

Diplomarbeit

Allogene Stammzelltransplantation im Kindes- und Jugendalter

-

Vergleich der unterschiedlichen ex vivo Graftmanipulationen und deren Auswirkung auf die Immunrekonstitution

Eine retrospektive Studie an 118 Patient*innen an der klinischen Abteilung für
pädiatrische Hämato-Onkologie von 2004-2022

eingereicht von

Patricia Teresa Bachlechner-Radl

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Drⁱⁿ. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-/Onkologie
unter der Anleitung von**

OA Dr. med. univ. Thomas Perwein
und

Ao.Univ.-Prof. Dr. med. univ. Wolfgang Schwinger

Graz, 30.01.2025

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.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, 30.01.2025

Patricia Teresa Bachlechner-Radl eh.

Für meinen Julian,

*was bleibt, ist deine Liebe und deine Jahre voller Leben
und das Leuchten in den Augen aller, die von dir erzählen!*

(Julia Engelmann)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, OA Dr. med. univ. Thomas Perwein, der mir stets mit Rat und konstruktivem Feedback zur Seite stand. Ebenso danke ich Ao.Univ.-Prof. Dr. med. univ. Wolfgang Schwinger, dessen Unterstützung und Expertise maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht auch an Andrea Raicht, die mich tatkräftig bei der Erhebung der Labordaten unterstützt hat, sowie an Oberrat Mag.rer.nat. Gerold Schwantzer für seine wertvolle Hilfe bei den statistischen Analysen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während des Verfassens dieser Arbeit und meines gesamten Studiums mit Geduld, Zuspruch und Verständnis begleitet haben. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!

Zusammenfassung

Einleitung: Diese Arbeit konzentriert sich auf den Vergleich unterschiedlicher Graftmanipulationen (CD34+ Selektion, CD3+/CD19+ Depletion, CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+ Depletion) mit nicht-manipulierten Grafts und deren Auswirkung auf die Immunrekonstitution nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT). Ein rasches Engraftment und eine effektive Immunrekonstitution sind zwei der wichtigsten Schlüsselfaktoren, um eine niedrige transplantationsbedingte Morbidität und Mortalität (TRM) zu erreichen. Der ideale Verlauf einer HSZT zeichnet sich durch ein stabiles Engraftment, einem Gleichgewicht zwischen effektiven Graft-versus-Leukämie (GVL) / Graft-versus-Tumor (GVT) -Effekt, niedrigen GVHD-Raten und der Erholung der Immunabwehr durch ein quantitativ und qualitativ funktionsfähiges Immunsystem aus. Für den Erfolg der HSZT spielen unterschiedliche Faktoren eine Rolle. Um die Einflüsse auf die Immunrekonstitution vollständig zu erfassen, wurden Aspekte wie die Wahl der Spender*innen, die Stammzellquelle, die Konditionierungstherapie, auftretende Graft-versus-Host Disease (GVHD) und Infektionen in die Analyse integriert. Ziel dieser Studie war es, durch den Vergleich der Graftmanipulationen wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Immunrekonstitution bei 118 pädiatrischen Patient*innen an der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie Graz im Zeitraum vom 01.01.2004 bis zum 31.12.2022 zu gewinnen.

Methoden: In dieser retrospektiven Analyse wurden die Patient*innen hinsichtlich der Graftmanipulationen in vier Gruppen eingeteilt (Gruppe I: unmanipuliert, Gruppe II: CD34+ Selektion, Gruppe III: CD3+/CD19+ Depletion, Gruppe IV: CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+ Depletion). Um Aussagen über die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems treffen zu können wurden Daten zur Immunrekonstitution zu acht Messzeitpunkten (+14, +28, +90, +180, +270, +360, +540, +720) erhoben.

Ergebnisse: Ein stabiles drei-Linien Engraftment wurde in den T-Zell-depletierten Gruppen (TCD) III und IV signifikant früher erreicht. In Gruppe III kam es im Median am Tag +9 und in Gruppe IV am Tag +10 ($p < 0,001$) zum Engraftment. Trotz signifikant kürzerer Verabreichung der GVHD-Prophylaxe (Gruppe III: $p < 0,005$; Gruppe IV: $p < 0,001$) traten in den TCD-Gruppen weniger Fälle von akuter GVHDs auf. Außerdem kam es in den TCD-Gruppen zu einer frühzeitigen Rekonstitution der NK-Zellen: in Gruppe III und IV wurden am Tag +14 schon Normwerte erreicht. Die B-Zellen erholten sich zuerst in Gruppe IV (9-11 Monate). Die T-Zellen normalisierten sich nach 7-11 Monaten. Während in Gruppe IV

eine frühe Erholung der CD4⁺ T-Zellen (11 Monate) festgestellt wurde, normalisierten sich die CD8⁺ Subgruppen zuerst in Gruppe I (5 Monate). In Gruppe IV traten TRECs in der höchsten Anzahl nach 4 Monaten auf ($p=0,001$). Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire war in Gruppe I von Anfang an breit gefächert und nach der T-Zell-Depletion zunächst eingeschränkt, jedoch nach 8 Monaten wiederhergestellt.

Schlussfolgerung: Diese vorliegende Analyse zeigte in den TCD-Gruppen ein zügiges Engraftment mit stabilem Chimärismus. Vor allem die Methode der CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺ Depletion führte zu einer raschen und effektiven Immunrekonstitution. Darüber hinaus traten in Gruppe IV trotz des häufigeren HLA-Mismatch-Settings, der Anwendung von DLI und der kürzeren immunsuppressiven Therapie seltener akute GVHDs ($p<0,021$) mit weniger schwerwiegender Ausprägung auf. Zusätzlich wurden in Gruppe IV signifikant weniger Infektionen beobachtet ($p<0,030$). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen auf, dass die Methode der CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺ Depletion im Vergleich zur unmanipulierten Knochenmarksspende eine vielversprechende Strategie darstellt, die TRM zu senken.

Abstract

Introduction: This study focuses on comparing different graft manipulation methods (CD34+ selection, CD3+/CD19+ depletion, CD3+ TCR $\alpha\beta$ /CD19+ depletion) with non-manipulated grafts and their impact on immune reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Rapid engraftment and effective immune reconstitution are two critical factors in achieving low transplantation-related morbidity and mortality (TRM). An optimal HSCT course is characterized by stable engraftment, a balance between effective graft-versus-leukemia (GVL) or graft-versus-tumor (GVT) effects, low GVHD rates, and immune recovery through a quantitatively and qualitatively functional immune system. The success of HSCT is influenced by several factors. To fully assess the impact on immune reconstitution, aspects such as donor selection, stem cell source, conditioning regimen, occurrence of graft-versus-host disease (GVHD), and infections were integrated into the analysis. The aim of this study was to gain insights into immune reconstitution by comparing graft manipulations in 118 pediatric patients at the Department of Pediatric Hemato-Oncology in Graz from January 1, 2004, to December 31, 2022.

Methods: In this retrospective analysis, patients were divided into four groups according to the type of graft manipulation (Group I: unmanipulated, Group II: CD34+ selection, Group III: CD3+/CD19+ depletion, Group IV: CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+ depletion). To assess hematopoietic reconstitution, immune reconstitution data were collected at eight time points (+14, +28, +90, +180, +270, +360, +540, +720 days).

Results: Stable three-lineage engraftment was achieved significantly earlier in the T-cell-depleted groups (TCD) III and IV. In group III, median day of engraftment was on day +9 and on day +10 in group IV ($p < 0.001$). Despite significantly shorter administration of GVHD prophylaxis (group III: $p < 0.005$; group IV: $p < 0.001$), fewer cases of acute GVHDs occurred in the TCD groups. In addition, there was an early reconstitution of NK cells in the TCD groups: in groups III and IV, normal values were already reached on day +14. The B cells recovered first in group IV (9-11 months). The T cells normalized after 7-11 months. While an early recovery of CD4+ T cells was observed in group IV (11 months), the CD8+ subgroups normalized first in group I (5 months). In group IV, TRECs occurred in the highest number after 4 months ($p = 0.001$). The T-cell receptor repertoire was broad in group I from the beginning and initially restricted after T-cell depletion, but was restored after 8 months.

Conclusion: This analysis demonstrated rapid engraftment with stable chimerism in the TCD groups. The CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+ depletion method, in particular, led to rapid and effective immune reconstitution. Furthermore, in Group IV, acute GVHD occurred less frequently ($p<0.021$) and with milder severity, despite more frequent HLA mismatch settings, the use of DLI, and shorter immunosuppressive therapy. Additionally, significantly fewer infections were observed in Group IV ($p<0.030$). The findings of this study suggest that CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+ depletion method is maybe a promising strategy to reduce TRM compared to unmanipulated bone marrow transplantation.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN UND DEREN ERKLÄRUNG	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	2
TABELLENVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 ALLOGENE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION.....	5
1.2 SPENDER*INNENAUSWAHL.....	6
1.2.1 HLA-KOMPATIBILITÄT	6
1.3 KONDITIONIERUNG.....	8
1.4 STAMMZELLRESSOURCEN UND CD34+ ZELLEN	9
1.5 ENGRAFTMENT UND IMMUNREKONSTITUTION	10
1.6 GRAFTZUSAMMENSETZUNG	11
1.6.1 NK- ZELLEN (CD3-56+)	12
1.6.2 T-LYMPHOZYTEN (CD3+) UND SUBPOPULATIONEN.....	13
1.6.3 B-LYMPHOZYTEN (CD19+).....	13
1.7 KOMPLIKATIONEN	15
1.7.1 GVHD.....	15
1.7.2 INFEKTIONEN.....	16
1.8 FORSCHUNGSFRAGE	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 STUDIENDESIGN.....	19
2.2 PATIENT*INNENKOLLEKTIV	20
2.2.1 GRUNDERKRANKUNG.....	21
2.2.2 SPENDER*INNEN UND STAMMZELLQUELLEN.....	22
2.2.3 KONDITIONIERUNG.....	23
2.3 IMMUNREKONSTITUTION UND ENGRAFTMENT	24
2.3.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER IMMUNSTATUS.....	24
2.3.2 CHIMÄRISMUSANALYSE	25
2.3.3 TREC-ANALYSE	25
2.3.4 SPECTRATYPING	25
2.4 STATISTISCHE ANALYSEN	26
3 ERGEBNISSE – RESULTATE MIT GRAPHISCHEN DARSTELLUNGEN	27
3.1 GRAFT SURVIVAL	27
3.2 ENGRAFTMENT	28
3.3 INFEKTIONEN	30
3.4 GVHD.....	31
3.5 IMMUNREKONSTITUTION.....	34
3.5.1 CHIMÄRISMUSANALYSE	34
3.5.2 CD3+ T-ZELLEN.....	34
3.5.3 CD4+ T-ZELLEN.....	35
3.5.4 CD8+ T-ZELLEN.....	36

3.5.5	NKT-ZELLEN (CD3+/CD56+)	36
3.5.6	NK-ZELLEN (CD3-/CD56+).....	37
3.5.7	MONOZYTEN (CD14+)	38
3.5.8	B-ZELLEN (CD19+).....	38
3.5.9	CD4+/45RA+ ZELLEN UND CD8+/45RA+ ZELLEN.....	39
3.5.10	CD3+/CD4+/ TCRAB+ UND CD3+/CD8+/TCRAB+	40
3.5.11	CD3+/CD4+/TCR Γ Δ + UND CD3+/CD8+/TCR Γ Δ +	41
3.5.12	SPECTRATYPING.....	42
4	DISKUSSION	47
4.1	LIMITATIONEN.....	47
4.2	GRAFTMANIPULATIONEN	48
4.3	ENGRAFTMENT UND SPENDER*INNENCHIMÄRISMUS	50
4.4	IMMUNREKONSTITUTION.....	51
4.4.1	NK-ZELLEN.....	51
4.4.2	T-ZELLEN UND SUBPOPULATIONEN.....	52
4.4.3	B-ZELLEN	54
4.5	TRANSPLANTATIONSBEDINGTE KOMPLIKATIONEN	54
4.5.1	GVHD	54
4.5.2	INFEKTIONEN.....	56
5	FAZIT	57
6	ZUKÜNFTIGE PERSPEKTIVEN	58
	LITERATURVERZEICHNIS	59

Abkürzungen und deren Erklärung

HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
GVHD	Graft versus Host Disease
TCD	T-Zell-depletiert
CD	Cluster of differentiation
MRS	Matched related sibling
MUD	Matched unrelated donor
MMRD	Mismatched related donor
MMUD	Mismatched unrelated donor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
MHC	Major Histocompatibility complex
KMT	Knochenmarkstransplantation
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
GVH	Graft versus Host
HVG	Host versus Graft
TBI	Total body irradiation
TRM	Transplantationsbedingte Morbidität + Mortalität
GVL	Graft versus Leukemia
GVT	Graft versus Tumor
WBC	White blood cell count
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MTX	Methotrexat
CYA	Cyclosporin A
TAC	Tacrolimus
SIR	Sirolimus
SCS	Spectra Complexity Score

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rekonstitution der unterschiedlichen Immunzellen nach allogener HSZT über die Zeit (36)	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rekonstitution der B-Zellen nach allogener HSZT (43,44)	15
Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven des Graft-Survival der 131 Transplantationsverläufe.	27
Abbildung 4: Entwicklung des Chimärismus in den vier Gruppen über den Messzeitraum von Tag +14 bis Tag +720.....	34
Abbildung 5: Entwicklung der CD3+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	35
Abbildung 6: Entwicklung der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	35
Abbildung 7: Entwicklung der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	36
Abbildung 8: Entwicklung der CD3+/CD56+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	37
Abbildung 9: Entwicklung der CD3-/CD56+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	37
Abbildung 10: Entwicklung der CD14+Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	38
Abbildung 11: Entwicklung der CD19+Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	39
Abbildung 12: Rekonstitution der CD4+/45RA+ Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	39
Abbildung 13: Rekonstitution der CD8+/45RA+ Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	40
Abbildung 14: Rekonstitution der CD3+/CD4+/ TCR $\alpha\beta$ + über den Messzeitraum in den vier Gruppen.....	40
Abbildung 15: Rekonstitution der CD3+/CD8+/ TCR $\alpha\beta$ + über den Messzeitraum in den vier Gruppen.....	41
Abbildung 16: Rekonstitution der CD3+/CD4+/TCR $\gamma\delta$ + über den Messzeitraum in den vier Gruppen.....	41
Abbildung 17: Rekonstitution der CD3+/CD8+/TCR $\gamma\delta$ + über den Messzeitraum in den vier Gruppen.....	42
Abbildung 18: Complexity Scale CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	43
Abbildung 19: Complexity Scale CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	43
Abbildung 20: Fehlende Muster der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	43
Abbildung 21: Fehlende Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	44
Abbildung 22: Oligoklonale Muster CD4+ Zellen über den Messzeitraum der vier Gruppen.....	44
Abbildung 23: Oligoklonale Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	44
Abbildung 24: Monoklonale Muster der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	45

Abbildung 25: Monoklonale Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	45
Abbildung 26: Monoklonale Muster in polyklonalen Hintergrund der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	45
Abbildung 27: Monoklonale Muster in polyklonalen Hintergrund der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	46
Abbildung 28: Polyklonale Muster der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	46
Abbildung 29: Polyklonale Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der Gesamtkohorte	21
Tabelle 2: Maligne Erkrankungen	21
Tabelle 3: Nicht maligne Erkrankungen.....	22
Tabelle 4: Verteilung der Stammzellspenden und Stammzellquellen auf die vier Gruppen	23
Tabelle 5: Konditionierung.....	23
Tabelle 6: Anzahl der transplantierten Zellen und Engraftment	29
Tabelle 7: Therapiebedürftige Infektionen im ersten Jahr nach HSZT, Todesfälle durch Infektionen.....	30
Tabelle 8: GVHD-Prophylaxe	31
Tabelle 9: Akute GVHD.....	33
Tabelle 10: Chronische GVHD	33

1 Einleitung

1.1 *Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation*

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist mittlerweile ein wichtiger Bestandteil in der Therapie maligner und nicht maligner Erkrankungen, sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter. Die Stammzelltransplantation wird bei einem breiten Spektrum von Erkrankungen eingesetzt, unter anderem bei hämatologischen Neoplasien sowie bei Knochenmarks- und Immuninsuffizienzen. Oftmals stellen seltene angeborene Erkrankungen wie schwere kombinierte Immundefekte, Hämoglobinopathien oder schwere Stoffwechselerkrankungen eine Indikation dar. Über 20% aller allogenen HSZT werden bei Kindern und Jugendlichen durchgeführt und dienen häufig als letzter kurativer Ansatz bei therapierefraktären oder rezidierten Erkrankungen (1,3). Grundsätzlich besteht das Prinzip der hämatopoetischen Stammzelltransplantation darin, durch intensive Konditionierungstherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung die Tumorzellen radikal zu bekämpfen und das hämatopoetische sowie immunologische System der Patient*innen auszulöschen. Bei der allogenen HSZT überträgt man hämatopoetische Stammzellen (HSZ) von Spender*innen, mit dem Ziel, ein von ihnen abgeleitetes funktionsfähiges hämatopoetisches und immunologisches System in den Empfänger*innen wiederherzustellen (1–3).

Schwerwiegende Komplikationen, wie die Abstoßung des transplantierten Grafts, lebensbedrohliche Graft-versus-Host Disease (GVHD) und opportunistische Infektionen aufgrund der prolongierten Immunschwäche, stellen die Limitationen der Therapie dar und dämpfen den Erfolg. Der ideale Verlauf einer HSZT zeichnet sich durch ein stabiles Engraftment, einem Gleichgewicht zwischen effektiven Graft-versus-Leukämie (GVL) / Graft-versus-Tumor (GVT) -Effekt und niedrigen GVHD-Raten sowie der Erholung der Immunabwehr durch ein quantitativ und qualitativ funktionsfähiges Immunsystem aus. Für den Erfolg der HSZT spielen unterschiedliche Faktoren eine Rolle. Neben der zugrundeliegenden Erkrankung haben die Auswahl der Spender*innen, der Stammzellquelle, die Aufbereitung der gewonnenen Stammzellen, die Anzahl der infundierten Zellen und das gewählte Konditionierungsschema einen maßgeblichen Einfluss auf die transplantationsbedingte Morbidität und Mortalität (TRM). (2) Aufgrund des in den letzten Jahren stetig wachsenden Einsatzgebietes der HSZT liegt der Fokus verstärkt auf der Verringerung der transplantationsbedingten Komplikationen und der Senkung der TRM.

Das gilt insbesondere für jene Patient*innen, für die sich kein*e identer*idente Spender*in finden lässt und nur die Durchführung einer haploidenten HSZT in Frage kommt (1–3).

1.2 Spender*innenauswahl

Bei der Spender*innenauswahl für eine allogene HSZT gibt es unterschiedliche Möglichkeiten:

- Idente Geschwisterspende (matched related sibling; MRS)
- Idente Fremdspende (matched unrelated donor; MUD)
- Nicht-HLA-identen bzw. haploidenten Familienmitglied (mismatched related donor; MMRD)
- Nicht-HLA-idente Fremdspende (mismatched unrelated donor; MMUD) (4)

Bei der Spender*innenauswahl wird vorwiegend die Wahl einer HLA-identen Geschwisterspende angestrebt. Grundsätzlich ist das nur bei 30% der Patient*innen möglich. Ist keine HLA-idente Familienspende möglich, muss eine Registerspende in Betracht gezogen werden. Weltweit wurden mehr als 11 Millionen freiwillige Spender*innen typisiert und registriert. Die Wahrscheinlichkeit, eine unverwandte HLA-idente Person zu finden, liegt für Kaukasier*innen bei 60-70%. Problematisch ist jedoch, dass sich die HLA-Haplotypen in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen stark unterscheiden und so die Wahrscheinlichkeit für Patient*innen mit selteneren HLA-Haplotypen ein Match zu finden häufig nur bei 10% liegt. Für jene Patient*innen muss eine teilweise HLA-inkompatible oder auch haploidente HSZT in Betracht gezogen werden (5).

1.2.1 HLA-Kompatibilität

Bei einer allogenen HSZT muss immer die Tatsache beachtet werden, dass sich zwei Individuen, Spender*in und Empfänger*in, stets in ihrem Genom unterscheiden. Dementsprechend ist es von großer Bedeutung, dass Spender*in und Empfänger*in optimalerweise idente Gewebsmerkmale aufweisen. Das humane Leukozytenantigen-System (HLA) oder auch Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex; MHC) umfasst eine Reihe spezifischer Oberflächenmoleküle, die eine

entscheidende Rolle in der Unterscheidung von körpereigenen und körperfremd spielen (6). Die kodierenden Gene des Haupthistokompatibilitätskomplex befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Die beteiligten Gene werden in zwei Regionen eingeteilt, woraus die Codierung zweier unterschiedlicher Klassen resultiert, HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II, die sich in ihrer Funktion und Struktur unterscheiden. Die HLA-Klasse-I-Loci beinhalten die klassischen HLA Gene A, B und C. Die drei wesentlichen Subregionen der HLA-Klasse-II-Gene sind HLA- DR, DP und DQ (7,8). HLA-Klasse-I-Komplexe befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen, sowie auf Thrombozyten. Größtenteils binden sie Antigene, die durch den Proteinabbau im Zytosol entstehen (Viren, intrazelluläre Bakterien bzw. körpereigene Peptide). HLA-Klasse-II-Komplexe findet man vorwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen, wie B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Ihre Affinität bezieht sich auf durch Endozytose aufgenommene Antigene (9,10). Das Besondere am HLA-System ist, dass die beteiligten Gene hochpolymorph sind. Es existieren unzählige individuelle Genvarianten an einem Locus. Der Vorteil, der sich daraus ergibt, ist für die menschliche Population von großer Bedeutung. Je variabler die Genprodukte des HLA-Systems sind, desto mehr unterschiedliche Peptide können gebunden und somit den T-Zellen präsentiert werden. Daraus ergibt sich wiederum ein besserer Schutz gegen unterschiedliche Krankheitserreger (8). Gleichzeitig aber stellt das HLA-System bei der allogenen HSZT die größte Barriere dar. HLA-inkompatible Transplantationen sind mit Transplantationsabstoßungen und schwerwiegenden GVHD-Verläufen vergesellschaftet und somit mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert. Durch die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen findet man Patient*innen oftmals in lebensbedrohlichen Situationen wieder. Diese Tatsache überragt oft den gewünschten GVL/GVT-Effekt (11). Welche Inkompatibilitäten in den Allelkombinationen akzeptiert werden, hängt zumeist individuell von Patient*in und Spender*in und dem Genort, in dem sich die Unterschiede befinden, ab. Grundsätzlich steigt das Risiko einer erfolglosen HSZT mit der Anzahl der HLA-Inkompatibilitäten. Daher versucht man durch HLA-Typisierung eine Spende zu finden, die auf Allelebene eine Kompatibilität in den Genen HLA- A, B, C, DRB1 und DQB1 (10/10 Match) aufweist (12). Die Entdeckung der HLA-Merkmale und das Verständnis ihrer Funktion und Struktur hat die Entwicklung der allogenen Stammzelltransplantation in der klinischen Anwendung stark beeinflusst. Aufgrund der intensiven Forschung im Bereich der HLA-Genetik und der heutzutage möglichen HLA-Typisierung konnte die allogene HSZT

erst zu einem Standardverfahren etabliert werden und ist durch die mittlerweile akzeptierte Option der haploidenten Spende für nahezu alle Patient*innen durchführbar (12,13).

1.3 Konditionierung

Neben der Spender*innenauswahl sowie der Entnahme der Stammzellen stellt die sogenannte Konditionierung ebenfalls eine unerlässliche Komponente der allogenen HSZT dar. Diese soll mittels hochdosierter Chemotherapeutika, bzw. einer Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation, TBI) die notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche allogene HSZT schaffen. Die verabreichte Konditionierung induziert eine Myeloablation, die das Ansiedeln der Spender*innenstammzellen im Knochenmark ermöglicht. Ein weiterer wesentlicher Aspekt der Konditionierung ist die Immunablation, die eine primäre Abstoßung des Transplantats durch immunkompetente Zellen der Empfänger*innen verhindert. Gleichzeitig führt die hohe Dosierung der Chemotherapeutika zu einer starken Reduzierung der Tumorlast bzw. zu einem antileukämischen / antitumoralen Effekt (16,21). Inzwischen haben klinische Beobachtungen gezeigt, dass nicht nur die Konditionierung, sondern auch Spender*innenlymphozyten maßgeblich zum antileukämischen / antitumoralen Effekt beitragen. Daher können anstelle der früher üblichen hochdosierten und maximal tolerierbaren Chemotherapie für bestimmte Indikationen auch Konditionierungsschemata mit reduzierter Intensität eingesetzt werden, wodurch die Toxizität des Therapieverfahrens gesenkt werden kann (16,22).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen myeloablativen (MAC) und nicht myeloablativen (reduced intensity, RIC) Konditionierungen. Ein Konditionierungsregime gilt als myeloablativ, wenn keine autologe hämatopoetische Rekonstitution mehr möglich ist und eine Stammzellunterstützung erforderlich wird. Reduzierte-Intensitäts-Konditionierungsregime sind dadurch gekennzeichnet, dass sie zwar eine längere Zytopenie verursachen, jedoch eine autologe Rekonstitution noch ermöglichen. Die Wahl des einzusetzenden Regimes hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Dazu gehören die Grunderkrankungen und ihr Fortschritt bzw. der Remissionsstatus, der Allgemeinzustand der Patient*innen sowie eventuelle Begleiterkrankungen. Ebenso spielt die Auswahl der Spender*innen eine entscheidende Rolle (16,21,23).

1.4 Stammzellressourcen und CD34+ Zellen

Für eine allogene Stammzelltransplantation werden vor allem CD34+ hämatopoetische Stammzellen benötigt. CD34+-Zellen können aus dem Knochenmark (KM), aus dem peripheren Blut (PBSZ) bzw. aus dem Nabelschnurblut gewonnen werden, wobei letzteres eine geringere Rolle spielt (14–16). Die Stammzellgewinnung aus dem Knochenmark erfolgt durch mehrfache Aspirationen aus beiden Beckenkämmen unter Narkose. Im Gegensatz dazu werden die Stammzellen aus dem peripheren Blut mittels Apherese gesammelt. Im klinischen Alltag überwiegt – je nach Indikation - mit fast 80% die PBSZ (1). Bevor die Stammzellen aus dem Blut apherisiert werden können, muss Granulozyten stimulierender Faktor (G-CSF) verabreicht werden. Dieser führt zur Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut. Die häufigere Anwendung der PBSZ ergibt sich aus der Tatsache, dass, anders als bei der KMT, keine Narkose benötigt wird und die Komplikationsraten und die Beeinträchtigung wesentlich geringer sind. Außerdem ist die Transplantation von peripheren Stammzellen mit einer schnelleren Regeneration der Hämatopoese assoziiert, da ein höherer Gehalt an CD34+ Zellen gesammelt und verabreicht werden kann (1,14,15,17). Ein Transplantat aus PBSZ beinhaltet jedoch auch einen hohen Gehalt an T-Lymphozyten und geht daher mit einem erhöhten GVHD – Risiko einher. Im Gegensatz dazu ist ein durch KMT gewonnenes Transplantat mit einem geringeren GVH und HVG -Potential assoziiert (1,14,15).

Die Identifikation hämatopoetischer Stammzellen für die Selektion und den Entnahmeprozess erfolgt durch die veränderte Expression diverser Oberflächenmarker während des Differenzierungsprozess der Zelle. Primitive hämatopoetische Stammzellen werden durch das Fehlen aller linienspezifischen Marker und einer Gruppe von spezifischen Oberflächenantigenen identifiziert (15,18). Der CD34 - Marker stellt hierbei einen der wichtigsten dieser Oberflächenantigene dar und befindet sich auf 0,5-5% der Zellen im Knochenmark. Ausschlaggebend ist, dass sich dieser Marker auf frühen multipotenten Vorläuferzellen befindet, jedoch nicht mehr auf differenzierten reifen Zellen. Dementsprechend wird der CD34-Marker zur Identifizierung und Isolierung der Stammzellen für die HSZT herangezogen (15,19,20). Bei einer allogenen HSZT muss das transplantierte Graft zumindest eine Anzahl von 4×10^6 CD34+-Zellen/kg enthalten, um ein Langzeit-Engraftment und eine erneute funktionsfähige Hämatopoese und Immunabwehr sicherzustellen (15)(24).

1.5 Engraftment und Immunrekonstitution

Die Fähigkeit der transfundierten HSZ, ein funktionsfähiges hämatopoetische System und eine qualitative Immunabwehr wiederherzustellen, ist die Grundvoraussetzung des Erfolgs der allogenen HSZT. Die TRM der allogenen HSZT wird maßgeblich von einer raschen und effektiven Immunrekonstitution beeinflusst. Eine verzögerte Immunrekonstitution mit folglich prolongierter Immunschwäche stellt für die Patient*innen ein erhöhtes Risiko dar, im Posttransplantationsverlauf an opportunistischen Infekten zu versterben (24). Die Immunrekonstitution wird nicht nur von einzelnen Faktoren beeinflusst, sondern vielmehr aus dem Zusammenspiel prä-, peri- und posttransplantären Faktoren. Neben den nicht beeinflussbaren Faktoren wie Alter, der damit zusammenhängenden Thymusfunktion und der zugrundeliegenden Erkrankung, spielen auch die Spender*innenauswahl, die Stammzellquelle und die Konditionierungstherapie eine grundlegende Rolle in der Rekonstitution. Die angewandte Konditionierung führt bei den Patient*innen zu einer Eradikation des Knochenmarks und folglich zur Myeloablation und Immunsuppression. Je nach Intensität der Konditionierung und der Stammzellquelle kann die Panzytopenie über mehrere Wochen andauern. Der Nadir, der maximale Tiefpunkt der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, wird zumeist erst nach zwei bis drei Wochen überwunden und mit einer absoluten Neutrophilenzahl von $>0,5 \cdot 10^9/L$ im peripheren Blut ein Engraftment erreicht. Abgesehen von der aplastischen Phase, befinden sich die Patient*innen häufig bis weit nach Tag + 100 in einer geschwächten Abwehrlage infolge der Abwesenheit von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (17,24,25). Im Gegensatz zur quantitativen Rekonstitution der Immunzellen benötigt die qualitative Erholung der Zellen wesentlich länger. Allgemein verläuft die Immunrekonstitution in unterschiedlichen Phasen. Diese Phasen können in Abbildung 1 nachvollzogen werden. Grundsätzlich sind die ersten Zellen nach zwei bis drei Wochen messbar. Dazu zählen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, dendritische Zellen (DC), Neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Spezifischere Zellen wie B-Zellen und T-Zellen erholen sich teilweise erst Monate bis Jahre später (24–27).

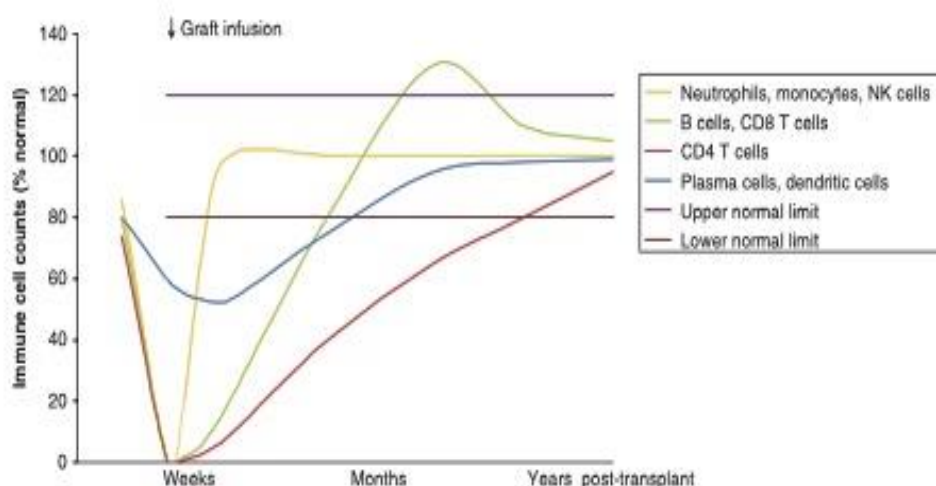


Abbildung 1: Rekonstitution der unterschiedlichen Immunzellen nach allogener HSZT über die Zeit (36)

1.6 Graftzusammensetzung

Einer der wichtigsten Komponenten einer allogene HSZT ist das Transplantat, im Englischen auch als Graft bezeichnet. Dessen Zusammensetzung, und allen voran die vorhandene Menge an CD34+-Zellen, stellt einen der wichtigsten prognostischen Faktoren der Transplantation dar und beeinflusst somit die Qualität des Grafts maßgeblich. HSZ können als funktionelle Einheit des Transplantats angesehen werden, neben anderen Vorläufer-, Blutzellen und Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Die größte Rolle spielen T-Lymphozyten (CD3+), T-Zell-Subpopulationen, B-Lymphozyten (CD19+), Natürlichen Killerzellen (NK) (CD3-56+) sowie Monozyten (CD14+) und dendritische Zellen (DC). Diese Zellen sind von großer Bedeutung für die schnelle und effektive Immunrekonstitution, können aber gleichzeitig auch lebensbedrohliche Komplikationen für die Empfänger*innen auslösen. Aufgrund des unterschiedlichen Einflusses der Komponenten für das Engraftment und die Immunrekonstitution wird vor allem großes Augenmerk auf die Aufgabenidentifizierung der einzelnen Zellen bei und nach allogener HSZT gelegt (16,19). Das kurative Potenzial und die Komplikationsrate der Transplantation hängt von einer Balance zwischen schneller Immunrekonstitution, geringen GVHD-Raten und der Kontrolle der Grunderkrankung ab (28). Um diese optimale Balance zu erreichen, wurden unter anderem Strategien der ex vivo Transplantatmanipulation entwickelt, mit dem vorwiegenden Ziel alloreaktive T-Zellen zu minimieren und die Zusammensetzung des Grafts zu optimieren (19,29,30). Zu diesen Strategien zählen unter

anderem die Selektion von CD34⁺ HSZ, die Depletion von CD3⁺/CD19⁺ Zellen und in jüngerer Zeit vor allem die spezifischere Depletion der CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺ Zellen (31,32).

1.6.1 NK- Zellen (CD3-56+)

Die erste lymphatische Subpopulation, die innerhalb von 3-4 Wochen im Rahmen der Immunrestitution quantitative Normwerte erreicht, sind NK-Zellen (33). Reife NK-Zellen zeichnen sich durch die Expression von CD56 und CD16 auf der Zelloberfläche aus. Trotz der raschen Erholung nach Transplantation herrscht bis zu 6 Monate eine Imbalance zwischen den unterschiedlichen Subtypen vor, wobei sich vorwiegend die unreifen CD56^{bright} -Zellen vermehren (34). NK-Zellen werden als zytolytische Effektor-Lymphozyten definiert, die auf ihre Umgebung angepasst reagieren. Im Gegensatz zu T- und B- Lymphozyten befinden sich auf der Oberfläche der NK-Zellen keine antigenspezifischen, sondern keimbahncodierte Rezeptoren (35,36). Sie können ohne vorangegangene Immunisierung virusbefallene Zellen aber auch körpereigene mutierte Zellen angreifen und zerstören. NK-Zellen exprimieren ein breites Spektrum an Rezeptoren, die ihre zytotoxischen und sekretorischen Funktionen stimulieren oder dämpfen. Durch diese Rezeptorkonstellation und die Expression unterschiedlichster Signalmoleküle, erkennen NK-Zellen nicht nur Zielzellen, sondern können präzise zwischen gesunden und veränderten Zellen unterscheiden. Das Wechselspiel der Rezeptoren und die Summe aller Signale entscheidet ob schlussendlich eine Zelle angegriffen wird oder nicht. Reife NK-Zellen attackieren Zellen nur dann, wenn sie nicht mehr ausreichend autologe MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Das können zum einen virusbefallene gestresste Zellen sein, aber auch mutierte Zellen. Der Schlüssel für diese kontrollierte Zellaktivität sind MHC-I-spezifische inhibitorische Rezeptoren. Post transplantationem hat dieses Erkennungsprinzip der NK-Zellen große Bedeutung, vor allem in der Erkennung und Zerstörung maligner Zellen. Die antileukämische / antitumorale Wirkung der NK-Zellen hat große Auswirkung auf die Rückfallraten und ist dementsprechend auch Zentrum der Forschung (35,37,38).

1.6.2 T-Lymphozyten (CD3+) und Subpopulationen

T-Lymphozyten haben sowohl positive als auch negative Effekte auf Engraftment und Immunrestitution nach allogener HSZT. Einerseits sind sie die Hauptverursacher der gefürchteten GVHD, andererseits unterstützen sie das Engraftment, verhindern Graft-Abstoßungen und haben große Auswirkung auf die Progression der Erkrankung durch die GVL/GVT-Effekte. Ob positive oder negative Effekte überwiegen, hängt unter anderem von der Ausprägung der HLA-Inkompatibilität und der Intensität der Konditionierung ab. Grundsätzlich unterscheidet man schon während des Reifungsprozesses der T-Lymphozyten im Gesunden zwischen der $\alpha:\beta$ und $\gamma:\delta$ T-Zell-Linie. Die beiden Zelllinien weisen Unterschiede in den beiden Ketten des T-Zell-Rezeptors (TCR) auf und spielen unterschiedliche Rollen in der Immunrestitution. Es ist bereits bekannt, dass hauptsächlich $\alpha:\beta$ T-Zellen für die Entstehung der GVHD verantwortlich sind und $\gamma:\delta$ T-Zellen dabei eine geringe Rolle spielen. Letztere fördern sogar die Immunrestitution, haben einen großen Einfluss auf die Erregerabwehr und besitzen hohes antileukämisches Potenzial (19,39,40). Die Linie der $\alpha\beta$ -T-Zellen trennt sich nochmals in zwei Untergruppen, die CD4- und CD8- T-Zellen (10,41). Der Rezeptor der T-Lymphozyten ist ein hoch variabler Antigenrezeptor, der auf eine enorme Anzahl an unterschiedlichen Antigenen reagieren kann. Die Antigene werden aber ausschließlich in Verbindung mit einem MHC-Molekül erkannt. Jeder durch die Rekombination der keimbahnkodierten Gensegmente individuell entstandene TCR erkennt eine bestimmte Kombination aus Peptid und MHC-Komplex. Darunter versteht man die MHC-Restriktion der Antigenerkennung. CD8+-T-Lymphozyten erkennen Peptide in Verbindung mit MHC-I-Molekülen. CD4+-T-Lymphozyten wiederum jene Antigene, welche an MHC-II-Moleküle gebunden sind. Dadurch ergibt sich, dass die beiden Subpopulationen zu unterschiedlichen Reaktionen der adaptiven Immunantwort führen. (41)

1.6.3 B-Lymphozyten (CD19+)

B-Lymphozyten erholen sich im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems nur sehr langsam. Ungefähr nach 2 Monaten können erste B-Lymphozyten im peripheren Blut gemessen werden. Abbildung 3 stellt eine schematische Reconstitution der B-Lymphozyten nach allogener HSZT dar. Die Zellen erholen sich zwar in der absoluten Anzahl, allerdings betrifft diese Erholung vor allem Vorläuferzellen und naive B-Zellen. Die

Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen kann oftmals mehr als zwei Jahre dauern. Im Gesunden, um effizient und schnell auf ein Antigen reagieren zu können, bildet das adaptive Immunsystem nach Erstkontakt mit einem Antigen ein immunologisches Gedächtnis aus. Dazu müssen langlebige Plasmazellen nach Antigenkontakt kontinuierlich Antikörper produzieren. So wird ermöglicht, dass der Organismus bei erneuten Antigenkontakt schnellstmöglich reagieren kann. Allgemein reifen B-Zellen im Knochenmark heran. An die Reifung der B-Zellen ist verbindlich die Synthese des B-Zell-Rezeptors (BCR) gebunden. Der reife BCR-Komplex besteht insgesamt aus zwei schweren (IgHC) und zwei leichten (IgLC) Immunglobulinketten. Je nach Ausprägung der schweren Kette unterscheidet man fünf Isotypen: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Die Isotypen unterscheiden sich in ihrer funktionellen Tätigkeit (10,42). Naive B-Lymphozyten exprimieren hauptsächlich IgM und IgG. Alle anderen Isotypen kommen meist nur auf bereits aktivierten B-Zellen oder Gedächtniszellen vor. Daraus ergibt sich die frühzeitige Normalisierung der IgM und IgG zumeist im ersten Jahr und die Erholung der IgA-Isotypen oft erst mehrere Jahre nach HSZT (10,42,43). Die mangelnde Erholung und Differenzierung der B-Zellen nach einer HSZT können nicht nur die Immunität gegenüber Krankheitserregern beeinträchtigen, sondern auch zu einem anhaltenden Mangel an Immunglobulinen führen. Folgen davon wären ein erhöhtes Infektionsrisiko und ein vermindertes Ansprechen auf Schutzimpfungen und damit eine Erhöhung der Mortalität der allogenen HSZT (43,44).

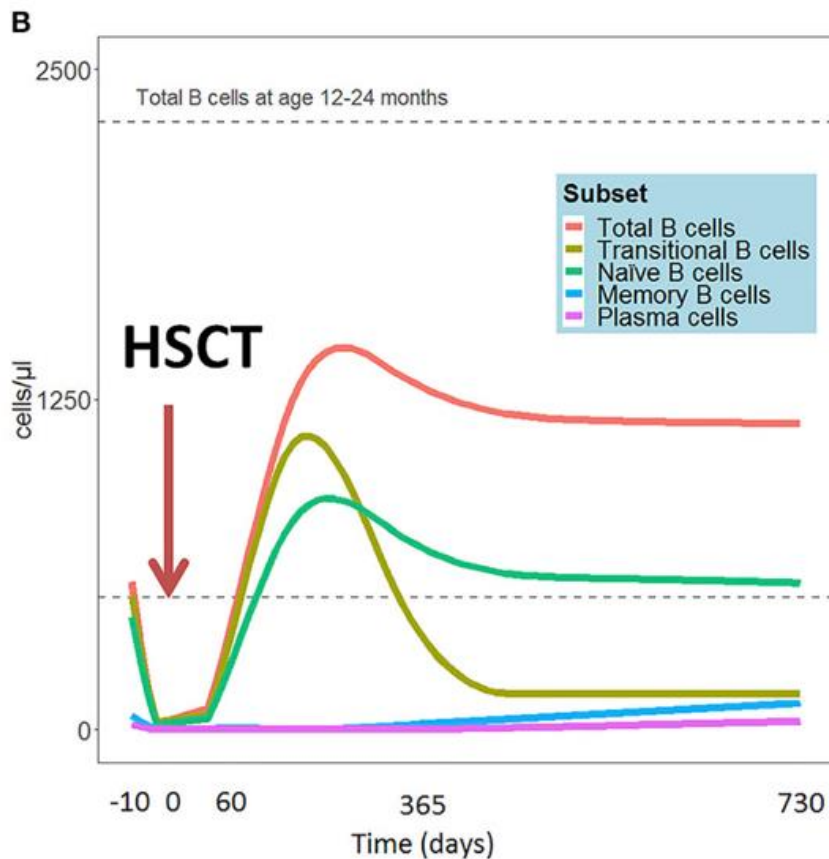


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rekonstitution der B-Zellen nach allogener HSZT (43,44)

1.7 Komplikationen

1.7.1 GVHD

Eine der schwerwiegendsten Komplikationen im Verlauf der allogenen HSZT ist die Entwicklung einer GVHD. Insbesondere bei großen Unterschieden in den HLA-Merkmalen bei Empfänger*in und Spender*in können schwere Verläufe letal enden. Andererseits wird beim Vorhandensein einer GVHD auch mit einem gleichzeitigen Graft-versus Tumor bzw. Leukämie (GVT/GVL)-Effekt gerechnet, der bei malignen Erkrankungen durchaus erwünscht ist. Am häufigsten von einer GVHD betroffen sind Darm, Leber und Haut (45). In der Theorie unterscheidet man zwischen akuter und chronischer GVHD. Grundsätzlich spricht man von akut bei einem Beginn unter 100 Tage und von chronisch über 100 Tagen nach Transplantation. Im klinischen Setting fällt die Differenzierung jedoch oftmals schwerer, da eindeutige Merkmale einer akuten und chronischen GVHD gleichzeitig und unabhängig von der Zeit nach Transplantation auftreten können. Man bezeichnet diese Form der GVHD auch als Overlap-Syndrom (46,47).

Die akute Graft-versus-Host-Disease (GVHD) entsteht durch drei Hauptzustände, die während der allogenen HSZT auftreten. Zunächst enthält das transplantierte Graft immunkompetente T-Zellen, die von den Empfänger*innen aufgrund der durch die Immunablation induzierten Unterdrückung des Immunsystems nicht abgewehrt werden können. Die transplantierten T-Zellen erkennen Unterschiede in den HLA-Merkmalen und stufen die Antigene der Empfänger*innen als fremd ein (48). Die Konditionierung und die Grunderkrankung der Patient*innen führen zusätzlich zur Gewebeschädigung und setzen dadurch proinflammatorische Zytokine frei (wie TNF und Interleukin-1). Diese Zytokine aktivieren die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) der Empfänger*innen, was zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen im Graft führt. Besonders die Schädigung des Darmepithels spielt eine wichtige Rolle, da sie zur Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS) führt. Diese LPS wirken als Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) und verstärken die Aktivierung der APCs. Insgesamt ist die Entstehung einer GVHD ein Zusammenwirken von angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie unterschiedlichster Zytokine (46). Aufgrund der Pathophysiologie der akuten GVHD ist es naheliegend die Intensität der Konditionierungsregime und damit die Gewebsschädigung zu verringern, um das Risiko der GVHD und die damit verbundenen Mortalität zu minimieren (47). Reduzierte Konditionierungsregime führen jedoch häufig zu persistierenden immunkompetenten T-Zellen, die die wesentlichsten Effektorzellen einer Graft-Abstoßung darstellen. Um den Erfolg der allogenen HSZT zu verbessern, werden immer mehr Strategien entwickelt, um das Risiko einer GVHD zu minimieren, aber gleichzeitig den GVT/GVL- Effekt zu fördern, der zur Zerstörung der malignen Zellen beiträgt, die durch die Konditionierung nicht angegriffen wurden. Problematisch ist jedoch, dass die zugrundeliegenden Mechanismen der GVT/GVL - Effekte nur schwer von den Entwicklungsmechanismen der GVHD zu trennen sind (49).

1.7.2 Infektionen

Infektionen im Posttransplantationsverlauf führen aufgrund der langsamen Rekonstitution des Immunsystems und der damit einhergehenden prolongierten schwachen Immunabwehrlage der Patient*innen zu gravierenden Problemen. Hinsichtlich des Infektionsrisikos kann die allogene HSZT in 3 Phasen eingeteilt werden: In den ersten 2-4 Wochen stellt die durch die Konditionierung induzierte Neutropenie den größten

Risikofaktor dar. Im Zusammenspiel mit der auftretenden Gewebsschädigung, wie einer Mucositis oder auch der Schädigung der Darmbarriere sind Patient*innen besonders anfällig für bakterielle Infektionen, die sich bis zu einer Sepsis ausbreiten können.

Beginnt sich das blutbildende System zu erholen, beginnt die nächste Phase. In den nächsten 2-3 Monaten nach der Transplantation steigt das Risiko, eine GVHD zu entwickeln. Die notwendige medikamentös-induzierte Immunsuppression und die langsame Erholung des Immunsystems begünstigt die Entstehung von Infektionen. Die häufigsten Erreger in dieser Phase sind Enterobakterien, die in Kombination mit einer GVHD des Gastrointestinaltraktes eine immense Bedrohung darstellen. Neben bakteriellen Infektionen spielen virale Erreger wie Adenoviren, andere respiratorische Viren und auch Pilzinfektionen mit Candida und Aspergillus eine Rolle. Ein weiterer Erreger, der in dieser Phase eine Rolle spielt, ist das Cytomegalievirus. Besonders gefährdet sind Patient*innen, die vor der Transplantation eine Seropositivität aufweisen. In der dritten Phase schreitet die Immunrestitution voran, jedoch bis sich vor allem das erworbene Immunsystem vollständig erholt hat, dauert es oft Jahre. In dieser Phase bereiten vor allem Erreger wie das Varizella-Zoster-Virus und die Reaktivierung früherer Infektionen wie z.B. Toxoplasmose, Probleme (50).

1.8 Forschungsfrage

Die Kernfragestellung dieser Arbeit ist, welche Auswirkung die unterschiedlichen Methoden der Graftmanipulation auf die Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation im Kindes- und Jugendalter haben. Durch den in den letzten Jahrzehnten zunehmenden Einsatz dieses Therapieverfahrens und der Weiterentwicklung des Prozesses, rücken auch die möglichen Komplikationen der Stammzelltransplantation immer mehr in den Mittelpunkt. Vor allem die Problematik der akuten und chronischen GVHD als Ursache der erhöhten Morbidität und Mortalität kann den Erfolg des ansonsten potenziell kurativen Therapieansatzes dämpfen. Diese Studie soll allgemeine Aussagen zur Immunrestitution und zum Überleben nach HSZT bei Kindern und Jugendlichen treffen und eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Transplantatmanipulation (Gruppe I: unmanipuliert, Gruppe II: CD34+ Selektion, Gruppe III: CD3+/CD19+Depletion, Gruppe IV: CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+Depletion) aufzeigen. Bisher existiert nur wenig Datenmaterial zur Immunrestitution im Post-Transplantations-

Verlauf bei pädiatrischen Patient*innen, besonders im Hinblick auf qualitative Messungen, im Gegensatz zu quantitativen Messungen. Die Untersuchung sowie der Vergleich der unterschiedlichen Arten der Graftmanipulationen sollte eine Aussage ermöglichen, mit welchen Methoden eine rasche und effektive Immunrekonstitution zu erwarten ist. Neben der Manipulation des Grafts können auch andere Faktoren im Transplantationsverlauf die Immunrekonstitution entscheidend beeinträchtigen. Dazu zählt die Art der Spender*innen, die Konditionierung, die Zelldosis, Auftreten und Therapie der GVHD sowie aufgetretene Infektionen. Diese Daten wurden zusätzlich für alle Patient*innen erhoben und werden als Nebenfragestellung ebenfalls analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie ist als retrospektive Analyse konzipiert. Die für die Auswertung notwendigen Daten wurden nach Überprüfung und Genehmigung der Ethikkommission (35-491 ex 22/23) retrospektiv gesammelt und analysiert. Ziel dieser Studie ist es, die möglichen Auswirkungen verschiedener Graftmanipulationen – CD34+ Selektion, CD3+/CD19+ Depletion, CD3+TCR $\alpha\beta$ / CD19+ Depletion – im Vergleich zu einer unmanipulierten Knochenmarktransplantation auf die Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation im Kindes- und Jugendalter aufzuzeigen. Die Daten für die retrospektive Analyse wurden den (elektronischen) Krankenakten und Ambulanzkarten sowie der Labordaten des FACS- und des Molekularbiologischen Labors der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie Graz entnommen und in einer Excel-Tabelle gesammelt und dokumentiert. Alle Dateien sind nur durch autorisierte Personen einzusehen und durch Zugriffsbeschränkungen geschützt. Alle identifizierenden Patient*innendaten wurden mittels fortlaufender Nummer pseudonymisiert. Die Größe der Studie ergibt sich durch die Anzahl der behandelten Patient*innen an der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie Graz im Zeitraum vom 01.01.2004 bis zum 31.12.2022. Als Ausschlusskriterium wurde die Transplantation von Nabelschnurblutstammzellen festgelegt, wodurch zwei Personen aus der Studie ausgeschlossen wurden. Aufgrund des rein explorativen Studienmodells wurde auf eine formale Fallzahl/Power-Berechnung verzichtet. Zu den, für die Studie relevanten, erhobenen Daten zählen das Alter, die Diagnose, das Konditionierungsschema, die Spender*inneninformation und verabreichte Stammzell Dosen. Im Posttransplantationsverlauf wurden aufgetretene Infektionen bis zu einem Jahr nach Transplantation, akute oder chronische GVHD sowie deren Prophylaxen und Therapie und verabreichte Donorlymphozyteninfusionen (DLI) dokumentiert. Als Graft-Survival wurde jene Zeitspanne nach der Transplantation definiert, die entweder bis zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups oder bis zum Eintreten eines der folgenden Ereignisse reichte: das Ableben des*der Patient*in oder die Notwendigkeit einer Re-Transplantation aufgrund eines Graft-Versagens bzw. eines Rezidiv der Grunderkrankung.

2.2 Patient*innenkollektiv

Diese retrospektive Studie umfasst alle Patient*innen mit malignen und nicht malignen Erkrankungen, bei denen im Zeitraum vom 01.01.2004 bis zum 31.12.2022 an der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato- Onkologie Graz eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt wurde. Insgesamt umfasst diese Studie somit 118 Patient*innen. 11 Patient*innen mussten Re-transplantiert werden, wobei bei zwei Patient*innen jeweils drei Transplantationen durchgeführt wurden. Zusammengefasst ergeben sich somit 131 Transplantationsverläufe, die in dieser Arbeit für die statistische Auswertung herangezogen wurden. Die Nachbeobachtungszeit lag im Median bei 2,5 Jahren (Spanne: 0,10-17,20 Jahre). Es wurde nicht zwischen männlichen und weiblichen Patient*innen unterschieden, da die Fragestellung für beide Geschlechter von Bedeutung ist. Die genaue Aufschlüsselung des Patient*innenkollektives befindet sich in Tabelle 1. Insgesamt wurden 54 Transplantationsverläufe von weiblichen und 77 von männlichen Patient*innen erhoben und untersucht. Das mittlere Alter der Patient*innen betrug bei der Durchführung der Transplantation 9,65 Jahre (Spanne: 0,9-23,7). Die Patient*innen wurden im Rahmen der Analyse anhand der Graftmanipulation in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe I: unmanipulierte Knochenmarks-/ periphere Blutstammzellspende (n = 50), Gruppe II: CD34+ Selektion (PBSZT) (n = 10), Gruppe III: CD3+/CD19+ Depletion (PBSZT) (n = 25), Gruppe IV: CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+ Depletion (PBSZT) (n = 46). In Gruppe III und IV wurde dem manipulierten Graft stets ein CD34+ Selektionat hinzugefügt, um eine vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen System aus allen Progenitorzellen zu versichern. Die Manipulationen der Grafts erfolgte nach den GMP-Richtlinien. Alle eingeschlossenen Patient*innen erhielten supportive Standardtherapien nach Protokoll und wurden wöchentlich auf auftretende Infektionen untersucht.

<i>Patient*innenkollektiv</i>	<i>Gruppe I Unmanipulierte KMT/PBSZT</i>	<i>Gruppe II CD34+ Selektion</i>	<i>Gruppe III CD3/CD19- Depletion</i>	<i>Gruppe IV TCR$\alpha\beta$/CD19- Depletion</i>	<i>Gesamt N (%)</i>
Transplantationsverläufe	50 (38,2%)	10 (7,6%)	25 (19,1%)	46 (35,1%)	131 (100%)
Geschlecht					
Weiblich:	17 (33,3%)	6 (60,0%)	12 (48,0%)	19 (40,4%)	54 (40,6%)
Männlich:	33 (58,0%)	4 (40,0%)	13 (52,0%)	27 (59,6%)	77 (57,9%)
Re-Transplantationen					
1.HSZT	48 (40,7%)	7 (5,9%)	21 (17,8%)	42 (35,6%)	118 (90,1)
2.HSZT	1 (9,1%)	2 (18,2%)	4 (36,4%)	4 (36,4%)	11 (8,4%)
3.HSZT	1 (50%)	1 (50%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,5%)
Alter (in Jahren)					
Mittelwert	9,36	4,83	13,06	9,18	9,65
Median	10,01	1,18	13,72	8,00	9,17
Minimum	0,70	0,09	1,73	0,28	0,09
Maximum	20,85	18,04	23,72	22,10	23,72

Tabelle 1: Charakteristika der Gesamtkohorte

2.2.1 Grunderkrankung

Bezüglich der Grunderkrankung erwies sich das Patient*innenkollektiv als sehr heterogen. Es handelte sich dabei vorwiegend um hämatologische Neoplasien sowie Knochenmarks- und Immuninsuffizienzen. Oftmals stellten auch seltene angeborene Erkrankungen wie schwere kombinierte Immundefekte, Hämoglobinopathien oder schweren Stoffwechselerkrankungen eine Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation dar.

<i>Maligne Erkrankungen:</i>	<i>Absolute Anzahl</i>	<i>Häufigkeit in %</i>
Akute lymphatische Leukämie	23	18%
Akute lymphatische Leukämie (Rezidiv)	4	3%
Akute myeloische Leukämie	16	12%
Juvenile myelomonozytäre Leukämie	2	2%
MDS/AML	3	2%
Myelodysplastisches Syndrom	4	3%
Non Hodgkin Lymphom	3	2%
Hodgkin Lymphom	1	1%
Neuroblastom	10	8%
Ewing-Sarkom	2	2%
Osteosarkom	4	3%
Keimzelltumor	1	1%
Wilms Tumor	1	1%
Medulloblastom	2	2%
Gesamt:	76	60%

Tabelle 2: Maligne Erkrankungen

<i>Nicht-maligne Erkrankungen:</i>	Absolute Anzahl	Häufigkeit in %
<i>Sichelzellerkrankung</i>	6	5%
<i>β-Thalassemie</i>	1	1%
<i>Hämophagozytische Lymphohistiozytose</i>	3	2%
<i>Griscelli-Syndrome</i>	2	2%
<i>Schwere aplastische Anämie</i>	12	9%
<i>Schwere kongenitale Neutropenie</i>	3	2%
<i>Schwerer kombinierter Immundefekt</i>	3	2%
<i>Septische Granulomatose</i>	2	2%
<i>Chronische Granulomatose</i>	4	3%
<i>Autoimmun-Lymphoproliferatives Syndrom</i>	1	1%
<i>Diamond-Blackfan-Anämie</i>	1	1%
<i>LRBA-Defizienz</i>	1	1%
<i>WIP-Defizienz</i>	1	1%
<i>X-LPS</i>	1	1%
<i>OMENN-Syndrom</i>	1	1%
<i>Profunder kombinierter Immundefekt</i>	1	1%
<i>Refraktäre Zytopenie</i>	1	1%
<i>MPS 1 Hurler</i>	5	4%
<i>Mb. Krabbe</i>	3	2%
<i>Metachromatische Leukodystrophie</i>	3	2%
Gesamt:	55	40%

Tabelle 3: Nicht-maligne Erkrankungen

2.2.2 Spender*innen und Stammzellquellen

Bei der Spender*innenauswahl wurde bei den 131 Transplantaten zwischen HLA-identen verwandten Spender*innen (n = 41; MRD), HLA-identen Fremdspender*innen (n = 54; MUD) sowie haploidenten Familienmitgliedern (n = 34; MMRD) oder nicht HLA-identen Fremdspender*innen (n = 2; MMUD) unterschieden. 34 der insgesamt 131 Transplantationen wurden haploident durchgeführt und dabei vorwiegend jene Transplantationen aus Gruppe III (n = 14) und Gruppe IV (n = 14). Für zwei Transplantationen, jeweils eine in Gruppe III und eine in Gruppe IV, wurde eine nicht HLA-idente Fremdspender*in gefunden. Die meisten Transplantationen (n = 54; MUD) wurden mit einer HLA-identen Fremdspender*in durchgeführt. 26 MUD wurden in Gruppe I, 18 MUD in Gruppe IV und jeweils 4 und 6 MUD in Gruppe II und III herangezogen. Für 41 Transplantationen stand eine HLA-idente Familienspende zu Verfügung. In Gruppe I waren es insgesamt 23 MRD, in Gruppe II lediglich ein MRD, in Gruppe III waren es 4 MRD und in Gruppe IV, 14 MRD. Tabelle 3 zeigt die detaillierte Aufschlüsselung der Verteilung auf die vier Gruppen.

Die Stammzellen wurden entweder aus dem Knochenmark (n = 41; KM) oder aus dem peripheren Blut (n = 90; PBSZ) gewonnen. Die KMT wurde vorwiegend in Gruppe I (n=39) angewandt. Die meisten Grafts bestanden aus PBSZ (Gruppe I: n= 11; Gruppe II: n = 10; Gruppe III: n = 23; Gruppe IV: n = 46). In Gruppe III wurden zwei KMT mit PBSZ kombiniert.

	Gruppe I Unmanipulierte KMT/PBSZT	Gruppe II CD34+ Selektion	Gruppe III CD3/CD19- Depletion	Gruppe IV TCR$\alpha\beta$/CD19- Depletion	Gesamt N (%)
Spender*innen					
Haploident	1 (2,9%)	5 (14,7%)	14 (41,2%)	14 (41,2%)	34 (26,0%)
MMUD	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (1,5%)
MRD	23 (56,9%)	1 (2,4%)	4 (9,7%)	13 (31,7%)	41 (32,0%)
MUD	26 (48,1%)	4 (7,4%)	6 (11,1%)	18 (33,3%)	54 (41,2%)
Stammzellquelle					
KMT	38 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	38 (29,0%)
PBSZT	11 (12,2%)	10 (11,1%)	23 (25,6%)	46 (51,1%)	90 (68,7%)
KMT+PBSZT	1 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)

Tabelle 4: Verteilung der Stammzellspenden und Stammzellquellen auf die vier Gruppen

2.2.3 Konditionierung

In 79 Fällen wurde ein myeloablatives Konditionierungsregime angewandt. Als MAC wurden Regime definiert, die auf Treosulfan, Busulfan oder TBI basierten. In 50 Fällen wurde eine reduced-intensity Konditionierung (RIC) angewandt. Bei 2 Transplantationsverläufen war keine Konditionierung notwendig, da aufgrund der Grunderkrankung, einem schweren kombinierten Immundefekt, keine T-Zellen vorhanden waren.

	Gruppe I Unmanipulierte KMT/PBSZT	Gruppe II CD34+ Selektion	Gruppe III CD3/CD19- Depletion	Gruppe IV TCR$\alpha\beta$/CD19- Depletion	Gesamt N (%)
Konditionierung					
MAC	33 (41,8%)	5 (6,3%)	7 (28,0%)	34 (73,9%)	79 (60,3%)
RIC	17 (34,4%)	3 (30,0%)	18 (72,0%)	12 (26,1%)	50 (38,2%)
keine	0 (0,0%)	2 (100,0%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (1,5%)

Tabelle 5: Konditionierung

2.3 Immunrekonstitution und Engraftment

Um Aussagen über die Rekonstitution des hämatopoetischen System treffen zu können, wurden zu acht Messzeitpunkten in festgelegten Abständen von Tag +14 bis zu Tag +720 (+14, +28, +90, +180, +270, +360, +540, +720) nach Transplantation für routinezwecke entnommene periphere Blutproben herangezogen und analysiert. Der Tag der Transplantation, wurde als Tag 0 definiert. Für die Normwertbereiche der einzelnen Zellen wurden die Werte von Kindern im Alter von 7 bis 16 Jahren als Referenz herangezogen, um dem Durchschnittsalter von 9,65 Jahren (Spanne: 0,9–23,7 Jahre) der Studienpopulation gerecht zu werden. Als erfolgreiches Engraftment wurde eine Neutrophilenanzahl von $1000/\mu\text{l}$ ($1 \times 10^9/\text{L}$) über einen Zeitraum von drei Tagen nach Transplantation definiert. Als Tag des leukozytären (WBC) - Engraftments wurde der Erste der drei aufeinanderfolgenden Tage definiert. Ebenso musste für ein erfolgreiches Engraftment eine Unabhängigkeit von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrattransfusionen und eine eindeutig nachweisbare Spender*innenhämatopoese erreicht werden. Wurden diese Kriterien am Tag +35 unvollständig oder nicht erfüllt, galt die Transplantation als inkomplett bzw. als Misserfolg.

2.3.1 Durchflusszytometrischer Immunstatus

Die quantitativen und qualitativen Analysen der Leukozyten-Subpopulation wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Dafür wurden Antikörper verwendet, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Beurteilt wurden:

- B-Lymphozyten (CD19+)
- T-Lymphozyten (CD3+, CD3+/4+, CD3+/8+, CD3+/4+/45RA+, CD3+/8+/45RA+)
- Zytotoxische T-Lymphozyten (CD3+/56+)
- NK-Zellen (CD3-/56+)
- Monozyten (CD14+).

2.3.2 Chimärismusanalyse

Weiters wurden durch Chimärismusanalysen mittels SNP qPCR der prozentuelle Anteil an Spender*innen-DNA in der Peripherblut-Probe von den Stammzellempfänger*innen festgestellt. Dazu wurden vor der Transplantation DNA-Proben von Empfänger*in und Spender*in verglichen und Merkmale, die sich unterscheiden, für Folgeanalysen herangezogen (SNP 1: Empfänger*in-positiv, Spender*in negativ und SNP2: Empfänger*in-negativ, Spender*in positiv).

2.3.3 TREC-Analyse

Die Anzahl junger T-Lymphozyten wurde bis 2019 durch die qPCR-basierte Quantifizierung von TREC (T Cell Receptor Excision Circles) ermittelt. Ab 2017 wurde zusätzlich die Anzahl junger B-Zellen durch die qPCR-basierte Quantifizierung von KREC (kappa-deleting element recombination circle) bestimmt.

2.3.4 Spectratyping

Die Analyse der Diversität des T-Zell Rezeptors erfolgte nach Monteiro et al (Molecular Medicine, Volume 1, Number 6, September 1995) und Puisieux et al (Journal of Immunology, 1994). Die Proben wurden an den Tagen +60, +120, +240, +360, +540 und +720 entnommen. Berechnet wurde der Complexity Score (Anzahl der Peaks pro TCR V β -Familie) und die relative Peakintensität (Fläche des Einzelpeaks pro Gesamtpeakfläche):

- Polyklonal: das Profil der TCR V β 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 einem dominanten Peak, dessen relative Peakintensität größer ist als 40 %.
- Monoklonal: Vorhandensein von einem dominanten Peak, dessen relative Peakintensität größer ist als 80 %.
- Fehlend: keine einzeln vorhandenen Peaks im 3-Basen-Abstand vorhanden.

2.4 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Mag. Gerold Schwantzer vom Institut für medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation unter Verwendung der SPSS-Software IBM SPSS Statistics 29 und Microsoft Excel für MacOS durchgeführt. Die Grafiken und Tabellen wurden mittels Microsoft Word für MacOS erstellt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Die deskriptive Statistik wurde für Alter, Geschlecht, Anzahl der durchgeführten HSZT, der Grunderkrankung, der Konditionierungsregime sowie der Stammzellquelle und der Spendercharakteristika erhoben. Mittels dem Kolmogorov-Smirnov und dem Shapiro-Wilk Test wurde auf Normalverteilung geprüft. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung wurden alle Daten mittels nicht parametrischen Tests analysiert. Vergleiche zwischen den vier Gruppen und Analysen in Bezug auf GVHD, Engraftment und Infektionen wurden mit dem exakten Chi²-Test für kategorische Daten und dem Kruskal-Wallis-Test für kontinuierliche Variablen durchgeführt. Für Mehrfachvergleiche wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet. Das Graft-Survival wurde nach der Methode von Kaplan und Meier berechnet, wobei das Ableben, Graft-Abstoßung und Re-Transplantation als Ereignisse berücksichtigt wurden. Für die statistische Auswertung der Immunrekonstitution wurden für alle Daten die Mediane sowie das Minimum und das Maximum berechnet.

3 Ergebnisse – Resultate mit graphischen Darstellungen

3.1 Graft Survival

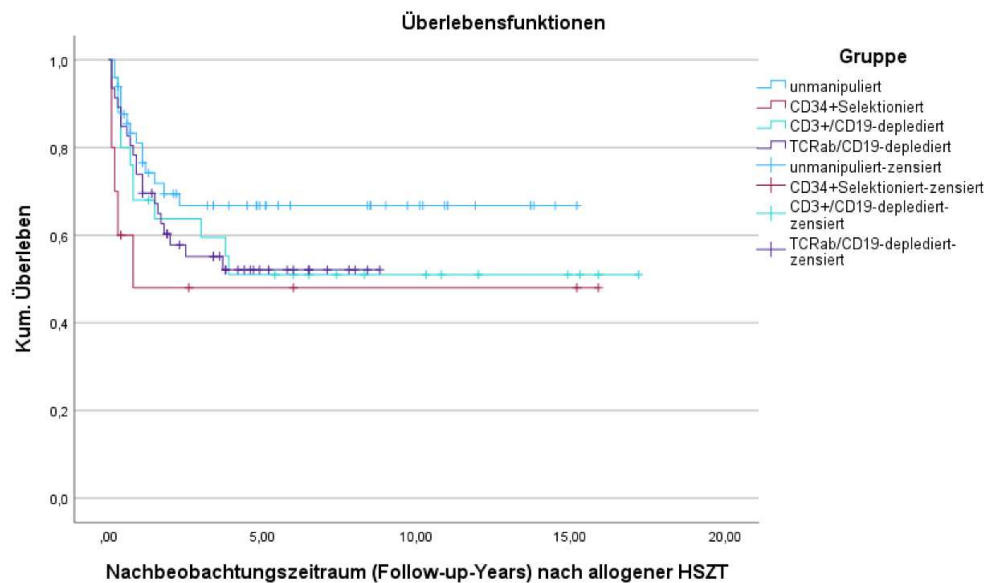


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven des Graft-Survival der 131 Transplantationsverläufe. Das kumulierte Graft-Survival (in %) der Transplantationsverläufe über die Zeit in Jahren dargestellt. Die mit Kreuzen gekennzeichnete Zensur zeigt die eingetretenen Ereignisse während des Follow-up-Zeitraums an.

Bei einer Nachbeobachtungszeit im Median von 2,5 Jahren (Spanne: 0,10-17,20 Jahre) lag die Wahrscheinlichkeit eines Graft-Survival nach 5 Jahren für alle Gruppen bei 56,5% (47,5%-65,4%). In Gruppe I lag die Wahrscheinlichkeit bei 66,7% (95% CI: 52,8%-80,6%), in Gruppe II bei 48,0% (95% CI: 15,9%-80,1%), in Gruppe III bei 51,0% (95% CI: 31,1%-70,9%) und in Gruppe IV bei 52,0% (95% CI: 36,9-67,1%). Insgesamt konnte bei 77 (59,2%) von 130 Transplantationsverläufen zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups ein Graft-Survival beobachtet werden. Ein Verlauf wurde nicht in die Analyse einbezogen, da die Nachbeobachtungszeit zu kurz war. Bei 11 (8,3%) Fällen wurde eine Re-Transplantation durchgeführt, und in zwei Fällen fanden jeweils drei Transplantationen statt. Bei vier Verläufen konnte ein Graft-Survival nach der zweiten bzw. in einem Fall nach der dritten Transplantation erreicht werden. Die Re-Transplantation erfolgte in acht Fällen aufgrund eines Graft-Versagens und in drei Fällen aufgrund der fortschreitenden Grunderkrankung. Bei insgesamt 40 (30,7%) Patient*innen kam es im Posttransplantationsverlauf zum Tod. Die Todesursache war in 22 (16,7%) Fällen ein Krankheitsrückfall, in neun (6,8%) Fällen waren es letale Infektionen und in weiteren sechs (4,5%) schwere letale GVHD. In drei

(2,3%) Fällen kam es zu einer Kombination aus einem Krankheitsrückfall, immunologischen und infektiösen Komplikationen.

3.2 Engraftment

Insgesamt wurde bei 109 (83,2%) von 131 Transplantationen ein Engraftment erreicht. Bei 16 (12,2%) Patient*innen konnte nur ein inkomplettes Engraftment dokumentiert werden und bei 6 (4,6%) Patient*innen kam es zu keinem primären Engraftment (Tabelle 4). Das WBC Engraftment wurde in Gruppe III und IV früher erreicht als in Gruppe I und II (Tag 9 und 10 vs. Tag 14 und 12). Signifikante Unterschiede konnten zwischen Gruppe I und Gruppe III und IV ($p < 0,001$, $p < 0,001$) festgestellt werden. Hinsichtlich der Erythrozytenkonzentraten und Thrombozytenkonzentraten wurde die Unabhängigkeit in Gruppe III und IV früher als in Gruppe I und II erreicht. (Erythrozytenk.: Tag 8 und 7 vs. 17 und 13; Thrombozytenk.: Tag 9 und 10 vs. 13 und 18). Auch hierbei waren die Unterschiede zwischen Gruppe I und Gruppe III und IV statistisch signifikant (Erythrozytenk.: $p < 0,001$, $p = 0,002$; Thrombozytenk.: $p < 0,001$, $p < 0,001$).

Im Median betrug die Anzahl der transplantierten CD34+ Zellen 12×10^6 Zellen/kg (Spanne: 0,00002- $89,1 \times 10^6$ /kg). Die Anzahl der CD3-Zellen betrug $11,7 \times 10^6$ /kg (Spanne: 0,0001- 1600×10^6 /kg). In Gruppe III und IV war die Anzahl der CD3+ Zellen signifikant niedriger als in Gruppe I und II ($p < 0,001$).

	Gruppe I Unmanipulierte KMT/PBSZT	Gruppe II CD34+ Selektion	Gruppe III CD3/CD19- Depletion	Gruppe IV TCR$\alpha\beta$/CD19- Depletion	Gesamt N (%)	p-Wert
CD34+Zellen/kg:						
Median:	6,70 x 10 ⁶	33,75 x 10 ⁶	12,20 x 10 ⁶	21,6 x 10 ⁶	12,0 x 10 ⁶	p<0,001
Min:	0,00002 x 10 ⁶	9,36 x 10 ⁶	13,57 x 10 ⁶	4,82 x 10 ⁶	0,00002 x 10 ⁶	
Max:	32,1 x 10 ⁶	82,0 x 10 ⁶	28,3 x 10 ⁶	89,1 x 10 ⁶	89,1 x 10 ⁶	
CD3+Zellen:						
Median:	58,0 x 10 ⁶	39,7 x 10 ⁶	0,08 x 10 ⁶	3,07 x 10 ⁶	11,7 x 10 ⁶	p<0,001
Min:	2,73 x 10 ⁶	0,0193 x 10 ⁶	0,0013 x 10 ⁶	0,001 x 10 ⁶	0,001 x 10 ⁶	
Max:	1600 x 10 ⁶	740 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	128 x 10 ⁶	1600 x 10 ⁶	
Engraftment						
Komplett	41 (37,6%)	6 (5,5%)	22 (20,2%)	40 (36,7%)	109(83,2%)	P<0,011
Inkomplett:	9 (18,0%)	3 (18,8%)	3 (18,8%)	1 (6,3%)	16 (12,2%)	
Kein Engraftment:	0 (0,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	5 (10,9%)	6 (4,6%)	
WBC Engraftment Day:						
Median:	14	12	9	10		P<0,001
Min:	9	7	6	8		
Max:	46	16	19	13		
Letzte Erythrozytentransfusion:						
Median:	17	13	8	7		p<0,001
Min:	-3	1	0	-5		
Max:	62	81	37	12		
Letzte Thrombozytentransfusion:						
Median:	18	13	10	9		p<0,002
Min:	8	1	7	5		
Max:	70	81	41	21		
Max:	70	81	41	21		

Tabelle 6: Anzahl der transplantierten Zellen und Engraftment

3.3 Infektionen

Im Median kam es im ersten Jahr nach der Transplantation zu vier (0-15) relevanten und therapiebedürftigen Infektionen, wobei es einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe III (n=5) und IV (n=3) gab ($p < 0,030$). Bei neun Patient*innen (6,8 %) traten letale infektiöse Komplikationen auf. Zwei Patientinnen verstarben infolge einer Viruspneumonie, während fünf eine Sepsis entwickelten, verursacht durch eine Lactobacillus-, eine Aspergillus-Infektion, eine Peritonitis sowie eine Pneumonie. Eine Patientin verstarb an den Folgen einer septischen PAE. Zudem führte eine disseminierte Zoster-Infektion bei einem*iner Patient*in zu einer letalen VZV-Pneumonie, und ein*eine weitere Patient*in verstarb an den Folgen einer HHV6-Reaktivierung.

	Gruppe I Unmanipulierte KMT/PBSZT	Gruppe II CD34+ Selektion	Gruppe III CD3/CD19- Depletion	Gruppe IV TCR$\alpha\beta$/CD19- Depletion	Gesamt N
Therapiebedürftige Infektionen im ersten Jahr nach HSZT					
Median:	4	4	5	3	4
Min:	0	0	0	0	0
Max:	14	10	15	11	15
Todesfälle Infektionen					
Anzahl	1	0	5	3	9

Tabelle 7: Therapiebedürftige Infektionen im ersten Jahr nach HSZT, Todesfälle durch Infektionen

3.4 GVHD

Für die GVHD-Prophylaxe wurden als Immunsuppressiva vorwiegend Mycophenolat Mofetil (n=62; MMF) und Cyclosporin A (n=21; CYA) angewandt. Es wurden nicht nur einzelne Immunsuppressiva verabreicht, sondern auch verschiedene Kombinationen verwendet. CYA wurde mit MMF kombiniert und dazu kamen ein, zwei, drei oder vier Dosen Methotrexat (MTX) (n=3; n=1; n=5; n=1). Jeweils 3 Patient*innen erhielten nur CYA und 2 Dosen MTX und bei 13 Patient*innen wurden CYA und 3 Dosen MTX kombiniert. Ein*e Patient*in erhielt CYA, 3 Dosen MTX, MMF und Sirolimus (SIR). MMF wurde ebenfalls mit zwei, drei oder vier Dosen MTX gemeinsam verabreicht (n=2; n=1; n=1). Zwei Patient*innen erhielten eine multiple Immunsuppressive Therapie aufgrund einer ausgeprägten akuten GVHD. Weiters wurde MMF mit CYA, CYA und FK506, Sirolimus, Tacrolimus (TAC) und Prograf (n=6, n=1, n=1, n=1, n=2) kombiniert. Ein*e Patient*in erhielt nur Prograf als immunsuppressive Therapie und vier Patient*innen erhielten keine GVHD-Prophylaxe.

GVHD-Prophylaxe:	Anzahl	Häufigkeit in %
CYA	21	16,03%
CYA / MMF	6	4,58%
CYA / MTX 1x / MMF	3	2,29%
CYA / MTX 2x	3	2,29%
CYA / MTX 2x / MMF	1	0,76%
CYA / MTX 3x	13	9,92%
CYA / MTX 3x / MMF	4	3,05%
CYA / MTX 3x / MMF / Sirolimus	1	0,76%
CYA / MTX 4x / MMF	1	0,76%
FK506 / MMF / CYA	1	0,76%
MMF	62	47,3%
MMF / MTX 2x	2	1,52%
MMF / MTX 3x	1	0,76%
MMF / MTX 4x	1	0,76%
MMF / Multiple Immunsuppressiva	1	0,76%
MMF / Prograf / MTX 1x	1	0,76%
MMF / SIR	1	0,76%
Multiple Immunsuppressiva	1	0,76%
MMF / Prograf	1	0,76%
Prograf	1	0,76%
TAC / MMF	1	0,76%
Non	4	3,05%
Total:	131	100%

Tabelle 8: GVHD-Prophylaxe

Die GVHD-Prophylaxe wurde in allen vier Gruppen im Median über 62 Tage (Spanne: 10-766) verabreicht. Die kürzeste Dauer wurde in Gruppe IV beobachtet, im Median von 48 Tagen (Spanne: 11-222). In den Gruppe II und III war die Dauer mit 68 (Spanne: 25-134) bzw. 66 Tagen (Spanne: 10-155) im Median sehr ähnlich. In Gruppe I wurde die GVHD-Prophylaxe im Median für 105 Tage (Spanne: 30-766) deutlich länger verabreicht. Statistisch signifikante Unterschiede konnten im paarweisen Vergleich zwischen Gruppe I und jeweils Gruppe III und IV nachgewiesen werden ($p=0,005$, $p=0,001$). Der Beginn der akuten GVHD lag im Median bei 30 Tagen (Spanne: 5-146) und der, der Chronischen bei 181 Tagen (Spanne:100-580).

68 (52,3%) Patient*innen entwickelten eine akute GVHD, davon 33 (48,5%) Patient*innen in Gruppe I, 6 (8,8%) in Gruppe II, 13 (19,1%) in Gruppe III und 16 (23,5%) in Gruppe IV. Bezüglich des Schweregrades der akuten GVHD zeigte sich bei 22 (16,8%) Patient*innen eine milde Ausprägung (Grad I). Eine moderate Grad II GVHD entwickelten 17 Patient*innen (13,0 %), während 15 Personen (11,5 %) eine Grad III GVHD und 8 Personen (6,1 %) eine schwere Grad IV GVHD entwickelten. Bei der Analyse der Organbeteiligungen im Rahmen der akuten GVHD war die Haut am häufigsten betroffen. Insgesamt zeigten 59 Patient*innen (Gruppe I: 28, Gruppe II: 6, Gruppe III: 13, Gruppe IV: 12) eine Beteiligung der Haut. Der Darm war bei 31 Patient*innen betroffen (Gruppe I: 16, Gruppe II: 1, Gruppe III: 7, Gruppe IV: 8), während die Leber in 14 Fällen beteiligt war (Gruppe I: 8, Gruppe III: 3, Gruppe IV: 3). Insgesamt 19 (14,5%) Patient*innen entwickelten im Posttransplantationsverlauf eine chronische GVHD. Davon waren 9 (47,0%) Patient*innen in Gruppe I, ein*e Patient*in (5,3%) in Gruppe II, 5 (26,3%) in Gruppe III und 4 (21,1%) in Gruppe IV. Bei der chronischen GVHD war mit 12 Fällen die Haut am häufigsten betroffen, gefolgt von Darm- und Leberbeteiligungen mit jeweils 8 Fällen. Die Einteilung nach Schweregrad ergab, dass 9 Patientinnen eine begrenzte ("limited") chronische GVHD entwickelten, während bei 10 Patient*innen eine ausgedehnte ("extensive") Form vorlag. Insgesamt kam es zu 5 Todesfällen infolge akuter und chronischer GVHD, die in den Gruppen I (n=3), II (n=1) und III (n=1) auftraten. In Gruppe IV wurde kein Todesfall verzeichnet.

	Gruppe I Unmanipulierte KMT/PBSZT	Gruppe II CD34+ Selektion	Gruppe III CD3/CD19- Depletion	Gruppe IV TCR$\alpha\beta$/CD19- Depletion	Gesamt N	p-Wert
Dauer der GVHD-Prophylaxe:						
Median:	105	68	66	48	62	<i>p</i> <0,001
Min:	30	25	10	11	10	
Max:	766	134	155	222	766	
Akute GVHD						
Anzahl	33 (48,5%)	6 (8,8%)	13 (19,1%)	16 (23,5%)	68 (52,3%)	<i>p</i> <0,021
Organbeteiligung						
Haut	28	6	13	12	59	
Darm	16	1	7	8	31	
Leber	8	0	3	3	14	
Grad						
I	10	4	4	4	22	
I-II	2	0	0	0	3	
II	10	1	2	4	17	
II-III	0	0	0	1	1	
III	7	1	4	3	15	
IV	3	0	3	2	8	

Tabelle 9: Akute GVHD

Chronische GVHD						
Anzahl	9 (47,4%)	1 (5,3%)	5 (26,3%)	4 (21,1%)	19(14,5%)	<i>P</i> <0,472
Organbeteiligung						
Haut	5	1	3	3	12	
Darm	3	0	3	2	8	
Leber	6	0	2	0	8	
Grad						
Limited	4	0	3	2	9	
Extensive	4	1	2	3	10	
Todesfälle						
Akut und Chronisch	3	1	1	0	5	

Tabelle 10: Chronische GVHD

3.5 Immunrekonstitution

3.5.1 Chimärismusanalyse

Am Tag +14 nach Transplantation ergab die Chimärismusanalyse im Median aller Transplantationsverläufe für den WBC 98% (Gruppe I: 98%; Gruppe II: 95%; Gruppe III: 99%, Gruppe IV: 100%). Im Postransplantationsverlauf wurde ersichtlich, dass der Chimärismus in Gruppe I, III und VI konstant blieb (Mediane der vier Gruppen Tag +28: 100%; Tag +90: 99%; Tag +180: 100%; Tag +360:100%; Median Tag +540: 100%; Median Tag 720: 100%), in Gruppe II jedoch sank der Chimärismus stark ab (Median: 60%) und erholte sich bis Tag +720 (Median:72%) nur wenig. In Gruppe II zeigten sich signifikant geringere SNP WBC Werte als in den Vergleichsgruppen ($p < 0,0001$).

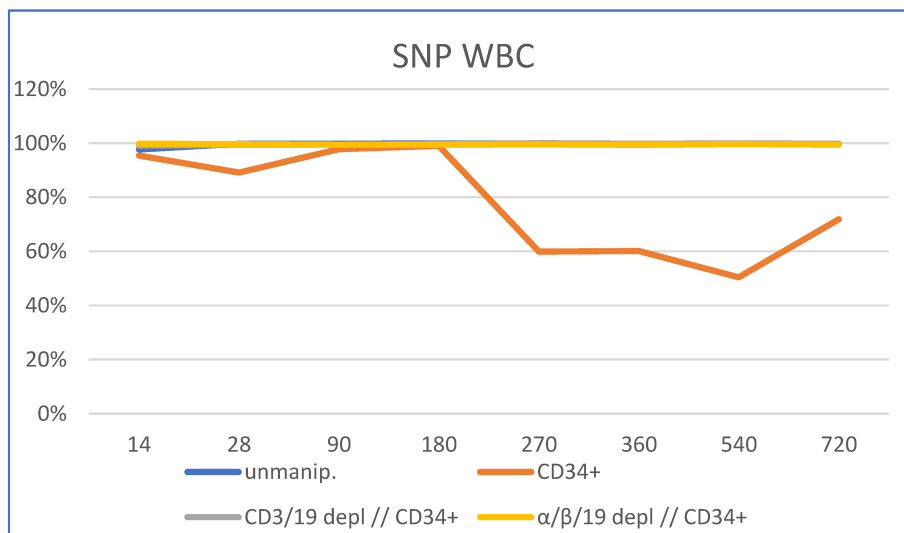


Abbildung 4: Entwicklung des Chimärismus in den vier Gruppen über den Messzeitraum von Tag +14 bis Tag +720. Die Werte basieren auf den berechneten Medianen.

3.5.2 CD3+ T-Zellen

Bis Tag +90 nach der Transplantation verblieb die Anzahl der CD3+ Zellen in allen Gruppen unter der Normwertgrenze mit unter 500 CD3+ Zellen/ μ L. In Gruppe II kam es zu einem starken Anstieg ab Tag +90 und somit konnten schon am Tag +180 Normwerte erreicht werden, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes auch in der Norm verblieben (Tag +720: 3488). In Gruppe I und Gruppe IV normalisierten sich die CD3+ Zellen an Tag +360 (Gruppe I: 948/ μ L und Gruppe IV: 1108/ μ L). In Gruppe III zeigten sich Normwerte erst am Tag +540 (808/ μ L).

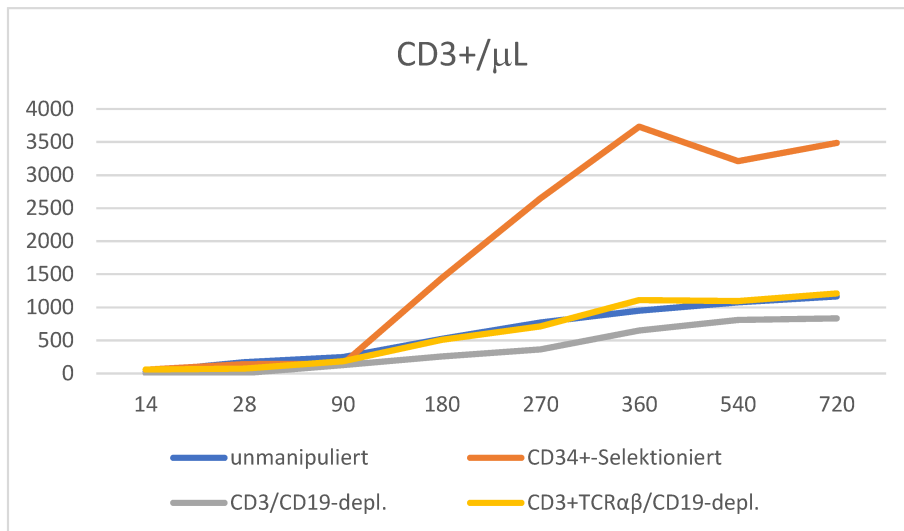


Abbildung 5: Entwicklung der CD3+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum. Der Normwertbereich liegt zwischen 800 und 3500 CD3+ T-Zellen/µL.

3.5.3 CD4+ T-Zellen

Die Erholung der CD4+ T-Helferzellen zeigte in allen Gruppen einen langsamen, kontinuierlichen Anstieg. In Gruppe I verblieb die Anzahl bis Tag +360 subnormal und erreichte ab Tag + 540 den Normbereich (437 CD4+ T-Zellen/µL). In Gruppe II kam es ab Tag +90 zu einem Anstieg der Zellzahlen, der ab Tag + 270 steiler wurde und am Tag +360 einen Peak mit einer Zellzahl von 1703 CD3+ T-Zellen zeigte. In Gruppe III wurden bis Tag+ 720 keine Normwerte erreicht (Gruppe III: 393 CD4+ T-Zellen/µL) In Gruppe IV konnten Normwerte ab Tag +360 (Gruppe IV: 505 CD4+ T-Zellen/µL) beobachtet werden.

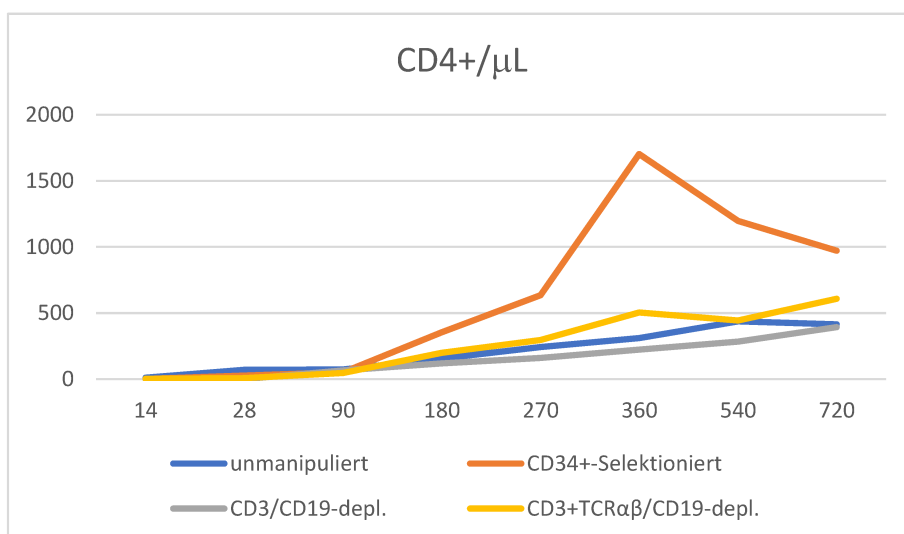


Abbildung 6: Entwicklung der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum. Der Normwertbereich liegt zwischen 400 und 2100 CD4+ T-Zellen/µL.

3.5.4 CD8+ T-Zellen

Zum Zeitpunkt der ersten Messungen zeigte sich in allen Gruppen nur ein langsamer Anstieg. In Gruppe I erreichte die Anzahl der CD8+ T-Zellen an Tag +180 altersentsprechende Normwerte (260/ μ L). In Gruppe II konnten Zellzahlen im Normbereich ab Tag +180 mit 446 CD8+ T-Zellen/ μ L beobachtet werden. Ab Tag +270 stiegen die Zellzahlen in Gruppe II stark an und erreichten an Tag +360 eine Anzahl von 2064 CD8+ T-Zellen/ μ L. Bis zu Tag +720 sank die Anzahl auf 1636 CD8+ T-Zellen/ μ L ab. Die CD8+ T-Zellen normalisierten sich in Gruppe III (316 μ L) am Tag +360 und in Gruppe IV (295/ μ L) am Tag +270.

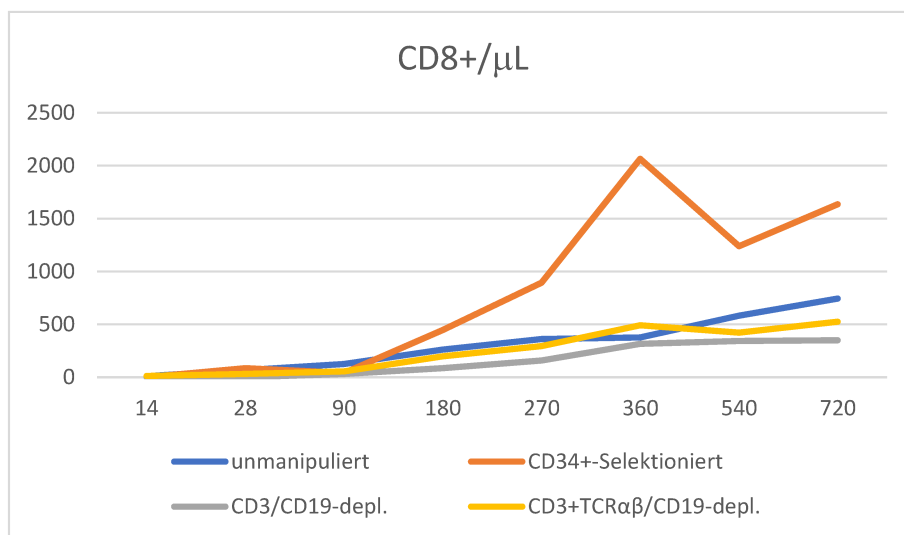


Abbildung 7: Entwicklung der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum. Der Normwertbereich ist mit 200-1200 CD8+ T-Zellen/ μ L definiert.

3.5.5 NKT-Zellen (CD3+/CD56+)

Innerhalb des ersten Monats nach der HSZT war die Zahl der CD3+56+ zytotoxischen T-Zellen in Gruppe IV (10-29/ μ L) höher als in den anderen Gruppen. Referenzwerte wurden erst am Tag +180 in Gruppe II (36/ μ L) erreicht, während in den anderen Gruppen die CD3+56+-Zellzahlen subnormal blieben (<30/ μ L).

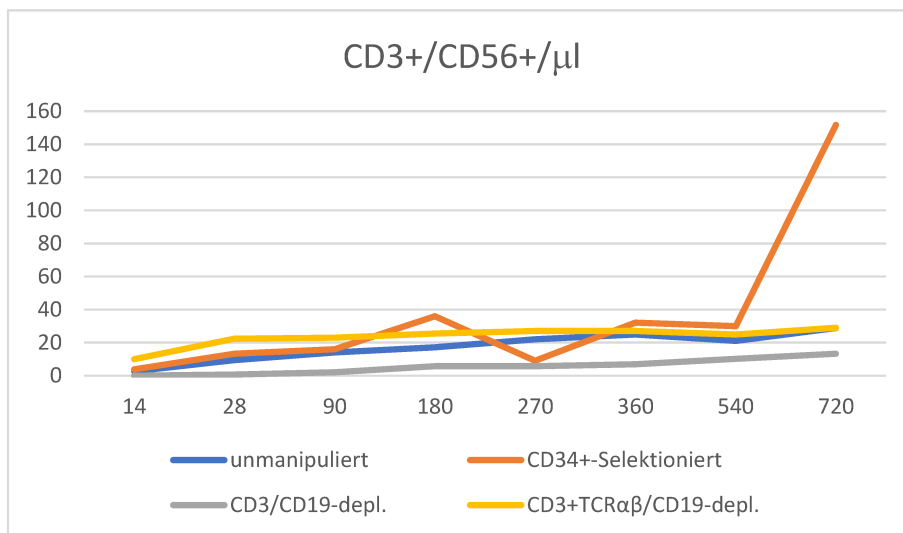


Abbildung 8: Entwicklung der CD3+/CD56+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.
Der Normwertbereich ist mit 30-140 CD3+/CD56+ T-Zellen/ μ L definiert.

3.5.6 NK-Zellen (CD3-/CD56+)

Die NK-Zellen waren in den Gruppen III und IV zu Beginn der Beobachtung (Tag +14) in ausreichender Zellzahl vorhanden (Gruppe III: 204,9/ μ L; Gruppe IV: 191,7/ μ L). Die Gruppen I und II zeigten deutlich geringere Werte zu diesem Messzeitpunkt (Gruppe I 22,5/ μ L; Gruppe II 48,35/ μ L). In Gruppe I normalisierten sich die NK-Zellen nach 28 Tagen (96/ μ L), in der Gruppe II erst nach 360 Tagen (356,8/ μ L). Gegen Ende des Analysezeitraums an Tag +720 befanden sich die Zellzahlen der Gruppen I, III und IV im Normbereich (Gruppe I: 137/ μ L; Gruppe III: 119,2/ μ L; Gruppe IV: 124/ μ L), wohingegen die mediane Zellzahl in Gruppe II mit sinkender Tendenz bei 80,67/ μ L lag.

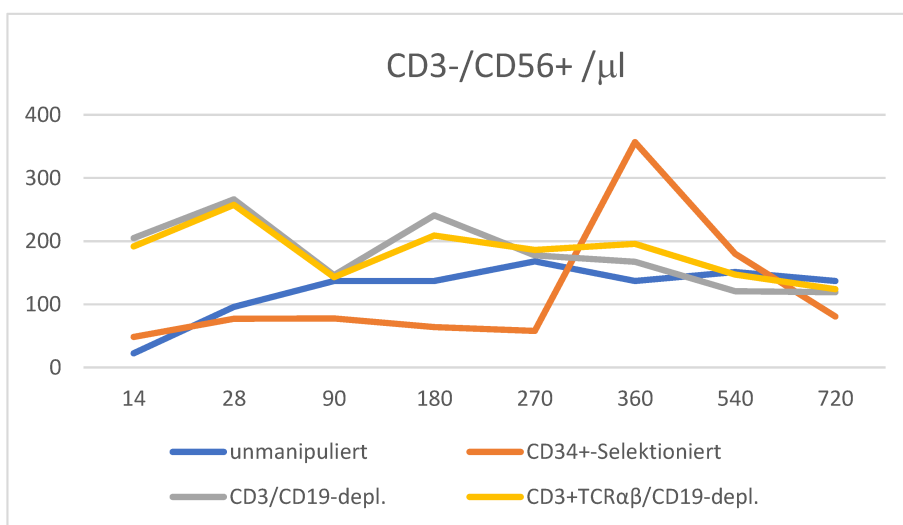


Abbildung 9: Entwicklung der CD3-/CD56+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.
Der Normwertbereich ist mit 70-1200 CD3-/CD56+/ μ L definiert.

3.5.7 Monozyten (CD14+)

Zu Beginn des Analysezeitraums am Tag +14 lagen die medianen Zellzahlen der Gruppen II, III und IV im Normbereich, lediglich Gruppe I verblieb unterhalb der Norm (Gruppe I: 133/ μ L, Gruppe II: 575,5/ μ L; Gruppe III: 873,1/ μ L; Gruppe IV: 1045/ μ L). Im Verlauf sanken die Zellzahlen in den Gruppen III und IV leicht ab (Tag +720 Gruppe III: 332,4/ μ L; Gruppe IV: 294/ μ L). In Gruppe I normalisierten sich die Werte ab Tag +28 (458,2/ μ L) und verblieben bis Tag +720 stabil (430/ μ L). Gruppe II zeigte nach anfänglichem Absinken der medianen Zellzahl an Tag +270 einen Peak (693,9/ μ L) und verblieb bis Tag+720 in der Norm (496/ μ L).

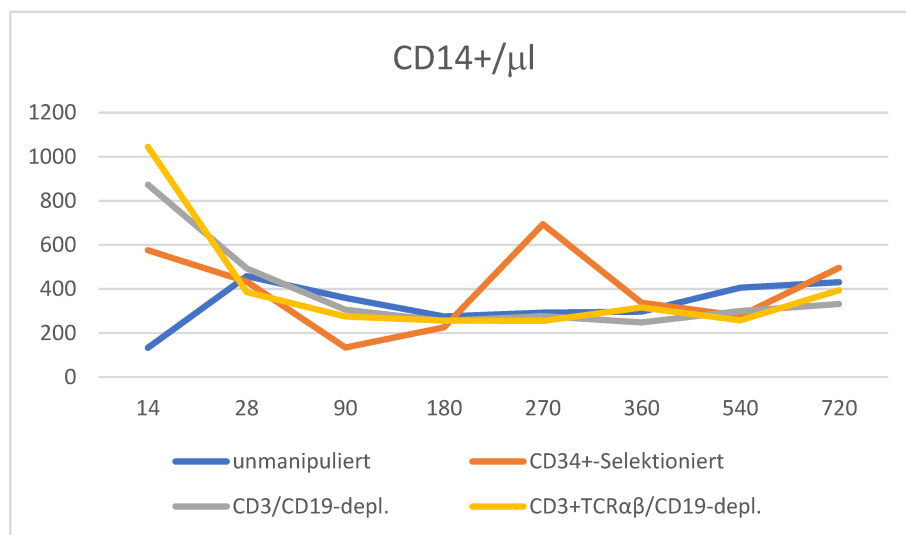


Abbildung 10: Entwicklung der CD14+ Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum. Der Normwertbereich ist mit 400-1000 CD3-/CD56+ Zellen/ μ L definiert.

3.5.8 B-Zellen (CD19+)

Zu Beginn des Analysezeitraums befanden sich die CD19+ Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Altersentsprechende Normwerte konnten in Gruppe I (204/ μ L) und IV (297/ μ L) erst am Tag +360 und an Tag + 270 in Gruppe II (240/ μ L) erreicht werden, während die Zellanzahl in Gruppe III über den gesamten Beobachtungszeitraum subnormal blieb (<200/ μ L).

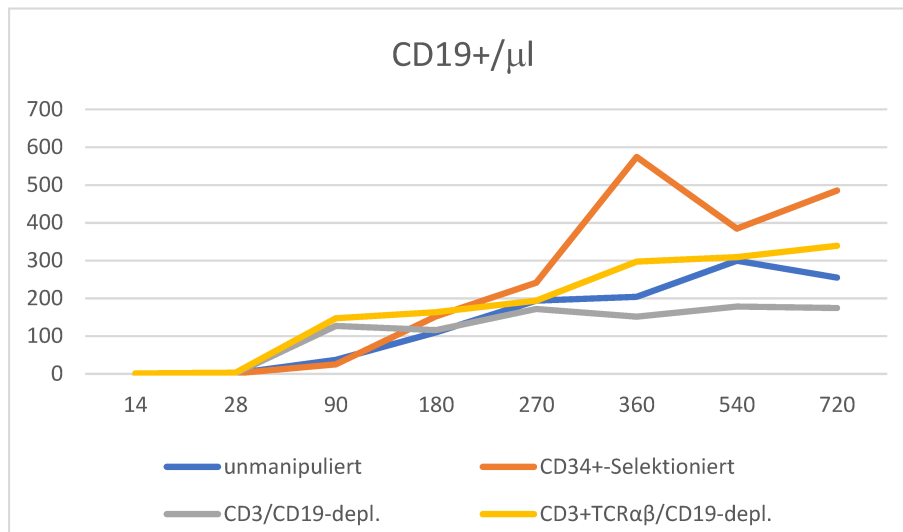


Abbildung 11: Entwicklung der CD19+ Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum. Der Normwertbereich ist mit 200-600 CD19+ Zellen/µL definiert.

3.5.9 CD4+/45RA+ Zellen und CD8+/45RA+ Zellen

Zu Beginn war die Anzahl der naiven CD4+/CD45RA+ T-Zellen in allen Gruppen gering. Ab Tag +180 zeigte sich jedoch in allen Gruppen ein Anstieg (Gruppe I: 39/µL; Gruppe II: 76/µL; Gruppe III: 10/µL; Gruppe IV: 36/µL), der ab Tag +270 anhält. Bis Tag +720 stieg die Anzahl in Gruppe I auf 198/µL, in Gruppe II auf 346/µL, in Gruppe III auf 136/µL und in Gruppe IV auf 214/µL. Ein ähnlicher Trend wurde bei den naiven CD8+/CD45RA+ T-Zellen beobachtet, wobei der Anstieg bereits ab Tag +90 höher war. An Tag +720 erreichte Gruppe II mit 1226/µL die höchste Zellanzahl, gefolgt von Gruppe I (347/µL) und Gruppe IV (263/µL). In Gruppe III wurden 136/µL CD8+/CD45RA+ naive T-Zellen gemessen.

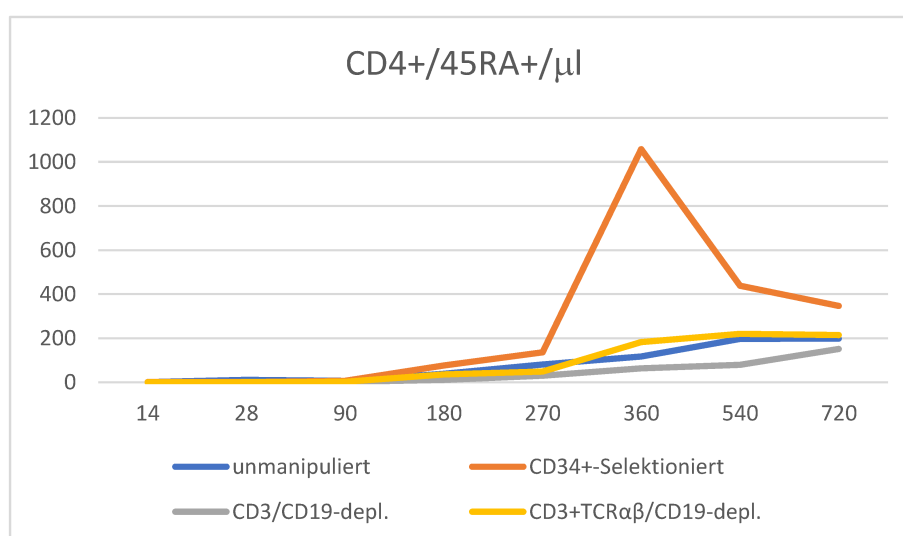


Abbildung 12: Rekonstitution der CD4+/45RA+ Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

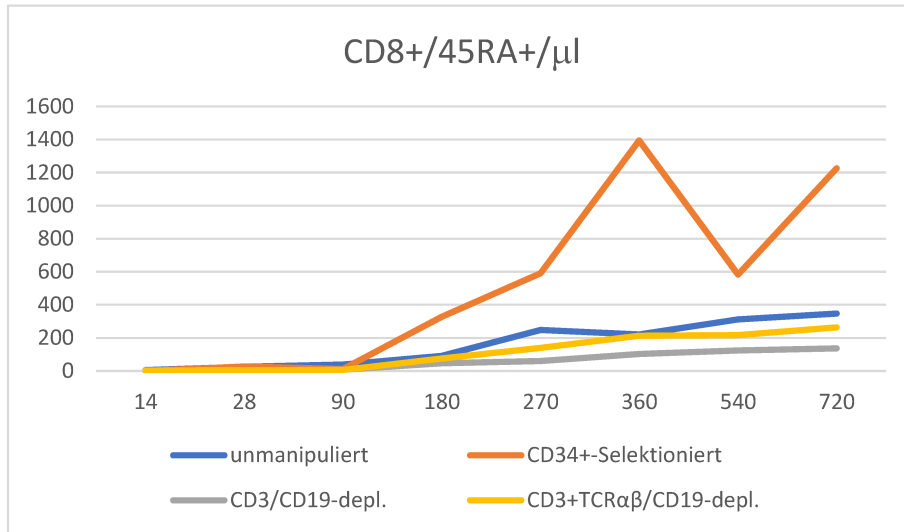


Abbildung 13: Rekonstitution der CD8+/45RA+ Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

3.5.10 CD3+/CD4+/ TCR $\alpha\beta$ + und CD3+/CD8+/TCR $\alpha\beta$ +

In Gruppe I wurden am Analysebeginn kontinuierlich steigende Zahlen der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen beobachtet. Die Zahlen der CD3+/CD4+/ TCR $\alpha\beta$ + und CD3+/CD8+/TCR $\alpha\beta$ + waren an Tag +60 höher in Gruppe I im Vergleich zu den Gruppen II-IV (Gruppe I: 80/ μL ;75 μL vs. 67/ μL ,37/ μL ; 27/ μL ,23/ μL ; 16/ μL ,11/ μL). Ab Tag + 270 konnte in allen Gruppen eine klare steigende Tendenz beobachtet werden, wobei die höchsten Werte in Gruppe II verzeichnet wurden.

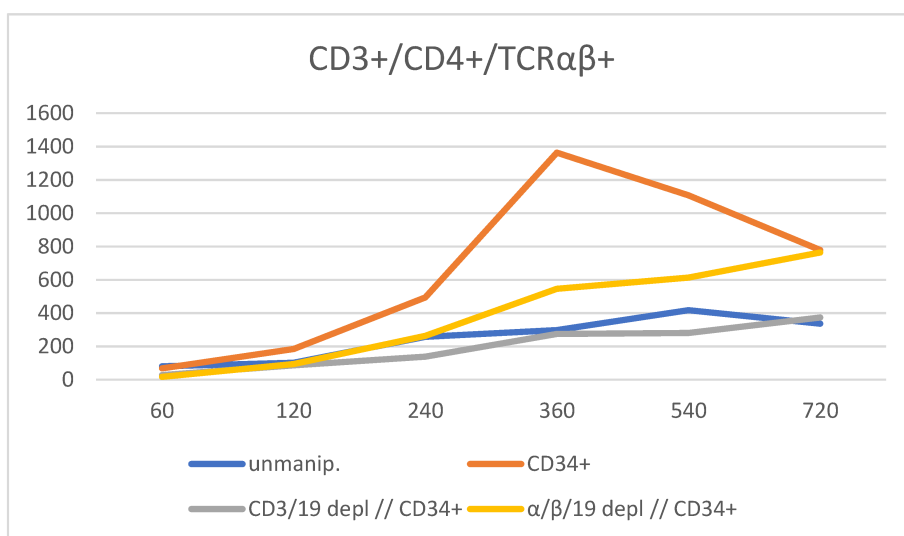


Abbildung 14: Rekonstitution der CD3+/CD4+/ TCR $\alpha\beta$ + über den Messzeitraum in den vier Gruppen.

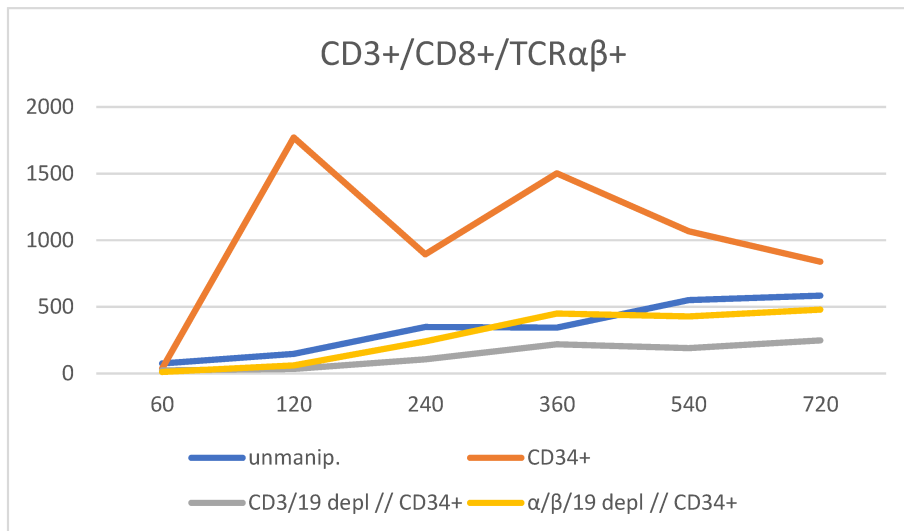


Abbildung 15: Rekonstitution der CD3+/CD8+/TCRαβ+ über den Messzeitraum in den vier Gruppen.

3.5.11 CD3+/CD4+/TCRγδ+ und CD3+/CD8+/TCRγδ+

Zu Beginn waren die CD3+/CD8+ TCRγδ+ T-Zellen in Gruppe IV in höchster Anzahl (5/μL) vorhanden, ihre Zahl stieg kontinuierlich an und verblieb im weiteren Verlauf stabil (Tag +720 Gruppe IV: 22/μL). Vor allem in Gruppe II konnte ein steiler Anstieg beobachtet werden und eine Zellanzahl von 131/μL verzeichnet werden. In Gruppe I und III war der Anstieg geringer, zeigte jedoch trotzdem wachsende Tendenzen. Die Erholung der CD3+/CD4+ TCRγδ+ T-Zellen zeigte sich etwas verzögert und konnte in Gruppe II am stärksten beobachtet werden.

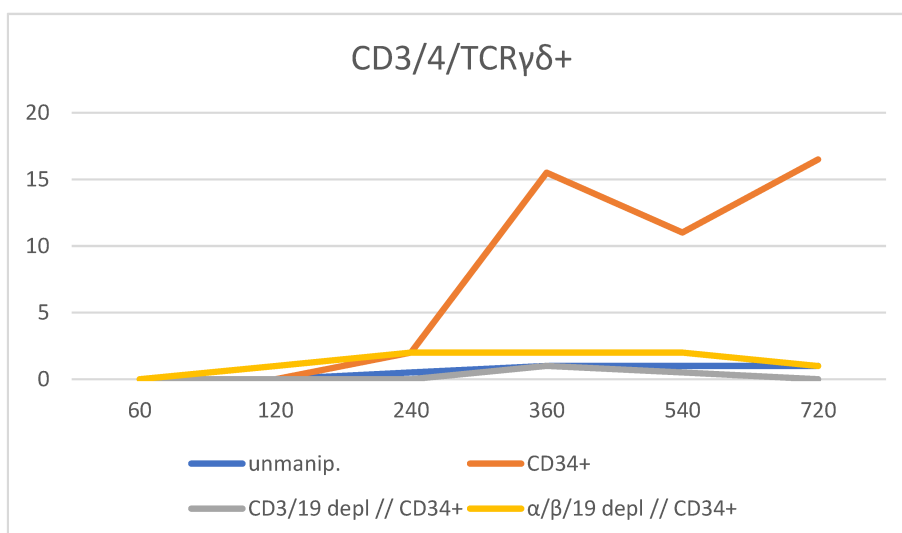


Abbildung 16: Rekonstitution der CD3+/CD4+/TCRγδ+ über den Messzeitraum in den vier Gruppen.

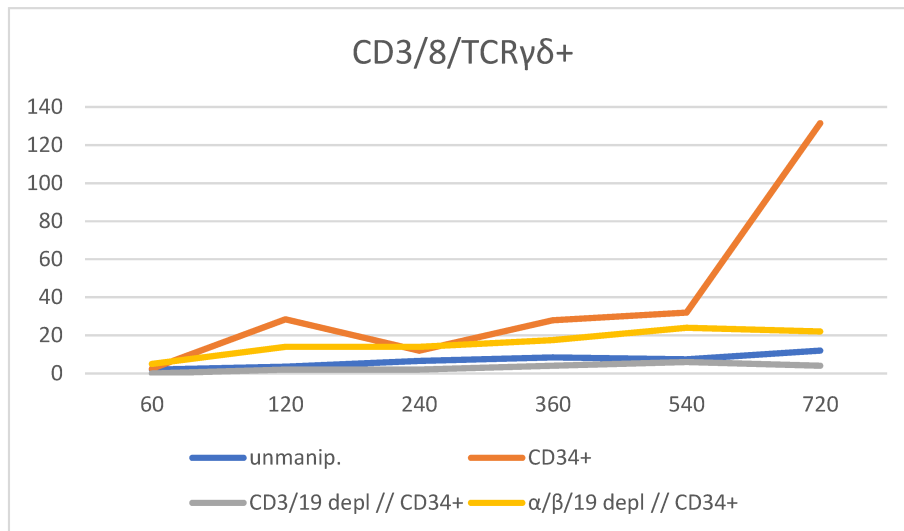


Abbildung 17: Rekonstitution der CD3+/CD8+/TCRγδ+ über den Messzeitraum in den vier Gruppen.

3.5.12 Spectratyping

An Tag +60 nach der HSZT war der Spectra-Complexity-Score (SCS) für CD4+ T-Zellen in Gruppe I höher (Median, 106) als in den anderen drei Gruppen (Median: Gruppe II, 54; Gruppe III, 59; und Gruppe IV, 39). Ab Tag +240 wiesen alle Gruppen einen vergleichbaren Wert auf (Median: Gruppe I: 120, Gruppe II: 120; Gruppe III: 120, Gruppe IV: 120).

Im Einklang damit waren in Gruppe I nach zwei Monaten polyklonale Muster vorherrschend, während in den Gruppen II-IV monoklonale oder fehlende Muster dominierten. Auch bei den CD8+ T-Zellen war der mediane SCS (103) in Gruppe I am Tag +60 höher als in den anderen Gruppen (Gruppe II: 1; Gruppe III: 18 Gruppe IV: 16,5). Ab Tag +240 wurde in allen Gruppen eine vergleichbare SCS beobachtet. Dementsprechend dominierten in Gruppe I ab Tag +60 polyklonale Muster, während das CD8+-Spektratyping in den anderen Gruppen hauptsächlich fehlende oder monoklonale Muster ergab. Am Tag +240 wurde in allen Gruppen eine Verschiebung in Richtung Polyklonalität beobachtet.

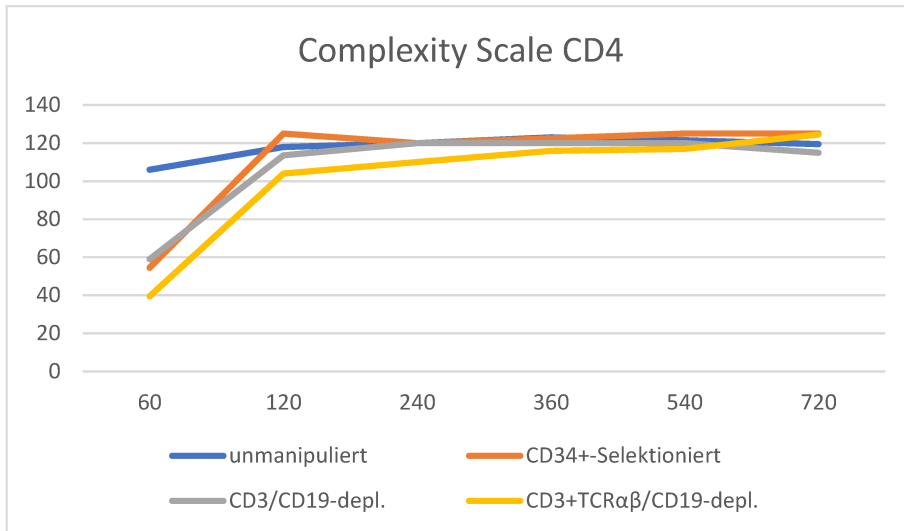


Abbildung 18: Complexity Scale CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

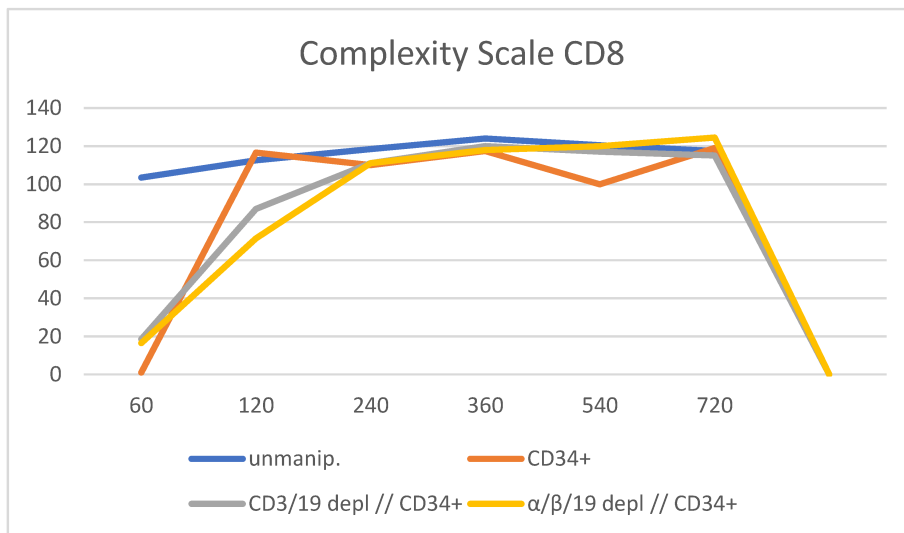


Abbildung 19: Complexity Scale CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

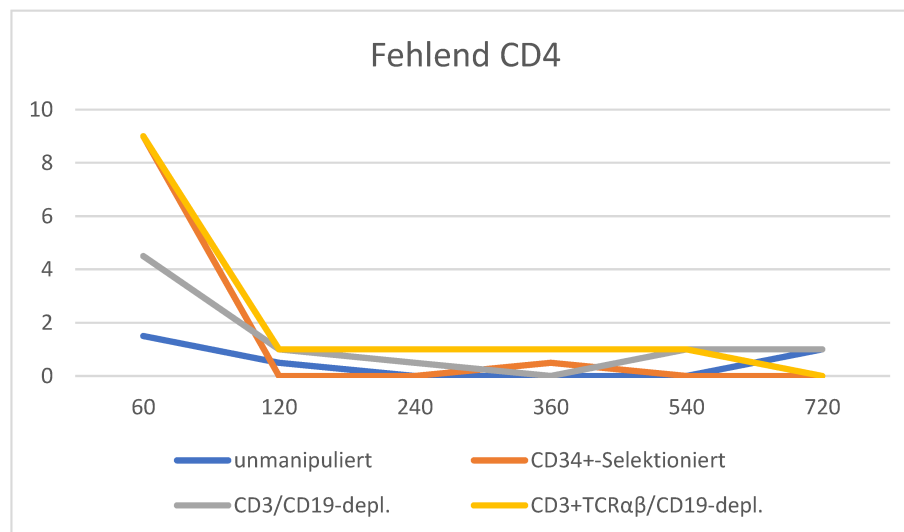


Abbildung 20: Fehlende Muster der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

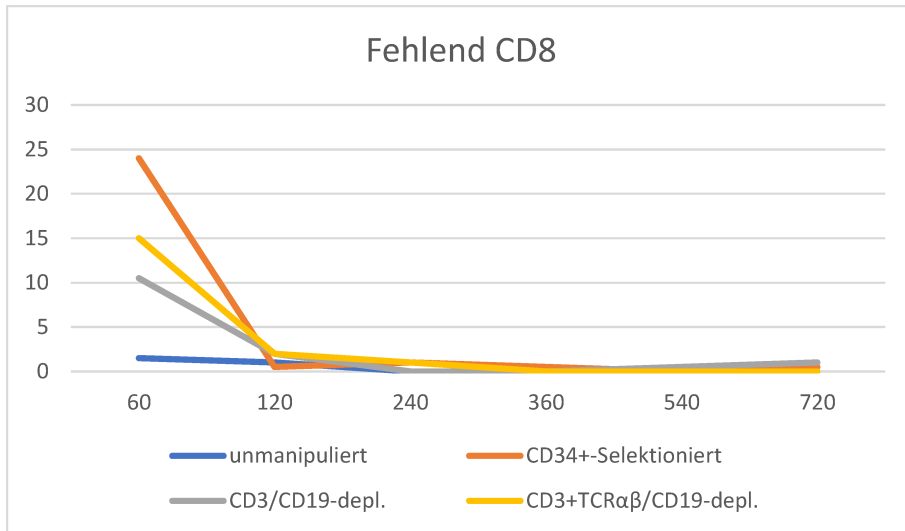


Abbildung 21: Fehlende Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

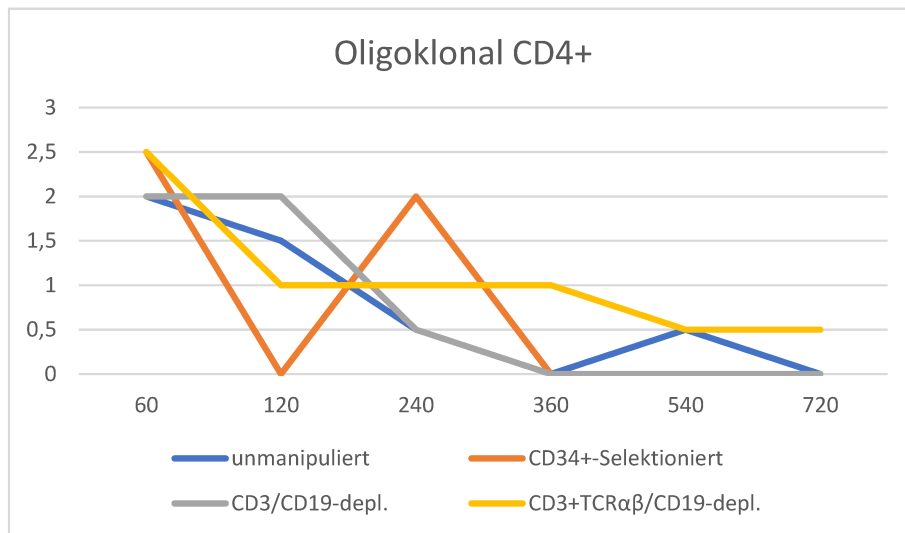


Abbildung 22: Oligoklonale Muster CD4+ Zellen über den Messzeitraum der vier Gruppen.

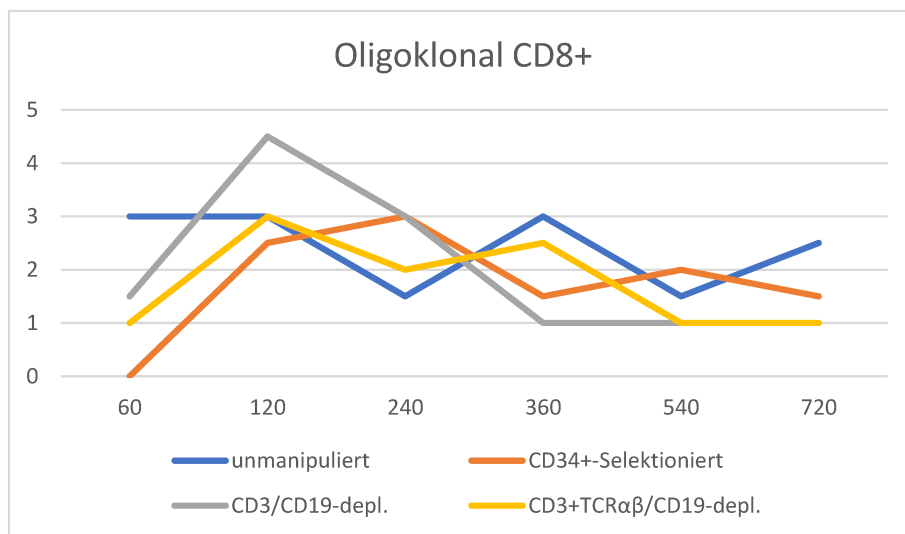


Abbildung 23: Oligoklonale Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

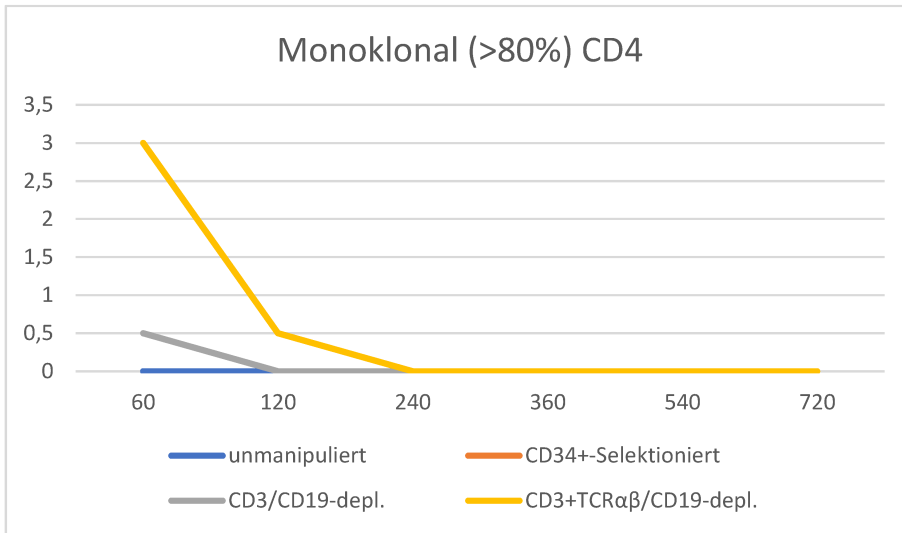


Abbildung 24: Monoklonale Muster der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

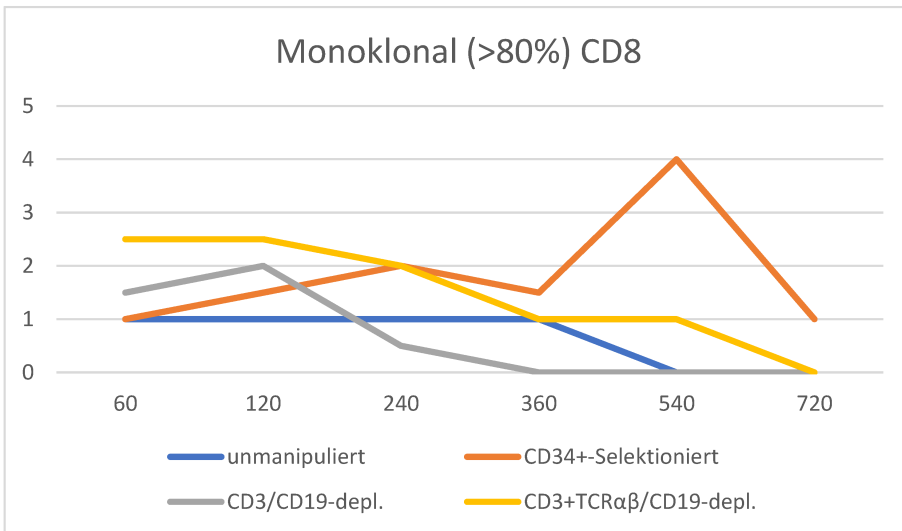


Abbildung 25: Monoklonale Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

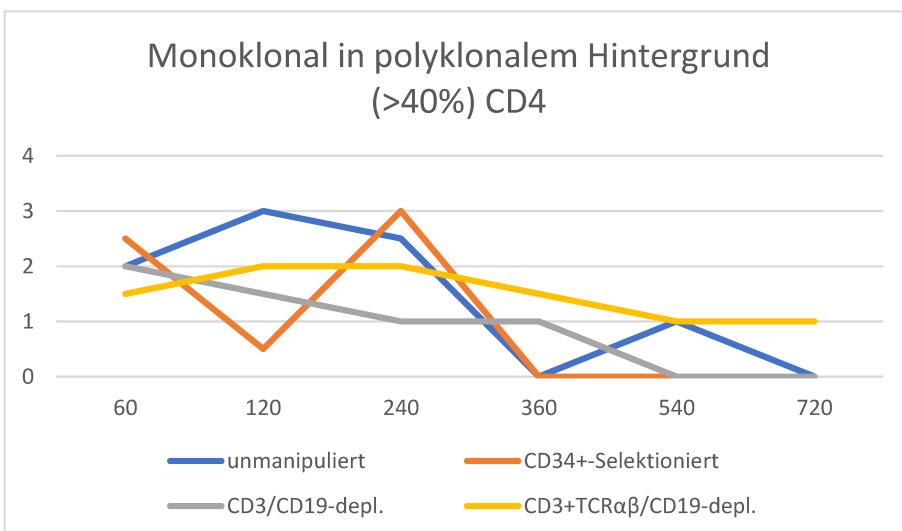


Abbildung 26: Monoklonale Muster in polyklonalem Hintergrund der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

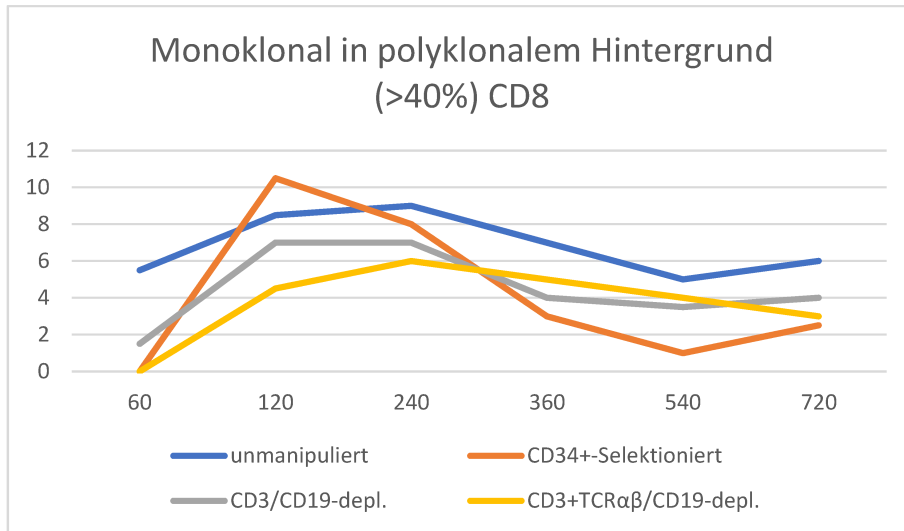


Abbildung 27: Monoklonale Muster in polyklonalem Hintergrund der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

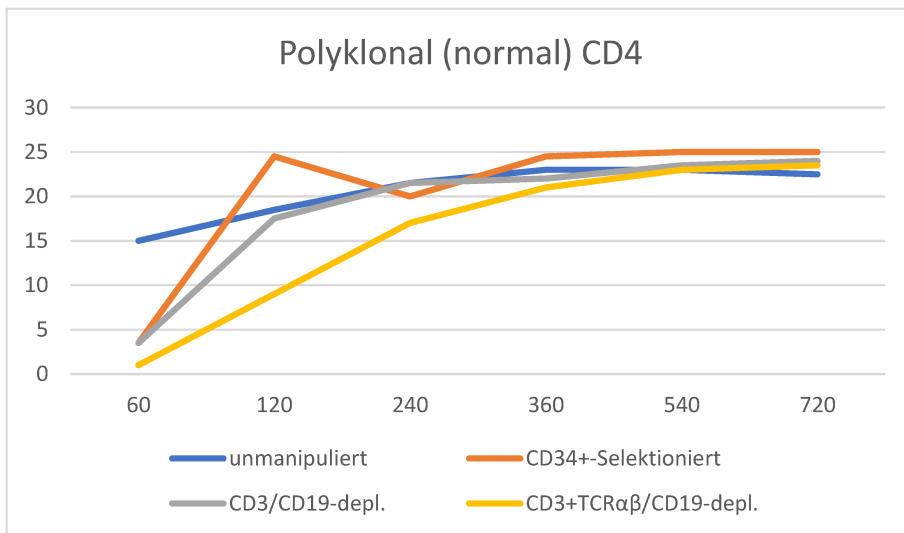


Abbildung 28: Polyklonale Muster der CD4+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

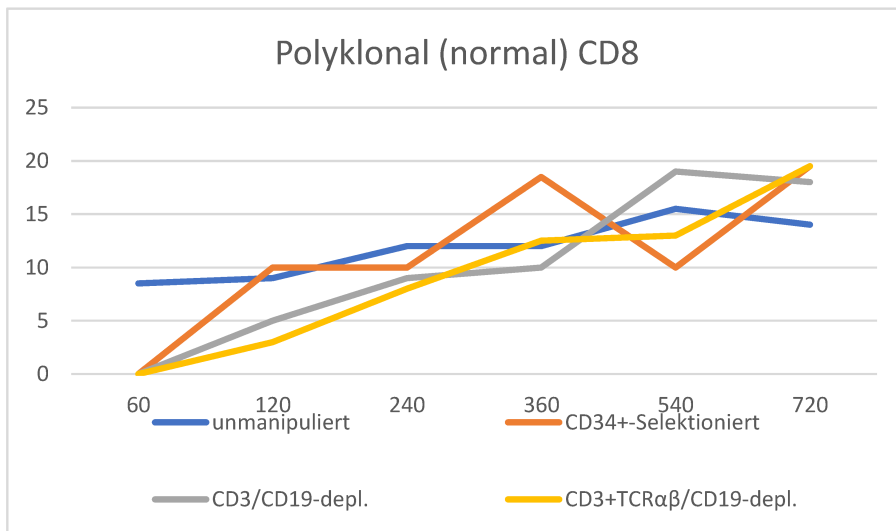


Abbildung 29: Polyklonale Muster der CD8+ T-Zellen in den vier Gruppen über den Messzeitraum.

4 Diskussion

Diese Arbeit konzentriert sich auf den Vergleich der unterschiedlichen Graftmanipulationen (CD34+ Selektion, CD3+/CD19+ Depletion, CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19 Depletion) mit nicht-manipulierten Grafts und deren Auswirkung auf die Immunrekonstitution nach allogener HSZT. Es wurden zu 8 Messzeitpunkten (+14, +28, +90, +180, +270, +360, +540, +720) Daten zur Immunrekonstitution erhoben, um potenzielle Unterschiede aufzudecken und zu analysieren. Eine rasches Engraftment und eine effektive Immunrekonstitution sind zwei der wichtigsten Schlüsselfaktoren, um eine niedrige Komplikationsrate und TRM der HSZT zu erreichen. Schwerwiegende Komplikationen wie die Abstoßung des transplantierten Grafts, lebensbedrohliche GVHDs und opportunistische Infektionen aufgrund der prolongierten Immunschwäche stellen die Limitationen der Therapie dar und dämpfen den Erfolg. Der ideale Verlauf einer HSZT zeichnet sich durch ein stabiles Engraftment, ein Gleichgewicht zwischen effektiven GVL/GVT-Effekt, niedrigen GVHD-Raten und der Erholung der Immunabwehr durch ein quantitativ und qualitativ funktionsfähiges Immunsystem aus. Um die Einflüsse auf die Immunrekonstitution vollständig zu erfassen, wurden Aspekte wie die Wahl der Spender*innen, die Stammzellquelle, das Konditionierungsregime, die GVHD-Prophylaxe und auftretende Infektionen in die Analyse integriert (30). Ziel dieser Studie war es durch den Vergleich der unterschiedlichen Arten der Graftmanipulationen miteinander, und mit unmanipulierten Transplantaten wichtige Erkenntnisse zur Immunrekonstitution bei 118 pädiatrischen Patient*innen zu liefern.

4.1 Limitationen

Das Patient*innenkollektiv dieser Studie liefert wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Immunrekonstitution bei pädiatrischen Patient*innen, da es aufgrund der Heterogenität die Möglichkeit bietet, verschiedene Aspekte der Immunrekonstitution unter realen Bedingungen zu untersuchen. Dennoch ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass die Heterogenität der zugrunde liegenden Erkrankungen die Verallgemeinerung der Ergebnisse beeinflusst. Durch den Einbezug aller Patient*innen von 2004-2022, die einer allogenen HSZT unterzogen wurden, besteht hinsichtlich des Alters, der Grunderkrankung, der zuvor durchgeführten Behandlungen, sowie des sich über die Zeit ändernden Transplantationssettings ein breites Spektrum, das zu Limitationen in der Vergleichbarkeit der Daten führt.

Die Patient*innen wurden anhand der Manipulation des Grafts in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe I: unmanipulierte Knochenmarks-/ periphere Blutstammzellspende (n = 50), Gruppe II: CD34+ Selektion (PSZT) (n=10), Gruppe III: CD3+/CD19 Depletion (PSZT) (n = 25), Gruppe IV: CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19 Depletion (PSZT) (n= 46). An dieser Stelle muss vermerkt werden, dass Gruppe II mit einer Anzahl von 10 Transplantationsverläufen die kleinste Kohorte darstellt und die statistischen Ergebnisse daher schwer vergleichbar und interpretierbar sind. Die ungleiche Verteilung aber auch die geringe Anzahl an Patient*innen kann zur Verzerrung der Ergebnisse und zur Verfälschung der Signifikanz führen.

Als weitere Limitation stellte sich auch die retrospektive Datenanalyse dar: trotz der Aktualisierung der Daten 2022 und 2023 konnten nicht alle fehlenden Daten erhoben werden, was teilweise zu Unvollständigkeit der Datengrundlage führte.

4.2 Graftmanipulationen

Schon frühere Ergebnisse zeigten, dass eine HSZT mit einem CD34+ selektionierten Transplantat durchaus vielversprechend sein kann, jedoch mit einigen Nachteilen einhergeht (51). Durch die positive Selektion der CD34+ Zellen und die anschließende Reinigung des Präparates wird eine indirekte Entfernung der T- sowie B-Zellen erreicht. Als Folge dessen sinkt das Auftreten der durch T-Zellen ausgelösten GVHD und die mit B-Zellen assoziierten posttransplantations-lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) (52–55). Die Transplantation eines CD34+ selektionierten Grafts erfordert jedoch die Verabreichung einer intensitätsstärkeren Konditionierung, um eine Graft-Abstoßung zu verhindern und ein Engraftment zu ermöglichen. Diese Intensitätssteigerung führt in weiterer Folge zu einer erhöhten Komplikationsrate (36,52). Frühere Ergebnisse haben auch gezeigt, dass dieses Verfahren mit einer verlangsamten Immunrekonstitution durch die beeinträchtigte Erholung der T-Zellen und somit mit erhöhten Infektionsraten assoziiert ist (29,56). Weiters verbleiben durch die gezielte positive Selektion der CD34+ Zellen keine anderen effektiven Zellen im Transplantat, die die Immunrekonstitution unterstützen (29,56). Die Ko-Transplantation angeborener Immunzellen, wie NK-Zellen, Monozyten, myeloischen und plasmazytoiden dendritischen Zellen und Granulozyten, die sowohl infektionshemmend als auch tumorhemmend wirken, gemeinsam mit CD34+ HSZ führt im Posttransplantationsverlauf jedoch zu einer verbesserten Rekonstitution des Immunsystems nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ. (31,57) Somit ergibt sich zwar mit der

Selektion der CD34+ Progenitorzellen und dem somit größtenteils T- Zell-freiem Transplantat ein verringertes Risiko einer GVHD, jedoch ist die TRM durch die intensivierete Konditionierung und das Auftreten von Infektionen aufgrund der verlangsamten Immunrestitution immer noch kritisch (51–55). Im Vergleich zur CD34+Selektion besteht ein gravierender Unterschied zur CD3+/CD19+ Depletion, welche durch eine gezielte Entfernung einzelner Zellen einen anderen Ansatz der Manipulationstechniken darstellt. Aufgrund der in zahlreichen Studien erkannten Tatsache, dass vorwiegend T-Zellen verantwortlich für die Entstehung der GVHD sind, ist der Ansatzpunkt der T-Zell-Depletion naheliegend (31,51,54,58). Auch aus den Ergebnissen dieser Studie ist ersichtlich, dass die GVHD-Raten in den TCD-Gruppen niedriger sind. Der Vorteil der selektiven Depletion von CD3+/CD19+ ist, dass bei diesem Verfahren potenziell wirksame Immunzellen im Transplantat verbleiben, die die Immunrestitution fördern. Insgesamt kommt es aber aufgrund der vollständigen Depletion der T- und B-Zellen, ebenfalls wie bei der CD34+Selektion zu einer prolongierten Immunschwäche. Darüber hinaus geht der durch die T-Zellen entstehende GVL/GVT Effekt verloren und die Rückfallraten von malignen Erkrankungen steigen an (51,54). Beim spezifischeren Verfahren der CD3+TCR $\alpha\beta$ + / CD19+ Depletion verbleiben zusätzlich TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen im Transplantat. TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen kombinieren Eigenschaften des angeborenen und des erworbenen Immunsystems, unterstützen schon früh die Immunrestitution und konnten bisweilen nicht mit der Entstehung einer GVHD in Verbindung gebracht werden.(39,51,59–61) Zusätzlich beschreibt Ye et al., dass TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen einen wirksamen antitumoralen bzw. antileukämischen Effekt erzielen können, indem sie Zielmoleküle maligner Zellen direkt identifizieren (39). Grund dafür ist laut Martelli et al. die Unabhängigkeit der MHC-Komplexe (61). CD3+Zell-depletierte Grafts enthalten vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems, die sowohl antiinfektiös als auch antitumoral wirken und ein frühes und effektives Engraftment unterstützen. Im Gegensatz dazu enthält das durch die spezifischere CD3+TCR $\alpha\beta$ Depletion gewonnene Graft sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems und bietet dadurch bedeutende Vorteile in Bezug auf das Überleben: der positive Einfluss der im Graft enthaltenen Zellen schafft bessere Bedingungen für die Immunrestitution und führt somit zu einer raschen und effizienten Erholung der Immunabwehr. Die somit verbesserte Immunlage spiegelt sich in geringeren Komplikationsraten wider. Die Beobachtungen in dieser Studie zur Reconstitution der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen und TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen konnte zusätzlich zeigen, dass trotz der Depletion

von TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen eine frühzeitige Rekonstitution dieser Zellen möglich ist. In Gruppe I zeigten sich zwar von Anfang an hohe und kontinuierlich steigende Werte von sowohl CD3⁺/CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen als auch CD3⁺/CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen, jedoch konnte auch in Gruppe III und IV eine Normalisierung innerhalb von 4-5 Monaten beobachtet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen schon in der frühen Posttransplantationsphase vor allem in Gruppe IV detektiert werden konnten und sich die Rekonstitution von TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen als auch von TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen zur Gruppe I, mit KM-Transplantat, nicht stark unterschied (40,45,51).

4.3 Engraftment und Spender*innenchimärismus

Eine rasches Engraftment und eine effektive Immunrekonstitution ist wesentlich für den Erfolg der allogenen HSZT. Nahezu alle Patient*innen befinden sich über mehrere Tage bzw. Wochen in einer Panzytopenie, abhängig davon welches Konditionierungsregime und welche Stammzellquelle für den*die Patient*in ausgewählt wurde.(25) Seggewiss et al. und Mackall et al. beschreiben jeweils eine schnelle Erholung der myeloischen Zellreihe und somit die Überwindung des Nadirs innerhalb von 14 Tagen nach PBSZT und etwas später von 21 Tagen nach KMT (17,26). Die Auswertung der Ergebnisse dieser Studie zeigten, unabhängig der Gruppen, ebenfalls ein Engraftment im Median nach 10 Tagen bei PBSZT und 15 Tagen nach KMT. Neben der Stammzellquelle spielte beim Engraftment auch die Graftmanipulation eine Rolle. Ein stabiles drei-Linien Engraftment wurde in dieser Studie signifikant früher in den TCD-Gruppen erreicht, in Gruppe III im Median am Tag +9 und in Gruppe IV an Tag +10 ($p < 0,001$). Auch die Unabhängigkeit von Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentraten wurde in Gruppe III und IV signifikant schneller erreicht (Erythrozytenk.: Tag +8 und +7 vs. +17 und +13, $p < 0,001$; Thrombozytenk.: Tag +9 und +10 vs. +13 und +18, $p < 0,002$). Diese Beobachtungen bestätigen bereits zuvor erzielte Ergebnisse (17,55,62).

Insgesamt wurde bei 83% (109 von 131 Transplantationsverläufen) ein primäres Engraftment erreicht. Es konnten bezüglich der Versagens- und Abstoßungsrate keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden. Letztendlich kam es bei 13 Patient*innen (knapp 10%) zu einem Transplantatversagen und einer notwendigen Re-Transplantation. Bei neun anderen Patient*innen mit drohenden Transplantatversagen gelang durch die wiederholte Gabe von Donor-lymphozyten-Infusionen (DLI) eine Stabilisierung des Chimärismus. Harada et al. beschreibt DLI als effektive Immuntherapie

nach allogener HSZT, um einerseits einen gemischten Chimärismus zu stabilisieren und einen Krankheitsrückfall zu verhindern und andererseits, um den GVL/GVT-Effekt zu verstärken (63).

In dieser Arbeit wurde über den Gesamtzeitraum, bis zum Tag +720, der Spender*innenchimärismus überwacht, um eine drohende Transplantatabstoßung zu erkennen oder einen möglichen Krankheitsrückfall einzuschätzen. Laut Bornhäuser et al. ist ein sinkender bzw. inkompletter Spender*innenchimärismus assoziiert mit höheren Rückfallraten (64). Im Postransplantationsverlauf zeigten sich in Gruppe I, III und IV ein konstanter Chimärismus, wobei in Gruppe II der Chimärismus zum letzten Messzeitpunkt am Tag 720 mit 72% stark abgesunken war. Das unterstreicht vorherigen Erkenntnisse, wonach ohne die gleichzeitige Transplantation von T-Zellen und anderen wirksamen Zellen dauerhaft lediglich ein instabiles Engraftment erreicht werden kann (40,65). Insgesamt kam es, unabhängig der Gruppen, bei 22 Personen zu einem Krankheitsrückfall und folglich zum Versterben der Patient*innen. Hinsichtlich der Rückfallraten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Gruppen beobachtet werden, was vorherigen Ergebnissen widerspricht (64).

4.4 Immunrekonstitution

Zu Beginn der Immunrekonstitution erholen sich vorwiegend Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen, Monozyten und Dendritische Zellen. Die Erholung der spezifischeren T- und B-Zellen des erworbenen Immunsystems dauert teilweise einige Monate, in vielen Fällen jedoch sogar Jahre, bis sie quantitativ und qualitativ vollständig wiederhergestellt sind. (27) Während Muccio et al. beschreibt, dass bei frühzeitiger Erholung der NK-Zellen, die Infektionsraten niedriger sind (57), spricht Seggewiss in den ersten 100 Tagen generell von einer Immundefizienz (17). Grund dafür ist die Tatsache, dass sich die einzelnen Immunzellen zwar quantitativ erholen, jedoch die qualitative Erholung wesentlich länger dauert (17).

4.4.1 NK-Zellen

NK-Zellen sind die ersten lymphatischen Zellen, die sich nach allogener HSZT erholen. Aufgrund der frühzeitigen Erholung innerhalb der ersten beiden Monate spielen sie eine

grundlegende Rolle in der frühen Immunabwehr gegen virale Erreger sowie in der Zerstörung verbliebener Tumorzellen. Sie weisen keine Alloreaktivität auf und verursachen daher keine GVHD (40,42,63,74,75). Die Metaanalyse von Mustaq et al. ergab ein besseres Gesamtüberleben und niedrigerer Rückfallraten bei hoher NK-Zell-Rekonstitution, sowie die Steigerung des GVL/GVT-Effekt ohne steigende GVHD-Raten (34,56,66). Muccio et al. beobachtete eine rasche Erholung vor allem bei der Anwendung CD3+ TCR $\alpha\beta$ /CD19 depletierter Grafts (25,57,67). Auch in dieser Studie wurden die früheren Ergebnisse bestätigt und eine frühzeitige Erholung der NK-Zellen in den TCD-Gruppen beobachtet: in Gruppe III und IV wurden am Tag +14 schon Normwerte erreicht und ein früher Peak am Tag +28 gemessen. In Gruppe I dagegen wurden die Normwerte erst am Tag +28 erreicht. Wie erwartet zeigte sich in Gruppe II die langsamste und instabilste Erholung mit Normwerten nach 8 Monaten, was sich durch das größtenteils T-Zell-freie Transplantat und die somit fehlende Unterstützung der Immunrekonstitution erklären lässt.

4.4.2 T-Zellen und Subpopulationen

Im Gegensatz zu den NK-Zellen ist die T-Zell-Rekonstitution nach allogener HSZT bekanntermaßen verzögert und unterscheidet sich grundsätzlich von der Rekonstitution der B-Zellen. Während es sich zu Beginn bei der B-Zell-Rekonstitution um naive B-Zellen handelt und die Differenzierung erst später erfolgt, vermehren sich bei der T-Zell-Rekonstitution primär periphere reife T-Zellen des Transplantats. Die Rekonstitution der CD8+ Zellen beginnt früher, innerhalb von 6 Monaten, während die Erholung der CD4+-Zellen, wie durch diese Studie auch bestätigt wurde, verzögert verläuft und oft erst nach einem Jahr beobachtet werden kann (27,67). Laut Storek et al. und Talmadge et al. spielt dabei die Zusammensetzung des Grafts und somit die verabreichte Dosis an T-Zellen eine ausschlaggebende Rolle (27,29). Die vorliegende Studie sowie vorangegangene Untersuchungen zeigen, dass Transplantationen mit T-Zell-depletierten Grafts zu einer eingeschränkten Erholung der T-Zellen führen (27,29,51,67,68). Nach fünf Monaten erreichte zuerst Gruppe I, altersentsprechende Normwerte der CD8+-Zellen. Dies deutet auf eine oligoklonale Expansion von reifen, aus dem Graft stammenden CD8+ T-Zellen über einen thymusunabhängigen peripheren Weg bei nicht-manipulierter HSZT hin. In den TCD-Gruppen dagegen konnten Normwerte erst nach 7-10 Monaten erreicht werden. Auch hinsichtlich der CD4+ -Zellen wurde die verzögerte Erholung bestätigt. In Gruppe II und IV konnten nach 11 Monaten Normwerte erreicht werden. In Gruppe I konnte eine

Normalisierung erst nach 18 Monaten beobachtet werden und in Gruppe III verblieben die Werte subnormal, was in Zusammenhang mit der vollständigen T-Zell-Depletion stehen könnte (68).

Die ersten Zellen der T-Zell-Rekonstitution ermöglichen zwar kurzfristig eine Immunabwehr, sind aber in ihrem TCR-Repertoire stark eingeschränkt und sind gleichzeitig alloreaktiv. Erst später setzt die Reifung naiver T-Zellen im Thymus ein, die stark von der noch vorhandenen Thymusfunktion abhängt. Erst jene Zellen, die durch die Reifung im Thymus entstanden sind, stellen langfristig eine effektive Immunabwehr dar (68). In dieser Studie wurden mittels PCR, TRECs (T-Zell-Rezeptor-Exzisionskreise) und KRECs (κ -deleting recombination excision circles) nachgewiesen, um die qualitativen Aspekte der Thymus- und Knochenmarkserholung zu bewerten. Um eine gut funktionierende adaptive Immunabwehr zu gewährleisten, ist ein breites TCR und BCR-Spektrum notwendig. TRECs entstehen während des Rearrangement des TCR und KRECs während des Rearrangement der leichten Ketten. Laut Mensen et al. sind ca. 70% der neu herangereiften T-Zellen TREC positiv, während ungefähr 50% der B-Zellen KREC positiv sind (69). In dieser Studie konnte nach 5 Monaten ein Anstieg der TREC-Zahl in Gruppe I und IV beobachtet werden, wobei der Anstieg in Gruppe IV wesentlich schneller und höher voran ging. Bei der KREC-Analyse konnten sehr ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Das lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass in Gruppe I und IV eine qualitativ bessere Immunrekonstitution erreicht werden kann aufgrund der Zusammensetzung des transplantierten Grafts.

Gleichzeitig konnte auch eine schnelle Erholung der CD3⁺/CD4⁺/CD45RA⁺ naiven T-Zellen in Gruppe IV beobachtet werden, was insgesamt für eine schnelle Thymus-Erholung und eine effiziente Immunrekonstitution spricht. Die Korrelation zwischen einem Anstieg naiver T-Zellen, einer hohen TREC-Zahl, und TCR-Polyklonalität wurde bereits von Mensen et al. und Zamani et al. beschrieben (68–72). Diese Studie konnte diese Beziehung ebenfalls bestätigen und somit für Gruppe IV eine effiziente Rekonstitution des erworbenen Immunsystems feststellen.

Neben der Bewertung der Thymusfunktion gibt die Beurteilung der Komplexität des TCR-Repertoires ebenfalls Auskünfte über die qualitative Rekonstitution des adaptiven Immunsystems (71). In dieser Studie konnte bei der Beurteilung des Spectratypings bezüglich des Complexity Scores (CS) für CD4⁺-T-Zellen und für CD8⁺ T-Zellen in Gruppe I nach zwei Monaten höhere Werte beobachtet werden als in den anderen Gruppen. Erst nach 8 Monaten wurden in den anderen drei Gruppen vergleichbare Werte erreicht. Im Einklang

damit zeigten sich in Gruppe I nach zwei Monaten bei der CD4+- und CD8+- Spectratypings vorwiegend polyklonale Muster, während in den Gruppen II-IV monoklonale oder fehlende Muster dominierten. Dieses Phänomen lässt sich vermutlich durch den häufigeren Einsatz von MSD in Gruppe I erklären und die damit verbundene HLA-Identität. Nach +240 Tagen konnten in allen Gruppen eine Verschiebung in Richtung Polyklonalität beobachtet werden.

4.4.3 B-Zellen

Die Erholung der B-Zellen nach allogener HSZT ist häufig verzögert und führt zu prolongierter Immunschwäche (43). Ogonek et al. und Van der Maas et al. beschreiben eine erste Erholung nach 1-2 Monaten, wobei es sich hierbei überwiegend um transitionale B-Zellen handelt und eine vollständig quantitative Erholung nach 12 Monaten (43,73). Die qualitative Erholung kann bis zu 2 Jahre nach HSZT dauern (67).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine quantitative Erholung der B-Zellen über 200/ μ l in Gruppe I nach einem Jahr. In Gruppe II wurden Normwerte schon nach 9 Monaten erreicht. Trotz der umfassenden CD19-Depletion konnte in Gruppe IV eine schnelle Erholung, mit Normwerten nach 11 Monaten, festgestellt werden. In Gruppe III konnten jedoch bis zum letzten Messzeitpunkt keine Normwerte beobachtet werden. In beiden TCD-Gruppen wurde dieselbe Methode der B-Zell-Depletion angewandt, daher ist es naheliegend zu bestätigen, dass das Verfahren der CD3+TCR $\alpha\beta$ +/CD19-Depletion (wie in Gruppe IV angewandt) bessere Bedingungen für die Immunrekonstitution schafft. Eine rasche T-Zell-Rekonstitution und eine kurze Dauer der immunsupprimierenden Therapie, wie sie in Gruppe IV gegeben ist, unterstützt die Erholung der B-Zellen.

4.5 *Transplantationsbedingte Komplikationen*

4.5.1 GVHD

Wie im Unterkapitel "Graftmanipulationen" eingangs beschrieben, beeinflussen die unterschiedlichen Graftmanipulationen die Immunrekonstitution und haben folglich einen Einfluss auf das Auftreten transplantationsbedingter Komplikationen (19).

Eine der schwerwiegendsten Komplikationen im Verlauf der allogenen HSZT ist die Entwicklung einer GVHD. Alloreaktive T-Zellen stellen hierbei die potenziell gefährlichste

Komponente dar. Insbesondere bei großen Unterschieden in den HLA-Merkmalen bei Empfänger*in und Spender*in können schwere Verläufe letal enden (45).

In dieser Studie wurde bei 34 Transplantationsverläufen eine haploidente Spende herangezogen, wobei die Mehrheit (n=28) in den TCD-Gruppen vertreten war. Trotzdem zeigten die Ergebnisse, dass in Gruppe III und vor allem in Gruppe IV im Vergleich zur unmanipulierten Gruppe I signifikant weniger akute GVHDs auftraten ($p < 0,021$). Weiters konnte beobachtet werden, dass die GVHD-Prophylaxe signifikant kürzer in Gruppe III ($p < 0,005$) und IV ($p < 0,001$) verabreicht wurde als in Gruppe I. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die TCD eine wirksame Möglichkeit zur Reduktion des GVHD-Risikos ist, selbst im haploidenten Setting und trotz kürzerer immunsuppressiver Therapie. Zudem begünstigt die kürzere Anwendung der Immunsuppressiva eine effektive Immunrestitution, die in dieser Studie insbesondere in Gruppe IV beobachtet wurde. Insgesamt wurden in den TCD-Gruppen nicht nur seltener, sondern auch weniger schwere GVHD-Verläufe verzeichnet. So verstarben insgesamt fünf Personen infolge einer akuten oder chronischen GVHD, jedoch war in Gruppe IV kein Todesfall und in Gruppe III nur ein Todesfall zu verzeichnen. Während in den Gruppen III und IV tendenziell mildere Verläufe beobachtet wurden, verzeichnete Gruppe I sieben Patientinnen mit einer Grad-III-GVHD und drei Patientinnen mit einer Grad-IV-GVHD. Diese Erkenntnisse entsprechen den Erwartungen, die durch zuvor durchgeführte Studien aufgestellt wurden (46,47,49).

Überraschende Ergebnisse ergab die Auswertung der Gruppe II. Die positive Selektion der CD34+ Zellen ist bekanntermaßen eine wirksame Methode, um alloreaktive T-Zellen zu entfernen und die GVHD-Raten zu senken. In dieser Studie zeigten sich, jedoch sehr hohe GVHD-Raten. Es entwickelten 6 von 10 Personen in Gruppe II eine akute GVHD, trotz der GVHD-Prophylaxe im Median über 68 Tagen. Ursächlich für diese unerwarteten Ergebnisse ist, dass in diesen 6 Fällen zusätzlich zur CD34+ Selektion ein unmanipulierter Anteil hinzugefügt wurde.

Zusätzlich wurde das Auftreten einer GVHD in Bezug auf die Gabe von DLI analysiert.

Die Gabe der Spenderlymphozyten kann zu einer GVHD führen, die oft schwerwiegend verlaufen kann (70,80,81). Insgesamt erhielten in dieser Studie 43 Patient*innen eine DLI, davon 12 Personen in Gruppe III und 23 Personen in Gruppe IV. 16 Personen (37,2%) entwickelten eine GVHD nach DLI-Gabe, davon 8 in Gruppe III und 6 in Gruppe IV. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den beschriebenen Ergebnissen von Castagna et al. (74).

Insgesamt spricht dies für einen vorsichtigen Einsatz der DLI, da die positiven Effekte bei drohender Graftabstoßung bzw. der durch die DLI verstärkte GVL/GVT-Effekt, die negativen Effekte überwiegt (63,74–76).

4.5.2 Infektionen

Innerhalb des ersten Jahres nach einer allogener HSZT besteht aufgrund der anhaltend schwachen Immunabwehr ein deutlich erhöhtes Risiko für infektiöse Komplikationen (50). Aufgrund dessen wurden alle therapiebedürftigen Infektionen der Patient*innen im ersten Jahr erhoben und analysiert. Die Beobachtungen zeigten niedrige Infektionsraten in allen Gruppen, mit einem Median von vier (Spanne: 0-15) behandlungsbedürftigen Infektionen im ersten Jahr. Bei der genaueren Aufschlüsselung der Gruppen zeigte sich eine signifikant niedrigere Infektionsrate in Gruppe IV ($p < 0,030$). Diese Beobachtungen sind durch die kürzere Verabreichungsdauer der immunsuppressiven Therapie, die verbesserte Erholung der Thymusfunktion, sowie ein frühes breites TCR-Spektrum, wie es in Gruppe IV gegeben ist, erklärbar.

Bezüglich der Mortalitätsrate durch Infektionen beschreiben Elva Jiménez-Hernández et al. im Vergleich der vorhandenen Literatur eine sehr variable Rate von 16–47 %, die auf eine sehr heterogene Untersuchungspopulationen und zahlreiche Risikofaktoren wie Alter, Vorerkrankungen, CMV-Status vor der HSZT und GVHD zurückzuführen ist (77–79). In der multizentrischen Studie von Styczyński et al., die eine große Population von 95.828 allogenen HSZT-Patient*innen umfasst, wird eine Mortalitätsrate von 23,8% beschrieben (79,80).

In dieser Studie hingegen lag die Mortalitätsrate durch Infektionen bei lediglich 6,8%, was deutlich unter den in der Literatur genannten Werten liegt. Diese positiven Ergebnisse lassen sich teilweise auf die standardisierte Infektionsprophylaxe und -therapie vor und nach der Transplantation an der klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie Graz zurückführen sowie auf die positiven Ergebnisse in den TCD-Gruppen.

5 Fazit

Es kann festgehalten werden, dass die allogene Knochenmarkstransplantation mit einem unmanipulierten Graft in Anwesenheit eines MSD durchaus als etablierte Standardtherapie gilt. Aufgrund der Tatsache, dass nur in etwa 30% der Fälle bei Kaukasiern und in weniger als 10% der Fälle bei seltenen HLA-Typen ein identer Spender verfügbar ist, verschiebt sich der Fokus – v.a. bei malignen Erkrankungen - zunehmend hin zur haploidenten Stammzellspende. Der Erfolg der HSZT wird jedoch durch eine hohe Komplikationsrate und transplantationsbedingte Mortalität und Morbidität gedämpft. Neben den schwerwiegenden GVHD durch alloreaktive T-Zellen, stellt die verlangsamte Immunrekonstitution eines der größten Probleme dar, die eine hohe TRM mit sich zieht. In Anbetracht dessen ist es naheliegend, den Fokus auf die Entwicklung von Strategien zur Reduktion der Komplikationen und zur Verbesserung der Immunrekonstitution zu legen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Methoden der ex-vivo Graftmanipulation (CD34+Selektion, CD3+/CD19+Depletion, CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+Depletion) durchaus potenzielle Strategien in dieser Auswertung darstellen. Die Analyse der Studie zeigte am vielversprechendsten Ergebnisse in den TCD-Gruppen und bei genauerer Betrachtung in Gruppe IV mit der Methode der CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+Depletion. Im Vergleich zu den anderen Gruppen konnte ein zügiges Engraftment mit stabilem Chimärismus beobachtet werden. Zudem wurde eine rasche und effektive Immunrekonstitution festgestellt, was die Ergebnisse früherer Studien unterstreichen konnte. Es wurde eine frühzeitige Erholung der NK-Zellen und Monozyten nachgewiesen, neben einer effektiven Wiederherstellung der T-Zellen und B-Zellen innerhalb der erwarteten Zeitspanne. Die Ergebnisse der Immunrekonstitution konnten positiv durch die beobachtete Thymuserholung und die baldige Erholung naiver T-Zellen unterstrichen werden. Das TCR-Repertoire war zwar in Gruppe I von Anfang an breit gefächert und nach der T-Zell-Depletion zunächst eingeengt, zeigte sich aber nach 8 Monaten wiederhergestellt. Zusammenfassend konnten unsere Beobachtungen und Ergebnisse unter Betrachtung aller Faktoren zeigen, dass die Methode der CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+Depletion zu einer schnellen und effizienten Immunrekonstitution führt. Darüber hinaus wurden trotz des häufigeren HLA-Mismatch-Settings, der Anwendung von DLI und der kürzeren immunsuppressiven Therapie keine höheren GVHD-Raten beobachtet. Die Ergebnisse verdeutlichen somit, dass die Methode der CD3+TCR $\alpha\beta$ /CD19+Depletion im Vergleich zur unmanipulierten Knochenmarksspende eine vielversprechende Strategie sein könnte, die TRM zu senken.

6 Zukünftige Perspektiven

Trotz intensiver Forschung bleibt das Management der allogenen HSZT bei Kindern und Jugendlichen eine große Herausforderung, die weiterhin umfangreiche Forschung erfordert, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Aktuelle Untersuchungen konzentrieren sich insbesondere auf die Verabreichung modifizierter allogener und autologer T-Zellen sowie NK-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der HSZT. Diese werden mit RIC-Konditionierungsregimen und Immunsuppressiva im Verlauf der Posttransplantation kombiniert, um den GVL/GVT-Effekt zu verbessern, das Risiko einer GVHD insbesondere bei haploidenten Transplantationen zu minimieren und gleichzeitig die Immunrestitution zu optimieren. Frühere Ergebnisse der ex vivo Graftmanipulationen zeigten, dass die Zusammensetzung des Grafts entscheidend ist und die einzelnen Zellkomponenten sowohl antitumorale / antileukämische als auch antiinfektiöse Eigenschaften aufweisen. Der zentrale Aspekt der Forschung liegt insbesondere in der Identifikation der Funktionen der einzelnen Zellen und dem damit möglichen gezielten Einsatz der unterschiedlich modifizierten Zellen, im Wesentlichen auch aufgrund des breiten Einsatzes der HSZT. Mögliche Zelltherapieansätze sind der Einsatz von Regulatorischen Typ 1 T-Zellen (Tr1), die die Toleranz gegenüber des Empfängers verbessern, indem die Alloreaktivität vermindert wird, CAR-T-Zellen, die eine gezielte Therapie ermöglichen können, sowie CAR-T-regulatorische Zellen, die auf gezielte Alloantigen gerichtet sind und somit das therapeutische Potenzial der HSZT verbessern könnten. Ein weiterer Ansatz wäre die Anwendung von NK-Zellen der Spender*innen mit einem inhibitorischen mismatch KIR mit dem Ziel den GVL/GVT-Effekt zu verstärken. Nicht zu vernachlässigen ist auch die immer attraktiver werdende Möglichkeit der Genterapie mittels CRISPR/Cas9 und der individuell angepassten Immuntherapie. (28,33,36,81)

Literaturverzeichnis

1. Merz R. Stammzelltransplantation. *TumorDiagn u Ther.* Dezember 2019;40(10):650–2.
2. Saad A, de Lima M, Anand S, Bhatt VR, Bookout R, Chen G, u. a. Hematopoietic Cell Transplantation, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* Mai 2020;18(5):599–634.
3. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Herausgeber. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019 [zitiert 30. März 2023]. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-56468-4>
4. Barriga F, Ramírez P, Wietstruck A, Rojas N. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res.* 2012;45(3):307–16.
5. Hwang WYK, Ong SY. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation without a matched sibling donor: current options and future potential. *Ann Acad Med Singap.* April 2009;38(4):340–6.
6. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *IJMS.* 22. Februar 2018;19(2):621.
7. Turner D. ES07.02 The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sang.* Juni 2004;87(s1):87–90.
8. Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Herausgeber. *Transfusionsmedizin und Immnhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik.* 4., überarb. und erw. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer; 2010. 624 S.
9. Wiczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, u. a. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* [Internet]. 17. März 2017 [zitiert 15. April 2023];8. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00292/full>
10. Murphy KM, Weaver C, Janeway C. *Janeway Immunologie.* 9. Auflage. Berlin [Heidelberg]: Springer Spektrum; 2018. 1205 S. (Lehrbuch).
11. Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 1. Oktober 2008;42(S2):S71–6.
12. Fürst D, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Die immungenetische Spenderauswahl für die unverwandte Stammzelltransplantation. *Transfusionsmedizin.* 21. November 2014;4(04):197–207.
13. Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Ayala E, Aljurf M, Nishihori T, Marsh R, u. a. Standardizing Definitions of Hematopoietic Recovery, Graft Rejection, Graft Failure, Poor Graft Function, and Donor Chimerism in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Report on Behalf of the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Transplantation and Cellular Therapy.* August 2021;27(8):642–9.
14. Gulbas Z. Haploidentical stem cell transplantation-bone marrow vs peripheral blood. *Transfusion and Apheresis Science.* April 2018;57(2):168–70.
15. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfusion and Apheresis Science.* Dezember 2014;51(3):68–82.
16. Nagler A, Shimoni A. Conditioning. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, Herausgeber. *The EBMT Handbook* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [zitiert 13. September 2023]. S. 99–107. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5_13
17. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and

- expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 13. Mai 2010;115(19):3861–8.
18. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. April 2004;36(4):607–20.
 19. Xu ZL, Huang XJ. Optimizing Allogeneic Grafts in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cells Translational Medicine*. 1. November 2021;10(S2):S41–7.
 20. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. September 2013;4(3):71.
 21. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 17. Juli 2014;124(3):344–53.
 22. Resnick IB, Shapira MY, Slavin S. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases. *Transplant Immunology*. August 2005;14(3–4):207–19.
 23. Sharma SK, Choudhary D, Doval D, Khandelwal V, Patel A, Setia R, u. a. Myeloablative Versus Reduced Intensity Conditioning Regimens for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome: A Retrospective Analysis. *Indian J Hematol Blood Transfus*. Juli 2021;37(3):472–8.
 24. Zhou Y, Zhang L, Meng Y, Lei X, Jia L, Guan X, u. a. Differential analysis of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with Wiskott-Aldrich syndrome and chronic granulomatous disease. *Front Immunol*. 14. Juni 2023;14:1202772.
 25. Gjærde LK, Brooks PT, Andersen NS, Friis LS, Kornblit B, Petersen SL, u. a. Functional immune reconstitution early after allogeneic haematopoietic cell transplantation: A comparison of pre- and post-transplantation cytokine responses in stimulated whole blood. *Scand J Immunol*. Juli 2021;94(1):e13042.
 26. Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant*. Oktober 2009;44(8):457–62.
 27. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. *Expert Opinion on Biological Therapy*. Mai 2008;8(5):583–97.
 28. Ibikunle S, Grosso D, Gergis U. The two-step approach to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 1. September 2023;14:1237782.
 29. Talmadge JE. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *International Immunopharmacology*. August 2003;3(8):1121–43.
 30. Sperl D, Lang P, Benesch M, Bainschab A, Urban C, Wilfing R, u. a. Immunological recovery following HLA-matched CD3+ TCR $\alpha\beta$ + / CD19+ depleted hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatric Transplantation [Internet]*. August 2022 [zitiert 20. Juni 2023];26(5). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ptr.14285>
 31. Oevermann L, Lang P, Feuchtinger T, Schumm M, Teltschik H, Schlegel P, u. a. Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. August 2012;1266(1):161–70.
 32. Gaziev J, Isgrò A, Sodani P, Paciaroni K, De Angelis G, Marziali M, u. a. Haploidentical HSCT for hemoglobinopathies: improved outcomes with TCR $\alpha\beta$ + / CD19+ depleted grafts. *Blood Advances*. 13. Februar 2018;2(3):263–70.
 33. Pegram HJ, Ritchie DS, Smyth MJ, Wiernik A, Prince HM, Darcy PK, u. a.

- Alloreactive natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia Research*. Januar 2011;35(1):14–21.
34. Mushtaq MU, Shahzad M, Shah AY, Chaudhary SG, Zafar MU, Anwar I, u. a. Impact of natural killer cells on outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 3. Oktober 2022;13:1005031.
35. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, u. a. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*. 7. Januar 2011;331(6013):44–9.
36. Zhao F, Shi Y, Chen X, Zhang R, Pang A, Zhai W, u. a. Higher Dose of CD34+ cells Promotes Early Reconstitution of Natural Killer Cells and Is Associated with Better Outcomes After Unmanipulated Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Myeloid Malignancies. *Transplantation and Cellular Therapy*. September 2022;28(9):589.e1-589.e10.
37. Kumar S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*. Juli 2018;154(3):383–93.
38. Raulet DH. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Seminars in Immunology*. Juni 2006;18(3):145–50.
39. Ye W, Kong X, Zhang W, Weng Z, Wu X. The Roles of $\gamma\delta$ T Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cell Transplant*. 1. Januar 2020;29:096368972096698.
40. Balashov D, Shcherbina A, Maschan M, Trakhtman P, Skvortsova Y, Shelikhova L, u. a. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCR $\alpha\beta$ and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. November 2015;21(11):1955–62.
41. Kamradt T, Ferrari-Kühne K. Das adaptive Immunsystem. *Dtsch med Wochenschr*. August 2011;136(33):1678–83.
42. Brezski RJ, Monroe JG. B-Cell Receptor. In: Sigalov AB, Herausgeber. *Multichain Immune Recognition Receptor Signaling* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2008 [zitiert 5. April 2023]. S. 12–21. (Advances in Experimental Medicine and Biology; Bd. 640). Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-09789-3_2
43. Van Der Maas NG, Berghuis D, Van Der Burg M, Lankester AC. B Cell Reconstitution and Influencing Factors After Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children. *Front Immunol*. 12. April 2019;10:782.
44. Van Der Maas NG, Von Asmuth EGJ, Berghuis D, Van Schouwenburg PA, Putter H, Van Der Burg M, u. a. Modeling Influencing Factors in B-Cell Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children. *Front Immunol*. 7. Mai 2021;12:684147.
45. Zvyagin IV, Mamedov IZ, Tatarinova OV, Komech EA, Kurnikova EE, Boyakova EV, u. a. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia*. Mai 2017;31(5):1145–53.
46. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. Juni 2012;12(6):443–58.
47. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. Juni 2008;21(2):101–17.
48. Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang XN, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol* [Internet]. 20. März 2017 [zitiert 27. Februar 2024];8. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00079/full>

49. Zhang P, Chen BJ, Chao NJ. Prevention of GVHD without losing GVL effect: windows of opportunity. *Immunol Res.* April 2011;49(1–3):49–55.
50. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Infection and Chemotherapy.* August 2016;22(8):505–14.
51. Choi ES, Im HJ, Kim H, Koh KN, Jang S, Park C, u. a. Depletion of $\alpha\beta^+$ T cells for a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children. *J of Clinical Apheresis.* August 2018;33(4):521–8.
52. Lang P, Klingebiel T, Bader P, Greil J, Schumm M, Schlegel PG, u. a. Transplantation of highly purified peripheral-blood CD34+ progenitor cells from related and unrelated donors in children with nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 1. Januar 2004;33(1):25–32.
53. Locatelli F, Merli P, Pagliara D, Li Pira G, Falco M, Pende D, u. a. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after $\alpha\beta$ T-cell and B-cell depletion. *Blood.* 3. August 2017;130(5):677–85.
54. Sahasrabudhe K, Otto M, Hematti P, Kenkre V. TCR $\alpha\beta$ /CD19+ cell depletion in haploidentical hematopoietic allogeneic stem cell transplantation: a review of current data. *Leukemia & Lymphoma.* 23. Februar 2019;60(3):598–609.
55. Lang P, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schwinger W, Schlegel P, Pfeiffer M, u. a. Improved immune recovery after transplantation of TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* Juni 2015;50(S2):S6–10.
56. Lang P, Pfeiffer M, Teltschik HM, Schlegel P, Feuchtinger T, Ebinger M, u. a. Natural killer cell activity influences outcome after T cell depleted stem cell transplantation from matched unrelated and haploidentical donors. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* September 2011;24(3):403–11.
57. Muccio L, Bertaina A, Falco M, Pende D, Meazza R, Lopez-Botet M, u. a. Analysis of memory-like natural killer cells in human cytomegalovirus-infected children undergoing +T and B cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Haematologica.* 1. März 2016;101(3):371–81.
58. Schumm M, Handgretinger R, Pfeiffer M, Feuchtinger T, Kuci S, Faul C, u. a. Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations. *Cytotherapy.* 2006;8(5):465–72.
59. Bonneville M, O’Brien RL, Born WK. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* Juli 2010;10(7):467–78.
60. Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy.* Juli 2009;1(4):663–78.
61. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Pierini A, Falzetti F, Carotti A, u. a. “Designed” grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Blood.* 13. Februar 2014;123(7):967–73.
62. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, u. a. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood.* 31. Juli 2014;124(5):822–6.
63. Harada K. Pre-emptive and prophylactic donor lymphocyte infusion following allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* August 2023;118(2):158–68.
64. Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, u. a. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 1. November 2009;94(11):1613–7.

65. Abraham A, Hsieh M, Eapen M, Fitzhugh C, Carreras J, Keesler D, u. a. Relationship between Mixed Donor–Recipient Chimerism and Disease Recurrence after Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Dezember 2017;23(12):2178–83.
66. McCurdy SR, Radojeic V, Tsai HL, Vulic A, Thompson E, Ivcevic S, u. a. Signatures of GVHD and relapse after posttransplant cyclophosphamide revealed by immune profiling and machine learning. *Blood*. 27. Januar 2022;139(4):608–23.
67. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation: Current Opinion in Hematology. *Journal of Hematology*. Juli 2012;19(4):324–35.
68. Gaballa A, Sundin M, Stikvoort A, Abumaree M, Uzunel M, Sairafi D, u. a. T Cell Receptor Excision Circle (TREC) Monitoring after Allogeneic Stem Cell Transplantation; a Predictive Marker for Complications and Clinical Outcome. *IJMS*. 11. Oktober 2016;17(10):1705.
69. Mensen A, Ochs C, Stroux A, Wittenbecher F, Szyska M, Imberti L, u. a. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Transl Med*. Dezember 2013;11(1):188.
70. Mikhael NL, Elsorady M. Clinical significance of T cell receptor excision circle (TREC) quantitation after allogeneic HSCT. *Blood Res*. 31. Dezember 2019;54(4):274–81.
71. Zamani F, Mirfakhraie R, Safaee Nodehi SR, Mollaei-Kandelous Y, Jafari H, Farahmand M, u. a. The T Cell Receptor Repertoire Diversity Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *IJAAI* [Internet]. 30. Oktober 2022 [zitiert 5. März 2024]; Verfügbar unter: <https://publish.kne-publishing.com/index.php/IJAAI/article/view/11045>
72. Reich-Slotky R, Al-Mulla N, Hafez R, Segovia-Gomez J, Goel R, Mayer S, u. a. Poor graft function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia & Lymphoma*. 14. Oktober 2020;61(12):2894–9.
73. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, u. a. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 17. November 2016 [zitiert 4. März 2024];7. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00507/full>
74. Castagna L, Sarina B, Bramanti S, Perseghin P, Mariotti J, Morabito L. Donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation. *Transfusion and Apheresis Science*. Juni 2016;54(3):345–55.
75. for the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, u. a. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant*. Oktober 2019;54(10):1525–52.
76. Wang Y, Xu L, Yan C, Huang X. Modification of donor lymphocyte infusion: how to improve the outcome? *Sci China Life Sci*. September 2019;62(9):1253–6.
77. Tsoumakas K, Giamaiou K, Goussetis E, Graphakos S, Kossyvakis A, Horefti E, u. a. Epidemiology of viral infections among children undergoing hematopoietic stem cell transplant: A prospective single-center study. *Transplant Infectious Dis*. August 2019;21(4):e13095.
78. Slade M, Goldsmith S, Romee R, DiPersio JF, Dubberke ER, Westervelt P, u. a. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transplant Infectious Dis*. Februar 2017;19(1):e12629.
79. Jiménez-Hernández E, Núñez-Enriquez JC, Arellano-Galindo J, De Los Angeles Del Campo-Martínez M, Reynoso-Arenas PV, Reyes-López A, u. a. Infections and risk factors for infection-related mortality after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Mexico: A single center retrospective study. *Amanati A*, Herausgeber.

PLoS ONE. 29. September 2023;18(9):e0284628.

80. for the Infectious Diseases Working Party EBMT, Styczyński J, Tridello G, Koster L, Iacobelli S, Van Biezen A, u. a. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplant.* Januar 2020;55(1):126–36.

81. Bertaina A, Roncarolo MG. Graft Engineering and Adoptive Immunotherapy: New Approaches to Promote Immune Tolerance After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 10. Juli 2019;10:1342.