

Aus dem KRH Klinikum Siloah  
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie  
Stammzelltransplantation  
Zertifiziertes Onkologisches Zentrum

**Frühe Rekonstitution zirkulierender Antikörper-  
sezernierender Zellen nach haploidenter  
Stammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Hinterleitner, geb. Steurer, Martina**

**2020**

Dekan (komm.):

Professor Dr. D. Wallwiener

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. Dr. M. R. Müller

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Holzer

Tag der Disputation: 08.04.2020



Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

M.Steurer, E. Malenke, B. Federmann, L. Kanz, W. Bethge and S. Wirths.  
*Rapid Reconstitution of Human Antibody Secreting Cells After Haploidentical  
Allogeneic Stem Cell Transplantation.* (Blood 2009 114:3682. Abstract, ASH  
2009)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hämatopoese und Immunsystem .....	1
1.1.1. Das Blut.....	1
1.1.2. Die Hämatopoese.....	2
1.1.3. Die Leukozyten und Leukopoese .....	9
1.1.4. Das Immunsystem.....	14
1.1.4.1. Systematik des Immunsystems .....	14
1.1.4.2. Die angeborene, unspezifische Immunantwort .....	15
1.1.4.3. Die erworbene, adaptive Immunantwort .....	20
1.2. Akute myeloische Leukämie (AML) .....	33
1.2.1. Begriffsdefinition Leukämie und Einteilung der Leukämien .....	33
1.2.2. Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese und Symptomatik der akuten myeloischen Leukämie .....	35
1.2.3. Diagnostik und Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie .....	40
1.2.4. Therapiemöglichkeiten der akuten myeloischen Leukämie .....	48
1.3. Multiples Myelom .....	54
1.3.1. Begriffsdefinition.....	54
1.3.2. Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese und Symptomatik des Multiplen Myeloms.....	54
1.3.3. Diagnostik, Klassifikation und Stadieneinteilung des multiplen Myeloms .....	57
1.3.4. Therapiemöglichkeiten des Multiplen Myeloms .....	65

---

1.4. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	72
1.4.1. Definition und Entwicklung .....	72
1.4.2. Indikationen zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation und Epidemiologie .....	74
1.4.3. Therapeutisches Konzept und Ablauf der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation .....	75
1.4.4. Prinzipien der haploidenten Stammzelltransplantation .....	79
1.4.5. Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation .....	83
<b>2. Zentrale Fragestellung .....</b>	<b>89</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>90</b>
3.1. Material .....	90
3.1.1. Geräte .....	90
3.1.2. Verbrauchsmaterial .....	91
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien .....	92
3.1.4. Kits und Assays .....	92
3.1.5. Puffer .....	93
3.1.6. Antikörper .....	94
3.1.7. Software .....	95
3.2. Methoden .....	95
3.2.1. Studiendesign und Patientencharakteristika .....	95
3.2.2. Isolation von mononukleären Zellen (PBMC) aus Patientenproben .....	107
3.2.3. Nachweis Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISpot-Assay .....	108
3.2.4. Nachweis von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und löslichen Antikörpern mittels Luminex Multiplex Assay .....	110
3.2.5. Nachweis von BAFF mittels BAFF-ELISA .....	112
3.2.6. Durchflusszytometrische Analysen (FACS) .....	113

---

3.2.6.1. Grundlagen der fluoreszenzmarkierten Durchflusszytometrie .....	113
3.2.6.2. Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie .....	114
3.2.6.3. Behandlungsprotokoll der Oberflächenmarkerbestimmung .....	114
3.2.7. Statistische Analysen .....	115
3.2.8. Software .....	116
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>117</b>
4.1. Regeneration der Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation.....	117
4.2. Detektion von IgA-, IgG- und IgM-sezernierenden Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation .....	128
4.3. Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation .....	141
4.4. Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation .....	151
4.5. Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellregeneration.....	160
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>174</b>
5.1. Die Auswahl der Patienten.....	174
5.2. Das Modell der haploidenten Stammzelltransplantation .....	175
5.3. Die Regeneration der Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation.....	179
5.4. Detektion von IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation .....	184
5.5. Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation .....	187
5.6. Zytokinexpression nach haploidenter Stammzelltransplantation .....	190
5.7. Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellregeneration.....	193
5.8. Nachweis der Spender-Spezifität der gefundenen Zellpopulation .....	198
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>200</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>202</b>

**8. Abbildungsverzeichnis .....234**

**9. Tabellenverzeichnis .....239**



## Abkürzungsverzeichnis

A	Doxorubicin
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Ag	Antigen
AGIF	<i>adipogenesis inhibitory factor</i> = IL-11 = Oprelvekin
AL	Amyloid, bestehend aus Leichtketten
ALL	akute lymphatische Leukämie
allo Tx	allogene Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AML-1	<i>acute myeloid leukemia</i> 1-Protein = Runt- <i>related</i> Transkriptionsfaktor 1 = RUNX-1 = <i>core-binding factor subunit</i> alpha-2 = CBFA2
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle, engl. <i>antigen presenting cell</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i> = CD256-Antigen
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> , akutes Atemnotsyndrom, akutes (progressives) Lungenversagen
ATG	Antithymozytenglobulin
ATRA	All-Trans-Retinolsäure
auto-allo Tx	autologe und nachfolgend allogene Stammzelltransplantation
auto Tx	autologe Stammzelltransplantation
BAFF	<i>B cell activating factor</i> = TNFSF13B = <i>tumor necrosis factor superfamily member</i> 13B = BLyS = <i>B lymphocyte stimulator</i> = TALL-1 = zTNF4 = CD257-Antigen

---

BAFF-R	BAFF-Rezeptor
BCL2	antiapoptotisches B-Zell-Lymphom-2-Protein
BCMA	<i>B-cell maturation</i> Antigen
BET	<i>Bromodomain and extraterminal domain family</i>
BFU	<i>burst-forming unit</i>
BK-Virus	Humanes Polyomavirus 1, BK-Polyomavirus
B-Lymphozyt	= B-Zelle, Knochenmark-Lymphozyt (englisch <i>bone-marrow</i> )
BLyS	<i>B lymphocyte stimulator</i>
Bo	Bortezomib
BPDCN	<i>Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm</i>
BRD4	Bromodomänen Protein 4
BSA	Bovines Serumalbumin
BSC	<i>best supportive care</i> , bestmögliche unterstützende Behandlungsmaßnahmen
BWK	Brustwirbelkörper
bzw.	beziehungsweise
C	Cyclophosphamid
ca.	circa
CBFA2	<i>core-binding factor subunit alpha-2</i> = <i>acute myeloid leukemia</i> 1-Protein = AML-1 = Runt-related Transkriptionsfaktor 1 = RUNX-1
CBF- $\beta$	<i>core-binding-factor-<math>\beta</math></i>
CC	kompletter Donorchimärismus, <i>complete chimerism</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD33	Siglec-3 = <i>sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin</i>

---

CD95L	CD95-Ligand
CFU	<i>colony-forming unit</i>
CFU-GEMM	<i>colony-forming unit</i> für Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
CRAB	Akronym aus Hyperkalzämie (englisch <i>hypercalcemia</i> ), Niereninsuffizienz (englisch <i>renal insufficiency</i> ), Anämie (englisch <i>anemia</i> ) und ossäre Manifestationen (englisch <i>bone lesions</i> )
CRM1	<i>chromosome region maintenance 13</i>
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
D	hochdosiertes Dexamethason
d	niedrigdosiertes Dexamethason
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
D-Gene	<i>diversity</i> -Gene
DKMS	Deutsche Knochenmarkspenderdatei
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i> , Donorlymphozyteninfusion, Spenderlymphozyteninfusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantationen

---

DSIL	Deutsche Studieninitiative Leukämie
E	Erythrozyten
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELISpot Assay	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>
Epo	Erythropoetin
et al.	<i>et alii, et aliae</i> oder <i>et alia</i>
FAB	<i>French-American-British-Group</i>
FACS	Durchflusszytometrie, <i>fluorescence-activated cell sorting</i> oder <i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FDG-PET	Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLT3	<i>Fms-like-tyrosine-kinase 3</i> = CD135 = <i>fetal liver kinase-2</i> = Flk2
FLT3-Ligand	<i>Fms-like-tyrosine-kinase 3-Ligand</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Granulozyten
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GnRH	Gonadotropin- <i>Releasing</i> -Hormon
Go	Gemtuzumab Ozogamicin, Handelsname Mylotarg®, Immunkonjugat aus einem monoklonalen gegen CD33-

---

	gerichteten Antikörper verbunden mit einem bakteriellen Toxin
Go-AHAM	Kombinationstherapie aus All-Trans-Retinoinsäure, Cytarabin, Mitoxantron, Gemtuzumab Ozogamicin
Go-HAM	Kombinationstherapie aus Cytarabin, Mitoxantron, Gemtuzumab Ozogamicin
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
GvL-Effekt	<i>Graft-versus-Leukämie-Effekt</i>
GvM-Effekt	<i>Graft-versus-Malignoma-Effekt</i>
HD	Hochdosistherapie
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
H <sub>2</sub> O	Summenformel für Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Summenformel für Wasserstoffperoxid
HWK	Halswirbelkörper
iclg	intrazelluläres Immunglobulin
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IEV	Kombinationstherapie aus Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
Inc.	<i>incorporated</i> , eingetragene Gesellschaft
ISS	<i>International Staging System</i>

---

IVIG	intravenöse Immunglobuline
JAK2	Janus-Kinase 2
JC-Virus	Humanes Polyomavirus 2, JC-Polyomavirus, John-Cunningham-Virus
J-Gene	<i>junction</i> -Gene
kDa	Kilodalton, Einheit für die atomare Masse
kg	Kilogramm
KGF	Keratinocytenwachstumsfaktor engl. <i>Keratinocyte growth factor</i>
Ki-67	Antigen auf der Oberfläche menschlicher Zellen, das zur Markierung sich teilender Zellen verwendet wird.
L	Lenalidomid
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killer-Zellen
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Melphalan
MBP	<i>major basic protein</i>
MCAF	<i>monocyte chemotactic and activating protein</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mega	Megakaryozyten
mg	Milligramm
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MIP-1b	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
MM	Multiples Myelom

---

M(o)	Monozyten
M(o)-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor = CSF-1
MonoMAC-Syndrom	Syndrom mit Monozytopenie, Lymphopenie (B-Zellen und NK-Zellen), sowie Infektionen durch Mykobakterien, Pilze und Viren
MPAL	<i>mixed phenotype acute leukemia</i>
MPO	Myeloperoxidase
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> , Magnetresonanztomographie, MRT
MRT	Magnetresonanztomographie
n.d.	nicht detektierbar
NETosis	<i>Nox-independent neutrophil extracellular trap (NET) formation</i>
NH <sub>4</sub>	Ammoniumion
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nM	Nanometer
NOS	<i>not otherwise specified</i>
NSE	<i>non-specific Esterase</i>
OKT-3	Muromonab-CD3, muriner therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen den CD3-Rezeptor auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
P	Prednisolon
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung

---

PBSC	<i>peripheral blood stem cells</i> , periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Procalcitonin
PD	<i>progressive disease</i> , progrediente Erkrankung
PDGFR	<i>Platelet-derived-growth-factor</i> -Rezeptor
PFS	<i>progression free survival</i> , Progressions-freies Überleben
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PML	Promyelozytenleukämie
POX	Peroxidase
PR	partielle Remission
PRR	<i>Pattern-Recognition</i> Rezeptor
PRT	<i>Post-Remission-Treatment</i>
R	Rezeptor
RAC	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
Rh	Rhesusfaktor
RHO	<i>Ras homologue</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute, Maßeinheit für die Drehzahl
RPMI	Zellkulturmedium, das am <b>Roswell Park Memorial Institute</b> entwickelt wurde.
RUNX-1	<i>Runt-related</i> Transkriptionsfaktor 1 = <i>acute myeloid leukemia</i> 1-Protein = AML-1 = <i>core-binding factor subunit</i> alpha-2 = CBFA2



---

RVCD	Kombinationstherapie aus Lenalidomid, Bortezomib, Dexamethason, Cyclophosphamid
SCF	Stammzellefaktor = c-kit-Ligand
sCR	stringente komplette Remission
SD	<i>stable disease</i> , stabile Erkrankung
SEM	<i>standard area of the mean</i>
SLAMF7	<i>Signalling Lymphocyte Activation Molecule Family Member 7</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SSC	<i>Side Scatter</i>
T	Thalidomid
TAC1	<i>transmembran activator and calcium-Modulator and cyclophilin-ligand activator</i>
TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia Protein 1</i>
TAM	transiente abnormale Myelopoese
TBI	<i>total body irradiation</i> , Ganzkörperbestrahlung
TH2-Zellen	T-Helfer-2-Zellen
TLR	Toll- <i>like</i> -Rezeptor
T-Lymphozyt	= T-Zelle, = Thymus-Lymphozyt
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFSF13B	<i>tumor necrosis factor superfamily member 13B</i>
Tpo	Thrombopoetin
TRECs	<i>T-cell receptor rearrangement excision DNA circles</i>
u.a.	und andere
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von America

---

v.Chr.	vor Christus
VEGFR	<i>Vascular-endothelial-growth-factor-Rezeptor</i>
V-Gene	variable Gene
VGPR	<i>very good partial remission</i> , sehr gute partielle Remission
VOD	<i>hepatic veno-occlusive disease</i> , venöse okklusive Leberkrankheit
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WW	<i>watch-and-wait</i> , abwartendes Verhalten
ZNS	zentrales Nervensystem
°	Grad
%	Prozent
+	positiv
-	negativ
®	<i>Registered Trade Mark</i> , eingetragene Handelsmarke

# 1. Einleitung

Die hier vorgelegte Promotionsarbeit beschäftigt sich mit der frühen Rekonstitution Antikörper-produzierender Zellen nach haploidenter allogener Stammzelltransplantation im Menschen. Vor diesem Hintergrund versteht sich das Kapitel „Einleitung“ dahingehend, dass die für die Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellung aktuellen Forschungsergebnisse mit ihren Implikationen für die leitliniengerechten Therapien ausführlich zur Darstellung kommen. Dadurch wird die erforderliche Basis zur Interpretation und Diskussion der experimentellen Befunde gelegt.

## 1.1. Hämatopoese und Immunsystem

### 1.1.1. Das Blut

Das Blut ist ein Organ, welches aus zellulären und nichtzellulären Bestandteilen zusammengesetzt ist [1]. Die Aufteilung des Bluts in zwei Komponenten ist seit der Antike bekannt. Polibos, ein Schwiegersohn von Hippokrates, beobachtete 500 v. Chr., dass sich Blut in zwei Komponenten auftrennt, wenn man es nach der Abnahme in einem Gefäß stehen lässt [1]. Der zelluläre Bestandteil des Bluts enthält Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten; der nichtzelluläre Anteil wird Plasma genannt und enthält Wasser, Proteine und kleinmolekulare Stoffe [2].

Die Funktionen des Bluts umfassen eine Transportfunktion für beispielsweise Atemgase, Nährstoffe, Abbaumetabolite, Hormone und Wärme; des Weiteren eine Milieufunktion, die für eine Homöostase gelöster Stoffe, des pH-Werts und der Temperatur im Blut und gesamten Organismus sorgt; ferner die Funktion zur Blutstillung im Rahmen der primären und sekundären Hämostase. Als weitere Funktion kann die Abwehrfunktion genannt werden, bei welcher Proteine und zelluläre Bestandteile Fremdkörper und Krankheitserreger bekämpfen [2].

### 1.1.2. Die Hämatopoese

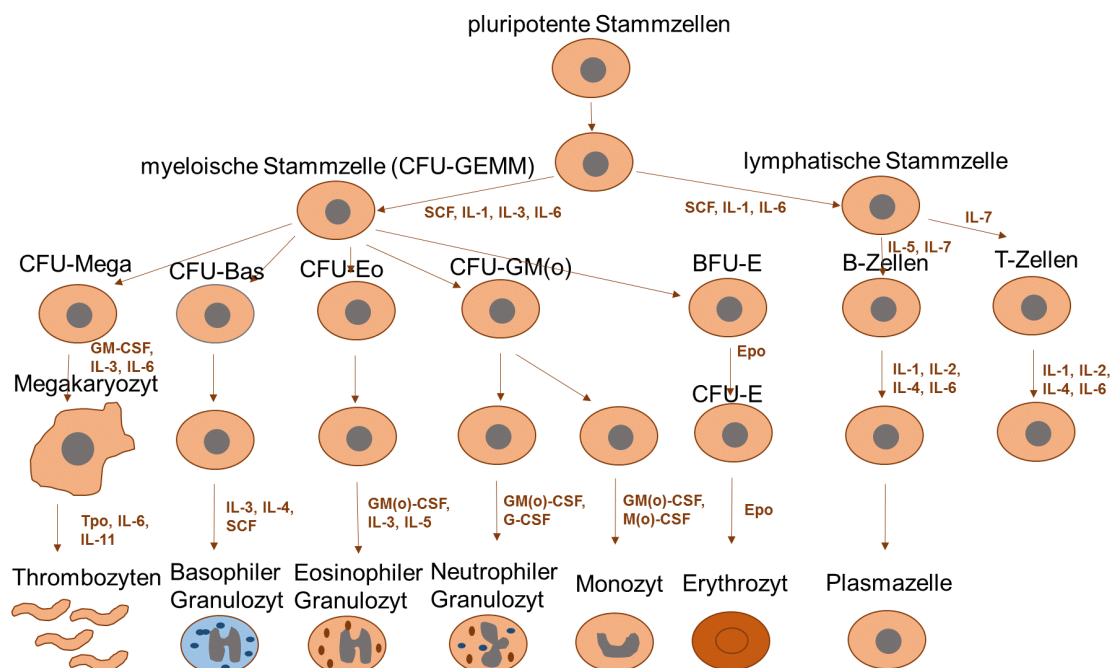
Als Hämatopoese wird die Entstehung der Zellen des Bluts aus blutzellbildenden (= hämatopoetischen) Stammzellen bezeichnet [3,4]. Das Wort Hämatopoese stammt aus dem Altgriechischen und leitet sich aus dem Wort αἷμα (= haima = Blut) und ποίησις (= poiein = machen) ab [2]. Da die Blutzellen eine limitierte Lebensdauer haben, welche von wenigen Stunden bei neutrophilen Granulozyten bis zu mehreren Jahren bei lymphozytären Gedächtniszellen variieren kann, müssen diese regelmäßig erneuert werden [2]. Die Blutzellen entwickeln sich dabei aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, welche sich einerseits selbst erneuern und andererseits zu differenzierten Blutzellen ausreifen [2,5].

Hämatopoetische Stammzellen besitzen einen gemeinsamen Immunphänotyp (CD34+, CD133+) [1]. Sie besitzen eine enorme Plastizität, was bedeutet, dass sich aus ihnen nicht nur alle Blutzellen entwickeln können, sondern auch nichthämatopoetische Zelllinien [6-9]. Beispielweise konnte gezeigt werden, dass adulte hämatopoetische Stammzellen, welche in ein Myokardinfarktmodell überführt wurden, zu Myozyten und verschiedenen Gefäßzellen differenzieren können [10]. Diskutiert wird auch, dass hämatopoetische Stammzellen zirkulieren können und sich auch längerfristig außerhalb des Knochenmarks aufhalten können [1,8].

Auf dem Weg der Ausreifung der Blutzellen gehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zwei verschiedene Zellreihen hervor: myeloische und lymphatische Progenitorzellen [1]. Stammzellen und Progenitorzellen gehören zu den unreifen Zellen des Knochenmarks [1]. Progenitorzellen werden auch koloniebildende Einheiten (*colony-forming units* = CFU) genannt, da sie darüber definiert sind, welche reifen Zellen aus ihnen entstehen können [1]. Eine Sonderform stellen hier die erythropoetischen Progenitorzellen dar, die aufgrund ihrer speziellen Morphologie auch *burst-forming units* (= BFU) genannt werden [1,2]. Progenitorzellen entwickeln sich weiter zu Vorläuferzellen, welche bereits lichtmikroskopisch einer Zellreihe zugeordnet werden können [1,2]. Aus den myeloischen Progenitorzellen entwickeln sich

über weitere Zwischenschritte Thrombozyten, basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten; aus den lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich B-Zellen und T-Zellen [2]. Eine schematische Übersicht über die Hämatopoese ist in Abbildung 1 dargestellt.

Das Knochenmark, in welchem die adulte Hämatopoese überwiegend abläuft, kann schnell und zweckmäßig auf die Anforderungen im peripheren Blut eingehen, um einerseits einen physiologischen Zustand zu erhalten und andererseits auf besondere Situationen wie Infektionen, Blutungen oder Stress zu reagieren [1,11]. Um diese schnellen Anpassungsmechanismen gewährleisten zu können, findet ein stetiger Austausch zwischen pluripotenten Stammzellen, verschiedenen Stromazellen und weiteren Zellen des Mikromilieus des Knochenmarks, wie beispielsweise Endothelzellen, statt [1,11].



**Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Hämatopoese (modifiziert nach 1-3).**

Die Größenverhältnisse der einzelnen Zellen sind dem Layout angepasst und entsprechen nicht den physiologischen Verhältnissen. Abkürzungen: BFU = *burst-forming unit*, CFU = *colony-forming unit*, CFU-GEMM = *colony-forming unit* für Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, CSF = Kolonie-stimulierender Faktor, E = Erythrozyten, Epo = Erythropoetin, G = Granulozyten, IL = Interleukin, M(o) = Monozyten, Mega = Megakaryozyten, SCF = Stammzellfaktor = c-kit-Ligand, Tpo = Thrombopoetin.

Diese wechselseitigen Interaktionen werden durch extrazelluläre und intrazelluläre Mechanismen vermittelt [12,13]. Extrazelluläre Mechanismen enthalten Zytokine und hämatopoetische Wachstumsfaktoren, intrazelluläre Mechanismen enthalten Signaltransduktionsmoleküle und nukleäre Transkriptionsfaktoren. Stromazellen produzieren unter anderem membrangebundene und sezernierte Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche für die Regulation von Proliferation und Differenzierung innerhalb der Hämatopoese und für das Überleben von Stamm- und Progenitorzellen verantwortlich sind [12,13]. In der extrazellulären Matrix des Knochenmarks können hämatopoetische Zytokine gebunden und gespeichert werden. Dieses Modell der Hämatopoese, bei welchem das Mikromilieu des Knochenmarks die Wahrscheinlichkeit der Differenzierungswege der Stammzellen und Progenitorzellen nach den Anforderungen des peripheren Bluts beeinflusst, wird Induktionsmodell genannt [1]. Dem entgegen steht das stochastische Modell der Hämatopoese, welches postuliert, dass die Selbsterneuerung und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zufällig erfolgt, wobei die Wahrscheinlichkeiten der Differenzierung oder das Ausmaß der Proliferation änderbar sein müssen, um eine Bedarfsanpassung zu erreichen [1]. Vermutet wird, dass die Hämatopoese sowohl durch eine genetisch bedingte stochastische Differenzierung, als auch durch eine Einwirkung auf die Wahrscheinlichkeiten der Differenzierung durch Stromazellen und deren Zytokine im Sinne des induktiven Modells gesteuert wird [14-16].

Zytokine, welche in diesem Modell eine essentielle Rolle zu spielen scheinen, können generell in verschiedene thematische Untergruppen eingeteilt werden: Interleukine, Interferone, Immunglobulinfamilie, TNF-Familie und Chemokine. Eine weitere Art der Einteilung berücksichtigt den Zeitpunkt, zu welchem ein Zytokin oder Wachstumsfaktor in die Hämatopoese eingreift. So werden frühe Zytokine und Wachstumsfaktoren unterschieden, die auf Stammzellen und Progenitorzellen wirken, und späte Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche auf reifere Vorläuferzellen und reife Zellen wirken [1]. In der folgenden Tabelle sind einige Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie deren Zielstrukturen aufgeführt.

**Tabelle 1: Übersicht über ausgewählte, an der Hämatopoese beteiligte Wachstumsfaktoren und Zytokine (adaptiert nach 1,2,5,12-16).**

Aufgeführt sind die Bezeichnung der Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren chromosomale Genlokalisierung, die produzierenden Zellen, deren Rezeptoren und Zielzellen. Abkürzungen: IL = Interleukin, R = Rezeptor, LAK-Zellen = Lymphokin-aktivierte Killer-Zellen, NK-Zellen = natürliche Killer-Zellen, TH2-Zellen = T-Helfer-2-Zellen, AGIF = *adipogenesis inhibitory factor* = IL-11 = Oprelvekin, Epo = Erythropoetin, Tpo = Thrombopoetin, SCF = Stammzellfaktor = c-kit-Ligand, GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, G-CSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, M(o)-CSF = Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor = CSF-1, FLT3-Ligand = *Fms-like-tyrosine-kinase 3-Ligand*, FLT-3 = *Fms-like-tyrosine-kinase 3* = CD135 = *fetal liver kinase-2* = Flk2.

Bezeichnung	Chromosomale Lokalisation	Herkunft	Rezeptor(en)	Zielstruktur/Funktion
IL-1 ( $\alpha,\beta$ )	2q13	Lymphozyten, Keratinozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Fibroblasten	IL-1R = CDW121a	Wachstumsfaktor in der frühen Hämatopoese, Kofaktor für B- und T-Zellen, Aktivierung von Makrophagen und Osteoklasten, Proliferation von Fibroblasten und Astrozyten, erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Epithel- und Endothelzellen
IL-2	4q26	Aktivierte T-Zellen (CD4+), neoplastische Zellen	IL-2R $\alpha$ = CD25, IL-2R $\beta$ = CD122, IL-2R $\gamma$	Proliferation von B- und T-Zellen, Modulation von LAK- und NK-Zellen, Lymphozyten
IL-3	5q23-31	Aktivierte T-Zellen, NK-Zellen, Keratinozyten, Monozyten, Mastzellen, Endothelzellen	IL-3R2 = CD123, IL-3R $\beta$	Proliferation von Mastzellen, Knochenmarkstromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen
IL-4	5q23-31	TH2-Zellen, Mastzellen	IL-4R $\alpha$ = CD124, IL-4R $\gamma$	Aktivierung und Proliferation von TH2-Zellen, Suppression von Interferon- $\gamma$ , Aktivierung und Proliferation von B-Zellen (Immunglobulin-Switch), Proliferation von Fibroblasten, Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, Leukozytenadhäsion an Endothelzellen, Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen

Bezeichnung	Chromosomale Lokalisation	Herkunft	Rezeptor(en)	Zielstruktur/Funktion
IL-5	5q23-31	Aktivierte T-Zellen	IL-5R $\alpha$ = CD125, IL-5R $\beta$	Wachstum, Differenzierung und Chemoattraktion von eosinophilen Granulozyten
IL-6	7q21	Stimulierte Monozyten, Makrophagen u.a.	IL-6R $\alpha$ = CD126, IL-6R $\beta$ = CDW130	Akute-Phase-Reaktion von Hepatozyten, Induktion von Glukokortikoiden, u.a.
IL-7	8q12	Adhärente Stromazellen des Knochenmarks und des Thymus, Keratinozyten	IL-7R $\alpha$ = CDW127, IL-7R $\gamma$	Wachstum von Prä-B- und Pro-B-Zellen, Thymozyten, reifen T-Zellen, NK-Zellen und LAK-Zellen, Induktion von IL-1, IL-6, Ausreifung von Megakaryozyten
IL-11 = <i>adipogenesis inhibitory factor</i> (AGIF) = Oprelvekin	19q13.3-14.3	Knochenmarkstromazellen	IL-11R $\alpha$	Stimulation der Hämatopoese, insbesondere der Megakaryozytenausreifung und Regulation der Makrophagenproliferation und -differenzierung
Epo	7q22	Interstitielle Zellen der Niere	Epo-R	Vorläuferzellen der Erythropoese
Tpo	3q26.3-27	Leber, Niere, Stromazellen des Knochenmarks, Muskel	Tpo-R	Stimulation von Bildung und Ausreifung der Megakaryozyten, langfristige Erhaltung der pluripotenten Stammzellen
SCF = c-kit-Ligand	12q22	Stromazellen, Fibroblasten, Gefäßendothel	SCF-R = c-kit = CD117	Proliferation von Knochenmarkstammzellen und Vorläuferzellen (Lympho-, Myelo-, Megakaryopoese), Vermehrung von Mastzellen und Melanozyten, autokriner Wachstumsfaktor für zahlreiche Tumorzellen, Synergismus mit IL-3, IL-6, IL-11, Tpo, Epo und GM-CSF



Bezeichnung	Chromosomale Lokalisation	Herkunft	Rezeptor(en)	Zielstruktur/Funktion
GM-CSF	5q31.1	Verschiedene, unter anderem T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten	GM-CSF-R = CD116	Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, insbesondere Beeinflussung der Entwicklung von Alveolar-makrophagen, Hemmung der Apoptose reifer Granulozyten
G-CSF	17q11.2-q12	Verschiedene, unter anderem Monozyten und Fibroblasten	G-CSF-R = CD114	Bildung und Differenzierung von Granulozyten, Chemotaxis von Granulozyten, Proliferation pluripotenter Stammzellen
M(o)-CSF = CSF-1	1p13.3	Verschiedene, unter anderem Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten	CSF1-R	Ausreifung von Makrophagen und Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen, Steuerung von Proliferation und Funktion von Makrophagen und Monozyten, Bedeutung für männliche und weibliche Fertilität, Beteiligung an Entwicklung der Plazenta, Rolle im Knochenmetabolismus, Rolle beim Lipoprotein-stoffwechsel
FLT3-Ligand	19q13.3	Milz, Lunge, Knochenmark-endothel	FLT-3 = CD135 = <i>fetal liver kinase-2</i> (Flk2)	Proliferation von Knochenmarkstammzellen und Progenitorzellen, Synergismus mit IL-3, IL-11, Tpo, SCF und GM-CSF

Die folgende Tabelle zeigt einige ausgewählte Transkriptionsfaktoren als intrazelluläre Steuerungsmechanismen der Hämatopoese.

**Tabelle 2: Übersicht über ausgewählte, für die Hämatopoese bedeutsame Transkriptionsfaktoren (adaptiert nach 1,2,5,12-16).**

Dargestellt sind die Bezeichnungen der Transkriptionsfaktoren, ihre Zielstrukturen und Aufgaben bei normaler Expression sowie Situationen und Folgen einer Mutation, Überexpression beziehungsweise eines Fehlens oder *Knockouts*. Abkürzungen: *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1* = TAL1, Rhombotin-2 = RBTN-2 = LMO-2, MonoMAC-Syndrom = Syndrom mit Monozytopenie, Lymphozytopenie (B-Zellen und NK-Zellen), sowie Infektionen durch Mykobakterien, Pilze und Viren, myelodysplastisches Syndrom = MDS, akute myeloische Leukämie = AML, *acute myeloid leukemia 1 Protein* = AML-1 = Runt-related Transkriptionsfaktor 1 = RUNX-1 = *core-binding factor subunit alpha-2* = CBFA2, CBF- $\beta$  = *core-binding-factor- $\beta$* .

Transkriptionsfaktor	Zielstrukturen und Aufgaben bei normaler Expression	Überexpression/Mutation	Fehlen/ <i>Knockout</i>
<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i> = TAL1	Hämatopoetische Progenitorzellen, Erythrozyten, Mastzellen, Megakaryozyten, Endothelzellen	B- und T-Zell-Leukämien	letal
Rhombotin-2 (= RBTN-2 = LMO-2)	Fetale Erythropoese im Dottersack	Akute T-lymphoblastische Leukämie	letal
GATA-2	Hämatopoetische Progenitorzellen	MonoMAC-Syndrom, familiäre Fälle von myelodysplastischen Syndromen (MDS) und akuter myeloischer Leukämie (AML), Emberger-Syndrom, Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	letal
<i>acute myeloid leukemia 1 protein</i> = AML-1 (= RUNX-1 = CBFA2)	Bildung von IL-3, GM-CSF, M-CSF-Rezeptor, hämatopoetische Stammzellen, Entwicklung von Neuronen	zusammen mit CBF- $\beta$ als Translokationspartner in 30 % der AML-Fälle im Kindesalter rearrangiert, eine heterozygote somatische Mutation führt zu einer charakteristischen Thrombozytenfunktionsstörung und AML-Prädisposition, Mammakarzinom	letal
C/EBP $\alpha$	Differenzierung der Granulopoese, Bildung des G-CSF-Rezeptors, Bildung der Myeloperoxidase, Glukose- und Lipidmetabolismus	Gesteigerte granulozytäre und gehemmte monozytäre Ausreifung	Blockierung der frühen Granulopoese, Bildung myeloischer Blasten

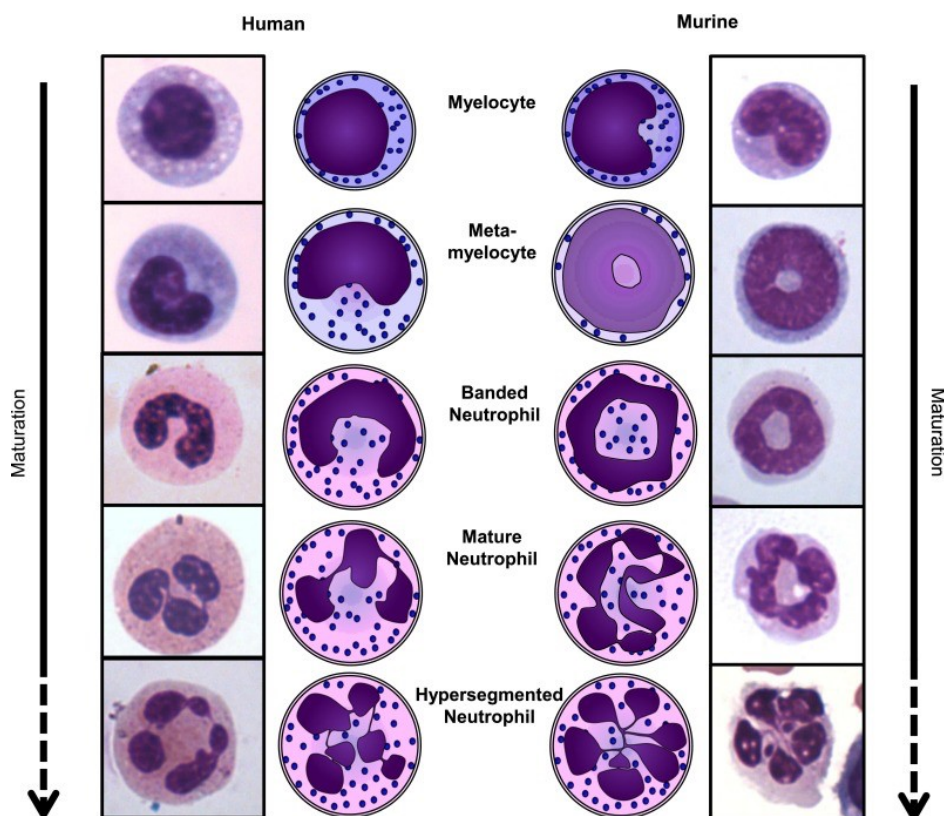
Transkriptionsfaktor	Zielstrukturen und Aufgaben bei normaler Expression	Überexpression/Mutation	Fehlen/ <i>Knockout</i>
PU.1	Differenzierung der Granulopoese, Expression in Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, erythroiden Zellen und Granulozyten, Zielgene sind Rezeptorgene von M-CSF, GM-CSF und G-CSF		Letal, fehlende Bildung Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten

### 1.1.3. Die Leukozyten und Leukopoese

Leukozyten sind kernhaltige, hämoglobinfreie Zellen, welche je nach Lebensalter des Organismus, der Tageszeit und des Funktionszustandes des Organismus in unterschiedlicher Zahl im Körper vorhanden sind und als Teil des Immunsystems von Bedeutung sind [2]. Sie befinden sich in Blut, Knochenmark und interstitiellen Kompartimenten, dabei sind sie amöboid beweglich und können von verschiedenen Stoffen angelockt werden [2]. Dieser Vorgang wird auch als Chemotaxis bezeichnet [2]. Nach morphologischen und funktionellen Kriterien, sowie ihrem Bildungsort, werden verschiedene Leukozytenuntergruppen unterschieden, wobei alle Leukozyten wie oben beschrieben aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen abstammen [2]. Die größte Untergruppe (ca. 60 % aller Blutleukozyten) bilden hierbei bei Menschen die Granulozyten. Sie stammen aus myeloischen Progenitorzellen (CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-Eo, CFU-Bas) im Knochenmark ab und erhielten ihre Bezeichnung anhand der im Zytoplasma enthaltenen und anfärbbaren Granula [17]. Je nach Anfärbbbarkeit der Granula in der nach Artur Pappenheim benannten Pappenheimfärbung, welche mehrere Farblösungen beinhaltet, können neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterschieden werden. Basische Farbstoffe, wie beispielsweise Methylenblau, färben negativ geladene Zellbestandteile bläulich an, so erscheinen basophile

Granulozyten blau. Saure Farbstoffe wie Eosin und Säurefuchsin färben Zellbestandteile mit positiver Ladung rot, weswegen eosinophile Granulozyten rot erscheinen. Neutrophile Substanzen lassen sich sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen anfärben, daher sind neutrophile Granulozyten hellviolett darstellbar [18].

Die meisten Granulozyten sind neutrophile Granulozyten [19]. Sie zirkulieren im Blut oder haften an Endothelwänden, insbesondere in Lunge und Milz, und spielen als Teil der unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Abwehr bakterieller Infekte [19,20]. Ein Ausschnitt der Differenzierung der neutrophilen Granulozyten ist in der folgenden Abbildung 2 dargestellt.

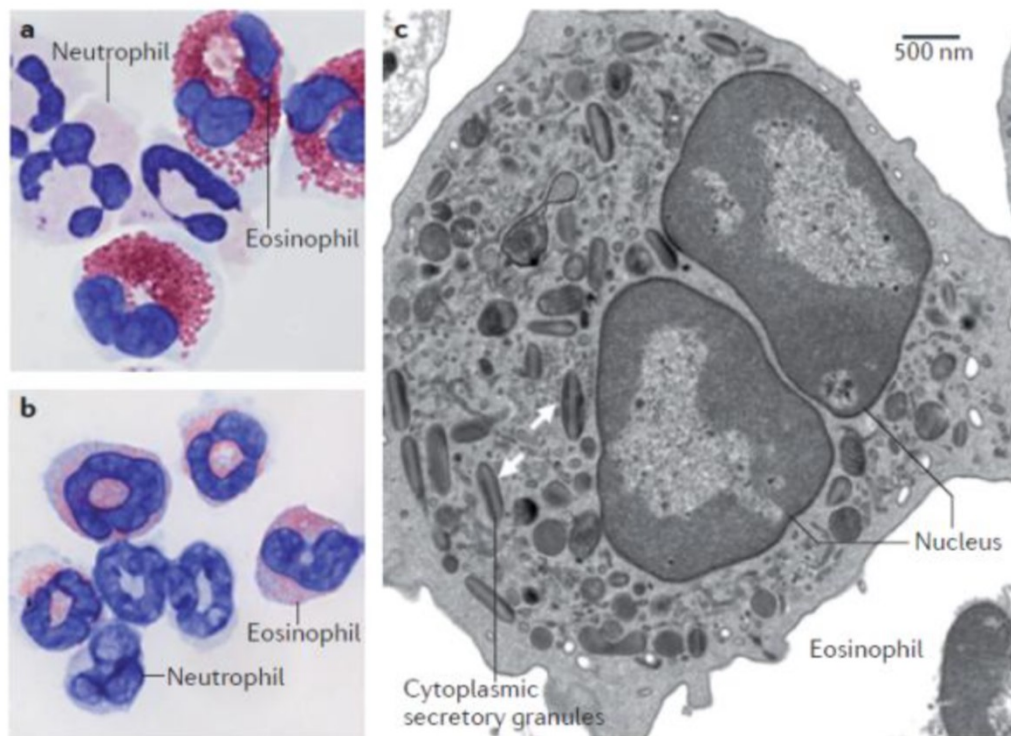


**Abbildung 2: Ausschnitt aus der Differenzierung der neutrophilen Granulozyten (adaptiert nach 19, 20).**

Die Entwicklung der neutrophilen Granulozyten erfolgt aus der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark über die *colony-forming units* für Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten (CFU-GEMM) und die *colony-forming units* für Granulozyten und Monozyten (CFU-GM) hin zum Myeloblasten. Dieser entwickelt sich über den Promyelozyten und Myelozyten zum Metamyelozyt, aus welchem der stabkernige neutrophile Granulozyt und später der segmentkernige neutrophile Granulozyt hervorgehen, die im peripheren Blut zu finden sind. Die Abbildung zeigt die humane und murine Reifung der neutrophilen Granulozyten vom Myelozyt zum segmentkernigen Granulozyt.

Die neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zeigen verschiedene Reifestufen [21]. Der stabkernige Granulozyt hat einen nicht segmentierten, stab- oder hufeisenförmigen Kern, welcher zu seiner Namensgebung führte, und stellt die vorletzte Reifestufe dar [21]. Der segmentkernige neutrophile Granulozyt, welcher die letzte Reifestufe der neutrophilen Granulozyten abbildet, hat einen segmentierten Kern [21]. Zu Beginn einer Infektion, wenn der Bedarf an neutrophilen Granulozyten stark ansteigt, kann es zu einem vermehrten Auftreten von stabkernigen Granulozyten kommen, was im Differentialblutbild als Linksverschiebung bezeichnet wird [22].

Die eosinophilen Granulozyten machen 2 - 4 % der Blutleukozyten aus. Ihre Namensgebung stammt von der Anfärbbarkeit ihrer eosinophilen Granula, welche unter anderem Peroxidase,  $\beta$ -Glukuronidase, saure Phosphatase, Arylsulfatase, weitere hydrolytische Enzyme und kationische Polypeptide, wie das *major basic protein* (MBP) enthalten [1,18]. Sie unterliegen einer ausgeprägten zirkadianen Rhythmik, welche von der Rhythmik der Glukokortikoidsynthese abhängt [2]. Die Differenzierung der eosinophilen Granulozyten erfolgt aus pluripotenten hämatopoetischen Zellen im Knochenmark [23]. Erst phänotypisch ausgereifte Zellen erreichen das periphere Blut [23]. Eosinophile Granulozyten verbringen nach ihrer Ausreifung jedoch nur eine kurze Zeit im peripheren Blut (Halbwertszeit ca. 18 Stunden), bevor sie in den Thymus und Gastrointestinaltrakt wandern und sich dort ansiedeln [24-26]. Verschiedene Stimuli, wie Interleukin-5 und Eotaxin, führen zu einer Aktivierung und Rekrutierung von weiteren Eosinophilen [23]. Die Bedeutung der eosinophilen Granulozyten liegt unter anderem in der Abwehr von Parasiten [27]. Eine erhöhte Eosinophilenanzahl im Blut wird außerdem mit verschiedenen Erkrankungen wie atopischen Störungen wie Asthma bronchiale oder Allergien, mit autoimmunen Erkrankungen oder Malignomen in Zusammenhang gebracht [27-29]. Abbildung 3 zeigt beispielhaft licht- und elektronenmikroskopische Bilder von eosinophilen Granulozyten.



**Abbildung 3: Darstellung eosinophiler Granulozyten (adaptiert nach 23).**

Abbildung 3a zeigt ein lichtmikroskopisches Bild humaner neutrophiler und eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut in einer modifizierten Giemsa-Färbung mit 100-facher Vergrößerung. Der eosinophile Granulozyt zeigt den charakteristischen zweilappigen (= pelgerförmigen) Kern und große rot angefärbte zytoplasmatische Granula. Die segmentkernigen neutrophilen Granulozyten haben einen multilobulierten Kern. In Abbildung 3b sind murine eosinophile Granulozyten dargestellt, die aus der Milz einer CD2-Interleukin-5 transgenen Maus isoliert und nach Giemsa angefärbt wurden. Abbildung 3c zeigt das elektronenmikroskopische Bild eines murinen eosinophilen Granulozyten in einer 6000-fachen Vergrößerung. Die zytoplasmatischen sekretorischen Granula sind mit Pfeilen markiert.

Basophile Granulozyten machen 0,5 - 1 % der Blutleukozyten aus. Ihre Ausreifung findet ausschließlich im Knochenmark statt [30]. Ihre Lebenszeit im peripheren Blut beträgt 2 - 3 Tage [30]. Die basophilen Granula enthalten unter anderem Histamin und Heparin. So sind auch die basophilen Granulozyten bei der Abwehr von Parasiten und bei allergischen Reaktionen beteiligt [30,31].

Als weitere Untergruppe der Leukozyten sollen die Monozyten beschrieben werden. Sie umfassen in etwa 2 - 10 % der Blutleukozyten [2]. Sie stammen wie auch die Granulozyten von myeloischen Vorläuferzellen ab [2]. Ihre Größe im Blutaussstrich beträgt 12 - 20  $\mu\text{m}$  [2]. Sie zeichnen sich durch einen großen bohnenförmigen Kern und vergleichsweise wenig Zytoplasma aus [2]. Bei den Monozyten handelt es sich um im peripheren Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems [32]. Sie bilden zudem die Vorläuferzellen von

Gewebsmakrophagen und eines Teils der dendritischen Zellen, indem sie nach 2 - 3 Tagen aus dem Blut in andere Gewebe einwandern und dort verbleiben [32]. Gewebsmakrophagen finden sich insbesondere in Lymphknoten, Alveolen, Lebersinusoiden, Milz und Knochenmark [2]. Eine Hauptfunktion der Monozyten und Gewebsmakrophagen, als Teil des angeborenen Immunsystems, ist die Phagozytose von körperfremden Strukturen [33]. Des Weiteren können sie Zellen des adaptiven Immunsystems, beispielsweise T-Zellen, durch die Präsentation von Antigenen aktivieren [33]. Auch bei der Wundheilung, zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt, spielen Monozyten und Makrophagen eine essentielle Rolle [34]. Die Unterscheidung der Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen erfolgt unter anderem über den Nachweis verschiedener Oberflächenmarker [35].

Im folgenden Abschnitt soll gesondert auf die Lymphozyten, welche ebenfalls zur Gruppe der Leukozyten gehören, eingegangen werden. Sie machen etwa 20 - 50 % der Blutleukozyten des Erwachsenen aus [2]. Bei Kindern kann der Anteil der Lymphozyten auch im physiologischen Zustand mehr als 50 % betragen [2]. Die Lymphozyten stammen im Gegensatz zu den Granulozyten und Monozyten von lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab [2]. In den primär lymphatischen Organen Knochenmark und Thymus entwickeln sich die Vorläuferzellen weiter, was als Prägung bezeichnet wird [2]. Lymphozyten, die sich im Knochenmark weiterentwickeln, werden B-Lymphozyten oder B-Zellen genannt [2]. Hierbei steht der Buchstabe B für „*Bone marrow*“. Lymphozyten, deren Prägung im Thymus stattfindet, heißen T-Lymphozyten oder T-Zellen, wobei der Buchstabe T für „*Thymus*“ steht [2]. Die Lymphozyten im peripheren Blut teilen sich in ca. 15 % B-Lymphozyten und 70 – 80 % T-Lymphozyten auf, wobei die Einteilung anhand der Expression von CD (= *Cluster of Differentiation*)-Molekülen an der Zelloberfläche erfolgt [2]. Reife B-Lymphozyten zeigen an ihrer Oberfläche neben CD19, welches bereits in früheren Stadien der B-Zell-Entwicklung exprimiert wird, insbesondere den B-Zell-Rezeptor (= membrangebundenes Immunglobulin), reife T-Lymphozyten zeigen CD3 an ihrer Oberfläche [36]. Die verbleibenden ca. 10 % der Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker weder B- noch T-Zellen

zuordnen [36]. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen Lymphozyten im Blutaussstrich nach Pappenheim-Färbung als kernhaltige Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation, einem runden Kern und basophilem Zytoplasma [37]. Eine Einteilung nach B- und T-Lymphozyten kann in der Regel anhand des lichtmikroskopischen Bilds nicht getroffen werden [38]. Die Lymphozyten sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems [2]. B-Lymphozyten leisten unter anderem durch die Produktion von Antikörpern einen Beitrag im Rahmen der spezifischen humoralen Immunantwort [2]. T-Lymphozyten sind Teil der spezifischen zellulären Immunreaktion [2]. Auf die einzelnen Subgruppen der B- und T-Lymphozyten sowie deren Funktion während der Immunantwort soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

#### **1.1.4. Das Immunsystem**

##### **1.1.4.1. Systematik des Immunsystems**

Das Immunsystem dient dem Organismus zur Abwehr von Fremdstrukturen, wie beispielweise infektiösen Erregern [36,39]. Infektiöse Erreger, wie Viren, Bakterien, Parasiten und Prionen, können die Zellen des Wirtsorganismus schädigen, indem sie in den Organismus eindringen, sich dort vermehren, Nährstoffe verbrauchen und Abbaumetabolite und Giftstoffe anhäufen [2]. Das Immunsystem ist ein vielschichtiges System aus zellulären und nichtzellulären Bestandteilen, welche im gesamten Organismus zu finden sind, insbesondere jedoch in primären lymphatischen Organen wie Knochenmark und Thymus und in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz, Haut und Schleimhäuten [40]. Die Anzahl der Zellen des Immunsystems in einem menschlichen Organismus liegt ungefähr bei  $10^{12}$  [36]. Die an der Immunantwort beteiligten Zellen können entweder direkt über Zell-Zell-Kontakte oder indirekt über Zytokine miteinander in Verbindung treten [36]. Das Immunsystem kann allgemein in zwei Teile gegliedert werden; einen angeborenen, unspezifischen Teil, welcher vor allem in der Frühphase der Immunantwort von Bedeutung ist, und einen erworbenen, adaptiven Teil, welcher im Verlauf der Immunreaktion zunehmend wichtig ist [41]. Der angeborene, unspezifische und der erworbene, adaptive Teil sind vielfach



miteinander verknüpft [42]. Ferner besteht eine enge Verbindung zwischen dem Immunsystem und weiteren Systemen wie der Blutgerinnung samt Komplementsystem, dem Nervensystem, dem endokrinen System und dem Mikrobiom [36].

#### **1.1.4.2. Die angeborene, unspezifische Immunantwort**

Das angeborene, unspezifische Immunsystem ist direkt mit der Geburt verfügbar [43]. Bei einer Infektion kommt es sofort zum Einsatz, kann jedoch nur bedingt zwischen unterschiedlichen Erregern unterscheiden [43,44]. Die Fähigkeit zur Erkennung von Fremdstrukturen beruht hierbei auf einer begrenzten Anzahl Keimbahn-kodierter Rezeptoren, die Teile von Mikrobiota erkennen, nicht jedoch Teile des Individuums selbst [43].

Zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem zählen zunächst mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute [2]. Diese sind zusätzlich mit weiteren Schutzmechanismen ausgestattet [2]. Beispielsweise sind Atemwegsepithelien mit Sekret überzogen, welches von Infektionserregern schwer durchdrungen werden kann [2]. Im Magen sorgt die Salzsäureproduktion der Belegzellen für einen pH-Wert kleiner 2, wodurch viele Erreger nicht überleben können [2]. Das Vaginalepithel gibt Glykogen-haltige Zellen ins Lumen ab. Dort wird das Glykogen durch nichtpathogene Bakterien zu Milchsäure metabolisiert, wodurch sich auch hier ein saurer pH-Wert ergibt. Auch der Urin hat physiologischerweise einen sauren pH-Wert [2].

Des Weiteren gehören humorale Komponenten dazu [2]. Besonders erwähnt werden soll hier das Enzym Lysozym als humorale Komponente der angeborenen, unspezifischen Immunantwort [45]. Lysozym findet sich in Tränenflüssigkeit, Speichel, Atemtraktsekreten, Blutserum, Liquor, Fruchtwasser, Zervixschleim sowie Muttermilch und wird in Respirationstrakt, Nieren und Gastrointestinaltrakt sowie von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen synthetisiert [45]. Es hydrolysiert Verbindungen in Peptidoglykanen, welche einen essentiellen Anteil der Zellwand von Bakterien darstellen [45]. Es wirkt somit direkt antibakteriell [45]. Allerdings kann Lysozym

auch eine indirekte Wirkung zugesprochen werden, da durch die Freisetzung von Fragmenten der Peptidoglykane (sogenannte Neoantigene) eine Modulation des Immunsystems ausgelöst werden kann [45].

Eine weitere humorale Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP), welches an Phosphorylcholin-Bestandteile an Bakterienoberflächen binden kann und hierdurch zu einer Begünstigung der Phagozytose führt [46]. Dieser Prozess wird auch als Opsonisierung bezeichnet [46].

Eine weitere wichtige Gruppe humoraler Komponenten stellen die Zytokine dar, welche bereits im Kapitel Hämatopoese (1.1.2.) erwähnt wurden [2]. Die Zytokine vermitteln Prozesse innerhalb der Immunantwort, wie unter anderem Wachstumsreize für verschiedene Immunzellen [47]. Zur Gruppe der Zytokine gehören beispielweise die Interferone  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  [47]. Interferon  $\alpha$  spielt in der angeborenen, frühen Immunantwort eine Rolle, indem es die Virusreplikation in infizierten Zellen hemmt und durch Stimulation der Expression von MHC-I-Molekülen (= *major histocompatibility complex*) die Erkennung virusinfizierter Zellen durch T-Zellen fördert [47].

Weitere wichtige Zytokine sind Histamin, Prostaglandine und Leukotriene [2]. Allen gemeinsam ist die Fähigkeit zur Erhöhung der Durchlässigkeit des Gefäßendothels für Zellen des Immunsystems und zur Anlockung von Immunzellen, also die Fähigkeit zur Chemotaxis [2,47]. Prostaglandine und Leukotriene werden allgemein unter dem Begriff Eikosanoide zusammengefasst [36].

Zur Gruppe der Zytokine gehören außerdem die bereits im Kapitel Hämatopoese (1.1.2.) erwähnten Interleukine [2]. Interleukin-1 (IL-1) ist ebenfalls ein Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems, welches von Monozyten nach ihrer Aktivierung freigesetzt wird und gleichzeitig auf diese stimulierend im Sinne eines positiven Feedbackloops wirkt [48]. Es fördert zudem die Gefäßpermeabilität für Entzündungszellen und kann Fieber induzieren [48].

Ferner ist in diesem Zusammenhang das Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) zu erwähnen [2]. TNF wird hauptsächlich durch Makrophagen synthetisiert und wirkt bei bakteriellen Infektionen durch Stimulation von Monozyten und Makrophagen [49]. Dies geschieht größtenteils durch Wachstumsförderung von B-Zellen, durch Förderung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und durch vermehrte Synthese weiterer Zytokine [49].

Als weiteres Beispiel für humorale Komponenten des angeborenen, unspezifischen Immunsystems soll abschließend das Komplementsystem genannt werden [36]. Das Komplementsystem enthält eine Reihe von Proteinen, welche, ähnlich dem Gerinnungssystem, kaskadenartig angeordnet sind [50]. Nach der Aktivierung des Komplementsystems und Ablauf der Kaskade entsteht ein terminaler Defekt in der Zellmembran des Infektionserregers, welcher zu dessen Lyse führt [50]. Weitere Funktionen des Komplementsystems beinhalten die Chemotaxis, die Erhöhung der Endothelpermeabilität für Immunzellen sowie die Förderung der Adhärenz von Antigen-Antikörper-Komplexen an die Zellmembran [50]. Generell werden ein klassischer und ein alternativer Weg der Komplementkaskade unterschieden, welche zu Beginn der Kaskade unterschiedliche Proteine enthalten und zum Ende der Signalkette zum selben Effektor-Komplex führen [50].

Zelluläre Bestandteile des angeborenen, unspezifischen Immunsystems sind Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen [2]. Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen können hierbei Fremdstoffe, wie zum Beispiel Infektionserreger, in sich aufnehmen und intrazellulär abbauen, was als Phagozytose bezeichnet wird [2]. Die Fremdkörper werden dabei in sogenannte Phagolysosomen aufgenommen, welche verschiedene proteolytische, glykolytische und lipolytische Enzyme enthalten [36]. Die dabei entstehenden Abbauprodukte werden teilweise für Aktivierungsprozesse des erworbenen, adaptiven Immunsystems verwendet [36]. Dendritische Zellen beispielweise phagozytieren Fremdstoffe im Gewebe und wandern anschließend in sekundäre lymphatische Organe, um dort T-Zellen die zuvor prozessierten Antigene zur Aktivierung zu präsentieren [36]. Neutrophile

Granulozyten produzieren verschiedene Enzyme, wie das bereits erwähnte Lysozym, saure Phosphatasen, Kollagenasen und NADPH-abhängige Oxidasen [36]. Einerseits können Bakterien hierdurch direkt abgetötet werden; andererseits wird durch die Kollagenasen weiteren Immunzellen die Einwanderung in das entzündete Gewebe ermöglicht [2]. Die NADPH-abhängige Oxidase und die NETosis (= *Nox-independent neutrophil extracellular trap* (NET) *formation*) ermöglichen den neutrophilen Granulozyten zudem Sauerstoffradikale herzustellen, die toxisch für bakterielle Zellmembranen sind [36,51]. Eosinophile Granulozyten setzen im Rahmen der angeborenen, unspezifischen Immunantwort Enzyme aus ihren Granula frei, die vor allem toxisch auf Parasiten wirken [29]. Hierzu zählen das eosinophile, kationische Protein, das *Major-basic-Protein* und das eosinophile Protein X [27]. Außerdem bilden eosinophile Granulozyten die Entzündungsmediatoren C4 und D4, die Teile des Komplementsystems sind [36]. Basophile Granulozyten setzen bei einer Infektion hauptsächlich Histamin und Serotonin frei, woraus eine Vasodilatation und eine Begünstigung des Einwanderns von Entzündungszellen resultieren [30].

Monozyten, Makrophagen und Granulozyten besitzen verschiedene Rezeptoren, die Bestandteile von Mikroorganismen binden und spezifische Mechanismen der Immunantwort auslösen können [52]. Diese Rezeptoren werden auch Toll-ähnliche Rezeptoren oder englisch *Toll-like Receptors* (TLRs) genannt [36]. Die Namensgebung stammt hierbei von der Forschungsgruppe um die Tübinger Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard, welche über die Entdeckung eines Proteins bei *Drosophila melanogaster* überaus erfreut war und deshalb das Protein nach dem deutschen Adjektiv „toll“ benannte [53]. TLRs ähneln dem Protein Toll und erhielten daher die Bezeichnung „Toll-like“ [53]. Die TLRs gehören zur Übergruppe der *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) [54]. Sie erkennen Fremdstrukturen, die ausschließlich auf oder in infektiösen Krankheitserregern vorkommen, sogenannte *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), und aktivieren Teile des erworbenen, spezifischen Immunsystems [55]. Durch die Bindung von TLRs an Fremdstrukturen kommt es zu einer Dimerisierung innerhalb des Rezeptors und zur Aktivierung einer

intrazellulären Signalkaskade, welche zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt [54]. Beispielweise wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B die Produktion von TNF $\alpha$  veranlasst [56]. Veränderte TLRs können, wenn sie nicht mehr nur Strukturen von pathogenen Mikroorganismen oder auch DAMPs (= *damage-associated molecular patterns*, freigesetzte Strukturen aus körpereigenen Zellen, die durch zufällige Mutationen in Genen zur Zellzykluskontrolle entstanden sind) erkennen, auch eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen spielen [57] [58].

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die bekannten humanen Toll-like Rezeptoren.

**Tabelle 3: Übersicht über die bekannten humanen TLRs und deren zu erkennende Strukturen (PAMPs) (adaptiert nach 52-56,57).**

Abkürzungen: TLR = *Toll-like Receptor*, PAMP = *Pathogen-Associated Molecular Pattern*, RNA = Ribonukleinsäure, DNA = Desoxyribonukleinsäure, CpG = Cytosin-phosphatidyl-Guanin.

Rezeptor	Erkannte PAMP
TLR-1	Lipoproteine, Glykolipide, Hefen, Protozoen
TLR-2	Lipoproteine, Lipopeptide, Peptidoglykane
TLR-3	Virale RNA
TLR-4	Lipopolysaccharide
TLR-5	Flagellin
TLR-6	Bakterielle Peptidoglykane
TLR-7	Kurze Einzel-, sowie Doppelstrang-RNA
TLR-8	Kurze Einzel-, sowie Doppelstrang-RNA
TLR-9	Unmethylierte CpG-DNA (Bakterien)
TLR-11	<i>Escherichia coli</i> , Profilin-like-Protein

### 1.1.4.3. Die erworbene, adaptive Immunantwort

Die adaptive, erworbene Immunantwort beinhaltet vor allem Lymphozyten [59]. Die Lymphozyten werden durch Fremdstrukturen von Krankheitserregern, sogenannten Antigenen, aktiviert [36].

Zunächst soll auf die T-Lymphozyten weiter eingegangen werden. Alle T-Lymphozyten enthalten an ihrer Oberfläche einen Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor genannt wird. Der T-Zell-Rezeptor ist mehrheitlich aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut, die für die einzelnen T-Zellen spezifisch sind und somit den variablen Teil des Rezeptors darstellen [60]. Die CD3 $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und CD247 $\zeta$ -Untereinheiten bilden die konstanten Teile des T-Zell-Rezeptors, welche bei allen T-Lymphozyten gleich sind und auch als CD3-Komplex bezeichnet werden [61]. Neben dem T-Zell-Rezeptor exprimieren T-Lymphozyten entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche [62]. Hierdurch können sie in CD4-positive T-Zellen, welche aufgrund ihrer Funktion auch T-Helferzellen genannt werden, und in CD8-positive T-Zellen, welche auch zytotoxische T-Zellen heißen, unterschieden werden [62]. CD4-positive T-Zellen aktivieren bei einer Infektion weitere Zellen des Immunsystems durch direkte Zell-Zell-Kontakte oder die Produktion von Zytokinen, wohingegen CD8-positive T-Zellen virusinfizierte körpereigene Zellen abtöten können [63]. Zur Aktivierung der T-Lymphozyten ist die Erkennung von Antigenen durch den T-Zell-Rezeptor notwendig [59]. Die Antigene müssen dafür von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC) über deren sogenannte MHC-Moleküle präsentiert werden [60]. Die MHC-Moleküle werden bei Menschen auch als HLA-Moleküle bezeichnet, wobei HLA für „*human leukocyte antigen*“ steht [64]. Sie können in zwei Gruppen - MHC Klasse I und MHC Klasse II - eingeteilt werden [65]. CD4-positive T-Lymphozyten erkennen ein Antigen durch Präsentation über MHC-II-Komplexe, wohingegen CD8-positive T-Lymphozyten ein Antigen über den MHC-I-Komplex erkennen. MHC-II-Moleküle werden auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert [66]. Diese Zellen phagozytieren als Teil der unspezifischen Immunantwort verschiedene Erreger, ihre Phagosomen verschmelzen mit Vesikeln des intrazellulären Golgi-

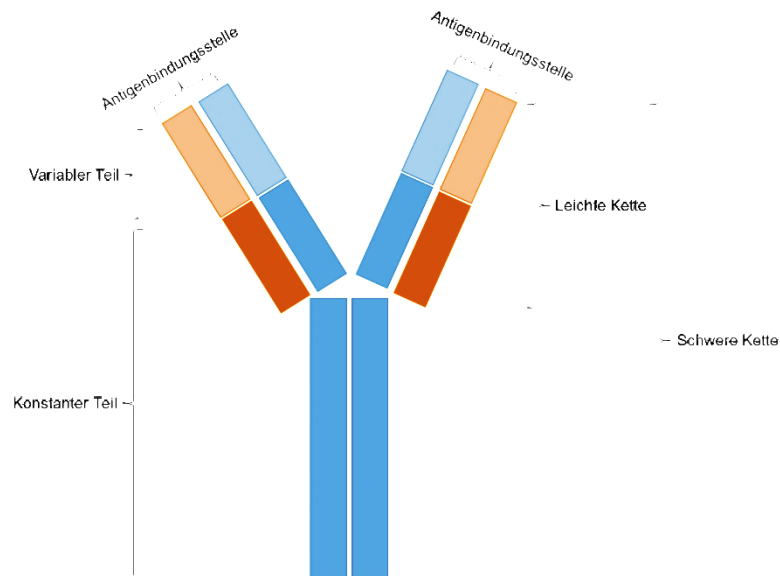
Apparats, welcher die MHC-II-Moleküle enthält, wodurch die phagozytierten Antigenfragmente an MHC-II-Moleküle binden können und der Komplex aus Antigen und MHC-II-Molekül an die Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle gelangen kann [66]. MHC-I-Moleküle hingegen werden an der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten, nicht jedoch auf Erythrozyten exprimiert [67]. MHC-I-Moleküle binden Peptide, welche hauptsächlich durch den Abbau zytosolischer Proteine mittels Proteasomen entstanden sind [68]. Über das endoplasmatische Retikulum wird der MHC-I-Peptid-Komplex in die Zellmembran eingefügt, wobei das zu präsentierende Peptid auf der extrazellulären Seite der Membran liegt. So können intrazelluläre Proteine zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden, die im Falle einer Erkennung körperfremder präsentierter Proteine - wie bei einer Virusinfektion - die betroffene, präsentierende Zelle abtöten [68]. MHC-I-tragende Zellen, die körpereigene Peptidfragmente präsentieren, werden hingegen nicht abgetötet. Für unzählige mögliche Antigene, die in der Natur vorkommen, existiert ein spezifischer T-Zell-Rezeptor, so dass es auch eine dementsprechend große Anzahl an T-Zell-Rezeptoren gibt [69]. Die enorme Variabilität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors wird durch die sogenannte somatische Rekombination von Gensegmenten möglich gemacht. Auf diesen Mechanismus wird im Abschnitt der B-Lymphozyten und Antikörper näher eingegangen.

Im Rahmen ihrer Entwicklung wandern T-Vorläuferzellen, welche weder CD4 noch CD8 exprimieren, nach ihrer Entstehung und ersten Reifungsschritten im Knochenmark, in den Thymus ein [70]. Dort entwickeln sie durch die somatische Rekombination einen jeweils spezifischen T-Zell-Rezeptor und sind anschließend CD3, CD4 und CD8 positiv [71]. Im Kortex des Thymus werden T-Lymphozyten mit einem zur Erkennung von Fremdantigenen geeigneten T-Zell-Rezeptor zur Reifung gebracht, wohingegen T-Lymphozyten, deren T-Zell-Rezeptor sich gegen körpereigene Strukturen richtet, vernichtet werden [72]. Die so entstandenen CD4-positiven T-Helfer-Zellen regulieren die weitere Immunantwort durch die Produktion von Zytokinen, insbesondere Interleukine wie IL-2, IL-4, IL-5 und IL-6 [73]. IL-2 stimuliert dabei die Proliferation von CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten, deren T-Zell-Rezeptor mit einem

passenden Antigen in Kontakt steht [73]. Die ebenfalls im Thymus entstehenden zytotoxischen T-Zellen oder T-Killer-Zellen können Zielzellen, wie virusinfizierte Zellen, direkt eliminieren [73]. Hierfür verwenden sie die Proteine Perforin, das die Membran der Zielzelle durchlässig macht, sowie Granzym und den CD95-Liganden (CD95L), welche in der Zielzelle Apoptose induzieren [74]. Ein geringer Teil der CD8-positiven Zellen – wie auch der CD4-positiven Zellen - verbleibt nach Beendigung einer Infektion als Gedächtniszellen [75].

Der folgende Abschnitt widmet sich speziell den B-Lymphozyten und den durch sie produzierten Antikörpern. Aktivierte B-Lymphozyten bilden Antikörper, welche auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden [76]. Antikörper binden an sogenannte Antigene von Pathogenen und führen unter anderem zu deren Neutralisation, was bedeutet, dass körpereigene Zellen nicht mehr infiziert werden können. Immunglobuline können generell in fünf Klassen eingeteilt werden: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Alle Antikörper zeigen eine ähnliche Grundstruktur [77]. Diese enthält vier Proteinketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [77]. Zwei der vier Ketten werden aufgrund ihres Molekulargewichts von 50 kDa als schwere Ketten bezeichnet, die anderen beiden Ketten bei einem Molekulargewicht von 30 kDa als leichte Ketten, wobei innerhalb eines Immunglobulins die schweren und die leichten Ketten jeweils identisch sind [2]. Alle Immunglobulinketten enthalten einen konstanten Teil und einen variablen Teil [2,77]. Der konstante Teil ist bei allen Immunglobulinen einer Klasse gleich und bestimmt somit die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Klasse von Immunglobulinen [2,77]. Der variable Teil ist auch innerhalb der einzelnen Immunglobulinklassen verschieden und definiert, welches Antigen durch den Antikörper erkannt wird [2,77]. Bei Milliarden von möglichen, in der Umwelt vorkommenden Antigenen, sind ebenso viele Antikörpervariationen möglich [76]. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Immunglobulins.





**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Immunglobulins (modifiziert nach 2,76,77).**

Die blau dargestellten Balken zeigen die schweren Ketten, die rot dargestellten Balken die leichten Ketten. Der variable Teil des Immunglobulins ist etwas heller eingefärbt, der konstante Teil mit dunkleren Farben hervorgehoben. Im Bereich der variablen Region liegt die Antigenbindungsstelle.

Die einzelnen Immunglobulinklassen unterscheiden sich in ihrem Vorkommen und ihrer Funktion [36]. IgM-Antikörper werden in fünf zusammenhängenden Untereinheiten, als sogenanntes Pentamer, sezerniert und als Monomer auf der Oberfläche reifer B-Zellen exprimiert [2]. IgM werden als erste Antikörper im Verlauf der Immunreaktion gebildet [78]. Neben ihrer Abwehrfunktion wird IgM-Antikörpern auch eine Rolle bei der Gewebshomöostase zugeschrieben, indem sie veränderte Zellen durch die Aktivierung des Komplementsystems abräumen lassen [78]. Sie sind als Pentamer aufgrund ihrer Größe nicht plazentagängig [36]. IgG werden größtenteils ins Serum sezerniert und bilden die wichtigsten Antikörper der sekundären Immunantwort [79]. IgA sind hauptsächlich auf Schleimhäuten nachweisbar und bilden dort eine Barrierefunktion; nur etwa 15% der im Serum zirkulierenden Antikörper sind vom IgA-Typ [80]. IgA können hierbei als Monomere und als Dimere vorliegen [77]. IgE lassen sich sowohl in gelöster Form im Serum nachweisen als auch zellgebunden an Mastzellen [81]. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei allergischen Reaktionen [81]. IgD werden auf der Oberfläche reifer B-Zellen exprimiert, der Anteil von nichtgebundenem IgD bezogen auf alle im Serum vorkommenden Immunglobuline beträgt weniger als ein Prozent [77]. Die Funktion von IgD ist

bis heute nicht vollständig geklärt [82]. Als Bestandteil der B-Lymphozytenmembran kann IgD basophile Granulozyten und Mastzellen aktivieren und als *crosstalk* zum angeborenen Immunsystem fungieren [36].

Die Sicherstellung der Antikörpervielfalt erfolgt nicht durch eine Kodierung in einzelnen Genen, dies ist aufgrund der Anzahl der benötigten Immunglobuline nicht möglich [83]. Vielmehr wird die Antikörpervielfalt durch das Prinzip der somatischen Rekombination von Gensegmenten (ähnlich zum T-Zell-Rezeptor) ermöglicht [83]. Für den konstanten Teil jeder Immunglobulinklasse existiert jeweils ein Gen: ein  $\mu$ -Gen für IgM, ein  $\gamma$ -Gen für IgG, ein  $\alpha$ -Gen für IgA, ein  $\varepsilon$ -Gen für IgE und ein  $\delta$ -Gen für IgD [84]. Für den variablen Teil des Immunglobulins stehen eine größere Anzahl sogenannter variabler (V)-Gene, zwölf sogenannte diversity-(D)-Gene und vier sogenannte junction-(J)-Gene zur Kombination zur Verfügung [84]. Durch die nahezu unbegrenzte Möglichkeit der Kombination von V-, D- und J-Genen entsteht die Antikörpervielfalt, diese wird zusätzlich noch durch Mutationen und Veränderungen bei Schneide- und Ligationsprozessen vergrößert [83].

Zu Beginn einer Immunreaktion werden – wie bereits erwähnt – vor allem IgM-Antikörper gebildet und sezerniert [85]. IgM-Antikörper sind wegen ihrer in gelöstem Zustand bestehenden Pentamer-Anordnung weniger effektiv [77]. Nach wenigen Tagen wird daher anstelle des  $\mu$ -Gens für die konstante Region des Immunglobulins das  $\gamma$ -Gen mit dem variablen Teil fusioniert, wodurch nach Transkription und Translation Immunglobuline der Klasse G entstehen [85]. Diese erkennen dasselbe Antigen wie zuvor die IgM-Antikörper, zeigen jedoch eine deutlich höhere Affinität zum Antigen [77].

Wie im Kapitel Leukozyten und Leukopoese (1.1.3.) dargestellt, findet die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark (englisch *bone marrow*) unter dem Einfluss von SCF und IL-7 aus Stromazellen statt [2]. Während des Reifungsprozesses der B-Zelle im Knochenmark wird der variable Teil des zugehörigen spezifischen Antikörpers durch somatische Rekombination gebildet und mit dem konstanten Teil der IgM-Subklasse an der Oberfläche der

B-Lymphozyten als sogenannter B-Zell-Rezeptor exprimiert, welcher diese Bezeichnung aufgrund seiner transmembranösen und intrazellulären Domäne erhält [86]. Im Rahmen des Reifungsprozesses entwickelt sich aus der hämatopoetischen Stammzelle zunächst die Pro-B-Zelle [87]. Die Pro-B-Zelle zeichnet eine durch somatische Rekombination ermöglichte Neuordnung der schweren Kette des zu produzierenden Antikörpers aus [87]. Ab dem Stadium der Pro-B-Zelle wird CD19 auf der Zelloberfläche exprimiert [88]. Anschließend entsteht die Prä-B-Zelle, welche die Umordnung der leichten Kette des zu produzierenden Antikörpers zur Aufgabe hat [87]. Nachfolgend befindet sich die entstandene Zelle im sogenannten unreifen Stadium, welches durch die Expression eines kompletten B-Zell-Rezeptormoleküls vom IgM-Typ auf der Oberfläche gekennzeichnet ist [87]. Reife B-Zellen schließlich, erreichen durch alternatives Spleißen, dass zusätzlich auch IgD-Rezeptoren gebildet werden [87]. Diese B-Zellen kommen nun mit in ihrer Umgebung befindlichen Antigenen in Kontakt [86]. Richtet sich die B-Zelle gegen ein körpereigenes Antigen, wird sie durch Apoptose abgetötet [36]. Die verbleibenden, ausschließlich Fremdantigene erkennenden B-Zellen wandern anschließend in lymphatische Organe, wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark [36].

Diese Zellen werden auch naive B-Zellen genannt, sie sind reife B-Zellen ohne bisherigen Kontakt zu ihrem Antigen [89]. Die Antikörperproduktion beginnt erst nach der Aktivierung von reifen B-Zellen durch die Bindung passender Antigene an ihre membrangebundenen spezifischen Antikörper [86]. Die Aktivierung der B-Zelle kann in einer T-Zell-abhängigen und einer T-Zell-unabhängigen Weise erfolgen [36]. Für die meisten Antigene ist eine T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Lymphozyten notwendig, bei der sowohl das Antigen, als auch eine Antigen-spezifische T-Helferzelle an die B-Zelle binden. Bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung wird nach Bindung des Antigens an den spezifischen B-Zell-Rezeptor der Antigen-Antikörper-Komplex in die B-Zelle eingeschleust [86]. Lysosomen zersetzen das Antigen intrazellulär in Peptidfragmente, welche dann an MHC-II-Molekülen der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden [86]. Die B-Zellen durchwandern anschließend die T-Zell-Zone der sekundär lymphatischen Organe, so dass CD4-positive T-Helfer-Zellen mit ihrem T-Zell-

Rezeptor an den Antigen-MHC-Komplex binden können und zu einer Stimulation der B-Zelle über den CD40- und B7-Rezeptor und über Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 führen können [86]. Durch die Bindung der T-Zelle werden die Proliferation der B-Zelle, die Differenzierung zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle und somit die Bildung und Sekretion löslicher Antikörper ermöglicht [86]. Je nach Einfluss der Zytokine erfolgt der Klassenwechsel der Antikörper [86]. Wie oben beschrieben, können dann durch die neu gebildeten löslichen Antikörper Mechanismen wie Neutralisierung, Opsonisierung und Komplementaktivierung bewirkt werden [86]. Bei der T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Lymphozyten, also dem Fehlen des Einflusses von CD4-positiven T-Lymphozyten, kann die B-Zelle nur IgM-Antikörper produzieren, der Klassenwechsel bleibt aus [86,90].

Ein weiterer Reifungsprozess, der somatische Hypermutation genannt wird, kann bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung im Verlauf die Affinität der produzierten IgG-Antikörper zum Antigen weiter erhöhen und so die Neutralisierung von Antigenen verbessern [91]. Hierbei wird der variable Teil der Immunglobuline erneut mutiert [91]. Zufällig entstandene Immunglobuline mit höherer Affinität werden dann weiter produziert [91]. B-Zellen mit Immunglobulinen geringer Affinität sterben ab; dies erfolgt unter anderem durch eine geringere Expression des bcl-2-Gens [91]. Die Zellen, deren Immunglobuline nach der somatischen Hypermutation die höchste Affinität zum entsprechenden Antigen besitzen, differenzieren weiter zu Plasmazellen [91]. Die Plasmazellen wiederum wandern ins Knochenmark und produzieren dort weiter hochaffine Antikörper [86]. Ein geringer Teil der hochaffinen B-Zellen verbleibt als B-Gedächtniszellen beispielsweise in der Milz [92]. Sie können über Jahre persistieren und im Falle eines erneuten Kontakt mit demselben Antigen ohne neuerliche Reifungsprozesse schnell reaktiviert werden [92].

**Tabelle 4: Darstellung unterschiedlicher Oberflächenmarker im Rahmen der B-Zell-entwicklung (modifiziert nach 85-90).**

B-Zellentwicklungsstufen	Exprimierte Oberflächenmarker						
Pro-B-Zelle	CD19		CD34		CD38		
Prä-Prä-B-Zelle	CD19	CD20	CD34	CD10	CD38		
Prä-B-Zelle	CD19	CD20		CD10	CD38		
Transitionale B-Zelle	CD19	CD20			CD38		
Naive B-Zelle	CD19	CD20			CD38		
IgM memory B-Zelle	CD19	CD20			CD38	CD27	
IgG memory B-Zelle	CD19	CD20			CD38	CD27	
IgA memory B-Zelle	CD19	CD20			CD38	CD27	
Plasmazelle	CD19				CD38		CD138

Reife, aber naive B-Lymphozyten können weiter in drei Subpopulationen unterteilt werden: B1-B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen, welche überwiegend T-Zell-unabhängig, unter dem Einfluss von dendritischen Zellen aktiviert werden und folliculäre B-Zellen, welche in ihrer weiteren Entwicklung T-Zell-abhängig sind und durch somatische Hypermutation und Antigen-gesteuerte Selektion zu hochaffinen, langlebenden Plasmazellen und Memory-B-Zellen werden [93].

Im Weiteren soll auf die B1-B-Zellen genauer eingegangen werden. Wichtig für spätere Interpretationen ist, dass viele Untersuchungsergebnisse bezüglich B1-B-Zellen aus Nagetierversuchen stammen und kaum humane Daten vorliegen [94]. B1-Lymphozyten, mit Ausnahme der B1b-Lymphozyten, auf die im Folgenden ebenfalls eingegangen wird, gehören im Gegensatz zu den folliculären B-Lymphozyten nicht zum adaptiven Immunsystem, da ihre Entwicklung T-Zell-unabhängig ohne Antikörperklassenwechsel und ohne Ausbildung von Gedächtniszellen erfolgt [94]. Allerdings erfüllen B1-B-Zellen viele Aufgaben ähnlich zu den übrigen B-Zellen, wie Antikörperproduktion und Antigenpräsentation [94]. B1-B-Zellen werden bereits aus Vorläuferzellen in der

Leber des Fötus gebildet und können sich peripher selbst erneuern, während die anderen B-Zell-Subpopulationen erst nach der Geburt gebildet werden und wie bereits beschrieben innerhalb des Knochenmarks erneuert werden [94]. B1-B-Zellen stellen somit die ersten reifen peripheren B-Zellen dar [94]. Nach ihrer Entstehung halten sich B1-Zellen insbesondere in Peritoneum und Pleura auf und nur selten in Milz oder Lymphknoten [95]. Hierbei scheint interessanterweise das pleuro-peritoneale Milieu die Funktion der B1-B-Lymphozyten zu beeinflussen [96,97]. So konnte eine durch *Toll-like*-Rezeptoren gesteuerte Migration von B1-B-Zellen aus dem Peritoneum über Omentum, Lymphknoten und/oder Blut zum Intestinum durch Ansel et al. beschrieben werden [98]. In der Mukosa des Intestinaltrakts können B1-B-Zellen Antikörper vom IgA-Typ produzieren [99]. Generell produzieren und exprimieren B1-B-Zellen jedoch überwiegend IgM-Antikörper und selten auch IgG-Antikörper der Subklasse 3 [94]. Die produzierten, löslichen Antikörper werden als natürliche Serumantikörper bezeichnet und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Abwehr von Bakterien und Viren. Für eine effektive Antigen clearance durch diese natürlichen Antikörper wird jedoch im Gegensatz zu spezifischen Antikörpern zusätzlich das Komplementsystem benötigt [100]. Die beschriebenen B1-assoziierten Immunglobuline enthalten vermehrt  $\lambda$ -Leichtketten und sind selektioniert für bestimmte VH-Typen, z.B. V<sub>H</sub>11 [101]. Die B-Zell-Rezeptoren, also Membran-gebundene Immunglobuline, der B1-Lymphozyten sind polyspezifisch mit einer geringen Affinität für mehrere Antigene [102]. Diese polyspezifischen Immunglobuline binden besonders an andere Immunglobuline, Autoantigene und Polysaccharide von Bakterien [102]. Aufgrund der T-Zell-unabhängigen Aktivierung der B1-B-Zellen finden kein Antikörperklassenwechsel und keine somatische Hypermutation statt [102]. Die aus B1-B-Zellen entstandenen Plasmazellen sind nur von kurzer Lebensdauer [93].

Die B1-B-Zell-Entwicklung hängt größtenteils von der Regulation der B-Zell-Rezeptor-Signalkaskade ab [103], auf die später auch noch weiter eingegangen wird. B1-Lymphozyten können unabhängig von ihrer Spezifität bei Bedarf schnell aktiviert werden [102]. Dies unterstreicht den angeborenen (= „innaten“)

Charakter dieses B-Zell-Subtyps [94]. Nach Griffin et al. besitzen humane B1-Lymphozyten den Phänotyp CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD69<sup>-</sup> CD70<sup>-</sup> [104,105]. Sie exprimieren außerdem hohe IgM-Level [106]. Murine B1-B-Zellen können anhand ihrer CD5-Expression unterschieden werden; so werden CD5<sup>+</sup> B1-B-Zellen auch B1a-Zellen genannt, CD5<sup>-</sup> B1-B-Zellen heißen auch B1b-Zellen [95,105]. Die Einteilung humaner B1-B-Zellen anhand ihrer CD5-Expression ist weniger einfach möglich, da CD5 auch auf anderen humanen B-Zell-Populationen exprimiert wird [105]. Im Gegensatz zu B1a-Zellen können Zellen des B1b-Subtyps bei Mäusen von Vorläuferzellen aus dem adulten Knochenmark abstammen [94]. Murine B1a- und B1b-Lymphozyten unterscheiden sich außerdem in der Expression des Plasmazellmarkers CD138 (= Syndecan-1) [107]. Neben morphologischen Unterschieden bestehen auch funktionelle Unterschiede zwischen B1a- und B1b-Zellen. So wird B1a-Zellen die Produktion natürlicher Serumantikörper zugeschrieben und B1b-Zellen die T-Zell-unabhängige Produktion von Antikörpern und auch die T-Zell-unabhängige Ausbildung von Gedächtniszellen [104,108]. B1b-Zellen zeigen somit viele funktionelle Ähnlichkeiten zu den folliculären B-Lymphozyten und werden daher auch eher dem adaptiven Immunsystem zugeordnet [109,110]. B1a-Lymphozyten hingegen entsprechen den oben beschriebenen B1-B-Zellen mit „innatem“ Charakter und Abstammung aus fötalen Vorläuferzellen [111].

Die Signaltransduktion innerhalb der B-Zellen nach der Bindung eines passenden Antigens, welche schließlich zur Aktivierung der B-Lymphozyten führt, ist komplex [112,113]. Der B-Zell-Rezeptor leitet nach der Antigenbindung ein Signal über assoziierte Ketten (Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ ) ins Zellinnere weiter [112,113]. Intrazellulär werden Kinasen der Src-Familie wie Lyn, Fyn und Blk aktiviert [112,113]. Aktivierte Src-Kinasen phosphorylieren Teile der Ig $\alpha$ - und Ig $\beta$ -Ketten, so dass daraufhin die Kinase Syk binden kann, welche ebenfalls phosphoryliert wird [112,113]. Syk phosphoryliert seinerseits das Protein BLNK (= SLP-65), welches zusammen mit der Kinase Btk die Phospholipase PLC $\gamma$ 2 aktiviert [112,113]. Die Phospholipase PLC $\gamma$ 2 kann in aktiviertem Zustand

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) hydrolysieren [112,113]. DAG und IP<sub>3</sub> dienen selbst wiederum als sekundäre Botenstoffe und regulieren so unter anderem Transkriptionsfaktoren [112,113]. IP<sub>3</sub> bindet an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER), dadurch kommt es zum Ausstoß von Calcium aus dem ER [112,113]. Durch eine Steigerung des intrazellulären Calciumspiegels kommt es schließlich zur Aktivierung von Calmodulin und so zur Aktivierung von Calcineurin [112,113]. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, der in den Zellkern wandert und dort die Transkription der DNA beeinflusst [112,113]. DAG aktiviert die PKC $\beta$ , die ihrerseits über mehrere Zwischenstufen den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert, welcher ebenfalls im Zellkern die Transkription der DNA beeinflusst [112,113]. Außerdem führt die Aktivierung über den B-Zell-Rezeptor (BCR) zur Aktivierung des G-Proteins Ras [112,113]. Durch GTP-Austauschfaktoren (GEFs) wird Ras in seine GTP-gebundene Form überführt und durch die Aktivierung von Ras werden die Kinasen Raf-1 und Mek aktiviert, welche anschließend die Transkriptionsfaktoren Erk1/2 aktivieren, welche wiederum innerhalb des Zellkerns die Transkription der DNA beeinflussen [112,113].

Zusätzlich erfolgt neben der Aktivierung über den BCR eine Ko-Stimulation über den CD19-Rezeptor [112,113]. Der Rezeptor CD19 wirkt verstärkend, indem er den Schwellenwert für die Aktivierung des BCR selbst herabsetzt. An den intrazellulären phosphorylierten Anteil des CD19-Rezeptors können zahlreiche Signalproteine, wie Vav, BCAP und PI3K, binden [112,113]. Die Bindung von PI3K bewirkt die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub> [112,113]. An PIP<sub>3</sub> wiederum können Proteine wie PDK1/2, Akt, Btk und PLC $\gamma$ 2 binden [112,113]. Akt kann die Kinase GSK-3 inaktivieren, wodurch der Transkriptionsfaktor NFAT nicht mehr phosphoryliert wird und dessen Inaktivierung abnimmt [112,113]. Neben dem B-Zell-Rezeptor stellt der BAFF-(*B cell activating factor*)-Rezeptor einen weiteren, für die Signalleitung wichtigen Rezeptor auf der Oberfläche von B-Zellen dar [112,113]. Auch inhibierende Rezeptoren der B-Zell-Oberfläche kommen vor; dazu zählen unter anderem CD22 und Fc $\gamma$ RIIB [112,113].



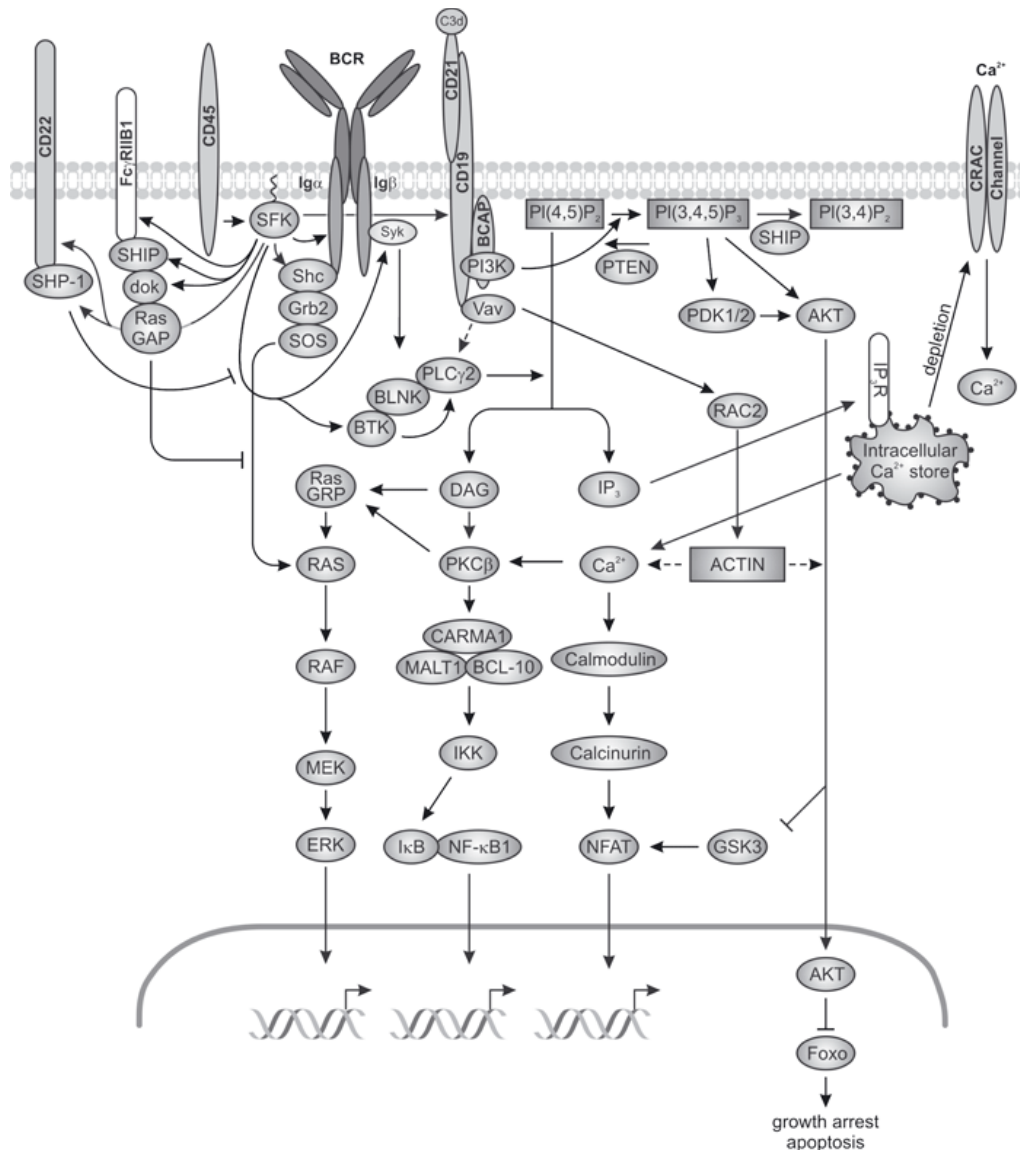


Abbildung 5: Signalkaskade innerhalb der B-Lymphozyten nach Bindung durch ein passendes Antigen (112, 114).

Auf BAFF (*B cell activating factor*), dessen Rezeptor im vorangegangenen Textabschnitt bereits erwähnt wurde, soll im Folgenden näher eingegangen werden. BAFF gehört zur Gruppe der Zytokine, genauer zur Untergruppe der TNF-Familie [114]. BAFF ist obligat für die Aktivierung, Differenzierung und das Überleben von B-Zellen [112]. Die Bildung von BAFF erfolgt durch neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [112]. Weitere Bezeichnungen für BAFF sind TNFSF13B (*tumor necrosis factor superfamily member 13B*), BlyS (*B lymphocyte stimulator*), TALL-1, zTNF4 oder CD257-

Antigen [114]. BAFF kann als Transmembranprotein und in ungebundener Form im Zytosol vorkommen [112]. In BAFF-defizienten *Knockout*-Mäusen zeigt sich eine gestörte B-Zell-Entwicklung mit stark in ihrer Anzahl reduzierten oder fehlenden folliculären B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen, wohingegen sich B1-Zellen normal entwickeln können [115]. Auch frühere Entwicklungsformen der B-Zellen im Knochenmark sind in ihrer Entwicklung BAFF-unabhängig [112]. Bei Mäusen mit einer Überexpression von BAFF treten gehäuft autoimmune Erkrankungen, im Sinne eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder eines Sjögren-Syndroms auf, so dass ein monoklonaler, gegen BAFF gerichteter humaner Antikörper namens Belimumab in Europa seit 2011 zur Behandlung des SLE zugelassen ist [116]. Für BAFF gibt es 3 Rezeptoren: den BAFF-Rezeptor (BAFF-R), der generell auf B-Zellen exprimiert wird, BCMA (*B-cell maturation antigen*), das hauptsächlich auf Plasmazellen exprimiert wird und TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin-ligand activator*), das insbesondere auf B1-Zellen vorkommt [115,117]. Die Wirkung von BAFF über TACI scheint sehr komplex und ist teilweise unverstanden, so dass auch eine apoptotische Wirkung auf B-Zellen über TACI vermittelt werden kann [118].

Eine weitere Form der Lymphozyten, die weder T-Zellen noch B-Zellen zuzuordnen ist, stellen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dar [119]. Sie zeigen an ihrer Oberfläche die Marker CD16 und CD56. Natürliche Killerzellen können im Gegensatz zu T-Zellen auch MHC-negative transformierte oder virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten (Konzept des „*missing self*“) [120]. Dies ist beispielsweise beim Cytomegalievirus (CMV) notwendig, da in CMV-infizierten Zellen die Expression von MHC-Molekülen gehemmt ist [2]. NK-Zellen zählen daher überwiegend zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem [119]. Da keine sogenannte Prägung notwendig ist, heißen diese Zellen natürliche Killerzellen. Durch die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche einer Zielzelle kann die Fähigkeit der NK-Zellen zum Abtöten infizierter Zellen noch erhöht werden [120]. Das Abtöten von Zielzellen erfolgt in diesem Fall durch die Induktion von Apoptose [121].

## **1.2. Akute myeloische Leukämie (AML)**

### **1.2.1. Begriffsdefinition Leukämie und Einteilung der Leukämien**

Der Begriff Leukämie leitet sich aus dem altgriechischen Wort λευχαιμία (leuchaimia) von λευκός (leukós) = weiss und αμα (haima) = das Blut her und wurde erstmals durch Rudolf Virchow Mitte des 19. Jahrhunderts geprägt, welcher in diesem Zusammenhang eine starke Vermehrung von Leukozyten bei einer bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht definierten Erkrankung beschrieb [122-124]. Um das Jahr 1890 unterschied Otto Naegeli erstmals myeloische und lymphatische Formen [125].

Die Leukämie bezeichnet heute eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen, welche durch die Entartung hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark definiert ist [126]. Die einzelnen Leukämieformen unterscheiden sich bezüglich ihrer Inzidenz, Ursachen und Therapiemöglichkeiten, ebenso wie in ihren Heilungsaussichten [123]. Anhand des klinischen Verlaufs werden heute eine akute und eine chronische Form unterschieden, wobei akute Leukämien durch einen raschen Verlauf innerhalb weniger Wochen bis Monate gekennzeichnet sind [127]. Sie zeigen meist eine hohe Anzahl leukämischer Zellen in Knochenmark und peripherem Blut, schwere Krankheitssymptome wie Infektanfälligkeit, hämorrhagische Diathese, Anämiesymptomatik und gegebenenfalls auch eine organspezifische Symptomatik bei Organbefall durch leukämische Blasten [127]. Chronische Leukämien hingegen verlaufen in der Regel weniger fulminant, symptomärmer und werden daher manchmal auch zufällig erstdiagnostiziert [127]. Anhand der Ursprungszelle im Knochenmark werden außerdem eine myeloische und eine lymphatische Form unterschieden [127].

**Tabelle 5: Einteilung der Leukämien.**

<b>Akute Leukämien</b>	<b>Chronische Leukämien</b>
<b>Akute myeloische Leukämien (AML)</b>	<b>Chronische myeloische Leukämien (CML)</b>
<b>Akute lymphatische Leukämien (ALL)</b>	<b>Chronische lymphatische Leukämien (CLL)</b>

Eine weitere Einteilung kann nach der Anzahl der Leukämiezellen im peripheren Blut erfolgen, wobei eine aleukämische Form ohne Nachweis von Leukämiezellen im peripheren Blut, eine subleukämische Form mit Nachweis von leukämischen Zellen im peripheren Blut bei normwertiger Gesamtleukozytenzahl und eine leukämische Form mit Nachweis vieler Leukämiezellen im peripheren Blut und erhöhter Gesamtleukozytenzahl unterschieden werden [127].

In Deutschland betragen die altersstandardisierten Inzidenzraten für die chronisch lymphatische Leukämie 4,1 (pro 100.000 Einwohner), für die akute myeloische Leukämie 3,1 (pro 100.000 Einwohner) und für die myeloproliferativen Neubildungen 2,4 (pro 100.000 Einwohner) [123]. Somit sind die aktuellen deutschen Inzidenzraten mit den Inzidenzraten des gesamteuropäischen Raums vergleichbar [128]. Männer sind generell häufiger von Leukämien betroffen als Frauen [123]. Die geschlechtsspezifische Auftretenswahrscheinlichkeit wird hierbei auf eine unterschiedliche Exposition der Geschlechter gegenüber umwelt- und arbeitsbedingten Risikofaktoren sowie auf hormonelle und genetische Faktoren zurückgeführt [129]. Mit Ausnahme der ALL, welche vorwiegend bei jüngeren Patienten auftritt, sind von der AML, CML und CLL besonders ältere Menschen betroffen [127]. So liegt hier das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 67 Jahren [127]. Das relative 5-Jahres-Überleben für alle Leukämiearten in Deutschland variiert je nach Geschlecht, Leukämiesubtyp und Altersgruppe stark zwischen 8 und 95 % [123,128].

Zunehmend fließen in die Unterteilung der Leukämien jedoch auch zytogenetische und molekularbiologische Merkmale ein [123,128]. Die Einteilung der hämatologischen Erkrankungen erfolgte bislang nach der 3. Revision der Internationalen Klassifikation der Krankheiten für die Onkologie (ICDO3), welche im Jahr 2000 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegeben wurde, sowie durch die hierdurch abgeleiteten *Classifications of Tumors of Haematopoietic and Lymphomatic Tissue* von 2001 und 2008 [130,131]. Für diese Einteilung werden insbesondere Zellreihe und Reife der Ursprungszelle herangezogen, aber auch weitere morphologische, genotypische, genetische, immunhistochemische sowie klinische Faktoren berücksichtigt [129]. Seit 2008 neu hinzugekommene wesentliche klinische, prognostische, morphologische, immunphänotypische und genetische Erkenntnisse führten zur Notwendigkeit einer Überarbeitung der WHO-Klassifikation der Leukämien, welche schließlich im Jahr 2016 erfolgte [132].

### **1.2.2. Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese und Symptomatik der akuten myeloischen Leukämie**

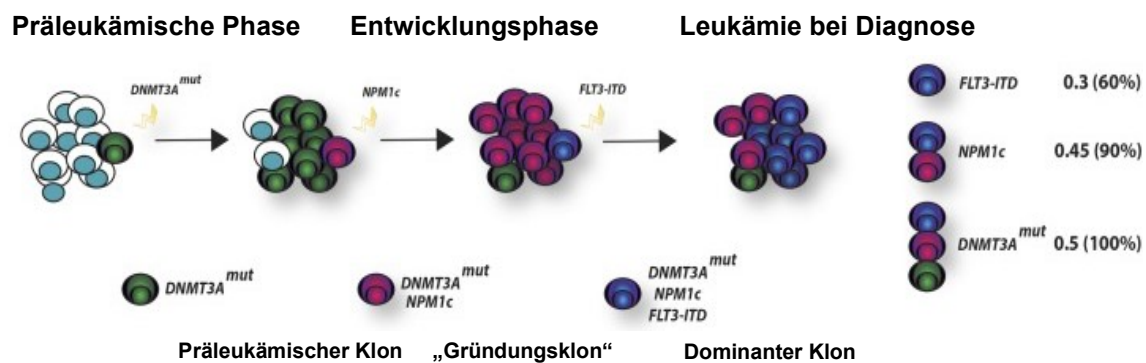
Die akute myeloische Leukämie bezeichnet eine heterogene Subgruppe der Leukämien, welche sich aus den myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark herleitet [133]. Sie stellt zudem eine der häufigsten hämatologischen Malignitäten der myeloischen Reihe beim Erwachsenen dar [127]. Ihre Erkrankungshäufigkeit liegt bei ca. 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [134]. Die Inzidenz steigt mit dem Alter an und liegt bei über 70-Jährigen bei über 100 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [127]. In einer schwedischen Registerstudie wurde ein Altersmedian von 72 Jahren berechnet [134]. Ein höheres Lebensalter bei Erstdiagnose wird dabei klassischerweise mit einer erhöhten Mortalität und somit auch mit einer schlechteren Gesamtprognose assoziiert [133].

Nach dem heutigen Verständnis wird die Entstehung einer AML, simultan zu anderen hämatoonkologischen Erkrankungen, als Resultat einer multifaktoriellen Genese angesehen [127]. Zu den bekanntesten Risikofaktoren wird beispielsweise die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung gezählt

[127]. So konnten leukämietytische chromosomale Abberationen besonders gehäuft in Überlebenden der Atombombenabwürfe auf Hiroshima und Nagasaki, aber auch aus Untersuchungen an nuklearer Energieerzeugung beobachtet werden [135,136]. Weitere mögliche Auslöser sind Benzole, Mineralölprodukte, Farben, Äthylenoxide, Herbizide, Pestizide und Arzneimittel wie Chloramphenicol und Phenylbutazon neben Zytostatika wie zum Beispiel Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Hemmer, welche oft zu einem charakteristischen Verlauf führen [137,138]. So erkrankten Patienten nach Alkylantienexposition, wie Nitrosaminharnstoffe und Cyclophosphamid, typischerweise mit einer Latenz von 4 bis 6 Jahren nach Substanzexposition [137,138]. Hierbei scheinen Aberrationen an den Chromosomen 5 und/oder 7 besonders gehäuft aufzutreten [137,138]. Im Gegensatz dazu führt die Anwendung von Topoisomerase-II-Hemmern wie Etoposid und Doxorubicin zu einer statistischen Häufung von Leukämien nach 1 bis 3 Jahren nach Exposition. Gehäufte Chromosomenaberrationen werden hier vor allen im Chromosom 11 (Bande q23) oder 17 (t(1;17)) beobachtet [137,138].

Analog der heute üblichen Charakterisierung werden Zytostatika-induzierte Leukämieformen auch als therapieassoziierte Leukämien bezeichnet [127]. Darüber hinaus können anhand ihrer Entstehung auch sekundäre Leukämien definiert werden [127]. Sie entstehen in der Regel auf dem Boden eines myelodysplastischen Syndroms (MDS), indem präleukäme Mutationen in den hämatopoetischen Vorläuferzellen kumulieren und schließlich zur Entwicklung einer akuten Leukämie führen [139]. Assoziiert mit einem komplex-aberranten Karyotyp dieser Erkrankungen, welcher mindestens drei numerische und/oder strukturelle Veränderungen pro Karyotyp umfasst, ist diese Leukämieunterform meist mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert [140,141]. Die de-novo-AML, zu der prozentual die meisten akuten myeloischen Leukämien gehören, entsteht im Gegensatz zu den therapieassoziierten und sekundären Leukämien spontan [142]. In der Pathogenese der de-novo-AML spielen in der Regel mehrere spontan auftretende Mutationen innerhalb der Blutstammzellen eine entscheidende Rolle [142]. Obwohl es einige Berichte von familiären AML-Fällen gibt, sind die überwiegende Zahl dieser Mutationen im Laufe des Lebens

spontan erworben und nicht erblich bedingt [143]. Entsprechend kann auch bei gesunden Probanden ab dem 60. Lebensjahr eine rasante Zunahme der präleukämischen Mutationen wie zum Beispiel DNMT3A, JAK2, TET2 oder SF3B1 festgestellt werden [144,145]. Dies unterstützt die Annahme, dass Leukämien, analog zu anderen Neoplasien wie den kolorektalen Karzinomen oder dem Mammakarzinom eine präkanzerogene Vorläuferphase durchlaufen [146,147].



**Abbildung 6: Klonale Evolution und Heterogenität akuter myeloischer Leukämien (modifiziert nach 145).**

Klonale Evolution einer akuten myeloischen Leukämie in einem hypothetischen Patienten. Die frühe Mutation im DNMT3A-Gen führt zur primären klonalen Vermehrung. Durch eine nachfolgende, additive NPM1c- und FLT3-ITD-Mutation entwickelt sich im Verlauf ein apoptoseresistenter, hyperproliferativer Leukämieklon.

Sogenannte balancierte Translokationen sind die häufigsten zytogenetischen Veränderungen der AML [146]. Hierrunter wird die Translokation, also Verlagerung eines Chromosoms oder eines Chromosomenabschnitts auf ein anderes Chromosom, verstanden, ohne dass die Gesamtmenge des Erbguts beeinflusst wird [148]. Erfolgt die Verlagerung zwischen nichthomologen Chromosomenabschnitten wird von einer reziproken (von lateinisch *reciprocus* = wechselseitig) Translokation gesprochen. Als Ergebnis dieser Rekombinationen können bestimmte Proto-Onkogene unter den Einfluss unterschiedlicher Transkriptionsverstärker, sogenannter Enhancer, geraten und so eine Dysregulation der Zelle entstehen [148]. Beispielsweise kann hier c-myc genannt werden, welches als Proto-Onkogen bei der T-Zell-Leukämie eine besondere Rolle spielt [149]. Bei einer weiteren Form der Translokation führen intrachromosomale Brüche im Bereich eines Introns zur Bildung eines chimären

Fusionsgens. Das bekannteste Beispiel ist hierbei die Translokation t(9;22)(q34;q11) im Rahmen der CML, welche zur Entstehung des sogenannten Philadelphia-Chromosoms führt [150]. Beim Philadelphia-Chromosom werden unter Erhalt des Leserahmens die N- bzw. C-terminalen Exone der Gene bcr und abl zu einem Fusionsgen (BCR-ABL) verknüpft [150]. Auch bei der akuten myeloischen Leukämie bestehen ähnliche Fusionsgene wie beispielsweise bei der Translokation t(9;11)(p22;q23) das Fusionsgen MLL-AF9 oder bei der Translokation t(6;11)(q27;q23) das Fusionsgen MLL-AF6 [151].

Die drei häufigsten Chromosomenanomalien der AML sind die Translokationen t(15;17) und t(8;21) sowie die Inversion inv(16) [133]. Hierbei sind, wie bereits erwähnt, insbesondere häufig Gene betroffen, welche für spezifische Schritte der hämatopoetischen Differenzierung und des Zellwachstums kodieren [152-154]. Interessanterweise konnte jedoch in einem tierexperimentellen Modell gezeigt werden, dass eine singuläre Mutation in einer myeloischen Vorläuferzelle alleine nicht ausreichen scheint, um eine AML-ähnliche Erkrankung auszulösen. Anhand dieses Tiermodells sind mindestens zwei Mutationen in einem unterschiedlichen Signalweg zur AML-Induktion notwendig [155].

Zusammenfassend lassen sich diese Erkenntnisse als 2-Stufen-Modell der Leukämogenese beschreiben. So beinhaltet die Leukämogenese erstens eine primär gesteigerte, über den Bedarf hinausgehende Zellproliferation und zweitens die mutationsbedingte Fähigkeit die Ausreifung zu immunkompetenten Zellen zu blockieren [156].

Neben den oben genannten strukturellen Aberrationen spielen jedoch auch epigenetische Regulationsmechanismen eine Rolle in der Pathogenese der AML [157]. Der physiologischerweise bestehende Einfluss der Epigenetik auf die Zellentwicklung zeigt sich eindrücklich bereits bei der Inaktivierung des zweiten weiblichen X-Chromosoms während der Embryogenese [158]. Hierbei liegt eine Hypermethylierung von Cytosinresten, welche nicht nur zur Ausschaltung einzelner Gene sondern zur Inaktivierung eines ganzen Chromosoms führen kann, zu Grunde [157]. Entsprechend werden hier

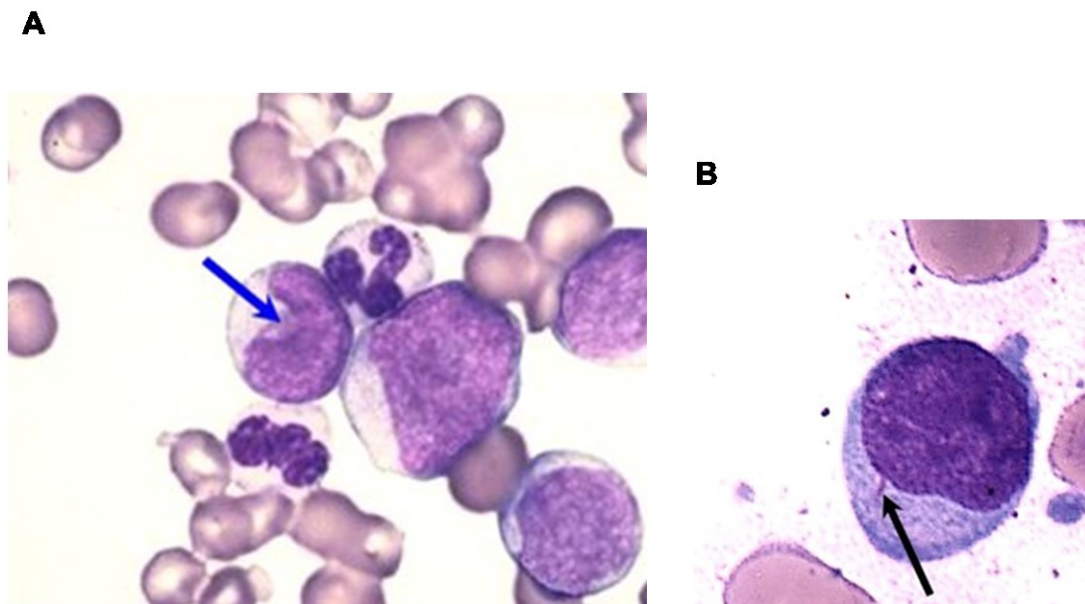


sogenannte CpG-Inseln (Cytosin-reiche Regionen) mit Hilfe der DNA-Methyltransferase methyliert, wodurch das nachgeschaltete Gen vermindert exprimiert wird [157]. Dieser epigenetische Regulationsmechanismus wird auch als transkriptionelles *silencing* bezeichnet [157]. Analog aktueller Daten konnten bereits in über 50% der menschlichen Gene CpG-Inseln und so eine konsekutive epigenetische Regulation nachgewiesen werden [157]. Insbesondere im Rahmen der AML scheint eine verstärkte Expression von DNA-Methyltransferasen zu einer Veränderung des Methylierungsmusters des Genoms und somit zur Deregulierung zahlreicher Signalwege zu führen [157].

Das Auftreten von klinischen Symptomen der AML erfolgt durch eine Zunahme der blastären Knochenmarksinfiltration mit einer nachfolgenden hämatopoetischen Insuffizienz [127]. Die ersten Symptome sind häufig unspezifisch [127]. Sie sind im Verlauf mit einer zunehmenden Anämie (Müdigkeit, Leistungsknick, Blässe), einer zunehmenden Neutropenie (häufige bakterielle Infektionen, insbesondere des Respirationstrakts, und Mykosen) und einer Thrombozytopenie (Petechien, Ekchymosen, Menorrhagien und Epistaxis) assoziiert [127]. Bei ca. 60 % aller Patienten finden sich im peripheren Blut eine Leukozytose und unabhängig von der Gesamtleukozytenzahl auch leukämische Blasten [127]. Bei einer sehr ausgeprägten Leukozytose (> 100.000 Leukozyten/ $\mu$ l) können aufgrund einer Leukostase weitere Symptome wie Hypoxie, retinale Blutungen und neurologische Symptome auftreten [127]. Daher wird die Leukostase als hämatologischer Notfall angesehen, welcher rasch die Einleitung einer zytoreduktiven Therapie oder einer Leukapherese erfordert [127]. Weniger häufig gibt es auch bei der AML aleukämische Verläufe, welche meistens bei sekundären Leukämien und älteren Patienten zu finden sind [127]. Extramedulläre Manifestationen betreffen beispielsweise die Haut und Schleimhäute, Zahnfleisch, Meningen, Milz und Leber und werden überdurchschnittlich häufig bei einer myelomonozytären/monozytären Differenzierung der AML beobachtet [159-161].

### 1.2.3. Diagnostik und Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie

Wie bereits erwähnt, erfolgen die Diagnosestellung und Klassifikation der AML in Anbetracht der großen Heterogenität der Erkrankung anhand ätiologischer, morphologischer, zytochemischer, immunhistologischer, zyto- und/oder molekulargenetischer Merkmale [162]. Mittels lichtmikroskopischer Beurteilung eines Blut- oder Knochenmarksausstrichs kann häufig eine erste Zuordnung der malignomsuspekten Zellen getroffen werden [163]. Neben der Quantifizierung der Blastenzahl spielen dabei morphologische Kriterien, wie zum Beispiel die Kern-Plasma-Relation oder Zelleinschlüsse wie Granula oder Auerstäbchen, eine Rolle [163].



**Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung myeloischer Blasten im peripheren Blut (Quelle: Bildergalerie der American Society of Hematology; Photographie von Peter Masalak 2002-2009).**

A: Darstellung myeloischer Blasten einer therapieassoziierten akuten myeloischen Leukämie im peripheren Blut mit charakteristischem *Thumbprint*-Zeichen (blauer Pfeil), (MacNeal Tetrachrome 1000x).  
B: Ausstrich des peripheren Blutes mit Nachweis eines spezifischen Auer-Stäbchens (schwarzer Pfeil).

Zur weiteren Differenzierung werden ergänzend Enzymaktivitäten von Myeloperoxidase (MPO)/Peroxidase (POX), Esterase (Non-specific-Esterase = NSE) und das Vorhandensein von Glykogengranula (PAS-Färbung) mit zytochemischen Verfahren nachgewiesen [163,164]. Die lichtmikroskopische Beurteilung, die sogenannte Zytologie, stellt somit den Ausgangspunkt einer jeden hämatologischen Stufendiagnostik dar [163].

Ein weiterer diagnostischer Schritt ist die Immunphänotypisierung, welche mit Hilfe spezifischer Antikörper distinkte Antigene auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma leukämischer Blasten nachweist [163]. Während der Hämatopoese exprimieren Zellen, entsprechend ihres Ausreifungsgrades, verschiedene Oberflächenantigene [163]. Daher ist es möglich, unter Verwendung verschiedener Progenitormarker, eine genaue Zuordnung der Blasten bezüglich ihres Reifegrads zu treffen [163]. Zusammen mit zelllinienspezifischen Markern, wie zum Beispiel CD19 für B-Zellen, kann dann eine dominante Linienzugehörigkeit bestimmt werden [165,166].

**Tabelle 6: Übersicht über ausgewählte Marker für die Bestimmung der Zelllinienzugehörigkeit im Rahmen der Immunphänotypisierung (modifiziert nach 163-166).**

<b>Progenitormarker</b>	<b>Zelltyp</b>
CD34, CD117	Hämatopoetische Vorläuferzellen
CD10	B- und T-Vorläuferzellen, Zellen des Knochenmarkstromas, Granulozyten
HLA-DR	Progenitorzellen aller drei Zellreihen, besonders myeloischer Blasten
TdT	Lymphatischer Progenitorzellmarker

Mit der Untersuchung der Zytogenetik mittels Chromosomenanalyse bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kann neben morphologischen, zytochemischen und immunhistologischen Untersuchungen ein weiterer Kernpunkt der Diagnostik der AML genannt werden [163]. Bei AML-Patienten konnten bereits über 50 strukturelle Chromosomenaberrationen identifiziert werden [133,167]. Die folgende Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über häufige Chromosomenaberrationen.

**Tabelle 7: Übersicht über häufige chromosomale Aberrationen der AML (modifiziert nach 133, 167).**

Karyotypenveränderung	Gene	Morphologisches Korrelat (analog FAB-Subtyp)	Inzidenz
<b>Balancierte Translokationen/Inversionen</b>			
t(8;21)(q22;q22)	RUNX1;RUNX1T1	M2 mit Auerstäbchen	6 %
inv(16)(p13q22) / t(16;16)(p13;q22)	CBFB;MYH11	M4Eo	7 %
t(15;17)(q22;q11-21)	PML;RARA	M3/M3v	7 %
t(9;11)(p22;q23)	MLL;AF9	M5	2 %
t(6;11)(q27;q23)	MLL;AF6	M4 und M5	~1 %
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)	EVI1;RPN1	M1, M4, M6, M7	~1 %
t(6;9)(p23;q34)	DEK;NUP214	M2, M4	~1 %
<b>Unbalancierte Chromosomenstörungen</b>			
+8		M2, M4 und M5	9 %
-7/7q-		Keine Präferenz eines FAB-Subtyps	7 %
-5/5q-		Keine Präferenz eines FAB-Subtyps	7 %
-17/17p-	TP53	Keine Präferenz eines FAB-Subtyps	5 %
-20/20q-		Keine Präferenz eines FAB-Subtyps	3 %
9q-		Keine Präferenz eines FAB-Subtyps	3 %
+21		M4, M4Eo	3 %
+22		Keine Präferenz eines FAB-Subtyps	
+13		M0, M1	2 %
+11	MLL1	M1, M2	2 %
<b>Komplexer Karyotyp</b>			10 %
<b>Normaler Karyotyp</b>			44 %

Neben Patientenalter und Vorerkrankungen stellt der Karyotyp den wichtigsten Prognosefaktor der AML dar [168-170]. Zytogenetisch kann die AML in drei Gruppen unterteilt werden: erstens AML mit normalem Karyotyp, zweitens AML mit einer balancierten Translokation und drittens AML mit einer unbalancierten Karyotypenveränderung [163]. Aus dieser zytogenetischen Einteilung lässt sich auch eine klinisch relevante, prognostische Einteilung ableiten [163]. Einer prognostisch günstigen Gruppe können zum Beispiel die AML t(8;21)(q22;q22) oder die AML inv(16)(p13q22) zugeordnet werden. Zu einer prognostisch ungünstigen Gruppe zählen akute myeloische Leukämien mit einem komplex aberranten Karyotyp [169,171]. Besondere Erwähnung findet hierbei die AML t(15;17)(q22;q12) oder auch Promyelozytenleukämie genannt, welche aufgrund ihrer zytogenetischen Zuordnung und unter Therapie mit konventionellen Zytostatika zur Gruppe mit einer intermediären Prognose gezählt wurde [163]. Seit der Anwendung von Arsen und All-trans-Retinolsäure können jedoch exzellente Heilungsraten erreicht werden, welche häufig sogar eine Stammzelltransplantation überflüssig machen [172]. Wie bereits erwähnt, spielen epigenetische Regulationsmechanismen wie DNA-Methylierungen oder posttranslationale Modifizierungen von Histonproteinen während der Zelldifferenzierung und -entwicklung eine wichtige Rolle, so dass zukünftig auch epigenetische Untersuchungen in der Diagnostik und Prognoseeinschätzung der AML an Bedeutung gewinnen könnten [173].

Seit 1976 erfolgt die Einteilung der Leukämien anhand zytomorphologischer Kriterien, der Zelllinienzugehörigkeit und des Differenzierungsgrads der Leukämiezellen innerhalb der FAB (*French-American-British-Group*)-Klassifikation [174]. Diese Klassifikation ist aufgrund ihrer Übersichtlichkeit, Verfügbarkeit und Kostengünstigkeit auch heute noch im klinischen Alltag neben der aktuell gültigen WHO-Klassifikation von Bedeutung. Die Klassifikation ist nachfolgend in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: *French-American-British-(FAB-)Klassifikation der AML (modifiziert nach 174).*

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Morphologisches Korrelat	Inzidenz
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	Unreife Blasten ohne Granulation	5 %
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	weniger als 10 % reife Zellen (= Promyelozyten, Granulozyten, Monozyten), nur spärliche Granulation	15 - 20 %
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	≥10 % reife Zellen in der Myelopoese, weniger als 20 % Monozyten	25 - 30 %
M2baso	Akute Basophilen-Leukämie		5 %
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie	30 % Promyelozyten (Blastenanteil oft deutlich weniger)	5 - 10 %
M3v	Akute Promyelozyten-Leukämie, mikrogranuläre Form		3 %
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloische Zellen (Blasten + Promyelozyten) > 20 %, monozytäre Zellen (Monoblasten und reife Formen) 20 % bis 80 %	20 %
M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie		5 - 10 %
M5	Akute Monoblasten/Monozyten-Leukämie	Mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten	5 %
M5a	Akute Monoblasten-Leukämie		
M5b	Akute Monozyten-Leukämie		
M6	Akute Erythroleukämie	>50 % aller Zellen sind Erythroblasten oder >30 % aller Blasten unter den nichterythrozytären Zellen sind Erythroblasten, häufig trilineäre Dysplasie	5 %
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	Hochgradig pleomorphe Blasten	5 %

---

Seit 2001 wird die AML - wie auch viele andere Tumorentitäten - nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes eingeteilt [175]. Diese zuletzt 2016 überarbeitete Systematik berücksichtigt weiterhin die morphologischen und immunhistochemischen Kriterien der FAB-Klassifikation zur Unterscheidung der einzelnen AML-Subtypen [132]. Zusätzlich bezieht diese WHO-Klassifikation auch molekulargenetische Merkmale und klinische Parameter ein [132]. Die folgende Tabelle 9 stellt die Besonderheiten der WHO-Klassifikation im Einzelnen dar.

**Tabelle 9: 2016 überarbeitete WHO-Klassifikation akuter myeloischer Leukämien (adaptiert und modifiziert nach 131).**

Akute myeloische Leukämie mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien
AML mit t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
APL (Akute Promyelozytenleukämie) mit PML-RARA
AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
AML mit t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2, MECOM
AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
Vorläufige Entität: AML mit BCR-ABL1
AML mit mutiertem NPM1
AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA
Vorläufige Entität: AML mit mutiertem RUNX1
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien
Akute myeloische Leukämie ohne weitere Kategorie ( <i>not otherwise specified</i> , NOS)
AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0)
AML ohne Ausreifung (FAB M1)
AML mit Ausreifung (FAB M2)
Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (FAB M5a/b)
Reine Erythroleukämie (FAB M6)
Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)
Akute Basophilenleukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose (Synonym: akute Myelofibrose; akute Myelosklerose)
Myeloisches Sarkom (Synonym: extramedullärer myeloischer Tumor, Chlorom)
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom
Transiente abnormale Myelopoese (Synonym: TAM, transientes myeloproliferatives Syndrom)
Down-Syndrom assoziierte myeloische Leukämie
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit
Akute undifferenzierte Leukämie



Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (abgekürzt MPAL für englisch <i>mixed phenotype acute leukemia</i> ) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) und (v;11q23.3); KMT2A-Rearrangement
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL), B/myeloisch, (nicht anderweitig spezifiziert, NOS)
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL), T/myeloisch, (nicht anderweitig spezifiziert, NOS)

Meistens ist durch die oben genannten diagnostischen Schritte die Diagnose akute myeloische Leukämie problemlos zu stellen. Dennoch sind in der folgenden Tabelle 10 mögliche Differentialdiagnosen aufgezählt.

**Tabelle 10: Differentialdiagnosen der AML (modifiziert nach Siegenthaler W, Lehrbuch Differentialdiagnose innerer Krankheiten, 2000, Kapitel 19.6.)**

Differentialdiagnose	Unterscheidung
Akute lymphatische Leukämie	Knochenmarkszytochemie (POX-/Esterasepositivität), Immunphänotypisierung, Zytogenetik, Molekulargenetik.
Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit	Knochenmarkszytochemie (POX-/Esterasepositivität), Immunphänotypisierung.
Virusinfektionen (z.B.: Parvovirus B19, EBV, CMV, HIV)	Virusnachweis (PCR, Ag oder serologisch), fehlender Nachweis von Blasten in peripherem Blut oder Knochenmark.
Myelodysplastische Syndrome	< 20 % Blasten im Knochenmark.
Perniziöse Anämie	Anamnese, Vitamin B12- und Folsäurespiegel, Knochenmorphologie (Megaloblasten).
Aplastische Anämie	Knochenmarkmorphologie (Aplasie), Zytogenetik.
Leukämisch verlaufende Lymphome	fehlender Nachweis von myeloischen Blasten in peripherem Blut oder Knochenmark, Immunphänotypisierung, ggf. Nachweis erhöhter Interleukin-2-Rezeptor-Spiegel.
Myeloproliferative Syndrome	< 20 % Blasten im Knochenmark (Ausnahme Blastenkrise bei der CML), häufig keine Anämie oder Thrombozytopenie, Zytogenetik (t(9;22)), Molekulargenetik (BCR-ABL, JAK2-Mutation).

#### **1.2.4. Therapiemöglichkeiten der akuten myeloischen Leukämie**

Initial führte die AML unbehandelt innerhalb eines Jahres bei allen Patienten zum Tod [176]. Erste Therapieversuche mit Röntgenstrahlung, Radiophosphor, Urethan oder Mustargen hatten kaum einen therapeutischen Effekt [177]. Komplette Remissionen und Langzeiterfolge konnten erstmals unter Daunorubicin und Cytarabin erreicht werden [178-180]. Heute stehen konventionelle Zytostatika wie Doxorubicin, Cytarabin oder Etoposid, demethylierende Substanzen wie 5-Azacytidin oder Decitabine und die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung [181]. Zunehmend werden auch neue Substanzen, welche im Rahmen zielgerichteter Therapien auf spezifische Pathomechanismen ausgerichtet sind, angewandt. Dies sind beispielsweise Arsentrioxid und All-Trans-Retinolsäure (ATRA) [172,182]. Das aktuelle Verständnis über die Pathogenese der AML begründet den stattgehabten Wandel von monomorphen Therapieregimen hin zu multimodalen Behandlungsansätzen [183]. Diese sind in der folgenden Abbildung 8 aufgeführt. Grundsätzlich kann die Therapie der AML in eine Induktionstherapie mit dem Ziel der kompletten Remission (CR) und die Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie) zur Erhaltung der CR aufgeteilt werden [181].

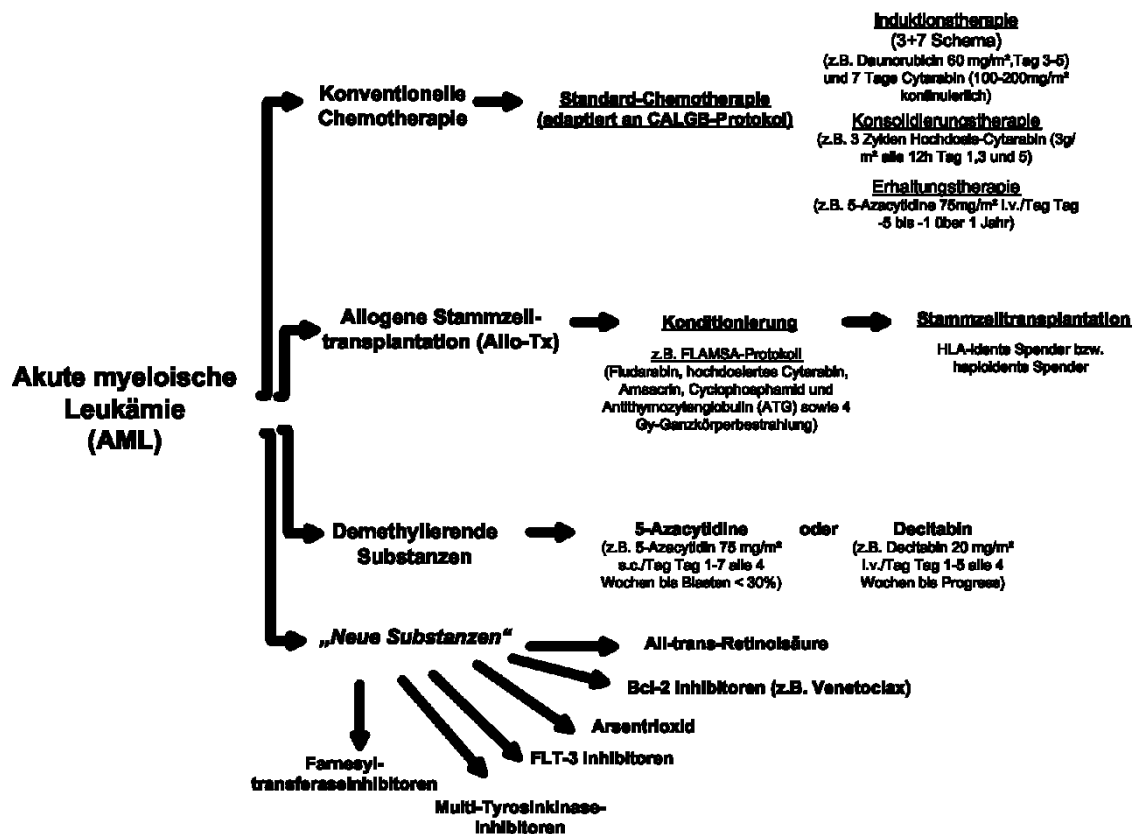


Abbildung 8: Schematische Darstellung aktueller Therapiemöglichkeiten der AML (adaptiert nach 177-183).

Die Wahl der Therapie erfolgt unter anderem nach Patientenalter, Komorbiditäten und Zytogenetik. Beispielsweise würde für jüngere Patienten mit einem günstigen/intermediären Karyotyp eher eine konventionelle Induktionstherapie analog dem 7+3-Schema gewählt werden. Patienten mit einem ungünstigen Karyotyp oder einem Rezidiv erhalten bevorzugt eine allogene Stammzelltransplantation. Palliative Therapiekonzepte für ältere Patienten oder Patienten mit schweren Komorbiditäten enthalten zum Beispiel demethylierender Substanzen. Neue Substanzen wie FLT-3-Inhibitoren, Tyrosinkinaseinhibitoren oder All-trans-Retinolsäure können hingegen in der Primärtherapie wie auch in der Palliativtherapie zum Einsatz gebracht werden.

Als Therapieziel in der AML ist die Heilung bzw. das Erreichen einer kompletten Remission (CR) definiert [181]. Dabei bezeichnet die komplette Remission einen Zustand, bei welchem nach Abschluss der Therapie keine klinischen, laborchemischen oder zytogenetischen Krankheitsmerkmale nachzuweisen sind [181,184]. Konkret bedeutet dies, dass nach Abschluss der Induktionstherapie die Gesamtleukozytenzahl <10.000/μl, die Zahl der neutrophilen Granulozyten >1.500/μl und die Zahl der Thrombozyten >100.000/μl betragen soll [181]. Außerdem muss die Anzahl der Blasten im Knochenmark weniger als 5 % betragen und es dürfen keine extramedullären Manifestationen der AML vorliegen [181]. Diese Angaben entsprechen auch

den Empfehlungen der deutschen AML Studiengruppen (AML Cooperative Group Münster und AML Cooperative Group München). Der Beginn einer Therapie sollte unabhängig vom Therapieregime direkt nach der Diagnosestellung erfolgen [181]. Laut Sekeres et al. führt eine Therapieverzögerung um mehr als 5 Tage bei jüngeren AML-Patienten zu einem signifikanten Rückgang von Prognose und Gesamtüberleben [185].

In Abhängigkeit von Patientenalter, Komorbiditäten und Zytogenetik erfolgt die Wahl der Primärtherapie [181]. Bei günstigem oder intermediärem Karyotyp kann bei Patienten, die jünger als 65 Jahre sind, häufig eine klassische Doppelinduktionstherapie durchgeführt werden [183]. Diese Induktionstherapie wird in der Regel nach einem klassischen 7+3-Schema verabreicht, wenngleich die überwiegende Anzahl der AML-Patienten heute im Rahmen von Studien therapiert werden. Das 7+3-Schema enthält eine Dauertherapie mit Cytarabin ( $100 - 200 \text{ mg/m}^2$  i.v., Tag 1 - 7) mit zusätzlichen drei Applikationen eines Anthrazyklins (meist Daunorubicin  $60 \text{ mg/m}^2$  i.v., Tag 3 - 5) [186].

Als primär therapierefraktär werden Patienten bezeichnet, welche nach ein bis zwei Zyklen Induktionstherapie kein Therapieansprechen zeigen. Diese Patienten werden daraufhin in der Regel allogene Stammzell-transplantiert [181].

Ist nach abgeschlossener Induktionstherapie eine CR erreicht, wird eine Konsolidierungstherapie angeschlossen [181]. Die Zusammensetzung und Form der Konsolidierungstherapie richtet sich dabei nach dem Zustand des Patienten und nach dem Risikoprofil der AML [181]. Cytarabin dient auch innerhalb der Konsolidierung als Hauptsubstanz (in der Regel in einer Dosis von  $3-4 \text{ g/m}^2$ ) [181]. Alternativ steht auch die allogene Stammzelltransplantation in der Konsolidierung zur Verfügung [181].

Nach Beendigung der Konsolidierungstherapie kann sich eine einjährige Erhaltungstherapie anschließen, welche zur Verminderung des Rezidivrisikos dienen soll, im Rahmen der RATIFY-Studie wurde hierfür beispielsweise Midostaurin eingesetzt [181,187].

Eine allogene Stammzelltransplantation kann bei Hochrisikopatienten mit einem komplexen Karyotyp frühzeitig erfolgen, da diese Patienten oft schlechte Ansprechraten auf Chemotherapien und ein hohes Rezidivrisiko zeigen [188]. Die allogene Stammzelltransplantation besteht aus einer Konditionierungsphase und der eigentlichen Stammzelltransplantation durch einen möglichst HLA-identen Fremd- oder Familienspender [189]. Bei fehlendem HLA-identen Spender, was in ca. 10-20 % der Transplantationen vorkommt, kann eine Spende auch durch einen haploidenten Familienspender erfolgen [189]. Die haploidente Transplantation kann allerdings wegen der inkompletten HLA-Kompatibilität zu vermehrten Komplikationen und somit auch schlechteren Transplantationsergebnissen führen [189]. Hierauf wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen.

Können aus verschiedenen Gründen wie beispielsweise einem hohen Patientenalter oder Komorbiditäten, weder eine klassische Chemotherapie, noch eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden, besteht eine palliative Therapiesituation, in welcher die demethylierenden Substanzen 5-Azacytidin und Decitabin eingesetzt werden können [190]. Eine passagere Kontrolle der Blastenzahl mit konsekutiver Erholung der Hämatopoese, geringeren Blutungskomplikationen und reduziertem Transfusionsbedarf ist das Ziel einer palliativen Therapie [190]. Dies führt auch zu einer verbesserten Lebensqualität der Patienten [190]. Insbesondere Patienten mit sekundären myeloischen Leukämien aus MDS werden einer palliativen Therapie zugeführt, da diese häufig höheren Lebensalters sind und zahlreiche Vortherapien vorweisen und somit nur selten für intensivere Therapieregime geeignet sind [190].

In der Rezidivsituation wird nach allgemeinem Konsens zunächst eine remissionsinduzierende Reinduktionstherapie mit beispielsweise Cytarabin, gefolgt von einer Konsolidierung mittels einer allogenen Stammzelltransplantation, falls möglich, durchgeführt. Weitere Optionen werden im Rahmen von Studien geprüft. [191,192].

Des Weiteren stehen heute in der Therapie der AML neben den bereits genannten Möglichkeiten einige neuere Substanzen zur Verfügung, welche sowohl in der Primärtherapie, als auch in der Rezidivsituation eingesetzt werden können [190]. Dabei ist zunächst die Anwendung von Arsentrioxid und All-Trans-Retinolsäure (ATRA) bei der Promyelozytenleukämie (PML) zu nennen [172]. Die Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, zu welchen beispielweise Midostaurin zählt, stellen eine weitere Substanzgruppe dar [190]. Diese inhibieren die FLT3-Rezeptortyrosinkinase, welche bei ca. 30% aller AML-Patienten aktiviert ist. Diese Aktivierung ist mit einer schlechteren Gesamtprognose zusammenhängend [193]. Frühe FLT3-Inhibitoren, zu welchen Sunitinib, Midostaurin und Lestaurtinib gehören, zeigten präklinisch vielversprechende Ergebnisse; allerdings konnten viele dieser Substanzen in klinischen Studien keinen andauernden Benefit zeigen. Bestenfalls zeigte sich ein vorübergehender Abfall der Blastenzahl im peripheren Blut [194]. Die anschließend entwickelten Zweitgenerations-FLT3-Inhibitoren wie Quizartinib zeigen eine verbesserte Rezeptorspezifität, eine gute Verträglichkeit und in ersten klinischen Studien auch eine verbesserte Wirksamkeit [194]. Jedoch scheint eine rasche Resistenzentwicklung *in vivo* stattzufinden, welche auf eine durch FLT3-Inhibition induzierte Überexpression der antiapoptotischen Proteine Survivin und Bcl-xl zurückgeführt wird [195,196]. Die Rolle der FLT3-Inhibitoren in Kombination mit bekannten etablierten Therapien oder aber auch anderen zielgerichteten Therapien ist aktuell Gegenstand weiterer Studien [194]. Sorafenib als weiterer Multityrosinkinaseinhibitor inhibiert neben FLT3 auch VEGFR2, Kit (=CD117 oder c-Kit oder Stammzellfaktor-Rezeptor), PDGFR und Raf [190]. In klinischen Phase-I/II-Studien konnten mit Sorafenib in Kombination mit Clofarabin, Cytarabin oder Idarubicin gute Ansprechraten mit Komplettremissionen in bis zu 75% der Fälle gezeigt werden [197-199]. Sorafenib sowie weitere Tyrosinkinaseinhibitoren werden derzeit in Kombination mit konventionellen Chemotherapieregimen in Phase-III-Studien getestet [194,200,201].

Als letzte Gruppe der „neuen Substanzen“ sollen hier Farnesyltransferaseinhibitoren beschrieben werden. Die G-Proteine Rho, Ras und Rac

besitzen in der Pathogenese der AML eine wichtige Schlüsselrolle. Die posttranslationale Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung von Ras, Rho oder Rac ist für deren biologische Funktion unerlässlich [190]. Ohne die Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung ist eine Membranlokalisation nicht möglich und die Aktivierung durch die ebenfalls membrangebundenen GTP-Austauschfaktoren (GEF/GAP) bleibt aus [202]. Rho und Ras können somit nicht an der Signaltransduktion der Zelle mitwirken [202]. Beispiele für Farnesyltransferaseinhibitoren sind die Substanzen Lonafarnib (SCH663366) und Tipifarnib (R115777). Diese zeigten bei einem tolerablen Nebenwirkungsprofil in klinischen Phase-I/II-Studien ein Therapieansprechen von 10 - 30 % [203-205]. Bei insgesamt sehr heterogenem Therapieansprechen auf Farnesyltransferaseinhibitoren in den getesteten Patientenkollektiven, zeigten einzelne Patienten auch komplette Remissionen. Es konnten bisher jedoch keine Patientensubgruppen sicher identifiziert werden, welche von dieser Therapie im Speziellen profitieren. In einer Phase-II-Studie mit Tipifarnib zeigten Patienten mit einer sekundären akuten myeloischen Leukämie die besten Ansprechraten [206].

Abschließend hängt die Prognose der akuten myeloischen Leukämie nach heutigem Kenntnisstand von Zytogenetik, Molekularbiologie, Alter und Komorbiditäten des Patienten ab [206]. Zur Abschätzung der Prognose stehen mehrere Prognoseindizes zur Verfügung. Angewendet werden kann der AML-Post-Remission-Treatment (PRT)-Score. Dieser wurde im Rahmen der AML96-Studie entwickelt und berechnet eine Prognose anhand des Zusammenhangs zwischen erhobenen, möglichen Vorhersagevariablen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Überlebenszeit nach kompletter Remission nach Chemotherapie oder allogener Stammzelltransplantation [207]. Damit trifft der PRT-Score zum einen eine Aussage über die allgemeine Überlebenswahrscheinlichkeit und zum anderen identifiziert er Patienten, welche aufgrund ihres Risikoprofils vermutlich von einer Postremissionstherapie profitieren [207]. Die Berechnung des PRT-Scores erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{PRT-Score} = 0,02017 \times (\text{Alter in vollendeten Lebensjahren}) + 0,51305 \times (1, \text{ wenn zyto-genetisch Hochrisiko oder sekundäre AML, } 0 \text{ in allen anderen Fällen}) + 0,69896 \times (1, \text{ wenn die FLT3-ITD Ratio} > 0,8 \text{ ist, } 0 \text{ in allen anderen Fällen}) - 1,27241 \times ((\% \text{ CD34-positive Blasten} + 1)^{-0,5})$$

Ein weiterer Prognosescore von Pastore et al. kombiniert klinische und molekulare Kriterien [208]. Es werden dabei Karyotyp, Patientenalter, Leukozytenzahl und ECOG-Performance-Status berücksichtigt [208]. Der ECOG-Performance-Status ist ein System, welches bei Patienten mit malignen Tumoren Einschränkungen der Aktivität und Selbstversorgung im Alltag bewertet [209].

## **1.3. Multiples Myelom**

### **1.3.1. Begriffsdefinition**

Das multiple Myelom (MM), auch Plasmozytom oder Morbus Kahler genannt, ist eine maligne Erkrankung des Knochenmarks, welche durch eine monoklonale Vermehrung der Plasmazellen gekennzeichnet ist [210,211]. Die Erkrankung wird anhand der WHO-Kriterien den B-Zell-Lymphomen zugeordnet [210,211]. Die hier pathologisch vermehrten, monoklonalen Plasmazellen produzieren häufig komplette oder inkomplette Immunglobuline, welche auch Paraproteine genannt werden [210,211].

### **1.3.2. Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese und Symptomatik des Multiplen Myeloms**

Das Multiple Myelom macht ca. 1 % aller Krebserkrankungen aus [212]. Unter den hämatologischen Neoplasien ist das Multiple Myelom jedoch die dritthäufigste Erkrankung nach Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen [212]. Die Inzidenz beträgt 4 - 6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [212]. Wie auch bei der AML korreliert die Erkrankungshäufigkeit mit dem zunehmenden Alter. So liegt das mediane Erkrankungsalter für Männer bei 71 Jahren und bei 73 Jahren für Frauen [128,213]. Die Inzidenzrate zeigt sich insgesamt über die letzten Jahre konstant [213,214]. Neben der alters-



spezifischen Variabilität gibt es auch geschlechtsspezifische Unterschiede [210,211]. So tritt die Erkrankung bei Männern etwas häufiger auf als bei Frauen [210,211]. Ferner bestehen ethnische Unterschiede, wobei Afroamerikaner in etwa doppelt so häufig erkranken, verglichen mit der weißen US-amerikanischen Bevölkerung [215-217]. Interessanterweise scheint auch ein erhöhter Body-Mass-Index mit einer erhöhten Erkrankungsrate einherzugehen [218,219]. Eine familiäre Häufung scheint ebenso möglich, ist jedoch selten. So ist das Risiko an einem Myelom zu erkranken um den Faktor 3,7 erhöht, wenn ein Verwandter ersten Grades ebenfalls betroffen ist [220].

Insgesamt ist die Ätiologie des Multiplen Myeloms im Detail unklar. Neben der bereits erwähnten Adipositas werden in der Literatur chronische Infektionen und die Exposition gegenüber Pestiziden sowie ionisierender Strahlung als mögliche Risikofaktoren aufgeführt [221-224]. Typischerweise zeigt sich vor dem Auftreten eines Multiplen Myeloms eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) [225,226]. Beim sogenannten MGUS handelt es sich um eine hämatologische Variante mit Vermehrung eines Paraproteins im peripheren Blut, ohne dass die Diagnosekriterien eines Myeloms erfüllt sind [227]. Die Konzentration des Paraproteins im Serum darf dabei nur bis zu 3 g/dl betragen, die Anzahl der Plasmazellen im Knochenmark muss kleiner als 10 % sein und Plasmazelldyskrasie-assoziierte Symptome wie Hyperkalzämie, Nierenfunktionseinschränkung, Anämie oder Osteolysen (sog. CRAB-Kriterien) dürfen nicht vorhanden sein [227]. Die MGUS-Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter, wobei in Europa bei ca. 2 % aller Erwachsenen ein MGUS diagnostiziert werden kann [228,229]. Auch beim MGUS liegt das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 70 Jahren, Männer sind häufiger betroffen als Frauen und auch Afrikaner oder Afroamerikaner zeigen eine erhöhte Prävalenz [230]. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich aus einem MGUS ein MM oder eine andere lymphoproliferative Erkrankung entwickelt, liegt bei ca. 1 % pro Jahr [231].

Oft ist die Symptomatik des MM unspezifisch und sehr unterschiedlich [232,233]. Dies führt nicht selten dazu, dass die Symptomatik bereits mehrere Monate besteht, bevor die Diagnose MM gestellt wird [232,233]. Dahingegen

sind bis zu 25 % aller Patienten mit MM bei der Diagnosestellung beschwerdefrei [232,233]. Die häufigste Symptomatik umfasst *Fatigue*, in ca. 40 % der Fälle, welche oft durch eine begleitende Anämie bedingt ist [212]. Außerdem bestehen skelettale Beschwerden in ca. 60 % der Fälle, welche häufig im Bereich des Stammskeletts lokalisiert sind und durch Knochendestruktion verursacht werden [212]. Dies kann zusätzlich zu Symptomen einer Hyperkalzämie führen, welche in 10 - 20 % der Fälle auftritt [212]. Ein weiteres Symptom ist die Infektneigung, welche ebenfalls 10 - 20 % der Patienten mit MM betrifft und zumindest teilweise durch einen sekundären Antikörpermangel bedingt ist. Zu einem Gewichtsverlust kommt es bei etwa 25 % der Patienten [215,234]. Eine Proteinurie führt klinisch zu schäumendem Urin und laborchemisch zur einer Nierenfunktionsverschlechterung. Die vermehrt gebildeten Immunglobulin-Leichtketten werden glomerulär filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert. Ist jedoch die Kapazität dieses Mechanismus der Rückresorption ausgereizt, kommt es zum Ausscheiden der Immunglobulin-Leichtketten über den Urin [235]. Zur einer Ausfällung von Leichtketten in den Nierentubuli in Form von Eiweißzylindern kann es bei Patienten mit MM kommen, wenn das sogenannte Tamm-Horsfall-Protein vorhanden ist [215,234]. Das Tamm-Horsfall-Protein – auch Uromodulin genannt – ist ein Protein, welches in den Zellen des aufsteigenden Schenkels der Henle'schen Schleife gebildet und anschließend nach einer proteolytischen Spaltung in das Lumen der Nierentubuli freigesetzt wird [236,237]. Es besteht die Annahme, dass das Tamm-Horsfall-Protein die Niere vor Nierensteinbildung und Harnwegsinfekten schützt [238]. In Gegenwart von Leichtketten, abhängig von deren Ladungen und Tertiärstruktur, kann Uromodulin zu einer Proteinausfällung in den Tubuli führen [239,240]. Die ausgefällten Proteine wirken direkt toxisch auf die Zellen der Nierentubuli und führen so zu einem Verlust der Nierenfunktion, was auch als Cast-Nephropathie bezeichnet wird [239,240]. Ferner können als Zeichen eines Hyperviskositätssyndroms beim MM Seh- und Gedächtnisstörungen, Schwindel, Kopfschmerzen, Angina pectoris, Angina abdominalis, Krampfanfälle oder ein Koma vorkommen [241]. Durch die vermehrte Bildung von Immunglobulinen wird die Viskosität des Bluts

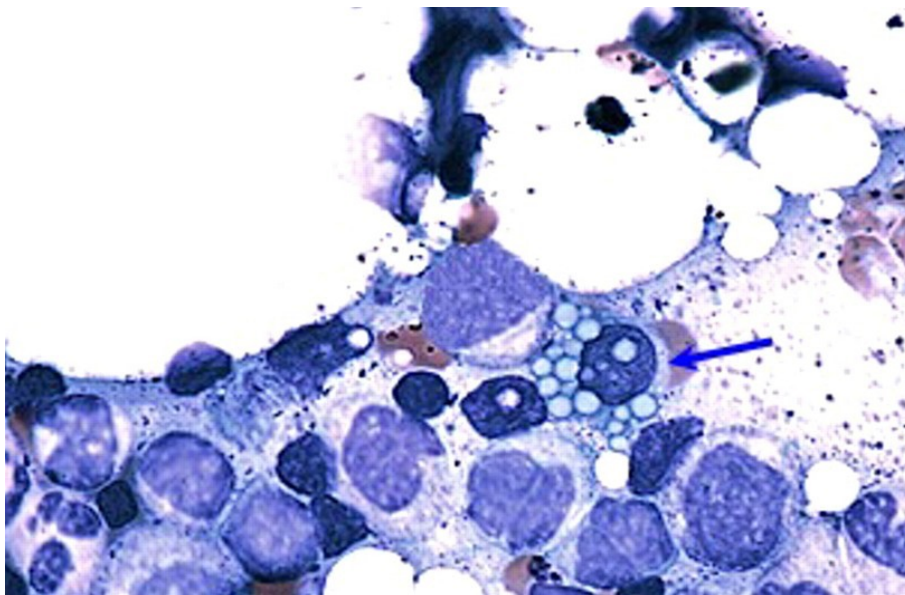
erhöht und es kommt zu Störungen der Mikrozirkulation [241]. Insgesamt ist das Hyperviskositätssyndrom beim MM eher selten; es kommt wesentlich häufiger beim Morbus Waldenström vor [242]. Des Weiteren kann als Folge eines MM eine AL-Amyloidose auftreten, welche durch Ablagerungen fehlgefalteter Proteine bedingt ist [242]. Diese Ablagerungen können prinzipiell alle Organe betreffen und sind je nachdem, welches Organ betroffen ist, symptomatisch [242]. Am häufigsten ist die Niere betroffen, wodurch es zu einer Nierenfunktionsverschlechterung mit einer führenden Albuminurie kommt [242]. Am Herz führen amyloidotische Ablagerungen zu einer Verdickung von Septum und Herzwand, einer diastolischen Relaxationsstörung und einer Proarrhythmie. Im Gastrointestinaltrakt kann es durch Amyloidablagerungen zu Diarrhoe und Gewichtsverlust kommen, in der Leber zu Organomegalie und Insuffizienz [242]. Amyloidotische Ablagerungen im autonomen und peripheren Nervensystem verursachen orthostatische Dysregulation und periphere Neuropathien [243,244].

Eine extramedulläre Erkrankung liegt vor, wenn monoklonale Plasmazellherde außerhalb des Knochenmarks gefunden werden [245]. Dies kommt entweder bei der Plasmazell-Leukämie, bei Weichteiltumoren mit direkter Verbindung zu ossären Manifestationen oder aber durch eine hämatogene Aussaat von Plasmazellen in Organe oder Weichteile vor [246]. Die Diagnose extramedullärer Manifestationen erfolgt häufig (Schnitt-)bildgebend, da diese klinisch inapparent sein können. Insgesamt ist das Auftreten extramedullärer Manifestationen beim MM mit einer ungünstigen Prognose verknüpft [245].

### **1.3.3. Diagnostik, Klassifikation und Stadieneinteilung des multiplen Myeloms**

Die Einteilung des MM erfolgt nach der Art des produzierten monoklonalen Immunglobulins und der entsprechenden Immunglobulin-Leichtkette [215]. Am häufigsten kommen IgG- und IgA-Myelome sowie Leichtkettenmyelome vor, bei welchen nur inkomplette Immunglobuline, sogenannte freie Leichtketten gebildet werden [215]. Diese drei Unterformen machen etwa 90 % der Myelomerkrankungen aus [215]. Selten kommen auch MM vor, die IgD, IgE

oder IgM produzieren [215]. Eine Unterscheidung zwischen dem IgM-produzierenden MM und anderen IgM-sezernierenden Erkrankungen wie zum Beispiel dem Morbus Waldenström gelingt meistens durch das Vorliegen von Osteolysen beim MM sowie durch die Feststellung einer erhöhten Inzidenz bestimmter Translokationen in der FISH-Analyse, wie zum Beispiel t(11;14), t(14;16), t(4;14) und t(14;20) [247].



**Abbildung 9: Darstellung von Myelomzellen im Knochenmarksausstrich (Quelle: Bildergalerie der American Society of Hematology; Photographie von Peter Masalak 2002-2009).**

Darstellung von Myelomzellen (sogenannten Mott-Zellen) mit teilweise großtropfigen, bläulichen Russell-Körperchen (blauer Pfeil). Diese stellen ebenso wie die Dutcher-Körperchen eine Speicherung von Immunglobulinen dar.

Als Sonderform des MM ist zum einen das solitäre Plasmozytom zu nennen. Darunter wird ein solitärer Plasmazelltumor verstanden, ohne dass eine systemische Erkrankung vorliegt [215]. In der WHO-Klassifikation werden solitäre ossäre Plasmazytome und solitäre extraossäre, extramedulläre Plasmazytome unterschieden [215]. Zur Diagnostik muss eine Biopsie genommen werden [215]. In kurativer Intention kann eine lokale Radiatio durchgeführt werden, wobei bis zu 50 % der Patienten in der Folge dennoch eine systemische Erkrankung entwickeln [248-250]. Eine weitere Sonderform ist ein MM mit einer primären Manifestation im zentralen Nervensystem (ZNS). Diese Form des MM ist sehr selten [251]. Zur Diagnostik müssen bei klinischem

Verdacht eine zerebrale Bildgebung und eine Liquorpunktion durchgeführt werden [251]. Des Weiteren existiert eine sehr seltene Sonderform des MM, welche anstatt osteolytischer Läsionen ausschließlich sklerotische Manifestationen aufweist [252]. Als zusätzliche, hier diskutierte Sonderform des MM soll das POEMS-Syndrom genannt werden. Dies ist eine seltene Erkrankung, welche auf einer klonalen Plasmazellvermehrung – wie beim MGUS – beruht [252]. Diese Erkrankung ist bei allen Patienten durch eine Polyneuropathie gekennzeichnet [252]. Weitere in den Diagnosekriterien enthaltenen Symptome wie sklerotische Knochenläsionen, Organomegalie, Lymphadenopathie, Ödeme, Ergüsse, Hautveränderungen, eine Thrombozytose und andere Symptome sind optional [253]. In Abhängigkeit der Größe und Anzahl der Knochenläsionen wird die Therapie des POEMS-Syndroms festgelegt. Zur Auswahl stehen hierbei die Radiatio und Systemtherapien analog zum multiplen Myelom, worauf in Abschnitt 1.3.4. näher eingegangen wird [253].

Zur Diagnostik des MM werden die Vorgaben *der International Myeloma Working Group* (IMWG) verwendet [254]. Diese sind in der folgenden Tabelle 11 aufgeführt.

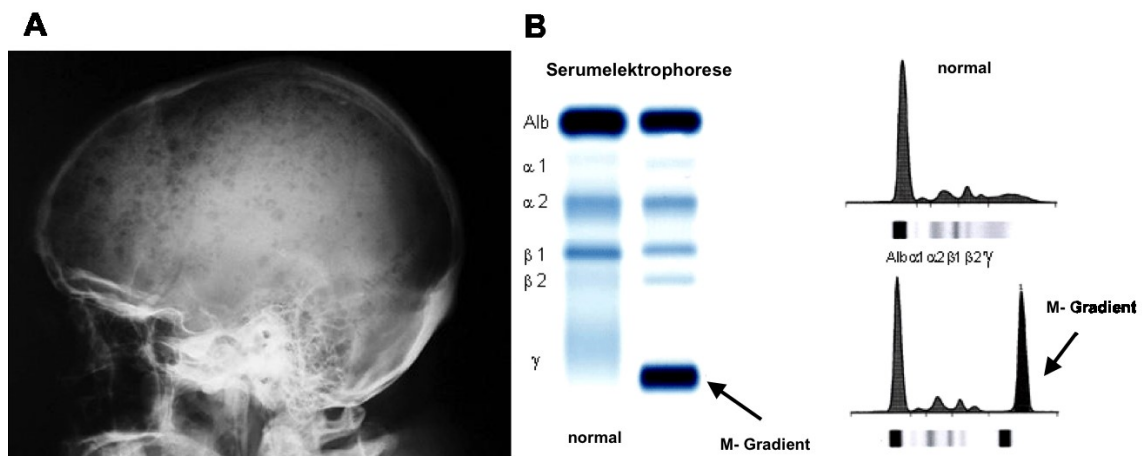
**Tabelle 11: Diagnose des Multiplen Myeloms (adaptiert und modifiziert nach 254).**

Bei einem multiplen Myelom liegen mindestens 10 % oder mehr Plasmazellen im Knochenmark vor. Zusätzlich kann ein monoklonales Protein in Serum und Urin nachweisbar sein. Außerdem bestehen Endorganschäden nach den sogenannten CRAB-Kriterien. CRAB steht für: Hyperkalzämie (englisch: *hypercalcemia*), Niereninsuffizienz (englisch: *renal insufficiency*), Anämie (englisch: *anemia*) und ossäre Manifestationen (englisch: *bone lesions*). Bei einem smouldering Myelom sind ebenfalls mindestens 10 % oder mehr Plasmazellen im Knochenmark nachweisbar. Des Weiteren sind mindestens 30 g/l oder mehr monoklonale Paraproteine im Serum nachweisbar. Im Unterschied zum multiplen Myelom bestehen jedoch keine Endorganschäden. Beim MGUS sind weniger als 10 % monoklonale Plasmazellen im Knochenmark vorhanden. Auch liegt der Anteil des monoklonalen Paraproteins im Serum bei unter 3 g/dl und es bestehen auch hier keine Endorganschäden. Beim solitären Plasmozytom sind ebenfalls weniger als 10 % Plasmazellen im Knochenmark nachweisbar. Der Nachweis von monoklonalem Paraprotein in Serum und Urin ist nicht obligat. Es bestehen keine Endorganschäden. Es zeigt sich eine solitäre Osteolyse mit oder ohne zugehörigem Weichteiltumor, wobei lokal das Vorkommen von monoklonalen Plasmazellen histologisch gesichert sein muss. Bei der Plasmazelleukämie zählt als diagnostisches Kriterium der Nachweis von mindestens oder mehr als  $2 \times 10^9$  monoklonalen Plasmazellen pro Liter peripherem Blut. Zusätzlich können auch mehr als 20 % der Zellen des Differentialblutbildes Plasmazellen sein.

Diagnose	Multiples Myelom (symptomatisch)	Smouldering Myelom (asymptomatisch)	MGUS	Solitäres Plasmozytom	Plasmazelleukämie
Kriterien					
klonale Plasmazellen im Knochenmark	>= 10 %	>= 10 %	< 10 %	< 10 %	
	und/oder	und/oder	und	und	
monoklonales Protein im Serum	nachweisbar	>= 3 g/dl	< 3 g/dl	nicht obligat nachweisbar	
	und/oder			und	
monoklonales Protein im Urin	nachweisbar			nicht obligat nachweisbar	
Endorganschäden (CRAB-Kriterien)	nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	
				und	
andere Manifestationen				solitäre Osteolyse +/- Weichteiltumor	>= $2 \times 10^9$ /l klonale Plasmazellen im Blut
					und/oder
				klonale Plasmazellen bioptisch gesichert	> 20 % Plasmazellen im Differentialblutbild

Stellt sich ein Patient mit dem Verdacht auf ein MM vor, werden die im

Folgenden aufgezählten Untersuchungen im Rahmen der Diagnostik durchgeführt. Die allgemeine Diagnostik enthält neben einer Anamnese und körperlichen Untersuchung eine Laboruntersuchung mit Differentialblutbild, plasmatischer Gerinnung, Elektrolyten (insbesondere Kalzium), Nierenretentionsparametern, GPT, LDH, Gesamteiweiß mit Serumelektrophorese, Immunfixation in Serum und Urin sowie eine quantitative Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM im Serum. Außerdem werden freie Kappa- und Lambda-Leichtketten im Serum, sowie die Eiweiß- und Leichtkettenausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt. Eine weitere wichtige Bestimmung ist die von  $\beta$ 2-Mikroglobulin im Serum [255-257].



**Abbildung 10: Radiologische und laborchemische Parameter des Multiplen Myeloms (Quelle: Drugs & Diseases, Mulligan EM 2012 (A) und Dr. M. Murali and the Clinical Immunology Laboratory, Massachusetts General Hospital (B)).**

A: Darstellung einer konventionellen Röntgenaufnahme des Schädels (seitlich) mit dem Nachweis typischer „schrotschussähnlicher“ Osteolysen. B: Abbildung einer Serumelektrophorese mit der Darstellung eines normwertigen Befundes und eines monoklonalen, myelomtypischen Gamma-Gradienten (M-Gradient).

Ergänzend erfolgt eine bildgebende Abklärung. Hierbei kamen früher konventionelle Röntgenuntersuchungen nach dem sogenannten Pariser-Schema zur Anwendung, welche jedoch heute aufgrund der Verfügbarkeit schnittbildgebender Verfahren, welche in Spezifität und Sensitivität deutlich überlegen sind, kaum noch verwendet werden [258]. Zur Diagnostik ossärer Läsionen wird in der Regel eine Low-Dose-Ganzkörper-Computertomographie ohne Kontrastmittel angewendet [259]. Auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) kann im Rahmen der bildgebenden Diagnostik durchgeführt werden,

wenn beispielsweise der Verdacht auf extramedulläre Manifestationen oder eine neurologische Symptomatik besteht; sie gehört bisher jedoch noch nicht zur Standarddiagnostik [259]. Auch die Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) gehört nicht zur Standarddiagnostik bei der Erstdiagnose; sie kann jedoch bei extramedullären Manifestationen und zur frühen Beurteilung eines Therapieansprechens eingesetzt werden. [260,261].

Bei Patienten mit Verdacht auf eine kardiale Amyloidose oder bei Patienten vor einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen oder einer Hochdosistherapie sowie bei Patienten unter einer Therapie mit Proteasominhibitoren wird generell eine Echokardiographie empfohlen [262,263].

Die Knochenmarkspunktion (Zytologie und Histologie) dient einerseits der bioptischen Sicherung der Diagnose und zum anderen weiterführenden genetischen Untersuchungen wie Zytogenetik, konventionelle Chromosomenanalyse und FISH [252]. Auch im Rezidiv oder zur Remissionskontrolle können erneute Knochenmarkspunktionen sinnvoll sein [264]. Im Falle eines solitären Plasmozytoms erfolgt die bioptische Sicherung aus der ossären Läsion [252].

Als minimale Resterkrankung (englisch *minimal residual disease*, MRD) wird ein Zustand bezeichnet, bei welchem die Patienten nach gutem Ansprechen auf eine Therapie quantifizierbare monoklonale Plasmazellen zurückbehalten [265]. Diese verbliebenen Zellen lassen sich mittels PCR, Durchflusszytometrie oder PET-CT nachweisen [265]. Wie auch bei der AML nimmt der Stellenwert genetischer Untersuchungen in Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapieplanung beim Myelom weiter zu [266]. Beispielsweise ist für Patienten mit einer Translokation t(4;14) eine ungünstige Prognose beschrieben [265]. Diese Patienten können durch eine Bortezomib-haltige Therapie jedoch gut behandelt werden [265]. Daher ist die Untersuchung auf eine Translokation t(4;14)(p16;q32) durch FISH in der Erstdiagnostik empfohlen [265]. Außerdem weisen Patienten mit einer Deletion del17p13 eine ungünstige Prognose auf [265]. Diese Patienten sollten einer intensivierten Therapie oder einer Stammzelltransplantation zugeführt werden [265]. Daher sollte auch diese genetische Variation mittels FISH untersucht werden [265]. Ein weiteres



Beispiel einer genetischen Veränderung mit einer ungünstigen Prognose stellt die Amplifikation von Chromosom 1q21 und die Deletion 1p dar. Auch diese sollten dementsprechend untersucht werden [265].

Aufgrund der oben genannten Beispiele wurden unter anderem von der *International Myeloma Working Group* und der *Mayo Clinic* genetische Untersuchungen zur Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapieplanung in der Literatur diskutiert und empfohlen [267,268].

Die Stadieneinteilung des Myeloms erfolgt nach der Salmon-Durie-Klassifikation, welche 1975 erstmals benutzt wurde [269,270]. Diese Klassifikation erlaubt eine Einschätzung der vorliegenden Tumormasse anhand klinischer Parameter [269,270]. Auch eine prognostische Einschätzung lässt sich teilweise ableiten [269,270]. Eine Übersichtsdarstellung dieser Klassifikation findet sich in der nachfolgenden Tabelle 12.

**Tabelle 12: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon (adaptiert nach 269,270).**

	<b>Stadium I</b> (alle Kriterien müssen erfüllt sein)	<b>Stadium II</b>	<b>Stadium III</b> (mindestens 1 Kriterium muss erfüllt sein)
<b>Hämoglobin</b>	> 10 g / dl	weder Stadium I noch III	< 8,5 g/dl
<b>Serumkalzium</b>	normal	weder Stadium I noch III	erhöht
<b>Osteolysen</b>	Keine oder maximal 1 Herd	weder Stadium I noch III	fortgeschritten, ausgeprägte Knochendestruktion
<b>Paraprotein</b>	IgG < 50 g/l (Serum) IgA < 30 g/l (Serum) Bence-Jones-Protein < 4 g/24 h (Urin)	weder Stadium I noch III	IgG > 70 g/l (Serum) IgA > 50 g/l (Serum) Bence-Jones-Protein > 12 g/24 h (Urin)

	<b>Zusatzbezeichnung A</b>	<b>Zusatzbezeichnung B</b>
<b>Nierenfunktion</b>	Kreatinin ≤ 2 mg/dl	Kreatinin > 2 mg/dl

Aufgrund verschiedenster Fortschritte in der Medizin, wie beispielsweise in der Bildgebung, werden unterschiedliche Weiterentwicklungen dieser Klassifikation diskutiert [271]. Von der *International Myeloma Working Group* wurde 2005 das

*International Staging System* (ISS) herausgegeben. Diese Klassifikation teilt Patienten in prognostische Subgruppen ein und verwendet hierfür die Parameter Albumin und  $\beta$ 2-Mikroglobulin im Serum [272]. Vorteilhaft werden an dieser Klassifikation insbesondere die Einfachheit und die prognostische Aussagefähigkeit angesehen. Auch für diese neuere Klassifikation wurden in der Vergangenheit diverse Modifikationen vorgeschlagen [273-275]. Eine Übersicht dieser Klassifikation findet sich im Folgenden ebenfalls in tabellarischer Form (Tabelle 13).

**Tabelle 13: International Staging System (ISS) (269, 272).**

	<b>Serumkonzentration</b>	<b>Medianes Überleben in Monaten</b>
<b>Stadium I</b>	$\beta$ 2-Mikroglobulin $\leq$ 3,5 mg/l und Albumin $\geq$ 3,5 g/dl	62
<b>Stadium II</b>	weder Stadium I noch Stadium III	44
<b>Stadium III</b>	$\beta$ 2-Mikroglobulin $>$ 5,5 mg/l	29

Weitere neue Klassifikationen berücksichtigen unter anderem genetische Marker und neue bildgebende Verfahren wie MRT und PET-CT [276].

Für die Vorhersage der Prognose des Multiplen Myeloms werden, wie auch bei anderen hämatologischen Neoplasien, konstitutionelle Marker wie ECOG-Performancessstatus, Alter und Komorbiditäten herangezogen [269,270]. Darüber hinaus spielen weitere Marker, wie Serum-LDH, Plasmazellproliferation, extramedulläre Manifestationen, Endorganschädigung und das Vorliegen einer leukämischen Ausschwemmung von Plasmazellen eine Rolle [269,270]. Aktuell kommt genetischen Markern, wie oben bereits erwähnt, eine zunehmende Bedeutung zu [277]. Die Translokationen t(4;14), t(14;16) und t(14;20), die Deletionen 17p und 1p, sowie der Zugewinn von 1q hängen mit einer ungünstigen Prognose zusammen [269,270]. Auch die Aberrationen Monosomie 13 und Deletion 13q stehen mit einer ungünstigen Prognose in Zusammenhang, wobei der isolierte Nachweis einer Deletion 13q nicht mit einer schlechten Prognose verbunden ist [267]. Die genetischen prognostischen Determinanten können auch therapeutisch genutzt werden. So konnten

Bergsagel et al. für Hochrisiko-Patienten mit einer Translokation t(4;14) einen Benefit bei der Therapie mit Bortezomib und einer autologen Stammzelltransplantation zeigen, wodurch die zunächst ungünstige Prognose verbessert werden kann [278]. Ähnlich hierzu konnte für Patienten mit einer prognostisch ungünstigen Deletion 17p ein Vorteil im progressionsfreien Überleben (englisch *progression free survival*, PFS) und Gesamtüberleben (englisch *overall survival*, OS) durch eine Kombinationstherapie aus Bortezomib und autologer Stammzelltransplantation gezeigt werden [279]. Insgesamt muss allerdings gesagt werden, dass aktuell noch keine allgemeingültige Übereinstimmung bezüglich der Nutzbarkeit genetischer Daten zur Prognoseabschätzung und Therapieplanung besteht.

#### **1.3.4. Therapiemöglichkeiten des Multiplen Myeloms**

Die Indikation zur Therapieeinleitung besteht bei Patienten mit einem symptomatischen Myelom, bei welchen die oben genannten CRAB-Kriterien zutreffen, wobei die Indikation gegeben ist sobald ein Kriterium zutrifft [269,270]. Diese beinhalten eine Hyperkalzämie von mehr als 2,75 mmol/l oder 10,5 mg/dl im Serum oder 0,25 mmol/l oberhalb des oberen Normwertes. Außerdem eine Niereninsuffizienz mit einem Kreatininwert von mehr als 2,0 mg/dl oder 173 µmol/l. Des Weiteren eine Anämie mit einem Hämoglobinwert von kleiner als 10,0 g/dl absolut oder mehr als 2,0 g/dl unterhalb des unteren Normwertes und eine Knochenbeteiligung [280]. Eine Erweiterung der CRAB-Kriterien stellen die SLiM-Kriterien dar, welche 2014 von der IMWG definiert wurden. Diese enthalten eine Plasmazellinfiltration im Knochenmark von mehr als 60 % (*sixty*), eine Erhöhung des Verhältnis von beteiligter zu unbeteiligter freier Leichtkette im Serum auf größer gleich 100, wobei die absolute Konzentration der beteiligten freien Leichtkette mehr als 100 mg/l betragen muss (*light chain*) und der Nachweis von mehr als einer fokalen Läsion im Ganzkörper-MRT (*magnetic resonance imaging, MRI*) [280]. Neben der in den CRAB- und SLiM-Kriterien enthaltenen Symptomen können auch weitere Symptome wie Schmerzen, ein Hyperviskositätssyndrom oder eine B-Symptomatik Behandlungsindikationen darstellen [269,270].

In der Therapie des Multiplen Myeloms stehen viele verschiedene Methoden und Substanzen zur Verfügung über deren Einsatz kein abschließender Konsens herrscht, so dass generell empfohlen ist, Patienten, wenn immer möglich, innerhalb von Studien zu behandeln [269,270]. Die Entwicklung neuer Medikamente und Verfahren führte innerhalb der letzten 30 Jahre zu einem deutlich verbesserten Gesamtüberleben bei Myelompatienten [280]. An Therapieoptionen stehen klassische Chemotherapeutika, Kortikosteroide, neue zielgerichtete Therapien und die autologe und allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung [280]. Ein möglicher Therapiealgorithmus ist in der unten aufgeführten Tabelle 14 dargestellt [281,282].

**Tabelle 14: Therapiealgorithmus des Multiplen Myeloms nach Erstdiagnose (analog 280-282 und uptodate/HEME/Initial Treatment MM).**

WW: *watch-and-wait* = abwartendes Verhalten; A: Doxorubicin; auto Tx: autologe Stammzelltransplantation; auto-allo Tx: autologe und nachfolgend allogene Stammzelltransplantation; Bo: Bortezomib; C: Cyclophosphamid; D: hochdosiertes Dexamethason; d: niedrigdosiertes Dexamethason; L: Lenalidomid; M: Melphalan; P: Prednisolon; T: Thalidomid; HD: Hochdosistherapie.

Patient	asymptomatisch	symptomatisch			
	WW	behandlungsbedürftig			
Behandlungsstrategie		für HD geeignet			für HD nicht geeignet
genetische Risikokonstellation		del17p	t(4;14)	andere	-
Induktion		BoCD/BoLD/BoAD/BoD		BoCD/BoLD/BoAD/LAD/Ld/BoLCD/BoD/BoThD	BoCD/BoMP/BoMP-BoTh/BoAD/BoD/Ld/MPTTh/MPL-L
Konsolidierung		HD mit auto-Studie allo Tx	HD mit auto Tx	HD mit auto Tx	-
Erhaltung		WW/Bo/L	Bo-haltig	WW/Bo/L	WW/Bo/L

Als Behandlungsziel bei Patienten mit einem symptomatischen Myelom ist eine Remission mit Symptomkontrolle und Vermeidung von krankheitsbedingten

Komplikationen definiert [280]. Eine Heilung der Erkrankung kann meistens nicht erreicht werden, so dass Patienten im Verlauf verschiedene Therapien durchlaufen und dieser Aspekt für die Wahl der Therapie berücksichtigt werden muss. Nach Erstdiagnose und Feststellung der Therapieindikation können die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt werden [280]. Patienten, welche für eine Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation geeignet sind und Patienten, welche nicht für eine Hochdosistherapie geeignet sind [280]. Patienten, die sich für eine Hochdosistherapie eignen, erhalten in der Regel eine Induktionstherapie mit einer Kombination aus Thalidomid, Lenalidomid, Bortezomib, Anthrazyklinen, Stickstoff-Lost-Verbindungen oder Dexamethason vor einer nachfolgenden autologen Stammzelltransplantation [281]. Thalidomid und Lenalidomid sowie die neuere Substanz Pomalidomid gehören zur Gruppe der Immunmodulatoren [281]. Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid sind zur oralen Einnahme verfügbar [281]. Alle drei Substanzen können in verschiedenen Kombinationen eingesetzt werden und sind Bestandteil diverser Studien. Nebenwirkungen enthalten Neutropenie und Thrombozytopenie, Infektionen, thromboembolische Komplikationen und Neuropathien [281]. Aufgrund des teratogenen Potentials dieser Substanzen gelten spezielle Verschreibungsrichtlinien. Lenalidomid zeigt auch nach einer Vortherapie mit Thalidomid Wirkung [283].

Bortezomib ist ein Proteasominhibitor und Hauptelement vieler Therapieregime in Erst- und Rezidivtherapie [284]. In Kombination mit Dexamethason und den immunmodulatorischen Substanzen wurden synergistische Effekte gezeigt [285]. Bei Patienten, welche für eine Hochdosistherapie mit nachfolgender Transplantation geeignet sind, wurde durch die Verwendung von Bortezomib in der Kombination eine Verbesserung der Ansprech- und Remissionsraten gezeigt [286,287]. Auch bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und/oder Dialysepflichtigkeit kann Bortezomib zum Einsatz kommen [288]. Nebenwirkungen enthalten insbesondere Neuropathien, Thrombozytopenien, eine Reaktivierung des Varizella-zoster-Virus und seltener auch pulmonologische Komplikationen wie Pneumonitis, interstitielle Pneumonie oder ARDS [289].

Anthrazykline sind klassische Zytostatika, die über multiple Mechanismen, aber unter anderem durch eine Hemmung der Topoisomerase II, wirken [289]. Hierzu zählen beispielweise Idarubicin, Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron und Epirubicin [290]. Zur Gruppe der Stickstoff-Lost-Verbindungen gehören Melphalan, Cyclophosphamid, Bendamustin, Chlorambucil und Ifosfamid, welche durch die Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA-Base Guanin zu Bindungen zwischen den DNA-Strängen führen [291]. Dexamethason ist ein langwirksames Glukokortikoid, welches ebenfalls in der Therapie des Myeloms eingesetzt werden kann [292]. Diverse Kombinationen dieser Medikamente sind in der Induktionstherapie denkbar und wurden beziehungsweise werden in Studien überprüft.

Die Wahl der entsprechenden Kombination berücksichtigt unter anderem, dass eine spätere für die autologe Stammzelltransplantation benötigte Stammzellapherese nicht negativ beeinflusst werden darf, weswegen zum Beispiel Melphalan zurückhaltend eingesetzt wird und Immunmodulatoren mindestens zwei Wochen vor einer Stammzellmobilisierung beendet werden müssen [293]. Außerdem werden genetische Faktoren berücksichtigt; so ist zum Beispiel der Einsatz von Bortezomib bei einer Translokation t(4;14) günstig [294].

Des Weiteren sind Komorbiditäten bei der Wahl der Kombinationstherapie zu bedenken. So beschränkt eine vorbestehende Polyneuropathie den Einsatz von Thalidomid oder Bortezomib und eine vorbestehende Herzinsuffizienz die Anwendung von Anthrazyklinen [295].

Die Induktionstherapie umfasst in der Regel drei bis sechs Zyklen [289]. Daran schließt sich die autologe Stammzelltransplantation an, wobei der Zeitpunkt der Stammzellsammlung entweder primär festgelegt wird oder vom Therapieansprechen der Induktionstherapie abhängig gemacht wird [281]. Zur Stammzellmobilisierung können der Granulozyten-Kolonien-stimulierende Faktor (G-CSF), eine Chemotherapie mit Cyclophosphamid oder Vinorelbin und nachfolgend G-CSF sowie G-CSF in Kombination mit Plerixafor, einem CXCR4-Hemmer, der zur Freisetzung von hämatologischen Stammzellen ins periphere Blut führt, zur Anwendung kommen [296]. Die Stammzellsammlung wird zwei

bis maximal acht Wochen nach Beendigung der Induktionstherapie durchgeführt [293].

Die autologe Stammzelltransplantation erfolgt als Einzeltransplantation oder als Tandemtransplantation, welche zusätzlich eine zweite autologe Transplantation weniger als zwölf Monate nach der ersten Transplantation und vor Eintritt eines möglichen Rezidivs beinhaltet [297]. Für die Tandemtransplantation konnte in manchen Studien ein signifikanter Vorteil bezüglich der Überlebenszeit gezeigt werden [298]. Allerdings gibt es auch negative Studienergebnisse zur Tandemtransplantation, so dass aktuell nicht generell, sondern beispielsweise bei Nachweis eines residuellen Paraproteins nach der ersten Transplantation eine zweite Hochdosistherapie empfohlen wird [299].

Die allogene Stammzelltransplantation ist aktuell und im Gegensatz zur Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation die einzige langfristig bestehende kurative Behandlungsoption [300]. Hierbei wird durch die Übertragung hämatologischer Stammzellen eines immunkompetenten Spenders, neben der zytotoxischen Effekte der Hochdosistherapie, auch eine immunologische Wirkung erzielt, welche als Graft-versus-Myeloma-Effekt bezeichnet wird [301]. Aufgrund verschiedener Risiken der allogenen Stammzelltransplantation, insbesondere des Graft-versus-Host-Effekts, bei welchem sich das transplantierte Immunsystem gegen die Organe des Empfängers richtet, liegt die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation beim Multiplen Myelom meist nicht in der Primärtherapie, sondern als Therapieoption nach Versagen der Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation [302]. Bei verschiedenen genetischen Risikokonstellationen wie zum Beispiel einer Deletion 17p ist eine frühzeitige allogene Stammzelltransplantation, aufgrund vielversprechender Studienergebnisse zu erwägen [303-306].

Therapieoptionen bei Patienten, welche nicht für eine Hochdosistherapie mit autologer Transplantation in Frage kommen, enthalten Melphalan-haltige Therapien und die oben aufgeführten neuen Substanzen. Auch in diesem Patientenkollektiv hängt die Wahl der Therapie im Einzelnen von verschiedenen Faktoren wie der genetischen Risikokonstellation, des Performancestatus und

Komorbiditäten ab [307]. Patienten, die zum Zeitpunkt der Ersttherapie als nicht transplantabel eingeschätzt werden, müssen im Verlauf wiederholt auf ihre Transplantationsfähigkeit überprüft werden, da diese durch anderweitige Therapien gegebenenfalls erreicht werden kann [289].

Für eine Erhaltungstherapie gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine generelle Empfehlung [289]. In der Erhaltungstherapie wurden Steroide, klassische Chemotherapeutika oder Interferon alpha getestet, welche keinen relevanten Überlebensvorteil, jedoch verschiedene Nebenwirkungen zeigten [289]. Neue Substanzen wie Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib in der Erhaltungstherapie werden ebenso wie der Einsatz der Immuntherapie diskutiert [308]. Einerseits gibt es für alle Substanzen in der Erhaltungstherapie positive Studienergebnisse mit verlängertem progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben, andererseits wurden Nebenwirkungen, wie beispielsweise das Auftreten von Zweitneoplasien beobachtet, so dass der Einsatz einer Erhaltungstherapie generell für Patientenpopulationen mit Risikozytogenetik empfohlen ist [309-311].

Für die Rezidivsituation sind Bortezomib als Monotherapie und in Kombination mit liposomalem Doxorubicin und Dexamethason zugelassen. Aber auch Lenalidomid mit Dexamethason, Bendamustin mit Prednisolon und Pomalidomid mit Dexamethason. Die Wahl der Medikation in der Rezidivsituation erfolgt nach Evaluation des Performancestatus, der Komorbiditäten und Toxizitäten der vorangegangenen Therapien. Auch im Rezidiv sollten Myelompatienten im Idealfall innerhalb einer Studie behandelt werden [312,313].

Neue Substanzen und Substanzgruppen, die sich teilweise noch in der Erprobung bezüglich ihrer Wirksamkeit und Sicherheit beim Myelom in unterschiedlichen Indikationen befinden, umfassen neben Immuntherapien, welche in den PD1/PD-L1-Signalweg eingreifen, Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Panobinostat, Ricolinostat und Quisinostat, monoklonale Antikörper wie Daratumumab (Anti-CD38), Elotuzumab (Anti-SLAMF7 = *Signalling Lymphocyte Activation Molecule Family Member 7*) und SAR650984 (Anti-CD38) sowie



Tyrosinkinaseinhibitoren wie Ibrutinib [313-315].

Patienten mit einem durch das Myelom-bedingten Nierenversagen müssen umgehend einer Therapie zugeführt werden, welche eine der neuen Substanzen enthalten sollte, wobei insbesondere für Bortezomib Daten vorliegen [288]. Durch ein Therapieansprechen wird eine Reduktion der Paraproteinausscheidung erreicht, was zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt [288]. Zusätzlich zur Tumorthherapie können zur Verbesserung der Nierenfunktion eine Harnalkalisierung sowie eine Therapie parallel bestehender Symptome wie Hyperurikämie, Hyperkalzämie und Dehydratation erfolgen [288]. Schleifendiuretika können die Ausfällung von Paraproteinen in den Tubuli der Niere begünstigen und sollten daher vermieden werden. Werden Bisphosphonate zur Therapie einer Hyperkalzämie verwendet, muss bei eingeschränkter Nierenfunktion gegebenenfalls eine Dosisreduktion erfolgen. In Studien werden die Plasmapherese und verschiedene Dialysetechniken zur Reduktion der Paraproteine im Serum untersucht. Hierzu bestehen kontroverse Ansichten und es gibt keine generelle Empfehlung zu deren Einsatz [316].

Als ergänzende Therapiemaßnahme kann bei frakturgefährdeten Osteolysen, pathologischen Frakturen, extramedullären Plasmazelltumoren und gelegentlich auch in der Schmerztherapie die Strahlentherapie zum Einsatz kommen [316]. Bisweilen sind auch operative Maßnahmen notwendig, etwa zur Stabilisierung von Wirbelkörpern [316].

Auch die Anwendung von Bisphosphonaten ist bei Patienten mit ossären Läsionen etabliert [317]. Für Bisphosphonate konnte eine Reduktion von sogenannten Skelettereignissen gezeigt werden, zu welchen pathologische Frakturen, eine Myelomkompression, radioonkologische und chirurgische Therapiemaßnahmen und die Hyperkalzämie zählen [318]. Die Therapiedauer beträgt laut Empfehlung mindestens zwei Jahre, die anschließende Fortführung erfolgt nach individuellen Gesichtspunkten bezüglich des Krankheitsverlaufs [316]. Als wichtige Nebenwirkung der Bisphosphonattherapie muss die Kieferosteonekrose genannt werden, zu deren Vermeidung verschiedene

zahnärztliche Maßnahmen erforderlich sind [319]. Für den monoklonalen Anti-RANK-Ligand-Antikörper Denosumab, welcher zur Therapie der Osteoporose eingesetzt werden kann, gibt es beim Multiplen Myelom keine Empfehlung [320].

Zur Verlaufskontrolle unter Therapie bestehen definierte Kriterien, welche von der IMWG festgelegt wurden [321]. Dabei werden sechs Formen des Therapieansprechens definiert. Diese enthalten die stringente komplette Remission (sCR), die komplette Remission (CR), die sehr gute partielle Remission (VGPR), die partielle Remission (PR), die stabile Erkrankung (SD) und die progrediente Erkrankung (PD). Die Einteilung berücksichtigt den Anteil klonaler Plasmazellen im Knochenmark, das Vorkommen von Weichteilmanifestationen, die Höhe des Paraproteins in Serum und Urin sowie die Anzahl der freien Leichtketten, inklusive des Quotienten aus beteiligten und nichtbeteiligten Leichtketten, welcher insbesondere für die Verlaufskontrolle von Leichtkettenmyelomen hilfreich ist [321].

## **1.4. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation**

### **1.4.1. Definition und Entwicklung**

Als hämatopoetische Stammzelltransplantation bezeichnet man die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen von einem Spender auf einen Empfänger [322]. Grundsätzlich wird zwischen einer autologen Stammzelltransplantation, bei welcher Spender und Empfänger identisch sind, und einer allogenen Stammzelltransplantation, bei welcher ein Empfänger von einem anderen Individuum eine Stammzellspende erhält, unterschieden [321]. Hierbei kann die syngene, auch isogen genannte Transplantation, als Sonderform der allogenen Stammzelltransplantation genannt werden, bei welcher ein Transplantat eines genetisch identischen Individuums auf ein anderes Empfängerindividuum übertragen wird, beispielweise bei eineiigen Zwillingen [322].

Die ersten präklinischen Studien zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation stammen aus der Mitte des 20. Jahrhunderts [323]. In Tiermodellen wurden zunächst syngene Transplantate oder autologe Transplantate getestet [324,325]. Allogene, nicht syngene Transplantate lösten durch Donor-lymphozyten verursacht eine Inflammation in verschiedenen Organen aus, welche mittlerweile als Graft-versus-Host-Disease (GvHD) bekannt ist [323]. Später wurden im Tiermodell verschiedene Konditionierungsmethoden zur Vorbereitung auf die eigentliche Stammzelltransplantation getestet und auch Behandlungsoptionen bei Auftreten einer GvHD nach allogener Transplantation erforscht [326].

Thomas et al. führten 1959 erstmalig eine erfolgreiche syngene hämatopoetische Stammzelltransplantation im Menschen durch, bei einem Patienten mit einer Leukämie nach einer Konditionierung mittels Bestrahlung und Infusion von Spenderstammzellen eines genetisch identischen Zwillings [327]. Hierdurch konnte erstmals eine Remission der Leukämie für 3 Monate erreicht werden [326]. Die Entdeckung und Typisierung des Humanen Leukozyten-Antigen-Systems (HLA-Systems), welches dem *Major Histocompatibility Complex*-System (MHC-System) im Menschen entspricht, ermöglichte ab den 1960er Jahren auch allogene, genetisch nicht identische, aber HLA-identische Stammzelltransplantationen im Menschen [323,328]. Ab den 1970er Jahren konnte bei Patienten mit einer Leukämie durch eine hämatopoetische Stammzelltransplantation eines HLA-identen Geschwisters in manchen Fällen eine Heilung der Leukämie erreicht werden [329]. Außerdem konnte bereits 1979 beobachtet werden, dass das Auftreten einer GvHD mit einem reduzierten Risiko für ein Wiederauftreten der Leukämie einhergeht; dieses Phänomen ist mittlerweile als Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL) bekannt [330].

### 1.4.2. Indikationen zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation und Epidemiologie

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation kann in der Therapie verschiedener maligner Erkrankungen, insbesondere hämatologischer und lymphoider Tumorerkrankungen, sowie bei verschiedenen nichtmalignen Erkrankungen zum Einsatz kommen [323,331,332]. Sie stellt häufig die einzig kurative Therapieoption für verschiedene maligne Erkrankungen dar. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die verschiedenen Indikationen.

**Tabelle 15: Überblick über die verschiedenen Indikationen zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation (modifiziert nach 330-331).**

	Maligne Erkrankungen	Nichtmaligne Erkrankungen
<b>Autologe Transplantation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiples Myelom</li> <li>• Non-Hodgkin-Lymphom</li> <li>• Morbus Hodgkin</li> <li>• Akute myeloische Leukämie</li> <li>• Neuroblastom</li> <li>• Keimzelltumore</li> <li>• Ovariakarzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoimmune Erkrankungen</li> <li>• Amyloidose</li> </ul>
<b>Allogene Transplantation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute lymphatische Leukämie</li> <li>• Akute myeloische Leukämie, inklusive der akuten Promyelozyten-Leukämie</li> <li>• Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN)</li> <li>• Chronische myeloische Leukämie und weitere myeloproliferative Erkrankungen</li> <li>• Myelodysplastisches Syndrom</li> <li>• Non-Hodgkin-Lymphome inklusive der chronisch lymphatischen Leukämie</li> <li>• Morbus Hodgkin</li> <li>• Multiples Myelom</li> <li>• Juvenile chronische myeloide Leukämie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplastische Anämie</li> <li>• Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie</li> <li>• Fanconi Anämie</li> <li>• Blackfan-Diamond Anämie</li> <li>• Thalassämia major</li> <li>• Sichelzellanämie</li> <li>• Schwere kombinierte Immunschwäche</li> <li>• Wiskott-Aldrich-Syndrom</li> <li>• Angeborene Stoffwechselstörungen</li> </ul>

Patienten mit den oben aufgeführten Erkrankungen können je nach Erkrankungsstadium, Vortherapie, genetischem Risikoprofil, Komorbiditäten und biologischem Alter für eine Stammzelltransplantation evaluiert werden [332]. Eine generelle Limitierung nach chronologischem Alter erfolgt nicht.

Für das Jahr 2016 werden vom Deutschen Register für Stammzelltransplantationen (DRST) insgesamt 3127 allogene Stammzelltransplantationen berichtet, wovon es sich bei 2898 um Ersttransplantationen handelt (Jahresbericht DRST 2016). Die häufigste Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation stellten hierbei die Leukämien mit 77,5 % aller Indikationen dar. Entsprechend dem Jahresbericht (DRST 2016) machte die AML alleine 43,1 % der Indikationen aus. Als Stammzellquellen diente hierbei bei 85,1 % der Patienten peripheres Blut, bei 14,8 % der Patienten Knochenmark und bei 0,1 % der Patienten Nabelschnurblut. Autologe Ersttransplantationen wurden im Jahr 2016 in Deutschland 3381 mal durchgeführt. Dabei erfolgten 58 % der autologen Transplantationen bei Patienten mit multiplem Myelom.

#### **1.4.3. Therapeutisches Konzept und Ablauf der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Nach der Indikationsstellung zur allogenen Transplantation muss für den Patienten ein geeigneter Spender gefunden werden [333]. Es wird zunächst nach einem Familienspender, beispielsweise Schwester oder Bruder, gesucht [333]. Sofern kein Familienspender gefunden werden kann, wird die Spendersuche in Registern fortgesetzt [333]. Es wird ein Spender gesucht, der möglichst viele übereinstimmende HLA-Gene hat, um potentielle Komplikationen – wie eine GvHD – zu minimieren [332,334]. Es werden folgende fünf Gene, entsprechend 10 Allele, evaluiert: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DQB1; ein Spender wird dann als gut passend bezeichnet, wenn wenigstens neun Allele mit denen des Empfängers übereinstimmen [332]. Das HLA-System entspricht – wie bereits weiter oben erwähnt – dem MHC-System des Menschen [335]. Die Bezeichnung HLA bezieht sich auf den Nachweis dieser Antigene auf Leukozyten, nicht jedoch auf Erythrozyten [336,337]. Die spezifischen HLA-Allele eines Individuums werden als

sogenannter Haplotyp bezeichnet [338]. Neben der HLA-Identität spielen für die Spenderauswahl gegebenenfalls noch weitere Merkmale, wie zum Beispiel der CMV-Status eine Rolle [332].

Wenn ein geeigneter Spender gefunden werden konnte und beim Empfänger zwischenzeitlich keine Kontraindikation zur Transplantation aufgetreten ist, erfolgt im nächsten Schritt die Konditionierung [338]. Die Konditionierung bezeichnet die der Transplantation vorausgehende Behandlung mit dem Ziel der Reduktion der Tumorlast bei malignen Erkrankungen, unter Inkaufnahme einer reversiblen oder irreversiblen Myeloablation, sowie der Unterdrückung des Immunsystems des Empfängers um ein Anwachsen des Transplantats zu ermöglichen [333]. Prinzipiell werden drei Möglichkeiten der Konditionierung anhand ihrer Intensität unterschieden, welche die Dauer der Zytopenie und Notwendigkeit der nachfolgenden Stammzellgabe bestimmt: myeloablativ, nichtmyeloablativ und intensitätsreduziert [333]. Die myeloablative Konditionierung zerstört hierbei das blutbildende Knochenmark des Empfängers irreversibel, hat eine komplette, anhaltende Zytopenie zur Folge und eine nachfolgende Stammzellgabe ist obligat [339]. Eine nichtmyeloablative Konditionierung bewirkt nur eine reversible, inkomplette Schädigung des blutbildenden Knochenmarks des Empfängers, die verursachte Zytopenie ist milder und das blutbildende Knochenmark könnte sich auch ohne eine nachfolgende Stammzellgabe erholen [339]. Die dritte Möglichkeit der Konditionierung wird als Intensitäts-reduziert bezeichnet. Hierbei ist die Intensität – und meistens auch Toxizität – der Konditionierungstherapie um mindestens 30 % verringert, Dauer und Ausprägung der Zytopenie sind variabel, die Schädigung des blutbildenden Knochenmarks ist reversibel, eine nachfolgende Stammzellgabe ist in der Regel jedoch notwendig [333]. Die Wahl der Konditionierung richtet sich unter anderem nach Faktoren wie vorhandenen Komorbiditäten, Patientenalter, Remissionsstatus vor Transplantation und Rezidivrisiko, wobei heutzutage immer mehr Intensitäts-reduzierte Regime bevorzugt werden [338]. Die Konditionierung wird generell im Rahmen einer prospektiven Studie empfohlen [338].

Zur Verfügung stehen aktuell verschiedene Chemotherapien oder eine Ganzkörperbestrahlung; bei der myeloablativen Konditionierung gilt eine Kombination aus Ganzkörperbestrahlung und den Chemotherapeutika Cyclophosphamid und Busulfan als Standardtherapie [340,341]. Anstelle von Cyclophosphamid kann auch Fludarabin eingesetzt werden [342,343]. Bei Intensitäts-reduzierten oder nichtmyeloablativen Konditionierungsverfahren finden neben der oben genannten Ganzkörperbestrahlung und den Substanzen Cyclophosphamid, Busulfan und Fludarabin auch modifizierte Bestrahlungsregime sowie die Wirkstoffe Melphalan, Cytarabin, Antithymozytenglobulin (ATG) und Idarubicin Verwendung [333].

Parallel zum Ende der Konditionierungsphase beim Empfänger erfolgt die Stammzellgewinnung beim Spender [338]. Stammzellen können hierbei entweder nach Gabe von G-CSF aus peripherem Blut gewonnen werden oder aber auch direkt durch eine Knochenmarksentnahme [332]. Nach erfolgreicher Konditionierung beim Empfänger und erfolgreicher Stammzellentnahme beim Spender erfolgt die eigentliche Transplantation, indem dem Empfänger die Stammzellen des Spenders intravenös übertragen werden [338]. Nach der Transplantation findet das Anwachsen der Stammzellen, welches auch als *Engraftment* bezeichnet wird, nach zehn bis 28 Tagen statt [344]. Dabei wandern die übertragenen Stammzellen des Spenders in das Knochenmark des Empfängers ein und proliferieren und differenzieren zu Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren der extrazellulären Matrix des Knochenmarks [344]. Aufgrund des enormen Regenerationspotentials hämatopoetischer Stammzellen wäre für eine komplette Regeneration des Knochenmarks zumindest theoretisch eine einzelne hämatopoetische Stammzelle ausreichend [345]. Um zu überprüfen, ob die neu gebildeten Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten vom Spender oder aber im Falle eines Transplantatversagens (engl. *engraftment failure*) oder eines Krankheitsrezidivs vom Empfänger stammen, wird spätestens am 28. Tag nach der Transplantation eine Chimärismusanalyse vorgenommen [346]. Hierbei werden genotypische und phänotypische Unterschiede zwischen Spender und Empfänger analysiert [346]. Stammen alle

hämatopoetischen Zellen vom Spender, so liegt ein vollständiger Chimärismus vor, sind hingegen hämatopoetische Zellen von Spender und Empfänger nachweisbar, liegt ein gemischter Chimärismus vor. Eine Sonderform stellt der transiente gemischte Chimärismus dar, bei welchem direkt nach der Transplantation für wenige Wochen noch Empfängerzellen nachgewiesen werden können, welche jedoch im Verlauf komplett verschwinden [347].

Immunologische Effekte wie der bereits erwähnte GvL-Effekt oder allgemeiner GvM-Effekt (Graft-versus-Malignoma-Effekt) und auch die GvHD sind abhängig von der Histokompatibilität der Donorzellen mit dem Empfängerorganismus, also dem Grad der Ähnlichkeit der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger [323]. Je ausgeprägter die Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger ist, desto eher treten diese Effekte auf [323]. Der GvM-Effekt ist eine Reaktion der Spenderlymphozyten gegen die verbliebenen Tumorzellen des Empfängers, welche hierdurch zerstört werden können [348,349]. Bei der GvHD hingegen wirken Spenderlymphozyten nicht gegen Tumorzellen, sondern gegen Normalgewebe des Empfängers wie beispielsweise Haut, Auge, Darm und Leber und verursachen hierdurch eine potentiell lebensbedrohliche Symptomatik [350]. Der GvL-Effekt und auch die GvHD gehen daher mit einer verminderten Rezidivhäufigkeit einher [351]. Auch Empfänger-Lymphozyten, welche nach der Konditionierung verblieben sind, können fremde Spenderantigene erkennen und so für Transplantatabstoßungen verantwortlich sein. Besteht ein hohes Risiko für eine GvHD, kann bereits während der Konditionierungsphase die Gabe von T-Zell-Antikörpern erfolgen, oder aber auch nach der Transplantation eine immunsuppressive Medikation beispielsweise mit Calcineurininhibitoren über bis zu 180 Tage durchgeführt werden, um das Risiko zu senken [332]. Zudem kann früh nach der Transplantation Methotrexat oder Cyclophosphamid gegeben werden. Die Transplantations-assoziierte Morbidität und Mortalität hängen somit einerseits vom Auftreten einer GvHD ab, andererseits aber auch vom Auftreten von Infektionen und der bereits bestehenden Organtoxizität durch die Vortherapien [332].



#### 1.4.4. Prinzipien der haploidenten Stammzelltransplantation

Haploidente Spender können leibliche Eltern, Kinder oder Geschwister sein [352]. Sie stimmen aufgrund ihrer Verwandtschaft zum Empfänger mit der einen Hälfte der HLA-Allele mit dem Empfänger überein, während die andere Hälfte der HLA-Allele komplett unterschiedlich sein kann [352]. Bei Patienten mit der Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation, für die kein HLA-passender verwandter oder unverwandter Spender gefunden werden kann, stellt eine haploidente Spende eine mögliche Alternative dar [353,354]. Wegen des „nur halb passenden“ Transplantats kommt es bei einer haploidenten Stammzelltransplantation zu einem vermehrten Auftreten von bilateraler Alloreaktivität im Sinne einer GvHD und einer Transplantatabstoßung, jedoch zu einer geringeren Zahl an Krankheitsrezidiven durch den GvM-Effekt [352]. Durch Veränderungen bei der Transplantataufbereitung, sowie durch eine pharmakologische Prophylaxe der GvHD, konnten diese Risiken in der kürzeren Vergangenheit jedoch reduziert werden [355]. In mehreren großen retrospektiven Studien bei Patienten mit AML konnte gezeigt werden, dass auch mit einer haploidenten Stammzelltransplantation im Vergleich zu einer allogenen HLA-gematchten Transplantation vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich *Engraftment*, Gesamtüberleben und Komplikationen wie GvHD und Transplantatabstoßung erzielt werden können [356-358].

Um die negativen Effekte der Alloreaktivität zu reduzieren und gleichzeitig das Risiko für infektiologische Komplikationen zu senken, wurden für die Durchführung einer haploidenten Stammzelltransplantation verschiedene strategische Ansätze entwickelt [352]. Die erste zu beschreibende Methode ist die T-Zell-depletierte haploidente Stammzelltransplantation mit einer Megadosis an CD34+ Zellen [352]. Da Immunphänomene wie eine GvHD oder eine Transplantatabstoßung hauptsächlich T-Zell-vermittelt sind, führt die T-Zell-Depletion des Transplantats in Kombination mit einer myeloablativen Konditionierung beim Empfänger zu einem verminderten Risiko an alloreaktiven Komplikationen [359,360]. Gleichzeitig führt das Fehlen der T-Zellen im Transplantat und im Empfängerindividuum zu einer langsamen

Immunrekonstitution und in der Folge auch zu infektiologischen Komplikationen [360]. Die Anreicherung des Transplantats mit CD34+ hämatopoetischen Stammzellen verbessert die Immunrekonstitution durch ein selteneres Auftreten an Transplantatversagen und verringert somit sekundär das Risiko infektiologischer Komplikationen, wobei grundsätzlich weiterhin ein durch die T-Zell-Depletion verursachtes, höheres Risiko, insbesondere für virale Infektionen besteht [359]. Die Herstellung eines an CD34+ Zellen angereicherten, T-Zell-depletierten Transplantats kann mittels einer Positivselektion erfolgen, bei welcher CD34+ Zellen durch spezifische Antikörper, welche an magnetische Mikrobeads gebunden sind, erst markiert und anschließend separiert werden [361-363]. In verschiedenen klinischen Studien konnten Patienten durch ein T-Zell-depletiertes haploidenten Stammzelltransplantat mit einer Megadosis an CD34+ Zellen erfolgreich transplantiert werden, ohne dass zur GvHD-Prophylaxe posttransplantationem eine prophylaktische Immunsuppression notwendig war [361-363]. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Markierung CD34+ Zellen mit Antikörpern und Mikrobeads möglicherweise einen ungünstigen Einfluss auf das *Engraftment* hat [364,365].

Eine weitere Methode zur Herstellung eines haploidenten Transplantats, welches eine verringerte Alloreaktivität, aber eine verbesserte Immunrekonstitution bewirken soll, besteht durch die negative Selektion CD3+ Zellen und CD19+ Zellen [366-368]. Hierbei werden CD3+ Zellen und CD19+ Zellen mittels passender Antikörper, welche an Mikrobeads gebunden sind, aus dem Transplantat entfernt [366,367]. Es entsteht ein Transplantat, aus dem lediglich reife T-Zellen, welche alloreaktive Komplikationen verursachen, und reife B-Zellen, welche für EBV-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen verantwortlich sind, entfernt wurden und welches aufgrund seiner Ursprünglichkeit zu einer schnellen Immunrekonstitution im Empfänger führt [366,367].

Jedoch nicht nur durch die negative Selektion von CD3+ und CD19+ Zellen, sondern auch durch die negative Selektion des  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptors und somit von  $\alpha/\beta$ -T-Zellen können alloreaktive Komplikationen verringert und die Immun-

rekonstitution nach haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation verbessert werden [369,370]. Die verbleibenden  $\gamma/\delta$ -T-Zellen verursachen keine GvHD, haben jedoch vermutlich antitumorale Effekte [371]. Die selektive Entfernung alloreaktiver T-Zellen aus einem Transplantat kann auch mittels Photodepletion ex vivo erfolgen; bei dieser Methode bleiben regulatorische T-Lymphozyten im Transplantat [372,373].

Darüber hinaus gibt es speziell zusammengestellte Transplantate, die normale T-Zellen und regulatorische T-Zellen, NK-Zellen,  $\gamma/\delta$ -T-Zellen und andere akzessorische Zellen in einem bestimmten Verhältnis zu einander enthalten [374]. Dieser Ansatz führt zu einer schnelleren Immunrekonstitution, einem probaten GvM-Effekt und einer geringen Auftretenswahrscheinlichkeit einer GvHD [374].

Einen weiteren Ansatz zur Herstellung eines haploidenten Transplantats stellt die negative Selektion von CD45RA dar [352]. Bei diesem Vorgehen werden naive T-Zellen, welche CD45RA an ihrer Oberfläche exprimieren und welche in besonderem Maße für Alloreaktivität im Sinne einer GvHD verantwortlich gemacht werden, aus dem Transplantat entfernt [375]. Gedächtnis-T-Zellen hingegen, welche zur Abwehr insbesondere viraler Infekte benötigt werden, verbleiben [375]. Zur verbesserten Immunrekonstitution nach haploidenter Transplantation mit T-Zell-depletierten Transplantaten können auch CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> regulatorische T-Zellen posttransplantationem infundiert werden [376-379].

Zusätzlich können zur Vorbeugung oder zur Behandlung viraler oder mykotischer Infektionen Virus-spezifische, zytotoxische, gegen CMV, Adenovirus und EBV oder gegen Aspergillus gerichtete T-Zellen verabreicht werden [380-384]. Ferner können spezielle Donorlymphozyten verabreicht werden, die zum GvM-Effekt beitragen. Geprüft werden Donorlymphozyten, welche jedoch im Falle des Auftretens einer GvHD durch vorhandene *suicide*-Gene durch Apoptose sterben [385,386]. Die *suicide*-Gene dieser speziellen polyklonalen T-Zellen könnten nach der klinischen Manifestation einer GvHD

mittels bestimmter Medikamente (beispielsweise Ganciclovir) angeschaltet werden [386,387].

Eine weitere Strategie kann nach dem sogenannten GIAC-Protokoll erfolgen. Die Abkürzung GIAC setzt sich zusammen aus dem Buchstaben „G“ für die Gabe von G-CSF zur Freisetzung von Stammzellen aus dem Knochenmark des Spenders, dem Buchstaben „I“ für die intensiviert Immunsuppression nach der Transplantation im Empfänger, dem Buchstaben „A“ für die Gabe von ATG zur Prophylaxe einer GvHD beim Empfänger und dem Buchstaben „C“ für die kombinierte Transplantation von peripheren Stammzellen und Knochenmarkstammzellen [352]. Diese Strategie führte in Studien zu einem guten *Engraftment*, scheint jedoch mit einer höheren Inzidenz an einer GvHD einherzugehen [388,389]. Durch eine ausschließliche Gabe von Knochenmarkstammzellen und die zusätzliche Gabe des Anti-CD25-Antikörpers Basiliximab konnte die Auftretenswahrscheinlichkeit einer GvHD auch in diesem strategischen Ansatz gesenkt werden [390].

Die Gabe von Cyclophosphamid nach der haploidenten Transplantation kann zur Prophylaxe einer GvHD eingesetzt werden, da Cyclophosphamid als alkylierende Substanz insbesondere Einzel- und Doppelstrangbrüche bei sich schnell teilenden alloreaktiven T-Lymphozyten bewirkt [353,357,391,392]. Zusätzlich werden auch alloreaktive T-Zellen des Empfängers eliminiert, wodurch auch Abstoßungsreaktionen verringert werden können [360]. Nicht-alloreaktive T-Lymphozyten hingegen, welche zu Abwehr insbesondere viraler Infekt benötigt werden, werden durch Cyclophosphamid weniger beeinträchtigt [392]. Die Gabe von Cyclophosphamid scheint nur einen geringen negativen Einfluss auf das PFS, die Immunrekonstitution und das Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen zu haben [357,391-393]. Dies gilt auch, wenn Cyclophosphamid vor der Transplantation zur Konditionierung eingesetzt wurde [357,391-393]. Allerdings wurden in anderen Studien höhere Auftretenswahrscheinlichkeiten für ein Rezidiv der Leukämie berichtet [357,392].

Zusammenfassend können verschiedene Vorteile, aber auch Einschränkungen der haploidenten Stammzelltransplantation verglichen mit gematchten

allogenen hämatopoetischen Transplantationen genannt werden [352]. Die bessere Verfügbarkeit von Spendern für die haploidente Transplantation stellt insgesamt, aber auch insbesondere für Patienten aus speziellen ethnischen Gruppen, einen Vorteil dar [352,394]. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Verfügbarkeit des Spenders, welche häufig aufgrund der Verwandtschaft von Spender und Empfänger gegeben ist [352]. Außerdem kann der häufig ausgeprägtere GvM-Effekt gerade für Hochrisikopatienten bezüglich einer geringeren Rezidivrate und einem verbesserten Gesamtüberleben von Vorteil sein [352,395,396]. Die Hauptnachteile der haploidenten Stammzelltransplantation sind Folge der höheren bidirektionalen Alloreaktivität und beinhalten höhere Raten an opportunistischen Infektionen oder Transplantatabstoßungen sowie schwerere Ausprägungen einer GvHD, wobei die oben genannten Strategien diese Nachteile zu verbessern versuchen [189,352,353,397].

#### **1.4.5. Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation**

Die Rekonstitution der verschiedenen Zellreihen der Hämatopoese nach einer allogenen Stammzelltransplantation verläuft in unterschiedlicher Geschwindigkeit [398]. Die Gesamtmorbidität und -mortalität der Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation hängen in besonderem Maße von der Rekonstitution der Leukozyten ab; hierauf wird daher im Folgenden besonderes Augenmerk gerichtet.

Neutrophile Granulozyten regenerieren innerhalb der ersten 14 bis 30 Tage nach der Transplantation, abhängig von der Art des Transplantats [398]. Die schnellste Regeneration der neutrophilen Granulozyten nach etwa 14 Tagen erfolgt nach Gabe von Stammzellen aus peripherem Blut; nach etwa 21 Tagen findet die Regeneration nach Gabe von Knochenmarkstammzellen statt, wohingegen eine Regeneration nach Gabe von Stammzellen aus Nabelschnurblut erst nach etwa 30 Tagen erfolgt [398-400]. Obwohl sich die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut innerhalb weniger Wochen nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation normalisiert,

bleibt die Fähigkeit dieser Zellen zur Chemotaxis bis zu vier Monate lang eingeschränkt [401]. Monozyten erscheinen im peripheren Blut etwa 40 Tagen nach einer allogenen hämatopoetischen Transplantation, Gewebeständige Makrophagen hingegen werden erst nach ca. 80 Tagen in Lunge und Leber nachweisbar [401-403].

Die Rekonstitution der Lymphozyten verläuft insgesamt deutlich langsamer als die der neutrophilen Granulozyten; innerhalb von Monaten bis zu Jahren nach der hämatopoetischen Transplantation abhängig von der Art und Zusammensetzung des Transplantats, der Intensität der Konditionierung, dem Lebensalter von Spender und Empfänger sowie der Auftretenswahrscheinlichkeit einer GvHD und die davon abhängige Notwendigkeit einer Immunsuppression posttransplantationem [398,404-407]. Zunächst expandieren Zytokin-produzierende CD56+ NK-Zellen [398]. Innerhalb der Gruppe der T-Lymphozyten expandieren unter dem Einfluss von Zytokinen und alloreaktiven Antigenen zunächst Memory-T-Zellen [398]. Nachfolgend beginnt die Entstehung naiver T-Lymphozyten im Thymus aufgrund des dort vorliegenden großen Repertoires an Antigenen, wobei CD8+ zytotoxische T-Zellen schneller entstehen, als CD4+ T-Helfer-Zellen. Sogenannte TRECs (*T-cell receptor rearrangement excision DNA circles*) dienen als Messwert für die Entwicklung der naiven T-Zellen im Thymus [398]. Die TRECs bleiben etwa drei bis sechs Monate nach der allogenen Stammzelltransplantation erniedrigt. Ihr Ansteigen nach einer allogenen Stammzelltransplantation zeigt den Beginn der Rekonstitution der T-Lymphozyten an. Allerdings entwickelt sich mit zunehmendem Lebensalter eine Atrophie des Thymus, welche in niedrigeren TREC-Leveln und auch in einer verminderten Rekonstitution an T-Lymphozyten resultiert [398]. Gegenstand verschiedener Untersuchungen ist daher eine mögliche medikamentöse Protektion des Thymus vor einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation und der hierfür notwendigen Konditionierung [398]. Hierfür wird beispielsweise der Einsatz des Keratinozytenwachstumsfaktors (engl. *Keratinocyte growth factor*, KGF) untersucht, welcher als Mitglied der Familie der *fibroblast growth factors* für die Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen in verschiedenen Geweben wie Darm, Haut und Thymus verantwortlich ist und

bereits zur Prophylaxe einer Mukositis eingesetzt wird [398]. Die Gabe von KGF vor der Konditionierung und nach der Transplantation verbessert in Tiermodellen die Thymopoese und steigert die Anzahl von T-Zellen im peripheren Blut [408]. Durch die Bindung von KGF an den KGF-Rezeptor, welcher sich unter anderem auf epithelialen Thymuszellen befindet, wird IL-7 produziert, welches eine Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und auch B-Zellen bewirkt [408,409]. Eine verbesserte Rekonstitution der T-Zellreihe nach der Transplantation durch den Einsatz von KGF bei Menschen konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden [410,411]. Eine weitere Einflussgröße zur Protektion von Thymusgewebe wird in den Sexualhormonen gesehen [398]. Durch eine chirurgische oder pharmakologische Blockade von Sexualhormonen, beispielweise bei Patienten mit Prostatakarzinomen, wurde eine Regeneration des Thymus mit vermehrter Produktion von T-Lymphozyten, aber geringerer Entstehung von B-Lymphozyten beobachtet [412]. Diese Effekte konnten durch die Gabe des GnRH-Analogons Goserelin auch bei Patienten nach autologer und allogener Stammzelltransplantation beobachtet werden, wobei nur bei Patienten nach autologer Transplantation auch ein Überlebensvorteil gesehen werden konnte [412]. Auch der kombinierte Einsatz von KGF und einer Sexualhormonblockade, ebenso wie der Einsatz weiterer Hormone – wie einem rekombinanten, humanen Wachstumshormon (engl. *growth hormone*, GH) – zur Thymusprotektion im Rahmen einer hämatopoetischen Transplantation, befinden sich in Untersuchung [413-416]. Ferner wird der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren und Anti-CD25-Antikörpern zur verbesserten T-Zell-Rekonstitution nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation untersucht; die Modulation der Thymusnische durch diese beiden Medikamentengruppen wird dafür als ursächlich angesehen [398,417]. Des Weiteren scheint der Notch-Signalweg für die Thymusentwicklung und somit auch für die Entwicklung von T-Lymphozyten von Bedeutung zu sein [418]. Es wird daher versucht auch diesen Signalweg zur Beeinflussung der T-Zell-Rekonstitution nach einer allogenen Stammzelltransplantation zu nutzen [419,420]. Zusätzlich gibt es Überlegungen die Immunrekonstitution nach einer Stammzelltransplantation durch die Gabe

von Zytokinen zu beeinflussen. IL-2 spielt hier eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. CD34+ hämatopoetische Stammzellen exprimieren den IL2-Rezeptor [398]. Durch die Gabe von rekombinantem IL-2 im Rahmen einer hämatopoetischen Transplantation proliferieren Stammzellen insbesondere zu NK-Zellen [398,421]. Hierdurch kommt es zu einer geringeren Rate an Krankheitsrezidiven durch einen stärkeren GvH-Effekt und einer höheren Immunkompetenz der Patienten [422-424]. IL-7 spielt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen im Thymus [425,426]. Die Auswirkung der IL-7-Gabe auf die Rekonstitution der T-Zellen nach einer allogenen hämatopoetischen Transplantation hängt im Mausmodell von der Art der Transplantation und des Transplantats, sowie der Dosis und Dauer der IL7-Gabe ab; insgesamt liegen hinsichtlich des Benefits einer Gabe von IL-7 bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation kontroverse Daten vor [426,427]. Ein vermehrtes Auftreten einer GvHD durch die IL7-Gabe wurde nicht beobachtet, da vermutlich nur nicht-alloreaktive T-Zellen in höherem Maße beeinflusst werden [427-430]. IL-15 regt die Proliferation von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen an. Der Einsatz von rekombinantem IL-15 spielt bereits bei Immuntherapien, beispielsweise bei einer Tumorstimmulierung, und auch beim T-Zell-*Engraftment* im Mausmodell eine bedeutende Rolle [431-433]. Auch durch die Gabe von immunmodulatorischen Zellen, wie T-Zellen, NK-Zellen oder mesenchymalen Stammzellen, welche ex vivo angereichert werden und zusätzlich gegen Virus- oder Tumor-spezifische Antigene gerichtet sein können, lässt sich die Immunrekonstitution nach einer Stammzelltransplantation verbessern [382,434-436].

Die Rekonstitution der B-Zellreihe nach einer allogenen Stammzelltransplantation kann bis zu zwei Jahre dauern [398,437]. Zuerst erscheinen nach etwa zwei Monaten unreife, transitionale B-Zellen mit dem Phänotyp CD19+ CD24++ CD38++ im peripheren Blut [398,438]. Reife B-Lymphozyten sowie B-Gedächtnis-Zellen und damit verbunden komplexe zirkulierende Immunglobuline erscheinen erst einige Monate später [437,439,440]. Auch die Rekonstitution der B-Lymphozyten kann durch das Auftreten einer GvHD negativ beeinflusst werden [439,441]. Die Serumkonzentrationen von



Immunglobulinen vom IgG- und IgM-Typ erreichen nach etwa drei bis vier Monaten nach der Transplantation normale Level, IgA-Antikörper-Level hingegen können über Jahre erniedrigt bleiben [401,442-444].

Die Rekonstitution der Immunzellen nach einer haploidenten Stammzelltransplantation verläuft generell langsamer als nach einer HLA-gematchten allogenen Stammzelltransplantation [445]. Um das Risiko negativer Effekte der vermehrten Alloreaktivität zu reduzieren, welche aufgrund der geringeren Übereinstimmung der HLA-Allele zwischen Spender und Empfänger bei einer haploidenten Transplantation besteht, wurden die verschiedenen oben aufgeführten Methoden zur Aufbereitung des Transplantats sowie zum weiteren Management nach der Transplantation entwickelt [398,445]. Die Depletion von T-Zellen und B-Zellen durch positive Selektion CD34+ Stammzellen oder durch negative Selektion CD3+ Zellen und CD19+ Zellen verlangsamt die Immunrekonstitution, verglichen mit der Rekonstitution nach einer HLA-gematchten allogenen Stammzelltransplantation [367,446,447]. Beim CD34+ Megadosis-Prinzip werden hohe Zellzahlen von hämatopoetischen Progenitorzellen transplantiert, die MHC-Barrieren überwinden helfen [446]. Bei der negativen Selektion von CD3+ Zellen und CD19+ Zellen enthält das Transplantat ebenfalls hämatopoetische Progenitorzellen zur Rekonstitution, ebenso wie dendritische Zellen und NK-Zellen, welchen zusätzlich dem *Engraftment* und der Immunrekonstitution dienen [367,447].

Neutrophile Granulozyten erscheinen nach einer haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantation im Mittel nach 11 bis 21 Tagen im peripheren Blut [363,391,448,449]. Zur Regeneration ihrer Funktion wie beispielsweise der Chemotaxis gibt es im haploidenten Setting kaum Daten [448]. Die Rekonstitution der Monozyten erfolgt je nach der Zusammensetzung des Transplantats sehr schnell, nach etwa 15 Tagen nach der haploidenten Transplantation [448]. Dendritische Zellen scheinen langsam zu regenerieren; normale Blutlevel werden etwa ein Jahr nach der haploidenten Transplantation erreicht [450,451].

Unter den Lymphozyten regenerieren auch nach einer haploidenten Stammzelltransplantation die CD56+ NK-Zellen am schnellsten [450-453]. Ihre Anzahl im peripheren Blut erreicht ca. 30 Tage nach der Transplantation normale Level. Die Rekonstitution der T-Lymphozyten nach einer haploidenten Stammzelltransplantation hängt entscheidend von der Zusammensetzung des Transplantats ab, insbesondere eine T-Zell-Depletion des Transplantats verlangsamt die Rekonstitution [451-456]. Für die Rekonstitution der B-Lymphozyten nach einer haploidenten Transplantation werden Zeiträume von mehr als einem Jahr beschrieben [451,453]. Das Auftreten einer GvHD verlangsamt auch in einem haploidenten Transplantationssetting die Rekonstitution der Lymphozyten [453,457]. Zur Verbesserung der Immunrekonstitution werden auch bei haploidenten Transplantationen die bereits weiter oben erwähnten Methoden untersucht [448].

## 2. Zentrale Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rekonstitution Antikörper-produzierender Zellen bei Patienten innerhalb des ersten Jahres nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu untersuchen. Insbesondere auf die ersten Wochen nach der Transplantation sollte der Fokus der Untersuchungen gelegt werden.

Diese Fragestellung beruht auf der Beobachtung, dass die Entstehung reifer Plasmazellen erst etwa ein Jahr nach der Transplantation in der Literatur beschrieben ist, Antikörper zur Abwehr von Infekten jedoch bereits vorher benötigt werden und auch vorhanden sind.

Die Untersuchung dieser Fragestellung bei haploident transplantierten Patienten ermöglichte eine Beobachtung dieser Rekonstitutionsphänomene unter *in vivo* Bedingungen, respektive in der klinischen Realität. Das Transplantat enthält durch die Depletion von CD3+ und CD19+ Zellen keine relevante Anzahl an reifen T-Zellen und B-Zellen. Zudem sind periphere Blutstammzellpräparate im Gegensatz zu Knochenmarksaspiraten ohne relevante Anteile an langlebigen Knochenmarks-Plasmazellen. Somit konnte die Entwicklung der B-Lymphozyten im Empfänger aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Spenders beobachtet werden, ohne dass bereits reife B-Zellen des Spenders oder Empfängers vorlagen und ohne dass CD34+ hämatopoetische Stammzellen durch positive Selektion mittels Markierung durch Mikrobeads verändert wurden. Auch konnte aufgrund der T-Zell-Depletion auf eine Immunsuppression zur GvHD-Prophylaxe *post transplantationem* verzichtet werden, welche möglicherweise die erhobenen Ergebnisse beeinträchtigt hätte.

Neben einer rein deskriptiven Beschreibung der beobachteten Zellen sollten in dieser Arbeit auch potentielle Einflussgrößen der Zellentwicklung wie Zytokine identifiziert werden und somit eine Einordnung der Beobachtungen in den Gesamtkontext der Hämatopoese ermöglicht werden. Des Weiteren sollten die produzierten Antikörper im Sinne einer funktionellen Untersuchung weiter charakterisiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

**Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Geräte.**

Gerät	Hersteller
Brutschrank Hera Cell, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
Countess® Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
ELISPOT reader Immunospot Analyzer	CTL Analyzers LLC, Cleveland, Ohio, USA
Eppendorf mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Canto II	Roche, Penzberg, Deutschland
Gefrierschrank, - 20°C, - 80°C	MS-Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
1-Kanal-Pipette, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
8-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank, 4 °C	MS-Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Light cycler LC480	Roche, Penzberg, Deutschland
Megafuge 1. OR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Neubauer Zählkammer Improved	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Pipettierhilfe Pipet Boy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipette serologisch advant 2, 5, 10, 25, 50 ml	Costar Corning, Tewksbury, Massachusetts, USA
Sterilbank Hera Save	Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
Sysmex KX21-N	Sysmex, Norderstedt, Deutschland
1.5 ml tube shaker Themomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuum Absaugsystem Vacusafe Comfort	IBS - INTEGRA Biosciences, Biebertal, Deutschland

Gerät	Hersteller
Vortex Mixer	Fisher, Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Cell Counter Slides	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Combitips Plus, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser 22 x 22 mm	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Falcon-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Glaspipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Handschuhe Micro-Touch	Ansell, Brüssel, Belgien
Light cycler 480 Multiwell Platte 96	Roche, Penzberg, Deutschland
Light cycler 480 Sealing Foil	Roche, Penzberg, Deutschland
MAHA S4510 Millipore MultiScreen-HA, 0,45 µm, transparent, steril	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
NH <sub>4</sub> -Heparin Monovette 9 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
PP-Microplate, 8, 24, 96 well U-Form	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter, 30 µm	Partec, Jettingen-Scheppach, Deutschland
96 well-Platten, 8, 24, 96 well Flachboden	Corning Incorporated, Corning, New York, USA

### 3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
ABTS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ABTS Buffer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aqua bidest, zweifach destilliertes Wasser	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Invitrogen/Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Ficoll-Medium 1.077 g/ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen/Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
RNase free water	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Streptavidin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.4. Kits und Assays

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
AEC Staining Kit	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Bio-Plex™ Cytokine Assay Analyte: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , MCP-1 (MCAF), MIP-1, TNF $\alpha$ .	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Standard Stock Solution BAFF-ELISA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

### 3.1.5. Puffer

Tabelle 20: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Blockierlösung BAFF-ELISA	PBS 2 % BSA
Blockierlösung ELISpot	PBS 1 % BSA
ELISpot <i>dilution buffer</i>	PBS 1 % BSA
PBS-Puffer	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumhydrogenphosphat
Verdünnungspuffer BAFF-ELISA	PBS 0,05 % Tween 20 0,5 % BSA
Waschlösung ELISpot	PBS 0,25 % Tween 20
Waschpuffer BAFF-ELISA	PBS 0,05 % Tween 20

### 3.1.6. Antikörper

Tabelle 21: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antikörper	Spezies-Spezifität	Hersteller
Anti-human BAFF IgG	<i>recombinant, expressed in E. coli</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mississippi, USA
Anti-mouse IgG	<i>mouse, Maus</i>	Rockland Inc., Limerick, Pennsylvania, USA
Anti-rabbit IgG	<i>rabbit, Kaninchen</i>	Rockland Inc., Limerick, Pennsylvania, USA
CD19	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
CD27	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
CD38	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
CD138	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
HLA-A2	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
HLA-B8	<i>rabbit, Kaninchen</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
HLA Class I BW6	<i>rabbit, Kaninchen</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IgA	<i>goat, Ziege</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mississippi, USA
IgA Fc, APC-gekoppelt	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
IgE	<i>goat, Ziege</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mississippi, USA
IgG	<i>goat, Ziege</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mississippi, USA
IgG Fc, APC-gekoppelt	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
IgM	<i>goat, Ziege</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mississippi, USA
IgM Fc, APC-gekoppelt	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom
Lineage Antikörper-Cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)	<i>mouse, Maus</i>	BioLegend, London, United Kingdom



### 3.1.7. Software

**Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Software.**

Software	Hersteller
Endnote X9	Thomson Reuters, New York, USA
FlowJo	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA
ImmunoSpot 3	CTL Europe GmbH, 53225 Bonn, Deutschland
Light Cycler Software 480	Roche, Penzberg, Deutschland
MS Office	Microsoft, Redmond, Washington, USA
SPSS Version 25	IBM SPSS Statistics, Armonk, New York, USA

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Studiendesign und Patientencharakteristika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Primärproben, sowie die personenbezogenen Daten von insgesamt 10 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen untersucht. Alle Patienten wurden vor Beginn der Analysen über die geplante Verwendung der Proben informiert und stimmten der wissenschaftlichen Verwendung der Blutproben, ebenso wie der Verwendung der klinischen Daten, schriftlich zu. Während der Rechercharbeiten wurde ausschließlich auf vorbestehende, eigene personenbezogenen Daten des Universitätsklinikums Tübingen zugegriffen. Diese Studie wurde von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen genehmigt.

Insgesamt wurden 10 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen, bei denen eine haploidente Stammzelltransplantation mit CD3- und CD19-depletierten Stammzellpräparaten am Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt wurde, in die primären Analysen und Auswertungen eingeschlossen. Drei Patienten wurden aufgrund von fehlenden konsekutiven Daten von der abschließenden Auswertung ausgenommen. Patient 8, weiblich, 51 Jahre alt

zum Zeitpunkt der Transplantation, mit der Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie (AML-M1) musste an Tag 65 *post transplantationem* bei einem primären Transplantatversagen ausgeschlossen werden. Patient 9, männlich, 57 Jahre alt zum Zeitpunkt der Transplantation, mit einer AML-M2 wurde an Tag 30 nach der Transplantation ebenfalls aufgrund eines primären Transplantatversagen aus der abschließenden Auswertung herausgenommen. Patient 10, männlich, 39 Jahre alt zum Zeitpunkt der Transplantation, mit der Diagnose einer AML-M5 verstarb an Tag 10 nach der Transplantation im Rahmen eines septischen Schocks. Auch die Daten dieses Patienten wurden daher von der abschließenden Auswertung ausgenommen.

Bei den verbleibenden 7 Patienten erfolgte mit Beginn der stationären Aufnahme auf die Transplantationsstation (entsprechend Tag -7) eine wöchentliche Abnahme von 10 ml Vollblut (siehe Abb. 11). Die Daten zur Regeneration der Gesamtleukozyten, Lymphozyten und Granulozyten wurden aus der abteilungsspezifischen Analyse des Blutbilds (Sysmex) entnommen. Die Chimärismusanalysen wurden der personenbezogenen Datenbank des Universitätsklinikums Tübingen entnommen.

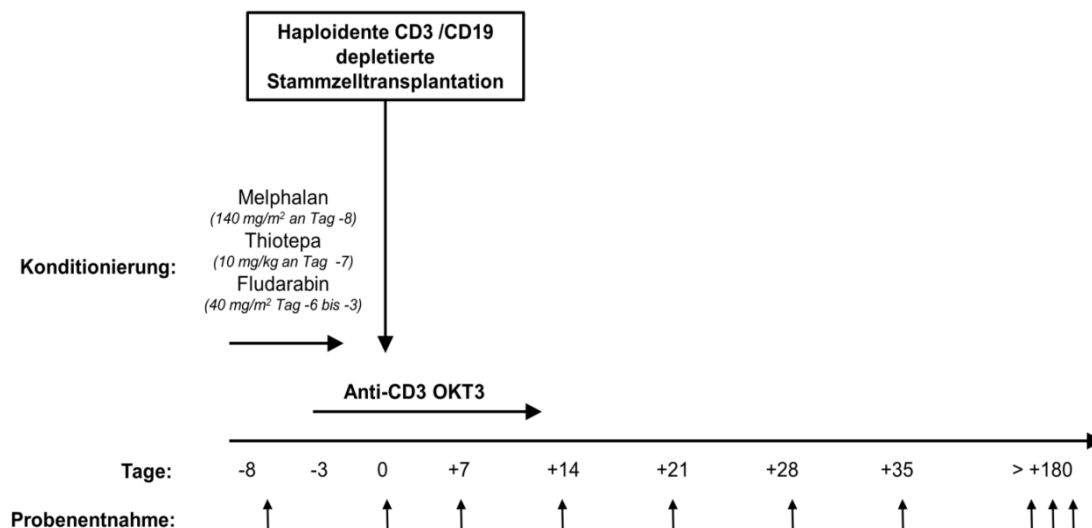


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Probenentnahmen.

Im Folgenden ist die Krankengeschichte der 7 ausgewerteten Patienten mit Diagnosen und klinischem Verlauf tabellarisch aufgeführt.

### Patient 1:

Bei dieser Patientin erfolgte die Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie M2 im Dezember 2006. Zu diesem Zeitpunkt ist die Patientin 45 Jahre alt. Die Zytogenetik zeigte eine Translokation t(7;21).

**Tabelle 23: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 1.**

12/2006 – 01/2007	<b>2 Zyklen Induktionstherapie mit Cytarabin, Daunorubicin</b> im Rahmen der AML-CG 2000-Studie mit Erreichen einer CR nach einem Zyklus.
02/2007 – 06/2007	<b>3 Zyklen Konsolidierungstherapie mit Cytarabin</b> mit Erreichen einer CR.
08/2007	<b>1. Rezidiv</b>
08/2007 – 10/2007	<b>2 Zyklen Fludarabin, Cytarabin, Idarubicin</b> mit Erreichen einer CR.
12/2007 – 01/2008	<b>Erhaltungstherapie mit Cytarabin, Thioguanin bzw. Cyclophosphamid</b> mit Erreichen einer CR.
02/2008	<b>2. Rezidiv</b>
02/2008 – 03/2008	<b>Induktionstherapie mit Fludarabin, Cytarabin, Idarubicin.</b>
03/2008	<p><b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b>  <u>Spender:</u> Bruder, 38 Jahre alt.  <u>Zellzahl:</u> <math>4,3 \times 10^6</math> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert.  <u>Blutgruppe:</u> Empfänger 0 Rh+, Spender 0 Rh+.  <u>CMV-Status:</u> Empfänger negativ, Spender positiv.  <u>Toxoplasrose-Status:</u> Empfänger positiv.  <u>HLA-Status:</u> Haploident.  <u>Konditionierung:</u> Fludarabin, Thiotepa, Melphalan.  <u>GvHD-Prophylaxe:</u> OKT-3 5 mg Tag -5 bis +14.  <u>GvHD:</u> Haut Grad 2, Leber Grad 0, Darm Grad 0, Gesamtgrad 1.  <u>Komplikationen:</u> Asymptomatische HHV6-Infektion, protrahierte abdominelle Schmerzen unklarer Genese.</p>
bis aktuell	Anhaltende Remission.

**Patient 2:**

Die zweite Patientin erhielt die Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie im März 2006, analog der FAB-Klassifikation erfolgte eine Zuordnung zu M1. Zu diesem Zeitpunkt ist die Patientin 48 Jahre alt. Molekulargenetisch erfolgte der Nachweis einer CEBPA-Mutation.

**Tabelle 24: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 2.**

03/2006 – 06/2006	<b>2 Zyklen Induktionstherapie mit Cytarabin, Idarubicin, Etoposid, All-Trans-Retinoinsäure und Valproinsäure</b> im Rahmen der AML-SG-07/04-Studie mit Erreichen einer CR nach zwei Zyklen.
07/2006 – 12/2006	<b>3 Zyklen Konsolidierungstherapie mit Cytarabin und All-Trans-Retinoinsäure</b> mit Erreichen einer CR.
03/2007	<b>1. Rezidiv</b>
03/2007 – 04/2007	<b>Therapie analog GO-A-HAM-Schema (Gemtuzumab Ozogamicin, All-Trans-Retinoinsäure, hochdosierte Cytarabin, Mitoxantron).</b>
05/2007	<b>Fremdallogene Stammzelltransplantation:</b> <u>Spender:</u> DKMS. <u>Zellzahl:</u> $8,74 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht. <u>Blutgruppe:</u> Empfänger 0 Rh+, Spender A Rh+. <u>CMV-Status:</u> Empfänger positiv, Spender negativ. <u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger negativ. <u>HLA-Status:</u> identisch. <u>Konditionierung:</u> Busulfan, Cyclophosphamid. <u>Komplikationen:</u> Mukositis Grad 2, Fieber in Aplasie.
02/2008	<b>2. Rezidiv</b>
03/2008	<b>Induktionstherapie mit Fludarabin, Cytarabin, Idarubicin</b> mit Nachweis einer Blastenpersistenz.
03/2008 – 04/2008	<b>Salvagetherapie mit Clofarabin und Cytarabin</b> mit Erreichen einer CR.
04/2008	<b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b> <u>Spender:</u> Sohn, 30 Jahre alt. <u>Zellzahl:</u> $8,04 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert. <u>Blutgruppe:</u> Empfänger 0 Rh+, Spender 0 Rh+.

	<p><u>CMV-Status</u>: Empfänger negativ, Spender negativ.</p> <p><u>Toxoplasmose-Status</u>: Empfänger positiv.</p> <p><u>HLA-Status</u>: Haploident.</p> <p><u>Konditionierung</u>: Clofarabin, Thiotepa, Melphalan.</p> <p><u>GvHD-Prophylaxe</u>: OKT-3 5 mg Tag -3 bis +11.</p> <p><u>GvHD</u>: Haut Grad 2, Gesamtgrad 1.</p> <p><u>GvHD-Therapie</u>: Prednisolon, Tacrolimus.</p> <p><u>Komplikationen</u>: Sepsis mit Nachweis von Streptococcus sanguinis in der Blutkultur, rezidivierende abdominelle Schmerzen, transfusionsrefraktäre Thrombozytopenie bei HLA-Antikörpern, Reaktion auf OKT-3, Reaktion auf die Transplantation mit Blutdruckabfall, Bradykardie, Hitzewallungen und Kribbelparästhesien, BK-Virusinfektion, HHV6-Reaktivierung, Mukositis Grad 4 und Diarrhoen mit parenteraler Ernährung, <i>Capillary-Leak-Syndrom</i> mit Ödemen, Voriconazol-Toxizität mit Halluzinationen, venöse okklusive Leberkrankheit (<i>hepatic veno-occlusive disease</i>, VOD) mit Therapie mit Defibrotide, Durchgangssyndrom, akutes Nierenversagen, Schmerzen in der rechten Hüfte und dem rechten Bein ohne morphologisches Korrelat.</p>
bis aktuell	Anhaltende Remission.

### Patient 3:

Die Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie M5 analog der FAB-Klassifikation wurde bei der Patientin im August 2006 gestellt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Patientin 37 Jahre alt.

**Tabelle 25: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 3.**

08/2006 – 09/2006	<b>2 Zyklen Induktionstherapie mit Cytarabin, Daunorubicin</b> mit Erreichen einer CR.
10/2006	<b>1. Zyklus Konsolidierungstherapie mit Cytarabin.</b>
11/2006	<b>Hysterektomie und fraktionierte Abrasio</b> bei initialer Endometrium-infiltration ohne Nachweis der AML im Resektat.
01/2007	<b>2. Zyklus Konsolidierungstherapie mit Cytarabin.</b>
03/2007	<b>1. Rezidiv</b>
03/2007 – 04/2007	<b>Systemtherapie mit Cytarabin, Fludarabin, Mitoxantron.</b>

05/2007	<p><b>Fremdallogene Stammzelltransplantation:</b></p> <p><u>Spender:</u> DKMS.</p> <p><u>Zellzahl:</u> 5,18 x 10<sup>6</sup> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht.</p> <p><u>Blutgruppe:</u> Empfänger B Rh+, Spender A Rh+.</p> <p><u>CMV-Status:</u> Empfänger negativ, Spender negativ.</p> <p><u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger negativ.</p> <p><u>HLA-Status:</u> identisch.</p> <p><u>Konditionierung:</u> Ganzkörperbestrahlung (<i>total body irradiation</i>, TBI), Cyclophosphamid.</p> <p><u>GvHD-Prophylaxe:</u> Ciclosporin A, Methotrexat, Mycophenolatmofetil.</p>
02/2008	<b>2. Rezidiv</b>
03/2008	<b>Induktionstherapie mit Cytarabin, Fludarabin, Mitoxantron</b> mit Erreichen einer CR.
04/2008	<p><b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b></p> <p><u>Spender:</u> Bruder, 42 Jahre alt.</p> <p><u>Zellzahl:</u> 7,1 x 10<sup>6</sup> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert.</p> <p><u>Blutgruppe:</u> Empfänger B Rh+, Spender 0 Rh+.</p> <p><u>CMV-Status:</u> Empfänger negativ, Spender negativ.</p> <p><u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger negativ.</p> <p><u>HLA-Status:</u> Haploident.</p> <p><u>Konditionierung:</u> Fludarabin, Thiotepa, Melphalan.</p> <p><u>GvHD-Prophylaxe:</u> OKT-3 5 mg Tag -5 bis +14.</p> <p><u>GvHD:</u> Haut Grad 0, Leber Grad 0, Darm Grad 0, Gesamtgrad 0.</p> <p><u>Komplikationen:</u> Capillary-Leak-Syndrom.</p>
bis aktuell	Anhaltende Remission.

**Patient 4:**

Im Januar 2007 wurde bei dieser Patientin die Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie M2 analog der FAB-Klassifikation gestellt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Patientin 38 Jahre alt. Molekulargenetisch erfolgte der Nachweis einer NPM1-Mutation.

**Tabelle 26: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 4.**

01/2007 – 02/2007	<b>2 Zyklen Induktionstherapie mit Cytarabin, Daunorubicin</b> im Rahmen der AML 2003-Studie der DSIL mit Erreichen einer CR.
04/2007	<b>1. Zyklus Konsolidierungstherapie mit Cytarabin und Mitoxantron sowie Sammlung von peripheren Blutstammzellen</b> ( <i>peripheral blood stem cells</i> , PBSC).
05/2007	<b>Autologe Transplantation</b> von Stammzellen nach einer <b>Konditionierung mit Busulfan und Cyclophosphamid</b> .
03/2008	<b>1. Rezidiv</b>
04/2008	<b>Salvagetherapie mit Cytarabin, Mitoxantron, Gemtuzumab Ozogamicin</b> (analog <b>Go-HAM-Protokoll</b> ).
06/2008	<p><b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b></p> <p><u>Spender:</u> Bruder, 35 Jahre alt.</p> <p><u>Zellzahl:</u> <math>13,4 \times 10^6</math> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert.</p> <p><u>Blutgruppe:</u> Empfänger 0 Rh+, Spender 0 Rh+.</p> <p><u>CMV-Status:</u> Empfänger positiv, Spender negativ.</p> <p><u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger positiv.</p> <p><u>HLA-Status:</u> Haploident.</p> <p><u>Konditionierung:</u> Fludarabin, Thiotepa, Melphalan.</p> <p><u>GvHD-Prophylaxe:</u> OKT-3 5 mg Tag -5 bis +14.</p> <p><u>GvHD:</u> Haut Grad 1, Leber Grad 0, Darm Grad 0, Gesamtgrad 1.</p> <p><u>Komplikationen:</u> Fieber in Aplasie, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe mit Notwendigkeit der passageren parenteralen Ernährung.</p>
07/2008 und 11/2008	Gabe von <b>Spenderlymphozyten</b> ( <i>donor lymphocyte infusion</i> , DLI) bei autologem Zellanteil im peripheren Blut größer 10%.
bis aktuell	Anhaltende Remission.

**Patient 5:**

Bei dieser Patientin erfolgte die Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie M2 analog der FAB-Klassifikation im Juni 2007. Zu diesem Zeitpunkt ist die Patientin 27 Jahre alt.

**Tabelle 27: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 5.**

06/2007 – 07/2007	<b>2 Zyklen Induktionstherapie mit All-Trans-Retinoinsäure, Idarubicin, Cytarabin, Etoposid</b> im Rahmen der AMLSG-07/04-Studie.
09/2007 – 11/2007	<b>3 Zyklen Konsolidierungstherapie</b> mit Erreichen einer CR.
02/2008	<b>Rezidiv</b>
02/2008	<b>Einschluss</b> der Patientin in die AMLSG-R1-Studie. <b>1 Zyklus Induktionstherapie mit Imatinib, Mitoxantron, Topotecan, Cytarabin.</b> Abbruch bei Unverträglichkeit und Nichtansprechen.
03/2008	<b>Salvagetherapie mit Clofarabin, Cytarabin</b> mit Nachweis einer Blastenpersistenz.
04/2008	<b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b> <u>Spender:</u> Schwester, 27 Jahre alt. <u>Zellzahl:</u> $5,84 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert. <u>Blutgruppe:</u> Empfänger B Rh+, Spender B Rh+. <u>CMV-Status:</u> Empfänger positiv, Spender positiv. <u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger positiv. <u>HLA-Status:</u> Haploident. <u>Konditionierung:</u> Clofarabin, Thiotepa, Melphalan. <u>GvHD-Prophylaxe:</u> OKT-3 5 mg Tag -3 bis +12. <u>GvHD:</u> Haut Grad 3, Leber Grad 0, Darm Grad 0, Gesamtgrad 2. <u>GvHD-Therapie:</u> Prednisolon, Tacrolimus, Mycophenolatmofetil. <u>Komplikationen:</u> Fieber in Aplasie, Sepsis mit Nachweis von Staphylococcus epidermidis in der Blutkultur, Hickman-Katheter-Infektion, Abszess im Bereich der Mohrenheimgrube, Übelkeit und Erbrechen mit verzögertem Kostaufbau.
2009 – 2012	Multiple Vorstellungen ambulant und stationär bei verschiedenen Infekten.
02/2013	Erstdiagnose eines hepatisch und lymphonodulär metastasierten neuroendokrinen Karzinoms des gastroenteropankreatischen System; Proliferationsmarker Ki-67 bis 90 % messend. Systemtherapie mit <b>Carboplatin</b> und <b>Etoposid</b> .
02/2014	Therapiefortsetzung im Sinne eines <i>best supportive care</i> (BSC) heimatnah.



**Patient 6:**

Im August 2006 erfolgte bei dieser Patientin die Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie M2 analog der FAB-Klassifikation. Zu diesem Zeitpunkt ist die Patientin 23 Jahre alt. Die Zytogenetik zeigte eine Translokation t(8;21) (q22q22) und eine Deletion del(11) (q13q22).

**Tabelle 28: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 6.**

09/2006 – 10/2006	<b>2 Zyklen Induktionstherapie mit All-Trans-Retinoinsäure, Idarubicin, Cytarabin, Etoposid</b> im Rahmen der AMLSG-07/04-Studie. Erreichen einer CR.
11/2006 – 02/2007	<b>3 Zyklen Konsolidierungstherapie</b> , weiterhin CR.
07/2007	<b>1. Rezidiv</b>
07/2007	Einleitung einer <b>Systemtherapie</b> nach <b>A-HAM-Protokoll</b> gemäß der AML-04/05-Studie (ohne Go) mit <b>All-Trans-Retinoinsäure, hochdosiertem Cytarabin, Mitoxantron</b> .
08/2007	<b>Therapie mit Litalir</b> bei Regeneration mit Blasten.
08/2007	<p><b>Fremdallogene Stammzelltransplantation:</b></p> <p><u>Spender:</u> Schwester, 25 Jahre alt.</p> <p><u>Zellzahl:</u> Unbekannt, da Transplantation extern erfolgt.</p> <p><u>Blutgruppe:</u> Empfänger A Rh+, Spender A Rh+.</p> <p><u>CMV-Status:</u> Empfänger negativ, Spender negativ.</p> <p><u>Toxoplasmose-Status:</u> Unbekannt, da Transplantation extern erfolgt.</p> <p><u>HLA-Status:</u> identisch.</p> <p><u>Konditionierung:</u> Busulfan, Cyclophosphamid.</p> <p><u>GvHD-Prophylaxe:</u> Ciclosporin A, Methotrexat.</p> <p><u>GvHD:</u> Keine.</p> <p><u>GvHD-Therapie:</u> Keine.</p> <p><u>Komplikationen:</u> Fieber in Neutropenie, Schmerzen linke Leiste und rechte Axilla bei Lymphknotenschwellung, Obstipation, Übelkeit und Erbrechen, Flankenschmerzen unter Cyclophosphamid, hämorrhagische Zystitis, Harnstau Grad 2 rechts, HSV-Mukositis, VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken)-Infektion, Hautexanthem, Clostridium difficile Enteritis.</p>
09/2007	CR, kompletter Donorchimärismus.
12/2007	Gemischter Chimärismus. Absetzen von Ciclosporin A. Einmalige Gabe

	von <b>Donorlymphozyten</b> , anschließend kompletter Donorchimärismus.
01/2008	<b>2. Rezidiv</b> mit 8 % Blasten in der Knochenmarkspunktion, einem gemischten Chimärismus im peripheren Blut und einer Ummauerung der Iliakalgefäße und des Ureters links sowie Affektion der Nervenwurzeln S1 und S2 durch Chlorome.  Mehrmaliger frustraner Versuch der Applikation einer intrathekalen Tripletherapie (Cytarabin, Dexamethason, Methotrexat).
01/2008	<b>Salvagetherapie mit Cytarabin und Cladribin.</b>
04/2008	<b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b>  <u>Spender:</u> Bruder, 26 Jahre alt. <u>Zellzahl:</u> 11,44 x 10 <sup>6</sup> CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert. <u>Blutgruppe:</u> Empfänger A Rh+, Spender A Rh+. <u>CMV-Status:</u> Empfänger positiv, Spender negativ. <u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger positiv. <u>HLA-Status:</u> Haploident. <u>Konditionierung:</u> Clofarabin, Thiotepa, Melphalan. <u>GvHD-Prophylaxe:</u> OKT-3 5 mg Tag -5 bis +14. <u>GvHD:</u> Haut Grad 2, Leber Grad 0, Darm Grad 0, Gesamtgrad 1. <u>GvHD-Therapie:</u> Keine. <u>Komplikationen:</u> Übelkeit und Erbrechen, hämorrhagische Zystitis bei JC-Virusinfektion und Harnaufstau, Fieber in Aplasie, Clostridium difficile-Enteritis.
04/2008 – 08/2008	<b>3-malige intrathekale prophylaktische Gabe von Depocyte (Cytarabin).</b>
06/2008	<b>Perkutane Bestrahlung der abdominellen Chlorom-Residuen.</b>
06/2008	<b>Nachweis einer EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung</b> in zervikalen Lymphknoten und der Tonsille.
07/2008 – 08/2008	<b>4 Gaben Rituximab.</b>
11/2008	<b>3. Rezidiv</b> Therapiefortsetzung im Sinne eines BSC.

**Patient 7:**

Die Erstdiagnose eines Plasmozytoms IgG lambda, entstanden aus einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz, wurde bei diesem Patienten im August 2005 gestellt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Patient 48 Jahre alt.

**Tabelle 29: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien des Patienten Nummer 7.**

02/2006 – 03/2006	<b>Radiatio</b> einer Osteolyse der 8. Rippe links.
07/2006 – 09/2006	<b>Dexamethason-Stoßtherapie</b> bei Übergang des Plasmozytoms in ein Stadium III nach Salmon/Durie.  Anschließend <b>Induktion mit Bortezomib, Dexamethason, Cyclophosphamid über 3 Zyklen</b> im Rahmen der DSMM Xla-Studie (1 Zyklus im Rahmen der Velcade-Studie, bei Leukopenie 4. Grades Studienabbruch).
10/2006	<b>Systemtherapie mit IEV (Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid) und anschließende Stammzellmobilisierung.</b>
11/2006	<b>1. Zyklus Hochdosis-Melphalan und autologe Stammzelltransplantation.</b>
01/2007	<b>2. Zyklus Hochdosis-Melphalan und autologe Stammzelltransplantation.</b>
01/2008 – 04/2008	<b>4 Zyklen Bortezomib und Dexamethason.</b>
04/2008 – 07/2008	<b>4 Zyklen Lenalidomid, Doxorubicin und Dexamethason.</b>
08/2008	<b>Haploidente Stammzelltransplantation:</b>  <u>Spender:</u> Sohn, 24 Jahre alt. <u>Zellzahl:</u> $6,08 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht, CD3/CD19 depletiert. <u>Blutgruppe:</u> Empfänger A Rh+, Spender A Rh+. <u>CMV-Status:</u> Empfänger negativ, Spender negativ. <u>Toxoplasmose-Status:</u> Empfänger positiv. <u>HLA-Status:</u> Haploident. <u>Konditionierung:</u> Fludarabin, Thiotepa, Melphalan. <u>GvHD-Prophylaxe:</u> OKT-3 5 mg Tag -5 bis +14. <u>GvHD:</u> Haut Grad 0, Leber Grad 0, Darm Grad 0, Gesamtgrad 0. <u>GvHD-Therapie:</u> Keine. <u>Komplikationen:</u> Fieber in Aplasie, atypische Pneumonie, idiopathisches Pneumonie-Syndrom (Therapie mit Enbrel/Steroiden), Übelkeit und Erbrechen unter Chemotherapie, Blutungsneigung in Thrombozytopenie, akute Nierenschädigung.
08/2009 – 09/2009	<b>Radiotherapie von HWK 5 – BWK 3.</b>
09/2009	<b>Systemtherapie mit Lenalidomid und Dexamethason,</b>
10/2009	<b>Radiotherapie der 7. Rippe rechts.</b>

---

07/2010 – 12/2010	<b>Chemotherapie nach RVCD-Protokoll (Lenalidomid, Bortezomib, Dexamethason, Cyclophosphamid).</b> Im Verlauf Abbruch von Bortezomib bei schwerer progredienter Polyneuropathie.
01/2011	Therapiefortsetzung im Sinne eines BSC.

### **3.2.2. Isolation von mononukleären Zellen (PBMC) aus Patientenproben**

Die Blutentnahme erfolgte bei den oben genannten Patienten nach dem in Abbildung 11 dargestellten Schema einmal wöchentlich mit Beginn jeweils eine Woche vor der geplanten haploidenten Transplantation. Dabei wurden je Abnahmetag 10 ml venöses Blut gewonnen. Hierfür wurden NH<sub>4</sub>-Heparin-Monovetten verwendet. Die Blutproben der Patienten wurden direkt nach der Abnahme zügig bearbeitet. Die Probenröhrchen wurden zunächst bei 1200 rpm und 4 °C 6 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert, noch einmal unter den selben Bedingungen zentrifugiert und dann für weitere Analysen (Luminex Multiplex Assay und Immunoglobulin Bead Array) bei -20 °C aufbewahrt. Die verbleibende zelluläre Fraktion wurde anschließend mit PBS auf insgesamt 8 bis 10 ml aufgefüllt. Dann wurde Ficoll-Medium (4 ml) in 15 ml Falcons vorgelegt. Das Ficoll-Medium wurde langsam mit der mit PBS verdünnten zellulären Fraktion der Blutprobe überschichtet. Es erfolgte dann eine erneute Zentrifugation bei 2000 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse für 20 Minuten. Aufgrund der Dichte des Ficoll-Mediums von 1,077 g/ml wird eine Separation der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte ermöglicht [458,459]. Ficoll-Medium besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Nach der Zentrifugation befindet sich daher zwischen der obersten Schicht, welche sich aus verbliebenem Blutplasma und Thrombozyten zusammensetzt, und dem Ficoll-Medium eine Schicht, die Lymphozyten und Monozyten enthält [458,459]. Unterhalb des Ficoll-Mediums befinden sich nach der Zentrifugation die Erythrozyten sowie die meisten Granulozyten [458,459]. Die die Lymphozyten und Monozyten enthaltende Interphase wurde mit einer 2 ml Pipette abgenommen und in neues Falcon überführt. Das Zellpellet aus der Interphase wurde dann insgesamt viermal mit ca. 10 ml PBS gewaschen (Einstellung der Zentrifuge 1200 rpm, 4 °C, 6 Minuten).

Die Anzahl der so gewonnenen Zellen wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der Suspension aus gewonnenen Zellen und

PBS zwischen die Neubauer Zählkammer und ein Deckglas pipettiert. Sofern Newtonringe, als Zeichen einer richtigen Befüllung der Kammer sichtbar wurden, erfolgte eine Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop. Das Mikroskop wurde dabei so eingestellt, dass die Einteilungslinien der Kammer sichtbar wurden. Es wurden vier der großen Quadrate der Neubauer Zählkammer hinsichtlich der enthaltenen Zellen ausgezählt. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde dann nach der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{Anzahl gezählte Zellen aus vier großen Quadraten} \times 10}{4}$$

Die Zellen aus der Suspension wurden nach der Zählung aufgeteilt und für den im Folgenden beschriebenen ELISpot-Assay sowie für durchflusszytometrische Analysen, welche ebenfalls noch beschrieben werden, weiterverwendet.

### **3.2.3. Nachweis Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISpot-Assay**

Der B-Zell-ELISpot-Assay (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*, kurz Elispot) dient zur Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen [458,459]. Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Wege zur Durchführung des B-Zell-Elispots [458,459]. Beim ersten Weg wird ein spezifisches Antigen am Boden einer 96-Well-Platte fixiert [458,459]. Anschließend erfolgt die Hinzugabe von Antikörperproduzierenden Zellen [458,459]. Die durch diese Zellen in einem definierten Inkubationszeitraum produzierten Antikörper können durch einen biotinylierten Antikörper vom IgG-Typ und Streptavidin sichtbar gemacht werden [458,459]. Die dabei entstehenden Punkte können anschließend ausgezählt werden [458,459]. Beim zweiten Weg wird die 96-Well-Platte mit einem *Capture*-Antikörper inkubiert, welcher spezifisch gegen die Immunglobulinsubtypen IgA, IgE, IgG oder IgM gerichtet ist [458,459]. Anschließend werden die Antikörperproduzierenden Zellen hinzugeben [458,459]. Die durch diese Zellen produzierten Antikörper werden durch Hinzugabe eines weiteren biotinylierten Antikörpers (sogenannter *Detection*-Antikörper) gebunden und anschließend mit Streptavidin sichtbar gemacht [460].

In dieser Arbeit wurde ein Teil der isolierten PBMCs je Patient und Abnahmetag zur Durchführung eines B-Zell-Elispots verwendet. Hierfür wurden MAHA S4510 Platten von Millipore mit *Capture*-Antikörpern inkubiert. Die *Capture*-Antikörper, welche spezifisch gegen die  $\mu$ -Kette humaner IgM-Antikörper oder gegen die  $\alpha$ -Kette humaner IgA-Antikörper oder gegen die  $\gamma$ -Kette humaner IgG-Antikörper gerichtet sind, wurden hierfür auf 5  $\mu\text{g}$  pro 1 ml mit PBS verdünnt. 70  $\mu\text{l}$  dieser Suspension aus dem jeweiligen *Capture*-Antikörper und PBS wurden anschließend in jedes *well* der MAHA S4510 Platten pipettiert und diese für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nachfolgend wurde die Platte insgesamt dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS pro *well* gewaschen. Der Puffer wurde dabei durch Invertieren und vorsichtiges Klopfen von der Platte entfernt. Danach wurden 200  $\mu\text{l}$  einer Blockierlösung bestehend aus PBS und 1 % BSA in jedes *well* pipettiert. Die Inkubation der Blockierlösung erfolgte über 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Nach der Entfernung der Blockierlösung durch Invertieren und vorsichtiges Klopfen der Platte auf Papier wurde jedes *well* mit 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium (RPMI mit FCS) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in unterschiedlicher Konzentration (100.000, 20.000, 4.000, 800) pro 100  $\mu\text{l}$  PBS in die *wells* hinzugegeben. Ein *well* mit jeweils einem der verschiedenen *Capture*-Antikörper wurde als Negativkontrolle freigelassen. Die Inkubation der Platte erfolgte nach der Hinzugabe der PBMCs bei 37 °C über Nacht im Brutschrank. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Platte insgesamt viermal je *well* mit 200  $\mu\text{l}$  PBS plus 0,25 % Tween 20 gewaschen und anschließend weitere viermal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS je *well* alleine. Danach wurde die Platte über 5 Minuten bei Raumtemperatur unter der Sterilbank mit *Aqua bidest* inkubiert. Im Anschluss wurde der *Detection*-Antikörper 1:2000 in ELISpot *dilution buffer* (bestehend aus PBS und 1 % BSA) verdünnt mit je 70  $\mu\text{l}$  in jedes *well* pipettiert. Die Inkubation des *Detection*-Antikörpers erfolgte über 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die den *Detection*-Antikörper enthaltende Suspension wurde nach zwei Stunden durch Invertieren von der Platte entfernt. Die Platte wurde im Anschluss erneut viermal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS plus 0,25 % Tween 20 pro *well* und danach dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS pro *well* gewaschen. Es wurde dann Streptavidin 1:400 in ELISpot *dilution buffer*

verdünnt mit 70 µl pro *well* auf die Platte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Streptavidin wurde nach einer Stunde durch Invertieren der Platte entfernt und danach viermal nach dem bereits bekannten Schema mit PBS und 0,25 % Tween 20 und dreimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurde die Platte mit 70 µl pro *well* AEC bei Dunkelheit gefärbt bis die unterschiedlichen Spots erkennbar wurden. Dies dauerte in der Regel bis zu 30 Minuten. Die AEC-Färbelösung wurde durch Invertieren der Platte entfernt. Die Platte wurde danach gründlich mit Leitungswasser abgewaschen. Die Analyse der Spots auf der Platte erfolgte nachdem die Platte komplett getrocknet war mittels eines Elispotreaders (ELISPOT reader Immunospot Analyzer, CTL Analyzers LLC, Cleveland, OH, USA) und der Immunospot 3 Software.

#### **3.2.4. Nachweis von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und löslichen Antikörpern mittels Luminex Multiplex Assay**

Der Luminex-Assay als spezifischer Multiplex-Assay beschreibt ein Verfahren, welches die Erkennung und Quantifizierung multipler Moleküle, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Antikörper, ermöglicht [460]. Hierbei werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Mikropartikel (englisch *beads*) an Biomoleküle wie Antikörper, Antigene, Enzyme und andere gekoppelt und erhalten so ihre Funktionalität [460]. Die *beads* mit den daran gebundenen Analyten können anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen und quantifiziert werden [461].

In der vorliegenden Arbeit wurde Blutplasma der haplotransplantierten Patienten an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28 und 35 posttransplantationem auf folgende Moleküle untersucht: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IgA, IgE, IgG, IgM. Zum Vergleich wurde das Plasma von zwei gesunden Kontrollpersonen analysiert. Das Vorgehen erfolgte analog zum Bio-Plex<sup>TM</sup> Cytokine Assay Instruction Manual und zum Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Assay Immunoglobulin Isotyping Instruction Manual [462]. Hierzu wurden für den Cytokin Assay 25 µl der Plasmaproben mit jeweils 75 µl Humanem Serum Diluent gemischt. Für den Immunoglobulin Isotyping Assay wurden 10 µl der



Plasmaproben verwendet und jeweils 1:1000 mit Isotyping Diluent verdünnt. Ferner wurde eine Standardlösung vorbereitet, welche die einzelnen Zytokine, Wachstumsfaktoren und Antikörper-Subtypen in einer definierten Menge enthält. Hierzu wurden für den Cytokin Assay Bio-Plex Serum Standard Diluent und Premixed Cytokine Standard Dilution zur Herstellung eines sogenannten Master Standard Stock verwendet. Die Herstellung erfolgte nach der Vorgabe in *Section 5* des Bio-Plex™ Cytokine Assay Instruction Manual [462]. Für den Immunoglobulin Isotyping Assay wurden Bio-Plex Isotyping Standard und Isotyping Diluent zur Herstellung eines Master Standard Stock verwendet. Die Herstellung des Master Standard Stock wurde nach der Vorgabe in *Section 5* des Bio-Plex Pro™ Assay Immunoglobulin Isotyping Instruction Manual angefertigt [462]. Die weiteren Schritte des Versuchs erfolgten für beide Assays analog. Die Luminexplatte wurde mit 100 µl *Assay Buffer* befeuchtet. Dann wurden 50 µl der *Bead Working Solution*, bestehend aus *Beads* und *Assay Buffer*, auf die Platte gegeben. Die Platte wurde danach mit 100 µl *Wash Buffer* pro *well* gewaschen. Nachfolgend wurden 50 µl, entweder der Patientenproben oder des *Standard Stock*, pro *well* pipettiert und dann abgedeckt auf einem Schüttler für insgesamt 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Geschwindigkeit des Schüttlers innerhalb der ersten 30 Sekunden auf 1100 rpm gesteigert wurde und anschließend für die weitere Inkubationszeit auf eine Geschwindigkeit von 300 rpm reduziert wurde. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Platte dreimal mit 100 µl *Wash Buffer* gewaschen. Anschließend wurden 25 µl des *Detection Antibody* gelöst in *Antibody Diluent* pro *well* auf die Platte gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Die Herstellung des *Detection Antibodies* erfolgte dabei nach den Angaben in *Section 6* und *7* des Bio-Plex™ Cytokine Assay Instruction Manual sowie *Section 6* und *7* des Bio-Plex Pro™ Assay Immunoglobulin Isotyping Instruction Manual [462]. Die Inkubation des *Detection Antibodies* erfolgte nach den selben Bedingungen wie die Inkubation der Patientenproben oder des *Standard Stocks* über insgesamt 30 Minuten. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Platte erneut dreimal mit 100 µl *Wash Buffer* gewaschen. Im Anschluss wurden 50 µl Streptavidin-PE verdünnt in *Assay Buffer* pro *well* hinzugegeben. Die Herstellung der

Streptavidinverdünnung wurde nach den Angaben in *Section 6* und *7* des Bio-Plex™ Cytokine Assay Instruction Manual sowie des Bio-Plex Pro™ Assay Immunoglobulin Isotyping Instruction Manual durchgeführt [463]. Die Streptavidinlösung wurde für 10 Minuten auf dem Schüttler nach den bereits beschriebenen Bedingungen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit 100 µl *Wash Buffer pro well* wurden zur Analyse der Platte 125 µl *Assay Buffer pro well* gegeben. Nachfolgend wurde die Platte mittels FACS ausgelesen.

### 3.2.5. Nachweis von BAFF mittels BAFF-ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist eine Untersuchungsmethode, bei welcher ein Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden und anschließend mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Antikörpers und einer nachfolgenden Farbreaktion nachgewiesen werden kann [464].

Bei der im Folgenden beschriebenen Methode wurde BAFF (*B cell activating factor*) mittels eines ELISA im Blutplasma der Patienten nachgewiesen. Hierfür wurde das Blutplasma der haplotransplantierten Patienten an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28 und 35 *posttransplantationem* verwendet. Zunächst wurde hierfür die verwendete 96-well-Platte mit humanem Anti-BAFF-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS (Gesamtvolumen 100 µl *pro well*) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit einem Waschpuffer bestehend aus PBS und 0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach wurde die Platte mit einer Blockierlösung aus 2 % BSA in PBS (Gesamtvolumen 100 µl *pro well*) bei Raumtemperatur blockiert. Die Platte wurde anschließend erneut dreimal mit dem oben genannten Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Antigen auf die Platte gegeben; entweder 100 µl der jeweiligen Patientenprobe oder 100 µl einer *Standard Stock Solution* bestehend aus PBS und der *Stock Solution* in unterschiedlicher Konzentration. Die Inkubation des Antigens erfolgte über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Platte mit dem bekannten Waschpuffer dreimal gewaschen. Daraufhin wurde der Antikörper für die

Färbereaktion (100  $\mu\text{l}$  pro well, 0,5  $\mu\text{g}$  pro ml Verdünnungspuffer, bestehend aus PBS + 0,05 % Tween 20 + 0,5 % BSA) hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dann viermal mit dem bekannten Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde Streptavidin 1:200 verdünnt im oben beschriebenen Verdünnungspuffer in einer Menge von 100  $\mu\text{l}$  pro well beigefügt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Erneut wurde die Platte nach Beendigung der Inkubation fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Platte wurde anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  pro well eines Substrats gefärbt, welches aus 20 mg ABTS in 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 18 ml Substratpuffer und 20  $\mu\text{l}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  besteht. Das Auslesen der Platte erfolgte 15 und 30 Minuten nach Zugabe des Substrats bei 405 nm.

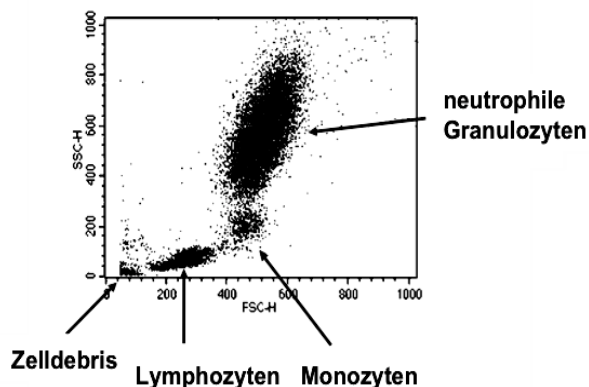
### **3.2.6. Durchflusszytometrische Analysen (FACS)**

#### **3.2.6.1. Grundlagen der fluoreszenzmarkierten Durchflusszytometrie**

Mittels Durchflusszytometrie werden sowohl physikalische als auch chemische Eigenschaften von Zellen in Suspension analysiert [465]. Mit dieser Methode können sowohl quantitative als auch qualitative Merkmale von mehreren tausend Zellen pro Sekunde bestimmt werden [465]. Die Granularität einer Zelle kann hierbei bis zu 0,5  $\mu\text{m}$  aufgelöst werden [465]. Das analytische Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf dem Prinzip der angeregten Emission [465]. Stimuliert der im Gerät befindliche Laserstrahl das zu analysierende, fluoreszenzmarkierte Agenz, so wird die Lichtenergie in Form von Photonen absorbiert [465]. Hierdurch erreicht das fluoreszenzmarkierte Molekül des Agenz, auch Fluorophor genannt, temporär eine höhere Energiemenge [465]. Aufgrund einer fehlenden Spinänderung kann dieser Zustand jedoch nicht lange aufrechterhalten werden [465]. Wenige Nanosekunden nach Erreichen des höheren Energielevels kehrt der Fluorophor wieder in seine ursprüngliche Form zurück [465]. Dabei wird die gespeicherte Änderungsenergie als Strahlung freigesetzt [465]. Die Wellenlänge der hierbei emittierten Strahlung wird dabei durch die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffs definiert [465].

### 3.2.6.2. Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer führt eine Zellsuspension, nach deren Vereinzeln, der sogenannten Durchflusskammer zu [466]. Diese enthält einen bzw. mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen [466]. Im Fall des hier verwendeten FACS CANTO existieren drei Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm, 633 nm und 405 nm [466]. In der Durchflusskammer werden die Zellen durch die Laser bestrahlt und anschließend in eine Detektionseinheit weitergeleitet [466]. Das emittierte Licht wird hier von mehreren Detektoren empfangen [466]. Das Licht wird hierbei je nach Granularität und Zellgröße gestreut und mittels eines Side Scatters (SSC), als Maß für die Granularität der Zelle, die Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge ihrer Vesikel, und eines Forward Scatters (FSC), als Maß für die relative Zellgröße, empfangen [466]. Hierbei definiert die Streustrahlung im rechten Winkel zum Strahlengang die Granularität (SSC) und die Strahlung im Strahlengang die Zellgröße (FSC) [466]. Wie in der unteren Abbildung dargestellt, können Zellpopulationen im Vollblut mit Hilfe dieser beiden Messwerte entsprechend nach ihrer Größe und Granularität unterschieden bzw. präselektioniert werden [466].



**Abbildung 12: Darstellung einer Vollblutprobe.**

Auf der Abszisse ist die relative Zellgröße (FSC) und auf der Ordinate die Zellgranularität (SSC) aufgetragen. Mit Hilfe dieses Verfahren ist es möglich Zellbestandteile des peripheren Bluts zu charakterisieren und somit für weitere Analysen zu präselektionieren. (Quelle: Charité Universitätsmedizin Berlin gemeinsame Einrichtung von Freier Universität und Humboldt-Universität zu Berlin).

Die empfangenen Wellenlängen werden anschließend logarithmisch nachverstärkt und an einen angeschlossenen Rechner übertragen.

### 3.2.6.3. Behandlungsprotokoll der Oberflächenmarkerbestimmung

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Zellen verwendet, welche wie im Kapitel 3.2.2. beschrieben, gewonnen wurden. Das isolierte Zellpellet

der zu analysierenden Zellpopulation wurde mit 100  $\mu$ l, 4 °C kalten PBS resuspendiert und in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß (2 ml) überführt. Anschließend wurde das Probengefäß für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet mit ca.  $5 \times 10^{4-6}$  Zellen wurde nachfolgend 10 – 15 Minuten mit einem zu analysierenden, fluoreszenzgekoppelten Antikörper, gelöst in PBS, inkubiert. Die Verdünnung der einzelnen Antikörper ist weiter unten aufgeführt. Nach der Inkubation erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 100  $\mu$ l PBS (4 °C) wie oben beschrieben. Die Proben wurden bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert. Am Durchflusszytometer wurden standardgemäß  $2 \times 10^{4-6}$  Zellen analysiert und mit dem Computerprogramm FlowJo V6-9 ausgewertet.

**Tabelle 30: Zusammenfassung aller verwendeten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper.**

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörperverdünnung
Anti-CD 19	FITC	1:100
Anti-CD 38	APC	1:50
Anti-CD 27	APC	1:200
Anti-CD 138	PE	1:100
Anti-Ic, IgG, IgA, IgM Mix	PE	1:50
Anti-Lineage	APC	1:100

### 3.2.7. Statistische Analysen

Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels Mittelwert und SEM (*standard area of the mean*). Das verwendete Signifikanzniveau in dieser Arbeit betrug 95 %. Werte über dieser Grenze ( $p$ -Wert  $p \leq 0,05$ ) wurden als signifikant eingestuft. Hoch-signifikante Unterschiede wurden bei  $p \leq 0,01$  angenommen. Ab einem Wert  $p \leq 0,001$  wurde ein von einem höchst-signifikanten Unterschied ausgegangen. Alle statistischen Signifikanzen wurden in dieser Arbeit mit einem, zwei oder drei Asterisk (\*) gekennzeichnet (\* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Mittelwerte mehrerer Gruppen bzw. Stichproben wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse, hier einer einfaktoriellen ANOVA (*Analysis of Variance*) ausgewertet. Im Fall des Erreichens eines Signifikanzniveaus erfolgte

anschließend eine Post-hoc Analyse der einzelnen Variablen unter Verwendung des Tukey Tests. Lineare Zusammenhänge wurden mittels einer linearen Regressionsanalyse berechnet.

### **3.2.8. Software**

Das Layout wurde, ebenso wie die Niederschrift dieser Arbeit, mit dem Textverarbeitungsprogramm MS WORD (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) durchgeführt. Die deskriptiven Analysen wurden mit MS Excel, GraphPad Prism und SPSS erstellt. Die Elispots wurden mit Hilfe des ImmunoSpot 3 Software quantifiziert. Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit FlowJo V6.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Regeneration der Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation

Um die Rekonstitution der Hämatopoese und hier im Besonderen der Leukopoese bzw. Lymphopoese nach erfolgter haploidenter Stammzelltransplantation zu untersuchen wurde in einem ersten Schritt die zeitliche Regeneration der Leukozyten, der neutrophilen Granulozyten sowie der Lymphozyten dezidiert betrachtet. Aufgrund der divergenten Grunderkrankungen sowie des heterogenen Verlaufs der haploidenten Stammzelltransplantationen erfolgte primär eine Analyse des individuellen Verlaufs aller Patienten, gefolgt von einer abschließenden Gruppenanalyse. Die Analyse der Leukozyten erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung des Sysmex-Systems.

Abbildung 13 zeigt den Überblick der zeitabhängigen Regeneration der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bei Patient 1 nach der haploidenten Stammzelltransplantation.

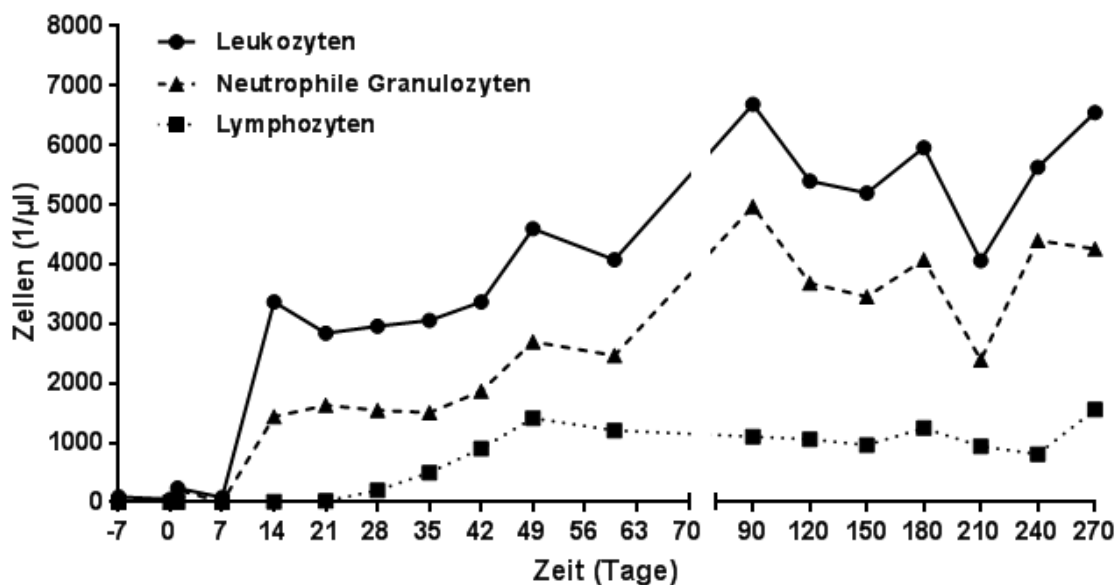
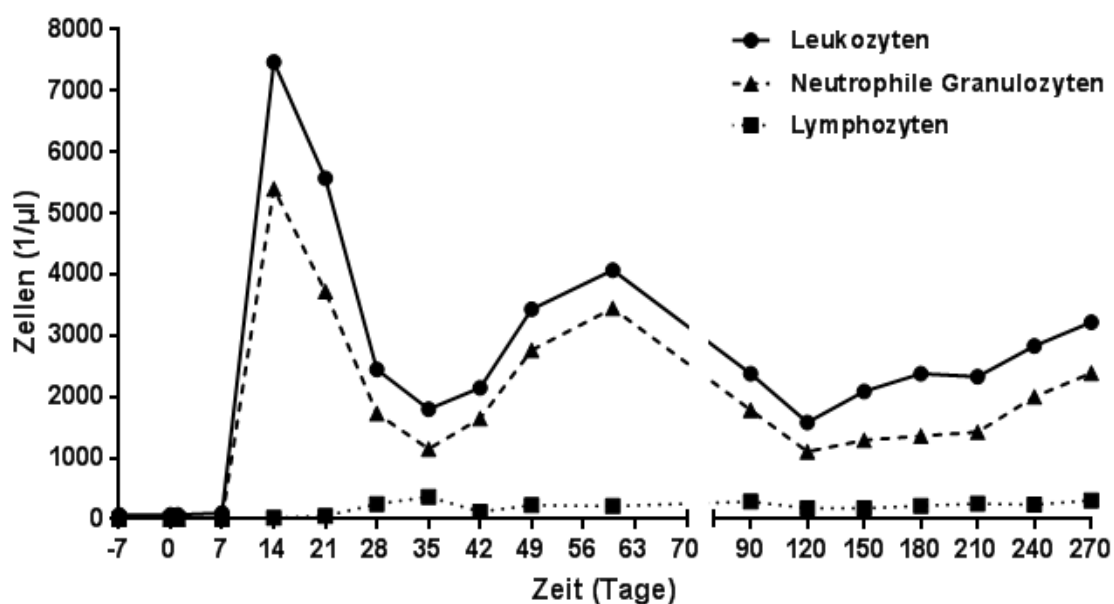


Abbildung 13: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 1.

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

Als Ausdruck der Konditionierung sowie der zugrundeliegenden Erkrankung zeigt sich bereits zu Beginn der Analyse (Tag -7) eine maximale Reduktion der Gesamtleukozyten-, Granulozyten- sowie der Lymphozytenzahl ( $< 50/\mu\text{l}$ ). Der *Granulozytentake*, definiert als Zeitpunkt, an dem 500 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$  nachweisbar sind, ist hier an Tag 9 erreicht. Bereits nach 14 Tagen weisen die Gesamtleukozytenzahlen wieder niedrig normale Werte auf (Normbereich: 3.800 - 10.300/ $\mu\text{l}$ ). Im Gegensatz hierzu kann ein relevanter Anstieg der Lymphozytenzahlen erst 35 Tage nach der haploidenten Transplantation dokumentiert werden. An Tag 100 nach Transplantation weisen sowohl die neutrophilen Granulozyten (Normbereich: 2.100 - 7.7000/ $\mu\text{l}$ ) als auch die Lymphozyten (Normbereich: 1.200-3.5000/ $\mu\text{l}$ ) wieder normale Konzentrationen auf.



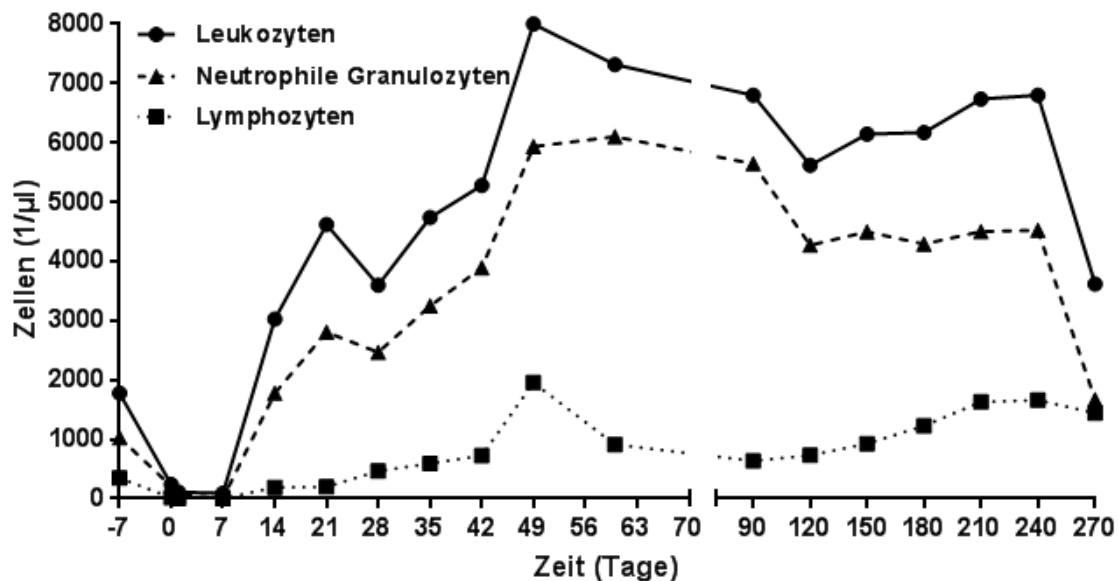
**Abbildung 14: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 2.**

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

Die Regeneration der Leukopoese nach haploidenter Transplantation des zweiten Patienten ist in Abbildung 14 dargestellt. Auch hier ist zum Beginn der Analyse (Tag -7) eine ausgeprägte Leukopenie ( $< 50/\mu\text{l}$ ) sichtbar. Der *Granulozytentake* konnte an Tag 10 dokumentiert werden. Interessanterweise fällt nach 14 Tagen ein deutlicher passagerer Anstieg der Gesamtleukozyten



sowie der neutrophilen Granulozyten gefolgt von einem erneuten Abfall der Zellzahlen zwischen Tag 28 und Tag 49 auf. Der primäre Anstieg der Gesamtlymphozytenzahl und somit der Beginn der Regeneration der Lymphopoese ist frühestens ab Tag 28 erkennbar. Im Gegensatz zu Patient 1 persistiert die Lymphopenie mit  $< 1000/\mu\text{l}$  bis Tag 270 nach der Transplantation.



**Abbildung 15: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 3.**

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

Einen Überblick über die Regeneration der Leukopoese bei Patient 3 gibt Abbildung 15. Zu Beginn der Analyse (Tag -7) lässt sich noch eine Gesamtleukozytenpopulation von  $1760/\mu\text{l}$  zeigen. Die neutrophilen Granulozyten liegen an Tag -7 bei  $1038/\mu\text{l}$ , die Lymphozyten liegen an Tag -7 bei  $349/\mu\text{l}$ . Zum Zeitpunkt der Stammzellrückgabe (Tag 0) beträgt die messbare Zellzahl aller hier untersuchten Zellreihen  $< 50/\mu\text{l}$ . Der *Granulozytentake* konnte an Tag 8 nach der Transplantation beobachtet werden. An Tag 21 weisen die Gesamtleukozytenwerte, ebenso wie absoluten Neutrophilenzahlen wieder Normwerte auf. Entsprechend ist bei Patient 3 die Regeneration der Granulopoese bereits nach 16 Tagen erfolgt. Auch bei diesem Patienten ist ein passagerer Abfall der Leukozyten und Granulozyten zwischen Tag 21 und 28 erkennbar. Ein Anstieg der Lymphozytenzahl kann analog zu Patient 1 und 2 erst 28 Tage nach

Stammzellrückgabe gezeigt werden. Eine weitgehende Normalisierung der Lymphozytenzahl ( $>1200$  Lymphozyten/ $\mu\text{l}$ ) tritt nach 49 Tagen ein. Auffallend ist bei diesem Patienten ein relevanter Abfall der Leukozyten- und Granulozytenzahl 270 Tage nach der Transplantation.

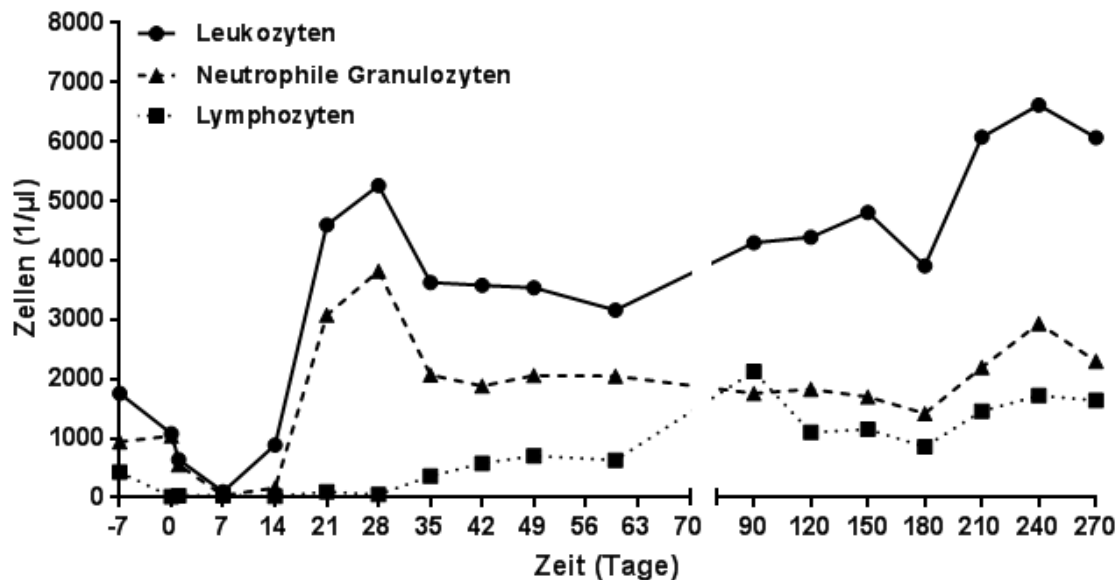


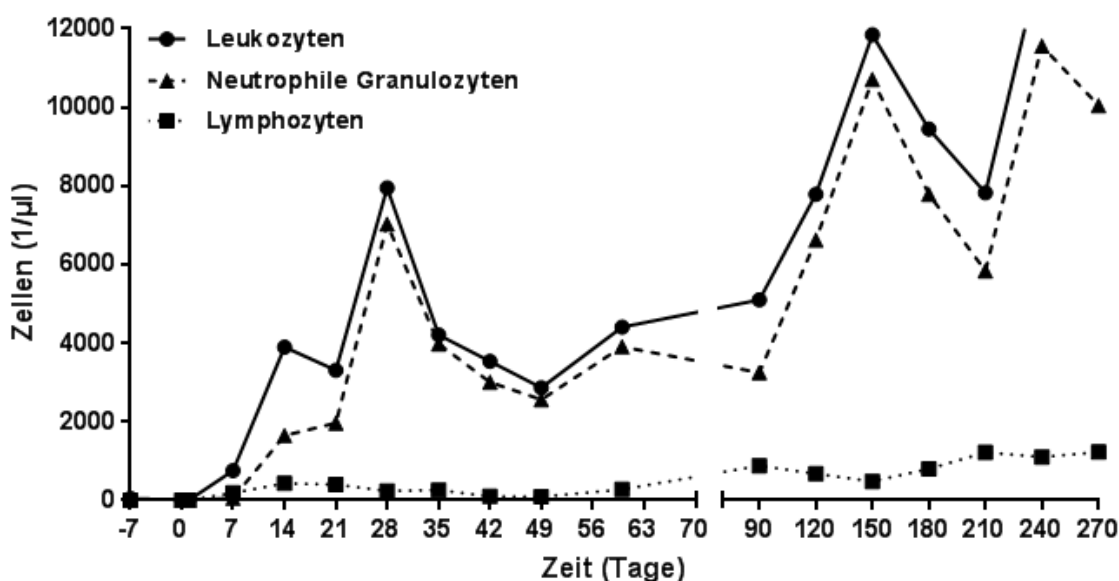
Abbildung 16: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4.

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

Vergleicht man die Ergebnisse der bisherigen 3 Patienten mit den Daten der Regeneration der Leukopoese bei Patient 4, so fällt erneut – wie auch bei Patient 2 – ein steiler Anstieg der Gesamtleukozyten und der neutrophilen Granulozyten zwischen Tag 14 und 21 auf. Der *Granulozytentake* ist an Tag 8 erreicht. Ebenso wie bei Patient 2 und Patient 3 kann auch bei Patient 4 ein vorübergehender Abfall der Leukozytenzahl zwischen Tag 28 und 35 gezeigt werden. Ein Anstieg der Lymphozyten ist ab Tag 35 zu dokumentieren (siehe Abb. 16).

Bei Patient 5 (siehe Abb. 17) kann der Beginn der Regeneration der Leukopoese und insbesondere auch der Granulopoese zwischen Tag 7 und 14 terminiert werden. Dem primären Anstieg der Leukozyten folgt erneut ein passagerer Abfall zwischen Tag 28 und 42. Eine beginnende Regeneration der Lymphozyten ist ab Tag 90 nach erfolgter Stammzellrückgabe zu erkennen.

Zwischen Tag 90 und 210 nach der Transplantation zeigt sich zudem ein erneuter passagerer Leukozytenanstieg auf maximal 11830/ $\mu$ l. Betrachtet man den gesamten Zeitverlauf der Regeneration der Granulopoese so imponiert hier ein zweigipfliger Anstieg (Tag 28 und Tag 150). Interessanterweise lassen sich die Granulozytenzahlen nicht mit klassischen Entzündungsparametern wie CRP (CRP an Tag 28: 0,4 mg/dl, CRP an Tag 150: 0,6 mg/dl) korrelieren und sind somit ggf. als Ausdruck einer stufenweisen Regeneration zu interpretieren.



**Abbildung 17: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 5.**

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

Auch Patient 6 weist einen mehrgipfligen Verlauf der Leukozytenzahlen und neutrophilen Granulozytenzahlen auf. Der *Granulozytentake* ist an Tag 9 nach der Transplantation messbar. Auffallend zeigt sich ein Anstieg der Leukozytenzahlen auf 28860/ $\mu$ l zwischen Tag 49 und 63 gefolgt von einem Abfall auf 3250/ $\mu$ l an Tag 90. Eine Korrelation der Leukozytenwerte mit dem CRP-Wert (0,02 – 0,73 mg/dl) lässt sich, analog zu Patient 5, auch bei Patient 6 nicht erkennen. Die Regeneration der Lymphozyten, angedeutet durch wiederholt relevant messbare Lymphozytenzahlen, kann ab Tag 35 nach der Stammzellrückgabe dokumentiert werden.

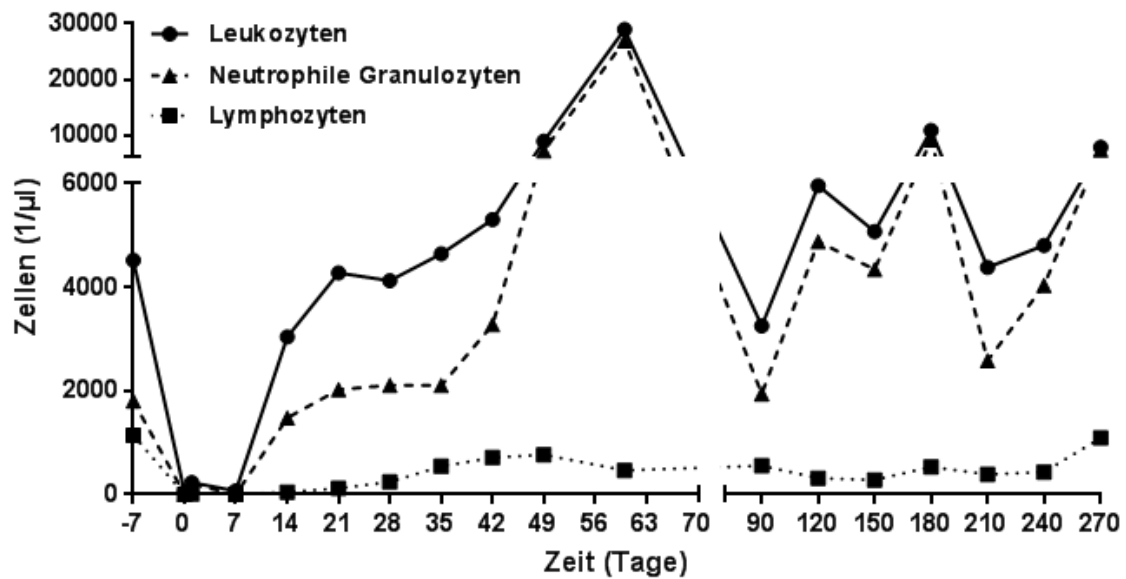
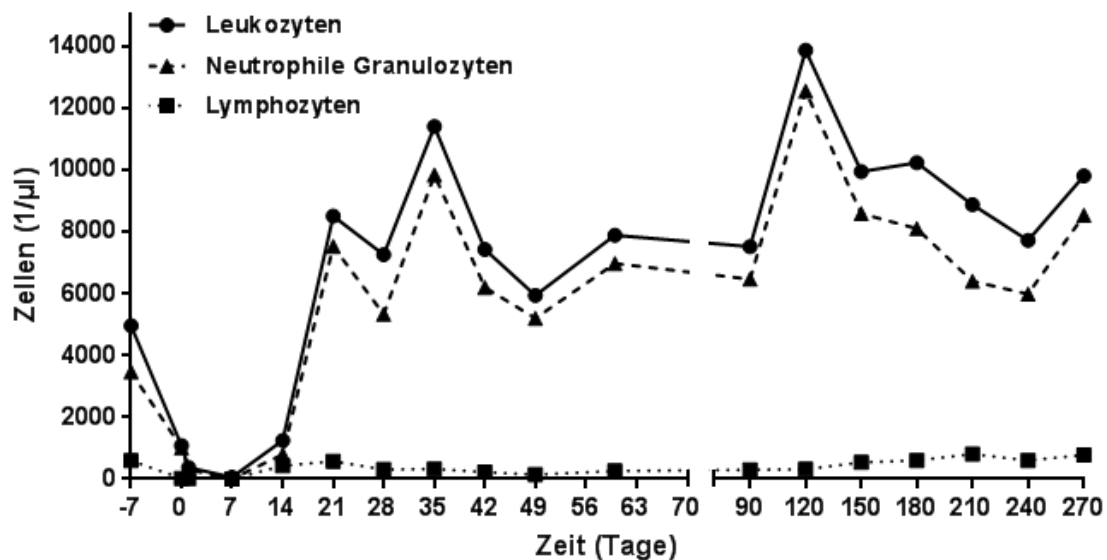


Abbildung 18: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 6.

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

In Abbildung 19 ist die Leukozytenentwicklung des Patienten 7 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Stammzellrückgabe (Tag 0) zeigen sich, im Gegensatz zu den bisherigen 6 Patienten noch insgesamt 1080 Gesamtleukozyten/ $\mu\text{l}$  und 980 neutrophile Granulozyten/ $\mu\text{l}$ . Entsprechend kann der *Granulozytentake* erst an Tag 13 dokumentiert werden. Analog zu den vorherigen Patienten ist der Gesamtverlauf der Regeneration der Leukozyten und der neutrophilen Granulozyten mehrgipflig mit *peaks* zwischen Tag 14 und 21, Tag 28 und 42 und Tag 90 bis 150. Auch dieser Verlauf der Leukozyten korreliert nicht mit den CRP-Werten. Die Entwicklung der Lymphozyten bis hin zu normwertigen Lymphozytenzahlen ( $> 1200/\mu\text{l}$ ) kann innerhalb des Analysezeitraums (Tag 0 bis 270) nicht beobachtet werden.

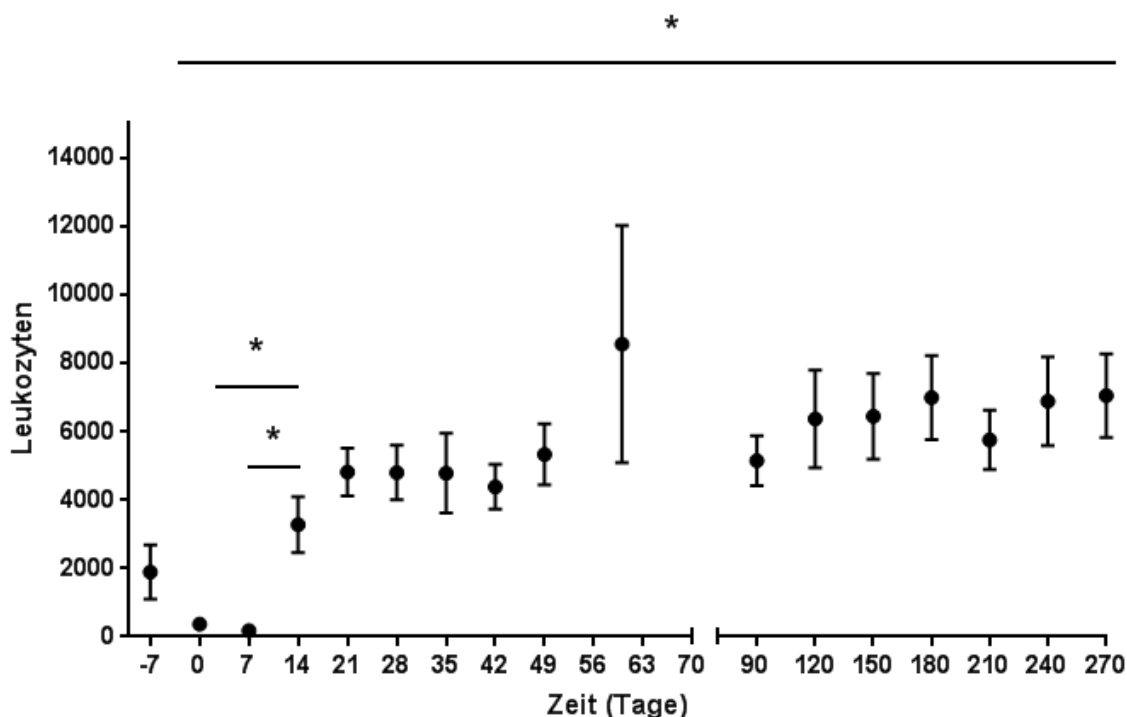


**Abbildung 19: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 7.**

Die Regeneration der Leukopoese nach erfolgter Transplantation ist bezogen auf die Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten dargestellt.

Eine statistische Gesamtbetrachtung der Leukozytenregeneration aller 7 Patienten erfolgte, wie im Material und Methoden beschrieben, unter Zuhilfenahme des ANOVA-Tests. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p < 0,05$ ) wurde anschließend eine Post-hoc Analyse unter Verwendung des Tukey Tests durchgeführt.

In Abbildung 20 ist die Regeneration der Gesamtleukozytenzahlen aller 7 Patienten nach erfolgter haploidenter Stammzelltransplantation als Mittelwert und *standard area of the mean* (SEM) dargestellt.



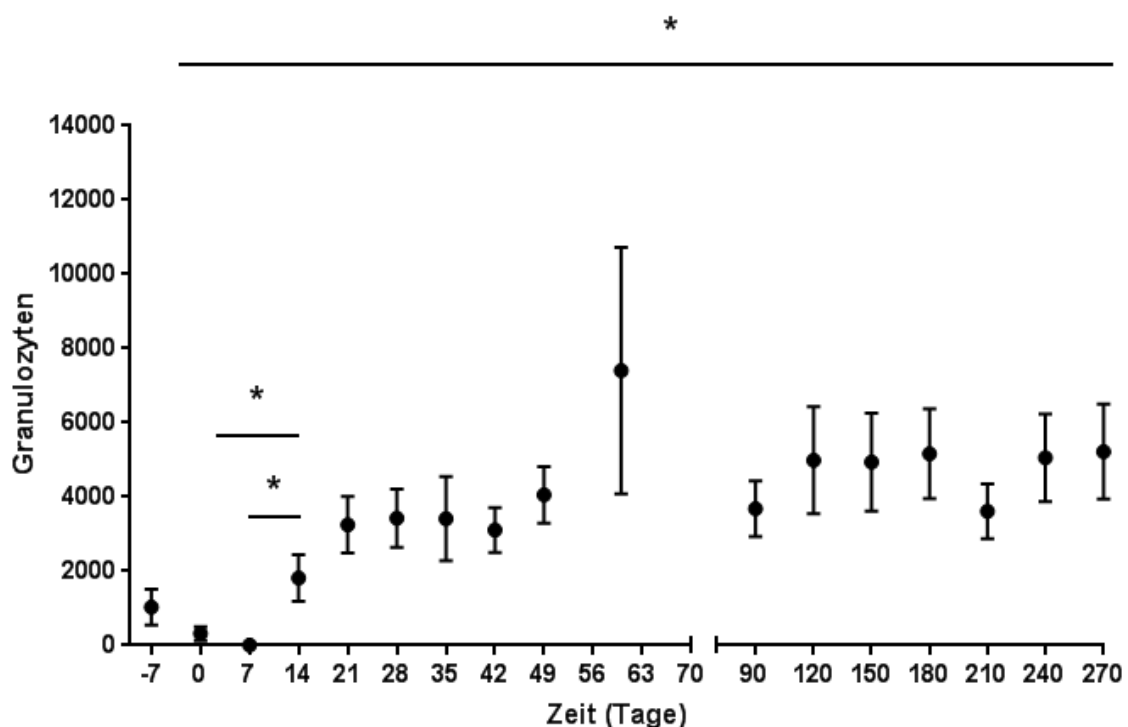
**Abbildung 20: Regeneration der Leukozyten nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Aufgezeigt ist hier die Regeneration der Leukopoese aller 7 Patienten nach erfolgter haploidenter Transplantation. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Vergleicht man die Regeneration der Gesamtleukozytenzahlen über den Beobachtungszeitraum der haploidenten Transplantation (Tag -7 bis 270), so ergibt die Varianzanalyse (ANOVA-Test) einen  $p$ -Wert von 0,03. Entsprechend wurden in einem zweiten Schritt Subgruppen- bzw. Post-hoc-Analysen zwischen den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Tag -7 bis 270) unter Verwendung des Tukey-Tests durchgeführt. Bezogen auf die hier berechneten Signifikanzen bestätigen sich die Beobachtungen der Einzelanalysen der Patienten im Bezug auf das Zeitfenster der Regeneration der Leukopoese (Tag  $\pm 14$ ). So steigen die Leukozytenzahlen signifikant an Tag 14 von  $168 \pm 45$  auf  $3210 \pm 950$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ . Auffallend zeigt sich hier ein passagerer, jedoch aufgrund der heterogenen Werte der Einzelpatienten nicht signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl zum Messzeitpunkt an Tag 56.

Simultan zu dieser Analyse wurde auch die Entwicklung der neutrophilen Granulozyten in der Summe aller Patienten untersucht (siehe Abb. 21). Betrachtet man den Verlauf der Regeneration der neutrophilen Granulozyten

nach der Stammzellrückgabe, so imponiert hier die nahezu exakte Übereinstimmung im Vergleich zu den Gesamtleukozyten. Die Subgruppenanalyse nach signifikanter Varianztestung ( $p = 0,02$ ) identifiziert ebenfalls den Tag 14 *post transplantationem* als statistisch signifikanten Regenerationszeitpunkt (Tag 0 vs. Tag 14:  $p = 0,02$ , Tag 7 vs. Tag 14,  $p = 0,01$ ). Entsprechend dieser Daten scheint die Regeneration der Gesamtleukozyten, erwartungsgemäß, maßgeblich die Erholung der Granulozyten und insbesondere der neutrophilen Granulozyten, widerzuspiegeln.

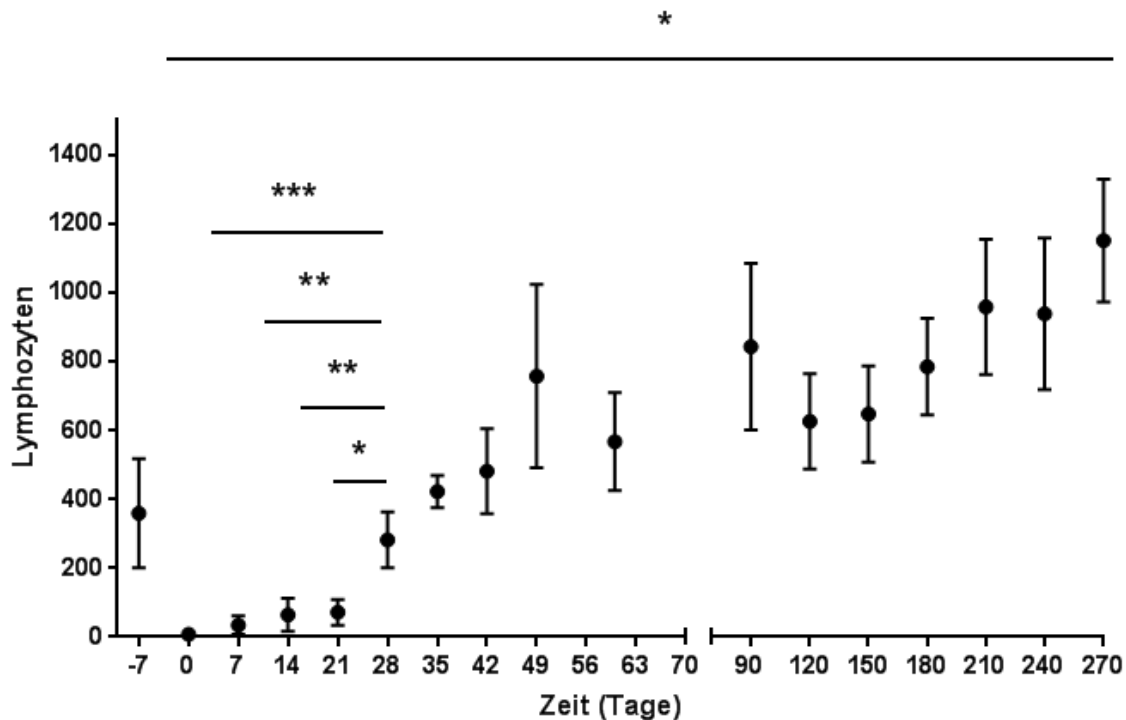


**Abbildung 21: Regeneration der neutrophilen Granulozyten nach haploidentischer Stammzelltransplantation.**

Dargestellt ist hier die Regeneration der neutrophilen Granulozyten aller Patienten ( $n = 7$ ) nach erfolgter haploidentischer Transplantation. Angezeigt sind der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA-/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Abschließend wurde die Regeneration der Lymphopoese aller 7 Patienten untersucht (siehe Abb. 22). Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen der Leukozyten und der neutrophilen Granulozyten zeigt sich die Regeneration der Lymphopoese deutlich später. So kann eine signifikante Zunahme der Lymphozytenpopulation erst an Tag 28 *post transplantationem* dokumentiert werden (Tag 0 vs. Tag 28:  $p < 0,001$ , Tag 7 vs. Tag 28:  $p = 0,008$ , Tag 14 vs.

Tag 28:  $p = 0,004$ , Tag 21 vs. Tag 28:  $p = 0,04$ ). Eine nahezu normwertige Lymphozytenzahl ( $>1200/\mu\text{l}$ ) wird frühestens 270 Tage nach erfolgter Stammzellrückgabe erreicht.



**Abbildung 22: Regeneration der Lymphozyten nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Dargestellt ist hier die Regeneration der Lymphozyten aller 7 Patienten nach erfolgter haploidenter Stammzelltransplantation. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA-/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

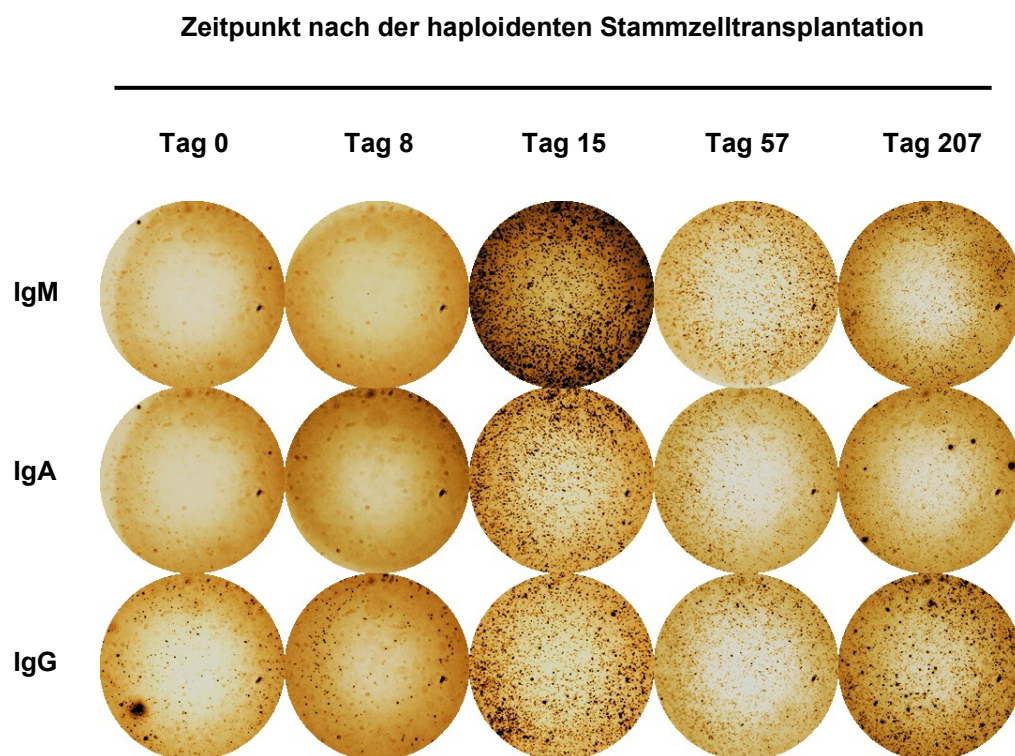
Zusammenfassend konnte in den oben aufgeführten Untersuchungen, bezogen auf das Zeitfenster der Regeneration der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, eine große Homogenität in allen 7 Patienten beobachtet werden. Der *Granulozytentake* lag bei allen 7 Patienten zwischen Tag 7 und Tag 9 *post transplantationem*. Betrachtet man den gesamten Verlauf der untersuchten Zellreihen so imponiert allerdings keine lineare Regeneration. Vielmehr lässt sich ein mehrphasiger Anstieg zeigen, welcher nicht mit den Inflamationsmarkern CRP oder PCT in positiver oder negativer Weise korreliert. Erwartungsgemäß konnte zudem eine deutlich verzögerte Lymphopoese, verglichen mit der Gesamtleukopoese und der Granulopoese, nachgewiesen werden. Eine vollständige Erholung der Lymphozytenzahlen ist frühestens 270 Tage nach Stammzellrückgabe erkennbar.



Eine Subklassifikation der Lymphozyten in B-Lymphozyten, insbesondere Plasmazellen, T-Lymphozyten oder NK-Zellen ist in dieser Analyse nicht möglich. Auf die Aspekte der Lymphozytensubklassen nach haploidenter Stammzelltransplantation wird in Kapitel 4.5. genauer eingegangen.

## 4.2. Detektion von IgA-, IgG- und IgM-sezernierenden Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation

In einem zweiten Schritt wurde nach der Analyse der Regeneration der Leukopoese das Auftreten von Immunglobulin-präsentierenden bzw. Immunglobulin-sezernierenden Zellen nach der haploidenten Stammzelltransplantation untersucht. Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Woche 0 bis 64) Patientenproben gewonnen und, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, periphere mononukleäre Zellen (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) isoliert. Anschließend wurde die Expression von IgA, IgG und IgM mit Hilfe eines ELISpot-Assays (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) analysiert. Die entstandenen Spots repräsentieren jeweils den Kontaktpunkt der Immunglobulin-tragenden Zellen mit der Detektionsmembran. Exemplarisch zeigt die untere Abbildung 23 das Auftreten IgM-, IgA- und IgG-sezernierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der haploidenten Transplantation bei Patient 2.



**Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der Elispots des Patienten 2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der haploidenten Transplantation.**

Nach der Probengewinnung wurden PBMCs isoliert und über 24 Stunden auf den mit IgM-, IgA- und IgG-Antikörper beschichteten Platten inkubiert. Nachfolgend wurde eine Immunfärbung, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, verwendet, um die Kontaktstelle der Immunglobulin-exprimierenden Zellen mit der Membran zu visualisieren.

Um Schwankungen in der Gesamtzellzahl der isolierten und verwendeten PBMCs in den unterschiedlichen Untersuchungen auszugleichen, wurde die Auswertung nicht nur auf die absolute Anzahl der entstehenden Elispots bezogen (Teilabbildung A), sondern ebenfalls eine Analyse der Elispots bezogen auf 1  $\mu\text{l}$  PBMC (definiert als Elispot/Gesamtanzahl der eingesetzten PBMCs/ $\mu\text{l}$ ) durchgeführt (Teilabbildung B).

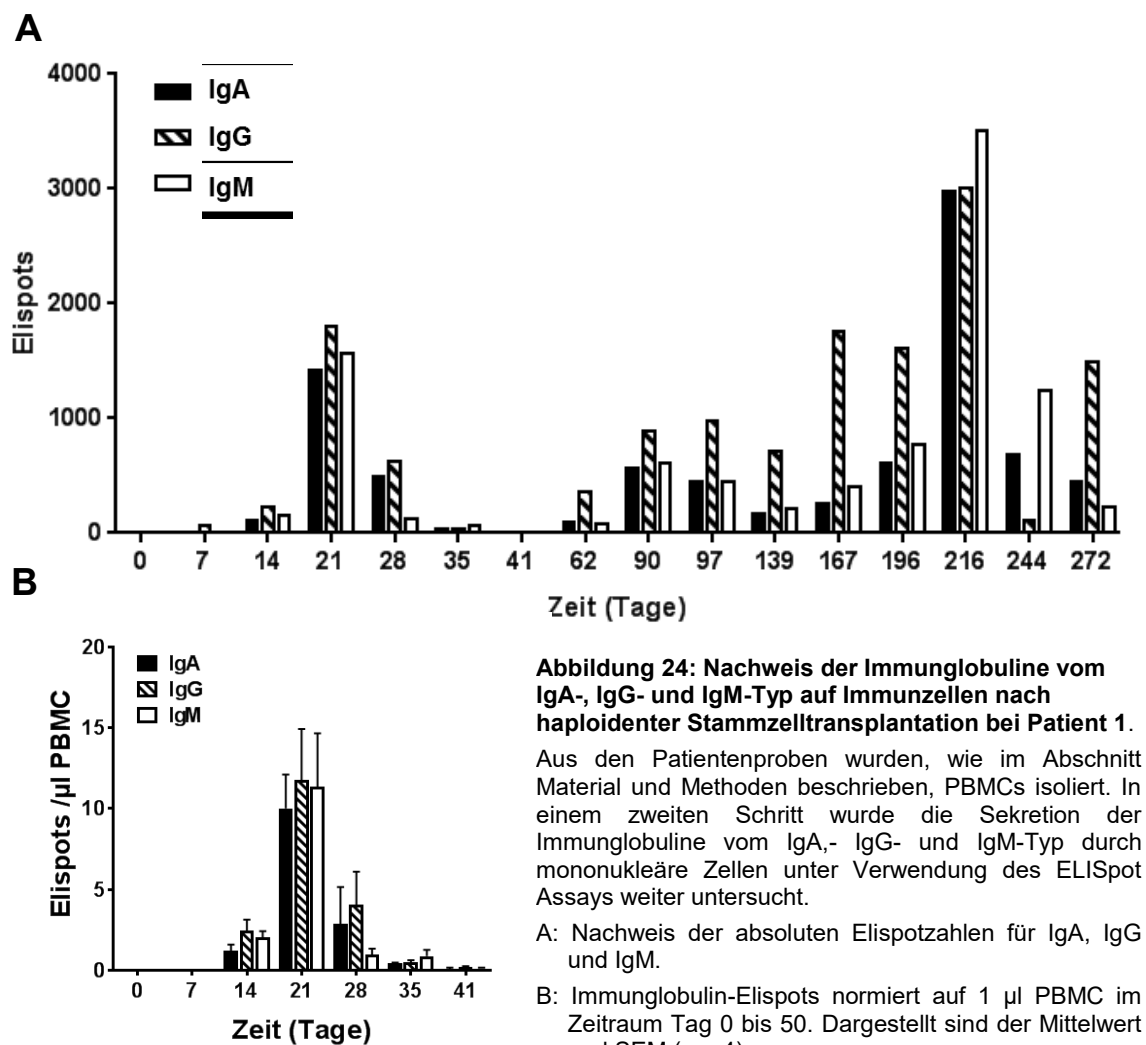
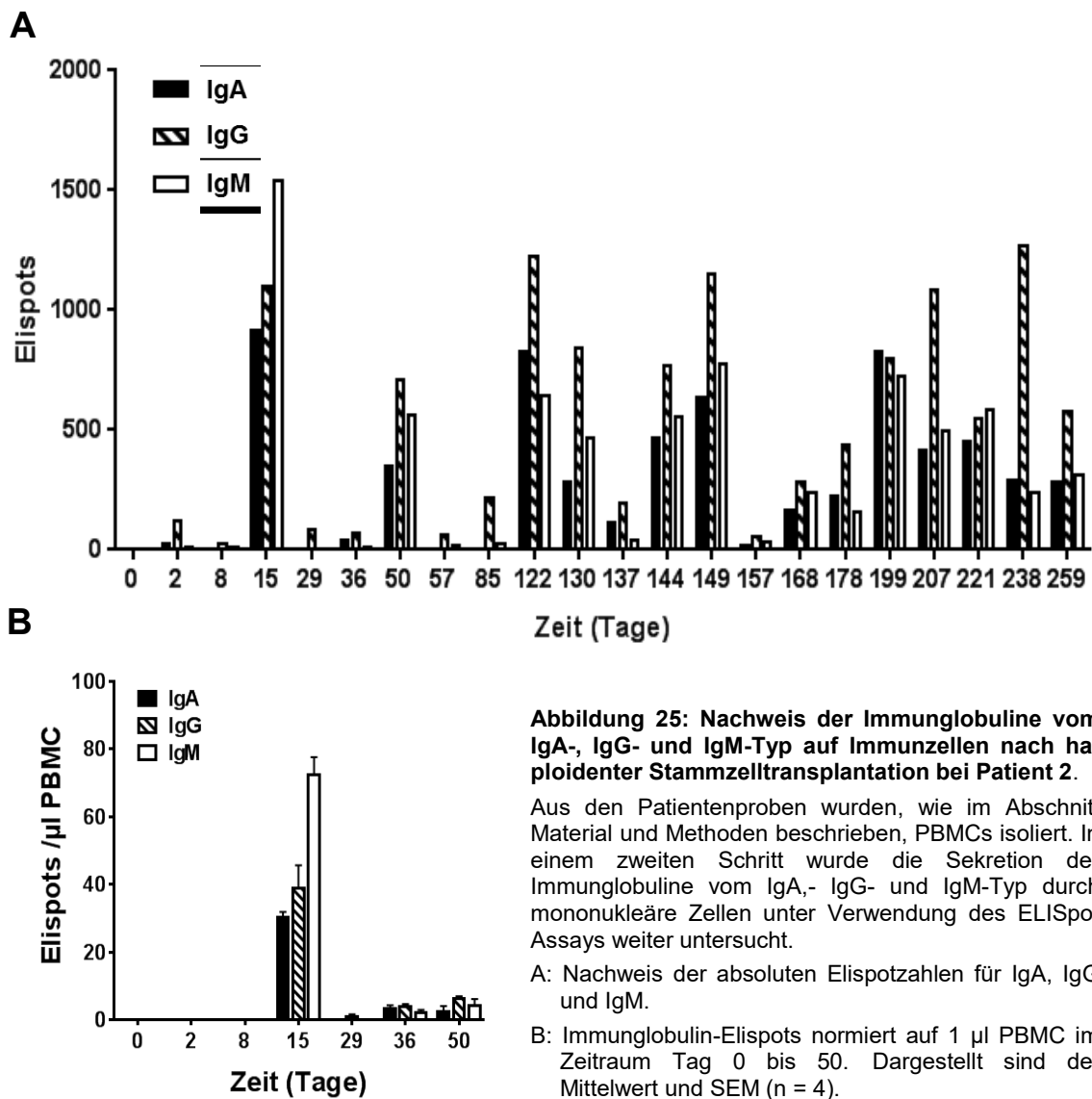


Abbildung 24 zeigt die absolute (A) und relative (B) Anzahl der entstandenen Elispots für IgA, IgG und IgM in Patient 1 nach erfolgter Stammzellrückgabe (Tag 0). Wie der Teilabbildung A zu entnehmen ist, sind zwischen Tag 0 (Tag der Stammzellgabe) und Tag +7 keine Immunglobulin-exprimierenden Zellen im peripheren Blut nachweisbar. Dementgegen ist ein passagerer Anstieg der IgA-,

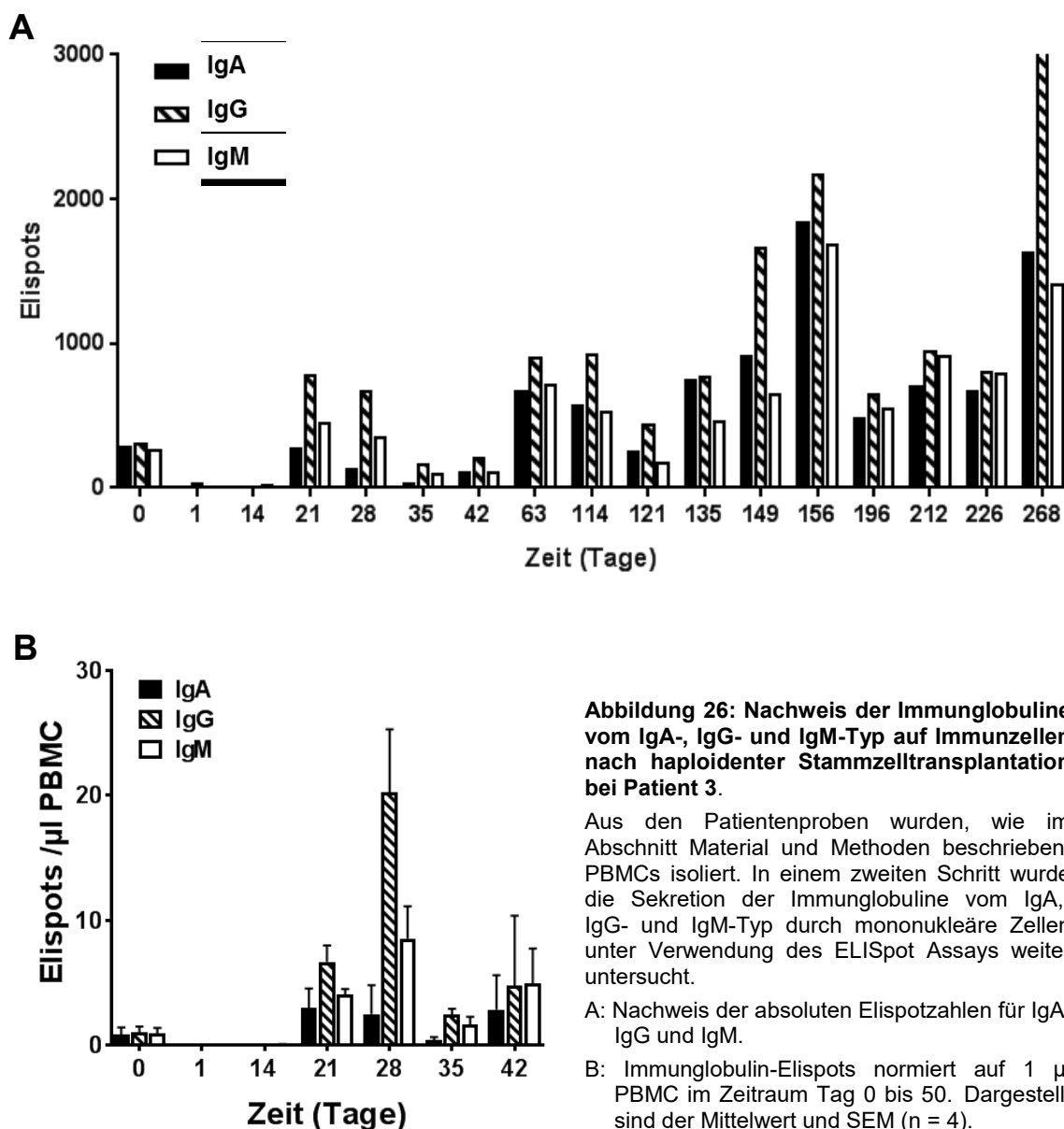
IgG- und IgM-Elispots zwischen Tag 14 und 35 *post transplantationem* detektierbar. Ein Maximum der *Spots* ist nach 21 Tagen mit 1441 *Spots* für IgA, 1823 *Spots* für IgG und 1578 *Spots* für IgM erreicht. Die Präferenz eines Immunglobulins ist nicht erkennbar. Bezogen auf die relative Anzahl der Elispots pro  $\mu\text{l}$  PBMCs (Teilabbildung B) kann diese Beobachtung mit  $10 \pm 2$  *Spots* für IgA,  $12 \pm 2,8$  *Spots* für IgG und  $11,4 \pm 2,6$  *Spots* für IgM bestätigt werden. Zwischen Tag 35 und 62 ist ein erneuter Abfall der Immunglobuline erkennbar. Erst ab Tag 90 können erneut relevante Elispotzahlen für IgA, IgG und IgM gezeigt werden.



Die Anzahl der gemessenen Elispots für IgA, IgG und IgM bei Patient 2 sind in Abbildung 25 dargestellt. Ein relevanter Anstieg sowohl der absoluten, als auch der relativen Anzahl der detektierten Elispots ist hier an Tag 15 nach der Stammzellgabe zu beobachten (Tag 15: IgA-Elispots: 921 absolut /  $25 \pm 1,4$  relativ, IgG-Elispots: 1109 absolut /  $39 \pm 4$  relativ, IgM-Elispots: 2214 absolut /  $73 \pm 5$  relativ). Auffallend ist, dass im Gegensatz zur Beobachtung bei Patient 1, eine Dominanz der Immunglobuline vom IgM-Typ vorliegt. Simultan zu den Beobachtungen bei Patient 1 hingegen, ist auch bei Patient 2 ein Abfall der Gesamtzahl der *Spots*, ebenso wie der relativen Zahl der Elispots, für IgA, IgG und IgM zwischen Tag 15 und 50 nachweisbar. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Elispots nach der haploidenten Transplantation so imponiert ein wellenförmiger Anstieg der Elispots, ähnlich zum Anstieg der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten nach der haploidenten Transplantation wie in Kapitel 4.1. beschrieben. Interessanterweise korreliert diese wellenförmige Entwicklung der Elispots direkt mit dem Regenerationsverlauf der Gesamtleukozyten und der neutrophilen Granulozyten (siehe Abb. 14). Eine Korrelation der Entwicklung der Elispots mit den Gesamtlumphozytenzahlen ist unter anderem aufgrund der niedrigen Gesamtzellzahl schwierig.

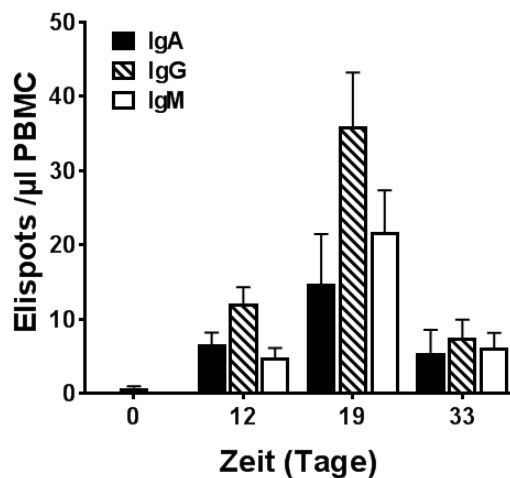
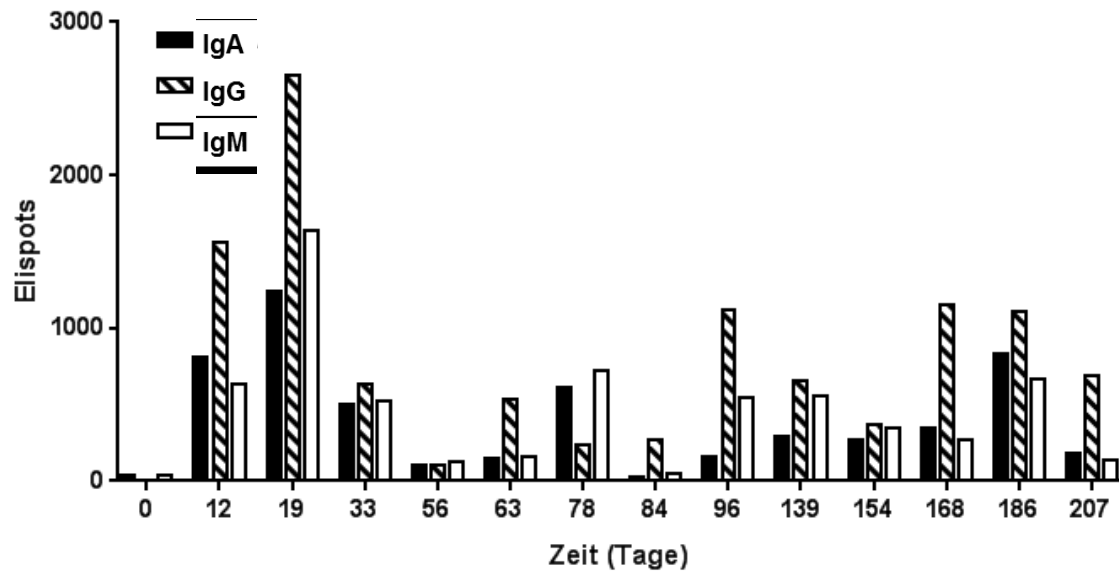
Bei Patient 3 konnte, wie Abbildung 26 zu entnehmen ist, ebenfalls ein vorübergehender, jedoch nicht so ausgeprägter Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-Elispots abgebildet werden. Ein erstes Maximum der *Spots* ist mit 142 - 673 Elispots absolut (IgA 142 - 283 *Spots*, IgG 473 - 673 *Spots* und IgM 330 - 357 *Spots*) zwischen Tag 21 und 28 nach Stammzellrückgabe erreicht. Relativ steigt die Gesamtzahl der Elispots pro  $\mu\text{l}$  PBMCs an Tag 28 deutlich an (IgA  $3 \pm 2$ , IgG  $20,8 \pm 7$  und IgM  $8 \pm 2$ ). Wohingegen bei Patient 2 IgM-Elispots in der ersten Nachweisphase dominieren, sind bei Patient 3 vor allem IgG-Elispots vorhanden. Eine mehrgipflige Verteilung der Gesamt-Elispots für IgA, IgG und IgM kann in Abbildung 26 ebenfalls gezeigt werden. Eine Korrelation der Elispot-Entwicklung mit dem Regenerationsverlauf der neutrophilen Granulozyten (erster Gipfel an Tag 21, zweiter Gipfel zwischen Tag 49 und 63) lässt sich auch bei Patient 3 vermuten. Eine Korrelation des Elispot-Verlaufs mit

den Lymphozytenzahlen hingegen (erster Gipfel an Tag 49) kann nicht gezeigt werden.



Bei Patient 4 (Abb. 27) kann ebenfalls ein früher, zeitlich begrenzter Anstieg der IgA, IgG und IgM Elisposts detektiert werden. Ein Maximum ist mit 1255 IgA Spots, 2661 IgG Spots und 1654 IgM Spots 19 Tage nach der Stammzelltransplantation zu erkennen. Wie bei Patient 3 dominieren auch IgG Elisposts zwischen den Tagen 12 und 19. Betrachtet man bei Patient 4 die absoluten Elispostzahlen im zeitlichen Verlauf, so fällt auf, dass die höchste

Elispotkonzentration (siehe Abbildung unten) bereits 19 Tage nach Stammzellrückgabe erreicht wurde.



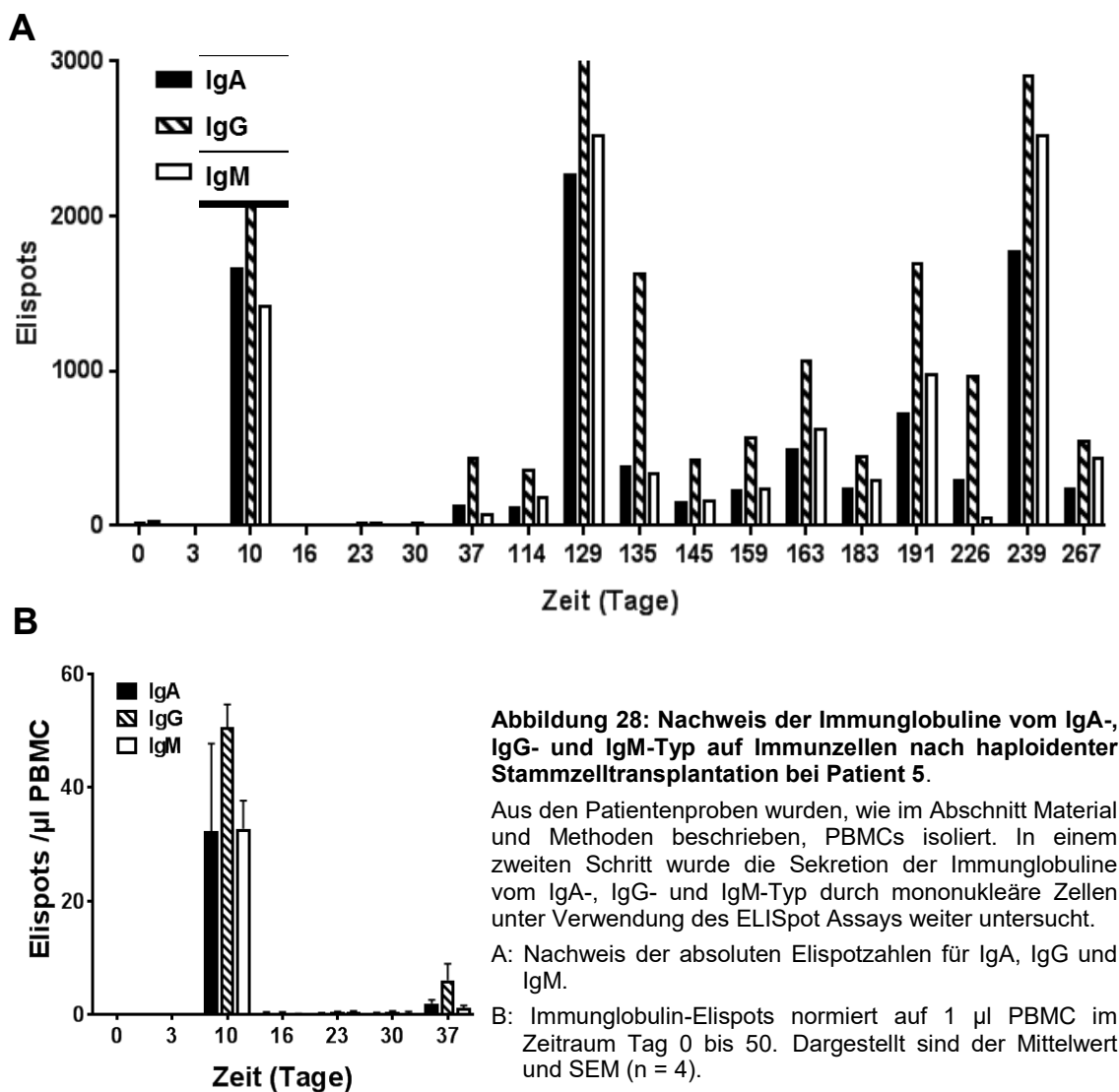
**Abbildung 27: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4.**

Aus den Patientenproben wurden, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, PBMCs isoliert. In einem zweiten Schritt wurde die Sekretion der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ durch mononukleäre Zellen unter Verwendung des ELISpot Assays weiter untersucht.

A: Nachweis der absoluten Elispotzahlen für IgA, IgG und IgM.

B: Immunglobulin-Elispots normiert auf 1  $\mu$ l PBMC im Zeitraum Tag 0 bis 50. Dargestellt sind der Mittelwert und SEM (n = 4).

Analog zu den Patienten 1 bis 4 wurde die Entwicklung Immunglobulin-exprimierender Zellen auch bei Patient 5 mittels Elispot untersucht. Die Ergebnisse der absoluten als auch der relativen IgA-, IgG- und IgM-Elispots sind in Abbildung 28 gezeigt.

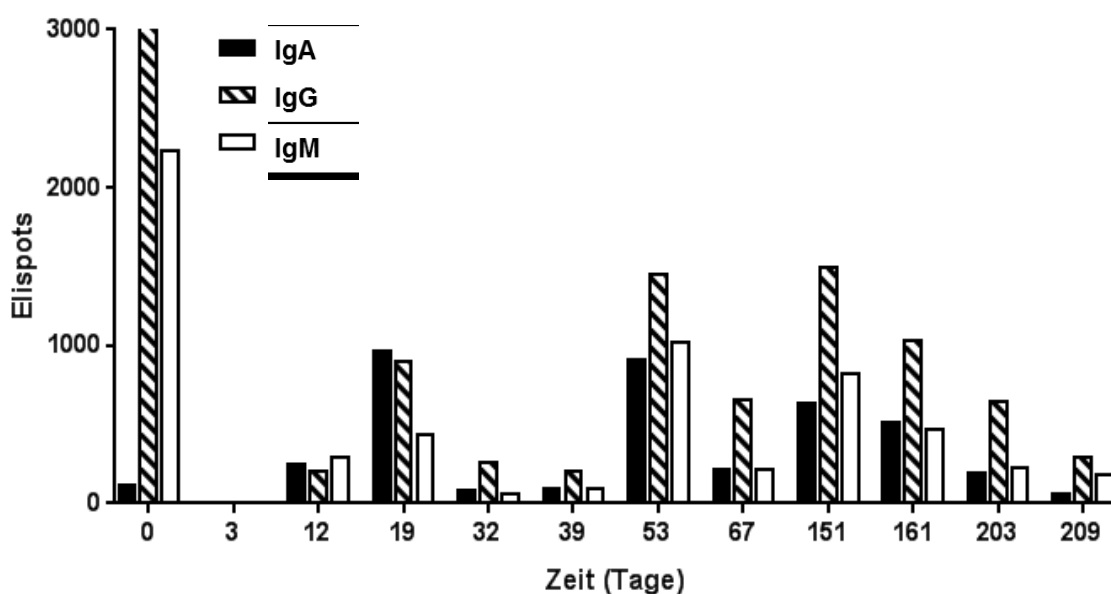


Wie der vorherigen Abbildung 28 zu entnehmen ist, konnte ein relevanter Anstieg der absoluten, als auch der relativen Anzahl der Elispots für IgA, IgG und IgM bereits 10 Tage nach der Transplantation detektiert werden. Im Gegensatz zu den Patienten 1 bis 4 liegt dieser Zeitpunkt näher an der Stammzellgabe. Ebenfalls fällt auf, dass an Tag 16 und Tag 23 keine Elispots mehr dargestellt werden können. Erst ab Tag 37 gelingt wieder ein Nachweis von insgesamt 139 IgA Spots, 443 IgG Spots und 84 IgM Spots.

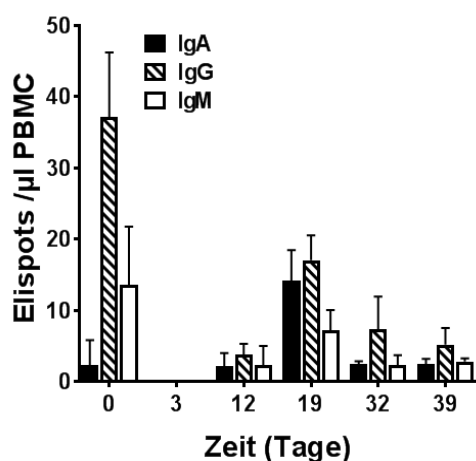


Interessanterweise korreliert dieser zweite Anstieg bei Patient 5 mit dem Anstieg der Lymphozyten im peripheren Blut (siehe Kapitel 4.1.). Betrachtet man die relative Anzahl der Elispots pro  $\mu\text{l}$  PBMCs so imponiert erneut, wie auch bei Patient 3 und 4 eine Dominanz von IgG (IgA  $32 \pm 11$ , IgG  $54,8 \pm 3$  und IgM  $30 \pm 4$ ). Ein zyklischer Anstieg der Elispots, wie bereits bei allen vorherigen Patienten gezeigt, kann auch hier detektiert werden.

A



B



**Abbildung 29: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 6.**

Aus den Patientenproben wurden, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, PBMCs isoliert. In einem zweiten Schritt wurde die Sekretion der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ durch mononukleäre Zellen unter Verwendung des ELISpot Assays weiter untersucht.

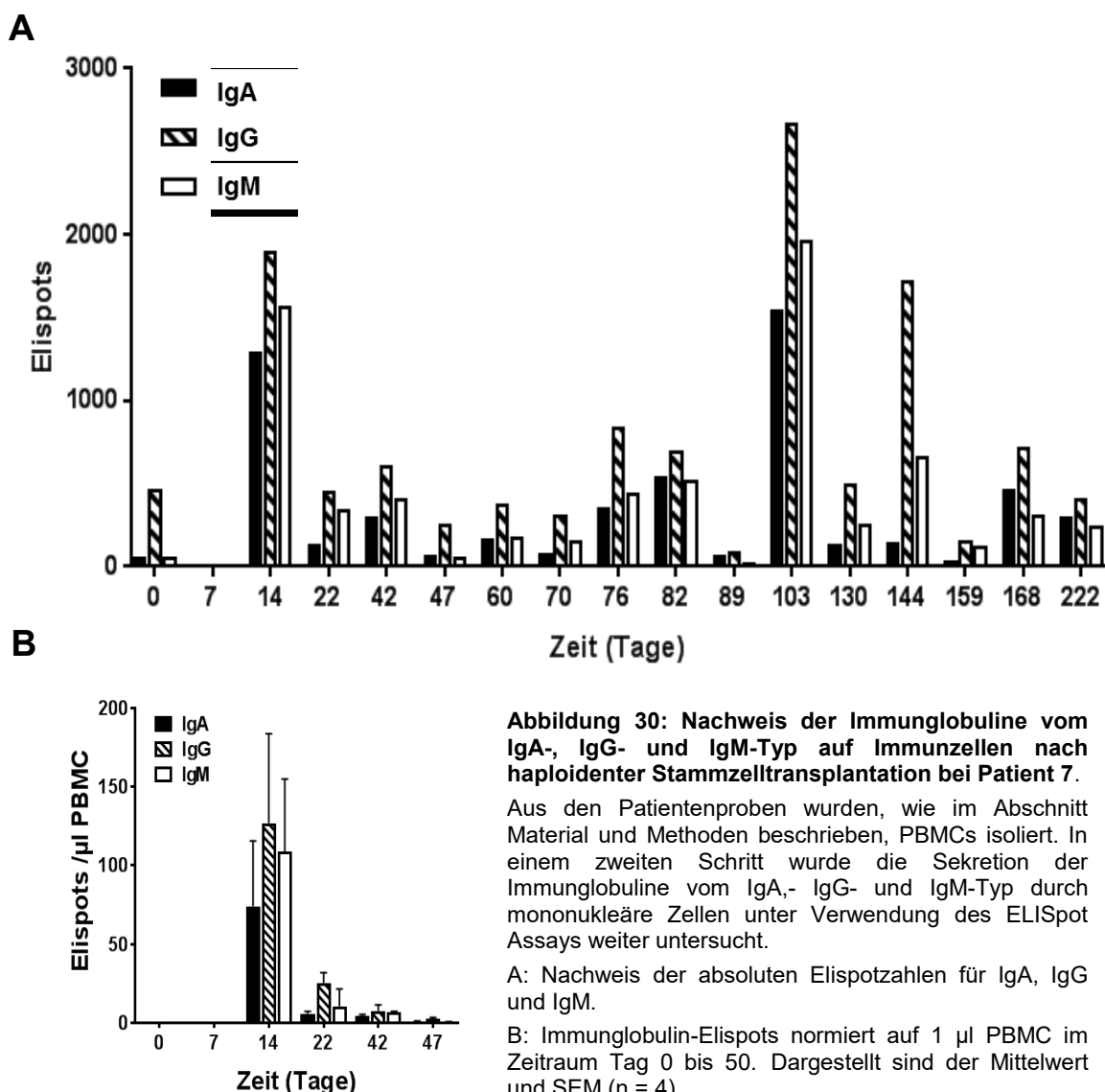
A: Nachweis der absoluten Elispotzahlen für IgA, IgG und IgM.

B: Immunglobulin-Elispots normiert auf 1  $\mu\text{l}$  PBMC im Zeitraum Tag 0 bis 50. Dargestellt sind der Mittelwert und SEM (n = 4).

Wohingegen bei den Patienten 1 bis 5 zum Zeitpunkt der Transplantation (also Tag 0) nur sehr wenige oder keine Elispots für IgA, IgG oder IgM nachweisbar waren, ist bei Patient 6 an Tag 0 mit 123 IgA Spots, 5604 IgG Spots und 2246

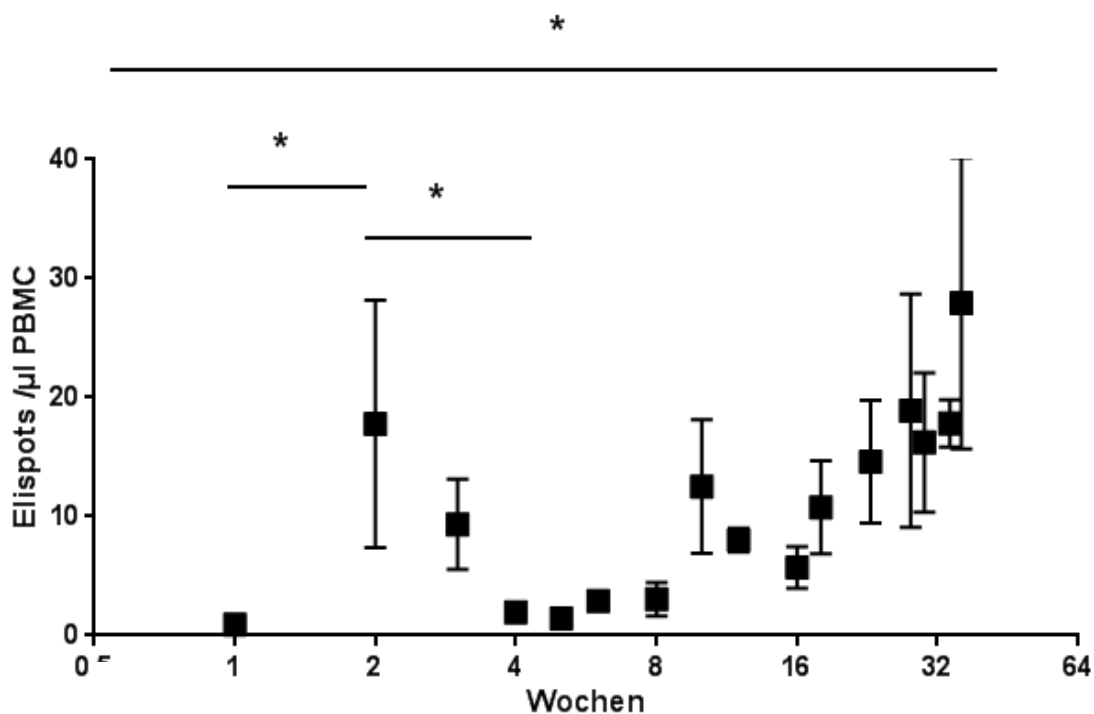
IgM Elispots noch eine relevante Anzahl Immunglobulin-exprimierender Zellen nachweisbar, welche erst bis zum Tag 3 komplett abfällt (siehe Abb. 29). Ein wie schon zuvor beobachteter Anstieg aller drei Immunglobulin-Subtypen kann mit einem ersten Maximum an Tag 19 mit  $14 \pm 5$  IgA-Spots pro  $\mu\text{l}$  PBMC,  $17 \pm 4$  IgG-Spots pro  $\mu\text{l}$  PBMC und  $8 \pm 4$  IgM-Spots pro  $\mu\text{l}$  PBMCs beobachtet werden. Auffallend zeigt sich in Patient 6 zudem ein stetiger Abfall aller drei Elispotzahlen ab Tag 151. So sind im Vergleich zu Tag 151 am letzten Analysezeitpunkt (Tag 209) lediglich 12,2 % der absoluten IgA-Spots, 20,1 % der IgG-Spots und 23 % der IgM-Spots nachweisbar.

Abschließend ist in Abbildung 30 die zeitabhängige Entwicklung der IgA-, IgG- und IgM-exprimierenden Zellen beim Patient 7 dargestellt.



Bei Patient 7 können die bisherigen Ergebnisse eines frühen, passageren Anstiegs der IgA-, IgG- und IgM-Elispots und somit ein Anstieg der Immunglobulin-exprimierenden Zellen erneut bestätigt werden. Ein Maximum zeigt sich mit 1298 IgA-*Spots* absolut, 1905 IgG-*Spots* absolut und 1573 IgM-*Spots* absolut. Eine signifikante Präferenz einer Immunglobulinsubklasse kann nicht dokumentiert werden. Jedoch imponiert erneut ein zyklischer Verlauf der Elispotzahlen.

Betrachtet man die bisherigen Daten der Elispots für IgA, IgG und IgM aller 7 Patienten zusammen, so fällt eine erstaunliche zeitliche Kohärenz des ersten Auftretens der Elispots für alle Immunglobulinsubklassen auf. Diese scheint trotz des inhomogenen Patientenalters, der unterschiedlichen Grunderkrankungen oder der unterschiedlichen infektiologischen Verläufe zu bestehen. Um eine weiterführende statistische Signifikanz zu bestimmen, wurde im Folgenden eine Varianzanalyse aller Patienten unter Zuhilfenahme des ANOVA-Tests durchgeführt. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p < 0,05$ ) erfolgte anschließend eine Post-hoc Analyse unter Verwendung des Tukey-Tests. In Abbildung 31 ist die zeitliche Verteilung der relativen IgA-Elispots aller 7 Patienten nach erfolgter haploidenter Stammzelltransplantation als Mittelwert und *standard area of the mean* (SEM) dargestellt.

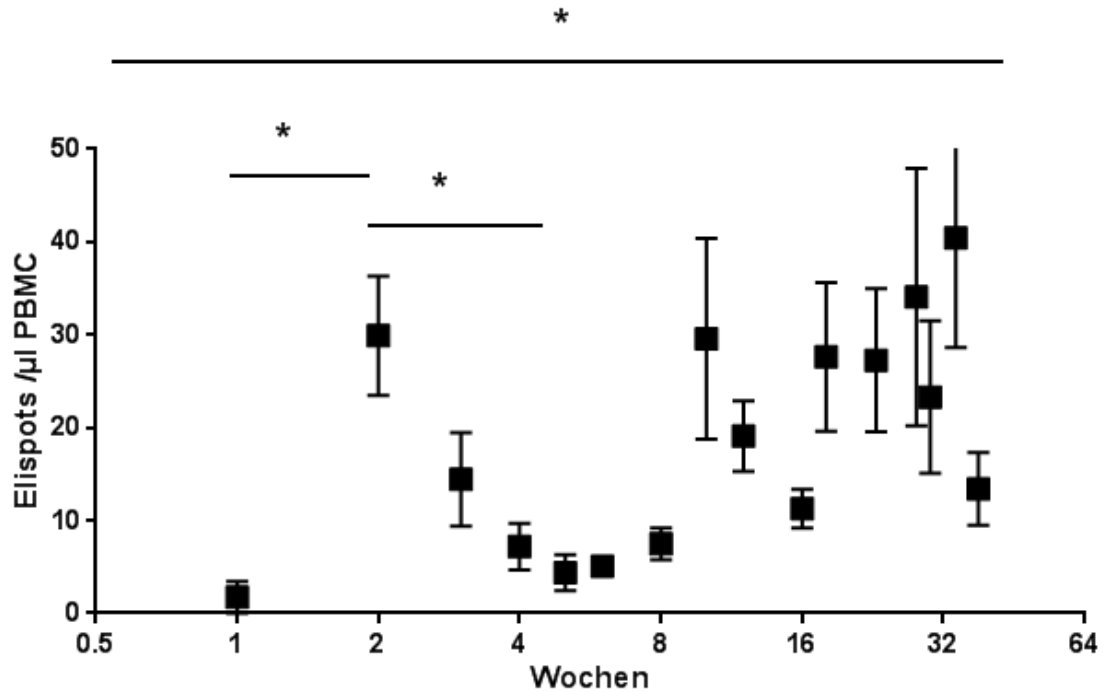


**Abbildung 31: Nachweis des Immunglobulins IgA auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Darstellung der IgA-Elispots aller 7 Patienten normiert auf 1 µl PBMC im Zeitraum Tag 0 bis 64 Wochen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA-/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

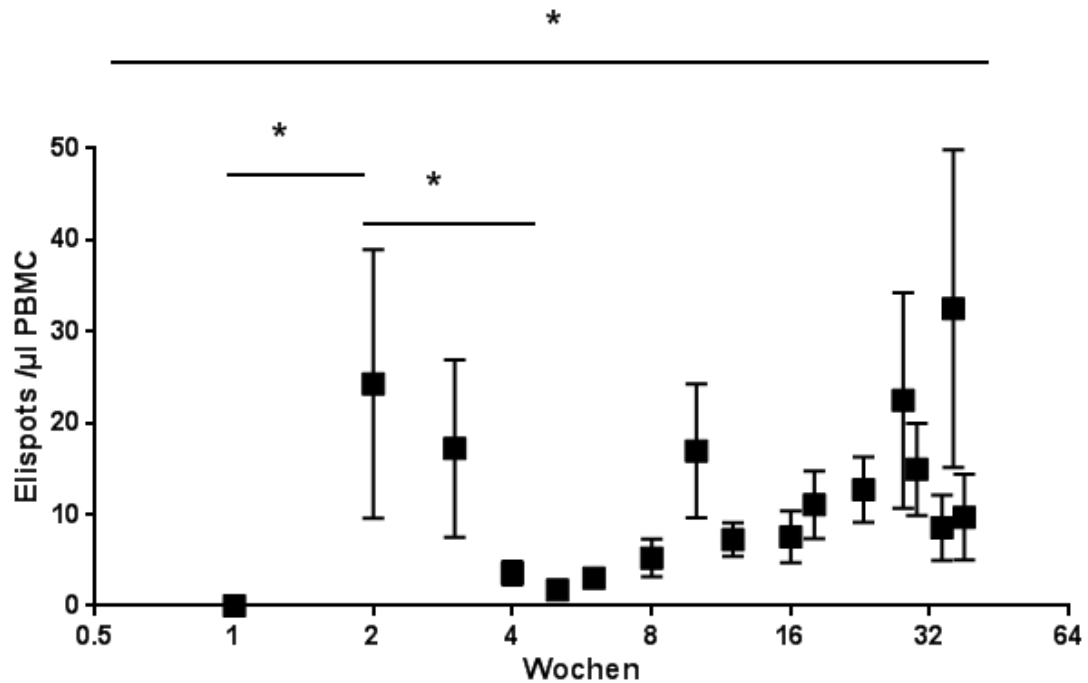
Statistisch lässt sich der beobachtete Anstieg der IgA-Elispots zwischen Tag 7 und Tag 21 (Woche 2) bzw. Tag 22 bis 27 (Woche 3) ebenfalls nachweisen (Woche 1 vs. 2:  $p = 0,023$ , Woche 1 vs. Woche 3:  $p = 0,04$ ). Eindrücklich zeigt sich zudem der erneute Abfall der relativen Elispots zwischen Woche 4 und 8. Ein erneuter, nachhaltiger Anstieg ist frühestens 12 Wochen nach der Stammzelltransplantation zu sehen.

Analog zu Abbildung 31 ist die Entwicklung der IgG-Elispots in Abbildung 32 gezeigt. Ein statistisch signifikanter Anstieg ( $p = 0,03$ ) der relativen IgG-Elispots pro µl PBMC ist ebenfalls in Woche 2 und 3 dokumentiert (Woche 1 vs. 2:  $p = 0,01$ , Woche 1 vs. Woche 3:  $p = 0,034$ ). Mit  $29 \pm 7$  IgG-Elispots pro µl PBMC in Woche 2 liegt dieser jedoch deutlich über der relativen Anzahl der IgA-Spots pro µl PBMC. Auffallend zeigt sich zudem eine, wie schon bei den einzelnen Patienten dargestellte, Abnahme der relativen IgG-Spots pro µl PBMC in Woche 34 nach der Stammzellrückgabe.



**Abbildung 32: Nachweis des Immunglobulins IgG auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Darstellung der IgG-Elispots aller 7 Patienten normiert auf 1 µl PBMC im Zeitraum Tag 0 bis 64 Wochen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 7; ANOVA-/Tuke- Test: \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001).



**Abbildung 33: Nachweis des Immunglobulins IgM auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Darstellung der IgM-Elispots aller 7 Patienten normiert auf 1 µl PBMC im Zeitraum Tag 0 bis 64 Wochen. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 7; ANOVA-/Tuke- Test: \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001).

Abschließend stellt Abbildung 33 die statistische Betrachtung der relativen IgM-Elispots pro  $\mu\text{l}$  PBMCs über den zeitlichen Verlauf dar. Ein früh auftretender Anstieg IgM-exprimierender Zellen in der zweiten bis dritten Woche nach der Stammzellrückgabe kann auch statistisch signifikant belegt werden (Woche 1 vs. 2:  $p = 0,037$ , Woche 1 vs. Woche 3:  $p = 0,044$ ).

Betrachtet man insgesamt die Ergebnisse der Elispotauswertungen so konnte ein signifikanter Anstieg von sezernierenden Zellen aller Immunglobulinklassen (IgA, IgG und IgM) in einem Zeitraum von 10 bis 30 Tagen nach der Stammzellrückgabe gezeigt werden. Dieser passagere Anstieg scheint unabhängig von Alter, Geschlecht, Grunderkrankung oder Infektkomplikationen aufzutreten und nicht direkt mit der Regeneration der absoluten Lymphozytenzahlen assoziiert zu sein. Zudem imponiert ein mehrgipfliger Anstieg der Elispots, welcher zeitlich mit der Regeneration der Granulozyten, nicht aber mit der Regeneration der Lymphozyten zusammenfällt.

### 4.3. Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation

Eine weitere Möglichkeit frühe Immunglobulin-exprimierende oder auch -sekretierende Zellen nach stattgehabter CD3- und CD19-depletierter haploidenter Stammzelltransplantation nachzuweisen, besteht im Nachweis von Immunglobulinen im Serum. Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation Serumproben, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, aufgereinigt und mittels Fluoreszenz-gekoppelten *beads* unter Verwendung des Luminex Multiplex Assays quantifiziert.

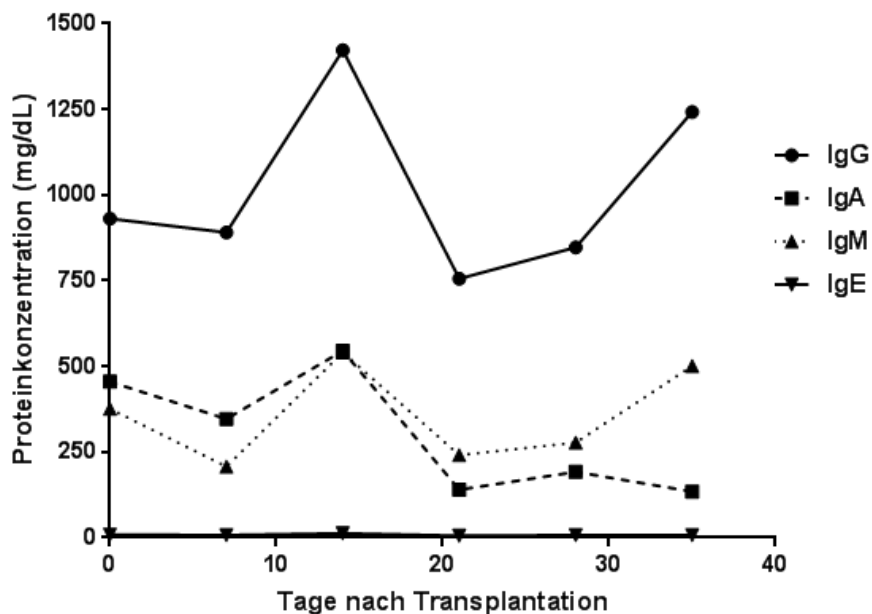
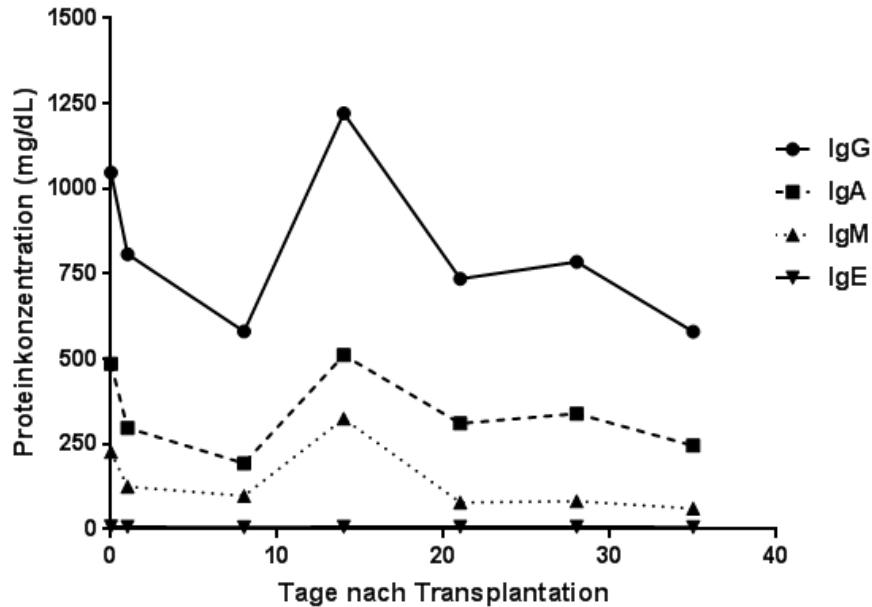


Abbildung 34: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 1.

Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

Wie aus Abbildung 34 zu entnehmen ist, zeigt sich bei Patient 1 zum Messzeitpunkt 1 (Tag 7 nach Transplantation) eine leichte, primäre Konzentrationsabnahme der Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM. Interessanterweise, konnte nach 14 Tagen (Messpunkt 2) ein, zum Teil deutlicher, passagerer Anstieg der Immunglobulinkonzentration für IgG, IgA und IgM festgestellt werden. So stieg die Konzentration von IgG von 891 mg/dl auf 1423 mg/dl, die Konzentration von IgA von 347 mg/dl auf 541 mg/dl und die Konzentration von IgM um 333 mg/dl. Die IgE-Spiegel zeigten sich über den gesamten

Untersuchungszeitraum (Messpunkt 1 bis 4, entsprechend Tag 1 bis 35) weitgehend unverändert.

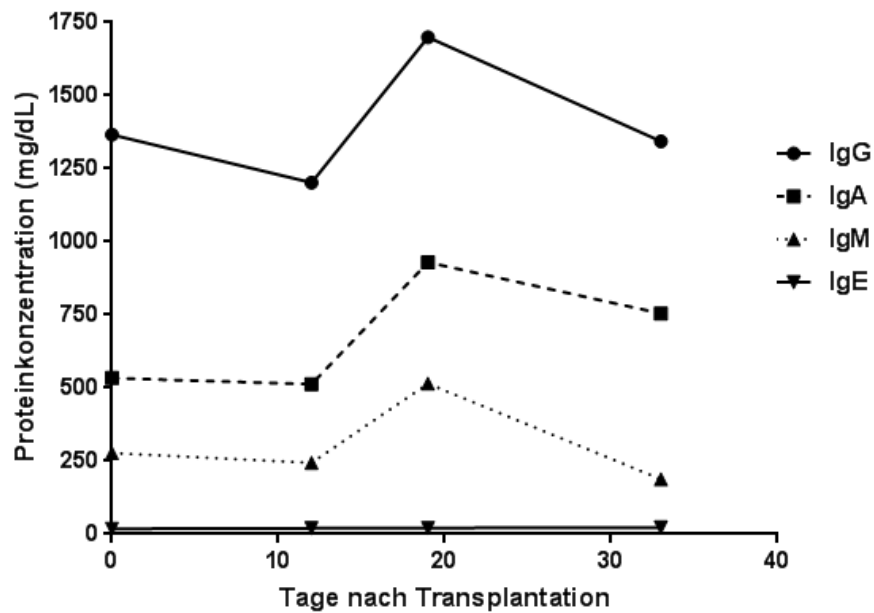


**Abbildung 35: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 2.** Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

Abbildung 35 stellt die zeitabhängigen Konzentrationen der Immunglobulin-subklassen bei Patient 2 dar. Analog zu Patient 1 zeigt sich auch hier nach 1 bis 8 Tagen ein vorübergehender Konzentrationsabfall von IgG, IgA und IgM im Serum (Abfall der Immunglobuline in Prozent: IgG 55,4 %, IgA 39,7 %, IgM 43,2 %). Im Vergleich hierzu zeigt sich zum Messpunkt 3 (entsprechend Tag 14) ein deutlicher Anstieg der IgG-, IgA- und IgM-Konzentration (Anstieg der Immunglobuline: IgG 210 %, IgA 260 %, IgM 320 %). Die IgE-Spiegel bleiben den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert.

Gleichermaßen wurde auch bei Patient 3 der Verlauf der Immunglobulin-konzentrationen im Serum quantifiziert. Im Gegensatz zu den Patienten 1 und 2 zeigt sich hier kein unmittelbarer Konzentrationsabfall von IgG, IgA und IgM nach der Transplantation.



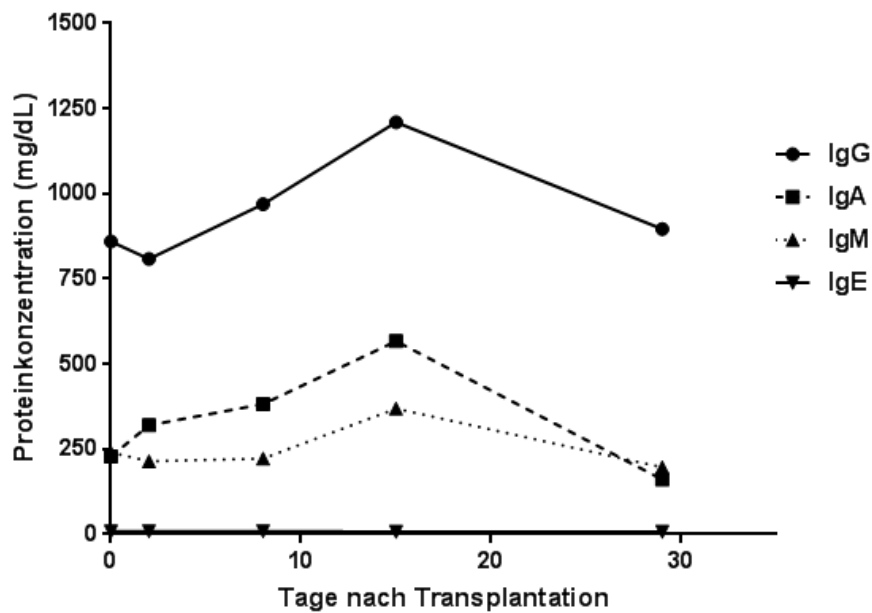


**Abbildung 36: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 3.**

Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

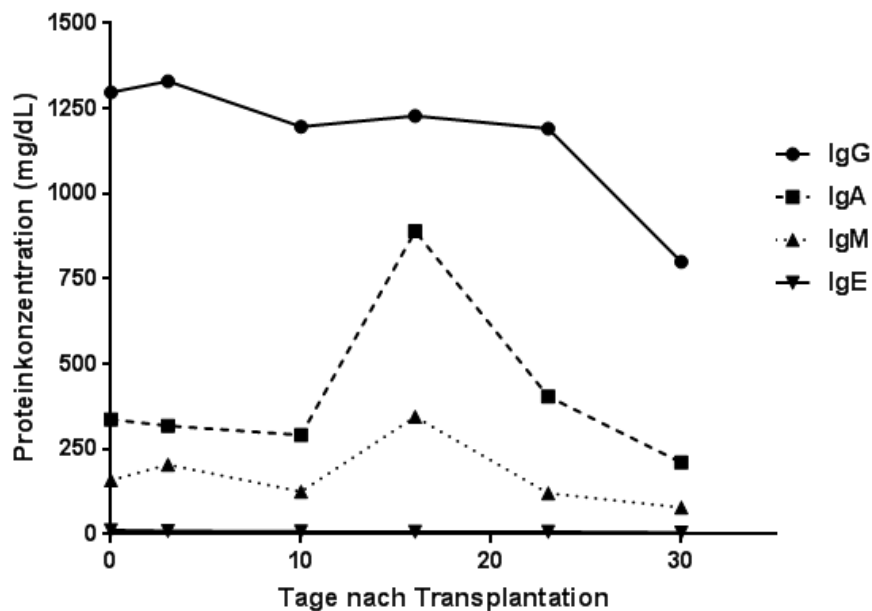
Während auch hier die IgE-Spiegel keine relevanten Konzentrationschwankungen aufweisen, zeigt sich ein relevanter Anstieg der IgG-, IgA- und IgM-Konzentrationen zwischen der zweiten und der dritten Woche (IgG von 1202 mg/dl auf 1699 mg/dl, IgA von 513 mg/dl auf 930 mg/dl und IgM von 244 mg/dl auf 515 mg/dl).

Bei Patient 4 (Abbildung 37) zeigt sich erneut, simultan zu den Patienten 1 bis 3, ein Anstieg aller drei Immunglobulinsubklassen zwischen Tag 8 und Tag 15. Ein primärer Konzentrationsabfall von IgG, IgA und IgM kann nicht dokumentiert werden. Interessanterweise weisen auch hier die IgE-Spiegel keine signifikanten Änderungen auf (IgE-Konzentrationen: an Tag 2 9 mg/dl, an Tag 8 9 mg/dl, an Tag 15 7 mg/dl und an Tag 29 nach der Transplantation 7 mg/dl).



**Abbildung 37: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4.**

Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

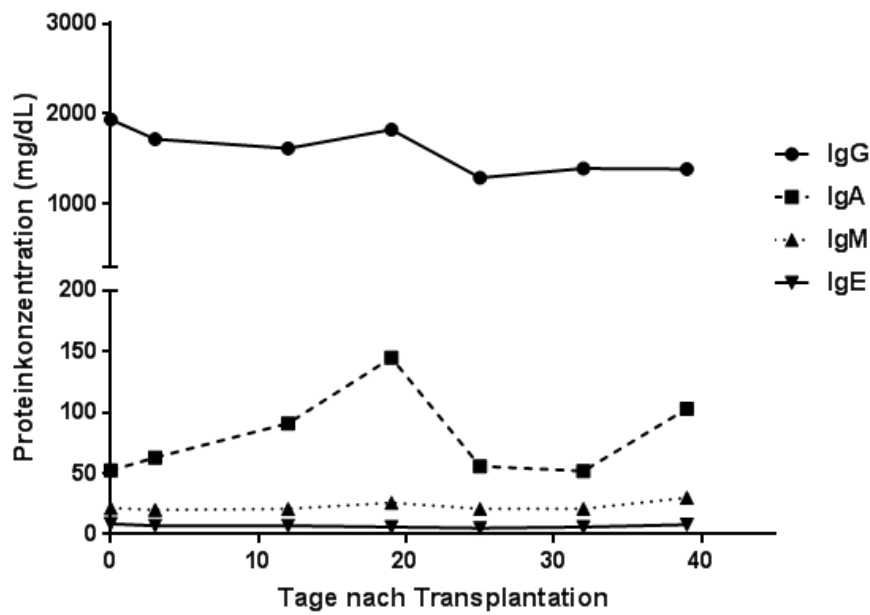


**Abbildung 38: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 5.**

Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

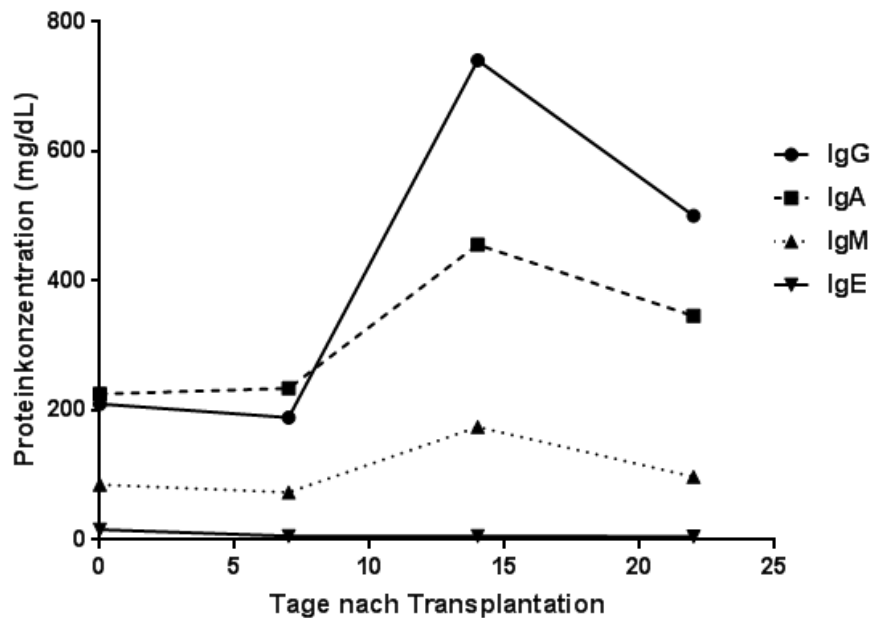
Betrachtet man die Entwicklung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum bei Patient 5, so fällt auf, dass die IgG-Konzentrationen zwischen den Tagen 3 und 23 nach der Transplantation weitgehend unverändert sind, wohingegen an Tag 30 ein deutlicher Abfall (67 %) dokumentiert wurde. Ein Anstieg der Konzentrationen zwischen Tag 8 und Tag 21 kann hier somit nicht gezeigt werden. Im Gegensatz dazu steigen die Konzentrationen von IgA und IgM an Tag 16 nach der Transplantation deutlich an (IgA: 305 %, IgM: 276 %) mit einem erneuten relativen Abfall an Tag 30 nach der Transplantation.

Auch die Plasmaproben der Patienten 6 und 7 wurden hinsichtlich der Immunglobulinkonzentrationen für IgG, IgA, IgM und IgE nach dem obigen Schema analysiert. Während die IgG-Spiegel bei Patient 6 erneut keine signifikanten Konzentrationsschwankungen aufweisen (siehe Abb. 40) zeigt der IgG-Spiegel bei Patient 7 einen deutlichen Anstieg (von 189 mg/dl auf 741 mg/dl) zwischen Tag 7 und Tag 14 *post transplantationem* (Abb. 41). Betrachtet man die absoluten IgG-Spiegel so fällt auf, dass Patient 6 mit einer IgG-Konzentration von  $1750 \pm 200$  mg/dl durchgehend, nahezu normwertige Konzentrationsbereiche aufweist. Analog zu den Patienten 1 bis 5 zeigt sich auch bei den Patienten 6 und 7 ein vorübergehender Anstieg der Konzentrationen von IgA und IgM zwischen den Messpunkten 2 und 3 bzw. 3 und 4, was den Tagen 7 und 14, bzw. den Tagen 12 und 19 nach der Transplantation entspricht.



**Abbildung 39: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 6.**

Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

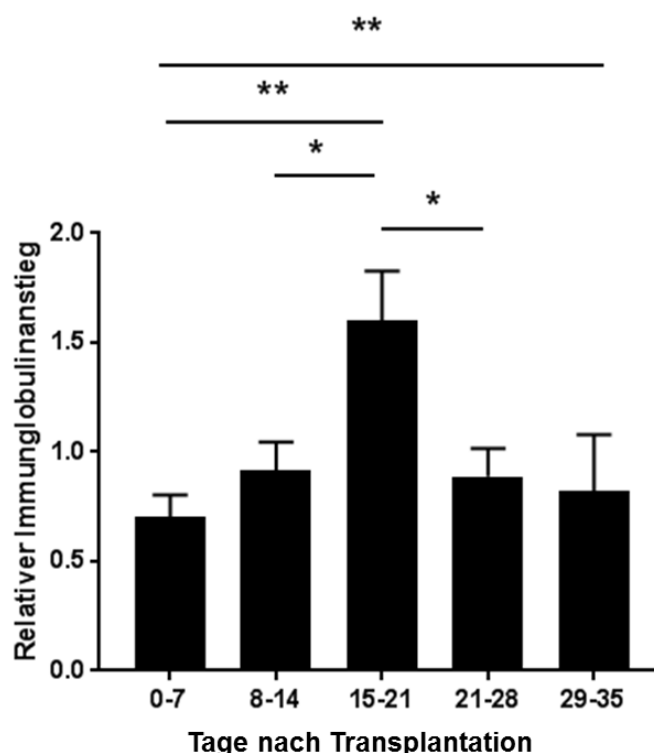


**Abbildung 40: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 7.**

Patientenplasma wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Transplantation isoliert und Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert.

Abschließend wurden die relativen Konzentrationsveränderungen der Immunglobulinsubklassen IgG, IgA, IgM und IgE von allen Patienten in Bezug auf den Tag 0 (Tag der Transplantation) untersucht. Der relative Anstieg der Immunglobuline wurde als  $\Delta$  Immunglobulinanstieg = Ig Konzentration Zeitpunkt X / Ig Konzentration Tag 0 definiert. Die statistische Signifikanz wurde primär mit Hilfe des ANOVA-Tests überprüft. Bei einem signifikanten Ergebnis ( $p < 0.05$ ) erfolgte eine anschließende Post-hoc Analyse unter Verwendung des Tukey-Tests.

Wie in Abbildung 41 dargestellt, liegt die mittlere IgG-Konzentration zwischen Tag 0 und Tag 7 (Woche 1) mit  $0,68 \pm 0,12$  deutlich unter dem Ausgangswert an Tag 0 (definiert als 1) und bestätigt somit die Ergebnisse der Einzelauswertung der Patientendaten. Somit scheint ein primärer Abfall der IgG-Konzentration im Serum nach der haploidenten Transplantation ein generelles Phänomen zu sein.

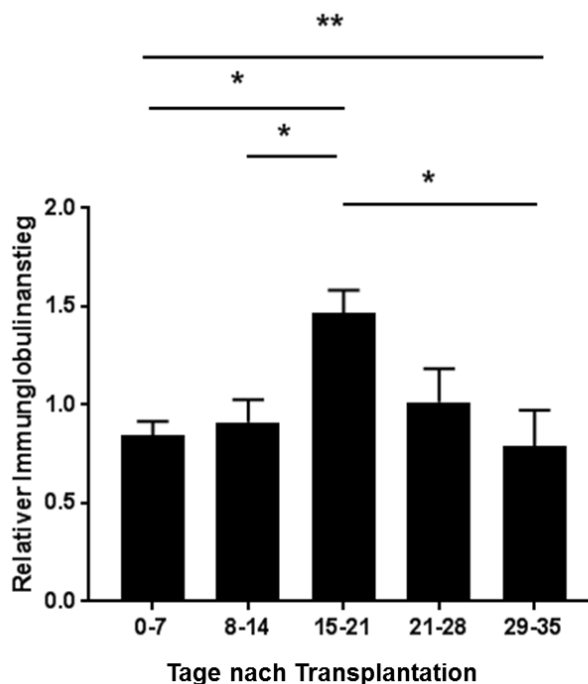


**Abbildung 41: Relative Immunglobulinentwicklung für IgG nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Die Abbildung zeigt den relativen Anstieg der Immunglobulinfraktion bezogen auf den Tag 0 ( $\Delta$  Immunglobulinanstieg = Ig Konzentration Zeitpunkt X / Ig Konzentration Tag 0). Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA-/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Einzelauswertungen, lässt sich in der hier dargestellten Summenanalyse ein signifikanter Anstieg der IgG-Konzentration im Zeitraum Tag 15 bis 21 bestätigen ( $p = 0,003$ ). Interessanterweise kann auch ein zeitabhängig begrenzter Anstieg zwischen Tag 15 und 21 gezeigt werden, so folgt dem signifikanten Anstieg (Woche 2 auf Woche 3,  $p = 0,042$ ) ein erneuter Abfall der IgG-Spiegel (Woche 3 auf Woche 4,  $p = 0,031$ ).

Um die zeitlichen Verläufe auch der Immunglobuline darzustellen, die nicht von der Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) abhängig sind und somit keinen signifikanten Störeinflüssen ausgesetzt sind, ist in der folgenden Abbildung 42 der Summenverlauf der relativen IgA-Konzentration aufgeführt. Im Gegensatz zum oben aufgeführten IgG-Verlauf ist hier nur ein dezenter primärer Abfall der IgA-Spiegel auf  $0,84 \pm 0,1$  zu beobachten. Im Gegensatz hierzu zeigt sich, analog zum IgG-Verlauf, ein signifikanter Anstieg der relativen IgA-Spiegel mit einer maximalen Konzentration zwischen Tag 15 und 21 (Woche 1 auf Woche 3,  $p = 0,035$ , Woche 2 auf Woche 3,  $p = 0,047$ ). Auch hier kann ein erneuter, signifikanter Abfall der IgA-Spiegel (Woche 3 auf Woche 5,  $p = 0,024$ ) dokumentiert werden.

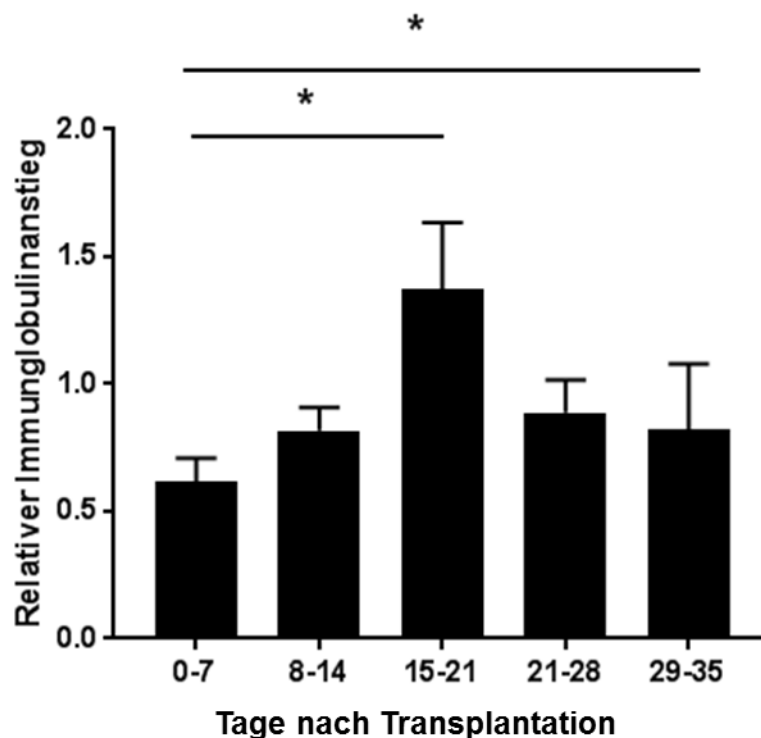


**Abbildung 42: Relative Immunglobulinentwicklung für IgA nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Die Abbildung zeigt den relativen Anstieg der Immunglobulinfraktion bezogen auf den Tag 0 ( $\Delta$  Immunglobulinanstieg = Ig Konzentration Zeitpunkt X / Ig Konzentration Tag 0). Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA-/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

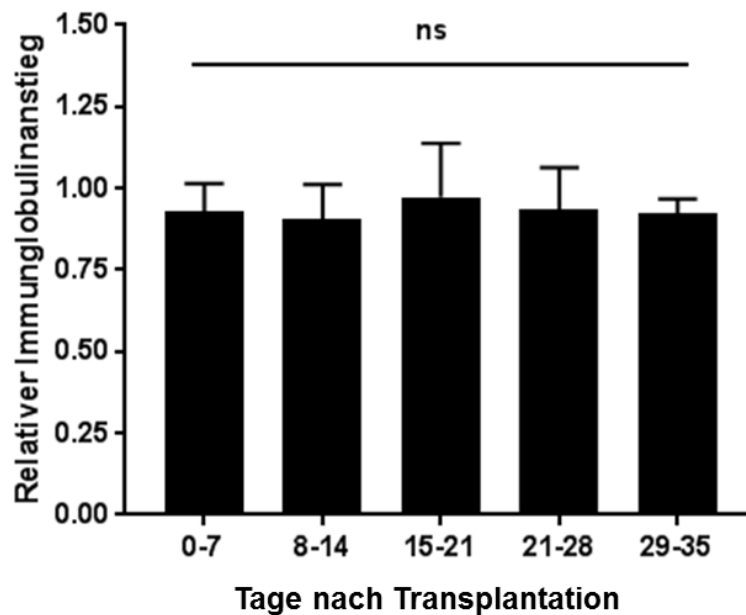
Der relative Verlauf aller IgM-Konzentrationen ist in Abbildung 43 dargestellt. Der zuvor beschriebene primäre Abfall der relativen Immunglobulinkonzentration ist hier mit  $0,58 \pm 0,11$  besonders ausgeprägt. Ähnlich wie bei den Subklassen IgG und IgA lässt sich auch hier ein signifikanter Anstieg der IgM-Spiegel, mit einem Maximum in Woche 3 ( $p = 0,038$ ) bestätigen.

Nachfolgend sind in Abbildung 44 außerdem die relativen IgE-Spiegel aufgeführt. Interessanterweise weisen diese, wie auch bei den Analysen der einzelnen Patienten, keine signifikanten Spiegelschwankungen auf.



**Abbildung 43: Relative Immunglobulinentwicklung für IgM nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Die Abbildung zeigt den relativen Anstieg der Immunglobulinfraktion bezogen auf den Tag 0 ( $\Delta$  Immunglobulinanstieg = Ig Konzentration Zeitpunkt X / Ig Konzentration Tag 0). Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; ANOVA-/Tukey-Test: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 44: Relative Immunglobulinentwicklung für IgE nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Die Abbildung zeigt den relativen Anstieg der Immunglobulinfraktion bezogen auf den Tag 0 ( $\Delta$  Immunglobulinanstieg = Ig Konzentration Zeitpunkt X / Ig Konzentration Tag 0). Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 7; ANOVA-/Tukey-Test: \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001).

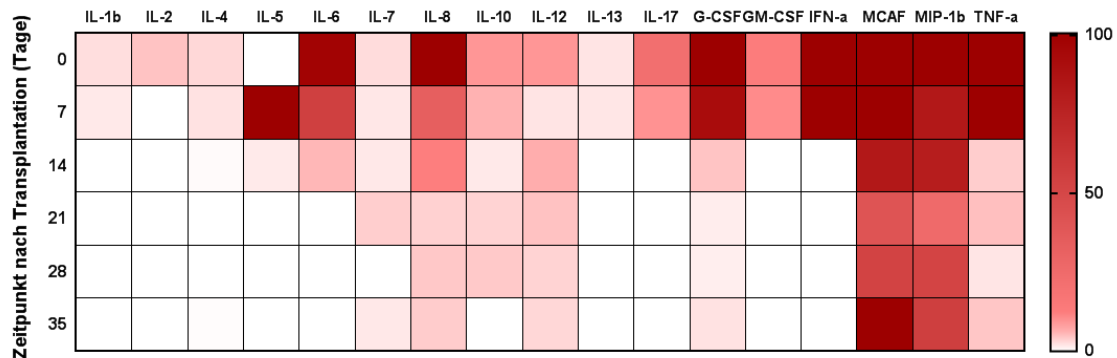
Zusammenfassend konnten durch die Luminexanalysen der einzelnen Immunglobulinsubklassen im Serum der Patienten die Daten der ELISPOT-Analysen erhärtet werden. Wie bereits im vorherigen Abschnitt gezeigt, konnte bei nahezu allen Patienten ein zeitlich begrenzter, früher Anstieg der Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM im Serum gezeigt werden. Eine Dominanz einer entsprechenden Immunglobulinsubklasse konnte nicht beobachtet werden. Durch diese Ergebnisse erhärtet sich die Hypothese der Existenz von frühen Immunglobulin-exprimierenden Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation. Dabei scheinen die Immunglobuline nicht nur auf der Zelloberfläche exprimiert zu werden, sondern anhand dieser Ergebnisse, ist hier auch eine signifikante Immunglobulinsekretion der Zellen zu vermuten.



#### 4.4. Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation

Vor dem Hintergrund des klassischen Modells der Entwicklung von Immunglobulin-produzierenden Zellen nach einer Stammzelltransplantation, fällt in den bisherigen Ergebnissen besonders der frühe Zeitpunkt (Tag 12 bis 21) des Nachweises gelöster und Zell-gebundener Immunglobuline nach der haploidenten Transplantation mit einem CD3- und CD19-depletierten Transplantat auf. Um im Folgenden die Entstehung einer frühen Antikörper-exprimierenden Zellpopulation weiter zu untersuchen, wurde die zeitabhängige Expression unterschiedlicher Interleukine und Wachstumsfaktoren analysiert. Im Fokus lagen dabei sowohl Zytokine, die für die klassische B- und T-Zell-Entwicklung eine wichtige Rolle spielen wie beispielsweise IL-2, IL-4, IL-5, IL-7 und IL-13, als auch inflammatorische Botenstoffe wie IL-6, IL-8, IFN $\alpha$ , MCAF, MIP-1b oder TNF $\alpha$ . Ferner wurden weitere Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und G-CSF auf ihre Expressionslevel nach der haploidenten Transplantation untersucht. Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation Serumproben, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, aufgereinigt und mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten *beads* unter Verwendung des Luminex Multiplex Assays quantifiziert. Um eine relative Expressionssteigerung darstellen zu können, wurden die quantitativen Ergebnisse auf gesunde Kontrollprobanden normiert.

Abbildung 45 stellt die, auf gesunde Kontrollprobanden bezogenen, relativen, zeitabhängigen Zytokinlevel des Patienten 1 nach haploidenter Stammzelltransplantation dar.



**Abbildung 45: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 1).**

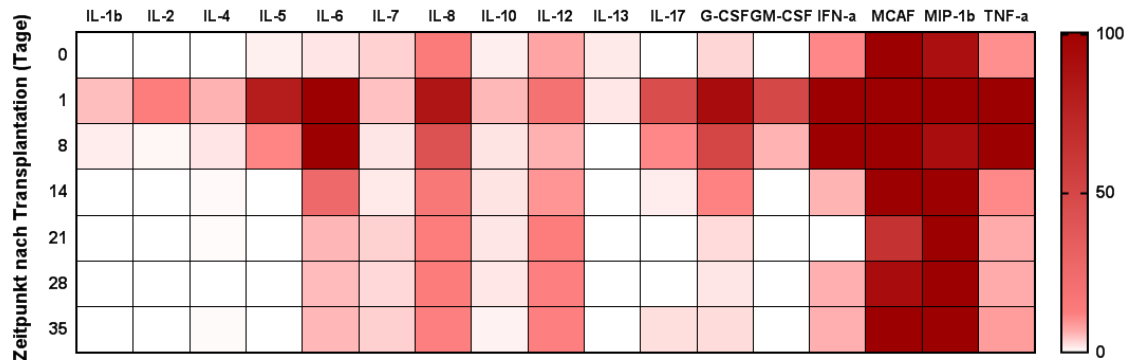
Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.

Betrachtet man die relativen Zytokinspiegel des ersten Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation (Tag 0), so fällt eine deutlich gesteigerte Expression von mehreren Inflammations-assoziierten Zytokinen auf. Neben dem Akute-Phase-Protein IL-6 (98-fach gesteigerte Expression) und dem Chemokin IL-8 (110-fach gesteigerte Expression), welche beide besonders von Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten produziert werden, dominieren zu frühen Untersuchungszeitpunkten vor allem IFN $\alpha$  (298-fach gesteigerte Expression), TNF $\alpha$  (333-fach gesteigerte Expression) und die chemotaktischen Botenstoffe MCAF (monocyte chemotactic and activating protein) (1400-fach gesteigerte Expression) sowie MIP-1b (Macrophage inflammatory protein) (170-fach gesteigerte Expression). Auch G-CSF zeigt erwartungsgemäß zwischen Tag 0 und Tag 7 deutlich erhöhte Serumspiegel (126-fach gesteigerte Expression).

Zytokine, die mit einer B- oder T-Zellreifung in Zusammenhang stehen, besonders seien dabei IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13 erwähnt, zeigen nur eine milde, 1- bis 5-fache Expressionssteigerung. Im Zeitverlauf nimmt die Konzentration dieser Interleukine im Serum, entgegen den Erwartungen, zusätzlich weiter ab

und weist zum Zeitpunkt des beobachteten Immunglobulinanstiegs (Tag 14 bis Tag 21) nahezu normwertige Plasmaspiegel auf.

Die zeitabhängigen Veränderungen der Zytokinspiegel bei Patient 2 sind in der folgenden Abbildung 46 dargestellt.

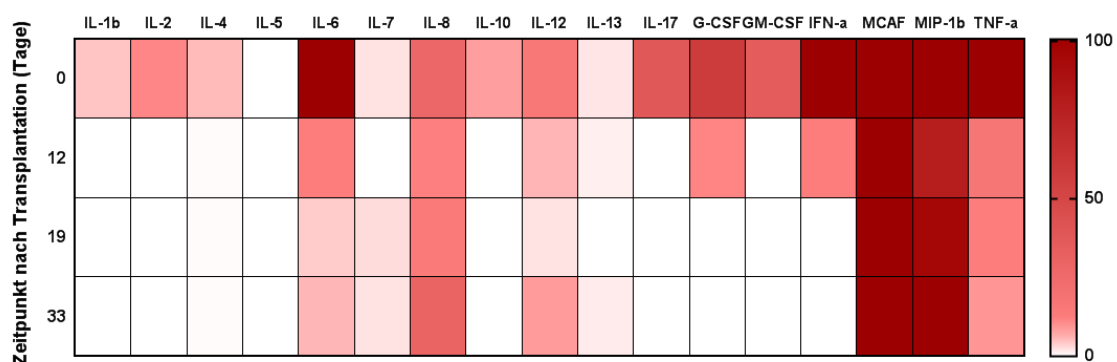


**Abbildung 46: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 2).**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.

Die relativen Zytokinspiegel des Patient 2 sind in Abbildung 46 dargestellt. Simultan zum Verteilungsmuster von Patient 1 zeigt sich auch hier eine Dominanz der proinflammatorischen Interleukine IL-6 (142-fach erhöhte Expression), IL-8 (85-fach erhöhte Expression), IFN $\alpha$  (193-fach erhöhte Expression) und TNF $\alpha$  (332-fach erhöhte Expression) zu frühen Messzeitpunkten (Tag 1 und 8). Auffallend präsentiert sich ebenfalls eine massiv gesteigerte Expression der chemotaktischen Botenstoffe MCAF (4220-fach erhöht) und MIP-1b (266-fach erhöht). Im Gegensatz zu IL-6, IL-8, IFN $\alpha$  und TNF $\alpha$  fallen die Plasmaspiegel von MCAF und MIP-1b im Zeitverlauf jedoch nicht ab. Bis zum Abschluss der Analyse an Tag 35 zeigen sich die Spiegel im Mittel um  $1651 \pm 967$ -fach erhöht für MCAF bzw. um  $167 \pm 61$ -fach erhöht für MIP-1b. Die Interleukine IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13 weisen im Gegensatz zu den inflammatorischen Zytokinen nur eine initiale, 1- bis 10-fache Steigerung der Expressionslevel auf. Zum Zeitpunkt des beobachteten Immunglobulinanstiegs (Tag 14 bis 21) kann erneut kein relevanter Unterschied zu gesunden Kontrollprobanden detektiert werden.

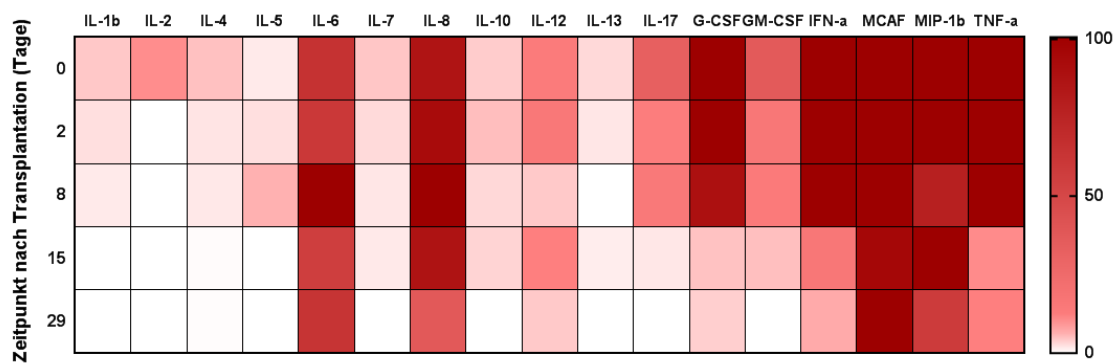
Interessanterweise kann das Zytokinexpressionsmuster der Patienten 1 und 2 nahezu identisch auch auf Patient 3 übertragen werden (siehe Abb. 47). Auch hier dominieren inflammatorische Zytokine und Chemokine unmittelbar nach erfolgter Transplantation (IL-6 142-fach erhöhte Expression, IL-8 38-fach erhöhte Expression, IFN $\alpha$  605-fach erhöhte Expression und TNF $\alpha$  764-fach erhöhte Expression). Die MCAF-Spiegel weisen, simultan zu Patient 1 und 2, bereits an Tag 0 eine 3090-fache Spiegelsteigerung auf. Auch die MIP-1b-Konzentrationen im Serum liegen im Mittel  $121 \pm 43$ -fach über der Norm.



**Abbildung 47: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 3).**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.

Interleukine, die mit einer B- oder T-Zellreifung assoziiert werden, scheinen auch bei Patient 3 zwischen Tag 0 und Tag 33 nach haploidenter Transplantation keine relevante Rolle zu spielen. Entsprechend der Erwartung, ist dagegen eine erhöhte Sekretion von G-CSF unmittelbar nach Stammzellrückgabe zu messen (35-fach erhöhte Expression).

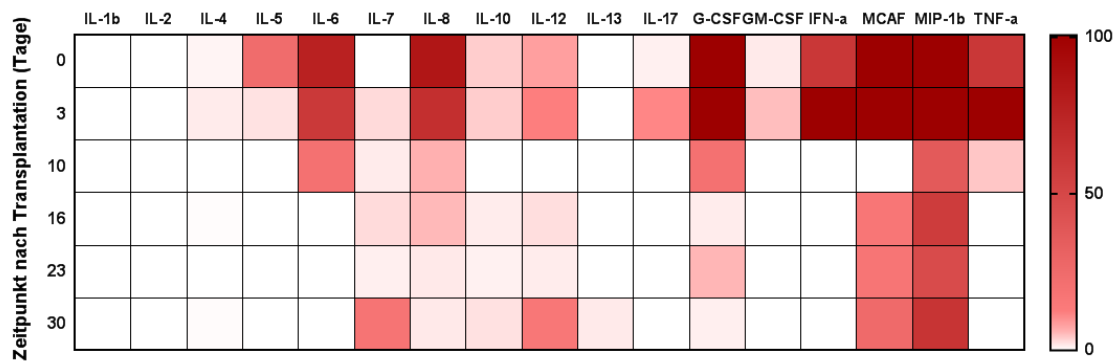


**Abbildung 48: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 4).**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.

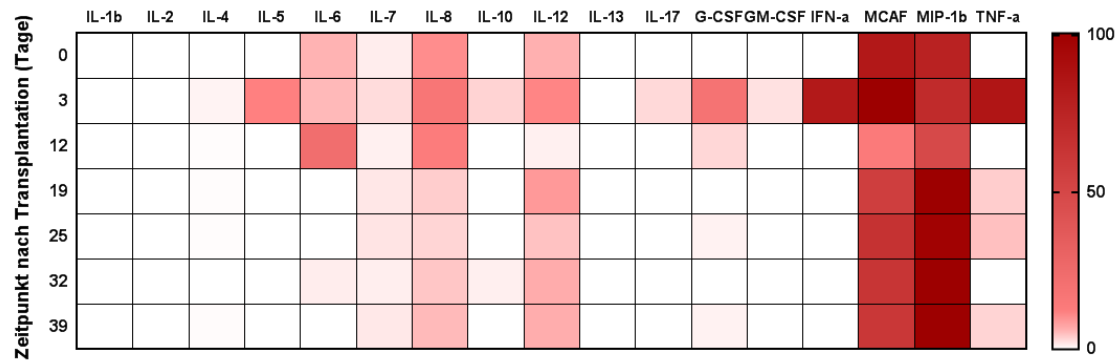
Der zeitabhängige Spiegelverlauf der Interleukine bei Patient 4 ist in Abbildung 48 gezeigt. Bemerkenswerterweise fällt auch hier, unabhängig von der zur Transplantation führenden Erkrankung, dem Vorliegen einer Infektion oder interindividuellen Schwankungen, eine sehr ähnliche Verteilung der Zytokinlevel auf. Wohingegen jedoch bei Patient 1, 2 und 3 die IL-6- und IL-8-Spiegel im zeitlichen Verlauf wieder deutlich absinken, persistieren diese bei Patient 4 mit einer im Mittel  $88 \pm 45$ -fachen Steigerung von IL-6 und einer im Mittel  $87 \pm 35$ -fachen Steigerung von IL-8.

Um die bisherigen Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurden auch die relativen Zytokinexpressionslevel der Patienten 5 bis 7 nach dem obigen Schema analysiert. Wie den Abbildungen 49, 50 und 51 zu entnehmen ist, konnte das bei den Patienten 1 bis 4 gezeigte „typische“ Verteilungsmuster, mit einer Dominanz der Inflammations-assoziierten Zytokine IL-6, IL-8,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\alpha$  zu frühen Messzeitpunkten, bestätigt werden. Die Chemokine MCAF und MIP-1b zeigen bei allen Patienten über den gesamten Messzeitraum deutlich gesteigerte Expressionslevel. B- und T-Zell-assoziierte Botenstoffe scheinen auch bei den Patienten 5, 6 und 7 eine untergeordnete Rolle zu spielen.



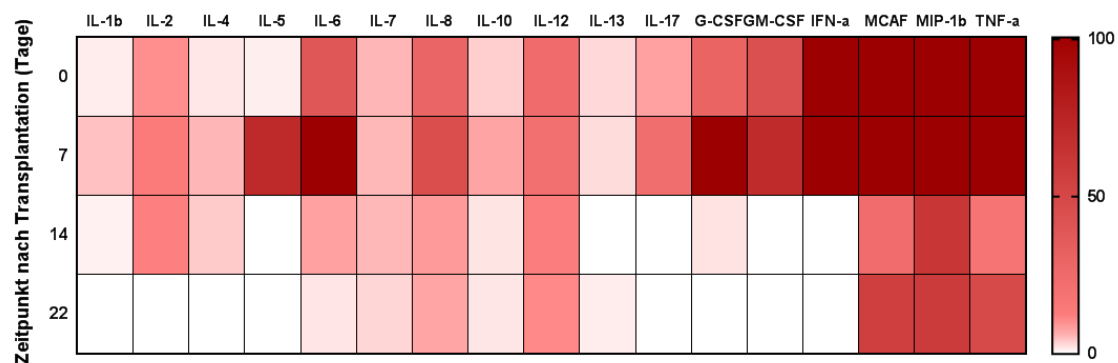
**Abbildung 49: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 5).**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.



**Abbildung 50: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 6).**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.



**Abbildung 51: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 7).**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an Tag 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach erfolgter Transplantation isoliert und die Zytokinkonzentration mittels Fluoreszenz-gekoppelter *beads* (Luminex Multiplex Assay) quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression, bezogen auf gesunde Kontrollen.

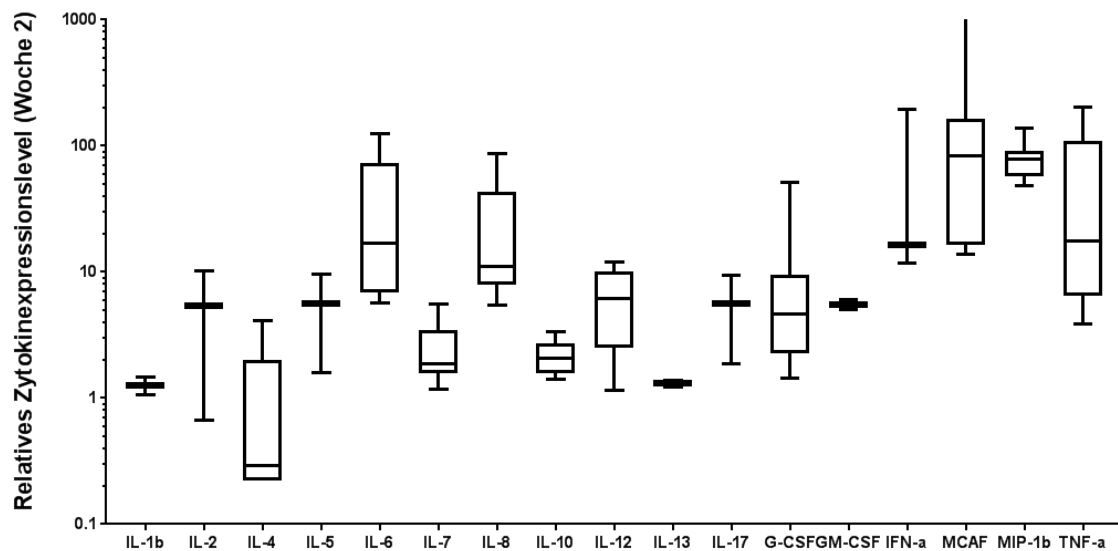
Im Rahmen der B-Zellentwicklung spielt neben IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13 auch der *B cell activating factor* (BAFF) eine essentielle Rolle. Um abschließend auch eine BAFF-vermittelte Proliferation von Antikörper-produzierenden Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von BAFF im Patientenplasma, wie in Material und Methoden beschrieben, mittels ELISA analysiert. In Tabelle 31 sind die relativen BAFF-Spiegel der einzelnen Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation abgebildet. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, scheint auch BAFF nach erfolgter Transplantation nicht signifikant nachweisbar zu sein.

**Tabelle 31: Relative BAFF-Expressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation.**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und die Konzentration von BAFF mittels ELISA quantifiziert (n.d. = nicht detektierbar).

Tag nach Transplantation	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
0 - 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8 - 14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,9
15 - 21	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.	n.d.
22 - 28	n.d.	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29 - 35	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,9

Abschließend wurden gesondert die relativen Expressionslevel der analysierten Zytokine, Interleukine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aller Patienten (n = 7) zwischen Woche 2 und 3 nach der haploidenten Transplantation betrachtet. Die Wahl der Zeitpunkte bezieht sich erneut auf die bisherigen Vorversuche, in denen frühe Immunglobulin-exprimierende bzw. -sezernierende Zellen vor allem in diesem Zeitraum zu beobachten sind.

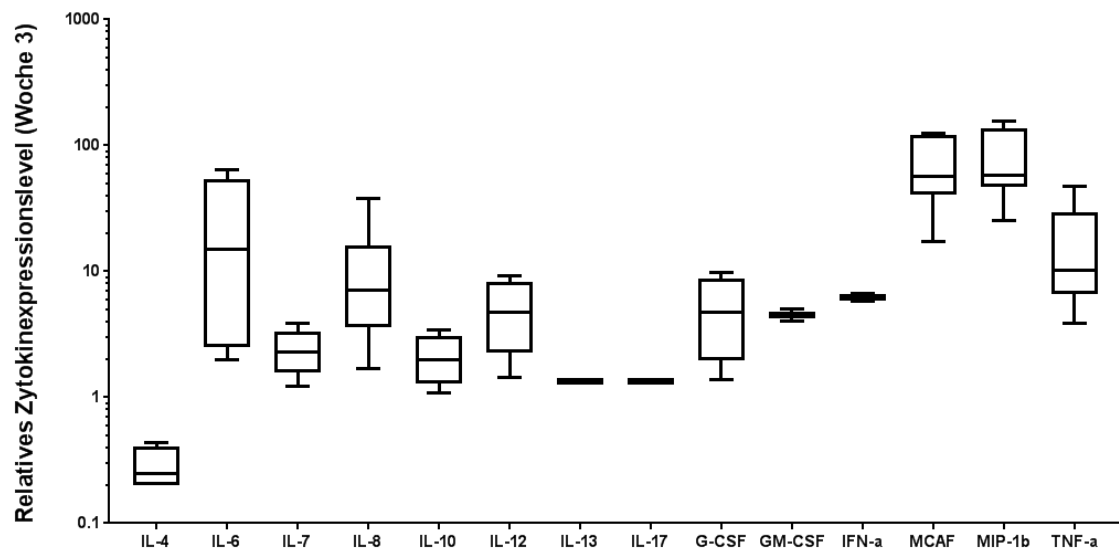


**Abbildung 52: Relative Zytokinexpressionslevel aller 7 Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation in Woche 2.**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und die Zytokinkonzentrationen anschließend Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression aller Patienten zum Zeitpunkt Woche 2 bezogen auf gesunde Kontrollen. Dargestellt sind Median mit 95 %-Konfidenzintervall, sowie die minimalen bzw. maximalen Absolutwerte ( $n = 7$ ).

Abbildung 52 zeigt das relative Expressionsmuster der getesteten Zytokine aller Patienten zwei Wochen nach haploidenter Stammzelltransplantation in logarithmischer Darstellung. Auffallend zeigt sich bei der hier aufgeführten Verteilung, dass sich die generelle Schwankungsbreite der Zytokine deutlich voneinander unterscheidet. Während IL-1b, IL-2, IL-5, IL-13, IL-17, GM-CSF und IFN $\alpha$  ein sehr geringes 95%-Konfidenzintervall und entsprechend sehr ähnliche relative Spiegel aufweisen, zeigt sich bei IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, G-CSF, MCAF, MIP-1b und TNF $\alpha$  eine deutlich größere Schwankungsbreite. Betrachtet man die absoluten Zytokinspiegel in diesem Zeitintervall, so bestätigten sich die Ergebnisse der Analysen der einzelnen Patienten. Während Interleukine der B- und T-Zell-Entwicklung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen, stechen besonders inflammatorische Signalstoffe wie IL-6 (Median: 14, 95 %-Konfidenzintervall: 7 - 65), IL-8 (Median: 10, 95 %-Konfidenzintervall: 9 - 55), TNF $\alpha$  (Median: 10, 95 %-Konfidenzintervall: 5 - 97), IFN $\alpha$  (Median: 11, 95 %-Konfidenzintervall: 9 - 12), MCAF (Median: 93, 95 %-Konfidenzintervall: 10 - 108) und MIP-1b (Median: 90, 95 %-Konfidenzintervall: 70 - 100) hervor.





**Abbildung 53: Relative Zytokinexpressionslevel aller 7 Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation in Woche 3.**

Das Patientenplasma wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und die Zytokinkonzentrationen anschließend Fluoreszenz-gekoppelt mittels Luminex Multiplex Assay quantifiziert. Die Abbildung zeigt die relative Zytokinexpression aller Patienten zum Zeitpunkt Woche 2 bezogen auf gesunde Kontrollen. Dargestellt sind Median mit 95 %-Konfidenzintervall, sowie die minimalen bzw. maximalen Absolutwerte ( $n = 7$ ).

In Abbildung 53 ist die relative Expression der Zytokine in der 3. Woche nach Stammzellrückgabe, analog zu Abbildung 52 gezeigt. Auch in der 3. Woche *post transplantationem* beherrschen IL-6 (Median: 10, 95 %-Konfidenzintervall: 3 - 60), IL-8 (Median: 7, 95 %-Konfidenzintervall: 4 - 10), TNF $\alpha$  (Median: 10, 95 %-Konfidenzintervall: 7 - 30), IFN $\alpha$  (Median: 7, 95 %-Konfidenzintervall: 7 - 8), MCAF (Median: 60, 95 %-Konfidenzintervall: 50 - 110) und MIP-1b (Median: 65, 95 %-Konfidenzintervall: 55 - 120) das Bild. Ebenfalls sind nach drei Wochen weiter dezent gesteigerte G-CSF- (Median: 5, 95 %-Konfidenzintervall: 2 - 8) sowie GM-CSF-Spiegel (Median: 4, 95 %-Konfidenzintervall: 4 - 5) messbar. Interleukine der B- und T-Zellentwicklung scheinen auch nach 21 Tagen noch keine relevante Expressionssteigerung aufzuweisen.

Zusammenfassend konnte in den oben aufgeführten Experimenten interessanterweise kein typisches Signalmuster von Interleukinen identifiziert werden, welches im Rahmen der B-Zellentwicklung beschrieben ist. Vielmehr scheinen Inflammations-assoziierte Zytokine ebenso wie Chemokine und Stammzellwachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF unmittelbar nach der haploidenten Transplantation zu dominieren. Bemerkenswert ist hier auch die

Kongruenz des Zytokinexpressionsmusters, das bei allen Patienten eine auffallende Ähnlichkeit aufweist und somit unabhängig von Alter, Geschlecht oder Erkrankung zu sein scheint.

#### **4.5. Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellregeneration**

Abschließend wurde im Rahmen dieser Arbeit die Regeneration der Immunzellen nach erfolgter haploidenter Stammzelltransplantation durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stammzellrückgabe (Tag 3 bis 268) Patientenproben gewonnen. Vor der Inkubation mit den unterschiedlichen Primärantikörpern erfolgte, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, die Isolation der PBMCs aus den Patientenproben. Die Auswahl der verwendeten Primärantikörper orientierte sich an klassischen Oberflächenmarkern, welche im Rahmen der B-Zellreifung bzw. Plasmazellreifung auf der Zelloberfläche detektierbar sind. Neben CD19, CD38, CD27 und CD138 wurde zusätzlich ein Lineage Antikörper-Mix (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) verwendet, der eine Unterscheidung zwischen Progenitorzellen und unreifen Vorläuferzellen ermöglicht. Um eine Zuordnung der analysierten Zellpopulationen zu Spender oder Empfänger (Patient) zu ermöglichen, erfolgte außerdem eine Analyse Spender-spezifischer HLA-Oberflächenmarker wie HLA BW6, HLA B8 oder HLA A2.

**Tabelle 32: Anteil der HLA-positiven, CD38-positiven Zellen.**

Woche nach Transplantation	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
1	94 %	91 %	94 %	97 %	89 %	99 %	94 %
2	98 %	97 %	99 %	99 %	99 %	98 %	99 %
3	99 %	97 %	99 %	98 %	99 %	96 %	99 %
4	99 %	95 %	99 %	97 %	99 %	95 %	99 %
5	98 %	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %

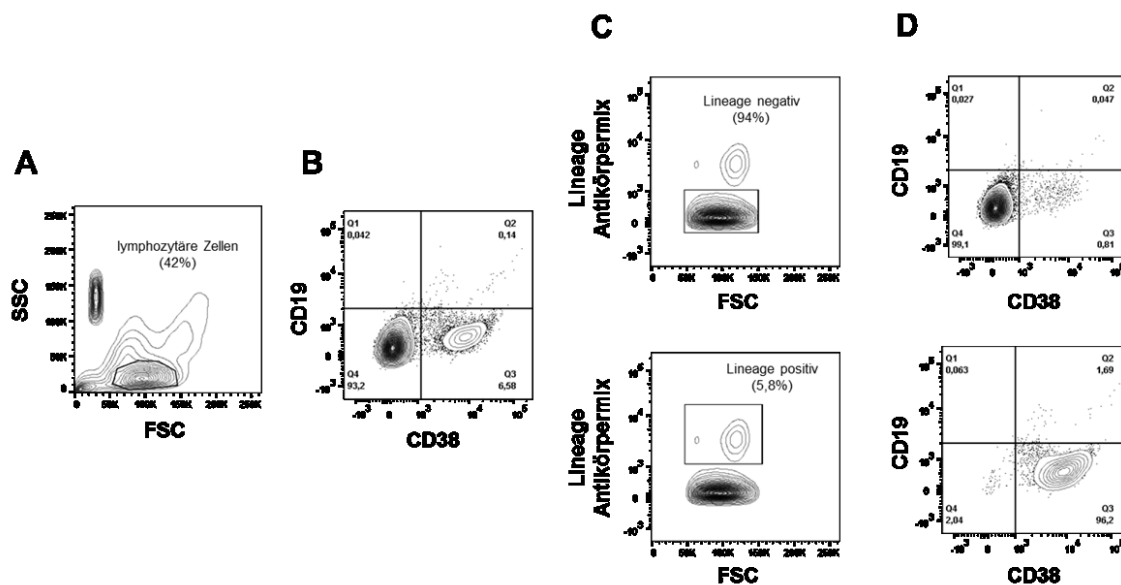
Um eine signifikante Empfänger-spezifische Zellpopulation auszuschließen, wurde die lymphozytische Zellsubpopulation vor Beginn der weiteren Zellsubtypisierung auf die Expression eines spenderspezifischen HLA-Oberflächenmarkers hin untersucht. Wie aus Tabelle 32 zu entnehmen ist, konnte in nahezu allen gemessenen Proben eine Immunsignatur des Spenders identifiziert werden.

Die Ergebnisse der HLA-Expression wurden zusätzlich den Ergebnissen der Chimärismusanalyse der Patienten gegenübergestellt. Zum Zeitpunkt des Auftretens von frühen Antikörper-produzierenden Zellen (Woche 2) zeigten alle Patienten einen kompletten Donorchimärismus (CC). Dies bekräftigt die Vermutung, dass zum Zeitpunkt der Elispotanalyse großteils Spender-Immunezellen analysiert wurden.

**Tabelle 33: Chimärismusanalyse aller Patienten nach der haploidenten Transplantation (CC = kompletter Donorchimärismus, autologer Anteil in %).**

Woche nach Transplantation	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
1	CC	1 - 2 %	CC	CC	CC	CC	CC
2	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
5	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
10	CC	CC	CC	CC	1 - 2 %	CC	CC
20	CC	CC	1 - 2 %	CC	CC	CC	CC

Nach der Messung der Proben erfolgte eine zeitabhängige Quantifizierung der einzelnen Zellsubpopulationen. Das Vorgehen der Auswertung ist in Abbildung 54 exemplarisch für den Patienten 1 dargestellt. Als Positivkontrolle und Kalibrierungshilfe wurden jeweils Antikörper-besetzte *beads* mitgeführt. Diese Population stellt sich im FACS mit einer starken Granulierung im *Side Scatter* (SSC) und einer geringen Größe zwischen 20 – 30 K im *Forward Scatter* (FSC) dar (Abb. 54 A). In einem ersten Schritt erfolgte dann die Eingrenzung der lymphozytären Zellen. Diese wurden als Zellpopulation zwischen 50 – 150 K (FSC) identifiziert (siehe Abschnitt Material und Methoden). Anschließend wurden die Antikörper anti-CD19 als typisches B-Zellantigen und anti-CD38, einem Marker, der bei unreifen B-Zellen und Plasmazellen vorkommt, gegeneinander aufgetragen (Abb. 54 B). Um eine Untersuchung von Zellen mit geringer Häufigkeit und unklarem Phänotyp zu ermöglichen, werden Zellen mit einer klaren Linienzugehörigkeit ausgegrenzt. Hierzu erfolgte die Betrachtung des Lineage Antikörper-Mix (Lin/Lineage), welcher T-Zellen und B-Zellen ebenso wie Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen identifiziert, gegenüber FSC aufgetragen (Abb. 54 C). In einem nächsten Schritt erfolgte die Subgruppenanalyse von Lin-positiven bzw. Lin-negativen Zellen bezogen auf ihre CD19- und CD38-Expression (Abb. 54 D). Somit ist auch eine Beurteilung der CD19 Spezifität (CD19-positive Zellen müssen Lin-positiv sein) möglich. Wie der Abbildung 54 D zu entnehmen ist, besteht die Lin-negative Zellpopulation großteils (zu 99,1 %) aus CD19- und CD38-negativen Zellen, wohingegen die Lin-positiven Zellen überwiegend CD38 (96,2 %) aber kaum CD19 (1 %) exprimieren. Diese, wenn auch sehr geringe CD19-positve Zellpopulation kann darüber hinaus auch als „interne“ Negativkontrolle genutzt werden.



**Abbildung 54: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der Immunzellregeneration bei Patient 1.**

Zu unterschiedlichen Analysezeitpunkten wurde Vollblut der Patienten gewonnen. Anschließend erfolgte, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, eine Isolation der PBMCs, gefolgt von deren Färbung mittels Primärantikörpern (CD19, CD38, *Lineage*-Antikörper-Mix). Nach Inkubation der Antikörper-gebundenen Zellen mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier exemplarisch das analytische Vorgehen. Nach einer Eingrenzung der lymphozytären Zellen (A) erfolgte eine Betrachtung der CD19<sup>+</sup>-, bzw. CD38<sup>+</sup>-Zellpopulationen (B). In einem dritten Schritt wurde eine Zuordnung der Zellen bezogen auf ihren Vorläufercharakter vorgenommen (C-D).

Im Folgenden wurde besonders die zeitabhängige Entwicklung der CD19- und CD38-exprimierenden Zellpopulationen nach der Transplantation analysiert.

Wie der Abbildung 55 zu entnehmen ist, zeigt sich bei Patient 1 bereits 14 Tage nach der haploidenten Stammzelltransplantation ein Nachweis einer CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup> Subpopulation von 12 %. Zu beachten ist hier, dass die Expressionslevel von CD38 zwischen  $10^3$  und  $10^5$  gleichmäßig verteilt sind und somit eine Population mit einer niedrig bis hohen CD38-Expression besteht. 87 % aller gemessenen Zellen exprimieren weder CD19 noch CD38 und entsprechen somit am ehesten einer Lin<sup>-</sup>, nicht weiter zuordnenbaren Zellpopulation. Im weiteren zeitlichen Verlauf (Tag 21) steigt die CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation erst auf 87,6 % an, bevor sie zwischen Tag 35 und 62 bei 58 – 68 % der gemessenen Gesamt-PBMCs ausmacht.

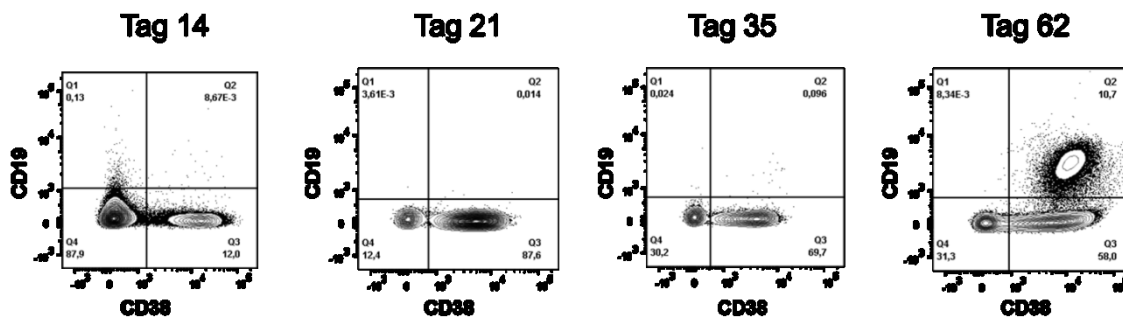


Abbildung 55: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38+/CD19- Zellpopulation bei Patient 1.

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolation der PBMCs und eine anschließende Färbung dieser Zellen mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier die zeitliche Entwicklung der detektierten (Lineage negativen) CD19/CD38-Zellpopulation. Diese Subgruppenanalyse wurde analog Abb. 54 durchgeführt.

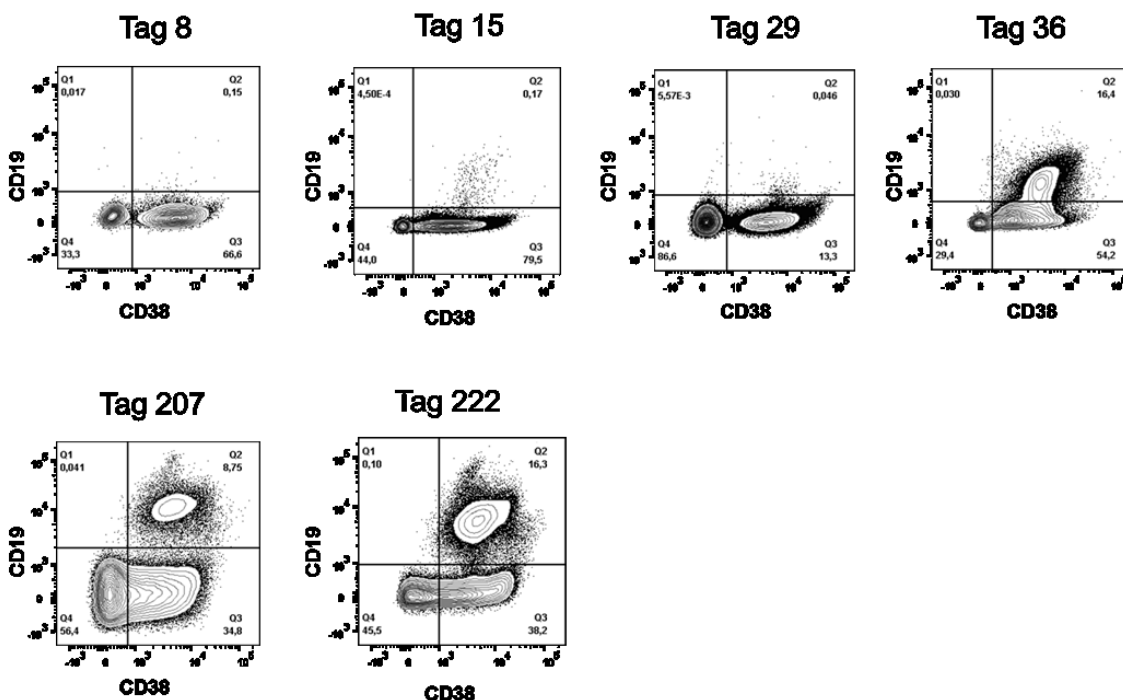


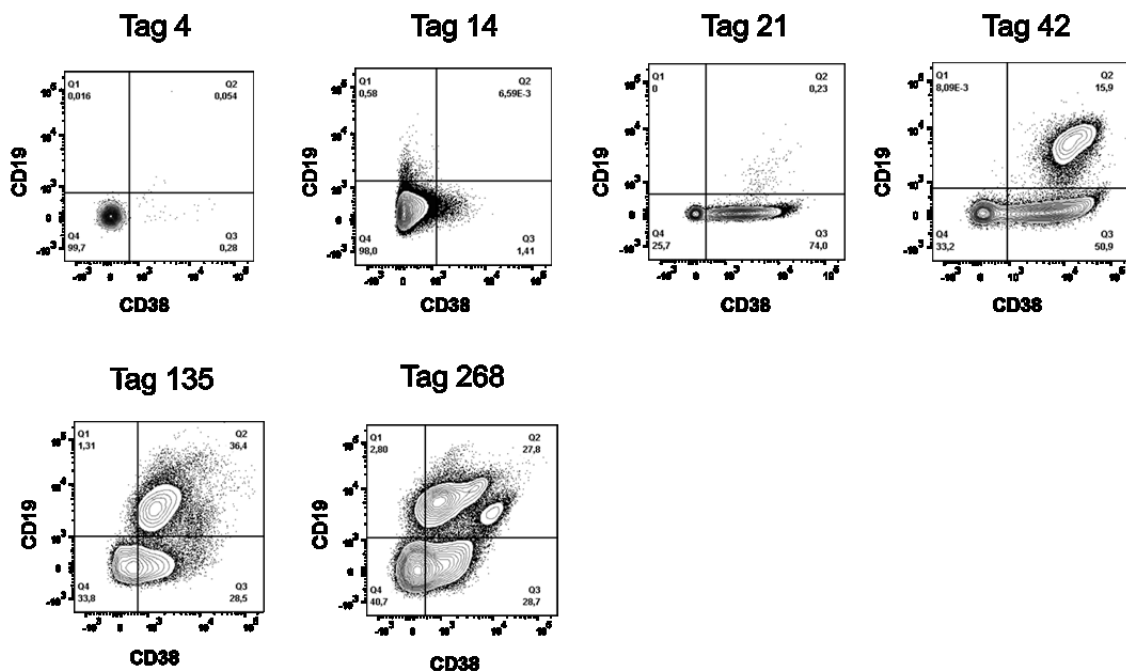
Abbildung 56: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38+/CD19- Zellpopulation bei Patient 2.

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolation der PBMCs und eine anschließende Färbung dieser Zellen mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier die zeitliche Entwicklung der detektierten (Lineage negativen) CD19/CD38-Zellpopulation. Diese Subgruppenanalyse wurde analog Abb. 54 durchgeführt.

Die zeitliche Entwicklung der CD19- und CD38-Expression auf Lymphozyten bei Patient 2 ist in Abbildung 56 dargestellt. An Tag 8 lässt sich hier ebenfalls eine frühe CD38<sup>low+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation (66,6 %) zeigen. An Tag 15 steigt diese bis auf 79,5 % an, bevor sie an Tag 29 nur noch 13,3 % der Gesamtzellpopulation beträgt. Zwischen Tag 36 und 222 schwankt diese

Zellpopulation zwischen 54 % und 39 %. Eine relevante  $CD38^{low/+}$ ,  $CD19^+$  B-Zellpopulation ist ab Tag 36 nach der haploidenten Transplantation (16,4 % der Gesamtzellzahl) nachweisbar. Diese Population persistiert bis Tag 222 und beträgt maximal 16,3 % (an Tag 222).

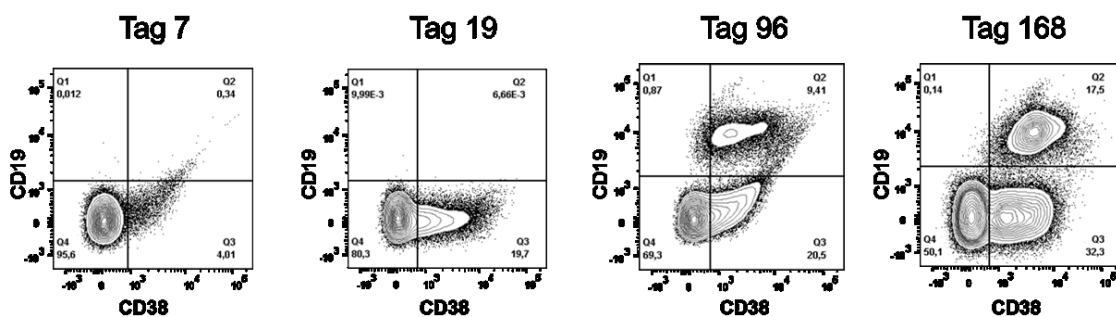
Bei Patient 3 sind 4 Tage nach der Stammzellrückgabe 99,7 % aller Zellen  $CD38^-$  und  $CD19^-$  und spiegeln somit am ehesten Vorläuferzellen wider (siehe Abb. 57). Auch an Tag 14 entsprechen 98 % aller Zellen unreifen Progenitoren, wobei eine sehr kleine (1,4 %)  $CD38^{low/+}$ ,  $CD19^-$  Zellpopulation bereits erkennbar wird. 21 Tage nach der Stammzellrückgabe beträgt diese Population bereits 74 % und sinkt im Verlauf stetig wieder bis auf 26,7 % nach 268 Tagen. Eine  $CD38^{low/+}$ ,  $CD19^+$  B-Zellpopulation ist nach 42 Tagen (mit 15,9 %) deutlich erkennbar. Der Anteil dieser Zellpopulation steigt an Tag 135 auf 36,4 % bzw. 27,8 % an Tag 268 an.



**Abbildung 57: Durchflusszytometrische Darstellung der  $CD38^+/CD19^-$  Zellpopulation bei Patient 3.**

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolation der PBMCs und eine anschließende Färbung dieser Zellen mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier die zeitliche Entwicklung der detektierten (Lineage negativen)  $CD19/CD38$ -Zellpopulation. Diese Subgruppenanalyse wurde analog Abb. 54 durchgeführt.

Die Abbildung 58 stellt die zeitliche Rekonstitution CD19- und CD38-positiver Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4 dar. An Tag 7 nach der Stammzellrückgabe ist hier bereits eine CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation (mit 4,1 %) detektierbar. Diese Population steigt, wie auch bei den Patienten 1 bis 3 an Tag 19 (Woche 3) auf 20 % an. Zwischen den Tagen 96 und 168 können 21 – 32 % dieser Population nachgewiesen werden. CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>+</sup> Zellen sind in diesem Zeitraum mit 9,4 % bzw. 17,5 % erkennbar.

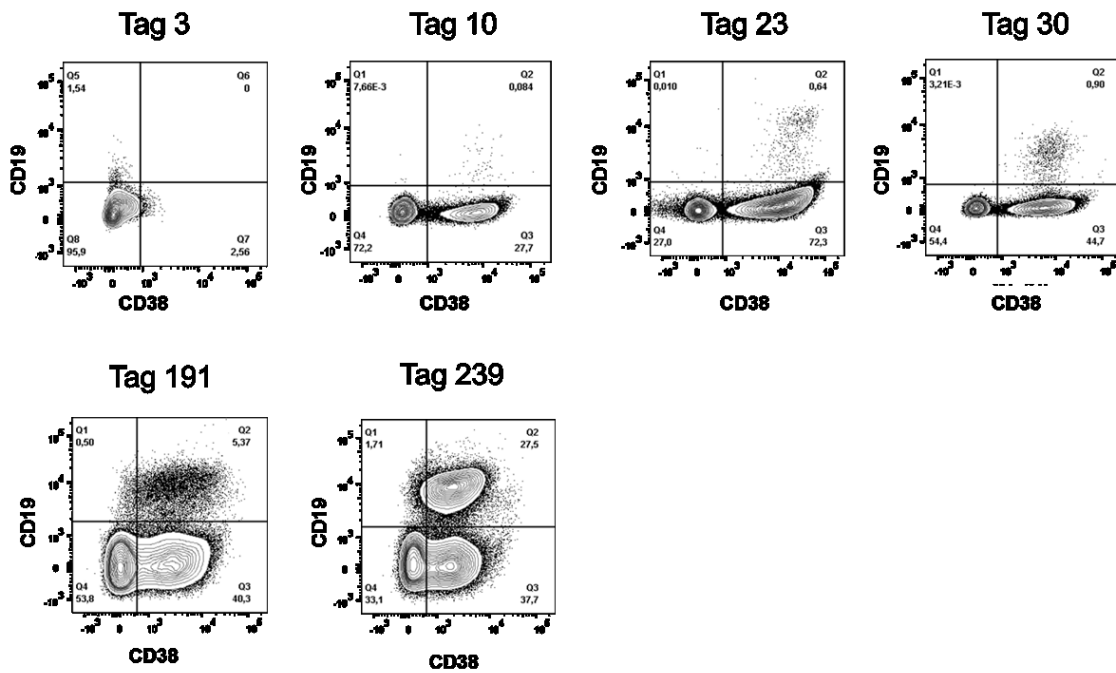


**Abbildung 58: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 4.**

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolation der PBMCs und eine anschließende Färbung dieser Zellen mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier die zeitliche Entwicklung der detektierten (Lineage negativen) CD19/CD38-Zellpopulation. Diese Subgruppenanalyse wurde analog Abb. 54 durchgeführt.

Auch bei Patient 5 konnte ein passagerer, zeitabhängiger Anstieg der vorbeschriebenen CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation mit einem Maximum an Tag 23 (mit 73 %) gezeigt werden. An Tag 3 konnte zudem eine kleine CD38<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup> B-Zellpopulation (1,54 %) gemessen werden, welche in Bezug auf die additive HLA-Färbung (HLA A2 negativ, in der Abbildung 59 nicht gezeigt) als autologe (also Empfänger-spezifische) B-Zellen identifiziert werden konnte. Diese ist ab Tag 10 nach der Transplantation nicht mehr nachweisbar. Auch generell sind HLA A2-negative Zellen zwischen Tag 10 und dem Abschluss der Analyse nicht mehr detektierbar. Ein Anstieg erster CD19-positiver B-Zellen ist bei Patient 5 zwischen Tag 23 und 30 (0,6 % bzw. 0,9 %) zu verzeichnen. 27 Wochen nach der Transplantation betragen diese Zellen jedoch lediglich 5,4 % der Gesamtzellpopulation. Erst 34 Wochen nach der Stammzellrückgabe exprimieren 28 % aller lymphozytären Zellen sowohl CD19 als auch CD38 an ihrer Oberfläche. Dies ist im Vergleich zu den Patienten 1 bis 4 deutlich später.





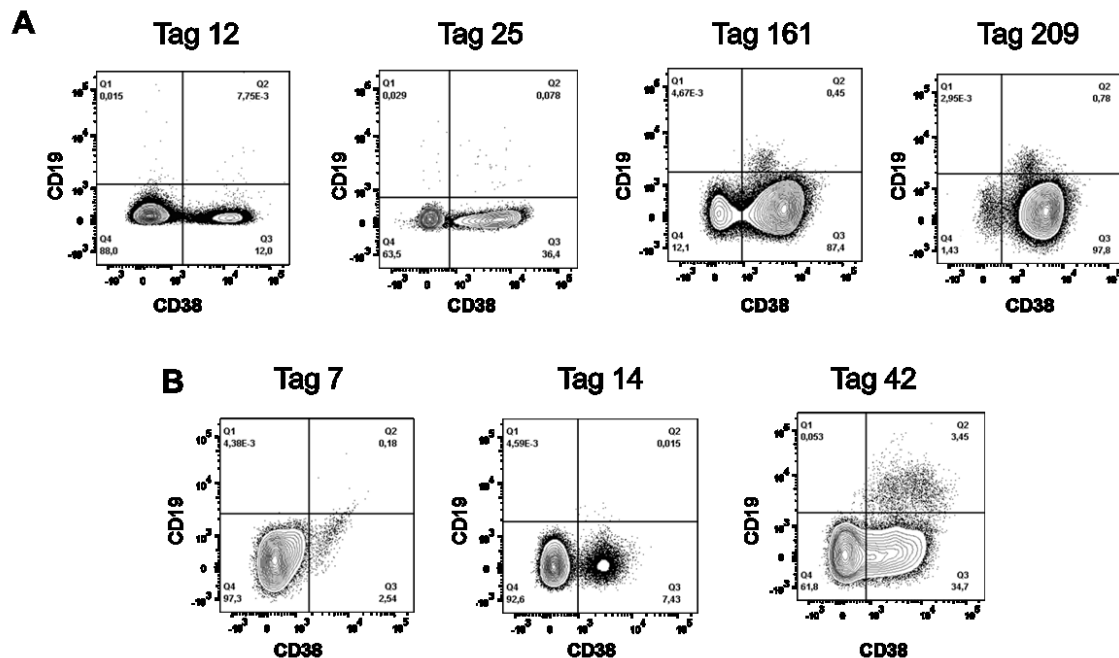
**Abbildung 59:** Durchflusszytometrische Darstellung der CD38<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 5.

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolation der PBMCs und eine anschließende Färbung dieser Zellen mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier die zeitliche Entwicklung der detektierten (Lineage negativen) CD19/CD38-Zellpopulation. Diese Subgruppenanalyse wurde analog Abb. 54 durchgeführt.

Die Rekonstitution CD19<sup>-</sup> sowie CD38-tragender Immunzellen bei den Patienten 6 und 7 ist in der Abbildung 60 zusammengefasst. Bei Patient 6 lässt sich, ähnlich zu den bisherigen Analysen der Patienten 1 bis 5, an Tag 12 bereits eine eindeutige CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation (mit 13 %) nachweisen. Auch diese Population steigt im Verlauf an und beträgt an Tag 25 37 %. Interessanterweise ist ein Übergang zu einer CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>+</sup> B-Zellpopulation nicht erkennbar. So steigt lediglich die CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Population bis auf 97,8 % nach 209 Tagen nach der haploidenten Transplantation an. Des Weiteren scheint die unreife Vorläuferzellpopulation (CD38<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>) über den zeitlichen Verlauf abzunehmen und beträgt nach 209 Tagen lediglich 1,43 %. Dementsprechend scheint der Patient 6 neben einem Verlust der Vorläuferzellen eine verzögerte bzw. reduzierte Entwicklung der B-Lymphozyten aufzuweisen.

Im Vergleich hierzu steigen bei Patient 7 die CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellen ab Tag 7 (3 %) bzw. Tag 14 (8 %) an, ohne dass die Vorläuferzellfraktion verloren geht.

Ein CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>+</sup> Phänotyp kann bei Patienten 7 im Gegensatz zu Patient 6 nach 42 Tagen (mit 4 %) nachgewiesen werden.

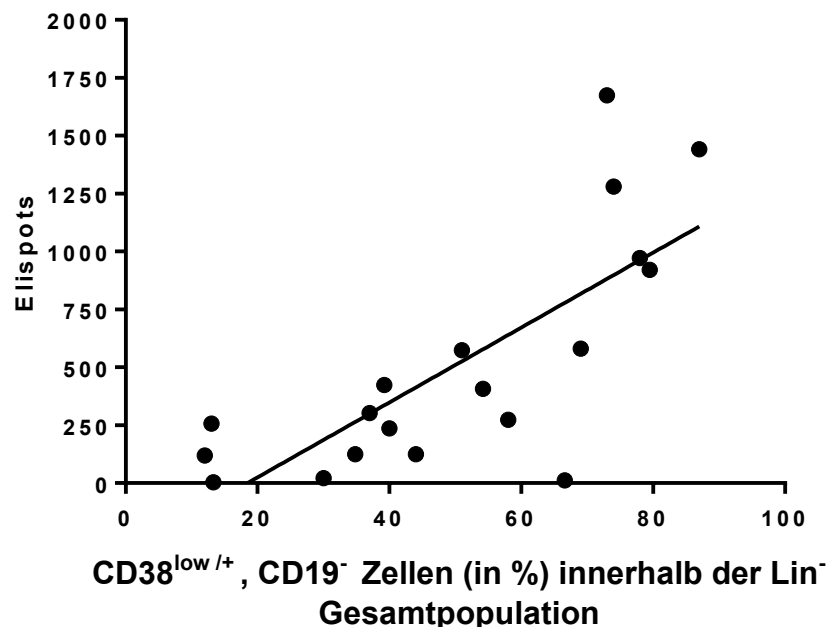


**Abbildung 60:** Durchflusszytometrische Darstellung der CD38<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> Zellpopulation der Patienten 6 und 7.

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolation der PBMCs und eine anschließende Färbung dieser Zellen mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier die zeitliche Entwicklung der detektierten CD19/CD38-Zellpopulation bei Patient 6 (A) und Patient 7 (B).

Zusammenfassend konnte in dieser FACS-Analyse die Entstehung einer frühen CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation bei allen 7 Patienten nach der haploidenten Transplantation gezeigt werden. Um eine statistische Korrelation des zeitlichen Auftretens dieses Zellphänotyps mit den detektierten Elispots für IgA, IgG und IgM herzustellen, erfolgte die nachfolgende lineare Regressionsanalyse. Wie der Abbildung 61 zu entnehmen ist, scheint das Auftreten der IgA-, IgG- und IgM-Elispots zeitlich signifikant ( $p < 0,001$ ) mit der beschriebenen CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation zu korrelieren. Dies ist bemerkenswert, da klassische Immunglobulin-exprimierende Zellen typischerweise einen Plasmazellphänotyp mit einer Expression von CD19 aufweisen. CD19<sup>-</sup> Zellen wären ggf. mit dem Phänotyp von *long lived plasma cells* [467] übereinstimmend. Dieser Plasmazellphänotyp (CD38<sup>++</sup>, CD19<sup>-</sup>) korreliert jedoch nicht mit dem Auftreten der Elispots oder den gemessenen Immunglobulinlevel im ELISA-Assay, so

dass hier ggf. eine bisher nicht beschriebene Zellpopulation für die frühe Immunglobulinentstehung (zwischen Woche 2 und 3 nach der haploidenten Stammzelltransplantation) verantwortlich sein könnte.



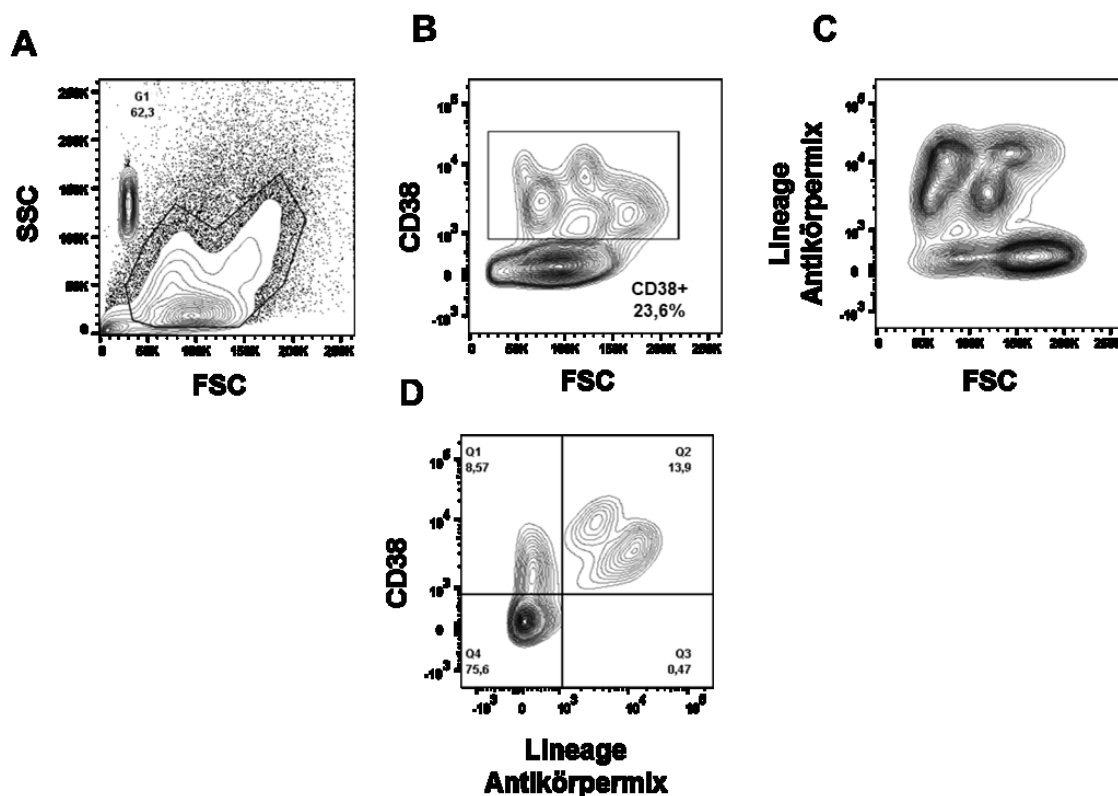
**Abbildung 61: Korrelation der CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation in % der Lin<sup>-</sup> PBMC Gesamtpopulation mit der Anzahl der detektierten Elispots.**

Dargestellt ist die prozentuale CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Population in Korrelation mit den absoluten Elispotzahlen. Eine lineare Regressionsanalyse bestätigt hier eine eindeutige Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Um eine weitere Differenzierung der CD38<sup>low/+</sup>, CD19<sup>-</sup> Zellpopulation zu erreichen, wurde in einem abschließenden Experiment eine ausgewählte Patientenprobe (Patient 1 an Tag 21) auf zusätzliche Oberflächenmarker hin untersucht. Neben einem *Lineage* Antikörpermix wurden hier zusätzlich die Plasmazellmarker CD27 und CD138 ebenso wie intrazelluläre IgM (icIgM), IgA (icIgA) und IgG (icIgG) verwendet.

In einem ersten Schritt erfolgte eine dezidiertere Betrachtung der CD38<sup>low/+</sup> Population in Bezug auf die Zellgröße sowie das Vorhandensein von Linienmarkern (*Lineage* Antikörpermix). Nach dem Eingrenzen der relevanten Zellpopulation (siehe Abb. 62 A) wurden CD38<sup>low/+</sup> Zellen im Größenvergleich (FSC) dargestellt (B). Während die CD38-negative Zellpopulation homogen zwischen 30 und 150 K verteilt zu sein scheint, scheinen CD38<sup>low/+</sup> Zellen drei

unterschiedliche größenabhängige Subpopulationen aufzuweisen. Zwei dieser Populationen liegen hierbei im Größenfeld der CD38<sup>-</sup> Zellen und könnten aufgrund ihrer durchschnittlichen Größen von ca. 60 K und 120 K (Faktor x 2) Zelldoubletten zugeordnet werden. Die dritte Population zeigt sich mit ca. 180 – 200 K deutlich größer und stellt am ehesten eine eigenständige Subgruppe dar. In einem weiteren Schritt wurde die Zellgröße in Bezug zum Vorhandensein von Progenitormarkern (Lin<sup>-/+</sup>) gesetzt (siehe Abb. 62 C). Wohingegen die Lin<sup>+</sup> Zellen analog zu den CD38<sup>low/+</sup> Zellen in Abbildung 62 B eine kleine doppelte Population (60 K und 120 K) zeigen, imponiert eine Lin<sup>-</sup> Zellfraktion, welche mit 150 – 200 K deutlich größere Zellen beinhaltet. Abschließend ist in Abbildung 62 D das Vorhandensein von Progenitormarkern (Lin) abhängig von CD38 dargestellt. Interessanterweise scheint es demnach neben Lin<sup>+</sup>, CD38<sup>low/+</sup> exprimierenden Zellen eine Lin<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup> tragende Zellpopulation zu geben.

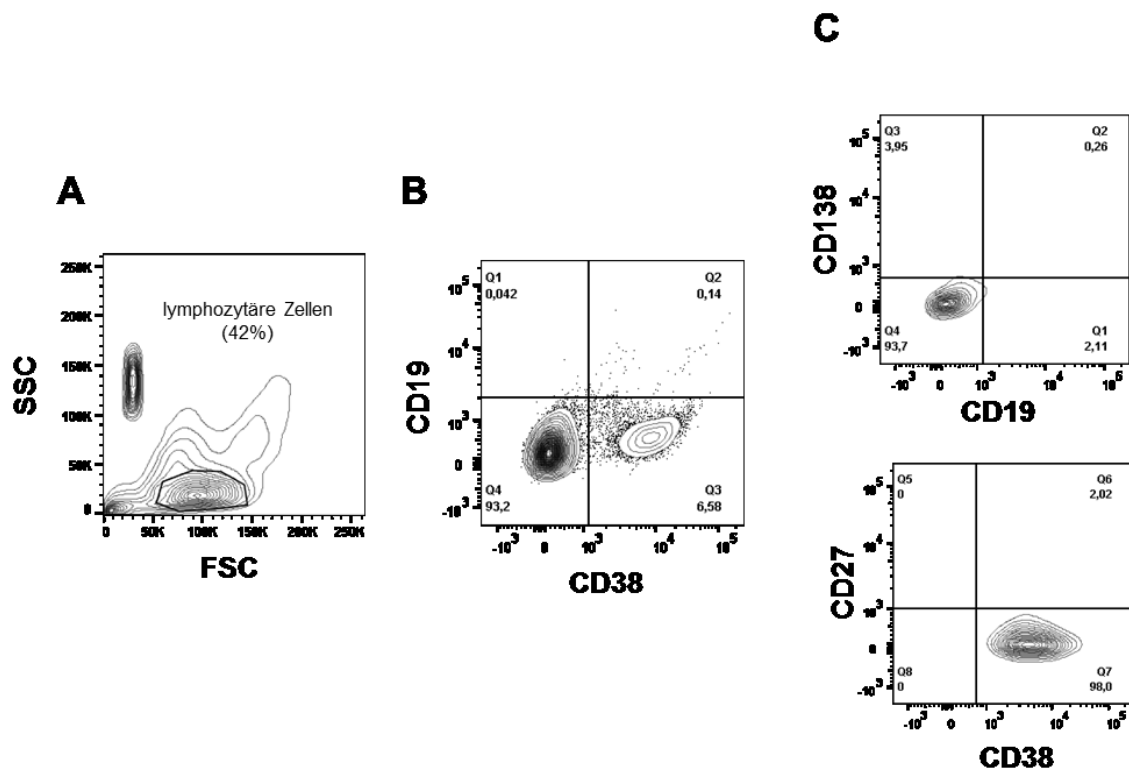


**Abbildung 62: Durchflusszytometrische Subgruppenanalyse der CD38<sup>+</sup> Zellpopulation.**

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, erfolgte eine Isolierung der PBMCs aus Patientenproben mit einer anschließenden Färbung mittels Primär- und Sekundärantikörper, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier exemplarisch das analytische Vorgehen zur weiteren Charakterisierung der lymphozytären CD38<sup>+</sup> Zellpopulation. A: Eingrenzung der relevanten Zellpopulation. B: Betrachtung der CD38<sup>+</sup> Zellpopulationen in Bezug auf die Zellgröße (FSC). C/D: Subgruppierung der Zellen bezogen auf eine Lineage-Positivität (C) und Korrelation mit CD38 (D).

Zusammenfassend scheint die zuvor beschriebene  $CD38^{low/+}$ ,  $CD19^-$  Zellpopulation nicht homogen zu sein, sondern sich in Größe und Expression von Progenitormarkern zu unterscheiden. Neben kleineren  $CD19^-$ ,  $CD38^{low/+}$ ,  $Lin^+$  exprimierenden und damit „reifen“ Zellen (wie z.B.: T-, NK-Zellen oder Monozyten), existiert eine Fraktion größerer  $CD19^-$ ,  $CD38^{low/+}$ ,  $Lin^-$  Zellen, welche einem nicht weiter charakterisierbaren Zellsubtyp zugeordnet werden müssen.

Eine weitere Subklassifizierung der Zellpopulationen erfolgte in Abbildung 63. Zusätzlich zu  $CD38$  und  $CD19$  wurde die Expression der typischen Plasmazellmarker  $CD138$  und  $CD27$  untersucht. Nach einer Identifikation der lymphozytären Zellpopulation im SSC und FSC (Abb. 63 A), erfolgte die Identifikation der  $CD19^-$ ,  $CD38^{low/+}$  Zellen (Abb. 63 B).

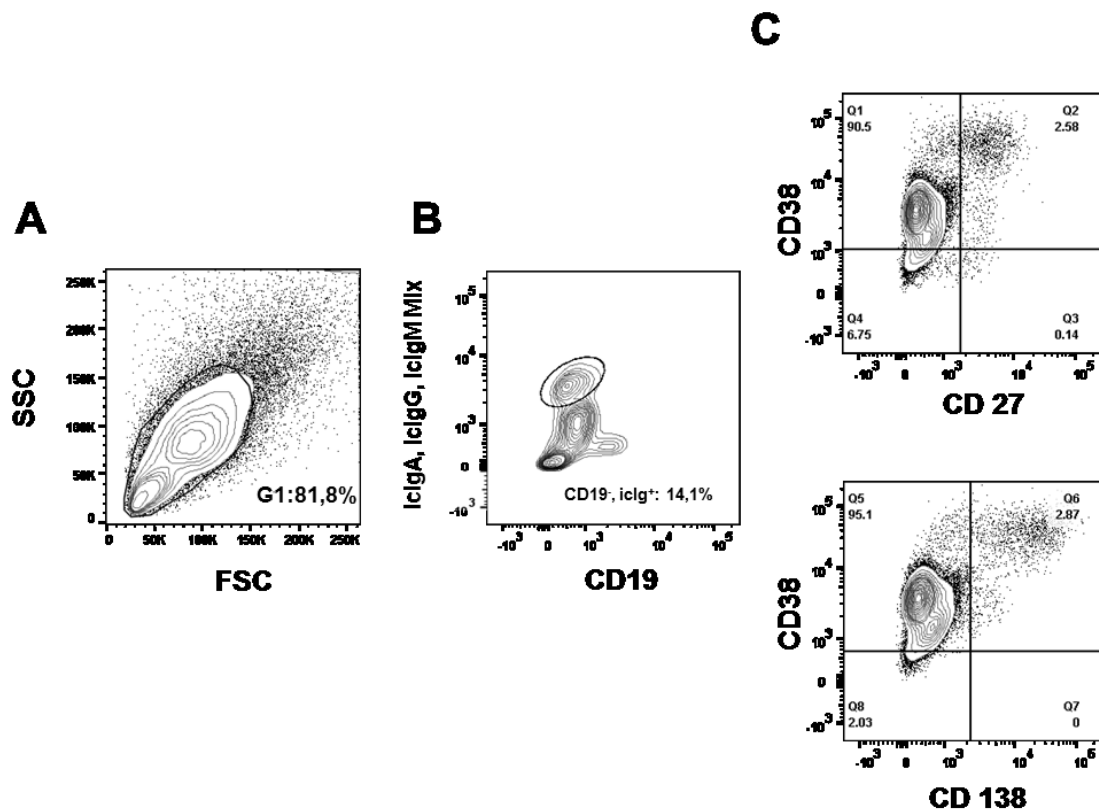


**Abbildung 63: Durchflusszytometrische Subgruppenanalyse der Immunzellregeneration bei Patient 1 (an Tag 7 nach der haploidenten Stammzelltransplantation).**

Zu unterschiedlichen Analysezeitpunkten wurde Vollblut der Patienten gewonnen. Anschließend erfolgte, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, eine Isolation der PBMCs mit einer anschließenden Färbung mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS). Dargestellt ist hier exemplarisch das analytische Vorgehen zur weiteren Eingrenzung der lymphozytären Zellpopulation. A: Eingrenzung der lymphozytären Zellen. B: Betrachtung der  $CD19^{+/-}$ ,  $CD38^{+/-}$  Zellpopulationen. C: Subgruppierung der  $CD38^+$ ,  $CD19^-$  Zellen bezogen auf eine  $CD27$ - und  $CD138$ -Expression.

In einem nächsten Schritt wurde die Expression von CD138 und CD27 in dieser Zellpopulation untersucht. Wie die Abbildung 63 C zeigt, scheint die CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup> Population weder CD27 noch CD138 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Entsprechend präsentiert sich hier eine bisher nicht eindeutig beschriebene und zuordenbare CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup>, CD27<sup>-</sup>, CD138<sup>-</sup> Zellpopulation.

Um einen direkten Zusammenhang der durchflusszytometrisch analysierten Immunzellsubpopulationen mit einer Immunglobulin-Expression herzustellen, wurden abschließend zytoplasmatische Färbungen gegen IgM (icIgM), IgA (icIgA) und IgG (icIgG) verwendet (siehe Abb. 64).



**Abbildung 64: Durchflusszytometrische Subgruppenanalyse der Immunglobulin-exprimierenden Zellpopulation bei Patient 1 (an Tag 14 nach der haploidenten Stammzelltransplantation).**

Zu unterschiedlichen Analysezeitpunkten wurde Vollblut der Patienten gewonnen. Anschließend erfolgte, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, eine Isolation der PBMCs mit einer anschließenden Färbung mittels Primär- und Sekundärantikörpern, gefolgt von einer Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) Dargestellt ist hier exemplarisch das analytische Vorgehen zur weiteren Eingrenzung der lymphozytären Zellpopulation. A: Eingrenzung der lymphozytären Zellen. B: Betrachtung der icIgA-, icIgG- und icIgM-exprimierenden Zellpopulationen bezogen auf CD19. C: Subgruppierung der icIgA-, icIgG- und icIgM-positiven Zellen bezogen auf eine CD27- und CD138-Expression.

Nach Eingrenzung der lymphozytären Zellpopulation (Abb. 64 A) erfolgte die Betrachtung der intrazellulären Immunglobulinfraktion für IgA, IgG und IgM (icIgA, icIgG und icIgM) vor dem Hintergrund der CD19-Expression. Wie der Abbildung 64 B zu entnehmen ist, lässt sich eine kleine CD19-positive B-Zellpopulation ohne Immunglobulinexpression (unten rechts) abgrenzen. Der Großteil der Immunglobulin-exprimierenden Zellen (14,1 %) zeigt sich jedoch CD19 negativ und entspricht somit nicht klassischen B-Zellen oder Plasmazellen. Diese CD19<sup>-</sup>, icIg<sup>+</sup> Population wurde in Abbildung 64 C weiter charakterisiert. Neben einer kleinen (2,5 - 2,8 %) CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD138<sup>++</sup>, CD27<sup>++</sup> Population (oben rechts), welche immunphänotypisch langlebenden Plasmazellen entspricht, imponiert eine dominante CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup>, CD138<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup> Population welche 90 – 95 % aller Immunglobulin-exprimierenden Zellen ausmacht.

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen somit ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Elispots für IgA, IgG und IgM und dem Auftreten einer CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation gezeigt werden. Darüber hinaus weisen weitere Subklassifizierungen darauf hin, dass es sich bei dieser Zellsubpopulation nicht um autologe B-Zellen bzw. Plasmazellen handelt, da sie auf der einen Seite keinen Plasmazellphänotyp (CD19<sup>(+)</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD138<sup>++</sup>, CD27<sup>++</sup>) besitzen und auf der anderen Seite eine HLA-Signatur des Spenders tragen. Durch die intrazelluläre Immunglobulinfärbung konnte hier eine bislang nicht beschriebene, vom Stammzellspender-abstammende immunglobulin-produzierende CD19<sup>-</sup>, CD38<sup>low/+</sup>, CD138<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup> Zellpopulation identifiziert werden, die deutlich vor der Rekonstitution anderer lymphatischer Zellen in der Zirkulation detektiert wird.

## 5. Diskussion

### 5.1. Die Auswahl der Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden die personenbezogenen Daten zur Krankheitsgeschichte und Primärproben (Blut) von insgesamt zehn Patienten erhoben und ausgewertet, die aufgrund hämatologischer Grunderkrankungen haploident stammzelltransplantiert wurden. Insgesamt konnten hierbei die Ergebnisse von sieben Patienten abschließend verwendet werden. Drei der zehn Patienten mussten von der abschließenden Analyse ausgeschlossen werden. Bei zwei dieser drei Patienten zeigte sich im Verlauf nach der Transplantation ein Transplantatversagen; ein Patient verstarb an Tag zehn nach der Transplantation aufgrund eines septischen Schocks. Somit ist die Anzahl der analysierten Patienten relativ gering; die Anzahl der gemessenen Proben hingegen ist aufgrund der häufigen Blutabnahmen bei den Patienten und des langen Beobachtungszeitraumes verhältnismäßig hoch. Dies muss bei der Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtkontext beachtet werden.

Ferner variiert bei den abschließend analysierten Patienten das Alter bei der Erstdiagnose zwischen 23 und 48 Jahren. Sechs der sieben Patienten sind weiblich, nur ein Patient ist männlich. Auch die Diagnosen, welche zur haploidenten Stammzelltransplantation führten, unterscheiden sich bei den Patienten. Bei einem Patienten wurde eine AML-M1 diagnostiziert, bei vier Patienten eine AML-M2, bei einem Patienten eine AML-M5 und bei einem Patienten ein Plasmozytom IgG lambda. Des Weiteren gibt es bei den ausgewerteten Patienten sehr große Unterschiede bezüglich der angewendeten Vortherapien. Die Induktionstherapien bei den AML-Patienten enthielten die Substanzen Cytarabin, Daunorubicin, Fludarabin, Idarubicin, Etoposid, All-Trans-Retinoinsäure, Valproinsäure, Mitoxantron, Imatinib und Topotecan. Für die Konsolidierungstherapien wurden die Substanzen Cytarabin, Thioguanin, Cyclophosphamid, All-Trans-Retinoinsäure, Gemtuzumab Ozogamicin, Mitoxantron und Busulfan verwendet. Ferner wurden Salvage-Therapien mit Clofarabin, Cytarabin, Mitoxantron, Gemtuzumab Ozogamicin, Cladribin,



Fludarabin und Litalir durchführt. Der Patient mit dem Plasmozytom IgG lambda erhielt vor der haploidenten Transplantation die Substanzen Dexamethason, Bortezomib, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid, Melphalan, Lenalidomid und Doxorubicin. Auch wurden nicht alle Patienten primär haploident transplantiert. Insgesamt vier Patienten erhielten eine primär haploidente Transplantation, drei Patienten wurden zunächst HLA-ident fremdallogen transplantiert und erst sekundär haploident transplantiert.

Zusammenfassend handelt es sich hier somit um ein kleines, sehr heterogenes Patientenkollektiv, welches sich insbesondere hinsichtlich Alter bei der Erst-diagnose, Geschlecht, hämatologischer Grunderkrankung, Vortherapien und Zeitpunkt der haploidenten Transplantation unterscheidet. Dies muss bei der anschließenden Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit beachtet werden.

## **5.2. Das Modell der haploidenten Stammzelltransplantation**

Wie im Kapitel Einleitung beschrieben sind immunologische Effekte wie der GvM-Effekt oder auch die GvHD abhängig von der Histokompatibilität der Donorzellen mit dem Empfängerorganismus [323]. Da bei der haploidenten Stammzelltransplantation diese immunologischen Effekte ausgeprägt zu erwarten sind, wurden die weiter oben beschriebenen strategischen Ansätze entwickelt, um die negativen Effekte der Alloreaktivität zu reduzieren und gleichzeitig durch eine frühe Immunrekonstitution das Risiko für infektiologische Komplikationen zu senken [352]. In der vorliegenden Arbeit wurde das haploidente Transplantat durch die negative Selektion CD3<sup>+</sup> Zellen und CD19<sup>+</sup> Zellen modifiziert, und so alloreaktive Komplikationen, welche durch reife T-Zellen verursacht werden, und lymphoproliferative Erkrankungen, welche durch reife B-Zellen ausgelöst werden, zu reduzieren versucht [366-368]. Gleichzeitig behält das Transplantat wichtige Vorläuferzellen und führt so zu einer schnellen Rekonstitution der Hämatopoese im Empfänger [366,367]. Für die Analysen zur Rekonstitution Antikörper-produzierender Zellen nach einer allogenen Stammzelltransplantation wurde daher bewusst das Modell der haploidenten CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> depletierten Transplantation gewählt. In diesem Modell kann die

humane adulte de-novo-Rekonstitution des B-zellulären Systems untersucht werden, welche sich signifikant von der murinen unterscheidet, ohne dass reife B-Zellen oder B-Zell-Progenitoren im Transplantat vorhanden sind und ohne den Einfluss von T-Zellen durch die CD3-Depletion. Des Weiteren wurde dieses Modell gewählt, da die Medikation im Anschluss an die Transplantation frei von Calcineurininhibitoren gewählt werden kann, welche durch die Blockade des NFAT-Signalweges einen erheblichen Einfluss auf die Rekonstitution der Hämatopoese nehmen könnten und welche in der Regel nach einer HLA-identen fremdallogenen Transplantation zum Einsatz gebracht werden müssen. Die Heterogenität der analysierten Patienten hinsichtlich ihrer Grunderkrankungen und Vortherapien kann in diesem Zusammenhang auch als Vorteil gesehen werden, da Störvariablen hier wahrscheinlicher sind, als bei der Analyse von Patienten mit einer einheitlichen Krankheitsentität, die Wertigkeit einheitlicher Ergebnisse auf der Grundlage heterogener Ausgangswerte jedoch gleichzeitig höher ist.

Zunächst erhielten alle analysierten Patienten eine Intensitäts-reduzierte Konditionierung, welche das blutbildende Knochenmark des Empfängers zwar nur reversibel zerstört, dennoch eine anhaltende Zytopenie zur Folge hat und somit eine nachfolgende Stammzellgabe meist obligat ist [339]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Transplantation und somit zum Zeitpunkt des Analysebeginns keine signifikante Anzahl Antikörper-produzierenden Zellen des Empfängers im peripheren Blut mehr vorlag [339]. Gleichzeitig enthält das CD3+/CD19+ depletierte Transplantat keine reifen B-Zellen bzw. Plasmazellen [86]. Dadurch liegen zum Zeitpunkt des Analysebeginns auch keine Antikörper-produzierenden Zellen des Spenders im Transplantat vor, sofern davon ausgegangen wird, dass langlebige CD19-Plasmazellen des Spenders nicht zirkulieren und somit nicht in Transplantaten enthalten sind. Daher macht das Modell der Transplantation eines haploidenten CD3+/CD19+ depletierten Transplantats eine „ungestörte“ Beobachtung der Rekonstitution der Antikörper-produzierenden Immunzellen möglich, ohne dass bereits zu Beginn Antikörper-produzierende Zellen von Spender oder Empfänger im peripheren Blut des Empfängerorganismus vorliegen.

Des Weiteren ist durch die Depletion CD3+ Zellen im Transplantat die Auftretenswahrscheinlichkeit alloreaktiver Komplikationen und somit die Notwendigkeit immunsuppressiver Maßnahmen nach der Transplantation geringer, verglichen mit nichtmodifizierten haploidenten Transplantaten [352]. Insgesamt mussten daher nur wenige Patienten nach der Transplantation immunsuppressiv behandelt werden, aufgrund des Auftretens einer GvHD. Der analysierte Patient 2 erhielt aufgrund einer GvHD Grad 2 der Haut eine immunsuppressive Medikation mit Prednisolon und Tacrolimus *post transplantationem*. Bei Patient 5 trat eine GvHD Grad 3 der Haut auf, weswegen dieser Patient nach der Transplantation eine immunsuppressive Medikation mit Prednisolon, Tacrolimus und Mycophenolatmofetil erhielt. Die mögliche Beeinflussung der Rekonstitution der Antikörper-produzierenden Zellen nach der Transplantation durch die immunsuppressive Medikation muss in diesen beiden Fällen bei der Bewertung der Ergebnisse dennoch berücksichtigt werden.

Auch die Auftretenswahrscheinlichkeit einer lymphoproliferativen Erkrankung bei haploident transplantierten Patienten ist durch die Depletion CD19+ Zellen im Transplantat als geringer beschrieben, verglichen mit nichtmodifizierten Transplantaten [468]. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass EBV als potentieller Auslöser einer lymphoproliferativen Erkrankung *post transplantationem* (PTLD, *post-transplant lymphoproliferative disorder*) von reifen B-Zellen beherbergt wird, und die Anzahl der reifen B-Zellen durch die CD19 Depletion stark reduziert wird [468,469]. Gleichzeitig muss angemerkt werden, dass auch EBV-negative PTLDs auftreten können [469]. Bei einem der untersuchten Patienten aus dem analysierten Kollektiv kam es zum Auftreten einer lymphoproliferativen Erkrankung. Patient 6 erhielt daher ab dem dritten Monat nach der haploidenten Stammzelltransplantation eine viermalige Applikation des Anti-CD20 Antikörpers Rituximab. Weitere therapeutische Maßnahmen zur Behandlung der PTLD erfolgten bei Patient 6 nicht. Der Patient 6 erhielt zu keinem Zeitpunkt nach der Transplantation eine immunsuppressive Medikation, welche Dosis-reduziert oder abgesetzt hätte werden können [469]. Eine zytoreduktive Chemotherapie erfolgte ebenfalls nicht [469]. Das Auftreten

der PTLD und der Einsatz des Anti-CD20 Antikörpers Rituximab müssen bei der Bewertung der gefundenen Ergebnisse bei Patient 6 berücksichtigt werden.

Des Weiteren kommt es wegen des „nur halb passenden“ Transplantats bei einer haploidenten Stammzelltransplantation neben einem vermehrten Auftreten von bilateraler Alloreaktivität im Sinne einer GvHD und einer Transplantatabstoßung auch zu einer geringeren Zahl an Krankheitsrezidiven durch den GvM-Effekt [352]. Bei Patient 4 wurde in Woche 5 nach der haploidenten Transplantation dennoch ein Krankheitsrezidiv mit einem Anteil autologer Zellen im peripheren Blut von mehr als 10 % gemessen. Dieser Patient erhielt anschließend Donorlymphozyteninfusionen (DLIs) in den Monaten 2 und 4 nach der Transplantation. Als Donorlymphozyteninfusion wird die Übertragung mononukleärer Zellen vom Spender auf den Empfänger nach der erfolgten Transplantation verstanden [470-472]. DLIs werden entweder als Teil des Stammzelltransplantats vor der Transplantation aliquotiert und nach der Transplantation bei Bedarf verwendet oder sie werden im Verlauf nach der Transplantation durch eine erneute Aphaese vom Spender gewonnen [473,474]. Generell können als DLI unmanipulierte mononukleäre Zellen verabreicht werden, oder aber auch Lymphozytenpopulationen, welche *in vivo* oder *ex vivo* modifiziert werden können [475]. Die empfohlene Dosis und das Intervall der verabreichten DLIs variieren nach hämatologischer Grunderkrankung, präemptiver oder therapeutischer Intention der Gabe, Dauer des krankheitsfreien Intervalls nach der Transplantation, Art der Transplantation und des Spenders [476,477]. Bei Patient 4 wurde wurden  $1 \times 10^4$  CD3+ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht. Die Donorlymphozyteninfusionen enthielten somit keine reifen B-Zellen. Dennoch muss auch die Gabe von DLIs bei Patient 4 bei der Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtkontext beachtet werden. Bei Patient 4 wurden unselektionierte PBMCs mit einem Anteil von  $1 \times 10^4$  CD3+ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht. Die Donorlymphozyteninfusionen enthielten somit vermutlich B-Zellen und deren Vorläuferzellen. Dies muss bei Patient 4 bei der Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtkontext beachtet werden.

### 5.3. Die Regeneration der Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation

Wie im Kapitel 1.4.5. der Einleitung beschrieben erfolgt die Rekonstitution der verschiedenen Zellreihen der Hämatopoese nach einer allogenen Stammzelltransplantation in unterschiedlicher Geschwindigkeit [398].

Für die neutrophilen Granulozyten, welche den größten Teil der Leukozyten insgesamt darstellen, ist eine Regeneration innerhalb der ersten 14 bis 30 Tage nach der Transplantation, abhängig von der Art des Transplantats, beschrieben [398]. Hierbei wird die schnellste Regeneration der neutrophilen Granulozyten nach etwa 14 Tagen nach Gabe von Stammzellen aus peripherem Blut beobachtet, nach etwa 21 Tagen findet die Regeneration der neutrophilen Granulozyten nach Gabe von Knochenmarkstammzellen statt, wohingegen eine Regeneration der neutrophilen Granulozyten nach Gabe von Stammzellen aus Nabelschnurblut erst nach etwa 30 Tagen erfolgt [398-400]. In der vorliegenden Analyse erhielten alle Patienten Stammzelltransplantate, welche mittels Apherese aus peripherem Blut des Spenders gewonnen wurden. Eine Regeneration der neutrophilen Granulozyten wurde im hier untersuchten Patientenkollektiv somit nach etwa 14 Tagen nach der Transplantation erwartet [398].

Die Rekonstitution der Lymphozyten dauert wesentlich länger, als die der neutrophilen Granulozyten und variiert von Monaten bis zu Jahren nach der hämatopoetischen Transplantation, abhängig von der Art und Zusammensetzung des Transplantats, der Intensität der Konditionierung, dem Lebensalter von Spender und Empfänger sowie der Auftretenswahrscheinlichkeit einer GvHD und die davon abhängige Notwendigkeit einer Immunsuppression *post transplantationem* [398,404-407]. Zuerst expandieren CD56+ NK-Zellen und Memory-T-Zellen, anschließend CD8+ zytotoxische T-Zellen, gefolgt von CD4+ T-Helfer-Zellen [398]. Die Rekonstitution der B-Zellreihe nach einer allogenen Stammzelltransplantation kann bis zu zwei Jahre dauern [398,437]. Nach etwa zwei Monaten erscheinen zunächst unreife, transitionale B-Zellen mit dem Phänotyp CD19+ CD24++

CD38<sup>++</sup> im peripheren Blut [398,438]. Das Auftreten reifer B-Lymphozyten sowie B-Gedächtnis-Zellen und somit teilweise auch komplexer zirkulierender Immunglobuline ist erst einige Monate später beschrieben [437,439,440].

Die Rekonstitution der Immunzellen nach einer haploidenten Stammzelltransplantation verläuft aufgrund der Modifikation des Transplantats, beispielsweise der negativen Selektion von CD3<sup>+</sup> Zellen und CD19<sup>+</sup> Zellen, generell langsamer als nach einer unmanipulierten HLA-gematchten allogenen Blutstammzelltransplantation [367,446,447]. Das Erscheinen der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut nach einer haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist im Mittel nach 11 bis 21 Tagen beschrieben [363,391,448,449]. Unter den Lymphozyten regenerieren auch nach einer haploidenten Stammzelltransplantation die CD56<sup>+</sup> NK-Zellen am schnellsten [450-453]. Ihre Anzahl im peripheren Blut erreicht ca. 30 Tage nach der Transplantation normale Level. Die Rekonstitution der T-Lymphozyten nach einer haploidenten Stammzelltransplantation hängt entscheidend von der Zusammensetzung des Transplantats ab, insbesondere eine T-Zell-Depletion des Transplantats verlangsamt die Rekonstitution [451-456]. Für die Rekonstitution der B-Lymphozyten nach einer haploidenten Transplantation werden Zeiträume von mehr als einem Jahr beschrieben [451,453]. Eine Regeneration der Lymphozyten generell wurde bei den hier untersuchten Patienten daher nach einigen Monaten nach der Transplantation erwartet.

In der dargestellten Arbeit wurde zunächst die Rekonstitution der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nach der haploidenten Transplantation unter Verwendung des Sysmex-Systems betrachtet. Bei Patient 1 zeigt sich als Ausdruck der Konditionierung sowie der zugrundeliegenden Erkrankung an Tag -7 eine maximale Reduktion der Gesamtleukozyten-, Granulozyten- sowie der Lymphozytenzahl ( $< 50/\mu\text{l}$ ). Ein Anstieg der Leukozyten kann ab Tag 7 nach der Transplantation festgestellt werden, mit einer Normalisierung der Gesamtleukozytenzahlen bereits nach 14 Tagen auf niedrig normale Werte. Die neutrophilen Granulozyten steigen ebenfalls ab Tag 7 nach der Transplantation deutlich an und erreichen bereits an Tag 9 einen Wert  $> 500$  pro  $\mu\text{l}$  Blut. Die

Lymphozytenzahlen steigen ab Tag 35 nach der Transplantation an und erreichen an Tag 100 nach der Transplantation normale Werte. Somit liegen die Ergebnisse der Rekonstitution der Leukopoese für den ersten Patienten innerhalb der in der Literatur beschriebenen Erwartungswerte. Auch bei Patient 2 zeigt sich an Tag -7 eine maximale Reduktion der Gesamtleukozyten-, Granulozyten- sowie der Lymphozytenzahl ( $< 50/\mu\text{l}$ ). Die Gesamtleukozytenzahl sowie die Zahl der neutrophilen Granulozyten steigt ab Tag 7 deutlich an mit einem *peak* der Werte an Tag 10 nach der Transplantation, gefolgt von einem Rückgang der Zahlen nach Tag 14. Die Regeneration der Lymphozyten ist ab Tag 28 erkennbar, wobei bis Tag 270 nach der Transplantation eine Lymphozytopenie mit  $< 1000/\mu\text{l}$  persistiert. Bei Patient 2 liegen die Ergebnisse der Immunrekonstitution daher ebenfalls im Rahmen der Erwartungen mit einer frühen Rekonstitution der Gesamtleukozyten und neutrophilen Granulozyten und einer späteren Rekonstitution der Lymphozyten. Bei Patient 2 wurde im Rahmen einer GvHD Grad 2 der Haut eine immunsuppressive Medikation mit Prednisolon und Tacrolimus eingesetzt. Möglicherweise liegt die relativ verzögerte Lymphopoese hiermit in Zusammenhang. Bei Patient 3 liegt an Tag -7 noch eine Gesamtleukozytenpopulation von  $1760/\mu\text{l}$  vor mit  $1038/\mu\text{l}$  neutrophilen Granulozyten und  $349/\mu\text{l}$  Lymphozyten. Zum Zeitpunkt der Stammzellrückgabe (Tag 0) liegen alle untersuchten Zellreihen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von  $50/\mu\text{l}$ . Der Anstieg der Gesamtleukozyten und der neutrophilen Granulozyten erfolgt ab Tag 7 nach der Transplantation; bereits an Tag 21 nach der Transplantation weisen Gesamtleukozyten und neutrophile Granulozyten bereits wieder Normwerte auf. Die Lymphozytenregeneration beginnt ab Tag 28 nach der Stammzelltransplantation. Eine weitgehende Normalisierung der Lymphozytenwerte mit  $>1200$  Lymphozyten/ $\mu\text{l}$  ist bereits früh nach der Transplantation an Tag 49 erkennbar. Auch bei Patient 3 liegen die gemessenen Ergebnisse der Rekonstitution der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten somit innerhalb der in der Literatur beschriebenen Erwartungswerte, mit einer jedoch vergleichsweise frühen Erholung der Lymphozyten. Bei Patient 4 tritt ab Tag 7 ein steiler Anstieg der

Gesamtleukozyten und der neutrophilen Granulozyten auf mit einem *peak* der Werte zwischen Tag 14 und 21 nach der Transplantation und einem anschließenden leichten Abfall der Werte. Ein Anstieg der Lymphozyten lässt sich ab Tag 35 nachweisen. Auch bei Patient 4 liegen die gemessenen Werte innerhalb der Erwartungen aus der Literaturrecherche. Ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Lymphozytenzahlen und der Gabe von Donorlymphozyten in den Monaten 2 und 4 nach der Transplantation kann jedoch bei Patient 4 nicht hergestellt werden. Bei Patient 5 zeigt sich eine Regeneration der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten zwischen Tag 7 und Tag 14 nach der haploidenten Transplantation mit einem passageren Abfall der Leukozyten zwischen Tag 28 und Tag 42 und einem anschließenden Wiederanstieg. Dabei korreliert die Entwicklung der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten nicht mit der Entwicklung des CRP-Wertes. Die Regeneration der Lymphozyten zeigt sich ab Tag 90 nach der haploidenten Transplantation und liegt somit innerhalb des erwarteten Zeitraums. Ob die im Vergleich zu den anderen Patienten etwas spätere Erholung der Lymphopoese bei Patient 5 im Zusammenhang mit der eingesetzten Immunsuppression bei GvHD Grad 3 der Haut steht, lässt sich spekulieren. Auch Patient 6 weist eine frühe Regeneration der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten und einen mehrgipfligen Verlauf der Leukozytenzahlen und neutrophilen Granulozytenzahlen auf. Auch bei diesem Patienten lässt sich der Verlauf der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten nicht mit dem Verlauf des CRP-Wertes korrelieren. Die Regeneration der Lymphozyten kann ab Tag 35 nach der Stammzellrückgabe dokumentiert werden. Eine Beeinflussung der Lymphozytenwerte bei diesem Patienten ab dem dritten Monat nach der Transplantation durch das Auftreten der PTLD und der anschließend repetitiven Gabe von Rituximab kann nicht sicher belegt werden. Bei Patient 7 zeigt sich im Vergleich zu allen anderen Patienten zum Zeitpunkt der Stammzellrückgabe (Tag 0) noch eine messbare Gesamtleukozytenzahl von 1080/ $\mu$ l und eine Neutrophilenzahl von 980/ $\mu$ l. Der anschließende Verlauf der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten ist mehrgipflig mit einem ersten *peak* zwischen Tag 14 und Tag 21. Auch dieser Verlauf der Leukozyten und neutrophilen



Granulozyten korreliert nicht mit dem CRP-Wert. Eine Entwicklung der Lymphozyten bis hin zu normwertigen Lymphozytenzahlen ( $> 1200/\mu\text{l}$ ) kann innerhalb des Analysezeitraums (Tag 0 bis 270) nicht beobachtet werden. Der Grund für diese langsame Entwicklung der Lymphozyten ist unklar. Allerdings liegt die Entwicklung der Lymphozyten noch innerhalb des zu erwartenden Zeitraums.

Insgesamt lässt sich somit bei allen 7 Patienten ab Tag 14 nach der haploidenten Transplantation eine signifikante Regeneration der Leukopoese feststellen. Diese entspricht den Angaben zur Regeneration der Leukozyten nach einer haploidenten Stammzelltransplantation in der Literatur [367,446,447]. Auffallend ist insgesamt auch ein zwei- oder mehrgipfliger Verlauf der Leukozytenwerte, welcher nicht mit dem CRP-Wert oder klinischen Angaben einer Infektion zeitlich korreliert werden kann. Außerdem zeigt sich auch bei allen 7 Patienten eine signifikante Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten ab Tag 14, vergleichbar zum Verlauf der Leukozytenzahlen. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den in der Literatur angegebenen Zeiträumen für die Rekonstitution neutrophiler Granulozyten nach einer haploidenten Stammzelltransplantation [363,391,448,449]. Anhand dieser Daten lässt sich die Regeneration der Gesamtleukozyten, maßgeblich durch die Erholung der neutrophilen Granulozyten erklären. Ferner zeigt sich die Regeneration der Lymphopoese bei allen 7 ausgewerteten Patienten erwartungsgemäß später, als die Regeneration der neutrophilen Granulozyten [363,391,448,449]. Eine signifikante Zunahme der Lymphozytenpopulation zeigt sich ab Tag 28 *post transplantationem*, wobei eine Normalisierung der Lymphozytenwerte im Durchschnitt nach 270 Tagen nach der Transplantation erreicht wird. Abschließend lässt sich in diesem kleinen Patientenkollektiv keine Korrelation zwischen der Menge der transplantierten CD34+ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers und dem Zeitpunkt der Rekonstitution der Immunzellen herstellen. Die Patienten erhielten zwischen  $4,3 \times 10^6$  und  $13,4 \times 10^6$  CD34+ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht. Patienten, welche weniger Stammzellen transplantiert bekamen, regenerierten in dieser Analyse nicht

langsamer, als Patienten, deren Transplantat weniger CD34+ Stammzellen enthielt.

#### **5.4. Detektion von IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation**

Die Rekonstitution der humoralen Immunantwort nach einer allogenen Stammzelltransplantation ist mit einer Dauer von bis zu zwei Jahren nach der Transplantation beschrieben [478]. Wie bereits ausführlich im Kapitel Einleitung erwähnt, entwickelt sich – basierend auf hauptsächlich murinen Daten - aus der Pro-B-Zelle, über die Prä-B-Zelle die transitionale B-Zelle, welche anschließend das Knochenmark verlässt und sich in der Milz entweder zu IgM-Gedächtniszellen weiterentwickelt oder zu reifen B-Zellen [478-481]. Reife B-Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von Antigenen weiter zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen [478-480,482]. Die Regeneration der Antikörperproduzierenden Plasmazellen nach einer allogenen Stammzelltransplantation ist somit ebenfalls über einen Zeitraum von mehreren Monaten beschrieben [483].

Nach der Analyse der Regeneration der Leukopoese, Granulopoese und Lymphopoese wurde bei den sieben Patienten nach der haploidenten Transplantation auch das Auftreten Immunglobulin-präsentierender bzw. Immunglobulin-sezernierender Zellen untersucht. Die aus den Patientenproben gewonnenen PBMCs wurden zwischen Woche 0 und 64 auf die Expression von IgA, IgG und IgM mit Hilfe eines B-Zell-ELISpot-Assays analysiert [484]. Bei Patient 1 zeigt sich in dieser Untersuchung unerwartet früh, zwischen Tag 14 und Tag 35 *post transplantationem*, ein Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen. Alle drei Immunglobulinklassen werden hierbei exprimiert ohne Präferenz eines Immunglobulins. Zwischen Tag 35 und 62 zeigt sich dann bei Patient 1 ein erneuter Abfall der Immunglobuline. Erst ab Tag 90 kann wieder eine relevante Menge IgA-, IgG- und IgM-tragender Zellen dargestellt werden. Bei Patient 2 zeigt sich ein ähnliches Bild mit einem Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen ab Tag 15 nach der

Stammzellgabe. Bei Patient 2 liegt jedoch eine Dominanz der Immunglobuline vom IgM-Typ vor. Der weitere Kurvenverlauf der IgA-, IgG- und IgM-tragenden Zellen bei Patient 2 ähnelt dem Kurvenverlauf bei Patient 1 und kann mit dem Verlauf der Regeneration der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten zeitlich korreliert werden. Eine Korrelation des Kurvenverlaufs der IgA-, IgG- und IgM-tragenden Zellen mit der Regeneration der Lymphozyten ist aufgrund der niedrigen Gesamtzellzahl schwierig. Zwischen dem Auftreten der GvHD Grad 2 der Haut bei dem Patienten 2 mit dem Einsatz von Prednisolon und Tacrolimus zur Immunsuppression und dem Auftreten bzw. dem Verlauf der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen kann kein direkter Zusammenhang hergestellt werden. Bei Patient 3 ergibt sich auch ein passagerer Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen zwischen Tag 21 und 28 nach der Stammzellrückgabe, wenngleich die absoluten Werte geringer ausfallen als bei den anderen Patienten. Der weitere Verlauf der IgA-, IgG- und IgM-tragenden Zellen, ähnelt dem Verlauf der beiden ersten Patienten. Bei Patient 3 zeigt sich demgegenüber jedoch eine Dominanz der Immunglobuline vom IgG-Typ. Auch bei Patient 3 kann der zeitliche Verlauf der Regeneration der neutrophilen Granulozyten mit dem Auftreten der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen vereinbart werden. Eine Korrelation zur Regeneration der Lymphozyten kann nicht hergestellt werden. Auch bei Patient 4 ist ein früher Anstieg von IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen messbar mit einem Maximum an Tag 19 nach der haploidenten Stammzelltransplantation. Der weitere Verlauf der IgA-, IgG- und IgM-tragenden Zellen ähnelt dem Verlauf bei den bereits beschriebenen Patienten. Auch bei Patient 4 dominieren Immunglobuline vom IgG-Typ. Ob das Auftreten des Krankheitsrezidivs bei Patient 4 mit einem Anteil autologer Zellen im peripheren Blut von mehr als 10 % und der anschließenden Gabe von DLIs in den Monaten 2 und 4 nach der Transplantation korreliert werden kann ist unklar. Es kann lediglich festgestellt werden, dass nach einem ersten *peak* der IgA-, IgG- und IgM-tragenden Zellen in der dritten Woche nach der Transplantation zwar ein relativer aber kein absoluter erneuter Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen erfolgt. Der Patient 5 zeigt einen relevanten Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen bereits 10

Tage nach der haploidenten Transplantation. Wie bei den bereits beschriebenen Patienten zeigt sich auch bei Patient 5 ein zweigipfliger Verlauf. Hierbei korreliert der zweite Anstieg der der IgA-, IgG- und IgM-tragenden Zellen zeitlich mit der Regeneration der Lymphozyten im peripheren Blut. Auch bei Patient 5 dominieren Immunglobuline vom IgG-Typ. Auch bei Patient 5 kann kein klarer Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer GvHD Grad 3 der Haut mit einer immunsuppressiven Therapie mit Prednisolon, Tacrolimus und Mycophenolatmofetil und dem Verlauf der Entwicklung der IgA-, IgG- und IgM-präsentierenden Zellen gebildet werden. Patient 6 zeigt einen etwas anderen Verlauf, als die bislang beschriebenen Patienten. Bei Patient 6 sind an Tag 0 Elispots für IgA, IgG oder IgM und somit Antikörper-produzierende Zellen nachweisbar, welche jedoch nach 3 Tagen unter die Nachweisgrenze abfallen. An Tag 19 zeigt sich dann ein Maximum der Immunglobulin-exprimierenden Zellen. Eine eindeutige Erklärung hierfür kann nicht genannt werden. Leukozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten liegen bei Patient 6 an Tag 0 in der Sysmex-Analyse unterhalb der Nachweisgrenze. Möglicherweise ist die Elispot-Analyse hier sensitiver als die Sysmex-Analyse. Des Weiteren erhielt Patient 6 bei Nachweis einer lymphoproliferativen Erkrankung repetitiv den Anti-CD20-Antikörper Rituximab. Dieser scheint keine Auswirkung auf die absoluten und relativen Zahlen der Immunglobulin-exprimierenden Zellen zu haben, was mit einer fehlenden Expression von CD20 auf diesen Zellen erklärt werden könnte. Zusätzlich kann gemutmaßt werden, dass die Immunglobulin-exprimierenden Zellen keine CD20 positiven Vorläufer brauchen, da die Depletion CD20 positiver reifer B-Zellen keinen Einfluss auf deren Detektion hat. Bei Patient 7 können die bisherigen Ergebnisse mit einem frühen, passageren Anstieg der IgA-, IgG- und IgM-exprimierenden Zellen erneut bestätigt werden. Eine signifikante Präferenz einer Immunglobulinklasse kann bei Patient 7 nicht dokumentiert werden.

Zusammenfassend zeigt sich bei allen 7 analysierten Patienten eine erstaunliche zeitliche Kohärenz des ersten Auftretens Immunglobulin-exprimierender Zellen nach der haploidenten Stammzelltransplantation. Die Immunglobulin-exprimierenden Zellen lassen sich dabei deutlich früher

nachweisen (Tag 10 bis 30 nach der Stammzellrückgabe), als die Regeneration von Plasmazellen in der Literatur beschrieben ist und als die Regeneration der Lymphozyten in der Sysmex-Analyse beobachtet werden kann. Diese Übereinstimmung besteht trotz des inhomogenen Patientenkollektivs und bezieht alle Immunglobulinklassen (IgA, IgG und IgM) mit ein. Tendenziell lässt sich bei drei der sieben Patienten eine Präferenz für Immunglobuline der Subklasse IgG nachweisen. Eine direkte Assoziation des Auftretens Immunglobulin-exprimierender Zellen mit der Lymphopoese nach der haploidenten Transplantation lässt sich nicht herstellen. Vielmehr scheint der zeitliche Verlauf der Antikörper-produzierenden Zellen mit der Regeneration der neutrophilen Granulozyten assoziiert werden zu können.

### **5.5. Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation**

Neben der Möglichkeit des direkten Nachweises Immunglobulin-exprimierender oder sezernierender Zellen mittels Elispot, wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein indirekter Nachweis dieser Zellen durch die Analyse der nicht-zellgebundenen Immunglobuline im Serum der Patienten untersucht.

Für die Immunglobuline vom IgM-Typ ist in der Literatur eine Regeneration hin zu normalen Serumleveln nach einer allogenen Stammzelltransplantation nach 3 bis 6 Monaten beschrieben [485]. Die IgG-Serumlevel hingegen können sich auch erst 1 Jahr nach einer allogenen Transplantation oder noch später normalisieren [485]. Für die Rekonstitution der Immunglobuline vom IgA-Typ und IgE-Typ nach einer allogenen Stammzelltransplantation konnten keine allgemein gültigen Zeiträume gefunden werden.

Beim ersten Patienten des untersuchten Kollektivs dieser Arbeit zeigt sich ein früher Anstieg der Serumlevel für IgA, IgG und IgM mit einem Maximum der Werte an Tag 14 nach haploidenter Transplantation. Die IgE-Spiegel blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum auf gleichbleibend niedrigem Niveau. Bei Patient 2 kann ein ähnlicher Verlauf der Immunglobulinserumlevel für IgA, IgG und IgM beobachtet werden mit einem Anstieg der Level zwischen

der ersten und der zweiten Woche nach der Transplantation und einem anschließenden erneuten Abfall. Die IgE-Spiegel bleiben auch hier über den gesamten Verlauf unverändert auf niedrigem Niveau. Die Entwicklung einer GvHD bei Patient 2 mit einer konsekutiven immunsuppressiven Therapie mit Prednisolon und Tacrolimus scheint auf den Verlauf der Serumimmunglobulinlevel keinen Einfluss genommen zu haben. Bei Patient 3 zeigt sich zwischen Woche 2 und Woche 3 nach der Stammzelltransplantation ein relevanter Anstieg der Serumkonzentrationen für IgA, IgG und IgM. Auch bei diesem Patienten bleiben die Serum IgE-Level unverändert auf niedrigem Niveau. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Patient 4 mit einem Anstieg der Serumkonzentrationen von IgA, IgG und IgM zwischen Woche 2 und 3. Erneut bleiben die IgE-Spiegel konstant im Bereich der Nachweisgrenze. Die Gabe von DLIs bei Patient 4 erfolgte erst im zweiten Monat nach der haploidenten Stammzelltransplantation, so dass diese mögliche Einflussgröße für den beobachteten Zeitraum von 35 Tagen keine Rolle spielt. Die bislang beobachteten Ergebnisse treffen für Patient 5 nur teilweise zu. Bei diesem Patienten kann kein Anstieg der Serum-IgG-Level zwischen Woche 1 und 3 beobachtet werden; vielmehr zeigt sich ein Abfall der Werte über den Beobachtungszeitraum von 35 Tagen nach der Transplantation. Für IgA und IgM zeigt sich jedoch das bekannte Bild mit einem *peak* der Serumlevel zwischen Woche 2 und Woche 3. Erneut bleiben die IgE-Spiegel konstant erniedrigt. Bei Patient 5 trat bekanntermaßen eine GvHD Grad 3 der Haut auf und eine immunsuppressive Therapie mit Prednisolon, Tacrolimus und Mycophenolatmofetil erfolgte deswegen. Ob diese Tatsache den Verlauf der Serum-IgG-Level bei Patient 5 erklären kann bleibt fraglich. Bei Patient 6 verlaufen die Serum-IgG-Level ebenfalls ohne relevante Schwankungen mit einem ausbleibenden *peak* zwischen Woche 2 und 3. Es zeigen sich außerdem nahezu normale Werte für IgG. Für Immunglobuline vom IgM-Typ und IgA-Typ zeigt sich der bereits bei den anderen Patienten beobachtete passagere Anstieg der Serumkonzentrationen zwischen Woche 2 und 3. Patient 6 erhielt, wie bereits beschrieben, aufgrund einer PTLD ab dem dritten Monat nach der haploidenten Transplantation rezidivierend Rituximab. Da dieses Ereignis erst

nach der Entnahme der Proben für die hieraufgeführte Analyse auftrat ist nicht mit einem Einfluss auf die Ergebnisse zu rechnen. Bei Patient 7 kann ein passagerer Anstieg der Serumkonzentrationen aller drei Immunglobulinsubtypen (IgA, IgG und IgM) zwischen Woche 1 und 3 nach der haploidenten Transplantation verzeichnet werden. Die Serumlevel für IgE bleiben auch hier konstant erniedrigt.

Zusammenfassend kann somit für den Verlauf der Serumkonzentrationen aller Immunglobulinsubklassen nach einer haploidenten Stammzelltransplantation bei allen 7 Patienten ein ähnliches Ergebnis aufgezeigt werden. Für IgG zeigt sich ein Anstieg der Serumkonzentrationen zwischen der ersten und der dritten Woche nach der Transplantation mit einem anschließenden Abfall bis zur Woche 5. Da die Serumkonzentration von IgG durch die Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) theoretisch beeinflusst werden kann und nicht bekannt ist, ob und welche Patienten zu welchen Zeitpunkten IVIGs erhielten, wurden auch die Immunglobulinsubklassen IgA, IgM und IgE auf gleiche Art analysiert da IVIGs in der Regel weder IgM noch IgA enthalten. Hierbei zeigt sich für IgA ebenfalls ein Anstieg der Serumkonzentrationen zwischen der ersten und der dritten Woche nach der Transplantation mit einem anschließenden Abfall bis zur Woche 5. Ein ähnlicher Verlauf ergibt sich auch für IgM mit einem Anstieg der Serumkonzentrationen zwischen der ersten und der dritten Woche nach der Transplantation mit einem anschließenden Abfall bis zur Woche 5. Lediglich die Serum-IgE- Level sind bei allen Patienten konstant erniedrigt und weisen keine Schwankungen auf. Es ergibt sich keine Dominanz einer Immunglobulinsubklasse. Somit korrelieren die Ergebnisse der Entwicklung der Immunglobuline im Serum mit den Elispot-Analysen. Dies erhärtet die Hypothese einer Existenz von frühen Immunglobulin-exprimierenden und – sezernierenden Zellen nach einer haploidenten Stammzelltransplantation.

## 5.6. Zytokinexpression nach haploidenter Stammzelltransplantation

Sowohl für die Immunrestitution nach einer allogenen und insbesondere auch haploidenten Stammzelltransplantation, als auch im Rahmen von Komplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation wie der GvHD, Infektionen und einem Zytokin-Release-Syndrom spielen viele verschiedene Zytokine eine wichtige Rolle [486]. Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine wurden dabei in zwei Gruppen einzuteilen versucht: Zytokine, die hauptsächlich in der Hämatopoese und vor allem Lymphopoese eine Rolle spielen und Zytokine, welche überwiegend im Rahmen einer Inflammation und der übrigen Myelopoese von Bedeutung sind. Zu den für die Hämatopoese wichtigen Zytokinen zählt IL-1b, welches insbesondere in der frühen Hämatopoese eine Rolle spielt und unter anderem auch auf B- und T-Zellen wirkt, jedoch gleichzeitig auch im Rahmen einer Inflammation wesentlich ist [487]. Des Weiteren zählt hierzu IL-2, welches die Proliferation von B- und T-Zellen fördert. [488]. Hierzu gehört auch IL-4, welches ebenfalls die Proliferation und Aktivierung von B- und T-Zellen, aber auch von Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bewirkt [489]. Ferner kann zu dieser Gruppe von Zytokinen IL-5 gezählt werden. IL-5 fördert das Wachstum und die Differenzierung insbesondere von eosinophilen Granulozyten [490]. IL-7, welches auch im Rahmen der Hämatopoese eine Rolle spielt, fördert das Wachstum von Prä-B-Zellen und Pro-B-Zellen, von reifen T-Zellen und NK-Zellen [491]. Außerdem sollen in diesem Zusammenhang die Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF erwähnt werden, welche die Proliferation pluripotenter Stammzellen und die Bildung und Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen fördern [492]. Zur Gruppe der inflammatorischen Zytokine zählt in erster Linie IL-6 als Akute-Phase-Protein [493]. Auch IL-8 ist als Mediatormolekül einer Inflammation bekannt. Es mobilisiert neutrophile Granulozyten und unterstützt deren Degranulation [494]. Ferner wird IL-12 eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Es spielt eine Rolle bei verschiedenen Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen [495]. IL-17, welches ebenfalls zu Gruppe der



proinflammatorischen Zytokine gehört, fördert die Bildung von IL-6 und IL-8 [496].  $\text{INF}\alpha$  spielt insbesondere im Rahmen von viralen Infekten eine Rolle [497]. MCAF ist auch proinflammatorisch wirksam und aktiviert vor allem Monozyten und Makrophagen [498]. MIP-1b spielt ebenfalls im Rahmen viraler Infekte eine Rolle [499].  $\text{TNF}\alpha$  ist als eines der wichtigsten Zytokine bekannt, die bei einer akuten oder chronischen Inflammation, wie einem Trauma, einer Infektion oder einer Autoimmunerkrankung, bedeutsam sind [500]. IL-10 kann nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden; die verschiedenen Funktionen von IL-10 sind teilweise als widersprüchlich beschrieben; überwiegend ist eine antiinflammatorische Wirkung berichtet [501]. Auch IL-13 werden pleiotrope, sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische, Effekte zugeschrieben [502]. Es ist jedoch auch als wichtiger Faktor der B-Zell-Entwicklung beschrieben [503].

Bei den Patienten der hier vorgestellten Arbeit wurden an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28 und 35 nach der haploidenten Stammzelltransplantation Serumproben auf die Zytokinexpression untersucht. Hierbei zeigt sich bei Patient 1 eine deutlich gesteigerte Konzentration der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8,  $\text{INF}\alpha$ , MCAF, MIP-1b und  $\text{TNF}\alpha$ . Auch die G-CSF-Expression ist erwartungsgemäß erhöht. Dahingegen sind die Zytokine, die die Entwicklung der B- und T-Zellen beeinflussen, wie IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13 nicht oder nur sehr gering in ihrer Konzentration gesteigert. Bei Patient 2 zeigt sich ein ähnliches Bild mit einer gesteigerten Konzentration von IL-6, IL-8,  $\text{INF}\alpha$ , MCAF, MIP-1b und  $\text{TNF}\alpha$  und einer nur diskret oder nicht gesteigerten Konzentration von IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13. Das Auftreten der GvHD bei Patient 2 scheint nicht zu einer Änderung des Expressionsmusters geführt zu haben. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigt sich auch bei Patient 3. Bei diesem Patienten ergibt sich erneut eine gesteigerte Expression für IL-6, IL-8,  $\text{INF}\alpha$ , MCAF, MIP-1b und  $\text{TNF}\alpha$ . Auch der vierte Patient zeigt ein nahezu identisches Bild der Zytokinverteilung. Die inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8,  $\text{INF}\alpha$ , MCAF, MIP-1b und  $\text{TNF}\alpha$  sind deutlich in ihrer Expression erhöht. Dabei hält die gesteigerte Expression sogar über einen längeren Zeitraum an als bei den

drei zuvor beschriebenen Patienten. IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13 sind nur diskret oder nicht gesteigert exprimiert. Das Auftreten eines Krankheitsrezidivs und die anschließende Gabe von DLIs erfolgten erst nach dem Ende des Analysezeitraums bei Patient 4 und haben somit auf die dargestellten Ergebnisse vermutlich keinen Einfluss. Auch bei Patient 5 dominieren gesteigert exprimierte inflammatorische Zytokine und an den ersten beiden Messpunkten auch eine gesteigerte Expression für G-CSF. Erneut spielen die für die Lymphozytenentwicklung wichtigen Zytokine IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13 keine Rolle. Auch bei Patient 5 scheint das Auftreten der GvHD zu keiner Änderung des Zytokinexpressionsmuster zu führen. Bei Patient 6 ergibt sich wiederum ein vergleichbares Zytokinexpressionsmuster mit einer gesteigerten Expression der inflammatorischen Zytokine, insbesondere MCAF und MIP-1b. Das Auftreten einer PTLD und die anschließenden Gaben von Rituximab erfolgten erst nach Ende des Analysezeitraums und führten somit vermutlich zu keiner Änderung des Expressionsmusters. Abschließend zeigt sich auch bei Patient 7 eine völlig vergleichbare Verteilung der Zytokinexpression mit einer gesteigerten Expression von IL-6, IL-8,  $\text{IFN}\alpha$ , MCAF, MIP-1b,  $\text{TNF}\alpha$  und G-CSF und einer gering oder nicht gesteigerten Expression von IL-2, IL-4, IL-7 und IL-13. Zusammenfassend zeigt sich somit bei allen analysierten Patienten in Woche 2 und in Woche 3 nach der haploidenten Stammzelltransplantation eine gesteigerte Expression inflammatorischer Zytokine, nicht jedoch von Zytokinen, die an der B-Zellentwicklung beteiligt sind. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass in Woche 2 und 3 bereits unerwartet früh Antikörper-produzierende Zellen mit den vorangegangenen Experimenten nachgewiesen werden konnten, welche somit ohne den Einfluss von Zytokinen entstanden sind, die eine Rolle in der B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Proliferation spielen.

Abschließend soll auf BAFF (*B cell activating factor*) als einen der wichtigsten Botenstoffe der B-Zell-Entwicklung erneut eingegangen werden [484]. BAFF ist für die Entwicklung und das Überleben von murinen B-Lymphozyten obligat [484]. Das Fehlen von BAFF, beispielsweise in BAFF-defizienten Mäusen, führt zu einem nahezu kompletten Verlust von folliculären B-Zellen und

Marginalzonen-B-Zellen [484]. Auch die Ausreifung von B-Zellvorstufen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen unterbleibt beim Fehlen von BAFF [484].

Bei den Patienten der hier vorgestellten Arbeit, wurde daher gesondert auch die Expression von BAFF untersucht, welche zu den gleichen Zeitpunkten analysiert wurde, wie die bereits beschriebenen Zytokine. Es zeigt sich hierbei bei den Patienten 3, 5 und 6 keine Veränderung der BAFF-Expression verglichen mit gesunden Probanden. Bei den Patienten 1 und 2 zeigt sich eine milde um den Faktor 0,5 erhöhte Expression von BAFF in Woche 5 bzw. Woche 4 nach der haploidenten Transplantation. Bei Patient 4 zeigt sich eine ebenfalls leicht erhöhte BAFF-Expression um den Faktor 0,5 in Woche 3. Lediglich bei Patient 7 kann eine 1,9-fache Erhöhung der BAFF-Expression in Woche 2 und eine 0,9-fache Erhöhung der BAFF-Expression in Woche 5 nach der haploidenten Stammzelltransplantation beobachtet werden. Zusammenfassend spielt die BAFF-Expression bei den 7 untersuchten Patienten in den ersten fünf Wochen nach der haploidenten Stammzelltransplantation eine untergeordnete Rolle. Insbesondere in den Wochen 2 und 3, in denen durch die vorangegangenen Experimente Antikörper-produzierende Zellen nachgewiesen wurden, scheint BAFF keine Rolle zu spielen. Es dominieren Inflammations-assoziierte Zytokine.

### **5.7. Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellregeneration**

Wie im Kapitel Einleitung ausführlich dargestellt, erfolgt die Entwicklung der B-Lymphozyten aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark [2]. Hierbei entwickelt sich aus der hämatopoetischen Stammzelle zunächst die Pro-B-Zelle, welche CD19, CD34 und CD38 an ihrer Oberfläche exprimiert und durch somatische Rekombination eine Neuordnung der schweren Kette des zu produzierenden Antikörpers ermöglicht [86,87]. Aus der Pro-B-Zelle entsteht die Prä-B-Zelle, welche die Oberflächenmarker CD19, CD20, CD10 und CD38 trägt und die Umordnung der leichten Kette des zu produzierenden Antikörpers zur

Aufgabe hat [86,87]. Nachfolgend befindet sich die entstandene Zelle im sogenannten unreifen Stadium, welches durch die Expression eines kompletten B-Zell-Rezeptormoleküls vom IgM-Typ auf der Oberfläche gekennzeichnet ist [86,87]. Als transitionale B-Zelle, welche CD19, CD20 und CD38 auf ihrer Oberfläche exprimiert, verlässt die unreife B-Zelle das Knochenmark und differenziert - zumindest in der Maus - und dem Einfluss von BAFF weiter zu einer reifen B-Zelle [86,87]. Die reife, aber naive B-Zelle erreicht durch alternatives Spleißen, dass zusätzlich auch IgD-Rezeptoren gebildet werden und kommt mit in ihrer Umgebung befindlichen Antigenen in Kontakt [86,87]. Reife, naive B-Zellen, die ausschließlich Fremdantigene erkennen, wandern weiter in lymphatische Organe, wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark und differenzieren dort weiter zu B1-B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen, welche überwiegend T-Zell-unabhängig, unter dem Einfluss von dendritischen Zellen aktiviert werden, oder aber zu folliculären B-Zellen, welche in ihrer weiteren Entwicklung T-Zell-abhängig sind und durch somatische Hypermutation und Antigen-gesteuerte Selektion zu hochaffinen, langlebenden Plasmazellen und B-Gedächtnis-Zellen werden [93]. B1-B-Zellen lassen sich in B1a-Zellen und B1b-Zellen unterteilen.

B1a-Zellen sind in ihrer Entwicklung T-Zell-unabhängig, sie durchlaufen keinen Antikörperklassenwechsel und bilden keine Gedächtniszellen aus [94]. B1a-Zellen produzieren überwiegend IgM-Antikörper und selten auch IgG-Antikörper der Subklasse 3 [94]. Nach Griffin et al. besitzen B1a-Lymphozyten den Phänotyp CD20+ CD27+ CD43+ CD70- und CD5+ [105]. B1b-Lymphozyten sind CD20+ CD27+ CD43+ CD70- und CD5-; sie sind im Gegensatz zu B1a-Zellen in der Lage auch Gedächtniszellen auszubilden und zeigen somit viele funktionelle Ähnlichkeiten zu den folliculären B-Lymphozyten [105]. B1a- und B1b-Lymphozyten unterscheiden sich außerdem in der Expression des Plasmazellmarkers CD138 [105]. Reife Plasmazellen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD19, CD38 und CD138 und produzieren hochaffine Antikörper [90]. B-Gedächtniszellen, welche CD19, CD20, CD38 und CD27 an ihrer Oberfläche exprimieren, verbleiben hauptsächlich in der Milz [89].

In der hier vorgelegten Arbeit zeigt sich bei Patient 1 bereits 14 Tage nach der haploidenten Stammzelltransplantation eine Lineage-negative CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation von 12 %, bei einer insgesamt jedoch niedrigen Leukozytenzahl. Diese Zellen können hier nicht weiter charakterisiert werden. Die übrigen Zellen sind CD19<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> und entsprechen somit am ehesten einer Lin<sup>-</sup> „unreifen“ Zellpopulation. Der Anteil der CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation steigt im Verlauf an Tag 21 nach der haploidenten Stammzelltransplantation auf 87,6 % an und fällt anschließend wieder ab. Nach 62 Tagen ist erstmals eine „reifere“ CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation zu erkennen. Bei Patient 2 zeigt sich bereits an Tag 8 nach der haploidenten Stammzelltransplantation eine CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation mit 66,6 %, welche an Tag 15 auf 79,5 % ansteigt und im Verlauf wieder abfällt. CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellen lassen sich ab Tag 36 nach der Transplantation mit 16,4 % nachweisen. Bei Patient 3 zeigt sich in den ersten beiden Wochen nach der haploidenten Transplantation überwiegend eine „unreife“ CD19<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> Zellpopulation. Die CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation ist an Tag 14 nach der Transplantation erstmals mit 1,4 % apparent und steigt im Verlauf an Tag 21 zunächst auf 74 % an, um anschließend wieder abzufallen. Eine CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Population lässt sich erstmals nach 42 Tagen nach der Transplantation erkennen. Bei Patient 4 ist bereits 7 Tage *post transplantationem* eine CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation mit 4,1 % nachweisbar. Auch bei Patient 4 steigt diese Population auf 20 % an Tag 19 an. CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellen sind erst später erkennbar. Bei Patient 5 ist die CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation mit einem Maximum von 73 % an Tag 23 detektierbar. CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellen zeigen sich in sehr geringer Anzahl (0,6 %) ab Tag 23 und bleiben auch im Verlauf bis zu 27 Wochen nach der Transplantation niedrig exprimiert (bei 5,4 %). Dies ist im Vergleich zu den ersten 4 Patienten deutlich später und hängt möglicherweise mit der immunsuppressiven Therapie im Rahmen der GvHD bei Patient 5 zusammen. Bei Patient 6 zeigt sich bereits an Tag 12 nach der haploidenten Transplantation eine CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Population mit 13 %. Auch bei diesem Patienten steigt die CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Population im Verlauf an und beträgt an Tag 25 bereits 37 %. Im Vergleich zu den anderen Patienten wächst die CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation bis an Tag 209 auf 97,8 %

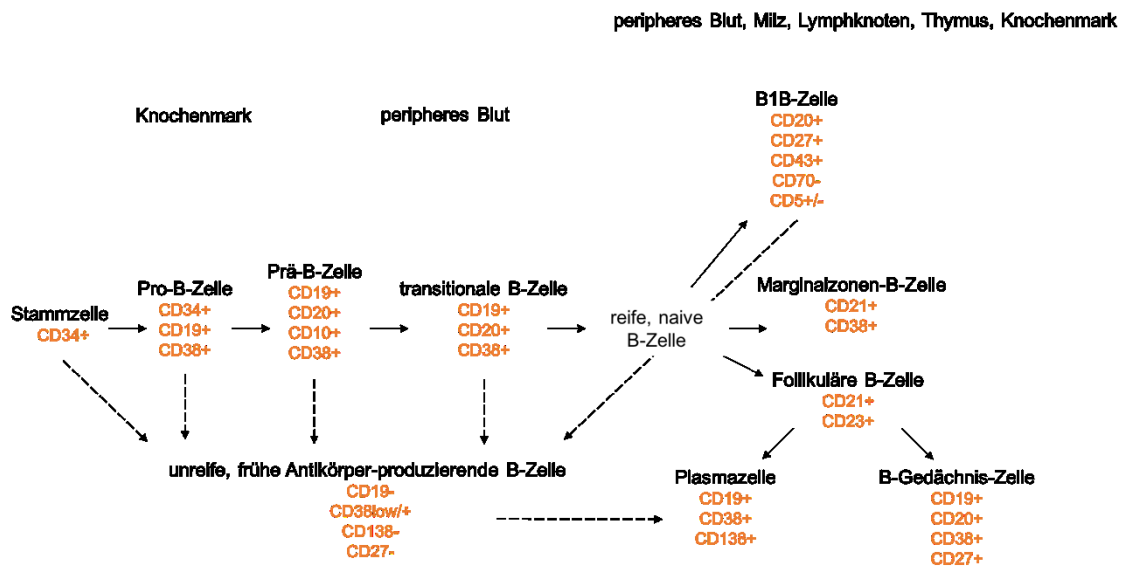
aller Lin- PMBCs weiter an. Es zeigen sich jedoch in diesem Zeitraum keine CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellen. Möglicherweise ist bei Patient 6 aufgrund der Rituximabgabe im Rahmen der PTLD ein Ausreifungsstopp der B-Lymphozyten zu erkennen und/oder es lässt sich die Effektivität der Rituximab-vermittelten Depletion reifer B-Zellen nachweisen. Bei Patient 7 liegt der Anteil der CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellen an Tag 7 bei 3 % und an Tag 14 bei 8 %. Der „reifere“ CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> Phänotyp zeigt sich bei Patient 7 nach 42 Tagen nach der haploidenten Transplantation mit 4 %.

Zusammenfassend zeigt sich somit bei allen 7 Patienten eine frühe CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation, welche zeitlich signifikant mit dem Auftreten der IgA-, IgG- und IgM-exprimierenden Zellen im Elispot korreliert. Dahingegen korreliert das Auftreten der IgA-, IgG- und IgM-exprimierenden Zellen im Elispot nicht mit dem Auftreten der Zellen, welche den klassischen Plasmazellphänotyp CD19<sup>+</sup> CD38<sup>low/+</sup> aufweisen. Bei Patient 1 konnten aufgrund einer ausreichenden Probenmenge zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Die vorbeschriebene Lineage-negative CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation zeigt sich CD27<sup>-</sup> und CD138<sup>-</sup>, so dass die Annahme einer Antikörper-produzierenden Zellpopulation, welche keine klassischen Plasmazellmarker exprimiert, weiter untermauert wird. Die beschriebene CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation weist außerdem eine unterschiedliche Zellgröße mit teilweise sehr großen Zellen auf, was möglicherweise zusätzlich ihren „unreifen“ oder „blastären“ Charakter unterstreicht. Abschließend wurden bei Patient 1 auch zytoplasmatische Färbungen gegen IgA (icIgA), IgG (icIgG) und IgM (icIgM) durchgeführt, um eine Korrelation zwischen der beschriebenen CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> Zellpopulation und einer Immunglobulinexpression herzustellen. Diese Färbung zeigt, dass die größte Population der Immunglobulin-exprimierenden Zellen (mit 90 - 95 %) den beschriebenen CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen entspricht.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich hier um eine frühe, bereits 2 bis 3 Wochen nach der haploidenten Stammzelltransplantation auftretende, Immunglobulin-produzierende Zellpopulation handelt, die keinen klassischen Plasmazellphänotyp aufweist. Eine Zuordnung dieser Zellen zu B1-

Zellen kann nicht erfolgen, da die beschriebene Zellpopulation im Vergleich zu „klassischen“ B1-B-Zellen CD19<sup>-</sup> und CD27<sup>-</sup> ist.

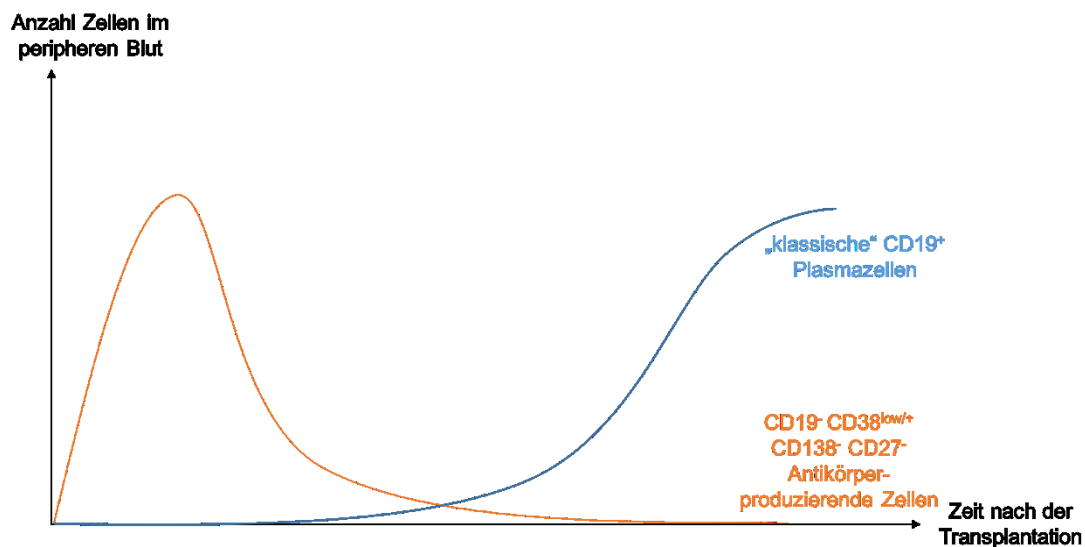
Abbildung 65 zeigt die hypothetische Entstehung dieser CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen im Rahmen der normalen B-Zell-Entwicklung anhand der dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit.



**Abbildung 65: Hypothetische Entstehung der CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen im Rahmen der B-Zell-Entwicklung (in der Literatur bekannte Ergebnisse modifiziert nach 437 und 484).**

Bekannte Entwicklungswege sind mit durchgängigen Pfeilen dargestellt, hypothetische Entwicklungswege mit gestrichelten Pfeilen. Die CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen könnten sich direkt aus Stammzellen, aus Pro-B-Zellen, aus Prä-B-Zellen oder aber auch aus transitionalen B-Zellen ableiten. Möglicherweise findet auch eine Entwicklung dieser Zellen aus B1-B-Zellen statt. Aus den CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen wiederum könnten sich reife, „richtige“ Plasmazellen entwickeln.

Die unten stehende Abbildung 66 zeigt den möglichen zeitlichen Verlauf der CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen sowie der „klassischen“ CD19<sup>+</sup> Plasmazellen nach der haploidenten Transplantation.



**Abbildung 66:** Möglicher zeitlicher Verlauf der CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen sowie der „klassischen“ CD19<sup>+</sup> Plasmazellen nach der haploidenten Transplantation.

Während die frühen CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, Antikörper-produzierenden Zellen insbesondere in den ersten Wochen nach der haploidenten Transplantation vorherrschend sind und über den zeitlichen Verlauf abnehmen, treten „klassische“ CD19<sup>+</sup> Plasmazellen erst nach einigen Wochen nach der Transplantation auf und erreichen dann stabile Spiegel im peripheren Blut.

## 5.8. Nachweis der Spender-Spezifität der gefundenen Zellpopulation

Um zu untersuchen, ob die gefundene frühe, Antikörper-produzierende, CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellpopulation vom Spender und nicht vom Empfänger stammt, wurden Spender-spezifische HLA-Oberflächenmarker untersucht [336,338]. Dabei zeigte sich bei allen 7 Patienten innerhalb der ersten 5 Wochen nach der haploidenten Transplantation eine fast ausschließliche HLA-Signatur des Spenders. Diese lag in der ersten Woche nach der Transplantation noch zwischen 89 % und 99 %, jedoch bereits ab der zweiten Woche nach der Transplantation zwischen 97 % und 99 %. Außerdem erfolgte eine Auswertung der Chimärismusanalysen der haplotransplantierten Patienten [504]. Alle 7 Patienten zeigen in Woche 2 nach der haploidenten Transplantation, in der die ersten Antikörper-produzierenden Zellen nachweisbar sind, einen vollständigen Donochimärismus. Durch den Nachweis der Spendergenese der (mutmaßlich lymphozytären) Zellpopulation im HLA-FACS und den Nachweis eines vollständigen Donochimärismus bei allen



---

Patienten in Woche 2 nach der Transplantation, kann bekräftigt werden, dass es sich bei den frühen Antikörper-produzierenden Zellen um neu entstandene CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD138<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> Zellen des Spenders handelt.

## 6. Zusammenfassung

Die Immunrekonstitution nach einer allogenen Stammzelltransplantation hat größten Einfluss auf das Auftreten infektiologischer Komplikationen, die Auftretenswahrscheinlichkeit einer Alloreaktivität wie der GvHD und des GvM-Effekts, eines Krankheitsrezidivs und somit auch auf die Morbidität und Mortalität eines transplantierten Patienten. Daten aus früheren Studien zeigen übereinstimmend eine frühe Immunrekonstitution von Zellen des angeborenen Immunsystems, welches Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen umfasst, während Zellen des adaptiven Immunsystems, welches insbesondere T-Lymphozyten und B-Lymphozyten beinhaltet, erst Monate nach einer allogenen Stammzelltransplantation regenerieren. Vor diesem Hintergrund, ermöglicht eine CD3+/CD19+ depletierte haploidente Stammzelltransplantation eine Beobachtung der Lymphopoese *in vivo* ohne den Einfluss von Immunsuppressiva.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rekonstitution Antikörper-produzierender Zellen bei Patienten innerhalb des ersten Jahres nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu untersuchen, wobei der Fokus der Untersuchung insbesondere auf den ersten Wochen nach der Transplantation lag. Die Fragestellung beruht auf der Beobachtung, dass die Entstehung reifer Plasmazellen erst etwa ein Jahr nach der Transplantation in der Literatur beschrieben ist, Antikörper zur Abwehr von Infekten jedoch bereits vorher benötigt werden und auch vorhanden sind.

Insgesamt konnten bei sieben haploident transplantierten Patienten Personenbezogene Daten erhoben werden und Proben gewonnen werden. Das Patientenkollektiv unterscheidet sich hinsichtlich Alter bei der Erstdiagnose, Geschlecht, hämatologischer Grunderkrankung, Vortherapien und Zeitpunkt der haploidenten Transplantation erheblich.

Dennoch ergibt sich bei allen sieben analysierten Patienten ein sehr einheitliches Bild bezüglich der erhobenen Ergebnisse. Alle Patienten zeigen ab Tag 14 nach der haploidenten Transplantation eine signifikante Regeneration

der Leukopoese, welche hauptsächlich auf der Regeneration der neutrophilen Granulozyten beruht. Der Beginn der Lymphopoese hingegen kann frühestens nach 28 Tagen beobachtet werden, wobei eine Normalisierung der Lymphozytenwerte im Durchschnitt nach 270 Tagen nach der Transplantation erreicht wird. Trotz der verzögerten Lymphopoese kann bei allen analysierten Patienten das Auftreten Immunglobulin-exprimierender und -produzierender Zellen bereits nach 10 bis 30 Tagen nach der haploidenten Stammzelltransplantation beobachtet werden. Diese Zellen produzieren und exprimieren die Immunglobulinsubklassen IgA, IgG und IgM. Auch im Serum der Patienten kann in diesem Zeitraum ein Anstieg der Konzentrationen für lösliches IgA, IgG und IgM beobachtet werden. Gleichzeitig sind in diesem Zeitraum insbesondere die Expressionslevel Inflammations-assoziiierter Zytokine erhöht, wohingegen Zytokine, die klassischerweise eine Rolle in der B-Zell-Differenzierung und B-Zell-Proliferation spielen, allen voran BAFF, eine untergeordnete Rolle spielen. Die identifizierte Zellpopulation, die mit dem Auftretenden der Antikörper-produzierenden Zellen signifikant korreliert und diesen vermutlich auch entspricht, zeigt den Phänotyp CD19<sup>-</sup> CD38<sup>low/+</sup> CD27<sup>-</sup> und CD138<sup>-</sup>. Sie lässt sich somit weder klassischen Plasmazellen noch „unreiferen“ B1-B-Zellen zuordnen. Die gefundenen Zellen sind jedoch eindeutig aus dem Transplantat des Spenders hervorgegangen.

Insgesamt kann somit eine frühe, bereits 2 bis 3 Wochen nach der haploidenten Stammzelltransplantation auftretende, Immunglobulin-produzierende Zellpopulation nachgewiesen werden, die einen bisher unbekanntem Phänotyp aufweist und möglicherweise einen bislang nicht beschriebenen Zwischenschritt in der Entwicklung der B-Lymphozyten darstellt. Zudem kann spekuliert werden, dass es sich bei diesen frühen Immunglobulin-sezernierenden Zellen um Elemente des angeborenen und weniger des adaptiven Immunsystems handeln könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Gadner G, Niemeyer, Ritter, Sykora und Welte. Kapitel Physiologie der Hämatopoese. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie.
2. Schmidt L. Physiologie des Menschen;30. Auflage:524.
3. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 2007;25:745-785.
4. Mirantes C, Passegue E, Pietras EM. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res* 2014;329:248-254.
5. Lympri S, Ferraro F, Scadden DT. The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured? *Ann N Y Acad Sci* 2010;1192:12-18.
6. Goodell MA. Stem-cell "plasticity": befuddled by the muddle. *Curr Opin Hematol* 2003;10:208-213.
7. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res* 2003;34:600-606.
8. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002;3:323-328.
9. Tisdale JF, Dunbar CE. Plasticity and hematopoiesis: Circe's transforming potion? *Curr Opin Hematol* 2002;9:268-273.
10. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 2009;113:155-160.
11. Papayannopoulou T, Scadden DT. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood* 2008;111:3923-3930.
12. Tarasova A, Haylock D, Winkler D. Principal signalling complexes in haematopoiesis: structural aspects and mimetic discovery. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:231-253.
13. Lotem J, Sachs L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene* 2002;21:3284-3294.
14. Aiuti A, Friedrich C, Sieff CA, Gutierrez-Ramos JC. Identification of distinct elements of the stromal microenvironment that control human hematopoietic stem/progenitor cell growth and differentiation. *Exp Hematol* 1998;26:143-157.
15. Manesso E, Teles J, Bryder D, Peterson C. Dynamical modelling of haematopoiesis: an integrated view over the system in homeostasis and under perturbation. *J R Soc Interface* 2013;10:20120817.
16. Maloy M, Maloy F, Jakobsen P, Olav Brandsdal B. Dynamic self-organisation of haematopoiesis and (a)symmetric cell division. *J Theor Biol* 2017;414:147-164.
17. Faurshou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003;5:1317-1327.
18. Ruter A, Gunzer U. Differentiation of granulocytes in Pappenheim stained blood cell smears using standardized cytophotometric analysis. *Blut* 1984;48:307-320.

19. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012;30:459-489.
20. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 2010;10:1325-1334.
21. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:3813-3827.
22. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin Chim Acta* 2016;457:46-53.
23. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013;13:9-22.
24. Steinbach KH, Schick P, Trepel F, et al. . Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut* 1979;39:27-38.
25. Lamouse-Smith ES, Furuta GT. Eosinophils in the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep* 2006;8:390-395.
26. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:101.
27. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:117-129.
28. Sakkal S, Miller S, Apostolopoulos V, Nurgali K. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr Med Chem* 2016;23:650-666.
29. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood* 2012;120:3882-3890.
30. Schwartz C, Eberle JU, Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur J Pharmacol* 2016;778:90-95.
31. Sasaki H, Kurotaki D, Tamura T. Regulation of basophil and mast cell development by transcription factors. *Allergol Int* 2016;65:127-134.
32. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. . Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325:612-616.
33. Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. . Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 2014;14:571-578.
34. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res* 2013;112:1624-1633.
35. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. . Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74-80.
36. Löffler P, Heinrich. *Immunsystem. Biochemie und Pathobiochemie*;8. Auflage:1109.
37. Baumann H. BP, Diem H., Gassmann W. . Lymphocyte morphology in the peripheral blood film: proposal of a revised nomenclature and systematics *J Lab Med* 2011;35:261-270.
38. Gruyter D. Lymphocyte morphology in the peripheral blood film: proposal of a revised nomenclature and systematics. *Journal of Laboratory Medicine* 2011:Heft 5.

39. Labrecque N, Cermakian N. Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms* 2015;30:277-290.
40. Calder PC. Feeding the immune system. *Proc Nutr Soc* 2013;72:299-309.
41. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:1274-1281.
42. Litman GW, Cooper MD. Why study the evolution of immunity? *Nat Immunol* 2007;8:547-548.
43. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
44. Hato T, Dagher PC. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:1459-1469.
45. Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* 2010;35:127-160.
46. Nakayama S, Mold C, Gewurz H, du Clos TW. Opsonic properties of C-reactive protein in vivo. *J Immunol* 1982;128:2435-2438.
47. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7.
48. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39:1003-1018.
49. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49-62.
50. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785-797.
51. Khan MA, Palaniyar N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci Rep* 2017;7:41749.
52. Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol* 2014;426:1246-1264.
53. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42:791-798.
54. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-384.
55. Hoebe K, Jiang Z, Tabeta K, et al. . Genetic analysis of innate immunity. *Adv Immunol* 2006;91:175-226.
56. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
57. Mohammad Hosseini A, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Adv Pharm Bull* 2015;5:605-614.
58. Patidar A, Selvaraj S, Sarode A, Chauhan P, Chattopadhyay D, Saha B. DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor. *Cytokine* 2018;104:114-123.
59. Boehm T, Swann JB. Origin and evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Anim Biosci* 2014;2:259-283.

60. Yin L, Scott-Browne J, Kappler JW, Gapin L, Marrack P. T cells and their eons-old obsession with MHC. *Immunol Rev* 2012;250:49-60.
61. Birnbaum ME, Berry R, Hsiao YS, et al. . Molecular architecture of the alphabeta T cell receptor-CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:17576-17581.
62. Tanaka H, Taniuchi I. The CD4/CD8 lineages: central decisions and peripheral modifications for T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014;373:113-129.
63. Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014;62:449-458.
64. Poluektov YO, Kim A, Sadegh-Nasseri S. HLA-DO and Its Role in MHC Class II Antigen Presentation. *Front Immunol* 2013;4:260.
65. Kaye J, Hsu ML, Sauron ME, Jameson SC, Gascoigne NR, Hedrick SM. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* 1989;341:746-749.
66. Bunbury A, Potalicchio I, Maitra R, Santambrogio L. Functional analysis of monocyte MHC class II compartments. *Faseb j* 2009;23:164-171.
67. Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, Inoko H. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol Rev* 2002;190:95-122.
68. Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 2003;110:163-169.
69. Lo WL, Allen PM. Self-peptides in TCR repertoire selection and peripheral T cell function. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014;373:49-67.
70. Good RA, Dalmaso AP, Martinez C, Archer OK, Pierce JC, Papermaster BW. The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J Exp Med* 1962;116:773-796.
71. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol* 2015;97:31-38.
72. Sprent J. Proving negative selection in the thymus. *J Immunol* 2005;174:3841-3842.
73. Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep* 2007;8:1142-1148.
74. Vieira Braga FA, Hertoghs KM, van Lier RA, van Gisbergen KP. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8(+) T cells, CD4(+) T cells, and NK cells. *Eur J Immunol* 2015;45:2433-2445.
75. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol* 2016;16:102-111.
76. Wootla B, Denic A, Rodriguez M. Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods Mol Biol* 2014;1060:79-110.
77. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 1994;31:169-217.
78. Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol* 2012;188:939-945.

79. Biburger M, Lux A, Nimmerjahn F. How immunoglobulin G antibodies kill target cells: revisiting an old paradigm. *Adv Immunol* 2014;124:67-94.
80. Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol* 2013;4:222.
81. Wu LC, Zarrin AA. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;14:247-259.
82. Edholm ES, Bengten E, Wilson M. Insights into the function of IgD. *Dev Comp Immunol* 2011;35:1309-1316.
83. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
84. Baranov OK, Eppel MS. [Genetic bases of antibody diversity]. *Genetika* 1984;20:1397-1413.
85. Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. *Methods Mol Biol* 2004;271:149-159.
86. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:959-971.
87. Reth M, Nielsen P. Signaling circuits in early B-cell development. *Adv Immunol* 2014;122:129-175.
88. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* 2012;1:36.
89. Deenick EK, Avery DT, Chan A, et al. . Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med* 2013;210:2739-2753.
90. O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2004;121:254-263.
91. Hwang JK, Alt FW, Yeap LS. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr* 2015;3:Mdna3-0037-2014.
92. Takemori T, Kaji T, Takahashi Y, Shimoda M, Rajewsky K. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol* 2014;44:1258-1264.
93. McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:354-361.
94. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2008;20:149-157.
95. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 1985;161:1554-1568.
96. Hastings WD, Tumang JR, Behrens TW, Rothstein TL. Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics. *Eur J Immunol* 2006;36:1114-1123.
97. Berberich S, Forster R, Pabst O. The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. *Blood* 2007;109:4627-4634.
98. Ansel KM, Harris RB, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 2002;16:67-76.



99. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 2003;3:63-72.
100. Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993;11:501-538.
101. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur J Immunol* 1986;16:450-456.
102. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2001;1:177-186.
103. Hardy RR. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. *Curr Opin Immunol* 2006;18:547-555.
104. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* 2011;208:67-80.
105. Griffin DO, Rothstein TL. Human b1 cell frequency: isolation and analysis of human b1 cells. *Front Immunol* 2012;3:122.
106. Ghosn EE, Yang Y, Tung J, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5195-5200.
107. Tung JW, Mrazek MD, Yang Y, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6293-6298.
108. Lalor PA, Stall AM, Adams S, Herzenberg LA. Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur J Immunol* 1989;19:501-506.
109. Roy B, Shukla S, Lyszkiewicz M, et al. . Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells. *Mol Immunol* 2009;46:1613-1619.
110. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 2004;21:379-390.
111. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 2007;7:213-219.
112. Mackay F, Figgitt WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol Rev* 2010;237:205-225.
113. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* 2010;28:21-55.
114. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. . An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001;293:2111-2114.
115. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, et al. . BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 2003;112:286-297.
116. Steri M, Orru V, Idda ML, et al. . Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med* 2017;376:1615-1626.
117. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 2006;18:263-275.

118. Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J Immunol Res* 2015;2015:247426.
119. Peng H, Tian Z. NK cell trafficking in health and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014;47:119-127.
120. Kadri N, Wagner AK, Ganesan S, et al. . Dynamic Regulation of NK Cell Responsiveness. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016;395:95-114.
121. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. . Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42:501-510.
122. Dudenredaktion WRd. Das große Fremdwörterbuch. Duden 2007;4:806.
123. A. Nennecke AW, K. Kraywinkel. Inzidenz und Überleben bei Leukämien in Deutschland nach aktuellen standardisierten Kategorien. *Bundesgesundheitsblatt* 2014;57:93-102.
124. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol* 2001;112:282-292.
125. Naegeli O. Über rothes Knochenmark und Myeloblasten. *Dtsch Med Wochenschr* 1900;26:287.
126. Pschyrembel W DO. Klinisches Wörterbuch. Pschyrembel 2004;260. Auflage:1034.
127. H. Renz-Polster SK, J. Braun. Leukämien. 2004.
128. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. . Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724-3734.
129. Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, et al. . Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:1174-1182.
130. Fritz A PC, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S , editors. International Classification of Diseases for Oncology, third edition. Geneva. World Health Organization 2000.
131. Swerdlow SH CE, Harris NL et al. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon. World Health Organization 2008.
132. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. . The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-2405.
133. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;368:1894-1907.
134. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. . Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009;113:4179-4187.
135. Kamada N, Tanaka K, Kasegawa A. Chromosome aberrations and transforming genes in leukemic and non-leukemic patients with a history of atomic bomb exposure. *Princess Takamatsu Symp* 1987;18:125-134.
136. Kuznetsova IS, Labutina EV, Hunter N. Radiation Risks of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma Incidence in the Mayak Cohort: 1948-2004. *PLoS One* 2016;11:e0162710.

137. Davies SM. Therapy-related leukemia associated with alkylating agents. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:536-540.
138. Sandoval C, Pui CH, Bowman LC, et al. . Secondary acute myeloid leukemia in children previously treated with alkylating agents, intercalating topoisomerase II inhibitors, and irradiation. *J Clin Oncol* 1993;11:1039-1045.
139. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, et al. . Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 2009;113:1906-1908.
140. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. . International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
141. Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:29-37.
142. Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:17-31.
143. Downton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood* 1985;65:557-563.
144. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. . Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:2488-2498.
145. Xie M, Lu C, Wang J, et al. . Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014;20:1472-1478.
146. Falini B, Tiacci E, Martelli MP, Ascani S, Pileri SA. New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues. *Discov Med* 2010;10:281-292.
147. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016;127:29-41.
148. Griffith W, Lewontin, Gelbart, Suzuki, Miller. Introduction to genetic analysis. *An Introduction to Genetic Analysis*. Vol 7th Edition: New York: W. H. Freeman; 2000.
149. Yashiro-Ohtani Y, Wang H, Zang C, et al. . Long-range enhancer activity determines Myc sensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E4946-4953.
150. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 2015;94 Suppl 2:S107-121.
151. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, et al. . The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 2013;27:2165-2176.
152. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. . Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993;92:1736-1744.
153. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med* 2015;4:460-478.

154. Foucar K, Anastasi J. Acute Myeloid Leukemia With Recurrent Cytogenetic Abnormalities. *Am J Clin Pathol* 2015;144:6-18.
155. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, et al. . PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8283-8288.
156. Ehninger G. LH, Berdel E. Akute myeloische Leukämie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose. Deutscher Ärzteverlag 2008:14.
157. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37-50.
158. Ng K, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A. Xist and the order of silencing. *EMBO Rep* 2007;8:34-39.
159. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2005;104:788-793.
160. Bakst RL, Tallman MS, Douer D, Yahalom J. How I treat extramedullary acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;118:3785-3793.
161. Shihadeh F, Reed V, Faderl S, et al. . Cytogenetic profile of patients with acute myeloid leukemia and central nervous system disease. *Cancer* 2012;118:112-117.
162. Arber DA VJ, Brunning RD, et al. . Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. Geneva, Switzerland. WHO PRESS 2008.
163. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051-1062.
164. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. *Br J Haematol* 1992;80:62-68.
165. Repp R, Schaekel U, Helm G, et al. . Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;53:11-19.
166. Ben Salah N, El Borgi W, Chelbi A, et al. . [Lineage assignment in acute leukemia: confrontation between cytology and immunophenotyping]. *Pathol Biol (Paris)* 2014;62:345-347.
167. Paulsson K. Genomic heterogeneity in acute leukemia. *Cytogenet Genome Res* 2013;139:174-180.
168. Chung SS. Genetic mutations in acute myeloid leukemia that influence clinical decisions. *Curr Opin Hematol* 2014;21:87-94.
169. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. . Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002;100:4325-4336.
170. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. . Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424-447.

171. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. . The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001;98:1312-1320.
172. Coombs CC, Tavakkoli M, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J* 2015;5:e304.
173. Bret C, Viziteu E, Kassambara A, Moreaux J. Identifying high-risk adult AML patients: epigenetic and genetic risk factors and their implications for therapy. *Expert Rev Hematol* 2016;9:351-360.
174. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. . Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
175. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
176. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer* 1951;4:39-59.
177. Gee TS, Yu KP, Clarkson BD. Treatment of adult acute leukemia with arabinosylcytosine and thioguanine. *Cancer* 1969;23:1019-1032.
178. [Treatment of acute granulocytic leukemias with daunomycin]. *Eur J Cancer* 1969;5:339-342.
179. Clarkson BD. Acute myelocytic leukemia in adults. *Cancer* 1972;30:1572-1582.
180. Powles RL, Crowther D, Bateman CJ, et al. . Immunotherapy for acute myelogenous leukaemia. *Br J Cancer* 1973;28:365-376.
181. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. . Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-474.
182. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29:760-769.
183. Seval GC, Ozcan M. Treatment of Acute Myeloid Leukemia in Adolescent and Young Adult Patients. *J Clin Med* 2015;4:441-459.
184. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. . Myelodysplastic syndromes standardized response criteria: further definition. *Blood* 2001;98:1985.
185. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, et al. . Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2009;113:28-36.
186. Wiernik PH, Banks PL, Case DC, Jr., et al. . Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1992;79:313-319.

187. Stein E, Xie J, Duchesneau E, et al. . Cost Effectiveness of Midostaurin in the Treatment of Newly Diagnosed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia in the United States. *Pharmacoeconomics* 2019;37:239-253.
188. Fernandez HF. Allogeneic Transplantation for Unfavorable-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15 Suppl:S70-72.
189. Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, et al. . Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol* 1997;15:1767-1777.
190. Malik P, Cashen AF. Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Cancer Manag Res* 2014;6:53-61.
191. Mangan JK, Luger SM. Salvage therapy for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2011;2:73-82.
192. Thol F, Schlenk RF, Heuser M, Ganser A. How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* 2015;126:319-327.
193. How J, Sykes J, Minden MD, et al. . The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with relapsed acute myeloid leukemia and intermediate-risk cytogenetics. *Blood Cancer J* 2013;3:e116.
194. Wander SA, Levis MJ, Fathi AT. The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther Adv Hematol* 2014;5:65-77.
195. Zhou J, Bi C, Janakakumara JV, et al. . Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood* 2009;113:4052-4062.
196. Weisberg E, Barrett R, Liu Q, Stone R, Gray N, Griffin JD. FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug Resist Updat* 2009;12:81-89.
197. Inaba H, Rubnitz JE, Coustan-Smith E, et al. . Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with clofarabine and cytarabine in pediatric relapsed/refractory leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:3293-3300.
198. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, et al. . Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28:1856-1862.
199. Rollig C, Serve H, Huttmann A, et al. . Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1691-1699.
200. Pratz K, Levis M. Incorporating FLT3 inhibitors into acute myeloid leukemia treatment regimens. *Leuk Lymphoma* 2008;49:852-863.
201. Mathew NR, Baumgartner F, Braun L, et al. . Sorafenib promotes graft-versus-leukemia activity in mice and humans through IL-15 production in FLT3-ITD-mutant leukemia cells. *Nat Med* 2018;24:282-291.
202. Mulloy JC, Cancelas JA, Filippi MD, Kalfa TA, Guo F, Zheng Y. Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies. *Blood* 2010;115:936-947.
203. Erba HP, Othus M, Walter RB, et al. . Four different regimens of farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in older, untreated acute myeloid

- leukemia patients: North American Intergroup Phase II study SWOG S0432. *Leuk Res* 2014;38:329-333.
204. Thomas X, Elhamri M. Tipifarnib in the treatment of acute myeloid leukemia. *Biologics* 2007;1:415-424.
205. Ravoet C, Mineur P, Robin V, et al. . Farnesyl transferase inhibitor (lonafarnib) in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukaemia: a phase II study. *Ann Hematol* 2008;87:881-885.
206. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, et al. . A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2007;109:1387-1394.
207. Pfirrmann M, Ehninger G, Thiede C, et al. . Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukaemia: a post-hoc analysis of the AML96 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:207-214.
208. Pastore F, Dufour A, Benthous T, et al. . Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2014;32:1586-1594.
209. Verger E, Salamero M, Conill C. Can Karnofsky performance status be transformed to the Eastern Cooperative Oncology Group scoring scale and vice versa? *Eur J Cancer* 1992;28a:1328-1330.
210. Rollig C, Knop S, Bornhauser M. Multiple myeloma. *Lancet* 2015;385:2197-2208.
211. Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *Lancet* 2004;363:875-887.
212. Harousseau JL, Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2009;360:2645-2654.
213. Hochrechnung des Instituts für Krebsepidemiologie e.V., Lübeck für icd10: C90 auf Basis der Daten der Krebsregister BY, BR, HB, HH, MV, NI, NW [Internet]. 2013 -.
214. Turesson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O. Patterns of multiple myeloma during the past 5 decades: stable incidence rates for all age groups in the population but rapidly changing age distribution in the clinic. *Mayo Clin Proc* 2010;85:225-230.
215. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. . Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78:21-33.
216. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, et al. . Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood* 2010;116:5501-5506.
217. Shirley MH, Sayeed S, Barnes I, Finlayson A, Ali R. Incidence of haematological malignancies by ethnic group in England, 2001-7. *Br J Haematol* 2013;163:465-477.
218. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016;375:794-798.
219. Wallin A, Larsson SC. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer* 2011;47:1606-1615.

220. Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1479-1483.
221. Landgren O, Linet MS, McMaster ML, Gridley G, Hemminki K, Goldin LR. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 2006;118:3095-3098.
222. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 1982;69:323-328.
223. Erratum: Borderud SP, Li Y, Burkhalter JE, Sheffer CE and Ostroff JS. Electronic cigarette use among patients with cancer: Characteristics of electronic cigarette users and their smoking cessation outcomes. *Cancer*. doi: 10.1002/ cncr.28811. *Cancer* 2015;121:800.
224. Satta G, Dubois S, Perrotta C, et al. . [Risk of multiple myeloma and agricultural exposures]. *G Ital Med Lav Ergon* 2011;33:106-107.
225. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009;113:5418-5422.
226. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. . Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-5417.
227. Kyle RA, San-Miguel JF, Mateos MV, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;28:775-790.
228. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. . Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-1369.
229. Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, Kamihira S, Tomonaga M. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: study of 52,802 persons in Nagasaki City, Japan. *Mayo Clin Proc* 2007;82:1474-1479.
230. Singh J, Dudley AW, Jr., Kulig KA. Increased incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance in blacks and its age-related differences with whites on the basis of a study of 397 men and one woman in a hospital setting. *J Lab Clin Med* 1990;116:785-789.
231. Zingone A, Kuehl WM. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. *Semin Hematol* 2011;48:4-12.
232. Kariyawan CC, Hughes DA, Jayatilake MM, Mehta AB. Multiple myeloma: causes and consequences of delay in diagnosis. *Qjm* 2007;100:635-640.
233. Friese CR, Abel GA, Magazu LS, Neville BA, Richardson LC, Earle CC. Diagnostic delay and complications for older adults with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2009;50:392-400.



234. Ramsenthaler C, Kane P, Gao W, et al. . Prevalence of symptoms in patients with multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Haematol* 2016;97:416-429.
235. Dimopoulos MA, Kastiris E, Rosinol L, Blade J, Ludwig H. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia* 2008;22:1485-1493.
236. El-Achkar TM, Wu XR. Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander, or protector? *Am J Kidney Dis* 2012;59:452-461.
237. Risch L, Lhotta K, Meier D, Medina-Escobar P, Nydegger UE, Risch M. The serum uromodulin level is associated with kidney function. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1755-1761.
238. Garimella PS, Bartz TM, Ix JH, et al. . Urinary Uromodulin and Risk of Urinary Tract Infections: The Cardiovascular Health Study. *Am J Kidney Dis* 2017;69:744-751.
239. Batuman V. The pathogenesis of acute kidney impairment in patients with multiple myeloma. *Adv Chronic Kidney Dis* 2012;19:282-286.
240. Walther C, Podoll AS, Finkel KW. Treatment of acute kidney injury with cast nephropathy. *Clin Nephrol* 2014;82:1-6.
241. Dumas G, Merceron S, Zafrani L, et al. . [Hyperviscosity syndrome]. *Rev Med Interne* 2015;36:588-595.
242. Mehta J, Singhal S. Hyperviscosity syndrome in plasma cell dyscrasias. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:467-471.
243. Kourelis TV, Kumar SK, Gertz MA, et al. . Coexistent multiple myeloma or increased bone marrow plasma cells define equally high-risk populations in patients with immunoglobulin light chain amyloidosis. *J Clin Oncol* 2013;31:4319-4324.
244. Madan S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. . Clinical features and treatment response of light chain (AL) amyloidosis diagnosed in patients with previous diagnosis of multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2010;85:232-238.
245. Usmani SZ, Heuck C, Mitchell A, et al. . Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica* 2012;97:1761-1767.
246. Blade J, Fernandez de Larrea C, Rosinol L, Cibeira MT, Jimenez R, Powles R. Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *J Clin Oncol* 2011;29:3805-3812.
247. Schuster SR, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. . IgM multiple myeloma: disease definition, prognosis, and differentiation from Waldenstrom's macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2010;85:853-855.
248. Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Maniatis A, Alexanian R. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood* 2000;96:2037-2044.
249. Weber DM. Solitary bone and extramedullary plasmacytoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:373-376.

250. Finsinger P, Grammatico S, Chisini M, Piciocchi A, Foa R, Petrucci MT. Clinical features and prognostic factors in solitary plasmacytoma. *Br J Haematol* 2016;172:554-560.
251. Chamberlain MC, Glantz M. Myelomatous meningitis. *Cancer* 2008;112:1562-1567.
252. Grover SB, Dhar A. Imaging spectrum in sclerotic myelomas: an experience of three cases. *Eur Radiol* 2000;10:1828-1831.
253. Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2011;86:591-601.
254. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-757.
255. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. . Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011;117:4701-4705.
256. Smith A, Wisloff F, Samson D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* 2006;132:410-451.
257. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
258. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL, et al. . International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia* 2009;23:1545-1556.
259. Hillengass J, Delorme S. [Multiple myeloma: current recommendations for imaging]. *Radiologe* 2012;52:360-365.
260. Bartel TB, Haessler J, Brown TL, et al. . F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:2068-2076.
261. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al. . Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* 2011;118:5989-5995.
262. Sedaghat D, Zakir RM, Choe J, Klapholz M, Saric M. Cardiac amyloidosis in a patient with multiple myeloma: a case report and review of literature. *J Clin Ultrasound* 2009;37:179-184.
263. Enrico O, Gabriele B, Nadia C, et al. . Unexpected cardiotoxicity in haematological bortezomib treated patients. *Br J Haematol* 2007;138:396-397.
264. Stifter S, Babarovic E, Valkovic T, et al. . Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagn Pathol* 2010;5:30.
265. Hart AJ, Jagasia MH, Kim AS, Mosse CA, Savani BN, Kassim A. Minimal residual disease in myeloma: are we there yet? *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:1790-1799.
266. Fairfield H, Falank C, Avery L, Reagan MR. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1364:32-51.

267. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. . International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-2221.
268. Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR, et al. . A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia* 2007;21:529-534.
269. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. . A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012;26:349-355.
270. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36:842-854.
271. Hari PN, Zhang MJ, Roy V, et al. . Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia* 2009;23:1528-1534.
272. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. . International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-3420.
273. Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, et al. . Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia* 2013;27:711-717.
274. Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA, et al. . Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia* 2008;22:1933-1937.
275. Gopalakrishnan S, D'Souza A, Scott E, et al. . Revised International Staging System Is Predictive and Prognostic for Early Relapse (<24 months) after Autologous Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25:683-688.
276. Kaufman GP, Gertz MA, Dispenzieri A, et al. . Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia* 2016;30:633-639.
277. Bataille R, Annweiler C, Beauchet O. Multiple myeloma international staging system: "staging" or simply "aging" system? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13:635-637.
278. Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* 2013;121:884-892.
279. Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. . Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol* 2013;31:3279-3287.

280. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. . International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-548.
281. Landgren O, Iskander K. Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes. *J Intern Med* 2017;281:365-382.
282. Palumbo A, Gay F, Cavallo F, et al. . Continuous Therapy Versus Fixed Duration of Therapy in Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2015;33:3459-3466.
283. Moehler T. Clinical experience with thalidomide and lenalidomide in multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12:372-390.
284. Berenson A, Vardanyan S, David M, et al. . Outcomes of multiple myeloma patients receiving bortezomib, lenalidomide, and carfilzomib. *Ann Hematol* 2017;96:449-459.
285. van Rhee F, Szymonifka J, Anaissie E, et al. . Total Therapy 3 for multiple myeloma: prognostic implications of cumulative dosing and premature discontinuation of VTD maintenance components, bortezomib, thalidomide, and dexamethasone, relevant to all phases of therapy. *Blood* 2010;116:1220-1227.
286. Oakervee H, Popat R, Cavenagh JD. Use of bortezomib as induction therapy prior to stem cell transplantation in frontline treatment of multiple myeloma: impact on stem cell harvesting and engraftment. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1910-1921.
287. Curran MP, McKeage K. Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma. *Drugs* 2009;69:859-888.
288. San-Miguel JF, Richardson PG, Sonneveld P, et al. . Efficacy and safety of bortezomib in patients with renal impairment: results from the APEX phase 3 study. *Leukemia* 2008;22:842-849.
289. Huang H, Zhou L, Peng L, Fu W, Zhang C, Hou J. Bortezomib-thalidomide-based regimens improved clinical outcomes without increasing toxicity as induction treatment for untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized controlled trials. *Leuk Res* 2014;38:1048-1054.
290. E. M. Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage 2008.
291. Zweegman S, van der Holt B, Mellqvist UH, et al. . Melphalan, prednisone, and lenalidomide versus melphalan, prednisone, and thalidomide in untreated multiple myeloma. *Blood* 2016;127:1109-1116.
292. Kervoelen C, Menoret E, Gomez-Bougie P, et al. . Dexamethasone-induced cell death is restricted to specific molecular subgroups of multiple myeloma. *Oncotarget* 2015;6:26922-26934.
293. Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL, et al. . International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). *Leukemia* 2009;23:1904-1912.

294. El-Ghammaz AM, Abdelwahed E. Bortezomib-based induction improves progression-free survival of myeloma patients harboring 17p deletion and/or t(4;14) and overcomes their adverse prognosis. *Ann Hematol* 2016;95:1315-1321.
295. Koeppen S. Treatment of multiple myeloma: thalidomide-, bortezomib-, and lenalidomide-induced peripheral neuropathy. *Oncol Res Treat* 2014;37:506-513.
296. Bilgin YM, de Greef GE. Plerixafor for stem cell mobilization: the current status. *Curr Opin Hematol* 2016;23:67-71.
297. Morris C, Iacobelli S, Brand R, et al. . Benefit and timing of second transplantations in multiple myeloma: clinical findings and methodological limitations in a European Group for Blood and Marrow Transplantation registry study. *J Clin Oncol* 2004;22:1674-1681.
298. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, et al. . Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood* 1997;89:789-793.
299. Naumann-Winter F, Greb A, Borchmann P, Bohlius J, Engert A, Schnell R. First-line tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation versus single high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in multiple myeloma, a systematic review of controlled studies. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:Cd004626.
300. Einsele H, Schafer HJ, Hebart H, et al. . Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning. *Br J Haematol* 2003;121:411-418.
301. Bensinger W. Allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;28:891-902.
302. Festuccia M, Martino M, Ferrando F, et al. . Allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma: immunotherapy and new drugs. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:857-872.
303. Usmani SZ, Rodriguez-Otero P, Bhutani M, Mateos MV, Miguel JS. Defining and treating high-risk multiple myeloma. *Leukemia* 2015;29:2119-2125.
304. Roos-Weil D, Moreau P, Avet-Loiseau H, et al. . Impact of genetic abnormalities after allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma: a report of the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Haematologica* 2011;96:1504-1511.
305. Kroger N, Badbaran A, Zabelina T, et al. . Impact of high-risk cytogenetics and achievement of molecular remission on long-term freedom from disease after autologous-allogeneic tandem transplantation in patients with multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:398-404.
306. Krishnan A, Pasquini MC, Logan B, et al. . Autologous haemopoietic stem-cell transplantation followed by allogeneic or autologous haemopoietic stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma (BMT CTN 0102): a phase 3 biological assignment trial. *Lancet Oncol* 2011;12:1195-1203.
307. Kuhr K, Wirth D, Srivastava K, Lehmacher W, Hellmich M. First-line therapy for non-transplant eligible patients with multiple myeloma: direct

- and adjusted indirect comparison of treatment regimens on the existing market in Germany. *Eur J Clin Pharmacol* 2016;72:257-265.
308. Jelinek T, Hajek R. PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma: The present and the future. *Oncoimmunology* 2016;5:e1254856.
309. Rosinol L, Oriol A, Teruel AI, et al. . Bortezomib and thalidomide maintenance after stem cell transplantation for multiple myeloma: a PETHEMA/GEM trial. *Leukemia* 2017;31:1922-1927.
310. Gay F, Oliva S, Petrucci MT, et al. . Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1617-1629.
311. Areethamsirikul N, Reece DE. The risk of secondary primary malignancies after therapy for multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2015;56:3012-3021.
312. Dimopoulos MA, Richardson PG, Moreau P, Anderson KC. Current treatment landscape for relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:42-54.
313. Ashjian E, Redic K. Multiple myeloma: Updates for pharmacists in the treatment of relapsed and refractory disease. *J Oncol Pharm Pract* 2016;22:289-302.
314. Sponaas AM, Moharrami NN, Feyzi E, et al. . PDL1 Expression on Plasma and Dendritic Cells in Myeloma Bone Marrow Suggests Benefit of Targeted anti PD1-PDL1 Therapy. *PLoS One* 2015;10:e0139867.
315. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol* 2016;91:90-100.
316. Grzasko N, Morawska M, Hus M. Optimizing the treatment of patients with multiple myeloma and renal impairment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15:187-198.
317. Terpos E, Morgan G, Dimopoulos MA, et al. . International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *J Clin Oncol* 2013;31:2347-2357.
318. Geng CJ, Liang Q, Zhong JH, et al. . Ibandronate to treat skeletal-related events and bone pain in metastatic bone disease or multiple myeloma: a meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ Open* 2015;5:e007258.
319. Dimopoulos MA, Kastritis E, Bamia C, et al. . Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol* 2009;20:117-120.
320. Hageman K, Patel KC, Mace K, Cooper MR. The role of denosumab for prevention of skeletal-related complications in multiple myeloma. *Ann Pharmacother* 2013;47:1069-1074.
321. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. . International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-1473.
322. Ottinger HM, C; Beelen, D W; Ehninger, G; Schmitz, N; Zander, A; Schrezenmeier, H. Developments and Quality Assurance in Stem Cell Transplantation – Data from a German National Registry. *Dtsch Arztebl* 2006;103:A-2381.

323. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813-1826.
324. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12:197-201.
325. Mannick JA, Lochte HL Jr, Ashley CA, Thomas ED, Ferrebee JW. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 1960;15(2):255-266. *Blood* 2016;127:2047.
326. Santos GW, Owens AH, Jr. Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant Proc* 1969;1:44-46.
327. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-1716.
328. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-1369.
329. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al. . One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49:511-533.
330. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. . Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068-1073.
331. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Res* 2016;76:6445-6451.
332. Müller LP MI-TC. The indications for allogeneic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112:262-270.
333. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. . Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1628-1633.
334. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, et al. . Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2014;124:2596-2606.
335. DeWolf S, Sykes M. Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest* 2017;127:2473-2481.
336. Beck S, Trowsdale J. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:117-137.
337. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. . Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005;65:301-369.
338. Debeljak M, Freed DN, Welch JA, et al. . Haplotype counting by next-generation sequencing for ultrasensitive human DNA detection. *J Mol Diagn* 2014;16:495-503.
339. Giralt S, Ballen K, Rizzo D, et al. . Reduced-intensity conditioning regimen workshop: defining the dose spectrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:367-369.

340. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al. . Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983;309:1347-1353.
341. Shank B, O'Reilly RJ, Cunningham I, et al. . Total body irradiation for bone marrow transplantation: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Radiother Oncol* 1990;18 Suppl 1:68-81.
342. Lee JH, Joo YD, Kim H, et al. . Randomized trial of myeloablative conditioning regimens: busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine. *J Clin Oncol* 2013;31:701-709.
343. Rambaldi A, Grassi A, Masciulli A, et al. . Busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine as a preparative regimen for allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1525-1536.
344. Gordon MY, Greaves MF. Physiological mechanisms of stem cell regulation in bone marrow transplantation and haemopoiesis. *Bone Marrow Transplant* 1989;4:335-338.
345. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.
346. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005;35:107-119.
347. Fehse B, Chukhlovina A, Kuhlcke K, et al. . Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:419-425.
348. Locatelli F, Pende D, Falco M, Della Chiesa M, Moretta A, Moretta L. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia. *Trends Immunol* 2018;39:577-590.
349. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-380.
350. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:35.
351. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. . Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-562.
352. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Hematologic Malignancies. *Adv Hematol* 2016;2016:5726132.
353. Showel M, Fuchs EJ. Recent developments in HLA-haploidentical transplantations. *Best Pract Res Clin Haematol* 2015;28:141-146.
354. Alshemmari S, Ameen R, Gaziev J. Haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation in adults. *Bone Marrow Res* 2011;2011:303487.
355. Kanakry CG, de Lima MJ, Luznik L. Alternative Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol* 2015;52:232-242.



356. Wang Y, Liu QF, Xu LP, et al. . Haploidentical vs identical-sibling transplant for AML in remission: a multicenter, prospective study. *Blood* 2015;125:3956-3962.
357. Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, et al. . Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood* 2015;126:1033-1040.
358. Raiola AM, Dominiotto A, di Grazia C, et al. . Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1573-1579.
359. Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nat Med* 1995;1:1268-1273.
360. Fuchs EJ. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:230-236.
361. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, et al. . Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:777-783.
362. Lang P, Handgretinger R, Niethammer D, et al. . Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 2003;101:1630-1636.
363. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. . Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005;23:3447-3454.
364. Gordon MY, Marley SB, Davidson RJ, et al. . Contact-mediated inhibition of human haematopoietic progenitor cell proliferation may be conferred by stem cell antigen, CD34. *Hematol J* 2000;1:77-86.
365. Tada J, Omine M, Suda T, Yamaguchi N. A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood* 1999;93:3723-3735.
366. Waller EK, Giver CR, Rosenthal H, et al. . Facilitating T-cell immune reconstitution after haploidentical transplantation in adults. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:233-237.
367. Bethge WA, Haegele M, Faul C, et al. . Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp Hematol* 2006;34:1746-1752.
368. Bethge WA, Faul C, Bornhauser M, et al. . Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:13-19.
369. Schumm M, Lang P, Bethge W, et al. . Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* 2013;15:1253-1258.

370. Airoidi I, Bertaina A, Prigione I, et al. . gammadelta T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alpha-beta+/CD19+ lymphocytes. *Blood* 2015;125:2349-2358.
371. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, et al. . Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:751-757.
372. Mielke S, Nunes R, Rezvani K, et al. . A clinical-scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood* 2008;111:4392-4402.
373. Bastien JP, Krosi G, Therien C, et al. . Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs versus CD4+ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2010;116:4859-4869.
374. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. . "Designed" grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2014;123:967-973.
375. Shook DR, Triplett BM, Eldridge PW, Kang G, Srinivasan A, Leung W. Haploidentical stem cell transplantation augmented by CD45RA negative lymphocytes provides rapid engraftment and excellent tolerability. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:666-673.
376. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. . CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144-1150.
377. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493-3499.
378. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, et al. . The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2008;111:945-953.
379. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. . Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117:3921-3928.
380. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, et al. . Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* 2005;106:4397-4406.
381. Feuchtinger T, Opherk K, Bethge WA, et al. . Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2010;116:4360-4367.
382. Comoli P, Basso S, Zecca M, et al. . Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1648-1655.
383. Leen AM, Christin A, Myers GD, et al. . Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2009;114:4283-4292.

384. Comoli P, Schilham MW, Basso S, et al. . T-cell lines specific for peptides of adenovirus hexon protein and devoid of alloreactivity against recipient cells can be obtained from HLA-haploidentical donors. *J Immunother* 2008;31:529-536.
385. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. . HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997;276:1719-1724.
386. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. . Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 2011;365:1673-1683.
387. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, et al. . Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 2009;10:489-500.
388. Lu DP, Dong L, Wu T, et al. . Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation. *Blood* 2006;107:3065-3073.
389. Liu D, Huang X, Liu K, et al. . Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion for treatment of hematological malignancies in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:469-477.
390. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, et al. . Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood* 2013;121:849-857.
391. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. . HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:641-650.
392. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, et al. . Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:482-489.
393. O'Donnell PV, Luznik L, Jones RJ, et al. . Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:377-386.
394. Gragert L, Eapen M, Williams E, et al. . HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med* 2014;371:339-348.
395. Kanda Y, Chiba S, Hirai H, et al. . Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 2003;102:1541-1547.
396. Wang Y, Liu DH, Xu LP, et al. . Superior graft-versus-leukemia effect associated with transplantation of haploidentical compared with HLA-identical sibling donor grafts for high-risk acute leukemia: an historic comparison. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:821-830.

397. Ash RC, Horowitz MM, Gale RP, et al. . Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant* 1991;7:443-452.
398. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010;115:3861-3868.
399. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, et al. . Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007;110:4543-4551.
400. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol* 2008;127:286-297.
401. Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987;69:369-380.
402. Thomas ED, Ramberg RE, Sale GE, Sparkes RS, Golde DW. Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* 1976;192:1016-1018.
403. Gale RP, Sparkes RS, Golde DW. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 1978;201:937-938.
404. Jimenez M, Ercilla G, Martinez C. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia* 2007;21:1628-1637.
405. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 2009;9:57-62.
406. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, et al. . Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001;98:2043-2051.
407. Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, et al. . Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:1275-1281.
408. Seggewiss R, Lore K, Guenaga FJ, et al. . Keratinocyte growth factor augments immune reconstitution after autologous hematopoietic progenitor cell transplantation in rhesus macaques. *Blood* 2007;110:441-449.
409. Min D, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, et al. . Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* 2002;99:4592-4600.
410. Langner S, Staber P, Schub N, et al. . Palifermin reduces incidence and severity of oral mucositis in allogeneic stem-cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:275-279.
411. Levine JE, Blazar BR, DeFor T, Ferrara JLM, Weisdorf DJ. Long-term follow-up of a phase I/II randomized, placebo-controlled trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after related donor allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1017-1021.

412. Sutherland JS, Spyroglou L, Muirhead JL, et al. . Enhanced immune system regeneration in humans following allogeneic or autologous hemopoietic stem cell transplantation by temporary sex steroid blockade. *Clin Cancer Res* 2008;14:1138-1149.
413. Kelly RM, Highfill SL, Panoskaltis-Mortari A, et al. . Keratinocyte growth factor and androgen blockade work in concert to protect against conditioning regimen-induced thymic epithelial damage and enhance T-cell reconstitution after murine bone marrow transplantation. *Blood* 2008;111:5734-5744.
414. Knyszynski A, Adler-Kunin S, Globerson A. Effects of growth hormone on thymocyte development from progenitor cells in the bone marrow. *Brain Behav Immun* 1992;6:327-340.
415. Murphy WJ, Durum SK, Anver MR, Longo DL. Immunologic and hematologic effects of neuroendocrine hormones. Studies on DW/J dwarf mice. *J Immunol* 1992;148:3799-3805.
416. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Chao NJ. Growth hormone accelerates immune recovery following allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation in mice. *Exp Hematol* 2003;31:953-958.
417. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:734-745.
418. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004;5:247-253.
419. Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 2002;17:749-756.
420. Zakrzewski JL, Kochman AA, Lu SX, et al. . Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 2006;12:1039-1047.
421. Soiffer RJ, Murray C, Cochran K, et al. . Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin-2 after autologous and T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1992;79:517-526.
422. Perillo A, Pierelli L, Battaglia A, et al. . Administration of low-dose interleukin-2 plus G-CSF/EPO early after autologous PBSC transplantation: effects on immune recovery and NK activity in a prospective study in women with breast and ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:571-578.
423. Nakajima R, Miyagaki T, Morimura S, et al. . Exacerbated Immune Complex-Mediated Vascular Injury in Mice with Heterozygous Deficiency of Aryl Hydrocarbon Receptor through Upregulation of Fcγ Receptor III Expression on Macrophages. *J Invest Dermatol* 2018;138:2195-2204.
424. Nadal E, Fowler A, Kanfer E, Apperley J, Goldman J, Dazzi F. Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions. *Exp Hematol* 2004;32:218-223.
425. Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell

- regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 2001;97:1491-1497.
426. Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, Widmer M, Weinberg K. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* 1996;88:1887-1894.
427. Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglan SJ, et al. . Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* 2001;98:2256-2265.
428. Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, Miller G, Mackall CL. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100:2642-2649.
429. Storek J, Gillespy T, 3rd, Lu H, et al. . Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys. *Blood* 2003;101:4209-4218.
430. Sportes C, Hakim FT, Memon SA, et al. . Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med* 2008;205:1701-1714.
431. Katsanis E, Xu Z, Panoskaltsis-Mortari A, Weisdorf DJ, Widmer MB, Blazar BR. IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice. *Transplantation* 1996;62:872-875.
432. Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR, et al. . IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1969-1974.
433. Sun A, Wei H, Sun R, Xiao W, Yang Y, Tian Z. Human interleukin-15 improves engraftment of human T cells in NOD-SCID mice. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:227-234.
434. Peggs KS, Verfuether S, Pizzey A, et al. . Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 2003;362:1375-1377.
435. Einsele H, Hamprecht K. Immunotherapy of cytomegalovirus infection after stem-cell transplantation: a new option? *Lancet* 2003;362:1343-1344.
436. Kapp M, Rasche L, Einsele H, Grigoleit GU. Cellular therapy to control tumor progression. *Curr Opin Hematol* 2009;16:437-443.
437. Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol* 2012;167:15-25.
438. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, et al. . Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 2008;127:14-25.
439. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990;76:1647-1656.

440. Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C, et al. . B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp Hematol* 2005;33:480-486.
441. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 1993;12:387-398.
442. Noel DR, Witherspoon RP, Storb R, et al. . Does graft-versus-host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors. *Blood* 1978;51:1087-1105.
443. Moins-Teisserenc H, Busson M, Herda A, et al. . CD19+CD5+ B cells and B1-like cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:988-991.
444. van Tol MJ, Gerritsen EJ, de Lange GG, et al. . The origin of IgG production and homogeneous IgG components after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:818-826.
445. Oevermann L, Lang P, Feuchtinger T, et al. . Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1266:161-170.
446. Aversa F. Haploidentical haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia in adults: experience in Europe and the United States. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:473-481.
447. Chen X, Hale GA, Barfield R, et al. . Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol* 2006;135:524-532.
448. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:440-449.
449. Yu S, Fan Q, Sun J, et al. . Haploidentical Transplantation Without In Vitro T-Cell Depletion Results in Outcomes Equivalent to Those of Contemporaneous Matched Sibling and Unrelated Donor Transplantation for Acute Leukemia. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e2973.
450. Chang YJ, Zhao XY, Huo MR, et al. . Immune reconstitution following unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical transplantation compared with HLA-identical sibling transplantation. *J Clin Immunol* 2012;32:268-280.
451. Perez-Martinez A, Gonzalez-Vicent M, Valentin J, et al. . Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1419-1427.
452. Pfeiffer MM, Feuchtinger T, Teltschik HM, et al. . Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. *Haematologica* 2010;95:1381-1388.
453. Federmann B, Hagele M, Pfeiffer M, et al. . Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced

- intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia* 2011;25:121-129.
454. Haddad E, Landais P, Friedrich W, et al. . Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood* 1998;91:3646-3653.
455. Bader P, Soerensen J, Jarisch A, et al. . Rapid immune recovery and low TRM in haploidentical stem cell transplantation in children and adolescence using CD3/CD19-depleted stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:331-337.
456. Clave E, Lisini D, Douay C, et al. . Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation correlates with leukemia relapse. *Front Immunol* 2013;4:54.
457. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Effects of the NK cell recovery on outcomes of unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:323-334.
458. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
459. *Der Experimentator: Immunologie, Experimentator*,. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014 2014.
460. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65:109-121.
461. Probst MCOK, M. J. (2007) in Sack, U.; Tárnok, A.; Rothe, G.: *Zelluläre Diagnostik*, S. Karger Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH; Technische und methodische Grundlagen:197-207.
462. BioRad. *BioPlex Cytokine Assay Inclusions Manual*.
463. Bio-Plex. *ProTM Assay Immunoglobulin Isotyping Instruction Manual*.
464. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005;51:2415-2418.
465. Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 1976;234:108-117.
466. Dangi JL, Lanier LL. Founding father of FACS: Professor Leonard A. Herzenberg (1931–2013). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:20848-20849.
467. Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, et al. . Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity* 2015;43:132-145.
468. Lang P, Teltschik HM, Feuchtinger T, et al. . Transplantation of CD3/CD19 depleted allografts from haploidentical family donors in paediatric leukaemia. *Br J Haematol* 2014;165:688-698.
469. Singavi AK, Harrington AM, Fenske TS. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Cancer Treat Res* 2015;165:305-327.



470. Castagna L, Sarina B, Bramanti S, Perseghin P, Mariotti J, Morabito L. Donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2016;54:345-355.
471. Goldsmith SR, Slade M, DiPersio JF, et al. . Donor-lymphocyte infusion following haploidentical hematopoietic cell transplantation with peripheral blood stem cell grafts and PTCy. *Bone Marrow Transplant* 2017;52:1623-1628.
472. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev* 2010;36:528-538.
473. Hasskarl J, Zerweck A, Wasch R, Ihorst G, Bertz H, Finke J. Induction of graft versus malignancy effect after unrelated allogeneic PBSCT using donor lymphocyte infusions derived from frozen aliquots of the original graft. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:277-282.
474. Abbi KK, Zhu J, Ehmann WC, et al. . G-CSF mobilized vs conventional donor lymphocytes for therapy of relapse or incomplete engraftment after allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:357-362.
475. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol* 2018;9:3041.
476. Tsirigotis P, Byrne M, Schmid C, et al. . Relapse of AML after hematopoietic stem cell transplantation: methods of monitoring and preventive strategies. A review from the ALWP of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:1431-1438.
477. Alyea EP, DeAngelo DJ, Moldrem J, et al. . NCI First International Workshop on The Biology, Prevention and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: report from the committee on prevention of relapse following allogeneic cell transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1037-1069.
478. Abdel-Azim H, Elshoury A, Mahadeo KM, Parkman R, Kapoor N. Humoral Immune Reconstitution Kinetics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children: A Maturation Block of IgM Memory B Cells May Lead to Impaired Antibody Immune Reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:1437-1446.
479. Capolunghi F, Rosado MM, Sinibaldi M, Aranburu A, Carsetti R. Why do we need IgM memory B cells? *Immunol Lett* 2013;152:114-120.
480. Kuczma M, Ding ZC, Zhou G. Immunostimulatory Effects of Melphalan and Usefulness in Adoptive Cell Therapy with Antitumor CD4+ T Cells. *Crit Rev Immunol* 2016;36:179-191.
481. Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J Immunol* 2007;179:13-19.
482. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:160-171.
483. Pei XY, Zhao XY, Xu LP, et al. . Immune reconstitution in patients with acquired severe aplastic anemia after haploidentical stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2017;52:1556-1562.

484. Shah HB, Koelsch KA. B-Cell ELISPOT: For the Identification of Antigen-Specific Antibody-Secreting Cells. *Methods Mol Biol* 2015;1312:419-426.
485. Norlin AC, Sairafi D, Mattsson J, Ljungman P, Ringden O, Remberger M. Allogeneic stem cell transplantation: low immunoglobulin levels associated with decreased survival. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:267-273.
486. Thiant S, Moutouou MM, Leboeuf D, Guimond M. Homeostatic cytokines in immune reconstitution and graft-versus-host disease. *Cytokine* 2016;82:24-32.
487. de Mooij CEM, Netea MG, van der Velden W, Blijlevens NMA. Targeting the interleukin-1 pathway in patients with hematological disorders. *Blood* 2017;129:3155-3164.
488. Giampaolo S, Wojcik G, Serfling E, Patra AK. Interleukin-2-regulatory T cell axis critically regulates maintenance of hematopoietic stem cells. *Oncotarget* 2017;8:29625-29642.
489. Dhanda SK, Gupta S, Vir P, Raghava GP. Prediction of IL4 inducing peptides. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:263952.
490. Hakansson L, Venge P. Priming of eosinophil and neutrophil migratory responses by interleukin 3 and interleukin 5. *Apmis* 1994;102:308-316.
491. Lim VY, Zehentmeier S, Fistonich C, Pereira JP. A Chemoattractant-Guided Walk Through Lymphopoiesis: From Hematopoietic Stem Cells to Mature B Lymphocytes. *Adv Immunol* 2017;134:47-88.
492. Lachmann N, Ackermann M, Frenzel E, et al. . Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem Cell Reports* 2015;4:282-296.
493. Ramadori G, Van Damme J, Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 1988;18:1259-1264.
494. de Boer JH, Hack CE, Verhoeven AJ, et al. . Chemoattractant and neutrophil degranulation activities related to interleukin-8 in vitreous fluid in uveitis and vitreoretinal disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3376-3385.
495. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2016;63:1-25.
496. Pages F, Vives V, Sautes-Fridman C, et al. . Control of tumor development by intratumoral cytokines. *Immunol Lett* 1999;68:135-139.
497. Houglum JE. Interferon: mechanisms of action and clinical value. *Clin Pharm* 1983;2:20-28.
498. Ato M. [Analysis of monocyte/macrophage function in a human MCAF/MCP-1 transgenic mouse]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1998;73:389-405.
499. Betakova T, Kostrabova A, Lachova V, Turianova L. Cytokines Induced During Influenza Virus Infection. *Curr Pharm Des* 2017;23:2616-2622.

500. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2007;48:751-762.
501. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* 2015;367:103-107.
502. Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Gharibi T, Babaloo Z. Interleukin-13 as an important cytokine: A review on its roles in some human diseases. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2015;62:341-378.
503. Defrance T, Carayon P, Billian G, et al. . Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 1994;179:135-143.
504. Mollet I, Giannoli C, Rigal D, Dubois V. [Chimerism analysis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Interest of cell sorting: general review]. *Pathol Biol (Paris)* 2012;60:143-148.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Hämatopoese.....	3
Abbildung 2: Ausschnitt aus der Differenzierung der neutrophilen Granulozyten .....	10
Abbildung 3: Darstellung eosinophiler Granulozyten.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Immunglobulins. ....	23
Abbildung 5: Signalkaskade innerhalb der B-Lymphozyten nach Bindung durch ein passendes Antigen.....	31
Abbildung 6: Klonale Evolution und Heterogenität akuter myeloischer Leukämien.....	37
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung myeloischer Blasten im peripheren Blut.....	40
Abbildung 8: Schematische Darstellung aktueller Therapiemöglichkeiten der AML.....	49
Abbildung 9: Darstellung von Myelomzellen im Knochenmarksausstrich.....	58
Abbildung 10: Radiologische und laborchemische Parameter des Multiplen Myleoms.....	61
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Probenentnahmen. ....	96
Abbildung 12: Darstellung einer Vollblut-probe. ....	114
Abbildung 13: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 1. ....	117
Abbildung 14: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 2. ....	118
Abbildung 15: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 3. ....	119
Abbildung 16: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4. ....	120

Abbildung 17: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 5. ....	121
Abbildung 18: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 6. ....	122
Abbildung 19: Regeneration der Hämato- bzw. Leukopoese nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 7. ....	123
Abbildung 20: Regeneration der Leukozyten nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	124
Abbildung 21: Regeneration der neutrophilen Granulozyten nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	125
Abbildung 22: Regeneration der Lymphozyten nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	126
Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der Elispots des Patienten 2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der haploidenten Transplantation. ....	128
Abbildung 24: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 1.....	129
Abbildung 25: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 2.....	130
Abbildung 26: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 3.....	132
Abbildung 27: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4.....	133
Abbildung 28: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 5.....	134
Abbildung 29: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 6.....	135
Abbildung 30: Nachweis der Immunglobuline vom IgA-, IgG- und IgM-Typ auf Immunzellen nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 7.....	136
Abbildung 31: Nachweis des Immunglobulins IgA auf Immunzellen nach haploidenter Stammzell-transplantation. ....	138

---

Abbildung 32: Nachweis des Immunglobulins IgG auf Immunzellen nach haploidenter Stammzell-transplantation. ....	139
Abbildung 33: Nachweis des Immunglobulins IgM auf Immunzellen nach haploidenter Stammzell-transplantation. ....	139
Abbildung 34: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 1. ....	141
Abbildung 35: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 2. ....	142
Abbildung 36: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 3. ....	143
Abbildung 37: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 4. ....	144
Abbildung 38: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 5. ....	144
Abbildung 39: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 6. ....	146
Abbildung 40: Immunglobulinentwicklung nach haploidenter Stammzelltransplantation bei Patient 7. ....	146
Abbildung 41: Relative Immunglobulinentwicklung für IgG nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	147
Abbildung 42: Relative Immunglobulinentwicklung für IgA nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	148
Abbildung 43: Relative Immunglobulinentwicklung für IgM nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	149
Abbildung 44: Relative Immunglobulinentwicklung für IgE nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	150
Abbildung 45: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 1). ....	152
Abbildung 46: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 2). ....	153

Abbildung 47: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 3).....	154
Abbildung 48: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 4).....	155
Abbildung 49: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 5).....	156
Abbildung 50: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 6).....	156
Abbildung 51: Relative Zytokinexpressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation (Patient 7).....	156
Abbildung 52: Relative Zytokinexpressionslevel aller 7 Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation in Woche 2.....	158
Abbildung 53: Relative Zytokinexpressionslevel aller 7 Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation in Woche 3.....	159
Abbildung 54: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der Immunzellregeneration bei Patient 1. ....	163
Abbildung 55: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 1. ....	164
Abbildung 56: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 2. ....	164
Abbildung 57: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 3. ....	165
Abbildung 58: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 4. ....	166
Abbildung 59: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation bei Patient 5. ....	167
Abbildung 60: Durchflusszytometrische Darstellung der CD38 <sup>+</sup> /CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation der Patienten 6 und 7. ....	168
Abbildung 61: Korrelation der CD38 <sup>low/+</sup> , CD19 <sup>-</sup> Zellpopulation in % der Lin <sup>-</sup> PBMC Gesamtpopulation mit der Anzahl der detektierten Elisots.....	169

---

Abbildung 62: Durchflusszytometrische Subgruppenanalyse der CD38 <sup>+</sup> Zellpopulation.....	170
Abbildung 63: Durchflusszytometrische Subgruppenanalyse der Immunzellregeneration bei Patient 1 (an Tag 7 nach der haploidenten Stammzelltransplantation).....	171
Abbildung 64: Durchflusszytometrische Subgruppenanalyse der Immunglobulin-exprimierenden Zellpopulation bei Patient 1 (an Tag 14 nach der haploidenten Stammzelltransplantation).....	172
Abbildung 65: Hypothetische Entstehung der CD19 <sup>-</sup> CD38 <sup>low/+</sup> CD138 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> Zellen im Rahmen der B-Zell-Entwicklung. ....	197
Abbildung 66: Möglicher zeitlicher Verlauf der CD19 <sup>-</sup> CD38 <sup>low/+</sup> CD138 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> Zellen sowie der regulären Plasmazellen nach der haploidenten Transplantation.....	198



## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über ausgewählte, an der Hämatopoese beteiligte Wachstumsfaktoren und Zytokine .....	5
Tabelle 2: Übersicht über ausgewählte, für die Hämatopoese bedeutsame Transkriptionsfaktoren .....	8
Tabelle 3: Übersicht über die bekannten humanen TLRs und deren zu erkennende Strukturen (PAMPs).....	19
Tabelle 4: Darstellung unterschiedlicher Oberflächenmarker im Rahmen der B-Zellentwicklung .....	27
Tabelle 5: Einteilung der Leukämien. ....	34
Tabelle 6: Übersicht über ausgewählte Marker für die Bestimmung der Zelllinienzugehörigkeit im Rahmen der Immunphänotypisierung .....	41
Tabelle 7: Übersicht über häufige chromosomale Aberrationen der AML .....	42
Tabelle 8: <i>French-American-British</i> -(FAB-)Klassifikation der AML .....	44
Tabelle 9: 2016 überarbeitete WHO-Klassifikation akuter myeloischer Leukämien.....	46
Tabelle 10: Differentialdiagnosen der AML .....	47
Tabelle 11: Diagnose des Multiplen Myeloms .....	60
Tabelle 12: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon	63
Tabelle 13: International Staging System (ISS).....	64
Tabelle 14: Therapiealgorithmus des Multiplen Myeloms nach Erstdiagnose. .	66
Tabelle 15: Überblick über die verschiedenen Indikationen zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation. ....	74
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Geräte. ....	90
Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	91
Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	92

---

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Kits. ....	92
Tabelle 20: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer. ....	93
Tabelle 21: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper. ....	94
Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Software. ....	95
Tabelle 23: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 1. ....	97
Tabelle 24: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 2. ....	98
Tabelle 25: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 3. ....	99
Tabelle 26: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 4. ....	101
Tabelle 27: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 5. ....	102
Tabelle 28: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien der Patientin Nummer 6. ....	103
Tabelle 29: Tabellarische Aufstellung des Krankheitsverlaufs sowie der erhaltenen Therapielinien des Patienten Nummer 7. ....	105
Tabelle 30: Zusammenfassung aller verwendeten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper. ....	115
Tabelle 31: Relative BAFF-Expressionslevel nach haploidenter Stammzelltransplantation. ....	157
Tabelle 32: Anteil der HLA-positiven, CD38-positiven Zellen. ....	161
Tabelle 33: Chimärismusanalyse aller Patienten nach der haploidenten Transplantation. ....	161