

LINIENSPEZIFISCHE  
CHIMÄRISMUSUNTERSUCHUNGEN IM  
PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN NACH  
ALLOGENER HÄMATOPOETISCHER  
ZELLTRANSPLANTATION

Maximilian Moritz Hamann

2008



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

LINIENSPEZIFISCHE  
CHIMÄRISMUSUNTERSUCHUNGEN IM  
PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN NACH  
ALLOGENER HÄMATOPOETISCHER  
ZELLTRANSPLANTATION

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Maximilian Moritz Hamann  
München  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-J. Kolb
2. Berichterstatter	Prof. Dr. med. M. Fischereider
1. Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Diepold
2. Mitberichterstatter	Prof. Dr. med. J. P. Johnson
Mitbetreuer:	Dr. med. M. Pihusch
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Material und Methoden</b>	9
2.1. Patienten	9
2.2. Messung dendritischer Zellen im peripheren Blut	11
2.2.1. Vorbemerkung	11
2.2.2. Probengewinnung	12
2.2.3. Probenverarbeitung	12
2.2.4. Probenmessung	13
2.3. Isolierung dendritischer Zellen	13
2.3.1. Probengewinnung	13
2.3.2. Probenverarbeitung	15
2.3.3. Isolierung von DC1 und DC2 mittels Cellsorting	15
2.3.4. Morphologie von isolierten dendritischen Zellen	16
2.3.4.1. Pappenheim-Färbung	16
2.3.4.2. Morphologie nach Kultivierung mit TNF- $\alpha$	16
2.3.4.3. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach Kultivierung mit TNF- $\alpha$	19
2.4. Isolieren der T-Zellen	22
2.4.1. Probengewinnung	22
2.4.2. Probenverarbeitung	22
2.4.3. Isolieren von T-Zellen mit dem Miltenyi-System	23
2.4.4. Chimärismusanalyse von T-Zellen	23
2.5. Chimärismusanalysen	24
2.5.1. Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung	24
2.5.2. Polymerasekettenreaktion von Short-Tandem-Repeats	28
2.5.3. Definitionen	30
2.6. Datenauswertung	31

<b>3. Ergebnisse</b>	32
3.1. Patienten	32
3.2. Kinetik der Chimärismen nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	36
3.2.1. Kinetik der Chimärismen beim Engraftment	36
3.2.1.1. Kinetik des Dendritenchimärismus	36
3.2.1.2. Kinetik des T-Zell-Chimärismus	38
3.2.2. Kinetik der Chimärismen nach sechs Monaten	40
3.2.2.1. Vorbemerkungen	40
3.2.2.2. Kinetik des Dendritenchimärismus	40
3.2.2.3. Kinetik des T-Zell-Chimärismus	42
3.2.3. Kinetik der Chimärismen nach zwölf Monaten	42
3.2.3.1. Kinetik des Dendritenchimärismus	42
3.2.3.2. Kinetik des T-Zell-Chimärismus	43
3.2.4. Verlauf der Chimärismen	43
3.3. Einfluss der Chimärismen auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	54
3.3.1. Chimärismus der Population DC1	54
3.3.2. Chimärismus der Population DC2	55
3.3.3. Chimärismus der T-Zellen	56
3.3.4. Patienten ohne Chimärismus beim Engraftment	57
3.3.5. DC Chimärismus sechs und zwölf Monate nach Transplantation	59
3.3.6. Patienten mit Unterschieden in den Chimärismen	65
<b>4. Diskussion</b>	67
4.1. Kinetik der Chimärismen	67
4.2. Einfluss der Chimärismen auf den klinischen Verlauf	68
4.2.1. DC1-Chimärismus	68
4.2.2. DC2-Chimärismus	70
4.2.3. T-Zell-Chimärismus	71
4.2.4. Einzelkasuistiken	71

4.2.5. Das Zusammenspiel von dendritischen und T-Zellen hinsichtlich GvHD	73
4.3. Ausblick	83
<b>5. Zusammenfassung</b>	87
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	89
<b>7. Danksagung</b>	104
<b>8. Lebenslauf</b>	106

## Verzeichnis der Bildtafeln

- Tafel 1:** Pathophysiologie der GvHD
- Tafel 2:** Patientendaten
- Tafel 3:** Messung des Dendritengehaltes
- Tafel 4:** Isolierung und Reinheit der DCs
- Tafel 5:** Pappenheim-Färbung von DC2
- Tafel 6:** Morphologie von in TNF- $\alpha$  inkubierten DC2
- Tafel 7:** Chimärismusanalyse mittels FISH
- Tafel 8:** Chimärismusanalyse mittels STR-PCR
- Tafel 9:** Befundbericht einer Chimärismusanalyse mittels STR-PCR
- Tafel 10:** Akute Graft-versus-Host Erkrankung
- Tafel 11:** Chronische Graft-versus-Host Erkrankung
- Tafel 12:** Todesursachen
- Tafel 13:** Dendritenchimärismus (Dx) beim Engraftment
- Tafel 14:** Quantitativer und qualitativer Chimärismus beim Engraftment
- Tafel 15:** Qualitativer Chimärismus nach sechs und zwölf Monaten
- Tafel 16:** Einfluss des DC1-Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen
- Tafel 17:** Einfluss des DC2-Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen
- Tafel 18:** Einfluss des T-Zell-Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen
- Tafel 19:** Rezidiv-freies und Gesamtüberleben in den Gruppen A + B
- Tafel 20:** Rezidiv-freies und Gesamtüberleben in den Gruppen C + D
- Tafel 21:** Rezidiv-freies und Gesamtüberleben in den Gruppen E + F
- Tafel 22:** Kombinationen der Chimärismen der verschiedenen Zelllinien



## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amsa	Amsacrin
AraC	Cytarabin
Apc	Allophycocyanin
APC	Antigen-presenting cell(s)
ATG	Antithymozytenglobulin
BSA	Bovine Serum Albumine
Bu	Busulfan
Camp	Campath
CC	Complete Chimerism
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte(s)
CyA	Cyclosporin A
Cyclo	Cylophosphamid
DC	Dendritic Cell(s)
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
Dx	Dendritenchimärismus
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
Flu	Fludarabin
GALT	Gut-associated Lymphoid Tissue
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukämie
GvT	Graft-versus-Tumor
HLA	Human Leukocyte Antigen

IL	Interleukin
IFN	Interferon
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharide
MC	Mixed Chimerism
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex
mHAg	Minor Histocompatibility Antigen
MM	Multipl. Myelom
MMF	Mycophenolatmofetil
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
OMF	Osteomyelofibrose
OMS	Osteomyelosklerose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSCT	Peripheral Blood Stem Cell Transplantation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
SAA	Schwere aplastische Anämie
SCA	Sickle Cell Anemia
SD	Standardabweichung
sFas	Soluble Fas
STR	Short Tandem Repeat
TBI	Total Body Irradiation
TC	T-Cell(s)
Th	T-Helfer-Zellen
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNI	Total Nodal Irradiation
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
VOD	Veno-Occlusive Disease
VP	Vepesid

**Auszüge dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Arbeiten veröffentlicht:**

Stefan Böck et al. (2005)

Kinetics of dendritic cell chimerism and T cell chimerism in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Jan;37(1):57-64.

Markus Pihusch et al. (2005)

Peripheral dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation.* 2005 Sep 27;80(6):843-9.

Stefan Böck et al. (2002)

Mixed chimerism of peripheral blood type 2 dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation is associated with an increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. München*

Moritz Hamann et al. (2002)

Linien-spezifische Chimärismusuntersuchungen nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. München*

Markus Pihusch et al. (2001)

Peripheral Blood Dendritic Cells in Patients with Acute Graft Versus Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Annual meeting of the American Society of Hematology. Orlando, USA*

Stefan Böck et al. (2001)

Chimerism of Peripheral Blood Dendritic Cells in Patients after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Annual meeting of the American Society of Hematology. Orlando, USA*

Markus Pihusch et al. (2001)

Dendritische Zellen im peripheren Blut bei Patienten unter allogener hämatopoetischer Zelltransplantation. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. Mannheim*

Markus Pihusch et al. (2000)

Chimerism of dendritic cells in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. Graz*

# 1. Einleitung

Die Transplantation von allogener Knochenmark oder allogenen peripheren Blutstammzellen ist heutzutage ein wichtiger Bestandteil bei der Therapie vieler Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Sie ist jedoch immer noch mit einem sehr hohen Risiko behaftet, wie die hohe Morbidität und Mortalität zeigen. Die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate nach einer allogenen Transplantation liegt, nicht aufgeschlüsselt nach Art der Erkrankung oder des Konditionierungsschemas, bei 50% (Waller *et al.*, 2001). Die Gründe für die hohe Mortalität sind zum einen die Toxizität der Behandlung an sich und zum anderen das Auftreten opportunistischer Infektionen. Besonders hervorzuheben sind jedoch die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) und das Rezidivieren der behandelten Krankheit.

Bis heute ist es allerdings schwierig frühzeitig im Posttransplantationsverlauf drohende Komplikationen wie eine Graft-versus-Host-Erkrankung zu erkennen. In den letzten Jahren haben sich hierfür zunehmend Chimärismusuntersuchungen etabliert. Bei einer Chimärismusuntersuchung lässt sich mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer und genetischer Techniken – zum Beispiel der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) und der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) – das qualitative und quantitative Verhältnis hämatopoetischer Zellen zwischen Spender und Empfänger bestimmen (Thiede *et al.*, 2001). Über die so bestimmte Chimärismuskinetik lassen sich Voraussagen machen über den Erfolg, aber auch über Komplikationen nach der Transplantation. Dazu gehören Anwachsen oder Abstoßung des Transplantats, Versagen des Transplantats und Auftreten eines Rezidivs.

Der Einfluss eines gemischten Chimärismus auf das Auftreten eines Rezidivs ist noch nicht geklärt, die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sind widersprüchlich. Zum Teil fand sich ein erhöhtes Rückfallrisiko bei instabilem gemischtem Chimärismus im Vergleich zu einem vollständigen Chimärismus oder einem gemischten Chimärismus, der in einen vollständigen überging (Thiede *et al.*, 2001; Dubovski, 1999). Vor allem die Ergebnisse älterer Arbeiten brachten keine eindeutige Assoziation eines gemischten Chimärismus mit einem erhöhten Rückfallrisiko hervor

(Schattenberg et al., 1989; Bertheas, 1991; van Leeuwen et al., 1994). Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen zugrundeliegenden Krankheiten sein und deren verschieden starkes Ansprechen auf den Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL). Roux et al. (1994) und Choi et al. (2000) fanden heraus, dass ein gemischter Chimärismus ein Warnzeichen für ein Rezidiv bei der CML ist, nicht aber bei akuten Leukämien.

Die Chimärismuskinetik scheint auch einen Einfluss auf die Entstehung einer GvHD zu haben. In der Regel kommt es bei einem gemischtem Chimärismus seltener zu einer GvHD (Choi et al., 2000; Gyger 1998; Frassoni et al., 1990; Roux et al., 1994). Tritt bei gemischtem Chimärismus eine GvHD auf, so ist diese meistens nicht so schwer wie bei einem vollständigen Chimärismus.

Die Graft-versus-Host-Erkrankung stellt im Wesentlichen eine Immunreaktion des transplantierten Immunsystems gegen den Empfänger dar, wobei zur Entstehung folgende, bereits 1966 von Billingham formulierten Voraussetzungen erfüllt sein müssen:

- 1.) das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten,
- 2.) der Empfänger muss Gewebeantigene exprimieren, die nicht denen des Spenders entsprechen, und
- 3.) der Empfänger darf nicht in der Lage sein, eine effektive Immunantwort auszulösen, die die transplantierten Zellen zerstört.

Die immunkompetenten Zellen wurden vor etwa dreißig Jahren durch Gowans (1977) als kleine Lymphozyten identifiziert, von denen man heute weiß, dass es sich um reife T-Zellen handelt. Zur Stimulierung und Ausreifung von T-Zellen kommt es bei Unterschieden in den MHC zwischen Empfänger und Spender. Dazu kann es aber auch bei HLA-identischen Spendern und Empfängern kommen, wenn Unterschiede bei den Minor-Histocompatibility-Antigenen vorliegen, da auch diese als fremd erkannt werden können. Das Resultat dieser T-Zell-Aktivierung ist die GvHD.

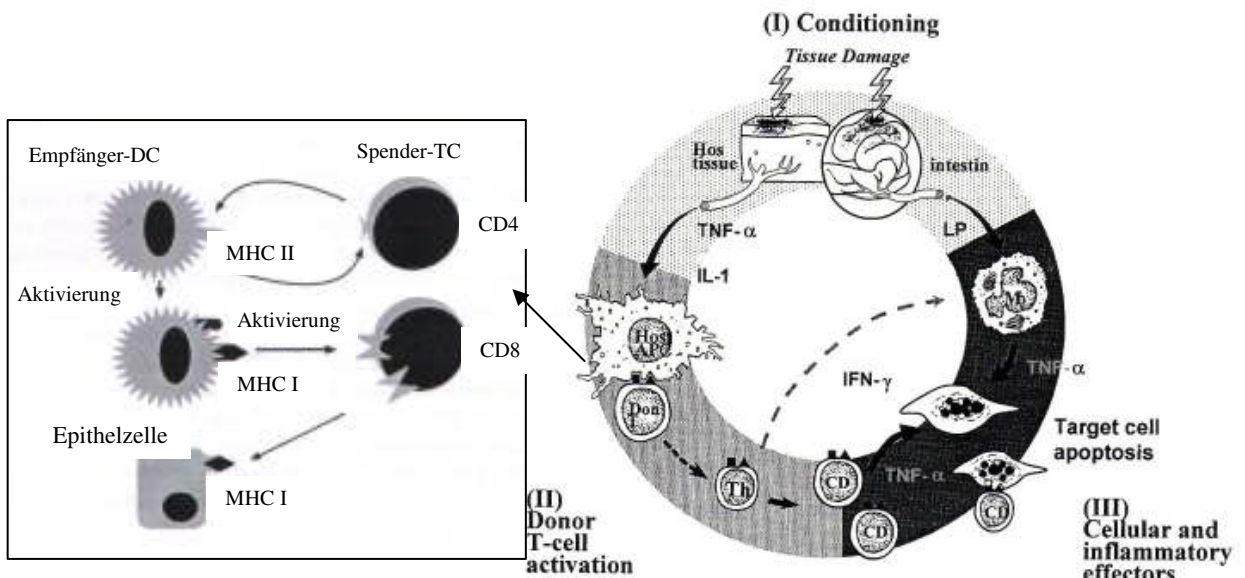
Insgesamt kann die GvHD in einem 3-Phasen-Modell zusammengefasst werden, das ganz wesentlich durch eine dysregulierte Zytokinproduktion geprägt ist (Krenger, 1997; Goker et al., 2001, Reddy et al., 2003). Die erste Phase umfasst

Gewebeschäden als Folge der Konditionierung, die zweite Phase setzt sich aus T-Zell-Aktivierung, Stimulierung und Proliferation zusammen. Gemeinsam bilden die erste und zweite Phase die sogenannte afferente Phase der GvHD, der die dritte Phase, die Effektorphase, folgt.

Das Konditionierungsregime hat einen sehr großen Einfluss auf die erste Phase, weil es eine Reihe von inflammatorischen Prozessen in den Geweben verursacht. Im Rahmen der Ganzkörperbestrahlung oder/und Hochdosis-Chemotherapie schütten aktivierte Zellen des geschädigten Gewebes große Mengen an inflammatorischen Zytokinen aus (*Holler, 2002*).

Nach Transplantation der Spenderzellen kommt es zur zweiten Phase der GvHD, die wahrscheinlich durch die dysregulierte Zytokinausschüttung der ersten Phase noch verstärkt wird (*Reddy et al., 2003*). Entscheidend für die zweite Phase ist die Präsentation von Empfänger-Antigenen an naive Spender-T-Zellen, die dadurch aktiviert werden und darauffolgend proliferieren und sich differenzieren. Die Basis hierfür ist die individuelle immunologische Identität, in der sich Empfänger und Spender unterscheiden. Sie wird durch Zelloberflächenantigene, die sogenannten Major- und Minor-Histocompatibility-Antigene (MHC/mHAg) hervorgerufen (*Goulmy et al., 1996*). Die Präsentation der Empfänger-Antigene an die naiven T-Zellen erfolgt durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie dendritische Zellen, über Allopeptid-MHC-Komplexe.

Phase 3 ist die Effektorphase der akuten GvHD. Eine Reihe komplexer Mechanismen ist in diese Phase involviert, die verantwortlich ist für Organdysfunktionen und Gewebeschäden. Die betroffenen Organe sind in der Regel Haut, Leber und Darm. Spender-T-Zellen reagieren entweder direkt oder über sekundäre Mechanismen mit den Empfängerzellen. Die aktivierten und proliferierten T-Lymphozyten schütten verschiedene inflammatorische Zytokine aus, die zwei unterschiedliche Rollen bei der Immunantwort der akuten GvHD spielen. Aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen schütten Zytokine wie IL-2, GM-CSF, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aus, die dann wiederum andere T-Zellen oder Zellen wie Monozyten, NK-Zellen, NK-ähnliche Zellen oder auch verbliebene Empfängerzellen aktivieren, was eine unspezifische Zytotoxizität zur Folge hat.



Quelle: Kolb et al., 2003

Quelle: Reddy et al., 2003

### Pathophysiologie der GvHD:

Phase 1: Während der Konditionierungsphase werden die Empfängergewebe – insbesondere Darm, Leber und Haut – geschädigt und aktiviert. Die aktivierten Empfängerzellen schütten Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  aus, durch deren Ausschüttung es bei den Empfänger-APCs zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC-Antigenen kommt. Dies führt zu einer verstärkten Erkennung von MHC-/mH-Antigenen durch Spender-T-Zellen.

Phase 2: In dieser Phase zeigt sich die T-Zell-Aktivierung durch Empfänger-DC anhand der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen und der Sekretion der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . Diese beiden Zytokine spielen eine zentrale Rolle bei der klonalen Expansion der T-Zellen.

Phase 3: Mononukleäre Phagozyten schütten, wenn sie durch ein zweites Signal wie LPS getriggert werden, zellschädliche Mengen an IL-1 und TNF- $\alpha$  aus. LPS gelangt durch die geschädigte Darmschleimhaut in die Blutbahn und stimuliert dann GALT oder Kupfer-Zellen in der Leber. In der Epidermis kann LPS Keratinozyten, Fibroblasten und Makrophagen zur weiteren Zytokinproduktion stimulieren. Das führt zu einer Schädigung des Gewebes mit konsekutiver Produktion von Zytokinen, was zusammen mit den CTL- und NK-assoziierten Mechanismen zur Zerstörung der Empfängergewebe führt.

Tafel 1: Pathophysiologie der GvHD



Neben der unspezifischen Zytotoxizität über lösliche Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 können CTLs auch eine spezifische Zytotoxizität über zwei andere, Kontakt-vermittelte Wege herstellen: Perforin-granzyme B-vermittelte Zytolyse und Fas-Fas Ligand (FasL)-vermittelte Apoptose. Erhöhte Spiegel von TNF- $\alpha$  wurden bei Patienten gefunden, die eine GvHD entwickelten. Bei schweren, Therapie-refraktären GvHDs brachten monoklonale TNF- $\alpha$ -Antikörper eine signifikante Besserung (*Krenger et al., 1997*).

Die GvH-Reaktion ist wesentlich durch die T-Helferzellen (Th) beeinflusst, von denen es zwei Typen gibt, Th1 und Th2. Th1 und Th2 geben verschiedene Zytokine ab, die eine gegensätzliche Wirkung auf die GvHD haben. Während ein Überwiegen der Th1-Zellen zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) führt und dadurch zu einer GvHD, kann eine Überzahl der Th2-Zellen zu einer humoralen Antwort führen und eine GvHD verhindern. Man spricht in diesem Rahmen auch von einer T1- bzw. T2-Polarisierung. Typische Zytokine einer T1-Antwort sind IL-2 und IFN- $\gamma$ , die einer T2-Antwort IL-4, IL-6 und IL-10 (*O'Doherty et al., 1994; Olweus et al., 1997; Rissoan et al., 1999; Arpinati et al., 2000*).

Allerdings scheint bei einer T2-Polarisierung das Risiko für eine cGvHD erhöht zu sein (*Arpinati et al., 2000; Reddy et al., 2000*). Obwohl die verheerende Wirkung der Th1-Zytokine (z.B.: IL-2 und IFN- $\gamma$ ) und die schützende Wirkung der Th2-Zytokine (z.B. IL-4 und IL-10) weitestgehend akzeptiert sind, existieren auch widersprüchliche Daten (*De Wit et al., 1993; Liu et al., 2002*).

Verantwortlich für die Polarisierung der T-Zellen in Richtung Typ1 oder Typ2 sind die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Dendritische Zellen (DCs) sind die einzigen APCs, die eine naive T-Zelle auf ein neues Antigen vorbereiten können. Insgesamt drei Subtypen der dendritischen Zellen sind in der Literatur beschrieben (*Pulendran et al., 2001*): myeloische DC (CD11c<sup>+</sup>; = DC1), lymphatische DC (CD123<sup>+</sup>; = DC2) und plasmazytoide DC (CD11c<sup>-</sup>). Die von uns untersuchten DC1 induzieren bei Interaktion mit T-Zellen eine T1-Antwort, die DC2 dagegen eine T2-Antwort (*Rissoan et al., 1999; Pulendran et al., 2001*). Dabei sind die verschiedenen Subtypen von jeweils anderen Voraussetzungen, wie unterschiedlichen Zytokinen und Botenstoffen, abhängig und produzieren unter deren Einfluss selbst verschiedene

Botenstoffe. DC1 produzieren z.B. IL-12. Auch hinsichtlich ihres Potentials bei der Aktivierung von T-Zellen und ihrer Funktion innerhalb des Immunsystems unterscheiden sich die DCs. DC1 nehmen mikrobielle und Umwelt-Antigene in der Peripherie auf, wandern zu den Lymphknoten, wo sie dann eine T-Zell-Antwort auslösen. DC2 wandern bereits während der Fetalperiode in die Lymphknoten. Sie sind vermutlich für die Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell-Toleranz gegenüber eigenen Antigenen zuständig (*Arpinati et al., 2000*). Drei Möglichkeiten stehen am Ende der Interaktion von APC und TC: komplette Aktivierung, partielle Aktivierung und Anergie. Wie die T-Zellen aktiviert werden müssen, hängt davon ab, in welchem Status der Aktivierung sich die T-Zellen befinden (ruhend-aktiviert; naiv-reif), und welcher Typ der APCs (professionell-unprofessionell; ruhend-aktiviert) das Antigen (Ag) präsentiert. So können beispielsweise unreife DC Toleranz-induzierend wirken, indem sie TC ruhig stellen durch eine Ag-spezifische Zerstörung oder Vermehrung regulatorischer T-Zellen (*Steptoe et al., 1996; Steinmann et al., 2000; Steinmann et al., 2002*).

In Anbetracht der Pathophysiologie der GvHD und der dabei involvierten Zellen, stellt sich vor allem bei den dendritischen Zellen als potente Ag-präsentierende Zellen und den T-Zellen als Effektorzellen der GvHD die Frage, inwieweit deren Chimärismusverhalten einen Einfluss auf die Entstehung einer GvHD hat. Die Daten sind bislang jedoch spärlich (*Porter et al., 2000; Clark et al., 2001; Auffermann-Gretzinger et al., 2002*). Vermutlich sind es die dendritischen Zellen des Empfängers, die eine wichtige Rolle spielen bei der Aktivierung von Spender-T-Zellen, da sie diesen direkt Empfänger-Alloantigene präsentieren, resultierend in einer akuten oder chronischen GvHD (*Arpinati et al., 2000*). Shlomchik et al. (1999) und Klanginsirikul et al. (2002) fanden heraus, dass eine Inaktivierung der Empfänger-DC womöglich eine GvHD verhindern oder abschwächen kann. Gleichzeitig wird jedoch auch ein Einfluss der Spender-DC auf die Entstehung einer GvHD diskutiert (*Arpinati et al., 2000; Reddy et al., 2000; Wu et al., 2000*). Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer GvHD besteht bei einem komplettem T-Zell-Chimärismus (*Mattson et al., 2001*). Gleichzeitig sind es aber auch regulatorische T-Zellen des Spenders, die eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung einer GvHD spielen, wie Edinger et al. (2003) im Mausmodell zeigen konnten.

Vor diesem Hintergrund wurde in unserer Arbeitsgruppe das Chimärismusverhalten der beiden Subsets der dendritischen Zellen und das der T-Zellen analysiert. Basierend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die sich vor allem mit dem Dendritenchimärismus beschäftigten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine größere Fallzahl der Chimärismen der beiden DC Subtypen, DC1 und DC2, und des Gesamtchimärismus analysiert und zusätzlich das Chimärismusverhalten der T-Zellen. Ziel war es, mögliche Einflüsse des Chimärismusverhaltens der untersuchten Zelllinien auf das Outcome (rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben, Inzidenz und Schwere der akuten und chronischen GvHD) nach allogener hämatologischer Zelltransplantation zu untersuchen.

**Gesamtzahl: N = 144**

Männlich 91 (63,2%)

Weiblich 53 (36,8%)

Mittleres Alter bei der Transplantation: 42,8 Jahre

(Range 16-65 Jahre, Standardabweichung 12,2 Jahre)

Verwandter Spender 79 (54,9%)

Fremdspender 65 (45,1%)

HLA-identer Spender 125 (86,8%)

Nicht HLA-identer Spender 19 (13,2%)

KMT 63 (43,8%)

PBSCT 81 (56,3%)

**Krankheiten:**

AML 46 (31,9%) CLL 3 (2,1%)

CML 33 (22,9%) MDS 3 (2,1%)

ALL 21 (14,6%) M. Hodgkin 2 (1,4%)

NHL 17 (11,8%) OMF/OMS 2 (1,4%)

MM 12 (8,3%) SCA 1 (0,7%)

SAA 4 (2,8%)

Tafel 2: **Patientendaten** (Teil 1)

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

Im Rahmen dieser prospektiven Studie wurden zwischen April 1999 und Oktober 2002 insgesamt 144 Patienten untersucht, an denen eine allogene Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen in der José-Carreras-Transplantationseinheit der Medizinischen Klinik III (Klinikum der Universität München - Großhadern) durchgeführt wurde. Alle Patienten gaben nach einem ärztlichen Aufklärungsgespräch ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über insgesamt zwölf Monate, wobei zum Zeitpunkt des Engraftments, sechs und zwölf Monate nach Transplantation untersucht wurde. Alle Patienten, die zwischen Oktober 2001 und April 2002 transplantiert wurden, wurden bis einschließlich 30. September 2002 beobachtet.

Tafel 2 gibt einen Überblick über die Patientendaten: Geschlecht, Alter, verwandter/Fremd-Spender, HLA-identer/nicht-identer Spender, Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen, zugrunde liegende Erkrankungen und Konditionierungsregime.

Die Einteilung des Schweregrads der akuten und chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung erfolgte anhand klinischer und laborchemischer Parameter (Grading der aGvHD nach *Glucksberg et al., 1974*). Für die GvHD-Prophylaxe wurden im Wesentlichen zwei verschiedene Regime eingesetzt: 50,4% der Patienten bekamen Methotrexat i.v. (15 mg/m<sup>2</sup> am Tag +1, 10 mg/m<sup>2</sup> am Tag +3 und 10 mg/m<sup>2</sup> am Tag +6 bzw. +7 beim haploidenten Protokoll) und Cyclosporin A (CyA), 45,3% der Patienten erhielten Mycophenolatmofetil (MMF) i.v. (Start am Tag 0 mit 2x15 mg/kg KG) und Cyclosporin A. Der CyA-Perfusor wurde am Tag -1 mit 5mg/kg/d gestartet, am Tag +5 wurde auf 3 mg/kg/d reduziert und ab Tag +28 wurde auf orales Cyclosporin A umgestellt (12 mg/kg/d). Innerhalb der ersten zwei bis drei Monate nach der Transplantation wurde die CyA-Dosis einem Plasmaspiegel von 250-500 ng/ml (inkl. der Metaboliten) angepasst und dann schrittweise reduziert.

**Konditionierungsregime:****Myeloablativ:**

12Gy TBI-Cyclo-ATG	25	(17,4%)
Bu-Cyclo-ATG	9	(6,3%)
12Gy TBI-Vp	7	(4,9%)
Flu-AraC-Amsa · 12Gy TBI-Cyclo-ATG ( <i>haplo</i> )	4	(2,8%)
12Gy TBI-Cyclo-ATG ( <i>haplo</i> )	3	(2,1%)

**Nicht-myeloablativ:**

Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG	49	(34,0%)
4Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG	12	(8,3%)
4Gy TBI-Flu-Cyclo	12	(8,3%)
8Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG	9	(6,3%)
2Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG	2	(1,4%)
Cyclo-ATG	2	(1,4%)
Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG ( <i>haplo</i> )	1	(0,7%)
Flu-Cyclo	1	(0,7%)
DexaBEAM-OKT 3	1	(0,7%)
9Gy TNI · 3Gy TBI-Cyclo-ATG	1	(0,7%)
8Gy TNI-Flu-Cyclo-ATG	1	(0,7%)
4Gy TBI-Flu-Cyclo-Camp	1	(0,7%)
OKT 3 · 4Gy TBI-Cyclo-ATG ( <i>haplo</i> )	1	(0,7%)
keine	3	(2,1%)

Tafel 2: **Patientendaten** (Teil 2)

3,6% der Patienten, die wegen eines multiplen Myeloms transplantiert wurden, erhielten wegen Nierenschäden kein CyA sondern nur MMF als GvHD-Prophylaxe (Dosierung wie oben).

Ein Patient mit einer schweren aplastischen Anämie erhielt neben CyA in oben beschriebener Dosierung auch Rapamycin (übliche Dosis 1-4 mg) als Prophylaxe. Des Weiteren kam bei einem Großteil der Patienten auch Antithymozytenglobulin (ATG) i.v. (10-30 mg/kg für 3 Tage, siehe Tafel 2 – Teil 2) als GvHR- und HvGR-Prophylaxe. Primär wurde eine aGvHD  $\geq$  Grad II mit Prednisolon (2-3 mg/kg/d) therapiert. Die Dosis wurde dann, je nach Ansprechen, alle drei Tage um 10% reduziert.

## **2.2. Messung dendritischer Zellen im peripheren Blut**

### **2.2.1. Vorbemerkungen**

Bis vor kurzem war es nicht möglich dendritische Zellen direkt aus Vollblut zu isolieren, da es keine spezifischen Marker gab. Vielmehr war es notwendig, diese durch Kultur von Blut oder Knochenmark in Gegenwart bestimmter Zytokine wie GM-CSF, TNF- $\alpha$  oder IL-4 zu gewinnen (*Fearnly et al, 1997*). Dadurch kommt es zur Reifung der dendritischen Zellen und in Folge dessen zu einer vermehrten Expression von Aktivierungsmarkern und ko-stimulatorischen Molekülen wie CMRF-44, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) und CD83, die auf direkt aus peripherem Blut isolierten Dendriten fehlen (*Hock et al. 1994, McLellan et al. 1995, Robinson et al. 1999*).

Die Identifikation der beiden Subsets der dendritischen Zellen wurde erst möglich, als CD11c<sup>+</sup> ( $\beta_2$ -Integrin) für DC1 und CD123<sup>+</sup> (IL-3R $\alpha$ ) für DC2 im peripheren Blut identifiziert wurden (*Kohrgruber et al., 1999*), weil es dadurch möglich wurde, in Verbindung mit HLA-DR und einem sogenannten lin<sup>+</sup> Cocktail (linienspezifische Oberflächenantigene wie CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) ein passendes Set monoklonaler Antikörper herzustellen.

### **2.2.2. Probengewinnung**

Für die Messung des Dendritengehaltes im Blut wurde ab einem Leukozytengehalt von >100/ $\mu$ l im Rahmen der Routineblutentnahmen werktags um 6:00 Uhr morgens ein Röhrchen Citratblut (4,7 ml) über den Hickmann-Katheter oder einen anderen zentralen Venenkatheter abgenommen. Das Blut wurde noch am gleichen Tag im Cellsorting Labor der Medizinischen Klinik III verarbeitet.

### **2.2.3. Probenverarbeitung**

Zunächst wurden 100  $\mu$ l Vollblut in einem Probenröhrchen für 15 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur mit folgenden monoklonalen Antikörpern inkubiert: 7  $\mu$ l anti-HLA-DR-PerCP, 7  $\mu$ l lin1-FITC (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56), 5  $\mu$ l anti-CD11c-APC und 5  $\mu$ l anti-CD123-PE. Maus-IgG<sub>1</sub>-PE und Maus-IgG<sub>2a</sub>-APC dienen als Isotypkontrolle (alle Antikörper Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA). Anschließend wurden die Erythrozyten mit 2 ml FACS<sup>TM</sup> Lysing Solution (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA), die zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, versetzt. Danach wurde wieder zehn Minuten lang bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe fünf Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert (Labofuge II, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand mit den lysierten Erythrozyten abgeschüttet und die Probe mit 3,5 ml PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) als Waschpuffer versetzt (PBS 0,1 M pH 7,3-7,4: Apotheke, Klinikum der Universität München; Natriumazid: Merck KGaA, Darmstadt; BSA: Merck KGaA, Darmstadt). Dann wurde erneut fünf Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand des PBS-Überstandes abgeschüttet. Der verbliebene Rest im Probenröhrchen wurde mit 300  $\mu$ l PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) resuspendiert.



## **2.2.4. Probenmessung**

Nach der oben beschriebenen Verarbeitung wurden die Probenmessungen im Cellsorting-Labor durchgeführt. Mit diesem Sechseparameter-Zellanalyse-Gerät lassen sich Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung sowie vier weitere Fluoreszenzen gleichzeitig messen. Ein luftgekühlter Argonlaser und ein Rotlaser dienen als Lichtquellen. Für die Signalauflösung stehen 1.024 Kanäle zur Verfügung. Die Messsignale wurden auf allen Detektoren über vier Dekaden logarithmisch verstärkt. FITC, APC, PerCP und PE wurden als Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Bei einer maximalen Messrate von 500-800 events/s wurden pro Probe 20.000 Signale im Forward-Side-Scatter-Kanal mit der CELLQuest<sup>TM</sup>-Software Version 3.0 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) akquiriert.

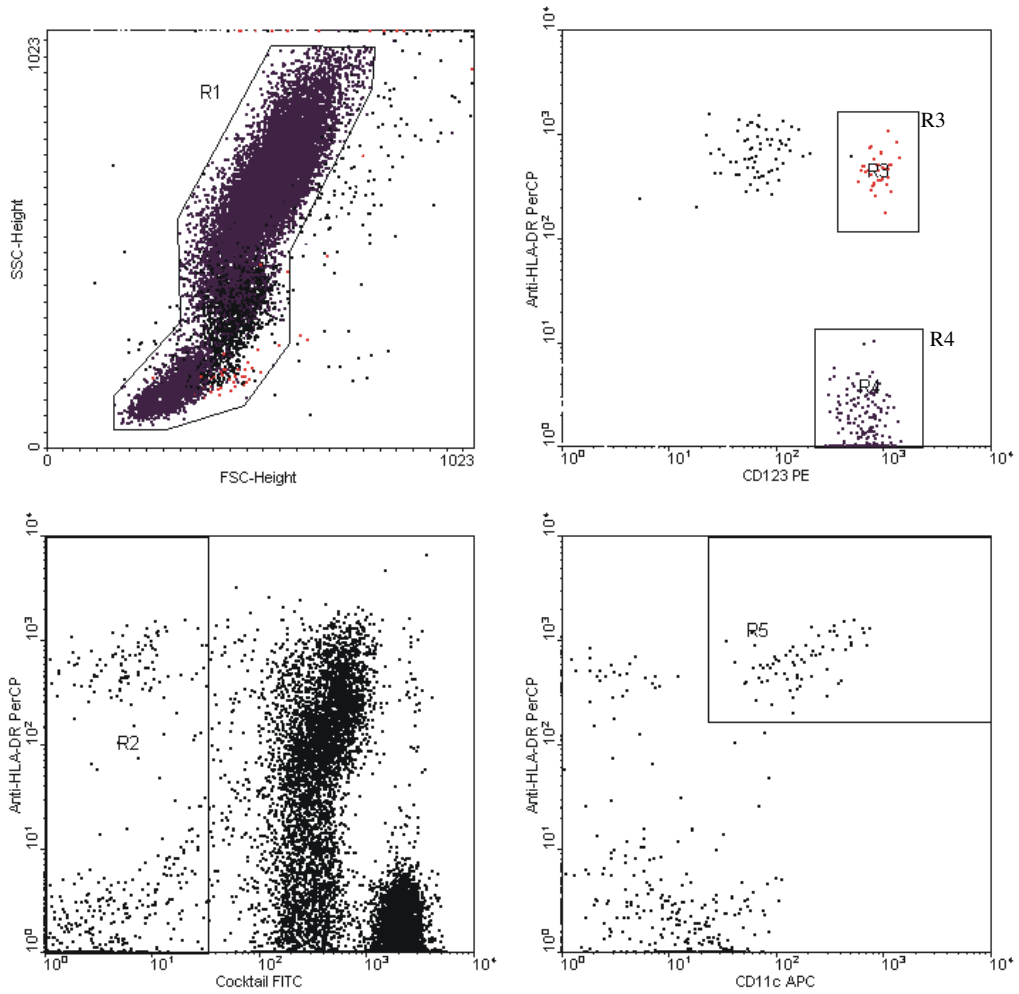
Die Trennung der Leukozyten von toten Zellen und Zelldebris erfolgte im Forward-Side-Scatter-Dot-Plot über R1. Da die beiden untersuchten Subpopulationen der dendritischen Zellen lin1-Cocktail negativ sind, wurde für die Identifikation der lin<sup>-</sup> Zellen der Dot Plot anti-HLA-DR-PerCP/lin1-Cocktail-FITC auf R1 gegatet (R2). Wie in Tafel 3 zu sehen, wurden die DC1 als HLA-DR<sup>+</sup> lin1<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> Zellen identifiziert und DC2 als HLA-DR<sup>+</sup> lin1<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> Zellen.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der CELLQuest<sup>TM</sup> Software Version 3.0 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Die angezeigten Werte geben den prozentualen Anteil der DC1 und DC2 an den Leukozyten im peripheren Blut an.

## **2.3. Isolieren dendritischer Zellen**

### **2.3.1. Probengewinnung**

Sobald die Messungen am Durchflusszytometer einen Anteil von mehr als ca. 0,1% der dendritischen Zellen an den Leukozyten ergaben, wurden dem Patienten wie unter 2.2.2. beschrieben am nächsten Tag drei bis vier Röhrchen Citratblut abgenommen. Für die Chimärismusanalysen nach sechs und zwölf Monaten wurde den Patienten im Rahmen der Routinenachuntersuchungen in der Transplantationsambulanz Blut an



**Durchflusszytometrische Messung von DC1 und DC2 im peripheren Blut am FACSCalibur™ :**

Die Dendriten zeigen sich als HLA-DR<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> Zellen in R2. DC1 sind HLA-DR<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> (R5), DC2 sind HLA-DR<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> (R3). In R4 sind basophile Monozyten zu sehen.

Tafel 3: Messung des Dendritengehaltes

einer peripheren Vene entnommen. Alle Proben wurden am selben Tag im Cellsorting-Labor der Medizinischen Klinik III verarbeitet.

### **2.3.2. Probenverarbeitung**

Zunächst erfolgte die Trennung der mononukleären Zellen aus dem Vollblut mittels Dichtezentrifugation. Dazu wurden in einem Probenröhrchen je 4 ml Citratblut vorsichtig auf 7 ml Lymphozyten-Separationsmedium (PAA Laboratories GmbH, Linz) pipettiert, so dass es zu keiner Vermischung kam. Anschließend wurde 20 Minuten bei 2000U/min zentrifugiert (Labofuge II, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Dann wurde die Schicht mononukleärer Zellen vorsichtig abgehoben und zweimal mit PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) gewaschen (Zentrifugation bei 2.000 U/min für je fünf Minuten). Über den Leukozytengehalt in der Zellsuspension (gemessen mit Cell Counter, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) wurde die nötige Antikörpermenge berechnet. Anschließend wurden die gewaschenen und in PBS suspendierten Zellen bei 4°C für 15 Minuten mit folgenden Antikörpern inkubiert: anti-HLA-DR-PerCP, lin1-FITC (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56), anti-CD11c-APC und anti-CD123-PE. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen (2.000 U/min für fünf Minuten) und für die Weiterverarbeitung am Cellsorter in PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) resuspendiert.

### **2.3.3. Isolieren von DC1 und DC2 mittels Cellsorting**

Das Sortieren der markierten mononukleären Zellen erfolgte im FACSVantage SE™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) des Cellsorting-Labors. Die Definition der Sortierungskriterien für den Cellsorter erfolgte durch die Identifizierung der Phänotypen der beiden Subtypen der dendritischen Zellen (DC1: HLA-DR<sup>+</sup> lin1<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>; DC2: HLA-DR<sup>+</sup> lin1<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>), wie unter 2.2.4. beschrieben.

Im Cellsorter wird die angesaugte Zellsuspension mit einer bestimmten Frequenz so in Schwingung versetzt, dass der Flüssigkeitsstrom kurz nach Durchlaufen einer Düse und Passieren eines Laserstrahls in einzelne, fast gleichförmige Tropfen aufgeteilt

wird. Jeder dieser Tropfen enthält genau eine Zelle. Die Strecke zwischen dem Punkt, an dem der Laser auf den Flüssigkeitsstrahl trifft, und dem Abrisspunkt kann exakt bestimmt werden, so dass der Cellsorter die Zeit zwischen der Erfassung durch den Laser und dem Tropfenabriss berechnen kann. Erfasst der Laser eine Zelle mit den bereits definierten Sortierungskriterien, dann wird dem Tropfen im Moment des Abrisses ein Spannungsimpuls vermittelt, der dem Tropfen eine Oberflächenladung gibt. Dadurch kann der Tropfen an den nun folgenden elektrischen Ablenkungsplatten durch das Anlegen einer entsprechenden Spannung in die gewünschte Richtung abgelenkt werden, so dass er in einem der zwei darunter installierten Sammelröhrchen landet. Ungeladene Tropfen, also solche, die nicht den Sortierungskriterien entsprechen, landen unabgelenkt in einem Abfallröhrchen in der Mitte.

Das Sortieren der beiden Populationen erfolgte simultan in je ein mit PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) gefülltes Sammelröhrchen. Die anschließend durchflusszytometrisch bestimmte Reinheit der dendritischen Zellen lag immer über 95% (Tafel 4).

### **2.3.4. Morphologie von isolierten dendritischen Zellen**

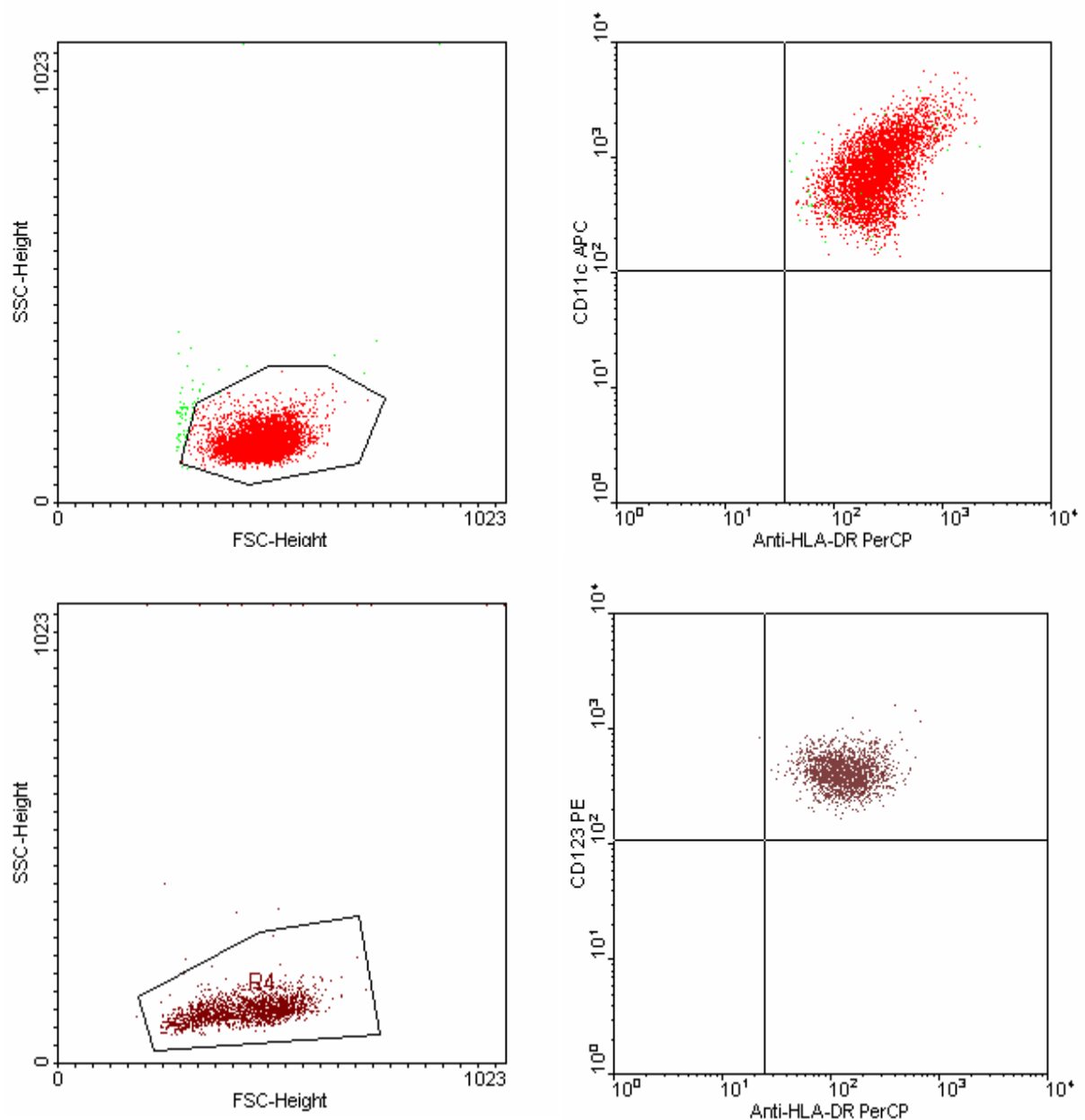
#### *2.3.4.1. Pappenheim-Färbung*

Die sortierten, in PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) suspendierten dendritischen Zellen wurden mit einer Zytocentrifuge (800 U/min, Shandon Labortechnik GmbH, Berlin) auf einen Objektträger aufgebracht. Das so hergestellte Zytospinpräparat wurde nach Pappenheim gefärbt.

Ein solches Präparat von isolierten DC2 ist in Tafel 5 zu sehen.

#### *2.3.4.2. Morphologie nach Kultivierung mit TNF- $\alpha$*

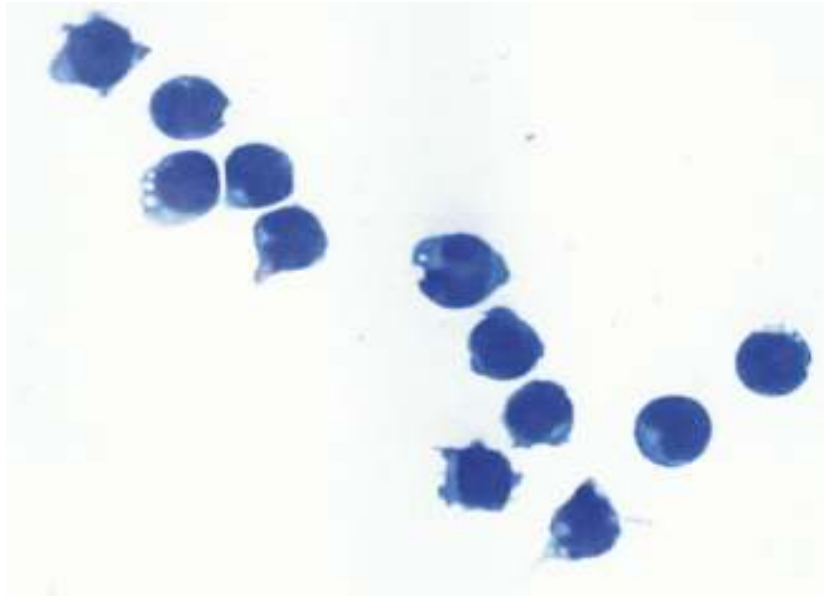
Die sortierten Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  inkubiert, um zu zeigen, dass diese tatsächlich dendritische Zellen sind. Im peripheren Blut sind dendritische Zellen



### **Isolierung von DCs aus peripherem Blut und deren Reinheit:**

Bei den dargestellten Dot Plots handelt es sich um die durchflusszytometrische Messung (siehe auch 2.2.4. und Tafel 3) der DCs, die mittels Cellsorting (FACSVantage SE<sup>TM</sup>, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) aus peripherem Blut isoliert wurden. In den beiden oberen Grafiken sind isolierte DC1 zu sehen, die unteren Grafiken zeigen isolierte DC2. Die Reinheit der DC1 lag bei 98,2%, die der DC2 bei 95,6%.

Tafel 4: **Isolierung und Reinheit der DCs**



### **Pappenheim-Färbung von direkt aus peripherem Blut isolierten DC2**

Die beiden Abbildungen zeigen nach Pappenheim gefärbte DC2. Deren lichtmikroskopisch erkennbare Morphologie stimmt auch mit der Lage der dendritischen Zellen im Forward-Side-Scatter überein: der Zellkern ist groß und leicht eingekerbt, es finden sich perinukleäre Aufhellungen und ein schmaler Zytoplasmasaum.

Tafel 5: **Pappenheim-Färbung von DC2**

funktionell unreif (*Kohrgruber et al., 1999*), reifen aber in-vitro in Gegenwart von TNF- $\alpha$  und entwickeln darüber hinaus auch ihre charakteristische Morphologie (*Auffermann-Gretzinger et al., 2002*). Nach dem Sortieren wurden die in PBS (0,09% Natrium, 0,5% BSA) suspendierten Zellen in RPMI + 10% FCS zusammen mit TNF- $\alpha$  (10 $\mu$ g/ml auf 10<sup>5</sup> Zellen/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Mit den kultivierten DCs wurde ein Zytospinpräparat angefertigt (800 U/min, Zytozentrifuge, Shandon Labortechnik GmbH, Berlin), das nach Pappenheim gefärbt wurde. Tafel 6 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme einer DC2 nach 24-stündiger Kultivierung mit TNF- $\alpha$ .

#### 2.3.4.3. *Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach Kultivierung mit TNF- $\alpha$*

Wie unter 2.3.4.2. beschrieben, wurden die dendritischen Zellen mit TNF- $\alpha$  kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 2%-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensen-Phosphat-Puffer (Lösung A {9,078 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml Aqua dest.} und Lösung B {11,876 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1000 ml Aqua dest.} gemischt auf pH 7,4) fixiert. Um eine höhere Zelldichte in den Schnittpräparaten zu erlangen, wurde die Suspension für 24 Stunden auf Transwell-Filtereinsätze (Falcon, Porengröße 5  $\mu$ m) gegeben, so dass die Zellen adhärirten. Anschließend wurden die Zellen auf den Filtern für zweimal zehn Minuten in einer Sörensen-Phosphat-Pufferlösung (pH 7,4) gewaschen.

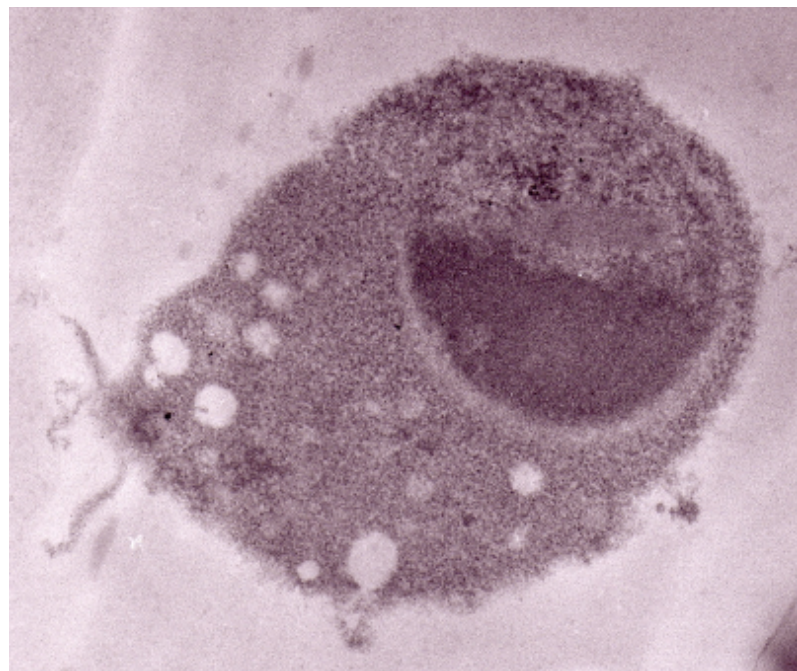
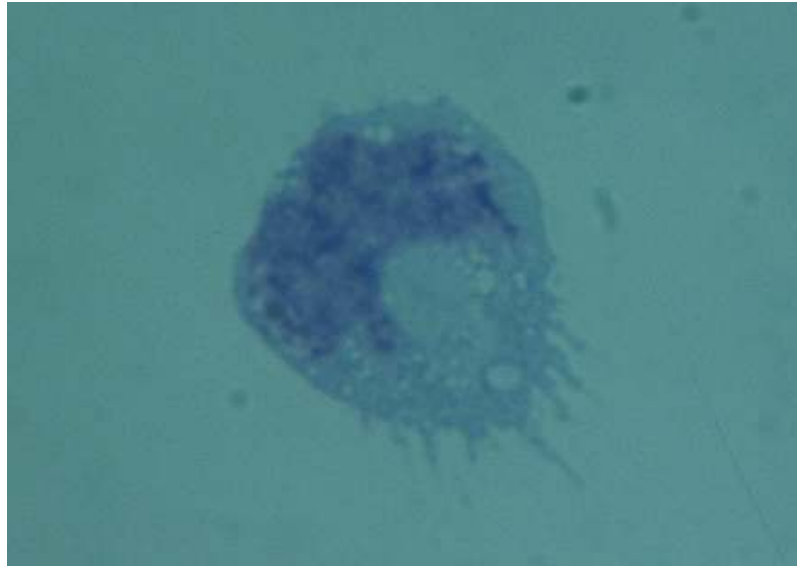
Nach dem Waschen der Proben wurden diese zwei Stunden in 2%igem Osmiumtetroxid in Sörensen-Phosphat-Puffer kontrastiert und danach erneut zweimal zehn Minuten in Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 90%iges unvergälltes Äthanol) für jeweils zweimal zehn Minuten, dreimal 20 Minuten in 100%igem unvergälltem Äthanol und einmal 20 Minuten in 100%igem wasserfreiem Äthanol. Dann wurde das Äthanol gegen Propylenoxid ausgetauscht, indem die Proben für zweimal 20 Minuten in Propylenoxid (1,2Propylenoxid, Firma E. Merck, Darmstadt) übertragen wurden.

Für die Einbettung in Propylenoxid-Araldit wurde Araldit (Araldite CY 212, Serva, Heidelberg) mit DDSA (Dodecenybernsteinsäure) (Serva) im Verhältnis 52 % : 48 % gemischt und 3 % Beschleuniger (Araldite-accelerator DY 946, Serva) zugesetzt und anschließend 1:1 mit Propylenoxid verdünnt. In diese Lösung wurden die Proben übertragen und über Nacht offen stehen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Einbettung in reines Araldit, das zuvor im Verhältnis 52 % : 48 % mit DDSA gemischt und mit 2 % Beschleuniger versetzt wurde. Die Proben wurden für ca. vier bis sechs Stunden in diese Lösung übertragen. Danach wurde Araldit mit 2 % Beschleuniger frisch zubereitet und die Objekte darin eingebettet. Anschließend wurde 48 Stunden bei 60°C polymerisiert.

Nach der Trimmung der auspolymerisierten Präparate mit einer Rasierklinge wurden die Semidünnschnitte mit einem Glasmesser im Reichert-Jung-Ultramikrotom abgenommen, anschließend getrocknet und mit Toloidinblau gefärbt. Die Ultradünnschnitte wurden ebenfalls im Reichert-Jung-Ultramikrotom mit einem Diamantmesser abgenommen und auf Kupfernetzchen (Grids) aufgezogen. Die anschließende Kontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte im Reichert-Jung-Ultrastainer. Dazu wurde eine Stunde bei 40°C mit Uranylacetat und anschließend 20 Minuten bei 20°C mit Bleicitrat (nach Reynolds) kontrastiert.

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung und Aufnahme der Fotos der Präparate erfolgte im Elektronenmikroskop Philips CM 10 bei einer Vergrößerung von 35.000 und 48.000. Die untere Abbildung in Tafel 6 zeigt eine dendritische CD123<sup>+</sup> Zelle bei einer 35.000-fachen Vergrößerung.





### **Dendritische Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$**

Die obere Abbildung zeigt eine nach Papanheim gefärbte dendritische Zelle, die 24 Stunden lang mit TNF- $\alpha$  inkubiert wurde. Im Bereich des unteren Zellpols sind die typischen Ausläufer der dendritischen Zellen zu erkennen.

Die untere Abbildung zeigt eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer ebenfalls mit TNF- $\alpha$  inkubierten DC2 bei einer 35.000-fachen Vergrößerung. Durch die für diese Aufnahme notwendigen, zahlreichen Arbeitsschritte ist die Zelle sichtbar geschädigt.

Tafel 6: Morphologie von in TNF- $\alpha$  inkubierten DC2

## **2.4. Isolieren der T-Zellen**

### **2.4.1. Probengewinnung**

Für die T-Zell-Chimärismusuntersuchungen am Tag +30 wurde den Patienten, wie unter 2.2.2. beschrieben, 50 ml heparinisiertes Vollblut abgenommen. Für die Chimärismusuntersuchungen nach sechs Monaten wurde das Blut im Rahmen der Routineuntersuchungen in der Transplantationsambulanz an einer peripheren Vene entnommen.

### **2.4.2. Probenverarbeitung**

Zunächst erfolgte die Trennung der mononukleären Zellen aus dem Vollblut mittels Dichtezentrifugation. Dazu wurden zunächst die 50 ml heparinisiertes Blut mit 50 ml PBS (Dulbecco; Zusammensetzung: NaCl 8000 mg/l, KCl 200mg/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1150 mg/l) versetzt. Dann wurden in drei 50 ml Probenröhrchen je 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium (PAA Laboratories GmbH, Linz) mit je 33 ml Blut vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde 20 Minuten bei 2.000U/min zentrifugiert (Rotanta 96 RC, Hettich GmbH, Tuttlingen). Dann wurde die Schicht mononukleärer Zellen vorsichtig abgehoben und dreimal mit PBS (Dulbecco) gewaschen (Zentrifugation bei 2.000 U/min für je zehn Minuten).

Anschließend wurden die mononukleären Zellen, abhängig von der mit der Neubauer-Zählkammer bestimmten Zellzahl, mit CD3-Microbeads (20µl/1,52·10<sup>7</sup> Zellen, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach) versetzt und für 15 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde die Suspension mit MACS-Puffer (Zusammensetzung: 500 ml PBS (Dulbecco), 2 ml EDTA (0,5mM), 2,5 ml FCS) gewaschen (Zentrifugation bei 2.000 U/min für zehn Minuten) und der Überstand abgeschüttet. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer nach Neubauer wurden die Zellen, abhängig von der Zellzahl, wieder mit MACS-Puffer (80 µl/1,52·10<sup>7</sup> Zellen) aufgeschwemmt.

### **2.4.3. Isolieren von T-Zellen mit dem Miltenyi-System**

Die resuspendierten mononukleären Zellen wurden dann von oben in eine magnetische Säule (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) eingefüllt. Bis zu einer Zellzahl von  $10^7$  positiven Zellen wurde die MS<sup>+</sup>/RS<sup>+</sup>-Säule verwendet, lag die Zellzahl darüber, kam die LS<sup>+</sup>/VS<sup>+</sup> Säule zum Einsatz. Die Säulen wurden durch einen Waschvorgang mit MACS-Puffer (0,5 ml bei der kleinen, 3 ml bei der großen Säule) vorbereitet. Anschließend wurden die in MACS-Puffer resuspendierten Zellen in ausreichender Menge (kleine Säule 0,5 ml, große Säule 1-10 ml) in die Säulen eingebracht. Durch die Lage der Säulen innerhalb eines angelegten Magnetfeldes blieben mit CD3-Microbeads markierte CD3<sup>+</sup> Zellen, also T-Zellen, in der Säule, wohingegen CD3<sup>-</sup> Zellen durch die Säulen in ein Auffangbehältnis liefen. Um alle CD3<sup>-</sup> Zellen aus den Säulen zu entfernen, wurde bei der kleinen Säule mit 0,5 ml und bei der großen Säule mit 3x3 ml MACS-Puffer nachgespült. Danach wurde die Säule mit den enthaltenen CD3<sup>+</sup> Zellen aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit MACS-Puffer (1 ml bei der kleinen Säule, 5 ml bei der großen Säule) aus der Säule in ein mitgeliefertes Auffangbehältnis heraus gespült.

Anschließend wurde die Zahl der sortierten T-Zellen mit der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

### **2.4.4. Chimärismusanalyse von T-Zellen**

Bei gegengeschlechtlicher Transplantation wurden die Chimärismusanalysen mittels FISH durchgeführt (siehe 2.5.1.), bei gleichgeschlechtlicher Transplantation wurden die Chimärismusanalysen mittels STR-PCR (siehe 2.5.2.) durchgeführt. Die unter 2.5.1. und 2.5.2. beschriebenen Methoden treffen auch für die T-Zellen zu.

## 2.5. Chimärismusanalysen

### 2.5.1. Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)

Nach einer Transplantation, bei der der Empfänger Knochenmark oder Blutstammzellen von einem gegengeschlechtlichen Spender erhalten hat, kann man die Chimärismusanalysen durch die Detektion der Geschlechtschromosomen X und Y durchführen. Verschiedene Methoden stehen einem dazu zur Verfügung, wie z.B. zytogenetische Untersuchungen (*Lawler et al., 1984; Walker et al., 1986*) oder Assays, die auf PCR-Technik basieren (*Fehse et al., 2001*). In den meisten Labors hat sich jedoch die FISH-Untersuchung für Chimärismusanalysen durchgesetzt. Das liegt zum einen an ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit, und zum anderen an der guten Korrelation ihrer Ergebnisse mit den Ergebnissen aus STR-PCR-Untersuchungen (*Thiede et al. 1999, Thiede et al. 2001*).

Nachdem die dendritischen Zellen in ein Probenröhrchen mit PBS-Puffer (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) sortiert waren (siehe 2.3.3.), wurde daraus mittels einer Zytocentrifuge (800 U/min, Shandon Labortechnik GmbH, Berlin) ein Zytospinpräparat hergestellt. An je zwei Stellen des Objektträgers wurden die DCs durch Zentrifugation aufgetragen. Anschließend wurden unter einem Lichtmikroskop (Axioskop 20, Fa. Carl Zeiss, Jena) bei zehnfacher Vergrößerung die Bereiche, in denen ausreichend viele Zellen gut verteilt nebeneinander lagen, aufgesucht und auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantkratzer umfahren.

Nachdem die markierten Präparate getrocknet waren, erfolgte die Fixierung in einer Lösung aus Methanol und Eisessigsäure für 20 Minuten (Fixierlösung: Methanol : Eisessigsäure 3:1, Merck KGaA, Darmstadt). Danach wurden die Präparate in einer 4°C kalten, aufsteigenden Alkoholreihe (70% / 80% / 90% / 100% Ethanol) je eine Minute lang gewaschen. Auf die trockenen Objektträger wurden dann an den markierten Stellen je 2 µl der zuvor aufgetauten Sonden (CEP® X SpectrumOrange™ DNA Probe (Zentromerregion Xp11.1-q11.1) und CEP® Y SpectrumGreen™ DNA Probe (Satellit III, Yq12), Vysis GmbH, Bergisch Gladbach) aufgebracht, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt, welches sogleich mit Fixogumm abgedichtet wurde. Sofort danach wurde der Objektträger für drei Minuten zur

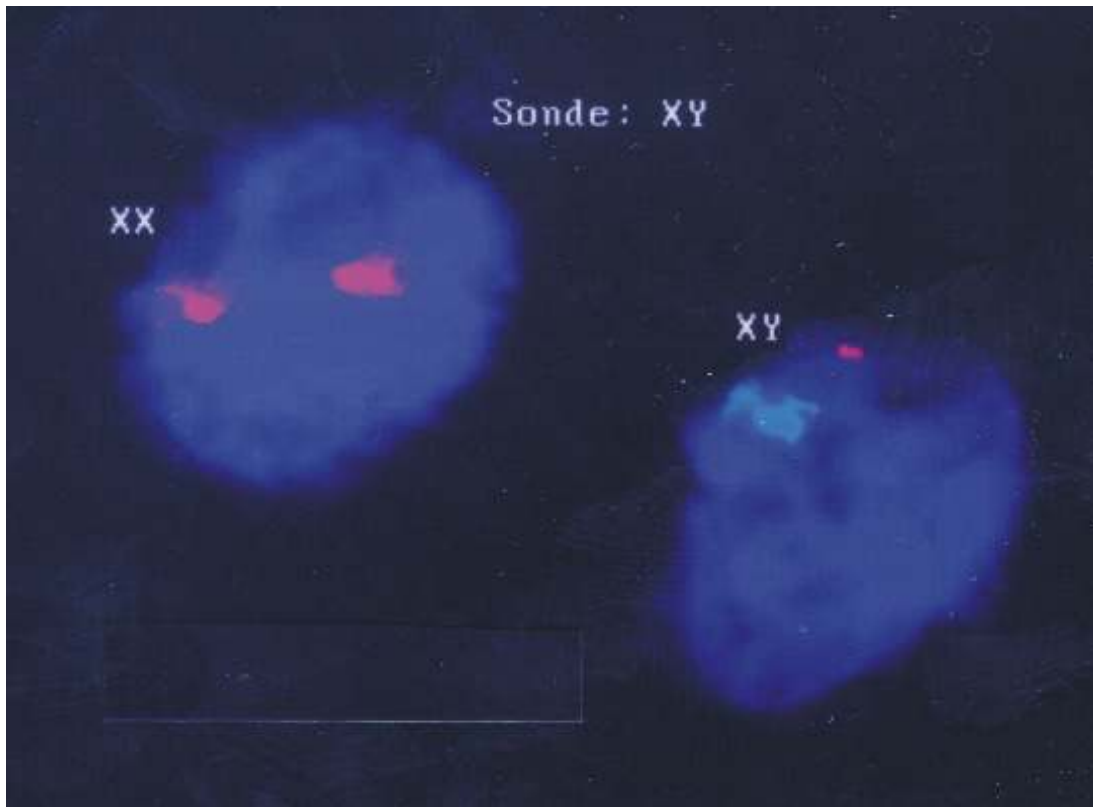
Hybridisierung in den Hybrite (76°C) gelegt und für zehn Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) aufbewahrt.

Nach zehn Stunden im Brutschrank wurden das Deckglas und das Fixogumm entfernt und das Präparat zwei Minuten in 75°C warmer 0,4% SSC Lösung gewaschen. Anschließend wurde das Präparat denaturiert (eine Minute in 2x SSC / 0,1% NP 40 bei Raumtemperatur). Die 20x-SSC-Stammlösung wird aus folgenden Bestandteilen hergestellt: 175,35 g NaCl plus 88,2 g tri-Na-Citrat-Dihydrat (beides Merck KGaA, Darmstadt) gelöst in 1000 ml Aqua dest (pH 7,0). Zur Herstellung der 0,4% SSC Waschlösung (pH 7,0-7,5) wurden 20x-SSC-Stammlösung und Aqua dest. im Verhältnis 2:98 gemischt. Die Denaturierungslösung setzte sich aus 900 ml Aqua dest., 100 ml der 20x-SSC-Stammlösung und 1000 µl NP 40 (nicht ionisches Detergenz, Vysis GmbH, Bergisch Gladbach) zusammen.

Auf die getrockneten Präparate wurden an den markierten Stellen je zwei Tropfen DAPI-Antifade (125 ng/ml DAPI = blaufluoreszierendes 4,6-Diamidino-2-Phenylindole als spezifischer DNA-Farbstoff gelöst in 1,4-Diaminobenzol, Dihydrochlorid, Glyzerol und Puffer; Vysis GmbH, Bergisch Gladbach) aufgetropft und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Bis zur Mikroskopie wurden die Präparate trocken und dunkel bei 4°C aufbewahrt.

Die Chimärismusanalysen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20, Fa. Carl Zeiss, Jena; Übersicht mit zehnfacher Vergrößerung, Auszählung bei 63-facher Vergrößerung mit Ölimmersion) des Cellsorting-Labors durchgeführt, wobei mindestens 100 Interphasekerne ausgezählt wurden.

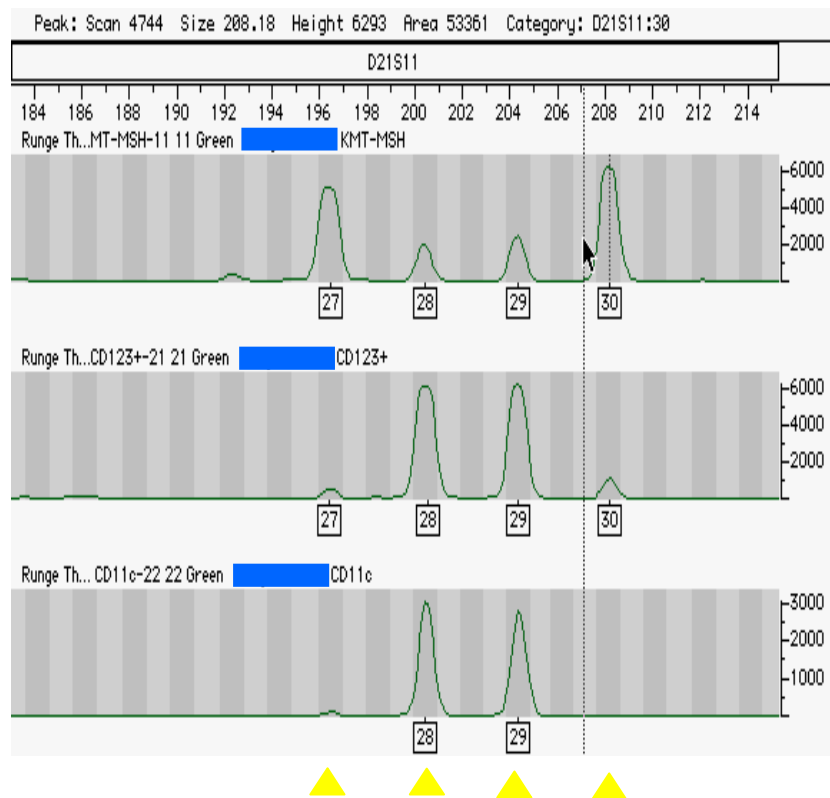
Tafel 7 zeigt zwei Interphasekerne (63-fache Vergrößerung) bei einer Chimärismusanalyse mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung am Tag +55 nach einer Transplantation peripherer Blutstammzellen. Bei der hier untersuchten Subpopulation DC2 ist neben einer dendritischen Zelle des männlichen Spenders (XY) auch noch eine residuale Zelle der Patientin (XX) zu sehen, womit definitionsgemäß ein gemischter Chimärismus vorliegt.



Nach gegengeschlechtlicher Transplantation wurden die Chimärismusanalysen an Zytospinpräparaten von DC1 und DC2 mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung durchgeführt. Die Zuordnung der Zellen zu Spender oder Empfänger erfolgt durch Identifizierung der Geschlechtschromosomen X und Y, die durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden markiert werden können.

Auf der Abbildung der FISH-Untersuchung von DC2 ist neben einer männlichen Zelle des Spenders (rechts) auch eine weibliche Zelle der Empfängerin (links) zu sehen, womit definitionsgemäß ein gemischter Chimärismus vorliegt.

Tafel 7: **Chimärismusanalyse mittels FISH**



Die Grafik zeigt das Ergebnis einer STR-PCR-Untersuchung des Locus D21S11. Bei den DC1 (CD11c<sup>+</sup>) sind nur Merkmale des Spenders (S; 28/29) vorhanden, das heißt ein vollständiger Chimärismus liegt vor. Im Gegensatz dazu sind in den DC2 (CD123<sup>+</sup>) Merkmale des Spenders (S; 28/29) und des Empfängers (E; 27/30) zu finden. Die Quantifizierung des gemischten DC2-Chimärismus anhand der Flächen unter den Peaks ergab folgendes Verhältnis von Spender- zu Empfängermerkmalen: 93% (±5%) : 7% (±7%). Die ebenfalls untersuchte Mundschleimhaut zeigte auch eine Mischung von Spender- und Empfängermerkmalen.

Die Zahlen (27, 28, 29, 30) geben die Anzahl der repetitiven Sequenzen der untersuchten Tetranukleotide an. Darin unterscheiden sich Spender und Empfänger.

Tafel 8: Chimärismusanalyse mittels STR-PCR

## 2.5.2. Polymerasekettenreaktion von Short-Tandem-Repeats

### (STR-PCR)

PCR-basierte Methoden eignen sich besonders gut für Chimärismusanalysen nach der gleichgeschlechtlichen Transplantation von allogenen hämatopoetischen Zellen. Es besteht zum einen die Möglichkeit die VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) zu untersuchen und zum anderen die STRs (Short-Tandem-Repeats) zu untersuchen, die eine qualitative und quantitative Chimärismusanalyse ermöglichen.

Short-Tandem-Repeats bestehen aus hochpolymorphen, repetitiven Di-, Tri- und Tetranukleotidsequenzen verschiedener Länge, die als Teil der nicht kodierenden DNA verstreut inseriert sind (*Thiede et al., 1999*). Bei der Chimärismusanalyse über STRs werden die unterschiedlichen Längen dieser detektiert, da sich hierin Spender und Empfänger unterscheiden. Da diese sensitive Methode auch geschlechtsunabhängig funktioniert, hat sie ihren Weg von der forensischen Medizin in Transplantationsmedizin gefunden (*Antin et al., 2001*).

Nach dem Isolieren der dendritischen Zellen (siehe 2.2.3.) wurde mit dem QIAamp Blood Kit (Fa. Qiagen, Hilden) die DNA dieser isoliert. Mit einem Amplifikationskit wurde je 1 ng amplifiziert (AmpFISTR Profiler Plus PCR Amplification Kit; Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt). Anschließend wurde die Kapillarelektrophorese auf 6% Polyacrylamid/Bisacrylamid-(19:1)-Gel (plus 8 M Urea und TBE Puffer) durchgeführt. Die separierten PCR-Produkte wurden mit einem ABI-373-Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Statistisch ausgewertet wurden die Ergebnisse mit dem Computerprogramm HWE Analysis. (*Keil et al., 1999*; *Anslinger et al., 2001*)



DNA-Systeme	A.L. DC1 CD11c+	A.L. DC2 CD123+	A.L. T-Zellen CD3+	A.L. Mundschleim- haut	A.L. Befund vor KMT GA00K25504
D3S1358	16 / 18	16 / 18	16 / 18	16 / 18	16 / 16
VWA	18 / 19	18 / 19	18 / 19	18 / 19	18 / 19
FIBRA	21 / 22	21 / 22	21 / 22	21 / 22	21 / 22
D8S1179	9 / [13] / 15	9 / [13] / 15	9 / 15	9 / 13 / 15	13 / 15
D21S11	28 / [30] / 32.2	28 / [30] / 32.2	28 / 32.2	28 / 30 / 32.2	28 / 30
D18S51	12 / 14	12 / 14	12 / 14	12 / 14	12 / 14
D5S818	11 / [12]	11 / [12]	11 / 11	11 / 12	11 / 12
D13S317	8 / 14	8 / 14	8 / 14	8 / 14	14 / 14
D7S820	9 / 12	9 / 12	9 / 12	9 / 12	9 / 12

GA-Nr.	Befund vom	Material	Anteil eigene Merkmale	Anteil Spender- merkmale
01K25613	24.10.01	CD11c+	20 ± 5 %	80 ± 5 %
01K25613	24.10.01	CD123+	6 ± 3 %	94 ± 3 %

Bei dieser Patientin erfolgte die Chimärismusanalyse mittels STR-PCR, wobei die T-Zellen und die dendritischen Zellen untersucht wurden. Um im Rahmen der Chimärismusanalyse Empfänger- und Spendermerkmale vergleichen zu können, wurden DNA-Merkmale herangezogen, die man vor der Transplantation aus mononukleären Zellen gewonnen hatte (siehe „Befund vor KMT“).

Bei den untersuchten T-Zellen lag ein kompletter Chimärismus vor, bei den DC1 (CD11c<sup>+</sup>) und den DC2 (CD123<sup>+</sup>) ein gemischter. In welchem Verhältnis Spender- und Empfängermerkmale zueinander standen, ist der unteren Tabelle zu entnehmen.

Nach der Transplantation lag bei der mituntersuchten Mundschleimhaut ebenfalls eine Mischung von Spender- und Empfängermerkmalen vor.

Tafel 9: **Befundbericht einer Chimärismusanalyse mittels STR-PCR**

Im Rahmen der STR-PCR wurden bis zu neun verschiedene tetramere STR-Loci untersucht (siehe Tafel 9): D3S1358, VWA, FIBRA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 und D7S820. Um eine quantitative und qualitative Chimärismusanalyse anhand von Vergleichsmaterial zu ermöglichen, wurde in der Regel vor der Transplantation eine STR-PCR an mononukleären Zellen durchgeführt. Wenn kein Vergleichsmaterial aus der Zeit vor der Transplantation zur Verfügung stand, wurde eine STR-PCR an Haarwurzeln oder Mundschleimhaut des Patienten nach der Transplantation durchgeführt.

In Tafel 8 ist das Ergebnis einer Chimärismusanalyse mittels STR-PCR zu sehen und in Tafel 9 ein typischer Befundbericht einer solchen Untersuchung.

### **2.5.3. Definitionen**

Die Bestimmung des Chimärismus erfolgte unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten. Definitionsgemäß besteht ein kompletter Chimärismus, wenn das Ergebnis einer STR-PCR nach gleichgeschlechtlicher Transplantation nur DNA-Merkmale des Spenders aufwies bzw. bei der FISH-Analyse nach gegengeschlechtlicher Transplantation ausschließlich Spenderkerne gefunden werden konnten. Bei der FISH Analyse wurden jeweils mindestens 100 Interphasekerne pro DC-Subset ausgezählt. Beim quantitativen Chimärismus wurde jeweils das Verhältnis von Empfänger- zu Spendermerkmalen (PCR) bzw. das Verhältnis von Empfänger- zu Spenderkernen (FISH) prozentual angegeben.

## 2.6. Datenauswertung

Die Auswertung der Daten wurde mit SPSS 11.5 für Windows (Version 11.5, SPSS Software GmbH, München) auf einem Laptop (TOSHIBA SATELLITE 5200 W903, Betriebssystem Windows XP Home) durchgeführt.

Bei den Ergebnissen handelt es sich, soweit nicht anders angegeben, um die jeweiligen Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD). Um Mittelwerte zwischen zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Für den Vergleich von qualitativen Merkmalen oder dichotomisierten Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewendet. Die Dauer des Rezidiv-freien und des Gesamtüberlebens sind als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, statistische Unterschiede wurden in diesen Fällen mit dem log-rank-Test analysiert. Alle p-Werte sind zweiseitig angegeben, wobei das Signifikanzniveau bei  $p=0,05$  liegt, das heißt, alle Werte für  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 3. Ergebnisse

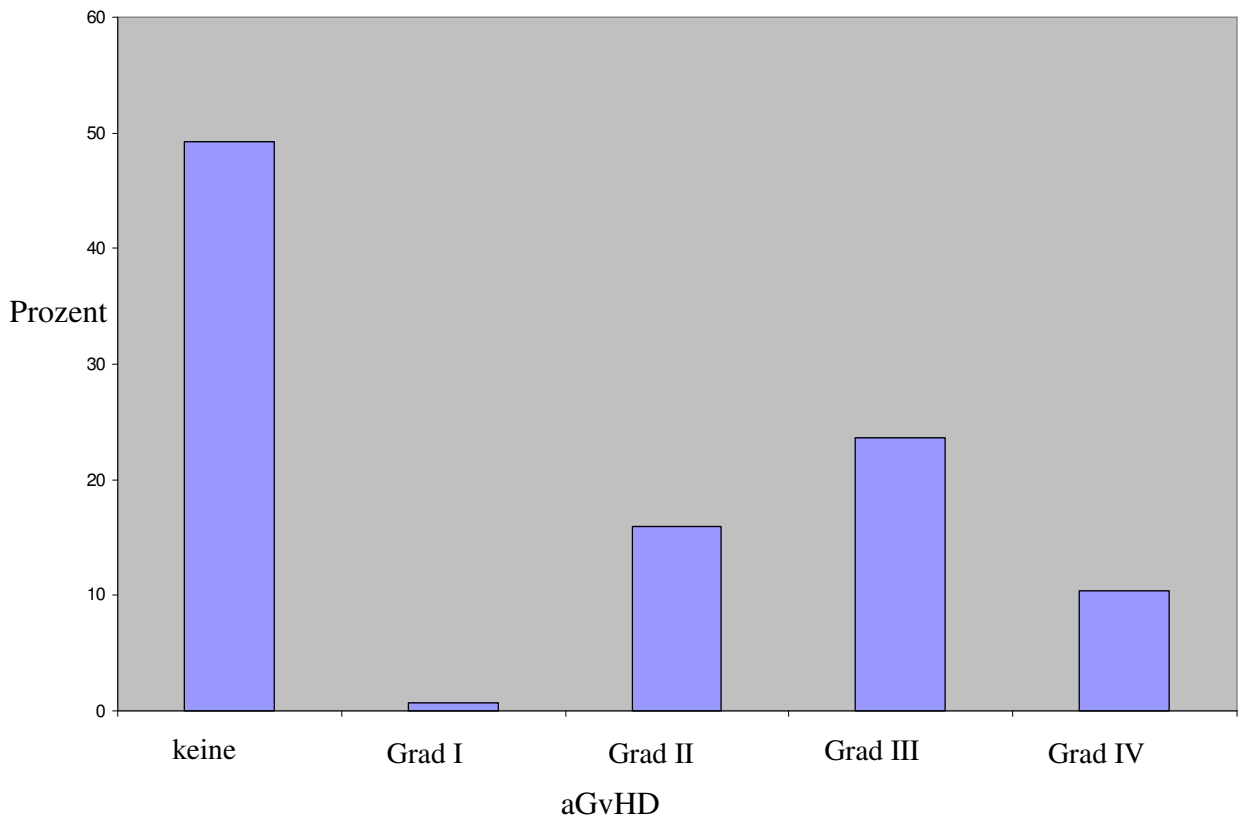
### 3.1. Patienten

Im Rahmen der Studie wurden zwischen April 1999 und April 2002 insgesamt 144 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen transplantiert und nach allogener Transplantation analysiert. Der Anteil der Männer unter den Transplantierten ist deutlich größer als der der Frauen (63,2% vs. 36,8%). Das durchschnittliche Alter lag bei 42,8 Jahren zum Zeitpunkt der Transplantation. 79 Patienten (54,9%) erhielten das Transplantat von einem Verwandten, 65 (45,1%) von einem Fremdsponder, wobei in 125 Fällen (86,8%) Spender und Empfänger HLA-ident waren. 19 Patienten (13,2%) bekamen ein nicht HLA-identenes Transplantat. 43,75% (n=63) der Transplantate waren Knochenmark, 56,25% (n=81) periphere Blutstammzellen. Die zugrunde liegenden Krankheiten und Konditionierungsschemata sind Tafel 2 zu entnehmen.

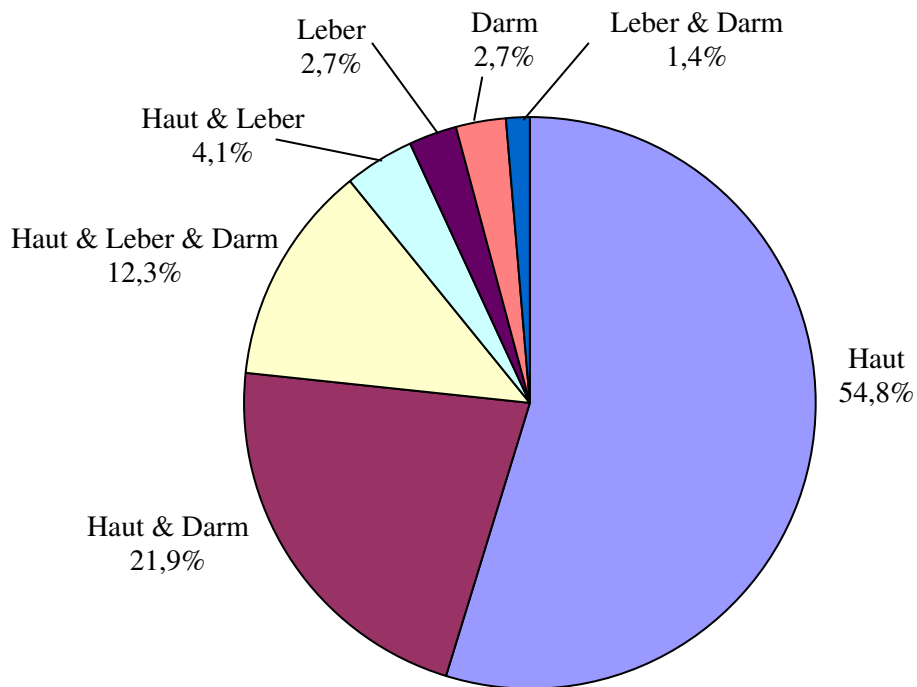
Bei insgesamt 73 Patienten (50,7%) trat im Verlauf eine akute Graft-versus-Host-Erkrankung auf. Ein (0,7%) Patient hatte eine aGvHD Grad I, 23 (16%) hatten Grad II, 34 (23,6%) Grad III und 15 (10,4%) Grad IV. Das am häufigsten betroffene Organ war die Haut (40 Patienten (54,8%)), gefolgt von Haut und Darm (16 Patienten (21,9%)) und Haut, Leber und Darm (neun Patienten (12,3%)). Im Mittel wurde die aGvHD am Tag +22 nach der Transplantation diagnostiziert (MW = 21,55; 4 – 68; SD 12,9). Tafel 10 gibt einen Überblick über Häufigkeiten und Organverteilung der akuten Graft-versus-Host-Erkrankung.

39 Patienten (27,1%) entwickelten im Verlauf eine chronische Graft-versus-Host-Erkrankung. Bei 17 Patienten (11,8%) war diese lediglich mild, 22 Patienten (15,3%) hatten eine schwere cGvHD. In 23 Fällen (59,0%) handelte es sich um eine cGvHD de novo, also eine cGvHD, die sich erst ab dem Tag +100 entwickelte. Bei den anderen 16 Patienten (41%) mit einer cGvHD entwickelte sich diese aus einer aGvHD. Haut sowie Haut und Leber waren auch bei der cGvHD die am häufigsten betroffenen Organe. Einen Überblick über die von der cGvHD

### Inzidenz der aGvHD (n=144)

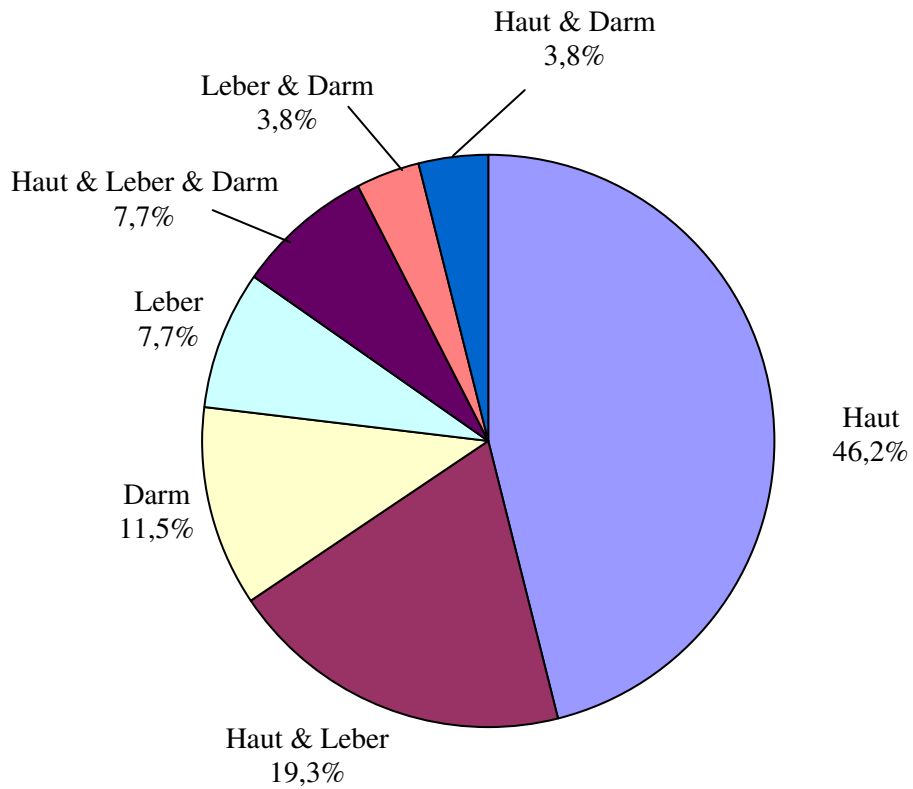


### Von aGvHD betroffene Organe (n=73)

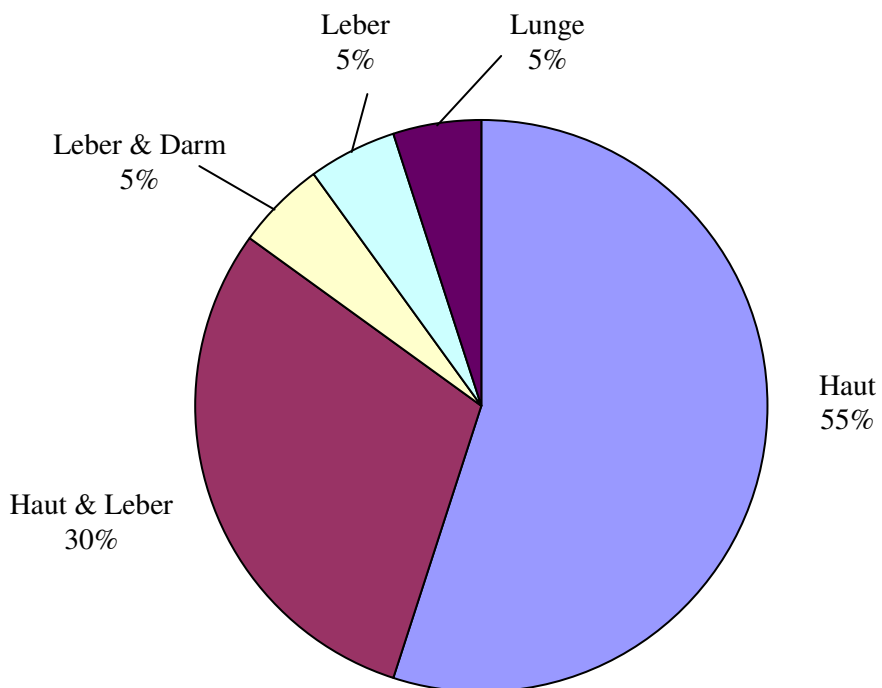


Tafel 10: Akute Graft-versus-Host-Erkrankung

**Von cGvHD betroffene Organe nach sechs Monaten (n=26)**



**Von cGvHD betroffene Organe nach zwölf Monaten (n=20)**

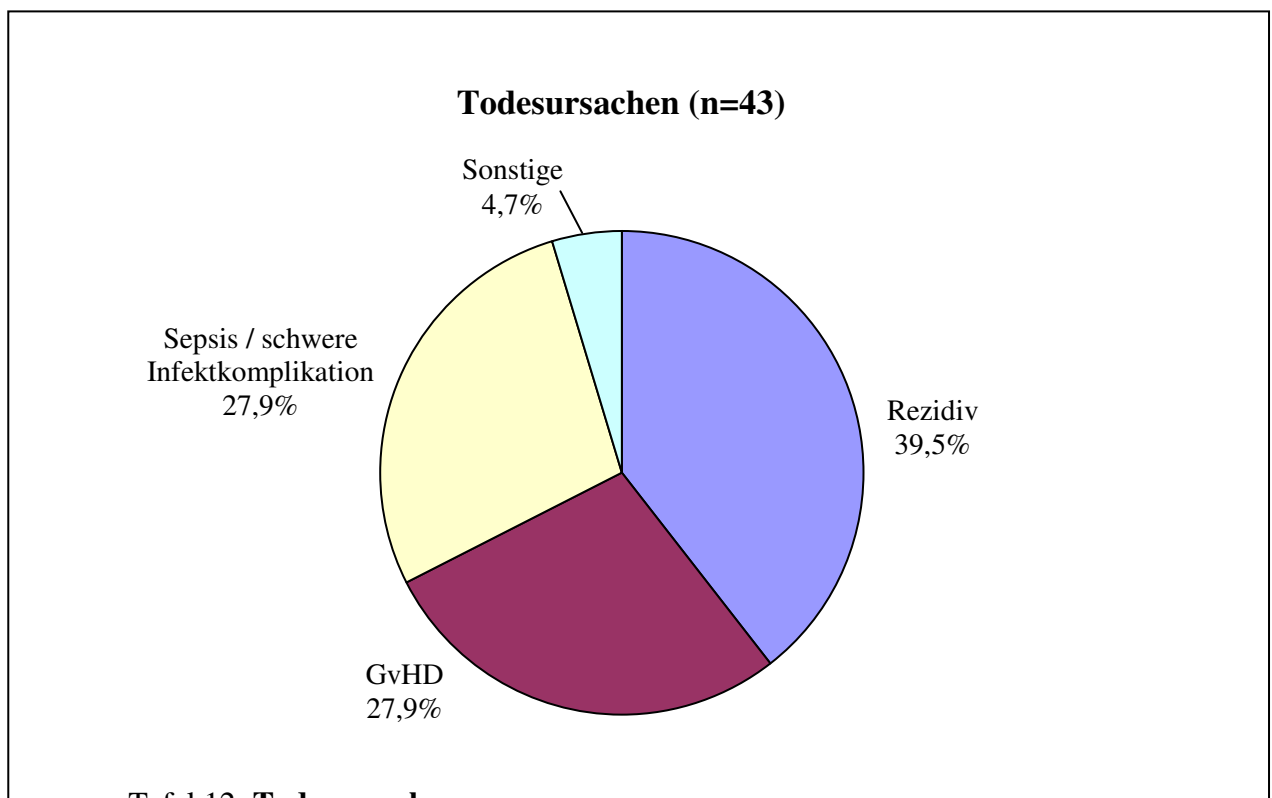


Tafel 11: Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

betroffenen Organe nach sechs und zwölf Monaten verschafft Tafel 11.

Bei 25 der 144 Patienten (17,4%) wurde innerhalb des Beobachtungszeitraums ein Rezidiv diagnostiziert, wobei es sich sowohl um hämatologische, zytogenetische als auch um molekularbiologische Rezidive handelte. Die Letalität bei einem Rezidiv der Grunderkrankung lag bei 68,0% (17 der 25 Patienten mit Rezidiv).

Insgesamt verstarben 43 Patienten (29,9%) innerhalb der ersten 12 Monate nach der Transplantation. Führende Todesursache war das Rezidiv (17 Patienten), gefolgt von Sepsis bzw. schwerer Infektkomplikation und GvHD (jeweils zwölf Patienten). Einen Überblick über die Verteilung der Todesursachen gibt Tafel 12.



## **3.2. Kinetik der Chimärismen nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation**

### **3.2.1. Kinetik der Chimärismen beim Engraftment**

#### **3.2.1.1. Kinetik des Dendritenchimärismus**

Bei 120 der 144 Patienten wurden im Median am Tag +21 (Range 9-84) Chimärismusanalysen an den dendritischen Zellen durchgeführt. Bei den restlichen 24 Patienten erfolgte diese Analyse nicht, da in der Regel zu wenig dendritische Zellen im peripheren Blut der Patienten waren wegen einer aGvHD oder/und einer Behandlung mit Prednisolon (*Pihusch et al., 2001*). Für die FISH-Untersuchungen werden mindestens 5.000, für die STR-PCR-Untersuchung mindestens 2.000 Zellen benötigt. Der prozentuale Anteil der dendritischen Zellen an den Leukozyten war bei den DC1 (MW 0,78%; SD 0,98) signifikant höher ( $p < 0,01$ ) als bei den DC2 (MW 0,43%; SD 0,50), was auch dazu führte, dass meistens mehr DC1 (MW 14.419 Zellen) als DC2 (MW 11.596 Zellen) für die Chimärismusbestimmungen gewonnen werden konnten (siehe Tafel 13). 63 (52,5%) der 120 Chimärismusanalysen wurden mit der STR-PCR-Technik durchgeführt, 57 (47,5%) mit der FISH-Technik.

Bei 118 Patienten wurden CD123<sup>+</sup> DC2 sortiert. Bei 111 der 118 Proben konnte eine Chimärismusanalyse durchgeführt werden. Bei den verbleibenden sieben Proben (alle STR-PCR) war der DNA-Gehalt für eine Analyse zu gering. Bei 88 Patienten (79,3%) ergab die Analyse einen kompletten Chimärismus der DC2 im peripheren Blut, bei 20 (18%) Patienten einen gemischten Chimärismus und bei drei Patienten (2,7%) waren keine Spendermerkmale bzw. kein Chimärismus nachweisbar.

Eine Analyse des DC1-Chimärismus wurde bei 43 Patienten durchgeführt. Bei fünf Patienten blieb die Analyse entweder wegen mangelnden DNA-Gehaltes der Probe (viermal STR-PCR) oder wegen eines nicht brauchbaren FISH Präparates (einmal FISH) ohne Ergebnis. 29 (76,3%) der 38 erfolgreich durchgeführten Untersuchungen ergaben einen kompletten DC1-Chimärismus im peripheren Blut, acht (21,1%) einen



	<b>Median</b>	<b>Range</b>
<b>Tag Dx post KMT (n=120)</b>	20,50	9 – 84
	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>CD123<sup>+</sup> DC2 [%] am Tag Dx (n=116)</b>	0,43	0,50
<b>CD11c<sup>+</sup> DC1 [%] am Tag Dx (n=110)</b>	0,78	0,98
<b>Anzahl sortierte CD123<sup>+</sup> DC2 (n=118)</b>	11596,34	7658,18
<b>Anzahl sortierte CD11c<sup>+</sup> DC1 (n=43)</b>	14419,10	9850,15

Die Bestimmung des Dendritenchimärismus zum Zeitpunkt des Engraftments erfolgte im Schnitt am Tag +21 nach der Transplantation. Bevor die Zellen sortiert wurden, wurde der Gehalt der dendritischen Zellen an den Leukozyten im peripheren Blut bestimmt. Bei den DC1 lag er bei 0,78%, bei den DC2 bei 0,43%. Demzufolge wurden im Mittel auch mehr HLA-DR<sup>+</sup> lin1<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> DC1 (14419) als HLA-DR<sup>+</sup> lin1<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> DC2 (11596) isoliert. Die isolierten Zellen wurden dann auf ihr Chimärismusverhalten untersucht.

Tafel 13: **Dendritenchimärismus (Dx) beim Engraftment**

gemischten Chimärismus. Bei einem Patienten (2,6%) war kein Chimärismus der DC1 im peripheren Blut nachweisbar (siehe Tafel 13).

Um die Chimärismusbestimmungen bei Patienten mit gemischtem Chimärismus quantifizieren zu können, wurde bei der STR-PCR-Untersuchung der prozentuale Anteil der eigenen Merkmale am DNA-Gehalt der Probe berechnet. Bei der FISH-Untersuchung wurde die Anzahl der eigenen Zellen mit der Anzahl der insgesamt ausgezählten Zellen in Relation gesetzt. Der Anteil eigener Merkmale/Zellen bei Patienten mit gemischtem DC1-Chimärismus lag bei durchschnittlich 6,2% (SD 8,7). Der mittlere Anteil eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem DC2-Chimärismus lag bei 8,2% (SD 13,4) (siehe Tafel 14).

### **3.2.1.2. Kinetik des T-Zell-Chimärismus**

Bei 44 (30,6%) der 144 Patienten wurde zum Zeitpunkt des Engraftments eine Chimärismusanalyse an den T-Zellen durchgeführt. Im Median geschah das am Tag +31 (Range 13-114) nach der Transplantation. Die Chimärismusanalyse erfolgte wie bei den dendritischen Zellen bei gleichgeschlechtlicher Transplantation mit der STR-PCR-Technik (34 Patienten (77,3%)), bei gegengeschlechtlicher Transplantation mit der FISH-Technik (zehn Patienten (22,7%)). Bei einem Patienten war der DNA-Gehalt der Probe für die STR-PCR Untersuchung nicht ausreichend.

32 Patienten (74,4%) hatten einen kompletten T-Zell-Chimärismus, zehn (23,3%) einen gemischten und eine Patientin hatte keinen T-Zell-Chimärismus (siehe Tafel 14).

Die Quantifizierung des T-Zell-Chimärismus erfolgte mit der gleichen Methode wie bei den dendritischen Zellen (siehe 3.2.1.1.). Der durchschnittliche Anteil eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem T-Zell-Chimärismus lag bei 23,2% (SD 25,28%) (siehe Tafel 14).

	<b>DC1</b> <b>(n=38)</b>	<b>DC2</b> <b>(n=111)</b>	<b>T-Zellen</b> <b>(n=43)</b>
<b>kompletter Chimärismus</b>	29 (76,3%)	88 (79,3%)	32 (74,4%)
<b>gemischter Chimärismus</b>	8 (21,1%)	20 (18%)	10 (23,3%)
<b>kein Chimärismus</b>	1 (2,6%)	3 (2,7%)	1 (2,3%)

	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>[%] Anteil eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem DC2-Chimärismus</b>	8,22	13,44
<b>[%] Anteil eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem DC1-Chimärismus</b>	6,16	8,75
<b>[%] Anteil eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem T-Zell-Chimärismus</b>	23,2	25,28

Die obere Tabelle zeigt die Daten zum qualitativen Chimärismus bei den beiden Subpopulationen DC1 (CD11c<sup>+</sup>) und DC2 (CD123<sup>+</sup>) und bei den T-Zellen zum Zeitpunkt des Engraftments.

In der unteren Tabelle sind die Zahlen des quantitativen Chimärismus beider DC Subpopulationen und der T-Zellen zum Zeitpunkt des Engraftments aufgeführt. Der Mittelwert bezeichnet den prozentualen Anteil eigener Merkmale/Zellen.

Tafel 14: Quantitativer und qualitativer Chimärismus beim Engraftment

## **3.2.2. Kinetik der Chimärismen nach sechs Monaten**

### **3.2.2.1. Vorbemerkungen**

Um Kinetik und Verlauf der Chimärismen beurteilen zu können, wurden etwa sechs Monate nach der Transplantation erneut Chimärismusuntersuchungen an den dendritischen Zellen und T-Zellen durchgeführt, bei den dendritischen Zellen erfolgte eine weitere Chimärismusuntersuchung nach zwölf Monaten. Die Gründe für die deutlich geringeren Fallzahlen im Vergleich zum Zeitpunkt des Engraftments sind vielfältig: zu geringe Zellzahlen im peripheren Blut wegen einer cGvHD und/oder einer Behandlung mit Prednisolon (*Pihusch et al., 2001*), Tod vor dem Tag +180, Rezidiv und damit verbunden technische Probleme beim Sortieren der Zellen. Hinzu kamen organisatorische Probleme, Probenmaterial der Patienten zu erhalten, die sich nicht regelmäßig in der Transplantationsambulanz der Medizinischen Klinik III (Klinikum der Universität München - Großhadern) zur Nachbehandlung vorstellten.

### **3.2.2.2. Kinetik des Dendritenchimärismus**

Die Chimärismusuntersuchungen nach sechs Monaten wurden im Median am Tag +190 (Range 70-298) durchgeführt. Bei insgesamt 70 Patienten erfolgte eine Analyse des Dendritenchimärismus. Auch nach sechs Monaten war der prozentuale Anteil der DC1 (MW 0,18%; SD 0,12) an den Leukozyten signifikant höher ( $p < 0,01$ ) als der der DC2 (MW 0,09%; SD 0,05).

Durchschnittlich wurden 13.169 DC1 und 9.121 DC2 für die Chimärismusbestimmungen gewonnen. 44 (62,9%) der 70 Chimärismusanalysen bei den dendritischen Zellen wurden mit der STR-PCR-Technik, 26 (37,1%) mit der FISH-Technik durchgeführt.

Bei 70 Patienten wurden CD123<sup>+</sup> DC2 sortiert. Bei 65 der 70 Proben konnte eine Chimärismusanalyse durchgeführt werden. Bei den verbleibenden fünf Proben (viermal STR-PCR, einmal FISH) war der DNA-Gehalt bzw. die Zellzahl für eine Analyse zu gering. Bei 63 Patienten (96,92%) ergab die Analyse einen kompletten Chimärismus der DC2 im peripheren Blut, bei je einem (zweimal 1,54%) Patienten

nach 6 Monaten	DC1 (n=36)	DC2 (n=65)	T-Zellen (n=33)
<b>kompletter Chimärismus</b>	33 (91,67%)	63 (96,92%)	30 (90,91%)
<b>gemischter Chimärismus</b>	2 (5,56%)	1 (1,54%)	3 (9,09%)
<b>kein Chimärismus</b>	1 (2,77%)	1 (1,54%)	0 (0%)

nach 12 Monaten	DC1 (n=28)	DC2 (n=32)	T-Zellen (n=0)
<b>kompletter Chimärismus</b>	27 (96,43%)	32 (100%)	nicht durchgeführt
<b>gemischter Chimärismus</b>	1 (3,57%)	0 (0%)	nicht durchgeführt
<b>kein Chimärismus</b>	0 (0%)	0 (0%)	nicht durchgeführt

Die obere Tabelle zeigt die Daten zum qualitativen Chimärismus nach sechs Monaten, die untere Tabelle die Daten nach zwölf Monaten.

Tafel 15: qualitativer Chimärismus nach sechs und zwölf Monaten

lag ein gemischter (Eigenanteil 7,0%) bzw. überhaupt kein Chimärismus vor (siehe Tafel 15).

Eine Analyse des DC1-Chimärismus wurde bei 38 Patienten durchgeführt. Bei zwei Patienten blieb die Analyse wegen mangelnden DNA-Gehaltes der Probe für die STR-PCR-Untersuchungen ohne Ergebnis. 33 (91,67%) der 36 erfolgreich durchgeführten Untersuchungen ergaben einen kompletten DC1-Chimärismus im peripheren Blut, zwei (5,56%) einen gemischten Chimärismus (Eigenanteil 1,0% und 10,0%). Bei einem Patienten (2,77%) war kein Chimärismus der DC1 im peripheren Blut nachweisbar (siehe Tafel 15).

### **3.2.2.3. Kinetik des T-Zell-Chimärismus**

Bei 33 Patienten wurde nach sechs Monaten eine Chimärismusanalyse an den T-Zellen durchgeführt. Im Median geschah das am Tag +185 (Range 93-247) nach der Transplantation. Alle 33 durchgeführten Chimärismusanalysen waren erfolgreich. 22 (66,7%) Untersuchungen wurden mit der STR-PCR Technik durchgeführt, elf (33,3%) mit der FISH Technik.

30 Patienten (90,91%) hatten einen kompletten T-Zell-Chimärismus und drei (9,09%) einen gemischten (Eigenanteile 50%, 41%, 3,0%). Es gab keinen Patienten, der keinen T-Zell-Chimärismus hatte (siehe Tafel 15).

## **3.2.3. Kinetik der Chimärismen nach zwölf Monaten**

### **3.2.3.1. Kinetik des Dendritenchimärismus**

Die Chimärismusuntersuchungen nach zwölf Monaten wurden im Median am Tag +371 (Range 248-694) durchgeführt. Bei insgesamt 37 Patienten erfolgte eine Analyse des Dendritenchimärismus. Auch nach zwölf Monaten war der prozentuale Anteil der DC1 (MW 0,19%; SD 0,13) an den Leukozyten signifikant höher ( $p < 0,01$ ) als der der DC2 (MW 0,09; SD 0,05).

Durchschnittlich wurden 12.330 DC1 (SD 7.976,5) und 9.297 DC2 (SD 4.234,1) für die Chimärismusbestimmungen gewonnen. 22 (59,5%) der 37 Chimärismusanalysen

bei den dendritischen Zellen wurden mit der STR-PCR-Technik, 15 (40,5%) mit der FISH-Technik durchgeführt.

Bei 36 Patienten wurden CD123<sup>+</sup> DC2 sortiert. Bei 32 der 36 Proben konnte eine Chimärismusanalyse durchgeführt werden. Bei den verbleibenden vier Proben (zweimal STR-PCR, zweimal FISH) war der DNA-Gehalt bzw. die Zellzahl für eine Analyse zu gering. Alle 32 Patienten hatten einen kompletten DC2-Chimärismus (siehe Tafel 15).

Eine Analyse des DC1-Chimärismus wurde bei 32 Patienten durchgeführt. Bei vier Patienten blieb die Analyse wegen mangelnden DNA-Gehaltes der Probe für die STR-PCR-Untersuchungen ohne Ergebnis. 27 (96,43%) der 28 erfolgreich durchgeführten Untersuchungen ergaben einen kompletten DC1-Chimärismus im peripheren Blut. Eine Patientin (3,57%) hatte in der FISH-Untersuchung einen gemischten Chimärismus (Eigenanteil 0,3%). Bei keinem Patienten war kein Chimärismus der DC1 im peripheren Blut nachweisbar (siehe Tafel 15).

### ***3.2.3.2. Kinetik des T-Zell-Chimärismus***

Eine Untersuchung der T-Zell-Chimärismen nach zwölf Monaten fand nicht mehr statt.

### **3.2.4. Verlauf der Chimärismen**

Bei 33 Patienten, die zum Zeitpunkt des Engraftments einen kompletten DC2-Chimärismus hatten, war dieser auch nach sechs Monaten noch komplett. Bei 14 Patienten mit komplettem DC2-Chimärismus beim Engraftment und nach sechs Monaten ergab die Analyse auch nach zwölf Monaten einen kompletten Chimärismus. Insgesamt wurden 20 Patienten mit komplettem DC2-Chimärismus nach sechs und zwölf Monaten erfasst. Acht Patienten hatten zum Zeitpunkt des Engraftments einen gemischten Chimärismus in den DC2, der sich zu einem kompletten Chimärismus nach sechs Monaten entwickelt hatte. Zwei der acht Patienten wurden auch nach zwölf Monaten analysiert, wo sie einen kompletten Chimärismus hatten. Ein Patient hatte nach sechs Monaten einen gemischten DC2-

Chimärismus, der nach zwölf Monaten komplett war. Drei Patienten hatten zum Zeitpunkt des Engraftments keinen Chimärismus in den DC2. Eine Patientin hatte nach sechs Monaten schließlich einen kompletten Chimärismus. Eine andere Patientin ohne DC2-Chimärismus verstarb einen Monat nach der Transplantation. Über den dritten Patienten, der noch lebt, liegen keine Chimärismusdaten nach sechs und zwölf Monaten vor.

Neun Patienten hatten einen kompletten DC1-Chimärismus beim Engraftment und nach sechs Monaten. Bei zwei der neun Patienten erfolgte eine Untersuchung auch nach zwölf Monaten, wo sie immer noch einen kompletten Chimärismus hatten. Elf Patienten wurden nach sechs und zwölf Monaten analysiert. Sie hatten jeweils einen kompletten DC1-Chimärismus. Ein Patient hatte beim Engraftment einen gemischten DC1-Chimärismus, der sich zu einem kompletten nach sechs Monaten entwickelte. Ein weiterer Patient hatte beim Engraftment und nach sechs Monaten einen gemischten DC1-Chimärismus. Eine Analyse nach zwölf Monaten erfolgte bei diesem Patienten nicht. Die verstorbene Patientin ohne DC2-Chimärismus hatte auch in den DC1 keinen Chimärismus.

14 Patienten hatten beim Engraftment und nach sechs Monaten einen kompletten T-Zell-Chimärismus. Drei Patienten hatten zunächst einen gemischten Chimärismus, der nach sechs Monaten komplett war. Eine Patientin hatte keinen Chimärismus in den T-Zellen beim Engraftment und verstarb zweieinhalb Monate nach der Transplantation.

In keiner Zelllinie konnte ein Wechsel von einem kompletten in einen gemischten Chimärismus beobachtet werden.



<i>Variable</i>	<i>Gruppe A (CC DC1)</i> (n=29)	<i>Gruppe B (MC DC1)</i> (n=8)	<i>p</i>
<b>Stammzellquelle</b>			
KMT	13 (44,8%)	1 (12,5%)	0,10 <sup>a</sup>
PBSCT	16 (55,2%)	7 (87,5%)	
<b>Spender</b>			
verwandt	17 (58,6%)	5 (62,5%)	0,84 <sup>a</sup>
unverwandt	12 (41,4%)	3 (37,5%)	
HLA-ident	23 (79,3%)	6 (75,0%)	0,79 <sup>a</sup>
nicht HLA-ident	6 (20,7%)	2 (25,0%)	
<b>Grundkrankheit</b>			
Akute Leukämien	16 (80,0%)	6 (100%)	0,23 <sup>a</sup>
Chronische Leukämien	4 (20,0%)	0 (0%)	
Myeloische Leukämien	13 (65%)	6 (100%)	0,09 <sup>a</sup>
Lymphatische Leukämien	7 (35%)	0 (0%)	
<b>Konditionierung</b>			
myeloablativ	9 (31,0%)	0 (0%)	0,07 <sup>a</sup>
nicht-myeloablativ	20 (69,0%)	8 (100%)	
<b>Transplantationsoutcome</b>			
Rezidiv	8 (27,6%)	3 (37,5%)	0,59 <sup>a</sup>
Tod	14 (48,3%)	5 (62,5%)	0,48 <sup>a</sup>

akute GvHD			
Inzidenz	17 (58,6%)	6 (75,0%)	0,40 <sup>a</sup>
Tag aGvHD	20,8	18,2	0,61 <sup>b</sup>
mild (Grad I+II)	7 (41,2%)	2 (33,3%)	0,74 <sup>a</sup>
schwer (Grad III+IV)	10 (58,8%)	4 (66,7%)	
chronische GvHD			
Inzidenz	10 (38,5%)	1 (12,5%)	0,23 <sup>a</sup>
mild	5 (50,0%)	1 (100,0%)	0,34 <sup>a</sup>
schwer	5 (50,0%)	0 (0,0%)	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson, <sup>b</sup> t-Test für unabhängige Stichproben

**Tafel 16: Einfluss des DC1-Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen**

Untersucht wurde, ob Gruppe A (CC = kompletter Chimärismus) und Gruppe B (MC = gemischter Chimärismus) bestimmte klinische Variablen signifikant unterschiedlich beeinflussen.

Die Grunderkrankungen wurden in jeweils zwei Gruppen unterteilt, die miteinander verglichen wurden: akute (AML, ALL) und chronische (CML, CLL) Leukämien, sowie myeloische (AML, CML) und lymphatische (ALL, CLL) Leukämien. Die Konditionierungsschemata wurden ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt: myeloablative (alle Schemata mit 12 Gy TBI und das Bu-Cyclo-ATG Protokoll) und nicht myeloablative (alle anderen Schemata) Protokolle. Hier wurde untersucht, ob zwischen den Gruppen bei den Grunderkrankungen und den Konditionierungsschemata signifikante Unterschiede bezüglich der Chimärismuskinetik bestehen.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe C (CC DC2)</i> (n=88)	<i>Gruppe D (MC DC2)</i> (n=20)	<i>p</i>
<b>Stammzellquelle</b>			
KMT	40 (45,5%)	14 (70,0%)	0,21 <sup>a</sup>
PBSCT	48 (54,5%)	6 (30,0%)	
<b>Spender</b>			
verwandt	53 (60,0%)	12 (60,0%)	0,99 <sup>a</sup>
unverwandt	35 (40,0%)	8 (40,0%)	
HLA-ident	75 (85,2%)	17 (85,0%)	0,98 <sup>a</sup>
nicht HLA-ident	13 (14,8%)	3 (15,0%)	
<b>Grundkrankheit</b>			
Akute Leukämien	46 (69,7%)	7 (50%)	0,27 <sup>a</sup>
Chronische Leukämien	20 (30,3%)	7 (50%)	
Myeloische Leukämien	49 (74,2%)	10 (76,9%)	0,84 <sup>a</sup>
Lymphatische Leukämien	17 (25,8%)	3 (23,1%)	
<b>Konditionierung</b>			
myeloablativ	34 (38,6%)	4 (20,0%)	0,12 <sup>a</sup>
nicht-myeloablativ	54 (61,4%)	16 (80,0%)	
<b>Transplantationsoutcome</b>			
Rezidiv	34 (38,6%)	9 (45,0%)	0,60 <sup>a</sup>
Tod	46 (52,3%)	11 (55,0%)	0,83 <sup>a</sup>

<b>akute GvHD</b>			
Inzidenz	43 (48,9%)	10 (50,0%)	0,93 <sup>a</sup>
Tag aGvHD	23,3	21,0	0,63 <sup>b</sup>
mild (Grad I+II)	12 (27,9%)	6 (60,0%)	0,054 <sup>a</sup>
schwer (Grad III+IV)	31 (72,1%)	4 (40,0%)	
<b>chronische GvHD</b>			
Inzidenz	22 (25,0%)	8 (40,0%)	0,18 <sup>a</sup>
mild	9 (40,9%)	4 (50,0%)	0,66 <sup>a</sup>
schwer	13 (59,1%)	4 (50,0%)	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson, <sup>b</sup> t-Test für unabhängige Stichproben

#### Tafel 17: Einfluss des DC2-Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen

Untersucht wurde, ob Gruppe C (CC = kompletter Chimärismus) und Gruppe D (MC = gemischter Chimärismus) bestimmte klinische Variablen signifikant unterschiedlich beeinflussen.

Die Grunderkrankungen wurden in jeweils zwei Gruppen unterteilt, die miteinander verglichen wurden: akute (AML, ALL) und chronische (CML, CLL) Leukämien, sowie myeloische (AML, CML) und lymphatische (ALL, CLL) Leukämien. Die Konditionierungsschemata wurden ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt: myeloablative (alle Schemata mit 12 Gy TBI und das Bu-Cyclo-ATG Protokoll) und nicht myeloablative (alle anderen Schemata) Protokolle. Hier wurde untersucht, ob zwischen den Gruppen bei den Grunderkrankungen und den Konditionierungsschemata signifikante Unterschiede bezüglich der Chimärismuskinetik bestehen.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe E (CC TC)</i> (n=32)	<i>Gruppe F (MC TC)</i> (n=10)	<i>p</i>
<b>Stammzellquelle</b>			
KMT	11 (34,4%)	5 (50,0%)	0,37 <sup>a</sup>
PBSCT	21 (65,6%)	5 (50,0%)	
<b>Spender</b>			
verwandt	12 (37,5%)	9 (90,0%)	0,004 <sup>a</sup>
unverwandt	20 (62,5%)	1 (10,0%)	
HLA-ident	28 (87,5%)	9 (90,0%)	0,83 <sup>a</sup>
nicht-HLA-ident	4 (12,5%)	1 (10,0%)	
<b>Grundkrankheit</b>			
Akute Leukämien	15 (65,2%)	7 (77,8%)	0,49 <sup>a</sup>
Chronische Leukämien	8 (34,8%)	2 (22,2%)	
Myeloische Leukämien	19 (82,6%)	4 (44,4%)	0,03 <sup>a</sup>
Lymphatische Leukämien	4 (17,4%)	5 (55,6%)	
<b>Konditionierung</b>			
myeloablativ	10 (31,3%)	5 (50%)	0,28 <sup>a</sup>
nicht-myeloablativ	22 (68,7%)	5 (50%)	
<b>Transplantationsoutcome</b>			
Rezidiv	10 (31,3%)	4 (40,0%)	0,61 <sup>a</sup>
Tod	14 (43,8%)	6 (60,0%)	0,37 <sup>a</sup>

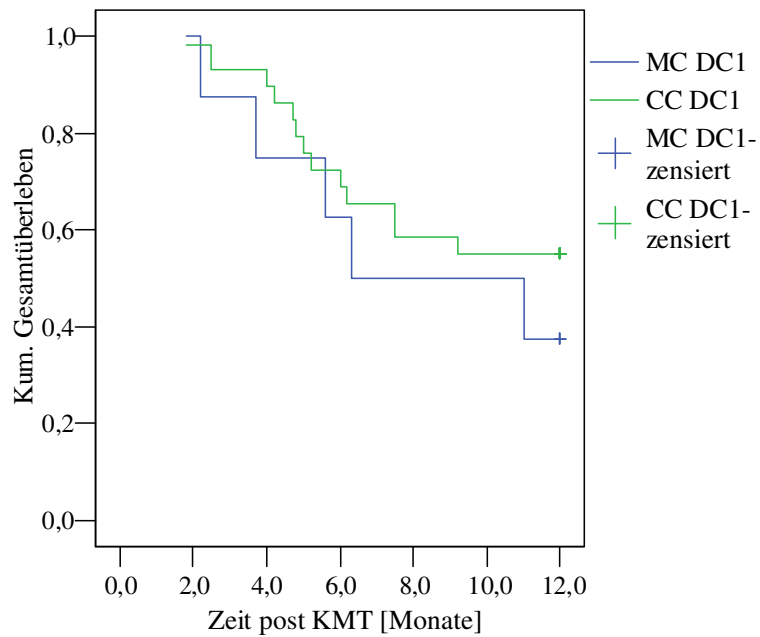
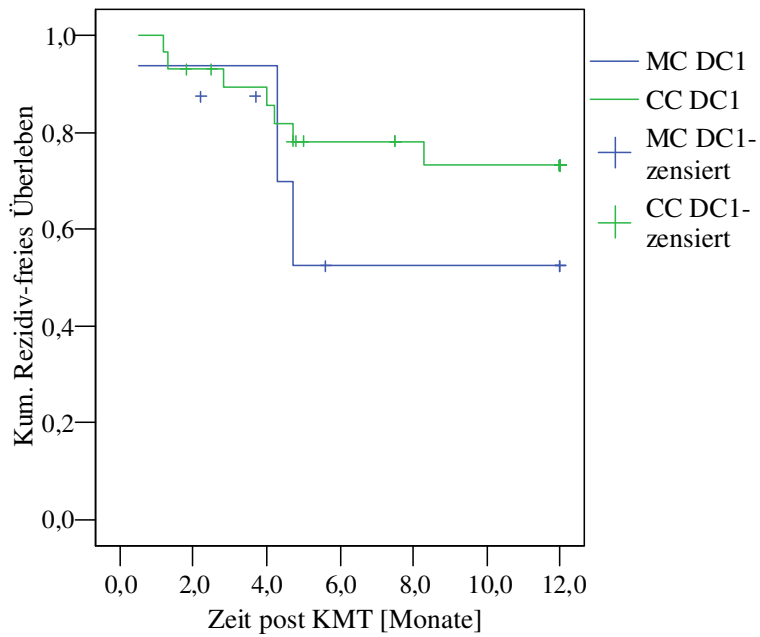
<b>akute GvHD</b>			
Inzidenz	16 (50,0%)	4 (40,0%)	0,58 <sup>a</sup>
Tag aGvHD	18,1	18,8	0,89 <sup>b</sup>
mild (Grad I+II)	8 (50,0%)	2 (50,0%)	1,00 <sup>a</sup>
schwer (Grad III+IV)	8 (50,0%)	2 (50,0%)	
<b>chronische GvHD</b>			
Inzidenz	8 (25,0%)	3 (30,0%)	0,75 <sup>a</sup>
mild	5 (62,5%)	1 (33,3%)	0,39 <sup>a</sup>
schwer	3 (37,5%)	2 (66,7%)	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test nach Pearson, <sup>b</sup> t-Test für unabhängige Stichproben

**Tafel 18: Einfluss des T-Zell-Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen**

Untersucht wurde, ob Gruppe E (CC = kompletter Chimärismus) und Gruppe F (MC = gemischter Chimärismus) bestimmte klinische Variablen signifikant unterschiedlich beeinflussen.

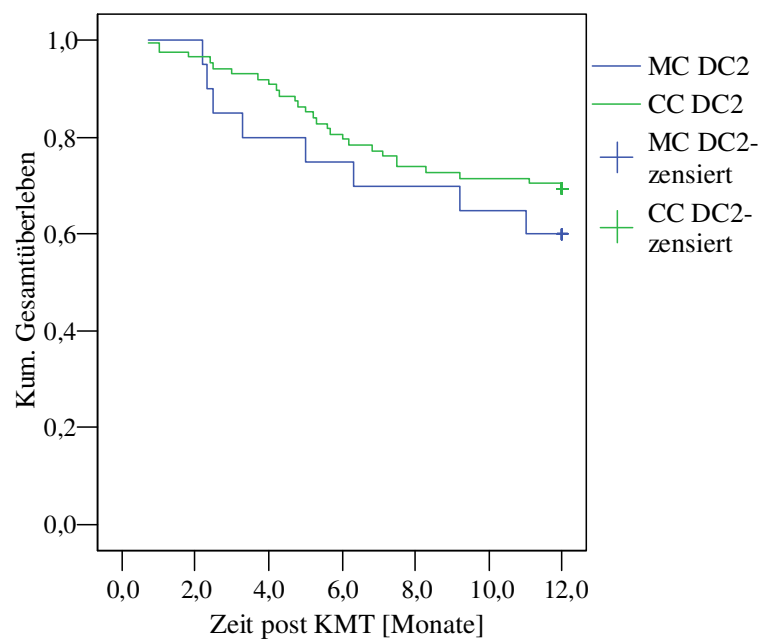
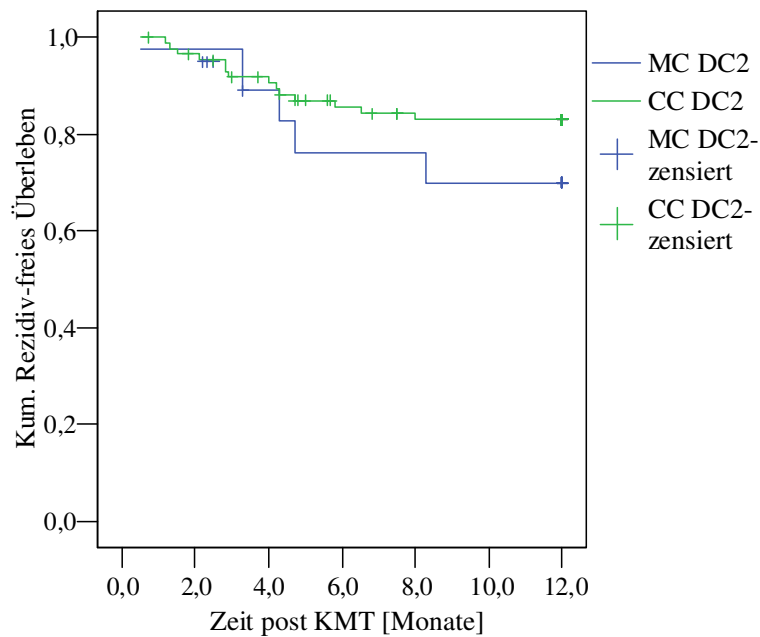
Die Grunderkrankungen wurden in jeweils zwei Gruppen unterteilt, die miteinander verglichen wurden: akute (AML, ALL) und chronische (CML, CLL) Leukämien, sowie myeloische (AML, CML) und lymphatische (ALL, CLL) Leukämien. Die Konditionierungsschemata wurden ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt: myeloablative (alle Schemata mit 12 Gy TBI und das Bu-Cyclo-ATG Protokoll) und nicht myeloablative (alle anderen Schemata) Protokolle. Hier wurde untersucht, ob zwischen den Gruppen bei den Grunderkrankungen und den Konditionierungsschemata signifikante Unterschiede bezüglich der Chimärismuskinetik bestehen.



**Tafel 19: Rezidiv-freies und Gesamtüberleben in Gruppe A + B:**

Es gibt keine signifikanten Unterschiede beim Rezidiv-freien ( $p=0,30^c$ ) und Gesamtüberleben ( $p=0,40^c$ ) zwischen komplettem (CC) und gemischtem (MC) DC1-Chimärismus.

<sup>c</sup> *log-rank Test*

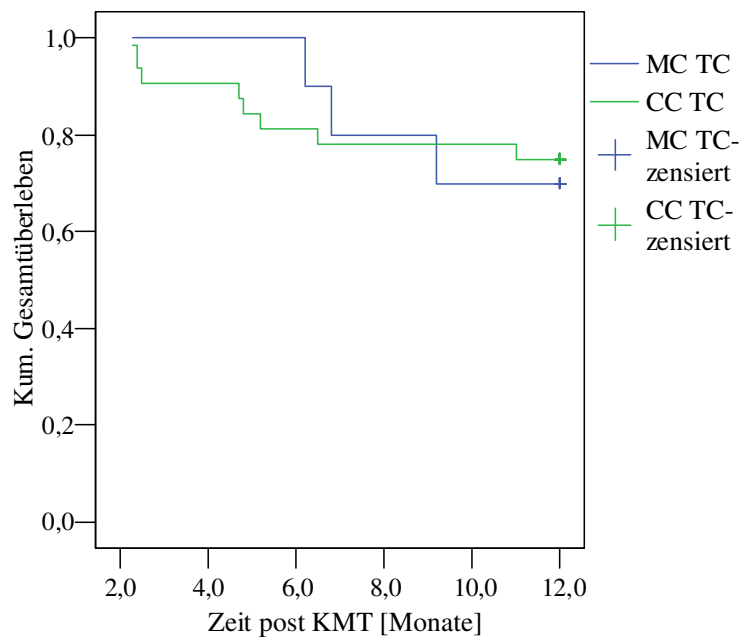
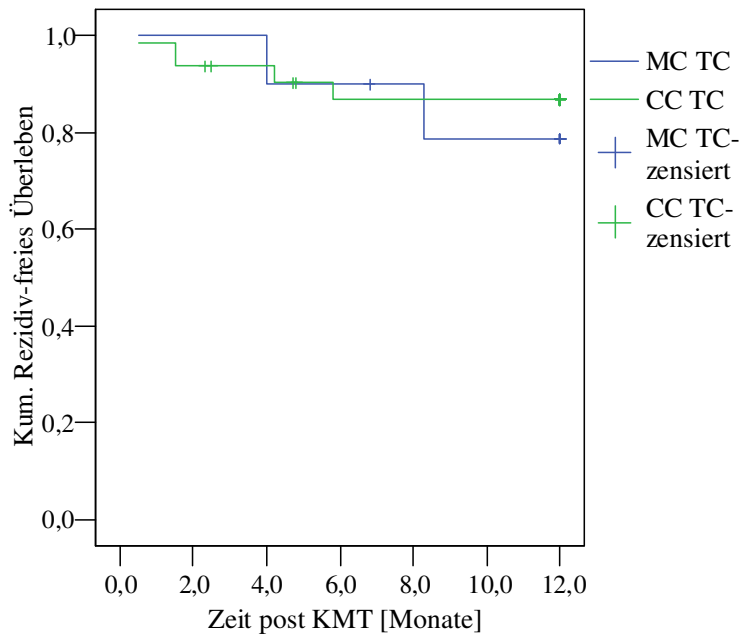


Tafel 20: **Rezidiv-freies und Gesamtüberleben in Gruppe C + D:**

Es gibt keine signifikanten Unterschiede beim Rezidiv-freien ( $p=0,27^c$ ) und Gesamtüberleben ( $p=0,39^c$ ) zwischen komplettem (CC) und gemischtem (MC) DC2-Chimärismus.

<sup>c</sup> log-rank Test





**Tafel 21: Rezidiv-freies und Gesamtüberleben in Gruppe E + F:**

Es gibt keine signifikanten Unterschiede beim Rezidiv-freien ( $p=0,64^c$ ) und Gesamtüberleben ( $p=0,88^c$ ) zwischen komplettem (CC) und gemischtem (MC) TC-Chimärismus.

<sup>c</sup> *log-rank Test*

### **3.3. Einfluss der Chimärismen auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation**

Um Unterschiede in der Ausprägung verschiedener klinischer Variablen zwischen Gruppen mit unterschiedlichem Chimärismus feststellen zu können, wurden sechs Gruppen erstellt: kompletter DC1-Chimärismus (Gruppe A) - gemischter DC1-Chimärismus (Gruppe B), kompletter DC2-Chimärismus (Gruppe C) - gemischter DC2-Chimärismus (Gruppe D), kompletter TC-Chimärismus (Gruppe E) - gemischter TC-Chimärismus (Gruppe F). Des Weiteren erfolgte eine Unterteilung in akute – chronische Leukämien und in lymphatische – myeloische Leukämien. Die anderen Krankheitsentitäten wurden auf Grund der geringen Fallzahlen nicht ausgewertet. Das Patientenkollektiv, das beim Engraftment keinen Chimärismus zeigte, sowie alle Patienten, die nach sechs und zwölf Monaten analysiert wurden, wurden aufgrund der geringen Fallzahlen gesondert betrachtet.

Tafel 22 zeigt alle aufgetretenen Kombinationen der Chimärismen aller drei Zelllinien von Patienten, bei denen beim Engraftment alle drei Zelllinien untersucht wurden, sowie das Auftreten von aGvHD und Schweregrad, cGvHD und Schweregrad, Rezidiv und Tod im Rahmen einer der jeweiligen Kombinationsmöglichkeiten.

#### **3.3.1. Chimärismus der Population DC1**

Zwischen Gruppe A und B wurde nach statistisch signifikanten Unterschieden bei den in Tafel 16 aufgeführten Variablen gesucht. Gruppe A (CC DC1) bestand aus insgesamt 29 Patienten, von denen 13 (44,8%) gegenüber einem (12,5%) der acht Patienten der Gruppe B (MC DC1) Knochenmark als Spende erhielten ( $p=0,1$ ). Keine signifikanten Unterschiede brachte die Herkunft der Spende (HLA-ident/nicht HLA-ident ( $p=0,79$ ), verwandt/unverwandt ( $p=0,84$ )). Die zugrunde liegenden Erkrankungen wurden in akut/chronisch und lymphatisch/myeloisch unterteilt. Bezüglich der Gruppen A und B zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede (akut vs. chronisch:  $p=0,23$ , myeloisch vs. lymphatisch:  $p=0,09$ ). Allerdings hatten alle sechs Patienten in Gruppe B eine AML als Grunderkrankung.

Ein nicht-myeloablatives Konditionierungsschema erhielten in Gruppe B alle acht Patienten, in Gruppe A nur 20 der 29 Patienten (Gruppe A 69,0% vs. Gruppe B 100%,  $p=0,07$ ). In den Tafeln 19 bis 21 ist das Transplantationsoutcome dargestellt. Acht der 29 Patienten in Gruppe A und drei der acht Patienten in Gruppe B hatten ein Rezidiv (27,6% vs. 37,5%,  $p=0,59$ ). Auch in der Zeit des Rezidiv-freien Überlebens ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,30$ ). 14 Patienten in Gruppe A und fünf Patienten in Gruppe B verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums (48,3% vs. 62,5%,  $p=0,48$ ), wobei sich hinsichtlich der Gesamtüberlebensdauer ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigten ( $p=0,40$ ). In Gruppe A fand sich eine niedrigere Inzidenz der aGvHD als in Gruppe B (58,6% vs. 75,0%,  $p=0,40$ ). Hinsichtlich des Schweregrads der aGvHD zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In Gruppe A hatten sieben Patienten (41,2%) eine milde aGvHD, zehn Patienten eine schwere (58,8%). In Gruppe B wurde bei zwei Patienten (33,3%) eine milde aGvHD, bei vier Patienten (66,7%) eine schwere aGvHD diagnostiziert. Die Diagnose erfolgte in Gruppe A durchschnittlich am Tag +21, in Gruppe B am Tag +18 (20,8 vs. 18,2,  $p=0,61$ ). Wie bei der aGvHD fanden sich auch bei der cGvHD keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppe A und B. Zehn Patienten (38,5%) der Gruppe A und ein Patient (12,5%) der Gruppe B erkrankten im Verlauf an einer cGvHD. In Gruppe A waren je fünf Verläufe mild bzw. schwer, der Patient in Gruppe B hatte eine schwere cGvHD.

### **3.3.2. Chimärismus der Population DC2**

Zwischen Gruppe C und D wurde nach statistisch signifikanten Unterschieden bei den in Tafel 17 aufgeführten Variablen gesucht. Gruppe C (CC DC2) bestand aus insgesamt 88 Patienten, von denen 40 (45,5%) gegenüber 14 (70,0%) der 20 Patienten der Gruppe D (MC DC2) Knochenmark als Spende erhielten ( $p=0,21$ ). Keine signifikanten Unterschiede brachte die Herkunft der Spende (HLA-ident/nicht HLA-ident ( $p=0,98$ ), verwandt/unverwandt ( $p=0,99$ )). Die zugrunde liegenden Erkrankungen wurden auch hier in akut/chronisch und lymphatisch/myeloisch unterteilt. Bezüglich der Gruppen C und D zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede (akut vs. chronisch:  $p=0,27$ , myeloisch vs. lymphatisch:  $p=0,84$ ). Ein

nicht-myeloablatives Konditionierungsschema erhielten in Gruppe D 16 der 20 Patienten, in Gruppe C 54 der 88 Patienten (Gruppe C 61,4% vs. Gruppe D 80,0%,  $p=0,12$ ). In den Tafeln 19 und 20 ist das Transplantationsoutcome dargestellt. 34 der 88 Patienten in Gruppe C und neun der 20 Patienten in Gruppe D hatten ein Rezidiv (38,6% vs. 45,0%,  $p=0,60$ ). Auch in der Zeit des Rezidiv-freien Überlebens ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,27$ ). 46 Patienten in Gruppe C und elf Patienten in Gruppe D verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums (52,3% vs. 55,0%,  $p=0,83$ ), wobei sich hinsichtlich der Gesamtüberlebensdauer ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigten ( $p=0,39$ ). In Gruppe C und D fanden sich in etwa die gleichen Inzidenzen für eine aGvHD (Gruppe C 48,9% vs. Gruppe D 50,0%,  $p=0,93$ ). Hinsichtlich des Schweregrads der aGvHD zeigten sich jedoch nahezu signifikante Unterschiede ( $p=0,054$ ) zwischen den beiden Gruppen. In Gruppe C hatten zwölf Patienten (27,9%) eine milde aGvHD, 31 Patienten eine schwere (72,1%). In Gruppe D wurde bei sechs Patienten (60,0%) eine milde aGvHD, bei vier Patienten (40,0%) eine schwere aGvHD diagnostiziert. Die Diagnose der aGvHD erfolgte in Gruppe C durchschnittlich am Tag +23, in Gruppe D am Tag +21 (23,3 vs. 21,0,  $p=0,63$ ). In Gruppe D war die Inzidenz der cGvHD höher als in Gruppe C ( $p=0,18$ ). 22 Patienten (25,0%) der Gruppe C und acht Patienten (40,0%) der Gruppe D erkrankten im Verlauf an einer cGvHD. In Gruppe C waren neun (40,9%) Verläufe mild und 13 (59,1%) schwer, jeweils vier Verläufe in Gruppe D waren schwer bzw. mild. Damit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Schweregrads der cGvHD zwischen den beiden Gruppen ( $p=0,66$ ).

### **3.3.3. Chimärismus der T-Zellen**

Zwischen Gruppe E und F wurde nach statistisch signifikanten Unterschieden bei den in Tafel 18 aufgeführten Variablen gesucht. Gruppe E (CC TC) bestand aus insgesamt 32 Patienten, von denen elf (34,4%) gegenüber fünf (50,0%) der zehn Patienten der Gruppe F (MC TC) Knochenmark als Spende erhielten ( $p=0,37$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen fanden sich bezüglich einer Spende von einem Verwandten bzw. nicht Verwandten. In Gruppe E stammten zwölf (37,5%) der 32 Spenden von einem Verwandten, in Gruppe F neun (90%) ( $p=0,004$ ).

Damit scheint eine Familienspende eher zu einem gemischten Chimärismus zu führen. Keinen Unterschied zeigten die Gruppen dagegen bei der HLA-Identität ( $p=0,83$ ). Die zugrunde liegenden Erkrankungen wurden wieder in akut/chronisch und lymphatisch/myeloisch unterteilt. Bezüglich der Gruppen E und F zeigten sich signifikante Unterschiede myeloischen und lymphatischen Leukämien ( $p=0,03$ ), nicht aber zwischen akuten und chronischen Leukämien ( $p=0,49$ ). Drei der vier myeloischen Leukämien in Gruppe F waren AML, eine CML. Ein nicht-myeloablatives Konditionierungsschema erhielten in Gruppe E 22 Patienten, in Gruppe F nur fünf der zehn Patienten (Gruppe E 68,7% vs. Gruppe F 50,0%,  $p=0,28$ ). In den Tafeln 19 und 20 ist das Transplantationsoutcome dargestellt. Zehn der 32 Patienten in Gruppe E und vier der zehn Patienten in Gruppe F hatten ein Rezidiv (31,3% vs. 40,0%,  $p=0,61$ ). Auch in der Zeit des Rezidiv-freien Überlebens ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,64$ ). 14 Patienten in Gruppe E und sechs Patienten in Gruppe F verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums (43,8% vs. 60,0%,  $p=0,37$ ), wobei sich hinsichtlich der Gesamtüberlebensdauer ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigten ( $p=0,88$ ). Die Inzidenz der aGvHD war in Gruppe E etwas höher als in Gruppe F (50,0% vs. 40,0%,  $p=0,58$ ). Hinsichtlich des Schweregrads der aGvHD zeigten sich überhaupt keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In beiden Gruppen hatten je 50,0% der Patienten eine milde bzw. schwere aGvHD ( $p=1,00$ ). Die Diagnose erfolgte in Gruppe E durchschnittlich am Tag +18, in Gruppe F am Tag +19 (18,1 vs. 18,8,  $p=0,89$ ). Wie bei der aGvHD fanden sich auch bei der cGvHD keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppe E und F. Acht Patienten (25,0%) der Gruppe E und drei Patienten (30,0%) der Gruppe F erkrankten im Verlauf an einer cGvHD. In Gruppe E waren fünf (62,5%) Verläufe mild und drei (37,5%) schwer, in Gruppe B verlief eine (33,3%) cGvHD mild und zwei (66,7%) schwer ( $p=0,39$ ).

### **3.3.4. Patienten ohne Chimärismus beim Engraftment**

Insgesamt vier Patienten fielen auf, weil sie beim Engraftment keinen Chimärismus in einer oder mehreren der drei untersuchten Zelllinien hatten, das heißt, dass nach der Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen ausschließlich eigene

Merkmale (STR-PCR) bzw. eigene Interphasekerne (FISH) in den dendritischen oder T-Zellen des peripheren Blutes gefunden wurden.

Keinen Chimärismus in beiden Dendritensubpopulationen zeigte eine Patientin (AML, 12 Gy TBI-Cyclo-ATG, Fremdspender mit HLA-DRQ-1 Mismatch, KMT) bei der FISH-Analyse am Tag +21 (je 100 weibliche Kerne). Die am gleichen Tag durchgeführte FISH-Analyse des peripheren Blutes zeigte dagegen nur männliche Spenderkerne. Am Tag +18 wurde bei der Patientin eine schwere aGvHD der Haut (Grad IV, histologisch gesichert) diagnostiziert. Am Tag +58 verstarb die Patientin an einer generalisierten cerebralen Thrombosierung bei V.a. Mikroangiopathie. Bis dahin war sie in kompletter Remission.

Bei einem Patienten (CLL, 4 Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT) konnten bei der Chimärismusanalyse der DC2 aus 16.000 sortierten Zellen mittels STR-PCR-Technik am Tag +21 nur eigene Merkmale detektiert werden. Durchgeführte Analysen des Knochenmarks am Tag +80 und des peripheren Blutes am Tag +148 zeigten einen gemischten Gesamtchimärismus. Die T-Zell-Chimärismen an den Tagen +92 und +148 waren ebenfalls gemischt. Eine genaue Quantifizierung der gemischten Chimärismen war aus technischen Gründen nicht möglich. Im Verlauf kam es weder zu einer akuten noch zu einer chronischen GvHD. Sechs Wochen nach der Transplantation waren immer noch CLL-Zellen im peripheren Blut zu sehen. Später war der Patient in kompletter Remission.

Wegen einer persistierenden Panzytopenie erhielt eine Patientin (ALL, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT) am Tag +29 noch einmal periphere Blutstammzellen des HLA-identen Familienspenders. In der darauf folgenden Chimärismusanalyse der 18.000 sortierten CD123<sup>+</sup> DC2 fanden sich nur eigene Merkmale (STR-PCR). Im Knochenmark und in den T-Zellen waren am Tag +64 nur Merkmale der Spenderin nachweisbar. In einer weiteren Untersuchung der DC2 am Tag +99 zeigten auch diese einen kompletten Chimärismus. Im Verlauf wurde keine akute oder chronische GvHD diagnostiziert. Am Tag +173 trat ein Rezidiv der ALL auf, an dem die Patientin 22 Tage später verstarb.

Eine Patientin (SAA, 12 Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Fremdspender, KMT) zeigte in der am Tag +41 durchgeführten Chimärismusanalyse mittels STR-PCR

Technik in den T-Zellen und im peripheren Blut ausschließlich eigene Merkmale. Der klinische Verlauf zeigte keine aGvHD, die Patientin verstarb am Tag +77 an einer schweren Infektkomplikation.

### **3.3.5. DC Chimärismus sechs und zwölf Monate nach Transplantation**

Insgesamt hatten 33 Patienten nach sechs Monaten einen kompletten DC1-Chimärismus. Alle Patienten befanden sich in Vollremission. 26 Patienten hatten nach sechs Monaten keine cGvHD, vier hatten eine milde cGvHD und drei eine schwere. Bei zwei Patienten war die Haut, bei einem Patienten der Darm und bei vier Patienten waren Haut und Leber von der cGvHD betroffen. Von 63 untersuchten Patienten mit komplettem DC2-Chimärismus nach sechs Monaten waren 60 in Vollremission, drei Patienten hatten ein Rezidiv. Bei 13 Patienten fanden sich klinisch Anzeichen für eine cGvHD, die in acht Fällen mild und in fünf Fällen schwer verlief. Bei sieben Patienten war nur die Haut, bei einem Patienten die Leber, bei drei Patienten der Darm und bei zwei Patienten Haut und Leber von der cGvHD betroffen. 30 Patienten mit komplettem T-Zell-Chimärismus nach sechs Monaten waren in Vollremission. Bei insgesamt zehn Patienten wurde eine cGvHD diagnostiziert, wobei viermal die Haut, zweimal der Darm, dreimal Haut und Leber und einmal Leber und Darm betroffen waren.

27 Patienten, die nach zwölf Monaten nachuntersucht wurden, hatten einen kompletten DC1-Chimärismus und waren in Vollremission. Bei sechs Patienten wurde eine cGvHD diagnostiziert (vier mild, zwei schwer). In drei Fällen war die Haut betroffen, in den anderen Fällen je einmal Leber, Lunge sowie Haut und Leber. 31 der 32 untersuchten Patienten mit komplettem DC2-Chimärismus nach zwölf Monaten waren in Vollremission. Bei einer Patientin war das Rezidiv ihres Plasmozytoms zum Zeitpunkt der Chimärismusanalyse bereits bekannt. 23 der 32 Patienten zeigten keine cGvHD, sechs eine milde und drei eine schwere cGvHD (fünfmal Haut, einmal Darm, einmal Lunge, zweimal Haut und Leber).

Zwei Patienten hatten sechs Monate nach der Transplantation einen gemischten Chimärismus in den DC1. Eine Patientin (CML, 8 Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG) zeigte am Tag +286 in der FISH-Untersuchung der DC1 einen weiblichen Empfängerkern auf 100 männliche Spenderkerne. Die am gleichen Tag durchgeführten Untersuchungen der DC2 und des peripheren Blutes ergaben jeweils einen kompletten Chimärismus. Nach zwölf Monaten (Tag +340) waren alle Chimärismen komplett (DC1, DC2, peripheres Blut). Die Patientin hatte bereits am Tag +22 einen gemischten DC2-Chimärismus (fünf eigene / 150 fremde Zellen) und einen gemischten Chimärismus im peripheren Blut (vier eigene / 96 fremde Zellen) am Tag +44. Im gesamten Beobachtungszeitraum wurde weder eine aGvHD noch eine cGvHD diagnostiziert, die Patientin war immer in Vollremission.

Ein Patient (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT), der einen gemischten DC1-Chimärismus und kompletten DC2-Chimärismus am Tag +147 zeigte, war auch am Tag +13 in beiden Dendritensubpopulationen gemischt chimär (DC1: 6% Eigenanteil, DC2: 3% Eigenanteil; STR-PCR). Am Tag +128 trat ein Rezidiv seiner AML auf. Der Patient hatte zu keinem Zeitpunkt eine aGvHD oder cGvHD.

Ein Patient (MDS, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG) zeigte am Tag +153 in der STR-PCR Untersuchung aus 10.000 Zellen 7% eigene Merkmale in den DC2. Die DC1 zeigten einen kompletten Chimärismus, ebenso wie die an den Tagen +98 und +157 untersuchten T-Zellen und das an den Tagen +96 und +356 untersuchte Knochenmark. Am elften Tag nach der Transplantation trat eine aGvHD Grad II der Haut auf. Am Tag +153 hatte der Patient eine milde cGvHD, von der Haut und Leber betroffen waren. Er war immer in kompletter Remission.

Eine Patientin (ALL, 12Gy TBI-Vp, HLA-identer Familienspender, KMT) zeigte in der FISH-Untersuchung am Tag +191 in beiden Dendritensubpopulationen keinen Chimärismus (DC1: 50 eigen/keine fremd, DC2: 20 eigen/keine fremd). Die niedrige Zahl der ausgezählten Zellen beruht auf der geringen Zahl von nur jeweils 2.700 Zellen, die beim Cellsorting gewonnen werden konnten, weshalb auf dem Zytospinpräparat sehr wenige Zellen zu finden waren. Das am Tag +153 untersuchte periphere Blut zeigte einen kompletten Chimärismus. Beim Engraftment zeigten die



DC2 (Tag +15) einen kompletten, die T-Zellen (Tag +34) einen gemischten (22 eigen/78 fremd) und das Knochenmark (Tag +30) einen gemischten (zwei eigen/100fremd) Chimärismus. Am Tag +11 wurde eine schwere, drittgradige aGvHD der Haut diagnostiziert. Am Tag +282 waren alle 400 ausgezählten Kerne der DC2 vom Spender. Eine cGvHD oder ein Rezidiv der ALL wurden nicht diagnostiziert.

Eine Patientin (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Fremdspender, KMT) hatte am Tag +412 einen gemischten DC1-Chimärismus und einen kompletten DC2-Chimärismus. Die FISH-Untersuchung zeigte unter insgesamt 602 ausgezählten Kernen zwei eigene. Die am gleichen Tag durchgeführte Analyse des peripheren Blutes ergab einen kompletten Chimärismus. Der an den Tagen +28 und +196 untersuchte DC2-Chimärismus war jeweils komplett. Die aGvHD Grad II der Haut ging im Verlauf in eine milde cGvHD über. Die Patientin war immer in Vollremission.

Variable		<i>CC DC1</i>						<i>MC DC1</i>		
		<i>CC DC2</i>			<i>MC DC2</i>			<i>MC DC2</i>		
		<i>CC TC</i>	<i>MC TC</i>	<i>Gesamt</i>	<i>CC TC</i>	<i>MC TC</i>	<i>Gesamt</i>	<i>CC TC</i>	<i>MC TC</i>	<i>Gesamt</i>
<i>keine aGvHD</i>	<i>Anzahl</i>	6	2	8	1		1			
	<i>Zeilen%</i>	66,7	22,2	88,9	11,1		11,1			
	<i>Spalten%</i>	66,7	100	72,3	100		50,0			
<i>aGvHD Grad I-IV</i>	<i>Anzahl</i>	3		3		1	1	1	1	2
	<i>Zeilen%</i>	50,0		50,0		16,7	16,7	16,7	16,7	33,3
	<i>Spalten%</i>	33,3		27,3		100	50,0	100	100	100
<i>milde aGvHD Grad I-II</i>	<i>Anzahl</i>	2		2		1	1	1	1	2
	<i>Zeilen%</i>	40,0		40,0		20,0	20,0	20,0	20,0	40,0
	<i>Spalten%</i>	66,7		66,7		100	100	100	100	100
<i>schwere aGvHD Grad III- IV</i>	<i>Anzahl</i>	1		1						
	<i>Zeilen%</i>	100		100						
	<i>Spalten%</i>	33,3		33,3						

Tafel 22/1: **Kombinationen der Chimärismen der verschiedenen Zelllinien**

Die Tabelle zeigt alle aufgetretenen Kombinationsmöglichkeiten zwischen DC1-, DC2- und TC-Chimärismen (ausgenommen sind Fälle, wo nur eigene Merkmale auftraten), sowie innerhalb einer Kombinationsmöglichkeit aufgetretene Komplikationen bzw. Tod.

Variable		CC DC1						MC DC1		
		CC DC2			MC DC2			MC DC2		
		CC TC	MC TC	Gesamt	CC TC	MC TC	Gesamt	CC TC	MC TC	Gesamt
<b>keine cGvHD</b>	Anzahl	6	2	8	1		1		1	1
	Zeilen%	60,0	20,0	80,0	10,0		10,0		10,0	10,0
	Spalten%	66,7	100	72,7	100		50,0		100	50
<b>cGvHD gesamt</b>	Anzahl	3		3		1	1	1		1
	Zeilen%	60,0		60,0		20,0	20,0	20,0		20,0
	Spalten%	33,3		27,3		100	50,0	100		50
<b>milde cGvHD</b>	Anzahl	2		2		1	1	1		1
	Zeilen%	50,0		50,0		25,0	25,0	25,0		25,0
	Spalten%	66,7		66,7		100	100	100		100
<b>schwere cGvHD</b>	Anzahl	1		1						
	Zeilen%	100		100						
	Spalten%	33,3		33,3						

Tafel 22/2: **Kombinationen der Chimärismen der verschiedenen Zelllinien**

Variable		<i>CC DC1</i>						<i>MC DC1</i>		
		<i>CC DC2</i>			<i>MC DC2</i>			<i>MC DC2</i>		
		<i>CC TC</i>	<i>MC TC</i>	<i>Gesamt</i>	<i>CC TC</i>	<i>MC TC</i>	<i>Gesamt</i>	<i>CC TC</i>	<i>MC TC</i>	<i>Gesamt</i>
<b>nicht verstorben</b>	<i>Anzahl</i>	5	1	6	1		1		1	1
	<i>Zeilen%</i>	62,5	12,5	75,0	12,5		12,5		12,5	12,5
	<i>Spalten%</i>	55,6	50,0	54,5	100		50,0		100	50
<b>Verstorben</b>	<i>Anzahl</i>	4	1	5		1	1	1		1
	<i>Zeilen%</i>	57,1	14,3	71,4		14,3	14,3	14,3		14,3
	<i>Spalten%</i>	44,4	50,0	45,5		100	50,0	100		50
<b>Rezidiv- frei</b>	<i>Anzahl</i>	8	1	9	1		1		1	1
	<i>Zeilen%</i>	72,7	9,1	81,8	9,1		9,1		9,1	9,1
	<i>Spalten%</i>	88,9	50,0	81,8	100		50,0		100	50,0
<b>Rezidiv</b>	<i>Anzahl</i>	1	1	2		1	1	1		1
	<i>Zeilen%</i>	25,0	25,0	50,0		25,0	25,0	25,0		25,0
	<i>Spalten%</i>	11,1	50,0	18,2		100	50,0	100		50,0

Tafel 22/3: Kombinationen der Chimärismen der verschiedenen Zelllinien

### 3.3.6. Patienten mit Unterschieden in den Chimärismen

Insgesamt fielen fünf Patienten, die in allen drei Zelllinien beim Engraftment analysiert wurden, mit unterschiedlichen Chimärismen zwischen den Zelllinien auf (siehe Tafel 21).

Ein Patient (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT) hatte am Tag +16 in beiden Dendritensubpopulationen einen kompletten Chimärismus. Die mittels STR-PCR Technik durchgeführte T-Zell-Chimärismusuntersuchung am Tag +13 zeigte 3% eigene Merkmale. Am gleichen Tag ergab die Analyse des Knochenmarkes 5% eigene Merkmale. Klinisch zeigte sich weder eine akute noch eine chronische GvHD. Am Tag +117 wurde ein Rezidiv der AML diagnostiziert, an dem der Patient am Tag +186 verstarb.

Ein Patient (CML, Bu-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, KMT) zeigte neben kompletten Chimärismen in beiden Dendritensubpopulationen (Tag +21) in der STR-PCR Untersuchung einen gemischten T-Zell-Chimärismus (19% Eigenanteil) (Tag +27). Nach etwa sechs Monaten waren alle Chimärismen komplett. Im Verlauf wurde weder eine akute noch eine chronische GvHD diagnostiziert. Der Patient war immer in Vollremission.

Eine Patientin (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Fremdspender, PBSCT) zeigte in der FISH-Untersuchung einen kompletten DC1- und T-Zell-Chimärismus. Bei den DC2 fand sich ein eigener Kern unter 200 Spenderkernen. Im Verlauf traten weder aGvHD noch cGvHD auf. Die Patientin war immer in Vollremission.

Bei einer Patientin (ALL, 12Gy TBI-Vp, HLA-identer Familienspender, KMT) ergab die FISH-Analyse am Tag +12 einen kompletten DC1-Chimärismus (keine eigen / 500 fremd), einen gemischten DC2-Chimärismus (eine eigen / 500 fremd) und am Tag +58 einen gemischten T-Zell-Chimärismus (eine eigen / 99 fremd). Am Tag +16 entwickelte sich eine aGvHD Grad II der Haut, die sich weiterentwickelte zu einer milden cGvHD von Leber und Darm. Am Tag +248 wurde ein Rezidiv der ALL diagnostiziert, das am Tag +274 zum Tod der Patientin führte.

Die STR-PCR am Tag +19 zeigte bei einer Patientin (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Fremdspender, PBSCT) in beiden Dendritensubpopulationen einen gemischten Chimärismus. Der Eigenanteil der DC1 lag bei 20%, der der DC2 bei 6%. Bei der am Tag +22 durchgeführten T-Zell-Analyse und der Knochenmark-Analyse am Tag +41 konnten keine eigenen Merkmale detektiert werden. Bereits am Tag +15 hatte die Patientin ein Rezidiv, an dem sie allerdings erst am Tag +330 verstarb. Zusätzlich wurde eine akute Haut-GvHD Grad II am Tag +7 diagnostiziert.

Bei drei weiteren Patienten lagen Unterschiede zwischen den Subpopulationen DC1 und DC2 vor, ohne dass der T-Zell-Chimärismus untersucht wurde.

Bei einem Patienten (NHL, 4Gy TBI Flu-Cyclo-ATG, HLA-identer Fremdspender, PBSCT) wurden am Tag +18 in der FISH-Analyse der DC1 unter 300 Spenderzellen zwei Empfängerzellen gefunden. Der DC2-Chimärismus war komplett. Am Tag +30 erkrankte der Patient an einer drittgradigen aGvHD von Haut und Darm. Im Verlauf entwickelte sich eine schwere cGvHD von Leber und Darm, an der der Patient am Tag +129 verstarb.

Eine Patientin (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Fremdspender, PBSCT) hatte am Tag +23 einen kompletten DC2-Chimärismus und einen gemischten DC1-Chimärismus (fünf eigen / 500 fremd). Am Tag +16 wurde eine aGvHD Grad III der Haut diagnostiziert.

Eine Patientin (AML, Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT) zeigte am Tag +12 einen kompletten DC2-Chimärismus und einen gemischten DC1-Chimärismus (eine eigen / 500 fremd). Im Gegensatz zu vorher genannten Patientin kam es bei ihr nicht zu einer GvHD. Sie verstarb am Tag +168 an einer Sepsis.

Bis auf zwei waren alle Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes in kompletter Remission. Die Patienten, die unterschiedliche Chimärismen zwischen den Zelllinien nach sechs oder zwölf Monaten hatten, wurden bereits unter 3.3.5. ausführlich beschrieben.

## **4. Diskussion**

Das Chimärismusverhalten von dendritischen Zellen und von T-Zellen im peripheren Blut nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation ist bis heute kaum beschrieben. Lediglich Auffermann-Gretzinger et al. (2002) zeigten anhand eines Kollektives mit 19 Patienten eine rasche Etablierung des Dendritenchimärismus nach der Transplantation. Um eine Aussage über den Einfluss des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Transplantation machen zu können, waren Fallzahl und Inzidenz der GvHD aber zu gering.

Ziele dieser Studie waren in erster Linie die Kinetik der Chimärismen der beiden Subpopulationen der dendritischen Zellen und der T-Zellen zu untersuchen sowie deren Einfluss auf den klinischen Verlauf und den Erfolg einer Transplantation.

### **4.1. Kinetik der Chimärismen**

Der Großteil der untersuchten Patienten hatte beim Engraftment bereits einen kompletten Chimärismus in beiden Subpopulationen der dendritischen Zellen. Bis auf einen kleinen Prozentsatz von Patienten, bei denen kein Chimärismus analysiert werden konnte, wurde bei den restlichen Patienten ein gemischter Chimärismus festgestellt. Weit weniger einheitlich war das Bild bei den quantitativen Chimärismusanalysen. Hier bewegte sich der Eigenanteil in der FISH- bzw. PCR-Analyse zwischen 0,2% und 50%.

Die Analysen nach sechs und zwölf Monaten zeigten, dass die meisten Patienten im Verlauf des ersten Jahres nach der Transplantation einen stabilen kompletten Chimärismus entwickelten. Zwischen den beiden Subpopulationen waren, genauso wie beim Engraftment, keine auffälligen Differenzen zu beobachten. Von den 20 Patienten mit gemischtem DC2-Chimärismus beim Engraftment wurden insgesamt neun nach sechs Monaten nachuntersucht. Acht Patienten hatten zu diesem Zeitpunkt

einen stabilen kompletten Chimärismus, ein Patient hatte immer noch einen gemischten Chimärismus, zeigte aber in der Nachuntersuchung nach zwölf Monaten einen stabilen kompletten Chimärismus. Eine mögliche Erklärung für das Verschwinden der Empfänger-Zellen aus dem peripheren Blut im Laufe der Zeit könnte zum einen die Elimination der Zellen durch alloreaktive Spender-T-Zellen im Rahmen einer Graft-versus-Host- oder Graft-versus-Leukämie-Reaktion oder zum anderen das Absterben residualer Empfänger-Zellen im Rahmen des natürlichen Turnovers (*Horowitz et al. 1990*) sein.

Das Chimärismusverhalten der T-Zellen war dem der dendritischen Zellen relativ ähnlich. 23,3% der untersuchten Patienten hatten beim Engraftment einen gemischten Chimärismus, nach sechs Monaten waren es noch 9,1%, womit der Prozentsatz etwas höher lag als bei den Dendriten. Der quantitative Chimärismus zeigte einen etwas größeren Range (1-80%).

## **4.2. Einfluss der Chimärismen auf den klinischen Verlauf**

Der Einfluss des Dendriten- und des T-Zell-Chimärismus auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Transplantation ist vor allem in Hinblick auf die komplexen immunologischen Interaktionen dieser beiden Zelllinien interessant. Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen potente Aktivatoren von T-Zellen (*Gueromonprez et al., 2002*), die die Effektorzellen der unerwünschten Graft-versus-Host-, aber auch der erwünschten Graft-versus-Leukämie-Reaktion sind.

### **4.2.1. DC1-Chimärismus**

In Tafel 16 ist ein Überblick über die Gruppen A (kompletter DC1-Chimärismus, CC DC1) und B (gemischter DC1-Chimärismus, MC DC1) gegeben. In Gruppe B waren nach einer PBSCT verhältnismäßig deutlich mehr Patienten mit einem gemischten Chimärismus vertreten als in Gruppe A. Der Grund dafür könnte die bei einer PBSCT übliche Vorbehandlung mit G-CSF sein, was eher zu einer T2-Antwort führt und



damit eventuell zu einer Art Toleranz der Spender-T-Zellen gegenüber den Empfängerzellen. Weiterhin war auffällig, dass es sich in Gruppe B ausschließlich um Patienten mit einer AML als Grunderkrankung handelte.

Ein nahezu signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und B zeigte sich im Bereich der Konditionierung. Alle Patienten mit gemischtem Chimärismus hatten sich einer nicht-myeloablativen Konditionierung unterzogen. Somit scheint eine nicht-myeloablative Konditionierung häufiger zu einem gemischten Chimärismus zu führen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Forschungsgruppen (*Frassoni et al., 1990; Leuween et al., 1994*). Hinsichtlich des Erfolges und möglicher Komplikationen waren auch keine wesentlichen Unterschiede zwischen Gruppe A und B vorhanden. Weder in der Häufigkeit noch in der Dauer der Rezidiv-freien Überlebenszeit gab es Unterschiede zwischen Patienten mit gemischtem oder komplettem Chimärismus in den DC1. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (*Schattenberg et al., 1989; Bertheas et al., 1991; Choi et al., 2000*), die zu dem Ergebnis kamen, dass ein gemischter hämatopoetischer Chimärismus nicht mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert ist.

Ein ähnliches Bild hat man bei Betrachtung der Todesfälle. Zwar scheinen tendenziell mehr Patienten mit einem gemischten DC1-Chimärismus zu sterben, aber das Gesamtüberleben ist gegenüber Gruppe A nur geringfügig schlechter. Die Inzidenz der aGvHD lag in Gruppe B etwas höher als in Gruppe A, und der Verlauf war in der Regel schwerer. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Frassoni et al. (1990). Hier waren in der Gruppe der komplett chimären Patienten sowohl Inzidenz als auch Schweregrad der aGvHD höher als in der Gruppe der gemischt chimären. Möglicherweise lässt sich dieses Phänomen durch eine verstärkte T-Zell-Aktivität gegen hämatopoetische Zellen im Rahmen einer GvH- oder GvL-Reaktion erklären, was schließlich zu einem kompletten Chimärismus führt. Dann wären die Chimärismusanalysen in dieser Studie dadurch möglicherweise erklärbar, da sie zu einem beliebigen Zeitpunkt und nicht prospektiv wie in unserer Studie durchgeführt wurden.

Leuween et al. (1994) konnten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Inzidenz der aGvHD zwischen komplett und gemischt chimären Patienten finden. Im

Gegensatz zu unseren Beobachtungen bezüglich der aGvHD war die Inzidenz der cGvHD in Gruppe A etwas höher. Clark et al. (2001) untersuchten 17 Patienten nicht beim Engraftment, sondern erst beim Auftreten einer cGvHD und fanden eine Assoziation mit kompletten Chimärismen in beiden Dendritensubpopulationen.

#### **4.2.2. DC2-Chimärismus**

Tafel 17 verschafft einen Überblick über die Gruppen C (CC DC2) und D (MC DC2). Die Entstehung des DC2-Chimärismus scheint etwas anderen Einflüssen zu unterliegen als der DC1-Chimärismus. In Gruppe C (CC DC2) waren 45,5% der Patienten Empfänger von Knochenmark, in Gruppe D (MC DC2) dagegen 70,0% und in Gruppe B nur 12,5%. HLA-Identität und Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger scheinen keine wesentliche Rolle zu spielen. Hinsichtlich der Konditionierung ist jedoch der gleiche Trend wie beim DC1-Chimärismus zu erkennen. 80,0% der Patienten mit gemischtem DC2-Chimärismus war nicht-myeloablativ konditioniert worden, gegenüber 61,4% in Gruppe C. Hinsichtlich der Grunderkrankungen ergaben sich keine Auffälligkeiten. In Gruppe D zeigte sich auch, anders als in Gruppe B, eine Mischung von chronischen und akuten bzw. myeloischen und lymphatischen Erkrankungen.

Auch das Auftreten eines Rezidivs sowie die Dauer des Rezidiv-freien Überlebens scheint nicht durch das Chimärismusverhalten der DC2 beeinflusst zu werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich einem bei Betrachtung der Häufigkeiten der Todesfälle und des Gesamtüberlebens. Bezüglich der Inzidenz der aGvHD bestand kein Unterschied zwischen Gruppe C und D. Allerdings war der Verlauf einer aGvHD bei Patienten mit komplettem DC2-Chimärismus (nahezu) signifikant schwerer. 72,1% der Patienten mit einer aGvHD in Gruppe C machten einen schweren Verlauf durch, in Gruppe D waren es 40,0%. In Gruppe D war die Inzidenz der cGvHD etwas höher, wobei auch hier, wie bei der aGvHD, die Verläufe in der Gruppe der komplett chimären Patienten meist schwerer waren. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Clark et al. (2001), die von einer erhöhten cGvHD Inzidenz in der Gruppe der komplett chimären Patienten berichteten.

### 4.2.3. T-Zell-Chimärismus

Tafel 18 zeigt die zu Gruppe E (CC TC) und F (MC TC) gehörenden Daten. Die Stammzellquelle scheint keinen besonderen Einfluss zu haben. Es fällt lediglich auf, dass in Gruppe E etwas mehr Empfänger einer PBSCT vertreten sind. Einen signifikanten Unterschied erkennt man jedoch bei Betrachtung der Gruppen E und F in Abhängigkeit des Spenders. 90% der Spender in Gruppe F waren Familienspender gegenüber 37,5% in Gruppe E. Dieser signifikante Unterschied ist im Zusammenhang mit den Grunderkrankungen und der Art der Konditionierung zu sehen. Ebenfalls signifikant war, dass in Gruppe E prozentual deutlich mehr Patienten mit einer myeloischen Leukämie vertreten waren, wobei es keine Rolle zu spielen scheint, ob diese akut oder chronisch ist.

Anders als bei den dendritischen Zellen war bei den T-Zellen in der Gruppe der gemischt chimären Patienten kein Unterschied zwischen einer myeloablativen und einer nicht-myeloablativen Konditionierung zu sehen. Die Rezidivhäufigkeit und die Rezidiv-freie Überlebenszeit waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Die Häufigkeit der Todesfälle war in Gruppe F etwas höher, was sich aber kaum auf die Gesamtüberlebensdauer auswirkte. Die Inzidenz der aGvHD war in Gruppe E etwas höher, was auf die Rolle der Spender-T-Zellen als Effektorzellen der GvHD zurückzuführen sein dürfte. Allerdings war der Verlauf bei komplett chimären Patienten nicht so schwer wie bei gemischt chimären Patienten, was durch regulatorisch wirkende Spender-T-Zellen hervorgerufen sein könnte (*Hoffmann et al., 2002*).

### 4.2.4. Einzelkasuistiken

Insgesamt vier Patienten fielen auf, weil sie beim Engraftment keinen Chimärismus in einer oder mehreren Zelllinien hatten, sie bildeten also neue Dendriten oder T-Zellen ausschließlich aus eigenen Vorläuferzellen (siehe 3.3.3.). Bei zwei Patienten wurde eine myeloablative und bei zwei eine nicht-myeloablative Konditionierung durchgeführt. Bei einer Patientin, die myeloablativ konditioniert worden war, trat eine schwere aGvHD der Haut auf. Die drei anderen Patienten hatten im Verlauf

keine GvHD. Trotz des Fehlens von Spendermerkmalen nach der Transplantation waren bis auf eine Patientin alle in kompletter Remission innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Bei einer Patientin trat am Tag +173 ein Rezidiv auf. Beim Engraftment wurden bei der Chimärismusanalyse der DC2 und der T-Zellen ausschließlich eigene Merkmale detektiert. Bei einer Nachuntersuchung 58 Tage später zeigte sich ein kompletter DC2-Chimärismus. Eine weitere Analyse des T-Zell-Chimärismus wurde nicht durchgeführt. Möglicherweise konnten sich die Spenderzellen innerhalb dieses Zeitraums erst durch den natürlichen Turnover durchsetzen, zumindest im peripheren Blut. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass zunächst eine Host-versus-Graft-Reaktion im Gange war, die zwar für eine Abstoßungsreaktion zu schwach war, aber doch stark genug, um eine Spenderhämatopoese zu verhindern. Eine GvH-/GvL-Reaktion kommt als Erklärung eher nicht in Betracht, da der Zeitraum des Wechsels von keinem zu einem kompletten Chimärismus relativ kurz war, und weil im Verlauf weder eine akute noch eine chronische GvHD diagnostiziert wurde. Die Patientin verstarb an einem Rezidiv ihrer Grunderkrankung.

Insgesamt ergibt sich kein einheitliches Bild. Zum einen differieren die Chimärismusanalysen der einzelnen hämatopoetischen Zelllinien zum Teil recht deutlich, zum anderen sind die klinischen Verläufe bei Patienten ohne Chimärismus in den dendritischen Zellen oder T-Zellen sehr unterschiedlich. Eine Patientin beispielsweise hatte keinen Chimärismus in beiden Dendritensubpopulationen, im peripheren Blut ergab die Analyse aber einen kompletten Gesamtchimärismus. Ein anderer Patient hatte keinen DC2-Chimärismus, aber einen gemischten T-Zell-Chimärismus und gemischten Gesamtchimärismus.

Eine mögliche Erklärung für die doch erheblichen Unterschiede zwischen den Zelllinien bei einer Chimärismusanalyse könnte zum einen der geringe Anteil (<1%) der dendritischen Zellen an den mononukleären Zellen des peripheren Blutes sein, und zum anderen die Auszählung von insgesamt sehr wenigen Zellen bei der FISH-Untersuchung. Dem entgegen stehen Daten einer Studie von Morse et al. (2002), die zeigen, dass Dendritenchimärismus und Gesamtchimärismus in der Regel die gleiche Ausprägung haben.

Weiterhin zeigt sich in unserer Studie, dass die Ergebnisse der Chimärismusanalysen in den verschiedenen, bei uns untersuchten Leukozytensubsets differieren können (Tafel 21). Bei insgesamt sechs Patienten, die in allen drei Zelllinien (DC1, DC2, TC) beim Eingraftment gemessen wurden, war dies der Fall. Zum Teil war das Ergebnis der Chimärismusanalyse bei beiden Dendritensubsets noch gleich, und es wichen nur die T-Zellen ab, zum Teil waren die Ergebnisse der Dendritensubsets auch unterschiedlich. Ein eindeutiger Einfluss auf eine der untersuchten klinischen Variablen war nicht feststellbar, so dass die Rolle des Chimärismusverhaltens der verschiedenen Leukozytensubsets weiter unklar bleibt. Zur Lösung dieser Fragestellung bedarf es vermutlich wesentlich größerer Fallzahlen.

#### **4.2.5. Das Zusammenspiel von dendritischen und T-Zellen hinsichtlich GvHD**

Unsere Daten zeigen, dass Patienten mit einem gemischten Chimärismus in den dendritischen Zellen tendenziell häufiger an einer GvHD erkranken. In der Gruppe der Patienten mit gemischtem DC1-Chimärismus (Gruppe B) waren Inzidenz und Schweregrad der aGvHD erhöht. Bei gemischtem DC2-Chimärismus lag ebenfalls eine leicht erhöhte Inzidenz der aGvHD vor. Allerdings war der Verlauf der aGvHD in der Gruppe mit komplettem DC2-Chimärismus schwerer. Ein umgekehrtes Bild zeigt sich einem bei den T-Zellen. Hier war die Inzidenz der aGvHD in Gruppe E (CC TC) etwas höher als in Gruppe F (MC TC), wobei das Chimärismustermuster scheinbar keinen Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung hatte.

Die Voraussetzungen, die zu diesen klinischen Beobachtungen führen, sind vielseitig und komplex und vor allem in ihrem Zusammenspiel noch nicht hinreichend erforscht, so dass hier lediglich gemutmaßt werden kann.

Eine der grundlegenden Fragen dürfte wohl sein, ob die Zellen einer der untersuchten Zelllinien, die an der Initiierung der GvHD beteiligt sind, vom Spender oder Empfänger stammen.

## **„Fremd“-Erkennung**

Während der zweiten Phase der GvHD werden Empfänger-Antigene an T-Zellen präsentiert, die daraufhin proliferieren und sich differenzieren.

Nach Einbringen der zellulären Bestandteile der Spende erkennen immunkompetente Spender-T-Zellen fremde Empfänger-Antigene, die über MHC durch APC präsentiert werden, als fremd. APC zerlegen große Proteine in kleinere Peptide, die anschließend an MHC-Moleküle binden und an der Zelloberfläche als Allopeptid-MHC-Komplexe präsentiert werden. Durch die Interaktion zwischen den Allopeptid-MHC und dem Antigen-spezifischen TCR kommt es zur „Fremd“-Erkennung und folgender Aktivierung der T-Zellen. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Spender CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine GvHD induzieren bei unterschiedlichen MHC-Klasse-II-Molekülen und dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine GvHD induzieren bei unterschiedlichen MHC-Klasse-I-Molekülen.

Das Zustandekommen der zweiten Phase wird durch die erste Phase erleichtert, die ihrerseits stark beeinflusst wird durch das Konditionierungsregime. Die Konditionierung verursacht eine Reihe von inflammatorischen Prozessen in den Geweben. Im Rahmen der Ganzkörperbestrahlung oder/und Hochdosis-Chemotherapie schütten aktivierte Zellen des geschädigten Gewebes große Mengen an inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF und IFN- $\gamma$  aus (Holler, 2002). Durch die dysregulierte Ausschüttung der Zytokine kommt es wahrscheinlich zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und Empfänger-spezifischen MHC-Antigenen. Die gesteigerte Expression von Spendergewebe-Antigenen verstärkt vermutlich die Erkennung histoinkompatibler Empfängergewebe-Antigene durch alloreaktive Spender-T-Zellen.

## **Funktion der T-Zellen**

Die T-Zellen sind, hervorgerufen durch komplexe Mechanismen, die Effektorzellen der GvHD. Vor allem während der Effektorphase sind sie verantwortlich für Organdysfunktionen und Gewebeschäden. Spender-T-Zellen reagieren entweder direkt oder über sekundäre Mechanismen mit den Empfängerzellen. Die aktivierten

und proliferierten T-Lymphozyten schütten verschiedene inflammatorische Zytokine aus, die zwei unterschiedliche Rollen bei der Immunantwort der akuten GvHD spielen. Bei MHC-Differenzen schütten sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen Zytokine wie IL-2, GM-CSF, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aus, die dann wiederum andere T-Zellen oder andere Zellen wie Monozyten, NK-Zellen, NK-ähnliche Zellen oder auch verbliebene Empfängerzellen aktivieren.

Bei den T-Zellen gilt allgemein die Ansicht, dass es die Zellen vom Spender sind, die zu einer GvHD führen. Das zeigen auch Daten von Studien, die belegen, dass die Inzidenz der GvHD niedriger ist, wenn die T-Zellen im Transplantat zerstört wurden. Unsere Daten zeigen ebenfalls, dass tendenziell mehr Patienten mit komplettem T-Zell-Chimärismus an einer GvHD erkranken. Andererseits führt eine T-Zell-Zerstörung häufiger zu Rezidiven, Abstoßungen und (fatal verlaufenden) Infekten (*Appelbaum, 2001*). Die erhöhte Rezidivrate liegt am Fehlen der T-Zellen, die eine zentrale Rolle beim Graft-versus-Leukämie-Effekt einnehmen. Inwieweit GvL- und GvH-Reaktion miteinander assoziiert sind, ist jedoch nicht klar. Mapara et al. (2002) berichten von einem möglichen GvL-Effekt ohne GvHD Assoziation, wohingegen Litvinova et al. (2002) die GvH-Reaktion als stärkste treibende Kraft der GvL-Reaktion darstellen. Keil et al. (2003) fanden heraus, dass nach nicht-myeloablativer Transplantation eine rasche Etablierung eines Spender-T-Zell-Chimärismus essentiell für ein stabiles Engraftment der Spende ist. Liegt vier Wochen nach Transplantation nicht ein mindestens 90%iger Spender-T-Zell-Chimärismus vor, so ist das Risiko für ein Rezidiv, eine Abstoßung oder beides zusammen signifikant erhöht.

### **T-Zell-Aktivierung**

Die Aktivierung der Spender-T-Zellen ist komplex und bedarf zweier Signalereignisse. Eine TCR-Peptid-MHC-Interaktion und eine besondere Formation zwischen dem an ein Empfänger-MHC gebundenem Peptid und dem Spender-TCR ist das erste Signal. Das zweite, kostimulatorische Signal kommt von APC und erfordert Zell-Zell-Kontakt. Dabei ist das Resultat des ersten Signals durch das zweite Signal reguliert. Drei Möglichkeiten stehen am Ende der Interaktion der zwei Signalereignisse: komplette Aktivierung, partielle Aktivierung und Anergie.

Kostimulatorische Moleküle sind zum Beispiel Antigene wie CD80, CD86 und das CD40/CD40L Rezeptor-Ligand-Paar. Die kostimulatorischen Voraussetzungen für T-Zellen hängen vom Aktivierungs-induzierten Reifestatus ab. Wie die T-Zellen aktiviert werden müssen, hängt davon ab, in welchem Status der Aktivierung sich die T-Zellen befinden (ruhend-aktiviert; naiv-reif) und welcher Typ der APC (professionell-unprofessionell; ruhend-aktiviert) das Antigen präsentiert.

### **Funktion der T-Helferzellen**

Sehr großen Einfluss auf die GvH-Reaktion haben die T-Helferzellen, von denen es zwei Typen gibt, Th1 und Th2. Th1 und Th2 geben verschiedene Zytokine ab, die eine gegensätzliche Wirkung auf die GvHD haben. Th1-Zellen produzieren Zytokine wie IL-2 und IFN $\gamma$ . IL-2 wird von den Th1-Zellen für ihr eigenes Wachstum produziert und gebraucht. Th2-Zellen dagegen geben IL-4, IL-6 und IL-10 ab und brauchen IL-1 oder IL-4 zum Proliferieren. Ein Überwiegen von Th1-Zellen führt zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten und dadurch zu einer GvHD, während eine Überzahl der Th2-Zellen zu einer humoralen Antwort führt und eine GvHD verhindern kann. Dies kann auch bei der Transplantation von peripheren Blutzellen beobachtet werden; die im Vergleich zur Knochenmarktransplantation höhere Anzahl an T-Zellen in der Spende müsste normalerweise ein höheres GvHD-Risiko mit sich bringen. Das ist aber nicht der Fall, da die Mobilisierung der Vorläuferzellen beim Spender mit G-CSF oder GM-CSF erfolgt, was vermutlich zu einer Th2 Polarisierung führt. Allerdings scheint das Risiko für eine cGvHD erhöht zu sein (*Arpinati et al., 2000; Reddy et al., 2000*).

Obwohl die verheerende Wirkung der Th1-Zytokine (z.B.: IL-2 und IFN- $\gamma$ ) und die schützende Wirkung der Th2-Zytokine (z.B. IL-4 und IL-10) weitestgehend akzeptiert sind, existieren auch widersprüchliche Daten. In klinischen Studien hat sich die Zahl der IL-2 produzierenden Spender-T-Zellvorläufer vor der Transplantation als prädiktiv für das Risiko einer akuten GvHD erwiesen, ebenso wie lösliche IL-2-Rezeptoren sensitive Indikatoren für eine beginnende GvHD und deren Schweregrad sind (*Krenger et al., 1997*). Chen et al. (2003) konnten zeigen, dass, neben einer Behandlung mit MMF, MTX und CyA, durch eine zusätzliche



Behandlung mit Basiliximab, einem monoklonalen IL-2-Rezeptor-Antikörper (=anti-CD25-Antikörper), eine wirkungsvollere Prävention und Reduktion des Schweregrads der GvHD erreicht werden kann.

### **Polarisierung der T-Zellen**

Verantwortlich für die Polarisierung der T-Zellen in Richtung Typ1 oder Typ2 sind die APC. DC sind die einzigen APC, die eine naive T-Zelle auf ein neues Antigen vorbereiten können. Drei Subtypen der DC sind bekannt (*Pulendran et al., 2001*):

- 1.) DC1: myeloischer Ursprung, CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup> (*lin* ist ein Cocktail verschiedener Antikörper: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56)
- 2.) DC2: lymphatischer Ursprung, CD123<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/IL-3Rα<sup>+</sup>, exprimieren große Mengen an pre-T-cell-Rezeptor-α-Ketten
- 3.) DC3: plasmazytoide DC

DC1 sind von GM-CSF abhängig und produzieren, wenn sie mit TNF-α oder CD40L erregt wurden, hohe Mengen an IL-12. Dies führt bei den T-Zellen zu einer Differenzierung in Richtung Th1.

DC2 brauchen IL-3, um sich zu differenzieren und zu proliferieren. Sie induzieren eine T-Zelldifferenzierung in Richtung Th2, wenn sie stimuliert werden. Ihre Anzahl erhöht sich im Blut unter dem Einfluss von G-CSF, so dass bei PBSCT im Vergleich zur KMT mehr DC2 im Transplantat sind, die Menge an DC1 aber in etwa gleich ist. Das erklärt das gegenüber der KMT nicht erhöhte GvHD Risiko der PBSCT.

Das Potential zur Aktivierung von T-Zellen ist bei DC2 geringer als bei DC1. Isolierte DC2 sind, im Gegensatz zu frisch isolierten DC1, nicht in der Lage, naive allogene T-Zellen zu aktivieren, sie exprimieren weniger oder keine kostimulatorischen Moleküle wie CD40, CD80 und CD86. Das unterschiedlich starke T-Zell-Aktivierungspotential liegt wahrscheinlich an den verschiedenen Rollen der DC-Subtypen bei der Immunantwort. DC1 nehmen mikrobielle und Umwelt-Antigene in der Peripherie auf, wandern zu den Lymphknoten, wo sie dann eine T-

Zell-Antwort auslösen. DC2 wandern bereits während der Fetalperiode in die Lymphknoten. Sie sind vermutlich für die Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell-Toleranz gegenüber eigenen Antigenen zuständig. DC2 werden voll aktiviert durch die Zytokine CD40L und TNF- $\alpha$ , die während einer Immunantwort durch Makrophagen und DC1 freigesetzt werden. Unter diesen Umständen initiieren DC2 die Proliferation von Ag-spezifischen T-Zellen, was zu einer Expansion von Th2-Klonen und Sekretion von IL-4 und IL-10 führt. Dies führt zu einem negativen Feedback-Mechanismus für die Th1-Differenzierung, so dass die Immunantwort und inflammatorische Prozesse terminiert werden. In mehreren experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Spender-Th2 ein vermindertes Potential für die Induktion einer GvHD haben. Es könnte aber auch sein, dass Spender-DC2 zur Pathogenese der GvHD beitragen, indem sie Empfänger-Ag indirekt Spender-T-Zellen präsentieren. Empfänger-DC spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Spender-T-Zellen, da sie diesen direkt Empfänger-Alloantigene präsentieren, resultierend in einer akuten oder chronischen GvHD (*Arpinati et al., 2000*).

T-Zellen können ihre zytotoxische Wirkung über lösliche Mediatoren wie TNF- $\alpha$  ausüben. TNF- $\alpha$  wird in größeren Mengen freigesetzt, wenn im Rahmen der durch Chemotherapie und Bestrahlung verursachten Darmschädigung Bakterien und Endotoxine (z.B. LPS) in die Blutzirkulation gelangen. Erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel wurden bei Patienten gefunden, die eine GvHD entwickelten. Bei schweren, Therapie-refraktären GvHDs brachten monoklonale TNF- $\alpha$  Antikörper eine signifikante Besserung (*Krenger et al., 1997*). Neben TNF- $\alpha$  können CTL und andere Effektorzellen, wie NK-Zellen, ihre Zytotoxizität auch über zwei andere, Kontakt-vermittelte Wege herstellen: Perforin-granzyme B-vermittelte Zytolyse und Fas/Fas Ligand (FasL)-vermittelte Apoptose. Der Fas/FasL-Weg ist vermutlich auch in die Elimination residualer Empfängerzellen involviert, was zu einem kompletten Spenderchimärismus führt (*Remberger et al., 2003*).

## **Regulatorische T-Zellen**

Bei der Entstehung bzw. Unterdrückung einer GvHD spielen auch sogenannte regulatorische T-Zellen des Spenders eine bedeutende Rolle. Edinger et al. (2003) konnten in Versuchen mit Mäusen zeigen, dass  $CD4^+CD25^+$  regulatorische Spender-T-Zellen in der Lage sind, auch bei MHC-Differenzen, eine GvHD zu verhindern, ohne dass der gewünschte GvT-Effekt verloren geht. Dies geschieht, indem diese Zellen die frühe Expansion alloreaktiver  $CD4^+CD25^-$  Spender-T-Zellen, die Expression der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Ketten und deren Fähigkeit zur Induktion einer GvHD unterdrücken.  $T_{reg}$  geben auch IL-10 ab, das, wie bereits erwähnt, eine eher schützende Funktion hat, wobei in anderen Versuchen mit Mäusen gezeigt werden konnte, dass die vollständige, schützende Wirkung der  $T_{reg}$  nur mit IL-10 möglich ist (Hoffmann et al., 2002). In der gleichen Studie fand man heraus, dass  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  eine Infiltration von GvHD-Zielorganen durch  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen zwar nicht verhindern, aber mit diesen gemeinsam dort eindringen und dort deren lokale Expansion und Induktion inflammatorischer Prozesse verhindern.

## **Einfluss des Chimärismus der Antigen-präsentierenden Zellen**

In der aktuellen Literatur wird den Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers eine wichtige Rolle bei der Induktion einer GvHD zugeschrieben (Shlomchik et al., 1999; Teshima et al., 2002). Dies gilt besonders für die zweite Phase der GvH-Reaktion wegen ihrer Funktion als potente Aktivatoren der Spender-T-Zellen. Sie stimulieren T-Zellen durch IL-1 und kostimulatorische Signale zur Produktion von IL-2 und IL-2-Rezeptoren. Unter dem Einfluss von IL-2 kommt es bei alloreaktiven T-Zellen zur klonalen Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung der Empfänger-APC hämatopoetischen Ursprungs Toleranz erzeugen und eine GvHD verhindern kann.

Diese Ansicht spiegelt sich auch in unseren Daten wieder, die zeigen, dass die Inzidenz der GvHD in den Gruppen mit gemischtem Chimärismus höher ist. Allerdings erkrankten auch Patienten mit komplettem Dendritenchimärismus an einer GvHD, was womöglich daran liegt, dass der Chimärismus in den Geweben von dem

im Blut abweicht, also noch eigene Ag-präsentierende Zellen vorhanden sind, wo die eigentliche GvHD abläuft.

Arpinati et al. (2000) konnten beobachten, dass auch die Spenderdendriten eine gewisse Rolle spielen. Nach der Transplantation von peripheren Blutstammzellen, die mit G-CSF mobilisiert wurden, war die Inzidenz der aGvHD nicht erhöht, und das, obwohl die Zahl der transplantierten T-Zellen, die die Effektorzellen der GvHD sind, zehnmal höher als bei der KMT ist. Vermutlich führt G-CSF zu einer selektiven Erhöhung der Anzahl der DC2 im peripheren Blut, ohne die Anzahl der DC1 wesentlich zu verändern. DC2 induzieren eine Th2-Antwort, die sich durch mehr Toleranz gegenüber dem Spender auszeichnet. Ein direkter Einfluss von G-CSF auf die T-Zellen kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da diese keine Rezeptoren für diesen Botenstoff besitzen. Andererseits wurde ein gewisser induktiver Beitrag der Spender-DC2 zur GvHD durch die indirekte Präsentation von Empfängerantigenen an Spender-T-Zellen erwähnt.

Reddy et al. (2000) beschrieben zusätzlich bei Behandlung mit G-CSF einen Anstieg der CD14<sup>+</sup> Monozyten, die wahrscheinlich die Alloreaktivität der T-Zellen unterdrücken und eine Verringerung inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12. Tzolas et al. (2001) fanden im Transplantat von Patienten mit aGvHD signifikant mehr DC1, die zu einem T1-Profil führen. Somit bleibt die Rolle der Spenderdendriten noch unklar, aber ihre Funktion ist wohl eher immunmodulierend.

### **Synopse der Daten aus der vorliegenden Studie**

Anhand unserer Daten kamen wir zu dem Schluss, dass die erhöhte Inzidenz und Schwere der akuten GvHD bei Patienten mit gemischtem DC1-Chimärismus (Gruppe B) zumindest teilweise durch Empfänger-DC1 induziert ist, da in Gruppe A (CC DC1) weniger Patienten an einer aGvHD erkrankten und der Verlauf in der Regel milder war. Anders beim DC2-Chimärismus, wo die Inzidenz der aGvHD bei Patienten mit gemischtem Chimärismus erhöht ist, was einen vermuten lässt, dass Spender-DC2 einen antiinflammatorischen, Toleranz-induzierenden Effekt

vermitteln. Dem entgegen steht jedoch der schwerere Verlauf bei Patienten mit komplettem DC2-Chimärismus.

Der derzeit gültigen Ansicht, dass Spender-T-Zellen die Effektorzellen der GvHD sind, entsprechen im Wesentlichen auch unseren Daten. In Gruppe E (CC TC) war die Inzidenz der aGvHD höher, das heißt, es waren verhältnismäßig mehr Spender-T-Zellen, also Effektorzellen, im peripheren Blut, was die leicht erhöhte Inzidenz erklären könnte. Auch Mattson et al. (2001) fanden in ihrer Studie eine erhöhte aGvHD Inzidenz in der Gruppe der Patienten mit komplettem T-Zell-Chimärismus. Allerdings gibt die Chimärismusanalyse keinen Aufschluss darüber, ob die Zellen in Richtung einer T1-oder T2-Antwort polarisiert wurden. Darin liegt wahrscheinlich auch der Schlüssel zum Schweregrad der GvHD, auf den der Chimärismus scheinbar keinen Einfluss hat. Einen möglichen Ansatz liefert eine Studie von Remberger et al. (2003). Patienten, die später einen kompletten T-Zell-Chimärismus entwickelten, hatten höhere Spiegel an TNF- $\alpha$  bzw. niedrigere Spiegel an TGF- $\beta$  und IL-10 während der Konditionierungsphase als Patienten mit gemischtem Chimärismus nach der Transplantation. In der ersten Woche nach der Transplantation waren die TGF- $\beta$ - und IL-10-Spiegel bei den komplett chimären Patienten immer noch niedriger, die sFas-Spiegel erhöht. In der zweiten und dritten Woche hatten diese Patienten höhere Spiegel an TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und sFas als Patienten mit gemischtem Chimärismus. Gleichzeitig konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass auch bei den Patienten mit einer aGvHD Grad II-IV höhere Spiegel an TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 und sFas vorliegen. Somit scheint das (Un-)Gleichgewicht der Zytokine einen Einfluss sowohl auf die Entwicklung des Chimärismus als auch auf die Entstehung einer aGvHD zu haben.

Unklar bleibt jedoch, wie sich der Chimärismus der einzelnen Zelllinien im Gewebe verhält. Erste Ansätze zur Bestimmung des Chimärismusverhaltens in Geweben lieferten Hessel et al. (1996). Sie untersuchten in ihrer Studie den Chimärismus von Langerhans-Zellen der Haut mittels einer Kombination aus Immunphänotypisierung und FISH. Alle neun untersuchten Leukämiepatienten zeigten einen gemischten Chimärismus in den Langerhans-Zellen, wobei der Eigenanteil unabhängig vom Analysezeitpunkt (Tag +36 bis +1395) zwischen 7% und 92% variierte. Hier wären weitere Studien, die linienspezifische Chimärismusuntersuchungen in den Geweben

durchführen, insbesondere bei GvHD-Patienten mit einer Haut-, Leber-, Darmbiopsie, dringend notwendig.

### **Situation bei der cGvHD**

Hinsichtlich der chronischen GvHD scheint der DC2-Chimärismus einen ähnlichen Einfluss zu haben wie bei der akuten GvHD. In Gruppe D (MC DC2) war die Inzidenz der cGvHD erhöht, in Gruppe C (CC DC2) war der Verlauf schwerer. DC2 scheinen in Bezug auf die cGvHD eine Rolle zu spielen, da bei der cGvHD eine bevorzugte Aktivierung der Th2 beschrieben wurde, was vermutlich durch DC2 hervorgerufen wird (*de Wit et al., 1993*). Waller et al. (2001) untersuchten 113 Patienten mit dem Ergebnis, dass eine hohe Anzahl an CD3<sup>-</sup> CD4<sup>bright</sup> DC im Spenderknochenmark (entsprechen den von uns untersuchten CD123<sup>+</sup> DC im peripheren Blut) mit einer geringeren cGvHD Inzidenz, aber höheren Rezidivinzidenz assoziiert ist. Dies passt auch zu den oben angestellten Überlegungen. Die durch DC2 vermittelte T2-Polarisierung der alloreaktiven Spender-T-Zellen führt durch zytokinvermittelte (IL-4 und IL-10), negative Feedbackmechanismen zu einer Verminderung der zytotoxischen Reaktionen und damit zu einer geringeren Inzidenz bei der cGvHD. Da allerdings GvL- und GvH-Reaktion miteinander zusammenhängen, kommt es in Folge der durch T2-Polarisierung abgeschwächten GvH-Effekte auch zu einer erhöhten Rezidivinzidenz. Ähnlich wie bei der aGvHD scheinen die Spender-DC2 auch bei der cGvHD einen protektiven Effekt auszuüben. So ist in Gruppe C die cGvHD-Inzidenz niedriger. Wider Erwarten ist allerdings auch bei der cGvHD der Verlauf in der Gruppe mit komplettem DC2-Chimärismus schwerer gewesen, womit sich auch hier eine Diskrepanz zwischen den erhobenen und erwarteten Daten ergibt.

Ebenfalls im Gegensatz zu den erwarteten Befunden waren die Chimärismusdaten der T-Zellen hinsichtlich der cGvHD. In Gruppe F (MC TC) waren sowohl Inzidenz als auch Schweregrad der cGvHD erhöht.

Hinsichtlich des Auftretens eines Rezidivs waren keine signifikanten Unterschiede zwischen gemischtem und komplettem Chimärismus bei beiden DC-Subtypen

erkennbar. Beim T-Zell-Chimärismus waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei den Häufigkeiten der Rezidive bzw. Todesfälle sichtbar. Allerdings fiel auf, dass sowohl Rezidiv-freie als auch Gesamtüberlebenszeit in Gruppe E etwas länger waren, obschon mehr Rezidive und Todesfälle in dieser Gruppe auftraten. Das scheint im Widerspruch zur oben dargestellten Theorie zu stehen, nach der Spender-T-Zellen über eine GvH-Reaktion gegen leukämische Zellen des Empfängers vorgehen. Eine Erklärung könnte sein, dass die Patienten mit komplettem T-Zell-Chimärismus früher an einer schweren GvHD verstarben.

### **4.3. Ausblick**

Die allogene Transplantation hämatopoetischer Zellen wird auch in Zukunft einer der wichtigsten Stützpfiler in der Behandlung einer Reihe hämatologischer aber auch onkologischer Erkrankungen sein. Allerdings wird sich die Behandlung immer mehr weg von der hochdosierten zytotoxischen Therapie hin zu einer Zell- und Immuntherapie entwickeln, bei der die Toxizität der Konditionierung reduziert und vermehrt auf den Graft-versus-Tumor-Effekt gesetzt wird (*Feinstein et al. 2001*). Ob sich die myeloablative oder nicht-myeloablative allogene Transplantation durchsetzen wird, wird sich erst in den nächsten Jahren zeigen (*Spitzer 2000, Maris et al. 2001*).

Ein besonderes Augenmerk wird man zukünftig vor allem auf die spezifische Immun- und Zelltherapie und die Trennung der GvH- und GvL-Effekte haben, für die es jetzt schon vielversprechende Ansätze gibt. So ist zum Beispiel eine spezifische Immuntherapie, die auf mHAg beruht, denkbar. Nachdem es gelungen war mHAg zu identifizieren, die ausschließlich auf hämatopoetischen Zelllinien, auch auf leukämischen, exprimiert werden (HA-1 und HA-2, *de Bueger et al., 1992*), schafften es Mutis et al. (1999) ex-vivo für diese mHAg-spezifische CTL zu generieren, die in der Lage waren, leukämische Zellen effektiv zu lysieren, ohne Schaden an den GvHD-assoziierten Organen anzurichten. Eine wichtige Rolle spielten hier auch dendritische Zellen, da nur diese in der Lage waren potente HA-1- und HA-2-

spezifische CTL zu induzieren. Goulmy et al. (1997) erörtern zusätzlich die Möglichkeit in Zukunft womöglich mHAg-basiert die Spender auszusuchen, eine Toleranz zu induzieren und eine adoptive Immuntherapie bei Trennung von GvH- und GvL-Effekten durchzuführen.

Andere Ansätze der adoptiven Immuntherapie gibt es im Rahmen der DLI. Hierbei wird versucht, zunächst über einen gemischten Chimärismus eine Art Toleranz zu erzeugen, indem man initial ein Transplantat ohne alloreaktive T-Zellen verabreicht. Nachdem sich dann der Empfänger von der Konditionierungs-induzierten Inflammation erholt hat, die vermutlich das Einwandern von T-Zellen in die GvHD-Zielgewebe fördert, kann eine DLI verabreicht werden, die optimale GvL-Effekte zeigt, ohne mit einer GvHD assoziiert zu sein (*Mapara et al., 2002*). Ähnliche Ansätze lieferten auch andere Arbeitsgruppen (*Johnson et al. 1995, Kolb et al. 1997, Wu et al. 2000*). Mithilfe von Suizidgenen wurde versucht Effektorzellen stillzulegen, sobald diese sich gegen nicht neoplastische Zellen richteten (*Kolb et al. 2001*). Litvinova et al. (2002) gelang es sogar mit Hilfe von Suizidgenen die GvH-Reaktion zu kontrollieren und dabei einen Teil der GvL-Reaktion zu erhalten.

Eine Sonderform der DLI, die gerade in klinischen Versuchen untersucht wird, dürfte die Verabreichung von Spender- $T_{reg}$  sein, mit deren Hilfe es möglich scheint, die GvHD-induzierende Wirkung der  $CD4^+CD25^-$  Spender-T-Zellen zu unterbinden, ohne dabei den GvT-Effekt einzuschränken. Mit dieser Technik ist also vermutlich eine Trennung von GvH- und GvT-Effekten möglich (*Hoffmann et al., 2002 und 2004; Edinger et al., 2003*).

Für den Bereich der Zelltherapien dürften auch dendritische Zellen interessant sein. Dies trifft für T-Zellen eher indirekt zu, da es bei diesen eher möglich ist, sie über bestimmte Botenstoffe oder auch Ag-präsentierende Zellen zu beeinflussen, um „prophylaktisch“ zu wirken. Liu et al. (2000) beschrieben die mögliche Option einer DC2-basierten Immuntherapie für Autoimmunerkrankungen und GvHD, da DC2 eine T2-Polarisierung und dadurch Toleranz induzieren. In einer anderen Studie von Fujii et al. (2001) wurden Patienten, bei denen es zu einem Rezidiv gekommen war, mit dendritischen Zellen behandelt. Dazu wurden DC des Spenders mit ex-vivo bestrahlten Tumorzellen des Empfängers versetzt, so dass deren Antigene durch die



Dendriten aufgenommen und prozessiert werden konnten. Schließlich wurden T-Zellen mit dazu gegeben, die durch die DC aktiviert wurden, und somit spezifisch für die Tumorzellen waren. Die Zellmischung wurde insgesamt vier Patienten verabreicht, bei denen sich eine vorübergehende Besserung bei Ausbleiben von GvH-Reaktionen zeigte.

Neben den Versuchen, bestimmte Effekte mittels Zelltherapie mit dendritischen Zellen bzw. indirekt auch T-Zellen zu erreichen, bieten sich natürlich auch bestimmte Medikamente zur Beeinflussung der Dendriten und T-Zellen an. So wurde zum Beispiel ein direkter Effekt von Dexamethason auf die Ausreifung von dendritischen Zellen beschrieben (*Kitajima et al., 1996*), was damit auch die T-Zell-Aktivierung und GvH-Effekte hemmt.

Klanginsirikul et al. (2002) machten die Beobachtung, dass es sowohl in-vitro als auch in-vivo bei Behandlung mit Campath-1G (monoklonaler CD52-Antikörper, der auf beiden DC-Subpopulationen exprimiert wird) zu einer raschen Zerstörung der Dendriten kommt. Die daraufhin niedrigere Inzidenz der aGvHD lässt hier auf ein mögliches Therapeutikum zur Behandlung der aGvHD schließen. Jedoch häufen sich die Daten, die eine erhöhte Infektgefahr bei diesen Patienten vermuten lässt. Allerdings war nicht ganz klar, ob die niedrigere GvHD-Inzidenz durch die DC-Depletion oder durch Einflüsse des Campath-1G auf T-Zellen zu erklären ist.

Eine andere Möglichkeit der GvHD-Prophylaxe wurde durch Shimizu et al. (2000) beschrieben. Sie behandelten Patienten mit Tacrolimus (FK506), das einerseits einen direkten Einfluss auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausübt, indem es deren IL-2-Ausschüttung hemmt, und andererseits damit behandelte DC derart beeinflusst, dass diese eher eine T2-Antwort induzieren und weniger IL-12 produzieren. Vermutlich kommt es unter Tacrolimus auch zu einer Verschiebung des T1/T2-Zytokinverhältnisses in Richtung T2, was vermutlich einen prophylaktischen Effekt bezüglich der aGvHD hat.

In den kommenden Jahren werden Chimärismusanalysen an Bedeutung gewinnen, um die positiven und negativen Auswirkungen der vielen neuen Ansätze in der Transplantationsmedizin besser erfassen und verstehen zu können. Im Zentrum des Interesses werden dabei vor allem linienspezifische Chimärismusuntersuchungen von Leukozytensubsets stehen (zum Beispiel DC und TC hinsichtlich der GvHD), da

diese es erlauben sich ein differenzierteres Bild über die verschiedenen Funktionen und Zusammenhänge zu machen. Eines der derzeitigen Hindernisse ist das Fehlen internationaler Standards bei den Chimärismusanalysen bezüglich der Techniken, Frequenzen und Zeitpunkte der Untersuchungen nach der Transplantation und der klinischen Deutung der Daten. Ein weiteres Problem sind die oft viel zu niedrigen Fallzahlen, die keine statistisch signifikanten Aussagen erlauben. Hier wären, gerade bei Untersuchungen zur GvHD, die extrem vielen Einflüssen unterliegt, multizentrische Studien wünschenswert, um ausreichend hohe Fallzahlen zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

Für viele Patienten mit einer hämatologischen Erkrankung stellt die Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen die einzige Therapieoption mit echter Heilungschance dar. Diese ist jedoch aufgrund mannigfacher Faktoren mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Im Rahmen von Nachuntersuchungen werden zunehmend Chimärismusuntersuchungen durchgeführt, anhand derer zum Teil mögliche Komplikationen frühzeitig aufgedeckt werden können. Routinemäßig werden jedoch nur Untersuchungen des Gesamtchimärismus durchgeführt, linienspezifische Chimärismusuntersuchungen sind dafür noch nicht ausreichend etabliert.

In unserer Studie wurden die Chimärismen von dendritischen Zellen und T-Zellen im peripheren Blut untersucht. Bei allen drei Zelllinien hatten die meisten Patienten nach myeloablativer Konditionierung bereits beim Engraftment einen kompletten Spenderchimärismus. Patienten, die nicht-myeloablativ konditioniert waren, hatten häufiger einen gemischten Chimärismus. Insgesamt lassen unsere Beobachtungen auf eine rasche Rekonstitution dieser Zellen im Posttransplantationsverlauf schließen, wobei deren immunologische Funktion zu diesem ungeklärt ist.

Im Rahmen der Chimärismusuntersuchungen wurden die Patienten auch klinisch untersucht, um zu zeigen, ob der Chimärismus der jeweiligen Zelllinie womöglich einen Einfluss auf den Posttransplantationsverlauf hat. Der Chimärismus der beiden DC-Subpopulationen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung eines Rezidivs oder das Überleben nach der Transplantation. Mehr Patienten mit gemischtem T-Zell-Chimärismus hatten ein Rezidiv oder verstarben, was auch deren Rezidiv-freie und Gesamtüberlebenszeit etwas verkürzt. Es zeigte sich, dass Patienten mit gemischtem Dendritenchimärismus bzw. komplettem T-Zell-Chimärismus häufiger an einer aGvHD erkrankten

In Zukunft werden T-Zellen und dendritische Zellen, insbesondere deren komplexes Zusammenspiel und deren immunologische Funktionen, von großem

wissenschaftlichen und klinischen Interesse sein. Weitere Untersuchungen der funktionellen Biologie der dendritischen Zellen und T-Zellen sind notwendig, um deren Funktionen für sich, aber auch im Zusammenhang miteinander verstehen zu können. Auf der Basis eines verbesserten und vertieften Verständnisses der immunologischen Vorgänge wird man in der Lage zu sein, neue Immuntherapien zu entwickeln und heute bereits existierende, vielversprechende Ansätze weiterzuentwickeln.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG, Pardoll DM (1998)** CD4<sup>+</sup> T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med.* 1998 May 18;187(10):1555-64
- Affaticati P, Locatelli F, Roggero S, Marmont F, Falda M, Dall'Omo AM, Busca A, Ceretto C, Pratico L, Berrino M, Curtioni ES (2000)** Cytotoxic T lymphocyte precursor frequency as a predictor of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Sep;26(5):517-23
- Anslinger K, Rolf B, Keil W (2001)** Evaluation and application of the AmpF/STR profiler plus PCR amplification kit in a Bavarian population sample. *Int J Legal Med.* 2001;114(4-5):278-80
- Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D (2001)** Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 tandem meeting. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7(9):473-85
- Appelbaum FR (2001)** Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):385-9
- Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C (2000)** Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood.* 2000 Apr 15;95(8):2484-90
- Auffermann-Gretzinger S, Lossos IS, Vayntrub TA, Leong W, Grumet FC, Blume KG, Stockerl-Goldstein KE, Levy R, Shizuru JA (2002)** Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1442-8
- Banchereau J, Steinman RM (1998)** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52
- Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D (1991)** Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood.* 1991 Dec 1;78(11):3103-6

- Böck S, Pihusch M, Heller T, Schoch C, Haferlach T, Rolf B, Diem H, Pihusch R, Hiller E, Hiddemann W, Kolb HJ (2001)** Chimerism of peripheral blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 98 (11): 204a (Abstract #
- Böck S, Pihusch M, Heller T, Rolf B, Pihusch R, Hiller E, Kolb HJ (2002)** Mixed chimerism of peripheral blood type 2 dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation is associated with an increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Onkologie* 2002; 25 (S04/02):231 (Abstract #816)
- Brown KA, Bedford P, Macey M, McCarthy DA, Leroy F, Vora AJ, Stagg AJ, Dumonde DC, Knight SC (1997)** Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol.* 1997 Mar;107(3):601-7
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J (1992)** GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 1992 Nov 19;360(6401):258-61
- Chen HR, Ji SQ, Wang HX, Yan HM, Zhu L, Liu J, Xue M, Xun CQ (2003)** Humanized anti-CD25 monoclonal antibody for prophylaxis of graft-vs-host disease (GVHD) in haploidentical bone marrow transplantation without ex vivo T-cell depletion. *Exp Hematol.* 2003 Nov;31(11):1019-25
- Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee SJ, Kim SH, Park CJ, Chi HS, Kim WK (2000)** Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Aug;26(3):327-32
- Clark FJ, Freeman L, McMullan D, Simpson P, Mason J, McDonald F, Fews G, Mahendra P, Craddock C, Moss PA, Griffiths M, Chakraverty R (2001)** Chronic graft versus host disease is associated with full donor chimerism in peripheral blood dendritic progenitor subsets. *Blood* 98 (11): 653a (Abstract #2741)
- Damiani D, Stocchi R, Masolini P, Michelutti A, Sperotto A, Geromin A, Skert C, Cerno M, Michieli M, Baccarani M, Fanin R (2002)** Dendritic cell recovery after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Sep;30(5):261-6
- De Bueger M, Bakker A, van Rood JJ, van der Woude F, Gloumy E (1992)** Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. *J Immunol.* 1992 Sep 1;149(5):1788-94

- De Bueger M, Bakker A, Bontkes H, van Rood JJ, Goulmy E (1993)** High frequencies of cytotoxic T cell precursors against minor histocompatibility antigens after HLA-identical BMT: absence of correlation with GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 1993 May;11(5):363-8
- De Wit D, van Mechelen M, Zanin C, Doutrelepont JM, Velu T, Gerard C, Abramowicz D, Scheerlinck JP, De Baetselier P, Urbain J, et al. (1993)** Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol.* 1993 Jan 15;150(2):361-6
- Dreger P, Schmitz N (2001)** Allogeneic transplantation of blood stem cells: Coming of age? *Ann Hematol.* 2001 Mar;80(3):127-36
- Drobyski WR, Komorowski R, Logan B, Gendelman M (2002)** Role of the passive apoptotic pathway in graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2002 Aug 1;169(3):1626-33
- Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gadner H, Lion T (1999)** Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia.* 1999 Dec;13(12):2059, 2060-9
- Durnam DM, Anders KR, Fisher L, O'Quigley J, Bryant EM, Thomas ED (1989)** Analysis of the origin of marrow cell in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in-situ hybridization assay. *Blood.* 1989 Nov 1;74(6):2220-6
- Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS (2003)** CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2003 Sep;9(9):1144-50. Epub 2003 Aug 17
- Eibl B, Ebner S, Duba C, Bock G, Romani N, Erdel M, Gachter A, Niederwieser D, Schuler G (1997)** Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 Nov;20(3):215-23
- Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N, Opalka B, Trenscher R, Seeber S, Schaefer UW, Beelen DW (2001)** A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Apr;27(8):809-15
- Fearnley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DNJ (1997)** Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: Implications for

studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3708-16

**Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ (1999)** Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):728-36

**Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, Kruger W, Zabelina T, Dudina O, Finckenstein FG, Kroger N, Kabisch H, Hochhaus H, Zander AR (2001)** Real-time quantitative y chromosome-specific pcr (qyccs-pcr) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001 Jun;10(3):419-25

**Feinstein L, Sandmaier B, Maloney D, McSweeney PA, Maris M, Flowers C, Radich J, Little MT, Nash RA, Chauncey T, Woolfrey A, Georges G, Keim HP, Zaucha JM, Blume KG, Shizuru J, Niederwieser D, Storb R (2001)** Nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation: Replacing high-dose cytotoxic therapy by the graft-versus-tumor effect. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun;938:328-37; discussion 337-9

**Ferrara JLM, Deeg HJ (1991)** Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991 Mar 7;324(10):667-74

**Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T (2003)** The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2003 Oct;78(3):181-7

**Field EH, Strober S (2001)** Tolerance, mixed chimerism and protection against graft-versus-host disease after total lymphoid irradiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 May 29;356(1409):739-48

**Frassoni F, Strada P, Sessarego M, Miceli S, Corvò R, Scarpati D, Vitale V, Piaggio G, Raffo MR, Songo G, Figari O, Bacigalupo A, Clavio M, Gualandi F, Soldá A, Marmont A, Reali G (1990)** Mixed chimerism after allogeneic marrow transplantation for leukemia: correlation with dose of total body irradiation and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1990 Apr;5(4):235-40

**Fujii SI, Shimizu K, Fujimoto K, Kiyokawa T, Tsukamoto A, Sanada I, Kawano F (2001)** Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma*. 2001 Jul;42(3):357-69



- Fussell ST, Donnellan M, Cooley MA, Farrell C (1994)** Cytotoxic T lymphocyte precursor frequency does not correlate with either the incidence or severity of graft-versus-host disease after matched unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1994 Mar 15;57(5):673-6
- Galy A, Rudraraju S, Baynes R, Klein J (2000)** Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets after autologous CD34<sup>+</sup> cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Jun;25(12):1249-55
- Gazitt Y (2000)** Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different hematopoietic growth factors. *Stem Cells*. 2000;18(6):390-8
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974)** Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295-304
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ (2001)** Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*. 2001 Mar;29(3):259-77
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JHF, Voosen J, Grathwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ (1996)** Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1996 Feb 1;334(5):281-5
- Goulmy E (1997)** Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev*. 1997 Jun;157:125-40
- Gowans JL (1977)** Cellular mediators of allograft immunity. *Transplant Proc*. 1977 Mar;9(1):685-90. Review.
- Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ (1996)** Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):364-7
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002)** Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67. Epub 2001 Oct 04
- Gyger M, Baron C, Forest L, Lussier P, Lagacé F, Bissonnette I, Bélanger R, Bonny Y, Busque L, Roy DC, Perreault C (1998)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the

- occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease. *Exp Hematol.* 1998 May;26(5):426-34
- Gyger M, Stuart RK, Perreault C (2000)** Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Jul;26(1):1-16
- Hamann M, Pihusch M, Böck S, Link T, Heller T, Rolf B, Pihusch R, Hiller E, Kolb HJ (2002)** Lineage specific chimerism analysis of different hematopoietic cell lines after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Onkologie* 2002; 25 (S04/02):95 (Abstract #329)
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC (2001)** Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):769-79
- Hessel H, Mittermüller J, Zitzelsberger H, Weier HU, Bauchinger M (1996)** Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Histochem Cell Biol.* 1996 Nov;106(5):481-5
- Hock BD, Starling GC, Daniel PB, Hart DNJ (1994)** Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. *Immunology.* 1994 Dec;83(4):573-81
- Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S (2002)** Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002 Aug 5;196(3):389-99
- Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M (2004)** Large Scale In Vitro Expansion of Polyclonal Human CD4+CD25high Regulatory T Cells. *Blood.* 2004 Apr 15
- Holler E (2002)** Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol.* 2002 Nov;9(6):479-84. Review
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM (1990)** Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990 Feb 1;75(3):555-62
- Imami N, Brookes PA, Lombardi G, Hakooz B, Johns M, Goldman JM, Batchelor JR, Lechler RI, Ritter MA (2003)** Association between interleukin-4-producing T lymphocyte

frequencies and reduced risk of graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1998 Apr 15;65(7):979-88

**Irschick EU, Hladik F, Niederwieser D, Nussbaumer W, Holler E, Kaminski E, Huber C (1992)** Studies on the mechanism of tolerance or graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow recipients at the level of cytotoxic T-cell precursor frequencies. *Blood*. 1992 Mar 15;79(6):1622-8

**Johnson BD, Truitt RL (1995)** Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. *Blood*. 1995 Jun 1;85(11):3302-12

**Kampgen E, Becker J, Brocker EB (2001)** [Cell therapy with dendritic cells] [Article in German]. *Internist (Berl)*. 2001 Oct;42(10):1314-20

**Keil F, Prinz E, Moser K, Mannhalter C, Kalhs P, Worel N, Rabitsch W, Schulenburg A, Mitterbauer M, Greinix H (2003)** Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival. *Transplantation*. 2003 Jul 15;76(1):230-6

**Keil W, Anslinger K, Wipper S, Rolf B (1999)** Evaluation of chimeric status following allogeneic bone marrow transplantation using short tandem repeats. *Progress in Forensic Genetics* 8: 567-569;

**Kitajima T, Ariizumi K, Bergstresser PR, Takashima A (1996)** A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest*. 1996 Jul 1;98(1):142-7]

**Klangsinsirikul P, Carter GI, Byrne JL, Hale G, Russell NH (2002)** Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2586-91

**Kohrgruber N, Halanek N, Gröger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, Stingl G, Maurer D (1999)** Survival, maturation, and function of CD11c<sup>-</sup> and CD11c<sup>+</sup> peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol*. 1999 Sep 15;163(6):3250-9

**Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermüller J, de**

- Witte T, Holler E, Ansari H (1995)** Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995 Sep 1;86(5):2041-50
- Kolb HJ, Gunther W, Schumm M, Holler E, Wilmanns W, Thierfelder S (1997)** Adoptive immunotherapy in canine chimeras. *Transplantation*. 1997 Feb 15;63(3):430-6
- Kolb HJ, Mischak-Weissinger E (2001)** Zelltherapie hämatologischer Neoplasien. *Internist (Berl)*. 2001 Oct;42(10):1374-83
- Kolb HJ, Schmid C, Chen X, Woiciechowski A, Roskrow M, Weber M, Guenther W, Ledderose G, Schleunig M (2003)** Adoptive immunotherapy in chimeras with donor lymphocytes. *Acta Haematol* 2003;110:110-120
- Kolb HJ, Rank A, Chen X, Woiciechowski A, Roskrow M, Schmid C, Tischer J, Ledderose G (2004)** In-vivo generation of leukaemia-derived dendritic cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology, Vol. 17, No. 3, pp. 439-451, 2004*
- Krenger W, Snyder K, Smith S, Ferrara JL (1994)** Effects of exogenous interleukin-10 in a murine model of graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation*. 1994 Dec 15;58(11):1251-7
- Krenger W, Snyder KM, Byon JCH, Falzarano G, Ferrara JLM (1995)** Polarized type 2 alloreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol*. 1995 Jul 15;155(2):585-93
- Krenger W, Hill GF, Ferrara JLM (1997)** Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1997 Aug 27;64(4):553-8
- Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, Issels RD (2001)** The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol*. 2001 May;31(5):1602-9
- Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR (1984)** Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol*. 1984 Mar;56(3):431-43
- Lion T (2001)** Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):292

- Lion T (2001)** Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):307-10
- Litvinova E, Maury S, Boyer O, Bruel S, Benard L, Boisserie G, Klatzmann D, Chohen JL (2002)** Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):2020-5
- Liu J, Anderson BE, Robert ME, McNiff JM, Emerson SG, Shlomchik WD, Shlomchik MJ (2001)** Selective T-cell subset ablation demonstrates a role for T1 and T2 cells in ongoing acute graft-versus-host disease: a model for the reversal of disease. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3367-75
- Liu YJ, Blom B (2000)** Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy. *Blood*. 2000 Apr 15;95(8):2482-3
- Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M (2002)** Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen presenting cells. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1903-9
- Mapara MY, Kim YM, Marx J, Sykes M (2003)** Donor lymphocyte infusion-mediated graft-versus-leukemia effects in mixed chimeras established with a nonmyeloablative conditioning regimen: extinction of graft-versus-leukemia effects after conversion to full donor chimerism. *Transplantation*. 2003 Jul 27;76(2):297-305
- Marin GH, Menna ME, Saba S, Klein G, Mendez MC, Bergna MI, Italiano C, Malacalza J, Perez M, Gil MA, Gardenal L, Orlando S, Mansilla E, Canepa C, Piccinelli G (1999)** Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets as a predictive factor for GVHD in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc*. 1999 Nov;31(7):2973-5
- Maris M, Woolfrey A, McSweeney PA, Sandmaier BM, Nash RA, Georges G, Maloney DG, Molina A, Chauncey T, Yu C, Zaucha JM, Blume KG, Shizuru J, Niederwieser D, Storb R (2001)** Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation: transplantation for the 21<sup>st</sup> century. *Front Biosci*. 2001 Aug 1;6:G13-6
- Matthews NC, Wadhwa M, Bird C, Borrás FE, Navarrete CV (2000)** Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6206-12

- Mattson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O (2001)** T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2001 Feb 15;71(3):433-9
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DNJ (1995)** Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol*. 1995 Jul;25(7):2064-8
- Morse MA, Rizzieri D, Stenzel TT, Hobeika AC, Vredenburgh JJ, Chao NJ, Clay TM, Mosca PJ, Lyerly HK (2002)** Dendritic cell recovery following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplants. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002 Aug;11(4):659-68
- Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Gloumy E (1999)** Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood*. 1999 Apr 1;93(7):2336-41
- Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, Kashiwase K, Taylor K, Suzuki K, Tadokoro K, Juji T (1998)** Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8<sup>+</sup> T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):977-83
- O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM (1997)** Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994 Jul;82(3):487-93
- Olweus J, Bitmansour A, Warnke R, Thomson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F (1997)** Dendritic cell ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 11;94(23):12551-6
- Pan L, Delmonte J, Jalonon CK, Ferrara JLM (1996)** Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*. 1995 Dec 15;86(12):4422-9
- Park SJ, Min WS, Yang IH, Kim HJ, Min CK, Eom HS, Kim DW, Han CW, Lee JW, Kim CC (2000)** Effects of mixed chimerism and immune modulation on GVHD, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for hematologic malignancies. *Korean J Intern Med*. 2000 Dec;15(3):224-31

- Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F (1996)** Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today*. 1996 Jun;17(6):273-8
- Pihusch M, Heller T, Schoch C, Haferlach T, Rolf B, Diem H, Pihusch R, Penovici M, Hiller E, Hiddemann W, Kolb HJ (2000)** Chimerism of dendritic cells in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Onkologie* 23, Suppl 7 2000: Abstract #466
- Pihusch M, Böck S, Heller T, Schoch C, Haferlach T, Diem H, Pihusch R, Hiller E, Hiddemann W, Kolb HJ (2001)** Peripheral blood dendritic cells in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 98 (11): 204a (Abstract #851)
- Porter DL, Leonard D, Duffy KM, Shlomchik W, McDaid K, Laport GG, Luger S, Stadtmauer EA, Schuster S, Demuth W, Moore J, Emerson SG (2000)** Dendritic cell chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 96: 585a (Abstract #2511)
- Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, Korbling M, Huh YO, Giralt S, Gajewski J, Donato M, Cleary K, Claxton D, Braunschweig I, van Besien K, Andersson BS, Anderlini P, Champlin R (1999)** Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood*. 1999 Aug 15;94(4):1465-70
- Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C (2001)** Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol*. 2001 Jan;22(1):41-7
- Reddy P (2003)** Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol*. 2003 Dec;21(4):149-61. Review
- Reddy V, Hill GR, Pan L, Gerbitz A, Teshima T, Brinson Y, Ferrara JLM (2000)** G-CSF modulates cytokine profile of dendritic cells and decreases acute graft-versus-host disease through effects on the donor rather than the recipient. *Transplantation*. 2000 Feb 27;69(4):691-3
- Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J (1992)** Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol*. 1992 Oct 15;149(8):2681-8

- Remberger M, Jaksch M, Uzunel M, Mattsson J (2003)** Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2003 Jun;70(6):384-91
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ (1999)** Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999 Feb 19;283(5405):1183-6
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CDL (1997)** Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1999 Sep;29(9):2769-78
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994)** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):83-93
- Roux E, Helg C, Chapius B, Jeannet M, Roosnek E (1994)** Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse. *Blood.* 1994 Dec 15;84(12):4385-6
- Savary CA, Graziutti ML, Melichar B, Przepiorka D, Freedman RS, Cowart RE, Cohen DM, Anaissie EJ, Woodside DG, McIntyre BW, Pierson DL, Pellis NR, Rex JH (1998)** Multidimensional flow-cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 1998 Jan;45(5):234-40
- Schattenberg A, De Witte T, Salden M, Vet J, van Dijk B, Smeets D, Hoogenhout J, Haanen C (1989)** Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood.* 1989 Apr;73(5):1367-72
- Schwarer AP, Jiang YZ, Brookes PA, Barrett AJ, Batchelor JR, Goldman JM, Lechler RI (1993)** Frequency of anti-recipient alloreactive helper T-cell precursors in donor blood and graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone-marrow transplantation. *Lancet.* 1993 Jan 23;341(8839):203-5
- Shimizu K, Fujii S, Fujimoto K, Kawa K, Yamada A, Kawano F (2000)** Tacrolimus (FK506) treatment of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4<sup>+</sup> T cells toward Th2 responses. *J Leukoc Biol.* 2000 Nov;68(5):633-40



- Shiohara T, Moriya N, Hayakawa J, Itohara S, Ishikawa H (1996)** Resistance to cutaneous graft-vs.-host disease is not induced in T cell receptor delta gene-mutant mice. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1483-9
- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG (1999)** Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science.* 1999 Jul 16;285(5426):412-5
- Spitzer TR (2000)** Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and the role of mixed chimerism. *Oncologist.* 2000;5(3):215-23
- Steinman RM (1991)** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K (2000)** The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000 Feb 7;191(3):411-6
- Steinman RM, Nussenzweig MC (2002)** Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):351-8. Epub 2002 Jan 02
- Steptoe RJ, Thomson AW (1996)** Dendritic cells and tolerance induction. *Clin Exp Immunol.* 1996 Sep;105(3):397-402
- Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Hashino S, Kobayashi S, Noto S, Higa T, Sakurada K, Asaka M (1997)** The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1997 Mar;19(6):571-6
- Theobald M, Nierle T, Bunjes D, Arnold R, Heimpel H (1992)** Host-specific interleukin-2-secreting donor T-cell precursors as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings. *N Engl J Med.* 1992 Dec 3;327(23):1613-7
- Teshima T, Reddy P, Lowler KP, KuKuruga MA, Liu C, Cooke KR, Ferrara JLM (2002)** Ftl3 ligand therapy for recipients of allogeneic bone marrow transplants expands host CD8<sub>a</sub><sup>+</sup> dendritic cells and reduces experimental acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2002 Mar 1;99(5):1825-32
- Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A (1999)** Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification

of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* 1999 May;23(10):1055-60

**Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G (2001)** Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia.* 2001 Feb;15(2):293-302

**Thomas R, Lipsky PE (1994)** Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1994 Nov 1;153(9):4016-28

**Tzolas AC, Devidas M, Iturrapse J, Boyette R, Sugrue M, Wingard JR, Reddy V (2001)** Type 1 dendritic cells (DC1) in allogeneic donor peripheral blood stem cell product are associated with an increase in acute graft-versus-host disease. *Blood* 98 (11): 203a (Abstract #849)

**Van Leuween JEM, van Tol MJD, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJM, Khan PM, Vossen JM (1994)** Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood.* 1994 May 15;83(10):3059-67

**Wakabayashi T, Onoda H, Kirita Y, Uchida H (1997)** Distribution of the dendritic cell in human organs and the incidence of GVHD. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):737-8

**Walker H, Singer CJR, Patterson J, Goldstone AH, Prentice HG (1986)** The significance of host haematopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol.* 1986 Feb;62(2):385-91

**Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, Peel J, Lonial S, Langston A, Redei I, Jurickova I, Boyer MW (2001)** Large number of CD4<sup>bright</sup> dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2001 May 15;97(10):2948-56

**Wessman M, Ruutu T, Volin L, Knuutila S (1989)** In situ hybridization using a Y-specific probe – a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1989 May;4(3):283-6

**Weston LE, Geczy AF, Farrell C (1997)** Donor helper T-cell frequencies as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings. *Transplantation*. 1997 Sep 27;64(6):836-41

**Winiarski J, Gustafsson A, Wester D, Dalianis T (2000)** Follow-up of chimerism, including T- and B-lymphocytes and granulocytes in children more than one year after allogeneic bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant*. 2000 May;4(2):132-9

**Wu BY, Guo KY, Song CY, Yang DA, Li D (2000)** Mixed chimera converted into full donor chimera with powerful graft-versus-leukemia effects but no graft-versus-host disease after non T cell-depleted HLA-mismatched peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Sep;26(6):691-3

**Young JW, Szabolcs P, Moore MA (1995)** Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1995 Oct 1;182(4):1111-9

**Young JW (1999)** Dendritic cells: expansion and differentiation with hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol*. 1999 May;6(3):135-44

**Zhou LJ, Tedder TF (1996)** CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2588-92

## 7. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Dr. med. Markus Pihusch** (Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg) für die Überlassung des Themas und die langjährige, hervorragende, kompetente und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft war für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar.

Bei Herrn **Prof. Dr. med. Hans-Jochem Kolb** (Leiter der Abteilung für Hämatopoetische Zelltransplantation der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern und Leiter der klinischen Kooperationsgruppe „Hämatopoetische Zelltransplantation“, GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) bedanke ich mich sehr herzlich für die Unterstützung und die wohlwollende Teilnahme am Werdegang der Arbeit. Zudem gilt ihm mein Dank für die Möglichkeit, diese Studie an den Patienten seiner Abteilung durchzuführen, sowie für die Vertretung der Dissertation vor der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Ebenso danken möchte ich Herrn **Prof. Dr. med. Erhard Hiller** (Oberarzt der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern) für die stete Begleitung meines wissenschaftlichen und klinischen Werdeganges.

Des Weiteren danke ich Herrn **Dr. rer. nat. Dipl. Chemiker Burkhard Rolf** vom Institut für Rechtsmedizin der Universität München für die hervorragende Kooperation bei der Durchführung der PCR-Untersuchungen und Herrn **Dr. med. Heinz Diem** (Institut für klinische Chemie, Klinikum der Universität München – Großhadern) für die technische Unterstützung bei der Erstellung und Gestaltung der Bilder.

Zudem gilt mein Dank Frau **Tatjana Heller** (Medizinisch-Technische Assistentin im Cellsorting Labor der Medizinischen Klinik III) für ihre kompetente Mithilfe beim technischen Teil der Arbeit, die wesentlich zum Gelingen der Studie beigetragen hat.

Danke auch an Frau **Marina Leeping** (Medizinisch-Technische Assistentin im Stammzelllabor Prof. Dr. H.-H. Kolb, GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) für die Kooperation bei der Durchführung der Untersuchungen zu den T-Zell-Chimärismen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch** (Lehrstuhl II der Anatomischen Anstalt, Ludwig-Maximilians-Universität), der die elektronenmikroskopische Untersuchung der dendritischen Zellen ermöglichte, sowie bei Frau **Sabine Herzmann** und Frau **Sabine Thost** (Medizinisch-Technische Assistentinnen).

Sehr hilfreiche und freundliche Unterstützung erhielt ich auch durch die beiden Doktoranden **Stefan Böck** und **Tim Link** in unserem Labor, die mich geduldig einarbeiteten und stets zu einer Zusammenarbeit bereit waren.

## 8. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum/-ort: 15.12.1979 in München  
Anschrift: Agnes-Miegel-Str. 29  
81927 München  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: evangelisch  
Familienstand: ledig

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

1986 – 1987            Grundschule, München  
1987 – 1990            Grundschule, Kassel  
1990 – 1992            Friedrichs-Gymnasium, Kassel  
1992 – 1999            Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium, München  
06/1999                Abschluss Allgemeine Hochschulreife  
(Mathematik, Französisch, Physik, Erdkunde)

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

---

05/2000                Aufnahme des Studiums der Humanmedizin,  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
03/2002                Ärztliche Vorprüfung  
04/2002                Wechsel an die medizinische Fakultät der TU München  
03/2003                1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
03/2005                2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/2006                3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## FAMULATUREN

---

09/2002	30-tägige Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Klinikums Großhadern, München
09/2003	30-tägige Famulatur in der Abteilung für Handchirurgie, Inselspital in Bern
03/2004	30-tägige Famulatur in der II. gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Rotkreuzkrankenhauses, München
08/2004	30-tägige Famulatur in der anästhesiologischen Praxis Dr. Linke, München

## PRAKTISCHES JAHR

---

04/2005 – 08/2005	Wahlfach Gynäkologie Klinikum Rechts der Isar, München
08/2005 – 12/2005	Innere Medizin 1. Hälfte: Deutsches Herzzentrum, München 2. Hälfte: Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien Abteilungen: Hämatologie und Dermatologie
12/2005 – 03/2006	Chirurgie Hôpital St Loup, Pompaples, Schweiz Rotation zwischen den Abteilungen für Unfallchirurgie, Orthopädie und Viszeralchirurgie

## PRAKTIKA UND KURSE

---

11/1999	Krankenpflegepraktikum im Colchester General Hospital, Colchester, England
01 – 03/2000	Dreimonatiger Sprachschulaufenthalt in Cheltenham, England
04 – 07/2003	Laparoskopie- und Ultraschallkurs in der chirurgischen Abteilung der TU München
10/2003 – 02/2004	Co-Assistent im anatomischen Präparierkurs der LMU-München
12/2003 – 04/2005	Tätigkeit als studentische Hilfskraft in der II. gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Rotkreuzkrankenhauses in München

## HOBBYS, INTERESSEN

---

Seit 1994	Mitgliedschaft bei Münchner Kajakverein, dort von 2000 – 2004 „Wanderwart“, Verantwortlicher für Vereinsfahrten und Fahrtenprogramm
1997 – 1998	Schülersprecher am Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium
1997 – 1999	stellvertretender Kollegstufensprecher am Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium
2004	Zweimonatige Kulturreise durch China, Vietnam, Kambodscha

Weitere Hobbys: Sport, Reisen, handwerkliche Tätigkeiten, Lesen

## DISSERTATION

---

April 2002	Beginn der Dissertation im Cellsorting Labor (Dr. med. Markus Pihusch) der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann)
------------	--