- (45) Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994 Dec 1;84(11):3948-3955.
- (46) Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339(17):1186-1193.
- (47) Aversa F, Terenzi A, Felicini R, Carotti A, Falcinelli F, Tabilio A, et al. Haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Int J Hematol* 2002;76(1):165-168.
- (48) Champlin R, Hesdorffer C, Lowenberg B, Martelli MF, Mertelsmann RH, Reisner Y, et al. Haploidentical 'megadose' stem cell transplantation in acute leukemia: recommendations for a

protocol agreed upon at the Perugia and Chicago meetings. *Leukemia* 2002 Mar;16(3):427-428.

(49) O'Reilly RJ. T-cell depletion and allogeneic bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1992 Apr;29(2 Suppl 1):20-26.

(50) Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001 Apr;27(8):777-783.

(51) Lang P, Handgretinger R. Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:S54-S59.

(52) Spitzer TR, McAfee SL, Dey BR, Colby C, Hope J, Grossberg H, et al. Nonmyeloablative haploidentical stem-cell transplantation using anti-CD2 monoclonal antibody (MEDI-507)-based conditioning for refractory hematologic malignancies. *Transplantation* 2003;75(10):1748-1751.

(53) Mehta J, Singhal S, Gee A, Chiang K, Godder K, Van Rhee F, et al. Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(4):389-396.

(54) Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005 May 20;23(15):3447-3454.

(55) Rizzieri DA, Koh LP, Long GD, Gasparetto C, Sullivan KM, Horwitz M, et al. Partially matched, nonmyeloablative allogeneic transplantation: clinical outcomes and immune reconstitution. *J Clin Oncol* 2007 Feb 20;25(6):690-697.

(56) Huang X, Liu D, Liu K, Xu L, Chen H, Han W, et al. Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* 2009;15(2):257-265.

(57) Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008;14(6):641-650.

(58) Hough R, Cooper N, Veys P. Allogeneic haemopoietic stem cell transplantation in children: what alternative donor should we choose when no matched sibling is available? *Br J Haematol* 2009;147(5):593-613.

(59) Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354(17):1813-1826.

(60) Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 1993;328(9):593-602.

(61) Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007 Dec 15;110(13):4576-4583.

- (62) Dew A, Collins D, Artz A, Rich E, Stock W, Swanson K, et al. Paucity of HLA-identical unrelated donors for African-Americans with hematologic malignancies: the need for new donor options. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008;14(8):938-941.
- (63) Confer DL. Unrelated marrow donor registries. *Curr Opin Hematol* 1997;4(6):408-412.
- (64) Rosenmayr A, Pointner-Prager M, Mitterschiffthaler A, Bozic L, Pelzmann B, Tüchler H, et al. What are a patient's current chances of finding a matched unrelated donor? Twenty years' central search experience in a small country. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(2):172-180.
- (65) Johansen K, Schneider J, McCaffree M, Woods G. Efforts of the United States' National Marrow Donor Program and Registry to improve utilization and representation of minority donors. *Transfusion Medicine* 2008;18(4):250-259.
- (66) Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2002;8(5):257-260.
- (67) McGlave PB, Shu XO, Wen W, Anasetti C, Nademanee A, Champlin R, et al. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years' experience of the national marrow donor program. *Blood* 2000 Apr 1;95(7):2219-2225.
- (68) Davies SM, Ramsay NK, Weisdorf DJ. Feasibility and timing of unrelated donor identification for patients with ALL. *Bone Marrow Transplant* 1996 May;17(5):737-740.
- (69) Dini G, Valsecchi MG, Micalizzi C, Busca A, Balduzzi A, Arcese W, et al. Impact of marrow unrelated donor search duration on outcome of children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(3):325-331.
- (70) Boelens J, Wynn R, O'meara A, Veys P, Bertrand Y, Souillet G, et al. Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for Hurler's syndrome in Europe: a risk factor analysis for graft failure. *Bone Marrow Transplant* 2007;40(3):225-233.
- (71) Stephan J, Vlekova V, Le Deist F, Blanche S, Donadieu J, De Saint-Basile G, et al. Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *J Pediatr* 1993;123(4):564-572.
- (72) Green A, Clarke E, Hunt L, Canterbury A, Lankester A, Hale G, et al. Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome. *Blood* 1999 Oct 1;94(7):2236-2246.
- (73) Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001 May 15;97(10):2962-2971.
- (74) Giebel S, Giorgiani G, Martinetti M, Zecca M, Maccario R, Salvaneschi L, et al. Low incidence of severe acute graft-versus-host disease in children given haematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors prospectively matched for HLA class I and II alleles with high-resolution molecular typing. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(11):987-993.
- (75) Veys P, Amrolia P, Rao K. The role of haploidentical stem cell transplantation in the management of children with haematological disorders. *Br J Haematol* 2003;123(2):193-206.

- (76) Dey BR, Spitzer TR. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006;135(4):423-437.
- (77) Anasetti C, Hansen JA. Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. *Transfus Sci* 1994;15(3):221-230.
- (78) Peters C, Matthes-Martin S, Fritsch G, Holter W, Lion T, Witt V, et al. Transplantation of highly purified peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells from HLA-mismatched parental donors in 14 children: evaluation of early monitoring of engraftment. *Leukemia* 1999;13:2070-2078.
- (79) Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001 Apr;27(8):777-783.
- (80) Ortin M, Raj R, Kinning E, Williams M, Darbyshire PJ. Partially matched related donor peripheral blood progenitor cell transplantation in paediatric patients adding fludarabine and anti-lymphocyte gamma-globulin. *Bone Marrow Transplant* 2002 Sep;30(6):359-366.
- (81) Reisner Y, Martelli MF. Tolerance induction by 'megadose' transplants of CD34 stem cells: a new option for leukemia patients without an HLA-matched donor. *Curr Opin Immunol* 2000;12(5):536-541.
- (82) Henslee-Downey PJ, Abhyankar SH, Parrish RS, Pati AR, Godder KT, Neglia WJ, et al. Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* 1997 May 15;89(10):3864-3872.
- (83) Lang P, Greil J, Bader P, Handgretinger R, Klingebiel T, Schumm M, et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2004;33(3):281-287.
- (84) Lang P, Schumm M, Greil J, Bader P, Klingebiel T, Muller I, et al. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr* 2005 Nov-Dec;217(6):334-338.
- (85) Risk factors for outcome after haploidentical hematopoietic stem cell transplant in children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: Impact of centre experience. A survey on behalf of the ALWP and PDWP of the EBMT. *Blood: AMER SOC HEMATOLOGY 1900 M STREET. NW SUITE 200, WASHINGTON, DC 20036 USA*; 2006.
- (86) Marks DI, Khattry N, Cummins M, Goulden N, Green A, Harvey J, et al. Haploidentical stem cell transplantation for children with acute leukaemia. *Br J Haematol* 2006;134(2):196-201.
- (87) Chen X, Hale GA, Barfield R, Benaim E, Leung WH, Knowles J, et al. Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol* 2006;135(4):524-532.
- (88) Handgretinger R, CHEN X, Pfeiffer M, Mueller I, Feuchtinger T, Hale GA, et al. Feasibility and Outcome of Reduced-Intensity Conditioning in Haploidentical Transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1106(1):279-289.
- (89) Doderio A, Carniti C, Raganato A, Vendramin A, Farina L, Spina F, et al. Haploidentical stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning regimen for the treatment of

advanced hematologic malignancies: posttransplantation CD8-depleted donor lymphocyte infusions contribute to improve T-cell recovery. *Blood* 2009 May 7;113(19):4771-4779.

(90) Dey BR, McAfee S, Colby C, Cieply K, Caron M, Saidman S, et al. Anti-tumour response despite loss of donor chimaerism in patients treated with non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005;128(3):351-359.

(91) Ball L, Lankester A, Bredius R, Fibbe W, Van Tol M, Egeler R. Graft dysfunction and delayed immune reconstitution following haploidentical peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:S35-S38.

(92) Comoli P, Basso S, Zecca M, Pagliara D, Baldanti F, Bernardo M, et al. Preemptive Therapy of EBV-Related Lymphoproliferative Disease after Pediatric Haploidentical Stem Cell Transplantation. *American journal of transplantation* 2007;7(6):1648-1655.

(93) Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* 2005 Dec 15;106(13):4397-4406.

(94) Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, Adams S, Durett A, Gee A, et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006 Sep 15;108(6):1797-1808.

(95) Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007 Oct 1;110(7):2764-2767.

(96) Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoffer F, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2008;40(1):25-32.

(97) Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174-1178.

(98) Rocha V, Chastang C, Souillet G, Pasquini R, Plouvier E, Nagler A, et al. Related cord blood transplants: the Eurocord experience from 78 transplants. Eurocord Transplant group. *Bone Marrow Transplant* 1998 Jun;21 Suppl 3:S59-62.

(99) Gluckman E, Thierry D, Traineau R. Blood banking for hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematother* 1993;2(2):269-270.

(100) Gluckman E, Wagner J, Hows J, Kernan N, Bradley B, Broxmeyer HE. Cord blood banking for hematopoietic stem cell transplantation: an international cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant* 1993 Mar;11(3):199-200.

(101) Rubinstein P, Adamson JW, Stevens C. The Placental/Umbilical Cord Blood Program of the New York Blood Center A Progress Report. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872(1):328-335.

(102) Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001 May 15;97(10):2962-2971.

- (103) Rocha V, Wagner Jr JE, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang M, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 2000;342(25):1846-1854.
- (104) Barker JN, Davies SM, DeFor T, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 2001 May 15;97(10):2957-2961.
- (105) Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339(22):1565-1577.
- (106) Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002 Sep 1;100(5):1611-1618.
- (107) Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004;32(4):397-407.
- (108) Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(2):207-214.
- (109) Fernandez MN, Regidor C, Cabrera R, Garcia-Marco J, Briz M, Fores R, et al. Cord blood transplants: early recovery of neutrophils from co-transplanted sibling haploidentical progenitor cells and lack of engraftment of cultured cord blood cells, as ascertained by analysis of DNA polymorphisms. *Bone Marrow Transplant* 2001 Aug;28(4):355-363.
- (110) De Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson B, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(9):771-778.
- (111) Frassoni F, Gualandi F, Podestà M, Raiola AM, Ibatucci A, Piaggio G, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *The Lancet Oncology* 2008;9(9):831-839.
- (112) Brunstein C, Barker J, Weisdorf D, DeFor T, McKenna D, Chong S, et al. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(12):935-940.
- (113) Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-Monna M, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood* 2007 Feb 1;109(3):1322-1330.
- (114) Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Konuma T, Kato S, et al. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with acute myelogenous leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008;14(12):1341-1347.

- (115) Matsuno N, Wake A, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, et al. Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation. *Blood* 2009 Aug 20;114(8):1689-1695.
- (116) van Rood JJ, Stevens CE, Smits J, Carrier C, Carpenter C, Scaradavou A. Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Nov 24;106(47):19952-19957.
- (117) Barker J, Weisdorf D, Wagner J. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344(24):1870-1871.
- (118) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005 Feb 1;105(3):1343-1347.
- (119) MacMillan ML, Weisdorf DJ, Brunstein CG, Cao Q, DeFor TE, Verneris MR, et al. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood* 2009 Mar 12;113(11):2410-2415.
- (120) Lang P, Pfeiffer M, Muller I, Schumm M, Ebinger M, Koscielniak E, et al. Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr* 2006 Nov-Dec;218(6):321-326.
- (121) Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411(6835):385-389.
- (122) Miller JS, Cooley S, Parham P, Farag SS, Verneris MR, McQueen KL, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood* 2007 Jun 1;109(11):5058-5061.
- (123) Re F, Staudacher C, Zamai L, Vecchio V, Bregni M. Killer cell Ig-like receptors ligand-mismatched, alloreactive natural killer cells lyse primary solid tumors. *Cancer* 2006;107(3):640-648.
- (124) Pérez-Martínez A, Leung W, Munoz E, Iyengar R, Ramírez M, Vicario JL, et al. KIR–HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. *Pediatric blood & cancer* 2009;53(1):120-124.
- (125) Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999 Jul 1;94(1):333-339.
- (126) Blaise D, Bay JO, Faucher C, Michallet M, Boiron JM, Choufi B, et al. Reduced-intensity preparative regimen and allogeneic stem cell transplantation for advanced solid tumors. *Blood* 2004 Jan 15;103(2):435-441.
- (127) Koscielniak E, Gross-Wieltsch U, Treuner J, Winkler P, Klingebiel T, Lang P, et al. Graft-versus-Ewing sarcoma effect and long-term remission induced by haploidentical stem-cell transplantation in a patient with relapse of metastatic disease. *J Clin Oncol* 2005 Jan 1;23(1):242-244.

- (128) Inoue M, Nakano T, Yoneda A, Nishikawa M, Nakayama M, Yumura-Yagi K, et al. Graft-versus-tumor effect in a patient with advanced neuroblastoma who received HLA haplo-identical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(1):103-106.
- (129) Kasow KA, Handgretinger R, Krasin MJ, Pappo AS, Leung W. Possible allogeneic graft-versus-tumor effect in childhood melanoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003 Dec;25(12):982-986.
- (130) Inaba H, Handgretinger R, Furman W, Hale G, Leung W. Allogeneic graft-versus-hepatoblastoma effect. *Pediatric blood & cancer* 2006;46(4):501-505.
- (131) Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 2004 Jan 1;172(1):644-650.
- (132) Ruggeri L, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli E, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *Journal of Immunotherapy* 2005;28(3):175-182.
- (133) Ciurea S, Saliba R, Rondon G, Pesoa S, Cano P, Fernandez-Vina M, et al. Reduced-intensity conditioning using fludarabine, melphalan and thiotepa for adult patients undergoing haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(3):429-436.
- (134) Bethge WA, Faul C, Bornhäuser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2008;40(1):13-19.
- (135) Lang P, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schwinger W, Schlegel P, Pfeiffer M, et al. Improved immune recovery after transplantation of TCRalpha/beta/CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2015 Jun;50 Suppl 2:S6-S10.
- (136) Otto M, Barfield RC, Iyengar R, Gatewood J, Müller I, Holladay MS, et al. Human  $\gamma\delta$  T cells from G-CSF-mobilized donors retain strong tumoricidal activity and produce immunomodulatory cytokines after clinical-scale isolation. *Journal of Immunotherapy* 2005;28(1):73-78.
- (137) Pelot MR, Pearson DA, Swenson K, Zhao G, Sachs J, Yang Y, et al. Lymphohematopoietic graft-vs.-host reactions can be induced without graft-vs.-host disease in murine mixed chimeras established with a cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1999;5(3):133-143.
- (138) Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood* 2002 Sep 1;100(5):1903-1909.
- (139) TR S. Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor. (1520-4383; 1520-4383).
- (140) Sykes M, Preffer F, McAfee S, Saidman SL, Weymouth D, Andrews DM, et al. Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *The Lancet* 1999;353(9166):1755-1759.
- (141) Mapara M, Kim Y, Marx J, Sykes M. DLI-mediated GVL effects in mixed chimeras established with a non-myeloablative conditioning regimen: extinction of GVL effects coincides

with loss of alloreactive cells following conversion to full donor chimerism. *Transplantation* 2003;76:297-305.

(142) Baron F, Storb R. Current roles for allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative or reduced-intensity conditioning. *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 2005;3(10).

(143) Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997 Jun 15;89(12):4531-4536.

(144) Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R, Colby C, Toh HC, Multani P, et al. Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2000;6(3):309-320.

(145) McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001 Jun 1;97(11):3390-3400.

(146) Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, de Lima M, et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* 2004;10(3):178-185.

(147) Drobyski WR, Klein J, Flomenberg N, Pietryga D, Vesole DH, Margolis DA, et al. Superior survival associated with transplantation of matched unrelated versus one-antigen-mismatched unrelated or highly human leukocyte antigen-disparate haploidentical family donor marrow grafts for the treatment of hematologic malignancies: establishing a treatment algorithm for recipients of alternative donor grafts. *Blood* 2002 Feb 1;99(3):806-814.

(148) Ferrara J, Cooke KR, Deeg HJ. *Graft-vs.-host disease*. : CRC Press; 1996.

(149) van Bekkum DW, De Vries MJ. *Radiation chimaeras*. : Logos Press [London][New York] Academic Press; 1967.

(150) Billingham R. *The biology of graft-versus-host reactions*. 1966.

(151) Gowans J. The fate of parental strain small lymphocytes in F1 hybrid rats. *Ann N Y Acad Sci* 1962;99(3):432-455.

(152) McGregor DD. Bone marrow origin of immunologically competent lymphocytes in the rat. *J Exp Med* 1968 May 1;127(5):953-966.

(153) Korngold R, Sprent J. T cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* 1987;44(3):335-339.

(154) Deeg H, Cottler-Fox M. Clinical spectrum and pathophysiology of acute graft-vs.-host disease. *Graft-vs.-Host Disease: Immunology, Pathophysiology, and Treatment*. New York, NY, Marcel Dekker 1990.

- (155) Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 2009;373(9674):1550-1561.
- (156) Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lönnqvist B, Hägglund H, Klaesson S, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(8):755-761.
- (157) Nash RA, Pepe MS, Storb R, Longton G, Pettinger M, Anasetti C, et al. Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. *Blood* 1992 Oct 1;80(7):1838-1845.
- (158) Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. *Blood* 1986 Sep;68(3):770-773.
- (159) Ji S, Chen H, Yan H, Wang H, Liu J, Zhu P, et al. Anti-CD25 monoclonal antibody (basiliximab) for prevention of graft-versus-host disease after haploidentical bone marrow transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(4):349-354.
- (160) Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1995 Mar 15;85(6):1655-1658.
- (161) van Rood JJ, Loberiza FR, Jr, Zhang MJ, Oudshoorn M, Claas F, Cairo MS, et al. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood* 2002 Mar 1;99(5):1572-1577.
- (162) Stern M, Ruggeri L, Mancusi A, Bernardo ME, de Angelis C, Bucher C, et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. *Blood* 2008 Oct 1;112(7):2990-2995.
- (163) Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002 Dec 15;100(13):4358-4366.
- (164) Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 2000 Apr 1;95(7):2240-2245.
- (165) Wingard J. Fungal infections after bone marrow transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 1999;5(2):55-68.
- (166) Sable CA, Donowitz GR. Infections in bone marrow transplant recipients. *Clinical infectious diseases* 1994;273-281.
- (167) Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 2002 Dec 15;100(13):4521-4528.
- (168) Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, Schönrich G. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* 2001;15(6):997-1009.

- (169) Heagy W, Crumpacker C, Lopez PA, Finberg RW. Inhibition of immune functions by antiviral drugs. *J Clin Invest* 1991 Jun;87(6):1916-1924.
- (170) Bunjes D, Duncker C, Wiesneth M, Stefanic M, Dohr D, Harsdorf S, et al. CD34<sup>+</sup> selected cells in mismatched stem cell transplantation: a single centre experience of haploidentical peripheral blood stem cell transplantation. *BONE MARROW TRANSPLANTATION-BASINGSTOKE*- 2000;25:S9-S11.
- (171) Storek J, Gooley T, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol* 1997;54(2):131-138.
- (172) Hebart H, Daginek S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002 May 15;99(10):3830-3837.
- (173) Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995;333(16):1038-1044.
- (174) Peggs KS, Verfuere S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *The Lancet* 2003;362(9393):1375-1377.
- (175) Riddell SR, Greenberg PD. T cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts. *Rev Med Virol* 1997;7(3):181-192.
- (176) Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998 Sep 1;92(5):1549-1555.
- (177) Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990 Dec 15;76(12):2462-2465.
- (178) Drobyski WR, Keever CA, Roth MS, Koethe S, Hanson G, McFadden P, et al. Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood* 1993 Oct 15;82(8):2310-2318.
- (179) Helg C, Roux E, Beris P, Cabrol C, Wacker P, Darbellay R, et al. Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993 Aug;12(2):125-129.
- (180) Van Rhee F, Lin F, Cullis J, Spencer A, Cross N, Chase A, et al. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *BLOOD-NEW YORK*- 1994;83:3377-3377.
- (181) Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, Thomas LL, Verdonck LF. Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997 Nov 15;90(10):4206-4211.

- (182) Salama M, Nevill T, Marcellus D, Parker P, Johnson M, Kirk A, et al. Donor leukocyte infusions for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(11):1179-1184.
- (183) Schaap N, Schattenberg A, Bar B, Preijers F, van de Wiel van Kemenade E., de Witte T. Induction of graft-versus-leukemia to prevent relapse after partially lymphocyte-depleted allogeneic bone marrow transplantation by pre-emptive donor leukocyte infusions. *Leukemia* 2001 Sep;15(9):1339-1346.
- (184) Verdonck L, Petersen E, Lokhorst H, Nieuwenhuis H, Dekker A, Tilanus M, et al. Donor leukocyte infusions for recurrent hematologic malignancies after allogeneic bone marrow transplantation: impact of infused and residual donor T cells. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(11):1057-1063.
- (185) Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev* 2010;36(7):528-538.
- (186) Marks DI, Lush R, Cavenagh J, Milligan DW, Schey S, Parker A, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002 Nov 1;100(9):3108-3114.
- (187) Peggs KS, Mackinnon S, Linch DC. The role of allogeneic transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2005;128(2):153-168.
- (188) Carlens S, Remberger M, Aschan J, Ringdén O. The role of disease stage in the response to donor lymphocyte infusions as treatment for leukemic relapse. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001;7(1):31-38.
- (189) Karastaneva A, Urban C, Lackner H, Schwinger W. Dynamics of Graft Function Measured by DNA-Technology in a Patient with Severe Aplastic Anemia and Repeated Stem Cell Transplantation. *Case Rep Med* 2014;2014:576373.
- (190) Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *Journal of molecular medicine* 2001;79(11):631-640.
- (191) Ciupe SM, Devlin BH, Markert ML, Kepler TB. Quantification of total T-cell receptor diversity by flow cytometry and spectratyping. *BMC Immunol* 2013 Aug 6;14:35-2172-14-35.
- (192) Kim JA, Rao P, Graor H, Rothchild K, O'Keefe C, Maciejewski JP. CDR3 spectratyping identifies clonal expansion within T-cell subpopulations that demonstrate therapeutic antitumor activity. *Surgery* 2004;136(2):295-302.
- (193) Björkström NK, Ljunggren H, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 2010;31(11):401-406.
- (194) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000 Mar;182(3):311-322.
- (195) Marsh RA, Vaughn G, Kim MO, Li D, Jodele S, Joshi S, et al. Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2010 Dec 23;116(26):5824-5831.

- (196) Spitzer TR. Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:390-395.
- (197) Chen X, Barfield R, Benaim E, Leung W, Knowles J, Lawrence D, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood* 2005 Jan 15;105(2):886-893.
- (198) Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(3):225-231.
- (199) Beiras-Fernandez A, Thein E, Hammer C. Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp Clin Transplant* 2003 Dec;1(2):79-84.
- (200) Lundqvist A, Childs R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for solid tumors: current status and future directions. *Journal of Immunotherapy* 2005;28(4):281-288.
- (201) Pérez-Simón JA, Martino R, Alegre A, Tomás JF, De Leon A, Caballero D, et al. Chronic but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2003;121(1):104-108.
- (202) Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet* 2000;356(9244):1795-1799.
- (203) Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol* 2001 Mar 1;166(5):2992-3001.
- (204) Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002 Mar 1;168(5):2307-2315.
- (205) Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 2003 Jan 20;197(2):245-255.
- (206) Leung W, Iyengar R, Triplett B, Turner V, Behm FG, Holladay MS, et al. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol* 2005 May 15;174(10):6540-6545.
- (207) Dey BR, Spitzer TR. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006;135(4):423-437.
- (208) Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999 Jul 16;285(5426):412-415.
- (209) FAU DB, TR S. Current status of haploidentical stem cell transplantation. (0007-1048; 0007-1048).

(210) Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002 Aug 5;196(3):389-399.

(211) Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4 CD25 regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9(9):1144-1150.

(212) Hanash AM, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2005 Feb 15;105(4):1828-1836.

(213) Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000 Jan;18(2):307-316.

(214) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30(1):42-48.

(215) Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002 May 15;99(10):3838-3843.

(216) Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin M, Dennis J, Haynesworth S, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(6):597-604.

(217) Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005 Feb 15;105(4):1815-1822.

(218) Lee ST, Jang JH, Cheong J, Kim JS, Maeng H, Hahn JS, et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002;118(4):1128-1131.

(219) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004;363(9419):1439-1441.

(220) Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999 Aug 15;94(4):1201-1208.

(221) Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, Comoli P, Locatelli F, Maccario R, et al. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 1999 May 15;93(10):3550-3557.

(222) Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 2002 May 1;99(9):3083-3088.

- (223) Michalek J, Collins RH, Durrani HP, Vaclavkova P, Ruff LE, Douek DC, et al. Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Feb 4;100(3):1180-1184.
- (224) Tamaki S, Ichinohe T, Matsuo K, Hamajima N, Hirabayashi N, Dohy H, et al. Superior survival of blood and marrow stem cell recipients given maternal grafts over recipients given paternal grafts. *Bone Marrow Transplant* 2001 Aug;28(4):375-380.
- (225) Harris DT, Schumacher MJ, LoCascio J, Booth A, Bard J, Boyse EA. Immunoreactivity of umbilical cord blood and post-partum maternal peripheral blood with regard to HLA-haploidentical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994 Jul;14(1):63-68.
- (226) Claas FH, Gijbels Y, van der Velden-de Munck J, van Rood JJ. Induction of B cell unresponsiveness to noninherited maternal HLA antigens during fetal life. *Science* 1988 Sep 30;241(4874):1815-1817.
- (227) Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jan 23;93(2):705-708.
- (228) Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996 Dec 1;88(11):4390-4395.
- (229) Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 1999 Mar 15;93(6):2033-2037.
- (230) Tanaka A, Lindor K, Ansari A, Gershwin ME. Fetal microchimerisms in the mother: immunologic implications. *Liver Transplantation* 2000;6(2):138-143.
- (231) Stern M, Ruggeri L, Mancusi A, Bernardo ME, de Angelis C, Bucher C, et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. *Blood* 2008 Oct 1;112(7):2990-2995.
- (232) Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 2003 Apr 1;101(7):2686-2692.
- (233) Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003 Jan 15;101(2):407-414.
- (234) Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393(6684):474-478.
- (235) Handgretinger R, Anderson K, Lang P, Dopfer R, Klingebiel T, Schrappe M, et al. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14. 18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995;31(2):261-267.
- (236) Recchia F, Cesta A, Rea S. Low dose interleukin-2 and 13-cis-retinoic acid as maintenance therapy in patients with solid tumors responsive to chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22(4 Suppl):135-143.

- (237) Simon T, Hero B, Faldum A, Handgretinger R, Schrappe M, Niethammer D, et al. Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004 Sep 1;22(17):3549-3557.
- (238) Lang P, Teltschik H-, Feuchtinger T, Pfeiffer M, Pflugrad U, Teltschik R, et al. Allogene Stammzelltransplantation bei pädiatrischen soliden Tumoren. 2011;17(11):1024-1031.
- (239) Chen X, Hale GA, Barfield R, Benaim E, Leung WH, Knowles J, et al. Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol* 2006;135(4):524-532.
- (240) Lang P, Pfeiffer M, Muller I, Schumm M, Ebinger M, Koscielniak E, et al. Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr* 2006 Nov-Dec;218(6):321-326.
- (241) Ciurea SO, de Lima M, Cano P, Korbling M, Giralt S, Shpall EJ, et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009 Oct 27;88(8):1019-1024.

## G BUCHZITATE

- Delves, Martin, Burton, Roitt. *Roitt's essential Immunology*. 12th edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2011.
- E.-J. Speckmann, J. Hescheler, R. Köhling. „Physiologie.“ München: Urban & Fischer, 2013.
- Gordon MacPherson, Jon Austyn. *Exploring Immunology - Concepts and Evidence*. Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell, 2012.
- Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport. *Janeway Immunologie 7te Auflage*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2014.
- Lüllmann-Rauch. „Taschenlehrbuch Histologie, 4.Auflage.“ Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 2012.
- Lüllmann-Rauch, Renate. „Taschenlehrbuch Histologie.“ Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 2012.
- Murphy, Kenneth. „Janeway's Immunobiology.“ New York: Garland Science, 2012.
- Murphy, Travers, Walport. „Janeway Immunologie.“ In *8th edition*, 8-10. London and New York: Garland Science, 2012.
- Rink, Kruse, Haase. *Immunologie für Einsteiger*. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.
- Rink, Kruse, Haase. „Immunologie für Einsteiger.“ 49. Spektrum akademischer Verlag, 2012.
- Vollmar/Zündorf/Dingermann. *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe*. 2 Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2012.
- W.Mak, E. Saunders. „The Immune Response.“ In *Basic and Clinical Principles*. Elsevier, 2006.