

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll)

**„Untersuchungen zum Einfluss von Antithymozytenglobulinen
auf die *in vivo*-Rekonstitution regulatorischer T-Zellen und des
allgemeinen zellulären Immunstatus nach allogener
hämatopoetischer Stammzelltransplantation“**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Medizin“ (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: André Reisberg
geboren am: 19. Juli 1983 in Kyritz

Betreuer: PD Dr. med. Gerhard Behre

Gutachter:

1. PD Dr. med. Gerhard Behre
2. Prof. Dr. med. Johannes Wohlrab
3. Prof. Dr. med. Nadezda Basara (Leipzig)

01.12.2009
09.08.2010

Meiner Familie, meinen Freunden und Lehrern

REFERAT UND BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG

Zielsetzung. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) stellen eine interessante Zellpopulation für die Transplantationsmedizin dar, da sie in der Lage zu sein scheinen, eine Trennung von GvHD und GvL-Effekt nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) beeinflussen zu können. Seit zwei Jahren ist bekannt, dass die im Rahmen der Konditionierungstherapie vor allogener SZT eingesetzten Antithymozytenglobuline (ATG) in der Lage sind *in vitro* eine Bildung von $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ aus $CD4^+ / CD25^-$ konventionellen T-Zellen (T_{con}) zu induzieren. Hinweise für einen solchen Effekt *in vivo* im Menschen fehlten bisher.

Methoden. Die zelluläre Immunrestitution nach allogener hämatopoetischer SZT wurde bei acht Patienten mit (n=4) bzw. ohne (n=4) vorherige ATG-Therapie in einem Zeitraum von 150 Tagen nach der Transplantation analysiert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Entwicklung der relativen Zahlen (% der $CD4^+$ Th-Zellen) dreier T_{reg} -Populationen: $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-}$, $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+$, $CD25^+ / foxP3^+ / CD127^{low/-}$. Zusätzlich wurde der klinische Verlauf der Patienten anhand des Auftretens von Infektionen sowie der Entwicklung einer GvHD dokumentiert.

Ergebnisse. Alle Patienten zeigten ein frühes Engraftment und entwickelten einen vollständigen Spenderchimärismus. Das zelluläre unspezifische Immunsystem bot eine rasche Reconstitution. Die T-lymphozytären Populationen des adaptiven Immunsystems hingegen erreichten erst sehr spät Normalwerte. ATG stellte sich als ein wichtiger hemmender Einflussfaktor vor allem auf die Reconstitution der $CD4^+$ Th-Zellen heraus, welche bis Tag +150 signifikant geringere Zellzahlen nach ATG-Gabe boten. Gleichzeitig wurden in der ATG-Gruppe deutlich höhere T_{reg} -Anteile in allen drei T_{reg} -Populationen während des gesamten Verlaufes beobachtet. Hinsichtlich der klinischen Entwicklung wurden für ATG-Patienten weniger ausgeprägte GvHD-Verläufe bei gleichzeitig erhöhtem Infektionsrisiko für CMV und EBV festgestellt.

Schlussfolgerung. Die vorliegende Arbeit bietet erste Hinweise dafür, dass ATG im Rahmen der Konditionierungstherapie vor allogener SZT nicht nur $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+$ sondern auch $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-}$ und $CD25^+ / foxP3^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ *in vivo* im Menschen induzieren kann. Der wahrscheinlichste Mechanismus hierfür ist die Induktion von T_{reg} aus $CD4^+ / CD25^- T_{con}$. Eine Senkung der therapieassoziierten Mortalität durch die *in vivo*-Expansion von T_{reg} könnte die Sicherheit der allogenen SZT als eine der wichtigsten Therapieformen für die Hämatookologie schließlich entscheidend verbessern.

Reisberg, André: *Untersuchungen zum Einfluss von Antithymozytenglobulinen auf die in vivo-Reconstitution regulatorischer T-Zellen und des allgemeinen zellulären Immunstatus nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation*. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2009

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

II. TABELLENVERZEICHNIS

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Allogene Stammzelltransplantation	1
1.2 Antithymozytenglobuline.....	8
1.3 Regulatorische T-Zellen.....	10
1.4 Zielsetzung	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Patientencharakteristika	13
2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	13
2.1.2 Konditionierungstherapie.....	13
2.1.3 Zusammensetzung der Stammzellpräparate und Transplantation.....	15
2.1.4 Immunsuppression und GvHD-Prophylaxe	15
2.1.5 Entnahme der Blutproben	15
2.2 Durchflusszytometrie	16
2.2.1 Allgemeines Prinzip.....	16
2.2.2 Verwendete Antikörper und Panels.....	17
2.2.3 Zellzahlbestimmung.....	18
2.2.4 Immunfärbung membranständiger Epitope	19
2.2.5 Immunfärbung intrazellulärer Epitope	19
2.2.6 FACS-Analyse und Geräte	20
2.3 Chimärismusanalyse und klinische Verlaufsbeobachtung.....	21
2.4 Statistik.....	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1 Charakterisierung und Vergleich der Transplantate beider Patientengruppen.....	25
3.2 Spenderchimärismus und Engraftment	25
3.3 Immunzellrekonstitution	26
3.3.1 CD45 ⁺ Leukozyten.....	27
3.3.2 CD16/56 ⁺ NK-Zellen.....	33
3.3.3 CD19 ⁺ B-Zellen.....	35
3.3.4 CD3 ⁺ T-Lymphozyten.....	35

3.4 Rekonstitution der regulatorischen T-Zellen.....	41
3.4.1 $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$	43
3.4.2 $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$	44
3.4.3 $CD25^+ / foxP3^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$	46
3.5 Klinischer Verlauf der Patienten.....	47
3.5.1 <i>Graft-versus-Host-Erkrankung</i>	47
3.5.2 <i>Infektionen</i>	48
4. DISKUSSION	49
4.1 Zum Engraftment und hämatopoetischen Chimärismus.....	49
4.2 Zur allgemeinen Immunzellrekonstitution.....	51
4.3 Zur Rekonstitution der regulatorischen T-Zellen.....	58
4.4 Zum klinischen Verlauf.....	64
4.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	66
6. LITERATURVERZEICHNIS	68
8. THESEN.....	80

CURRICULUM VITAE

VERÖFFENTLICHUNGEN

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Ziele der Standardkonditionierung.	4
Abb. 2:	Ziele der dosisreduzierten Konditionierung.	5
Abb. 3:	GvL vs. GvHD.	8
Abb. 4:	Zeitlicher Ablauf von Therapie und Blutentnahmen.	16
Abb. 5:	Beispielhafte FACS-Analyse anhand einer T_{reg}-Population.	21
Abb. 6:	Rekonstitution der CD45⁺ Leukozyten.	28
Abb. 7:	Rekonstitution der CD14⁺ Monozyten.	30
Abb. 8:	Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten.	32
Abb. 9:	Rekonstitution der CD16/56⁺ NK-Zellen.	34
Abb. 10:	Rekonstitution der CD3⁺ T-Lymphozyten.	36
Abb. 11:	Rekonstitution der CD4⁺ Th-Zellen.	38
Abb. 12:	Rekonstitution der CD8⁺ cT-Zellen.	39
Abb. 13:	FACS-Analyse der CD4⁺/ CD25⁺/ CD127^{low/-} T_{reg} von zwei Patienten.	42
Abb. 14:	FACS-Analyse der CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg} von zwei Patienten.	42
Abb. 15:	FACS-Analyse der CD25⁺/ foxP3⁺/ CD127^{low/-} T_{reg} von zwei Patienten.	42
Abb. 16:	Rekonstitution der CD4⁺/ CD25⁺/ CD^{127low/-} T_{reg}.	43
Abb. 17:	Rekonstitution der CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg}.	45
Abb. 18:	Rekonstitution der CD25⁺/ CD127^{low/-}/ foxP3⁺ T_{reg}.	46

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Beispielhafte Zusammensetzung von Knochenmark- und Blutstammzellpräparaten.	3
Tab. 2:	Zusammenfassung der Ein- und Ausschlusskriterien.	13
Tab. 3:	Zusammenfassung der Patientencharakteristika.	14
Tab. 4:	Antikörperpanels für die FACS-Analysen.	17
Tab. 5:	Synopsis der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.	18
Tab. 6:	Klassische Stadieneinteilung der akuten GvHD.	23
Tab. 7:	Klinische Einteilung der chronischen GvHD.	24
Tab. 8:	Vergleich der transplantierten Zellzahlen zwischen beiden Patientengruppen.	25
Tab. 9:	Spenderchimärismus aller acht Patienten an Tag +30.	26
Tab. 10:	Zeitpunkte des neutrophilen und thrombozytären Engraftments.	26
Tab. 11:	Normwerte für den allgemeinen zellulären Immunstatus.	27
Tab. 12:	Zusammenfassung der CD45⁺ Leukozytenzahlen.	29
Tab. 13:	Zusammenfassung der CD14⁺ Monozytenzahlen.	30
Tab. 14:	Zusammenfassung der neutrophilen Granulozytenzahlen.	32
Tab. 15:	Zusammenfassung der CD16/56⁺ NK-Zellzahlen.	34
Tab. 16:	Zusammenfassung der CD19⁺ B-Zellzahlen (Kein Antikörper).	35
Tab. 17:	Zusammenfassung der CD3⁺ T-Zellzahlen.	37
Tab. 18:	Zusammenfassung der CD4⁺ Th-Zellzahlen.	38
Tab. 19:	Zusammenfassung der CD8⁺ cT-Zellzahlen.	40
Tab. 20:	Zusammenfassung der Werte der CD4/ CD8-Ratio.	41
Tab. 21:	Zusammenfassung der Zahlen der CD4⁺/ CD25⁺/ CD127^{low/-} T_{reg}.	44
Tab. 22:	Zusammenfassung der Zahlen der CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg}.	45
Tab. 23:	Zusammenfassung der Zahlen der CD25⁺/ CD127^{low/-}/ foxP3⁺ T_{reg}.	47
Tab. 24:	Zusammenfassung des klinischen Verlaufes aller Patienten.	48
Tab. 25:	Übersicht der bisher bekannten Zielantigene von ATG.	53

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity)
aGvHD	akute GvHD
ALS	Antileukozytenserum
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)
ATG	Antithymozytenglobulin
ATG-F	ATG-Fresenius (<i>Fresenius</i>)
ATG-G	Thymoglobulin (<i>Genzyme</i>)
BMT	Knochenmarktransplantation (engl.: bone marrow transplantation)
CD	Differenzierungscluster (engl.: cluster of differentiation)
cGvHD	chronische GvHD
CMV	Zytomegalievirus (engl.: cytomegalievirus)
CsA	Cyclosporin A
cT-Zelle	Zytotoxische T-Zelle
CXCR/CCR	Chemokinrezeptoren
DC	Dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)
DLI	Spenderlymphozyteninfusion (engl.: donor lymphocyte infusion)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECP	Extrakorporale Photopherese (engl.: extracorporal photopheresis)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (engl.: ethylene diamine tetraacetic acid)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (engl.: enzyme linked immunosorbent assay)
Fab	Antigenbindender Antikörperteil (engl.: fragment of antibody)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer, syn. Durchflusszytometrie (engl.: fluorescence activated cell sorting)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
foxP3	intrazellulärer Transkriptionsfaktor (engl.: forkhead box protein 3)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: forward scatter)
G-CSF	Granulozytenkoloniestimulierender Faktor (engl.: granulocyte colony stimulating factor)
Gpt	Gigapartikel, $\times 10^9$
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: graft versus host disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion (engl.: graft versus leukemia)
Gy	Gray, SI-Einheit der Energiedosis

HLA	Humanes Leukozytenantigen (engl.: human leucocyte antigen)
IgG/ A	Immunglobulin G/ A
IL	Interleukin
IPEX	Immundysregulations-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-gebundenes-Syndrom (engl.: immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome)
KG	Körpergewicht
KIR	Killerzellimmunglobulin-ähnlicher Rezeptor (engl.: killer cell immunglobulin-like receptor)
LFA	Leukozytenfunktionsassoziiertes Antigen (engl.: leucocyte function associated antigen)
MMF	Mycophenolat Mofetil
MSC	Mesenchymale Stammzelle (engl.: mesenchymal stem cell)
MTX	Methotrexat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PBSCT	Periphere Blutstammzelltransplantation (engl.: peripheral blood stem cell transplantation)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PercP	Peridininchlorophyll Protein
RIC	Dosisreduzierte Konditionierung (engl.: reduced intensity conditioning)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl.: single nucleotide polymorphism)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl.: sideways scatter)
STR	Kurze direkte Sequenzwiederholung (engl.: short tandem repeats)
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	Ganzkörperbestrahlung (engl.: total body irradiation)
T _{con}	Konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zellrezeptor (engl.: T-cell receptor)
T _{eff}	Effektor-T-Zelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: transforming growth factor)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
XLAAD	X-gebundenes autoimmun-allergisches Dysregulationssyndrom (engl.: X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome)

1. EINLEITUNG

1.1 Allogene Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer wichtigen Therapieoption mit kurativem Potential für eine zunehmende Anzahl von sowohl malignen als auch nicht-malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems entwickelt. Vor allem Neoplasien des hämatopoetischen Systems und Stammzelldefekterkrankungen wie die aplastische Anämie, aber auch angeborene und erworbene Immundefekte sind dem therapeutischen Potential einer allogenen SZT zugänglich. [Goldman et al. 1998; Gratwohl et al. 2002; Lennard und Jackson 2000]

Die erste dokumentierte Knochenmarktransplantation (BMT) wurde im Jahre 1939 durchgeführt. Eine Frau mit Gold-induzierter Aplasie erhielt Knochenmark eines Bruders mit identischen Blutgruppenantigenen per infusionem und starb fünf Tage später. [Osgood et al. 1939] Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gelang der SZT durch die zunehmende Kenntnis von immunologischen Vorgängen und der Gewebetypisierung der Durchbruch zu einem praktikablen Therapieprinzip. Im Jahr 1949 beobachteten *Jacobson et al.* erstmals, dass Mäuse eine letale Ganzkörperbestrahlung durch eine Abschirmung der Milz überlebten. [Jacobson et al. 1949] Fünf Jahre später gelang es *Lorenz et al.* das Überleben dieser Mäuse durch die Infusion fremden Knochenmarks zu sichern. [Lorenz und Congdon 1954] Der erste erfolgreiche Versuch einer allogenen SZT zur Therapie einer Leukämie beim Menschen wurde schließlich im Jahr 1959 von Dr. E. Donnell Thomas durchgeführt. Vierzig Jahre später wurde seine Arbeit mit einem Nobelpreis gewürdigt. [Thomas et al. 1959]

Im Rahmen einer allogenen SZT wird das ursprüngliche hämatopoetische System des Empfängers durch die Übertragung allogener (griechisch: *allos* = fremd, anders) hämatopoetischer Stammzellen (verwandt oder unverwandt) nach vorheriger Depletion der Empfängerhämatopoese durch ionisierende Strahlung und/ oder Chemotherapie ersetzt. Zum Einen wird ein antineoplastischer Effekt durch die der Transplantation vorangestellten Konditionierungstherapie erreicht. Entscheidend für den langfristigen Therapieerfolg ist jedoch der Austausch des spezifischen Immunsystems des Empfängers gegen alloreaktive Immunzellen des Spenders, welche eine Immunantwort gegen die neoplastischen Zellen des Empfängers induzieren.

Dieser so genannte Graft-versus-Leukemia (GvL)-Effekt stellt das Hauptprinzip der allogenen SZT dar und wird zum Einen als Soforteffekt durch alloreaktive Spenderimmunzellen, welche in den Stammzellpräparaten enthalten sind, erreicht. Zum Anderen kommt es nach erfolgreicher Rekonstitution und Differenzierung der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen im Rahmen der so genannten Immunrekonstitution zu einer langfristigen Alloreaktion, die im besten Fall zu einer Heilung der Erkrankung führt. [Lennard und Jackson 2000; Sandmaier et al. 2007]

Hämatopoetische Stammzellen. Als humane hämatopoetische Stammzellen werden solche Vorläuferzellen bezeichnet, die als Oberflächenepitop den Marker CD34 exprimieren. CD-Moleküle (Cluster of Differentiation) sind Oberflächenepitope auf den Zellmembranen von Immunzellen. Zellspezifisch auftretende Muster dieser Moleküle ermöglichen eine international standardisierte Identifizierung und selektive Untersuchung der verschiedenen Zellpopulationen.

Die CD34⁺ Stammzellen stellen pluripotente Vorläuferzellen dar, die sowohl in die myeloische als auch die lymphatische Richtung differenzieren können. Somit sind sie in der Lage, neben der Hämatopoese (Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten) auch das spezifische Immunsystem (T- und B-Lymphozyten) auszubilden. [Barrett 2006; De Pauw et al. 2003]

Für die Stammzellen stehen verschiedene Quellen zur Verfügung: Knochenmarkaspirat [Sierra et al. 2002; Thomas und Storb 1970], periphere Blutstammzellen [Korbling et al. 1981; Ottinger et al. 1996; Xie et al. 2007] und Nabelschnurblut [Gluckman et al. 1989; Rocha et al. 2001; Rubinstein et al. 1998]. Die Gewinnung von Knochenmarkstransplantaten ist dabei das am längsten praktizierte Verfahren, welches jedoch aufgrund der besseren Spenderverträglichkeit bei der Gewinnung von peripheren Blutstammzellen zugunsten letzterer zunehmend in den Hintergrund tritt. Stammzellpräparate aus dem peripheren Blut enthalten bis zu drei mal so viele hämatopoetische Stammzellen und zehn mal mehr Lymphozyten als Präparate aus Knochenmark. (Tab. 1) Aber auch aufgrund signifikanter Unterschiede der zellulären Zusammensetzung der Transplantate im Hinblick auf ihren Gehalt an T- und B-Zellen kommen in bestimmten klinischen Situationen nur Stammzellen bestimmter Quellen in Frage. [Ottinger et al. 1996; Storek et al. 2001]

Die hämatopoetische CD34⁺ Stammzelle zirkuliert nur zu einem sehr geringen Prozentsatz von ca. 0,05 % im peripheren Blut. Durch eine Vorbehandlung mit dem Wachstumsfaktor

G-CSF (Granulozytenkoloniestimulierender Faktor) wird eine Mobilisierung von sowohl Stammzellen als auch T-Zellen im Spender induziert.

Die so aufkonzentrierten Blutstammzellen werden anschließend durch eine Leukapherese aus dem Blut gesammelt. Sie enthalten einen deutlich höheren Anteil an immunkompetenten T-Zellen als Stammzellprodukte aus Knochenmarkaspiraten. [Korbling und Anderlini 2001; Kroger et al. 1999]

Tab. 1: Beispielhafte Zusammensetzung von Knochenmark- und Blutstammzellpräparaten.

Beispielhafter Vergleich der Mengen von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen und CD3⁺ T-Lymphozyten in Transplantaten aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut. Blutstammzellpräparate enthalten eine bis zu dreifache Menge an Stammzellen und zehn Mal so viele T-Lymphozyten wie Knochenmarkaspirate. KG (Körpergewicht). [Korbling und Anderlini 2001]

	Knochenmark	Blutstammzellen
CD34 ⁺ Stammzellen (x10 ⁶ /kg KG)	2,4	7,6
CD3 ⁺ T-Lymphozyten (x10 ⁶ /kg KG)	23,8	279

Konditionierungstherapie. Zur Vorbereitung des Empfängers vor einer allogenen SZT und zur Reduktion der Malignomlast wird an den Tagen unmittelbar vor der Transplantation eine Konditionierungstherapie durchgeführt, die aus einer Polychemotherapie oder einer Kombination aus Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation, TBI) und einer Chemotherapie besteht. [Craddock 2008; Kroger 2007] Neben myeloablativen Konzepten (Standard), die eine hohe antineoplastische Potenz aufweisen und außerdem ausgeprägt immunsuppressiv wirken (*Abb. 1*), existieren seit jüngerer Zeit auch dosisreduzierte nicht-myeloablative Konditionierungsschemata (Reduced Intensity Conditioning, RIC). Dabei liegt ein Vorteil der RIC darin, dass aufgrund der reduzierten konditionierungsassoziierten Toxizität zunehmend auch Patienten mit einem Alter von über 65 Jahren und in schlechtem Allgemeinzustand, für die eine Standardkonditionierung kontraindiziert wäre, transplantiert werden können. [Blaise et al. 2007; Mielcarek et al. 2003]

Durch die Konditionierung wird ein schnelles Anwachsen der Spenderzellen in den meisten Fällen gewährleistet. Für die Standard-Konditionierung zählen zu den gängigsten Kombinationen in Abhängigkeit von der Diagnose und der zugrunde liegenden Therapieprotokolle Cyclophosphamid/ Ganzkörperbestrahlung (8-14 Gy) sowie Busulfan/ Cyclophosphamid. [Craddock 2008; Kroger 2007]

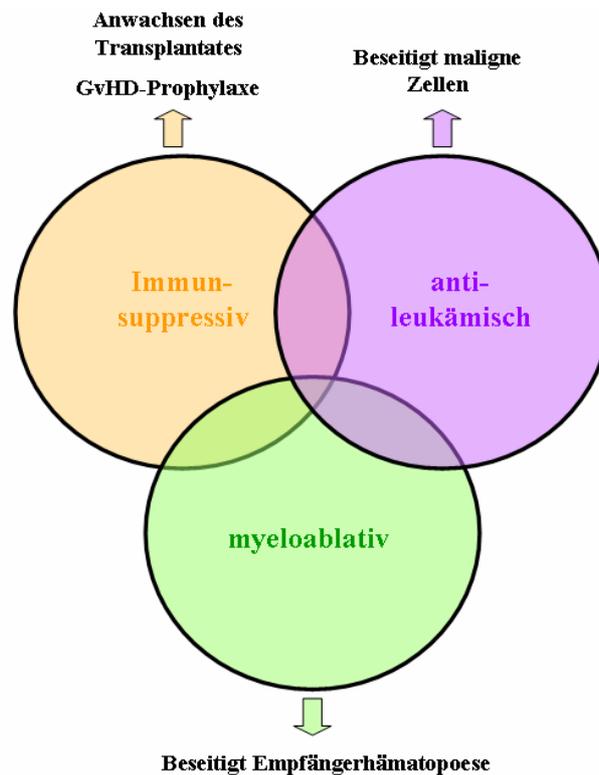


Abb. 1: Ziele der Standardkonditionierung.

Dargestellt sind die drei grundlegenden Effekte der Konditionierungstherapie und ihre Wirkmechanismen. Die drei Hauptziele bedingen sich gegenseitig und ihre kombinierte Wirkung ist ursächlich für den Ausgang einer allogenen SZT. [Kröger 2008]

Für die RIC spielt der durch die alloreaktiven Spenderlymphozyten getragene GvL-Effekt eine herausragende Rolle. Der myeloablativ Effekt der Konditionierungstherapie hingegen tritt in den Hintergrund. (Abb. 2) Untermauert wurde diese Ansicht durch Untersuchungen, in denen Patienten nach allogener Transplantation von T-Zell-depletiertem Knochenmark häufiger ein Rezidiv entwickelten als Patienten, die kein T-zelldepletiertes Knochenmark erhalten hatten. [Gale und Horowitz 1990; Martin et al. 1985] Der bisher direkteste Nachweis für den GvL-Effekt ist jedoch die Tatsache, dass die Infusion von Spenderlymphozyten (Donor Lymphocyte Infusion, DLI) Rezidive nach der Transplantation wirkungsvoll therapieren kann. [Dazzi et al. 2000; Kolb et al. 1990] Die Anwendung der RIC-Schemata hat demnach bei gleichzeitig geringerer therapieassoziiertes Toxizität eine stärkere Ausnutzung des GvL-Effektes als die Standardkonditionierung zum Ziel. Weitergehend kann die Immunsuppression im Empfänger zusätzlich durch T-Zell-Antikörper wie zum Beispiel Antithymozytenglobuline (ATG) oder Purin-Analoga wie Fludarabin verstärkt werden. (Abb. 2) Wirksame Kombinationen der RIC bestehen z.B. aus Busulfan, Melphalan und einer TBI von 2 Gy. [Blaise et al. 2007; Mielcarek et al. 2003]

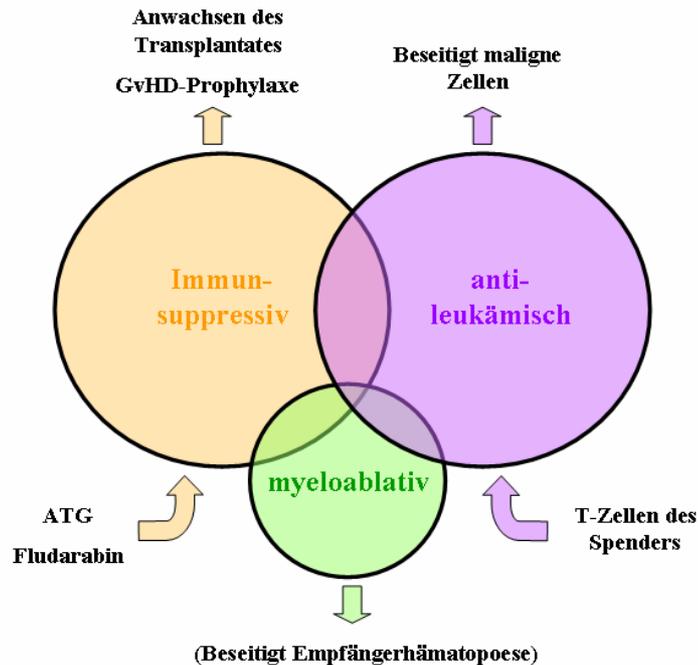


Abb. 2: Ziele der dosisreduzierten Konditionierung.

Dargestellt sind die Haupteffekte der dosisreduzierten Konditionierung. Der myeloablativ Effekt hat für dieses Therapieschema an Bedeutung verloren. (vgl. Abb. 1) Stattdessen sind neue Einflussfaktoren hinzugekommen. Antithymozytenglobuline (ATG) und Fludarabin können die Immunsuppression verstärken. Immunkompetente T-Zellen aus den Stammzellpräparaten des Spenders unterstützen den antileukämischen Effekt. [Kröger 2008]

Immunsuppression. Zur Prävention einer Transplantatabstoßung (Host-versus-Graft-Effekt) auf der einen Seite und einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Erkrankung, GvHD) auf der anderen Seite, ist eine effektive medikamentöse Immunsuppression im Rahmen einer allogenen SZT unabdingbar. Es werden hierzu verschiedene pharmakologische Konzepte verfolgt. Der klassische Standard besteht aus einer Kombination aus Cyclosporin A (CsA) und Methotrexat (MTX). Der Calcineurin-Inhibitor CsA verhindert durch Unterdrückung der Interleukin-2-Produktion (IL-2) die T-Zellaktivierung. [Zikos et al. 1998] Einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzt das Mycophenolat Mofetil (MMF). Es hemmt das für proliferierende Lymphozyten lebenswichtige Leitenzym der De novo-Purinsynthese. Daneben hat sich mittlerweile eine Reihe anderer Kombinationstherapien etabliert, wovon jedoch die Kombination aus CsA und MMF aktuell die größte Bedeutung besitzt. [Basara et al. 2000; Nash et al. 2000] Andere immunsuppressorische Therapieansätze zielen auf eine Inaktivierung der Antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Spenders durch extrakorporale Photopherese (EPC) oder mit Hilfe von NK-Zellen ab [Alcindor et al. 2001; Ruggeri et al. 2001].

Außerdem finden pluripotente mesenchymale Stammzellen (MSC) ihre Anwendung in präklinischen Studien. [Lazarus et al. 2005]

Neben der medikamentösen Immunsuppression, die über lange Zeit nach der allogenen SZT beibehalten wird, spielen jedoch vor allem Antithymozytenglobuline als immunsuppressiver Bestandteil der Konditionierungstherapie eine herausragende Rolle. Deren Einfluss auf die Immunrekonstitution nach allogener SZT wird als ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit im Folgenden ausführlich erläutert werden.

Immunrekonstitution. Die Zeit nach der Transplantation kann in verschiedene Rekonstitutionsphasen unterteilt werden. In der Prä-Transplantationsphase erfolgt die Konditionierung. Der Tag der Transplantation wird im Allgemeinen als Tag Null bezeichnet. Die frühe Rekonstitutionsphase beinhaltet die Tage +30 bis +90 nach der Transplantation. Zwischen den Tagen +90 und +360 spricht man von der mittleren und bei einer Zeit von über einem Jahr von der späten Rekonstitutionsphase. [Zander und Aksamit 1990]

Die frühe Phase der Rekonstitution hat einen überwiegend aplastischen Charakter, welcher von einer ausgeprägten Lymphozytopenie geprägt ist. Nach der Transplantation zeigen die Monozyten, gefolgt von den neutrophilen Granulozyten, den Thrombozyten und den CD16/56⁺ Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) ein stabiles „Engraftment“, so dass eine unspezifische Immunität innerhalb der ersten zwei Wochen weitestgehend gewährleistet ist. Der Begriff „Engraftment“ wird im klinischen Alltag als Synonym für das stabile Anwachsen der Immunzellen gebraucht und ist für die Neutrophilen mit einer Konzentration von über 5×10^9 Zellen/l Blut an zwei konsekutiven Tagen definiert. Bei den Thrombozyten wird eine Menge von mehr als 20×10^9 Zellen/l Blut vorausgesetzt. [Auffermann-Gretzinger et al. 2002; Chklovskaja et al. 2004; Ottinger et al. 1996; Storek et al. 2001]

Im Gegensatz zur unspezifischen Immunität bietet die Rekonstitution des adaptiven Immunsystems eine komplexere Dynamik. Erst nach zwei Jahren erreichen die CD3⁺ T-Lymphozyten die absoluten Normalwerte, während sich die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (cT) wesentlich schneller erholen als die CD4⁺ T-Helferzellen (Th). [Heitger et al. 1997; Mackall et al. 1995; Pavletic et al. 1998] Die CD19⁺ B-Zellen benötigen eine ähnlich lange Zeit zur vollständigen Rekonstitution. [Hong et al. 2008; Kook et al. 1996]

GvHD versus GvL. Das zentrale Problem der allogenen Transplantationsmedizin offenbarte sich bereits im Jahr 1979, nachdem ein selteneres Auftreten von Rezidiven der Grunderkrankung bei Patienten nach Ausbildung einer GvHD beobachtet worden war. [Weiden et al. 1979]

Bei der GvHD handelt es sich um eine Komplikation der allogenen SZT, deren Ursache eine Reaktion von Immunzellen aus dem Transplantat auf empfängereigenes Gewebe ist. Sie ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet. [Ho und Soiffer 2001] Die der Transplantation vorausgehende Konditionierung führt im Empfänger einerseits zur direkten apoptotischen Zellschädigung, andererseits erfolgt eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems. Letzteres mündet in einer inflammatorischen Aktivierung von Makrophagen und APC. [Shlomchik et al. 1999] Werden nun allogene Stammzellen zusammen mit den im Transplantat enthaltenen alloreaktiven T-Lymphozyten des Spenders in diese aktivierte Umgebung übertragen, so ist bei entsprechender Differenz in den Humanen Leukozytenantigenen (HLA) eine verstärkte Aktivierung und Expansion dieser Spenderimmunzellen möglich. Diese erkennen Gewebe und Organe des Empfängers als fremd und können schließlich eine akute GvHD auslösen. [Ferrara et al. 1999; Krenger et al. 1997]

Bei der GvHD müssen klassischerweise eine akute Form (aGvHD), definiert als Manifestation vor Tag +100 nach der Transplantation, und eine chronische Form (cGvHD) nach Tag +100 unterschieden werden. Die aGvHD manifestiert sich klinisch als das so genannte „wasting syndrome“, bestehend aus Dermatitis, Enteritis und Hepatitis mit generalisierter Schwäche. Die Stadieneinteilung erfolgt entsprechend der Organbeteiligung auch heute meist nach dem von *Glucksberg et al.* entwickeltem Schema aus dem Jahr 1974. Die cGvHD imponiert klinisch durch ein vielfältigeres Bild. Sie wird als begrenzt („limited“) oder erweitert („extensive“) beschrieben. [Glucksberg et al. 1974]

Während $CD8^+$ cT-Zellen die Effektorzellen der akuten GvHD sind, induzieren vorwiegend $CD4^+$ Th-Zellen die chronische GvHD. Demnach stellen die Haupteffektorzellen der GvHD die transplantierten alloreaktiven T-Lymphozyten vom Spender dar. [Anderson 2005]. Diese Tatsache ist die Ursache für das größte Hindernis der allogenen SZT: Der GvL-Effekt als Therapieziel und die GvHD als eine mitunter lebenslimitierende Komplikation werden durch dieselben Immunzellen verursacht und sind aus diesem Grund untrennbar miteinander verbunden. (*Abb. 3*)

Die Inzidenz der akuten GvHD beträgt 25-60% bei HLA-identischem verwandten Spender [Guardiola et al. 2002; Sierra et al. 2002] und bis zu 70% nach unverwandter SZT [Deeg et al. 2006; Hauzenberger et al. 2008].

Die Wichtigkeit der Entwicklung neuer Therapiemethoden zur Prophylaxe ist folglich unumstritten. Zwar wäre eine getrennte Beeinflussung der Effekte wünschenswert, jedoch bleibt diese Vorstellung zum jetzigen Zeitpunkt utopisch. Ziel der Forschung ist es deshalb, therapeutische Konzepte zu entwickeln, die den GvL-Effekt stärker betonen ohne das GvHD-Risiko gleichsinnig zu beeinflussen.

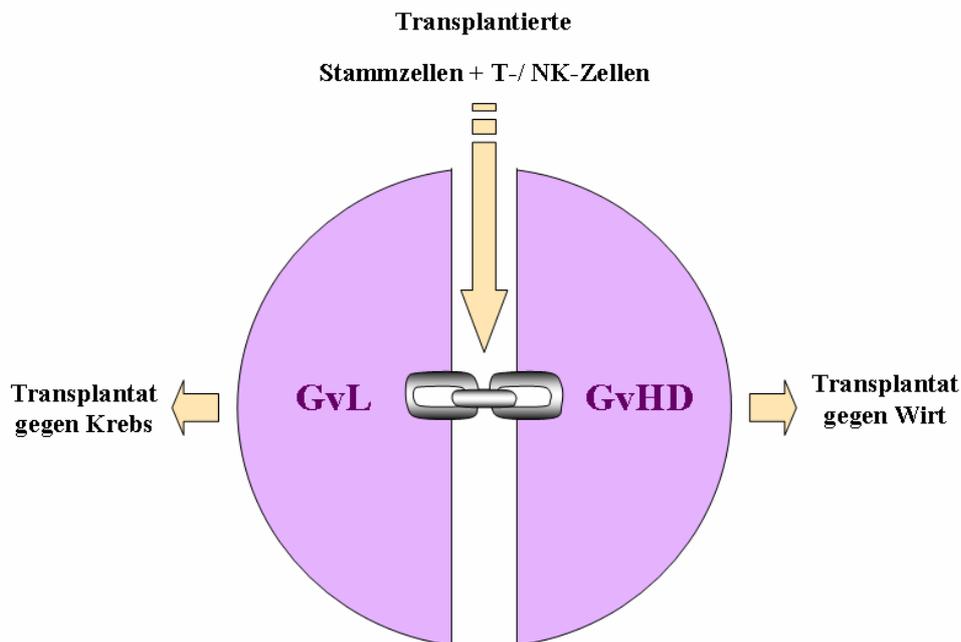


Abb. 3: GvL vs. GvHD.

GvL-Effekt und GvHD sind untrennbar miteinander verbunden, da sie durch dieselben Zellen getragen werden: die im Transplantat enthaltenen alloreaktiven T-Lymphozyten und NK-Zellen des Spenders. In Anlehnung an: [Holler et al. 2003]

1.2 Antithymozytenglobuline

Seit den 1960er Jahren werden mithilfe von Antiseren gegen Lymphozyten immunsuppressive Therapieoptionen entwickelt. [Pichlmayr 1966] Im Laufe der Zeit haben sich Antilymphozytenserum oder auch Antithymozytenglobuline (ATG) in der allogenen Transplantationsmedizin etabliert. Sie finden Anwendung als Teil der Konditionierungstherapie vor allem bei der unverwandten und/ oder nicht HLA-identen allogenen SZT. Bereits im Jahre 1899 hatte Metchnikoff als erster Antileukozytenserum (ALS) beschrieben und vermutet, dass alloreaktive Antikörper fremde Zellen erkennen, binden und zerstören können.

Vor diesem Hintergrund begann man polyklonale antihumane Antikörper zu gewinnen, um sie für die Transplantationsmedizin anwendbar zu machen, bis schließlich Kaninchen und Pferde als effektive Antikörperquelle identifiziert werden konnten. Entsprechend dem Zelltyp, mit welchem die Vakzinierung erfolgte, bezeichnete man die Antikörper entweder als Antilymphozyten- oder Antithymozytenglobuline. [Beiras-Fernandez et al. 2003]

ATG-Präparate. Aktuell stehen mehrere ATG-Präparate von verschiedenen Herstellern zur Verfügung. Zwei ATGs finden dabei regelmäßig Anwendung in der Klinik. Zum Einen das durch Vakzinierung mit humanen Thymozyten gewonnene Thymoglobulin der Firma Genzyme (Cambridge, Massachusetts, USA), im Folgenden als ATG-G abgekürzt, zum Anderen das aus der humanen JURKAT T-Zell-Linie hergestellte Antilymphozytenglobulin der Firma Fresenius (Fresenius-Biotech GmbH, Gräfeling, Deutschland), im Weiteren als ATG-F bezeichnet. [Craddock 2008] Während ATG-F üblicherweise in einer Dosierung von 15 bis 60 mg/ kg Körpergewicht (KG) verabreicht wird, liegt die Dosis für ATG-G zwischen 2,5 und 12,5 mg/ kg KG. [Bacigalupo et al. 2001b; Zander et al. 2003]

Wirkmechanismen der ATGs. Da es sich bei ATGs um polyklonale Antikörper handelt, bedingen sie eine Vielzahl unterschiedlicher immunologischer Effekte. Auf verschiedenen Wegen können sie das Immunsystem wirkungsvoll steuern und modulieren. Sie beeinflussen die Auslösung von Immunantworten, die Zelladhäsion und -interaktion sowie weitere Vorgänge, wie Entzündungen, die Apoptose und die Proliferation von Zellen. Den bisher am besten untersuchten Effekt der ATGs stellt die T-Zelldepletion dar. [Mohty 2007] Die ihr zugrunde liegenden bekannten Mechanismen sind vor allem eine komplementvermittelte Lyse und T-Zellaktivierung [Bonney-Berard und Revillard 1996] sowie eine Induktion der Apoptose aktivierter T-Zellen über das Fas-Molekül (CD95). [Genestier et al. 1998] Ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus ist die Steuerung und Beeinflussung der Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel, zum Beispiel über die Downregulation zellulärer Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 (leukocyte function associated antigen) und von Chemokinrezeptoren wie CXCR4 und CCR7. Außerdem spielen die Induktion der Apoptose von B-Zellen sowie die Beeinflussung der Funktionen von APCs eine Rolle für die Wirksamkeit der ATGs. [Mohty 2007]

Insgesamt bezeichnet man den durch ATG vermittelten immunsuppressiven Effekt als *in vivo*-T-Zelldepletion. Damit wird eine formale Analogie zu der in den 1970er bis 80er Jahren intensiv untersuchten Technik der *in vitro*-Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat gezogen. Letztere hat jedoch an Bedeutung verloren [Marmont et al. 1991] und es werden heute vor allem für die unverwandte SZT T-Zellantikörper wie die ATGs eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass nach einer allogenen SZT mit Konditionierung und ATG-Gabe die Inzidenz von sowohl akuter als auch chronischer GvHD effektiv verringert werden konnte. ATGs stellen deshalb eine effektive Alternative für die GvHD-Prophylaxe bei unverwandter oder nicht HLA-identer SZT dar. [Bacigalupo et al. 2001a; Byrne et al. 2000; Zander et al. 2003]

1.3 Regulatorische T-Zellen

Vor 14 Jahren wurde einer damals noch unbekannt, speziellen T-Zellsubpopulation eine wichtige Rolle für das Gelingen einer allogenen SZT zugeschrieben – den regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Im Jahr 1995 ordneten *Sakaguchi et al.* diesem $CD4^+ / CD25^+$ Zelltyp immunregulatorische Eigenschaften zu, nachdem sie eine beschleunigte Transplantat-abstoßung in Mäusen beobachtet hatten, deren Immunsystem keine T_{reg} bilden konnte. T_{reg} bilden einen nur geringen Anteil der $CD4^+$ Zellen von ca. 5-10% in Mäusen [Sakaguchi et al. 1995] und 1-2% im Menschen [Baecher-Allan et al. 2001].

T_{reg} -Marker. Da sich die Oberflächenproteine CD4 und CD25 aufgrund ihrer Koexpression auch auf aktivierten T-Zellen für eine Identifizierung der T_{reg} als nicht spezifisch genug erwiesen, wurde foxP3 als ein weiterer Marker eingeführt. *Brunkow et al.* hatten das „forkhead box protein 3“ in so genannten „scurfy mice“ identifiziert, einer Mausart, welche 1949 im Nationallabor von Oak Ridge/ USA aufgrund ihres außergewöhnlichen Phänotyps (schuppige Haut, kurze Lebensdauer von zwei bis vier Wochen, gonosomal rezessiver Erbgang) entdeckt worden war. Die Forscher machten eine Frameshiftmutation für das foxP3-Gen auf dem X-Chromosom für diese Veränderungen verantwortlich. [Brunkow et al. 2001] Bei foxP3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher außerdem für die Entwicklung der Autoimmunerkrankungen IPEX (Immundysregulations-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-gebundenes-Syndrom) [Bennett et al. 2001] sowie XLAAD (X-gebundenes autoimmun-allergisches Dysregulationssyndrom) [Chatila et al. 2000] eine Rolle spielt. FoxP3 wird hauptsächlich

von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen exprimiert, ist aber zu einem kleineren Anteil auch auf CD4⁺/CD25⁻ T-Zellen zu finden.

Weiterhin wurde festgestellt, dass sich unter den CD25^{+(high)}/foxP3⁺ T_{reg} auch aktivierte CD25^{+(intermediate)} Effektor-T-Zellen (T_{eff}) befinden. [Roncador et al. 2005] Aus diesem Grund wurde ein weiterer T_{reg}-Marker eingeführt. Die Alphakette des Interleukin 7 (IL-7)-Rezeptors (CD127) ermöglicht eine Identifizierung der T_{reg}, welche dieses Molekül nicht oder nur sehr schwach exprimieren (CD127^{low/-}). Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine direkte Unterdrückung der Expression von CD127 durch foxP3. Dieser Marker ermöglicht somit eine Untersuchung der T_{reg} unter Ausschluss aktivierter CD4⁺/CD25^{+(intermediate)}/foxP3⁺ T_{eff}-Zellen. [Hartigan-O'Connor et al. 2007; Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006]

Wirkmechanismen der T_{reg}. T_{reg} unterdrücken über einen direkten zytokinrezeptorvermittelten Zell-Zell-Kontakt die Aktivierung, Proliferation und Funktion von Immunzellen, wie CD4⁺ Th-Zellen [Thornton und Shevach 1998], CD8⁺ cT-Zellen [Piccirillo und Shevach 2001], Monozyten und Makrophagen [Taams et al. 2005], naiven Memory-B-Zellen [Lim et al. 2005] sowie Dendritischen Zellen (DC) [Cederbom et al. 2000].

Neben der Steuerung der Immunantwort auf Eigen- und Fremdartigene, Allergene und Tumorantigene spielen T_{reg} zudem eine wichtige Rolle in der allogenen SZT. [Levings und Roncarolo 2005] Sie unterdrücken die Immunantwort auf Alloantigene sowohl in der Nierentransplantation [Salama et al. 2003] als auch in der allogenen SZT im Mausmodell [Joffre et al. 2004] und fördern außerdem das allogene Engraftment [Hanash und Levy 2005]. Des Weiteren verringern sie die Inzidenz einer aGvHD im Mausmodell, [Edinger et al. 2003; Hoffmann et al. 2002] bei gleichzeitig erhaltenem GvL-Effekt, getragen durch CD8⁺ cT-Zellen. T_{reg} besitzen demnach ein großes Potential für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte im Rahmen der allogenen SZT, da sie eine Möglichkeit bieten, die GvHD-Rate zu senken, ohne den GvL-Effekt zu vermindern. [Edinger et al. 2003]

T_{reg} und ATGs. T_{reg} können im Rahmen eines adoptiven Zelltransfers auf unterschiedliche Weise *in vitro* expandiert und anschließend auf einen Empfängerorganismus übertragen werden. Jedoch ergeben sich methodische Probleme wie die gleichzeitige Expansion von T_{eff}-Zellen, die anschließend eine akute GvHD verursachen. [Battaglia et al. 2005; Godfrey et al. 2005; Taylor et al. 2002] Therapeutische Ansätze für eine T_{reg}-Expansion *in vivo* mit Umgehung der methodischen Probleme der *in vitro*-Technik fehlten bisher.

Aufgrund ihrer T-zelldepletierenden Wirkung finden ATGs im Rahmen der Konditionierungstherapie vor unverwandter allogener SZT erfolgreich ihre Anwendung. (siehe 1.2) Seit dem Jahr 2006 existieren jedoch Hinweise für einen neuen bis dahin unbekanntem Wirkmechanismus der ATGs. Lopez *et al.* beschrieben, dass ATG-G in der Lage zu sein scheint, *in vitro* eine Expansion von CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg} hervorzurufen. Sie inkubierten CD4⁺/ CD25⁻, so genannte konventionelle T-Zellen (T_{con}), gesunder Probanden *in vitro* mit ATG oder Kaninchen-IgG (Immunglobulin G) als Kontrolle und ermittelten durch FACS-Analysen die T_{reg}-Zahlen. Bereits nach neun Stunden beobachteten sie eine dosisabhängige Zunahme der Expression von CD25 und foxP3 bei einer Dosierung des ATGs von 1-10 µg/ml *in vitro*. Als Ursache für diesen Effekt vermuteten die Autoren eine durch ATG hervorgerufene Induktion von CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg} aus CD4⁺/ CD25⁻ T_{con}. [Lopez et al. 2006]

Zwei Jahre später veröffentlichten Ruzek *et al.* Ergebnisse, die analog zu den oben genannten Versuchen eine *in vitro*-Expansion mit einem anti-Maus-ATG induzieren konnten. Der anschließende Transfer der *in vitro* induzierten T_{reg} in an aGvHD erkrankte Mäuse, ergab eine signifikante Besserung der GvHD. [Ruzek et al. 2008] Bislang existierten jedoch keine Daten, die einen T_{reg}-expandierenden Effekt von ATGs *in vivo* im Menschen nachweisen konnten.

1.4 Zielsetzung

Regulatorische T-Zellen stellen eine höchst interessante Zellpopulation im Zusammenhang mit der allogenen Stammzelltransplantation dar, da sie in der Lage zu sein scheinen, das Gleichgewicht zwischen dem therapeutisch gewünschten GvL-Effekt und der unerwünschten GvHD zu beeinflussen. Deshalb sind alle Techniken von großem Interesse, die eine Steuerung dieser T-Zellpopulation bewirken können. So auch die in diesem Zusammenhang kürzlich vorgestellten Daten zur Eigenschaft von ATG, eine *in vitro*-Expansion bzw. -Induktion von T_{reg} zu bewirken.

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten prospektiven Untersuchung war es, die Rekonstitution des zellulären Immunsystems *in vivo*, mit und ohne ATG-Gabe, nach allogener SZT zu verfolgen. Insbesondere sollte im Sinne eines Pilotprojektes beantwortet werden, ob sich eine durch ATG bedingte T_{reg}-Expansion nach allogener SZT im Menschen *in vivo* nachweisen lässt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientencharakteristika

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden acht Patienten mit einem medianen Alter von 58 Jahren (37 bis 68 Jahre) in die Studie eingeschlossen. Diese gaben ihr schriftliches informiertes Einverständnis zur Teilnahme im Einklang mit den Forderungen der Deklaration von Helsinki in der fünften Überarbeitung aus dem Jahr 2000. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität liegt vor.

Die Einschlusskriterien beinhalteten das Alter (18 bis 70 Jahre), die Indikation zur allogenen SZT sowie das Vorhandensein eines HLA-identen Spenders. Patienten, welche diese Kriterien nicht erfüllten bzw. eine autologe SZT oder T-zelldepletierende Therapie in einem Zeitraum von weniger als einem Jahr vor der allogenen SZT in ihrer Vorgeschichte aufwiesen, wurden nicht eingeschlossen. (Tab. 2)

Tab. 2: Zusammenfassung der Ein- und Ausschlusskriterien.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter 18 bis 70 Jahre	Vorherige autologe SZT < 1 Jahr
Indikation zur allogenen SZT, Ausschluss von schwerwiegenden Organdysfunktionen	T-zelldepletierende Therapie < 1 Jahr (Fludarabin, Cytarabin)
HLA-identer Spender	
Informed Consent	

2.1.2 Konditionierungstherapie

Der Stammzelltransplantation wurde bei allen acht Patienten eine Konditionierungstherapie zur Vorbereitung des Empfängerimmunsystems vorangeschaltet. Die Wahl der Konditionierungstherapie (Standard versus RIC) richtete sich nach der Grunderkrankung bzw. den Risikofaktoren (Tab. 3). Die Teilnahme an dieser Pilotstudie beeinflusste die Therapiewahl nicht. Außerdem erhielten vier der acht Patienten in dieser Studie eines der ATG-Präparate im Rahmen der Konditionierungstherapie vor der Transplantation: ATG-F (n=2) in einer kumulativen Dosis von 30 mg/kg KG bzw. ATG-G (n=2) in einer kumulativen Dosis von 6 mg/kg KG von Tag -3 bis -1.

Auch hier richtete sich die Entscheidung, welcher Patient ein ATG-Präparat erhielt und welcher nicht, ausschließlich nach klinisch-transplantationsrelevanten Kriterien. Die andere Hälfte des Patientenkollektivs (n=4) erhielt keine Antikörper in Vorbereitung auf die Transplantation.

Das Geschlechterverhältnis sowie die Verwandtschaftsbeziehung zwischen Empfänger und Spender waren sowohl in der ATG- als auch in der Kein Antikörper-Gruppe gleich verteilt. Ebenso wiesen die Durchführung einer RIC oder Standard-Konditionierung in beiden Gruppen eine Gleichverteilung auf. (Tab. 3)

Tab. 3: Zusammenfassung der Patientencharakteristika.

*m (männlich), w (weiblich), MRD (matched related donor), MUD (matched unrelated donor), MMUD (mismatched unrelated donor).^{*1)} MMUD (minor mismatch Cw). ^{*2)} RIC (Reduced Intensity Conditioning): Treosulfan/ Fludarabin; Cyclophosphamid/ Fludarabin/ Rituximab; 2Gy TBI/ Flu. Standard: Cyclophosphamid/ TBI (12Gy or 8 Gy). AML (akute myeloische Leukämie), ALL (akute lymphatische Leukämie), CLL (chronisch lymphatische Leukämie), MM (Multiples Myelom), MCL (Mantelzelllymphom), OMF (Osteomyelofibrose)*

	ATG	Kein Antikörper	
Anzahl der Pat.	4	4	
Alter, y (Median)	37 - 68 (58)	48 - 67 (62)	(p = 0,773)
Diagnose	MM, MCL, CLL, ALL	AML (n=3), OMF	
Geschlecht Empf./ Spender			
<i>mm</i>	2	2	
<i>ww</i>	1	2	
<i>wm</i>	1		
Beziehung Empf./ Spender			
<i>MRD</i>		2	
<i>MUD</i>	3	2	
<i>MMUD ^{*1)}</i>	1		
Konditionierung ^{*2)}			(p = 1,00)
<i>RIC</i>	3	3	
<i>Standard</i>	1	1	

2.1.3 Zusammensetzung der Stammzellpräparate und Transplantation

Am Tag Null erhielten alle Empfänger Stammzellen aus peripheren Blutstammzellpräparaten von Spendern, deren hämatopoetische Stammzellen mit Hilfe von G-CSF mobilisiert worden waren. Abgesehen von zwei Patienten erhielten alle Teilnehmer Transplantate von unverwandten Spendern. Ein Antigen-Mismatch lag in keinem Fall vor. Alle Transplantate wurden vor ihrer Transfusion am Tag Null mittels FACS auf ihren Gehalt von CD34⁺ Stammzellen, CD3⁺ T-Zellen und CD4⁺/CD25⁺/foxP3⁺ sowie CD4⁺/CD25⁺/CD127^{low/-} T_{reg} analysiert. Der Zellgehalt wurde auf das Körpergewicht des jeweiligen Patienten bezogen und in Zellen/ kg KG angegeben.

2.1.4 Immunsuppression und GvHD-Prophylaxe

Nach erfolgreicher Konditionierung und anschließender SZT erhielten alle Patienten eine immunsuppressive Medikation um das Risiko einer Transplantatabstoßung oder einer GvHD zu verringern. In dieser Studie bestand die medikamentöse Immunsuppression bei allen Patienten aus einer Kombination aus CsA (ab Tag -1) und MMF (Tag 0 bis Tag +50). (Abb.4)

2.1.5 Entnahme der Blutproben

Nach der Transplantation wurden die Patienten in einem Zeitraum von 150 Tagen beobachtet. An den Tagen +30, +60, +90 und +150 nach Transplantation sowie einmalig vor Beginn der Konditionierungstherapie wurden den Patienten 7,5 ml Vollblutproben entnommen und mittels EDTA antikoaguliert um anschließend in der Durchflusszytometrie die Immunzellzahlen zu bestimmen. (siehe 2.2) *Abbildung 4* bietet einen schematischen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Therapie und die anschließenden Untersuchungen.

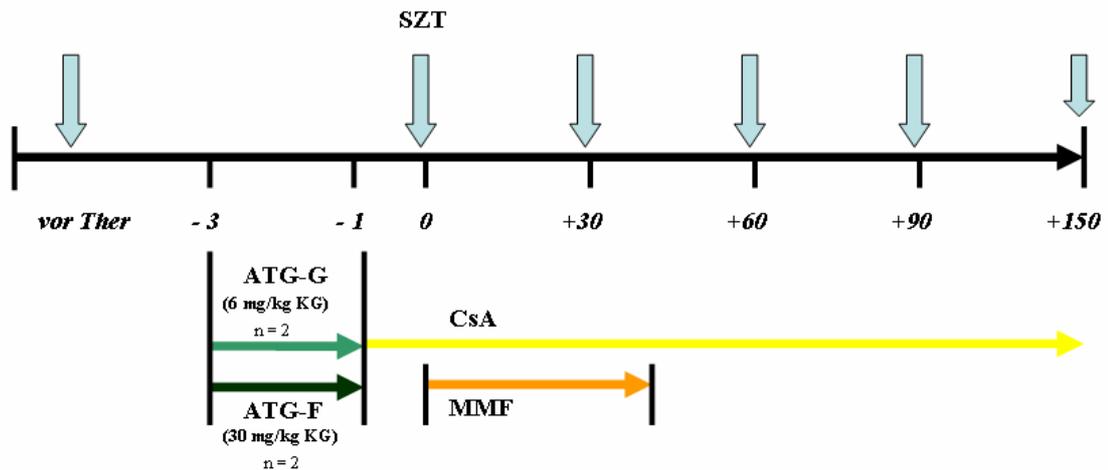


Abb. 4: Zeitlicher Ablauf von Therapie und Blutentnahmen.

Beobachtet wurden acht Patienten in einem Zeitraum vor Beginn der Konditionierungstherapie (vor Ther) bis Tag +150 nach allogener SZT. Die ATG-Präparate wurden von Tag -3 bis -1 in der jeweils üblichen Dosierung verabreicht. Die Transfusion der Stammzellpräparate (SZT) erfolgte an Tag 0. Im Rahmen der pharmakologischen Immunsuppression wurden CsA ab Tag -1 und MMF von Tag 0 bis Tag +50 verwendet. Die hellblauen Pfeile symbolisieren die Blutentnahmen an den jeweiligen Messtagen.

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie dient der phänotypischen Analyse der Immunzellen nach deren Färbung mit monoklonalen fluorochrommarkierten Antikörpern. Diese Antikörper sind gegen bestimmte Oberflächenepitope auf den Zellen gerichtet und binden diese spezifisch an ihrem antigenbindenden Teil (Fab-Teil).

Befinden sich die zu markierenden Antigene intrazellulär, wie z.B. foxP3, ist zuvor eine Permeabilisierung der Zellmembran nötig, um sie für die Antikörper durchgängig zu machen. (siehe 2.2.5) Nach der Färbung können die Zellpopulationen unter Verwendung eines Fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (fluorescence activated cell sorting, FACS) anhand der Parameter Lichtstreuung und Fluoreszenz identifiziert und aufgetrennt werden. Über ein Piezoelement werden die Zellsuspensionen in kleine Tropfen zerlegt und anschließend in einer Messeinheit mit Licht hoher Intensität (LASER) und einer Wellenlänge von 488 oder 595 nm bestrahlt.

Durch die Zellen wird dieser Lichtstrahl in Abhängigkeit von deren physikalischen Eigenschaften unterschiedlich stark gestreut. Maß und Richtung der Lichtstreuung liefern Informationen über Größe (gemessen anhand des Vorwärts-streulichtes, FSC) sowie Granularität (gemessen anhand des Seitwärtsstreu-lichtes, SSC) der Zellen. Des Weiteren werden die konjugierten Fluorochrome zur Fluoreszenz angeregt. Die Emission der verschiedenen Farbstoffe wird in 90°-Richtung aufgenommen. Farbe und Intensität liefern zusätzliche Informationen und ermöglichen so eine genauere Identifizierung und Untersuchung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen.

2.2.2 Verwendete Antikörper und Panels

Für die Identifizierung und Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden monoklonale mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC; 519 nm), Phycoerythrin (PE; 578 nm), Peridininchlorophyll Protein (PercP; 678 nm), Allophycocyanin (APC; 660 nm) oder Alexa Fluor 647 (668 nm) fluoreszenzmarkierte Antihuman-Antikörper verwendet. Die Zusammenstellung der Antikörperansätze für die Immunfärbung erfolgte anhand eines zuvor festgelegten Panels. (Tab. 4) Es wurden spezifische Antikörper verschiedener Hersteller verwendet. (Tab. 5)

Tab. 4: Antikörperpanels für die FACS-Analysen.

Dargestellt sind die verwendeten Antikörperpanels für die FACS-Analysen einschließlich der jeweils zugeordneten Fluoreszenz. Perm: Permabilisierungsschritt für die Messung des intrazellulären Markers foxP3. ISO: Isotypkontrolle.

FITC	PE	PercP	APC
CD45	CD14	-	-
ISO	ISO	CD3	ISO
CD8	CD45RO	CD3	CD4
CD4	CD127	CD3	CD25
CD16/56	CD27	CD3	CD19
Perm: CD25	FoxP3	CD4	CD127
Perm: ISO	ISO	CD4	ISO

Tab. 5: Synopsis der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

Für jeden Antikörper wurden das spezifische Antigen, der konjugierte Fluoreszenzfarbstoff, der für die Herstellung verwendete Klon sowie der Name der Herstellerfirma angegeben.

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD14	PE	M5E2	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland</i>
CD45RO	PE	UCHL1	<i>DAKO, Hamburg, Deutschland</i>
CD3	PercP	SK7	<i>Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland</i>
CD4	PercP	SK3	
CD127	PE/ Alexa 647	hiL-7R-M21	
CD25	APC	2A3	
CD 16	FITC	3G8	
CD56	FITC	NCAM16.2	
IgG1	PE	X40	
IgG1	APC	X40	
IgG1	Alexa 647	MOPC-21	
CD4	APC	VIT4	<i>Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
CD45	FITC	5B1	
CD19	APC	LT19	
CD4	FITC	13B8.2	<i>Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland</i>
CD8	FITC	B9.11	
CD25	FITC	B1.49.9	
IgG1	FITC	4,00E+03	
FoxP3	PE	PCH101	<i>eBioscience, San Diego, USA</i>
Rat IgG2A	PE	eBR2a	

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Um die Erythrozyten der Vollblutproben zu lysieren wurden in einem ersten Schritt 10 µl antikoagulieretes Vollblut (EDTA) mit 190 µl 3% Essigsäure (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*) versetzt. Nach der Lyse erfolgte eine manuelle Auszählung der mononukleären Zellen in einer NEUBAUER-Zählkammer. Hierzu wurden vier Eckquadranten des Zählgitters ausgezählt und in Gigapartikeln ($\times 10^9$)/l angegeben. Bei einer Zellzahl von weniger als 3-5 Gpt/l wurde die Probe aufkonzentriert.

Dazu wurden je Probenansatz 500 µl Vollblut zusammen mit 2 ml PBS (NaCl, KCL, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ x H₂O, Aqua dest.) in ein 5 ml Polystyren Rundbodenröhrchen (*BD Falcon, Heidelberg, Deutschland*) gegeben, vermischt, 5 Minuten (min) bei 1700 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert (*Universal 320, Hettich, Tuttlingen, Deutschland*) und schließlich der Überstand dekantiert. Lag die Zellzahl über 10 Gpt/l war eine Verdünnung erforderlich, so dass letztlich eine Menge von ca. 1x10⁶ Zellen pro Probenansatz vorlag. Diese Zahl sollte eine optimale Bindung der Antikörper an die Zellantigene ermöglichen.

2.2.4 Immunfärbung membranständiger Epitope

Die Antikörperlösungen wurden in den entsprechenden Ansatzröhrchen (*BD Falcon*) vorgelegt, um anschließend 100 µl der Vollblutprobe (ggf. nach Verdünnung oder Aufkonzentrierung entsprechend 2.2.3) hinzuzufügen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit erfolgte die Zugabe von je 2 ml 1:10 verdünnter *BD FACS Lysing Solution (BD)* mit anschließender Inkubation für 10 Minuten im Dunkeln bei RT. Nach einmaligem Zentrifugieren (5 min, 1700 rpm) wurde der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellansätze analog 2.2.3 zweimalig mit 2 ml PBS gewaschen. Schließlich wurden nach dem Dekantieren der Überstände 100 µl PBS pro Ansatz hinzugegeben und sofort die Messung durchgeführt.

2.2.5 Immunfärbung intrazellulärer Epitope

Die Färbung der intrazellulären Antigene erfolgte unter Verwendung des *Human Regulatory T-cell Staining Kits (eBioscience, San Diego, USA)*. In Vorbereitung auf die Färbung wurde zum Einen Fix/Perm-Lösung aus 0,5 ml *Fixation/Permeabilization Concentrate* und 1,5 ml *Fixation/Permeabilization Diluent* hergestellt.

Zum Anderen wurde ein Perm. Puffer, bestehend aus 2 ml *10x Permeabilization Buffer Concentrate* und 18 ml *Aqua dest.*, angesetzt. Analog zu 2.2.4 wurden auch hier zuerst die Antikörper vorgelegt und anschließend 100µl Vollblut hinzugefügt. Auf die erste Dunkelinkubation von 15 Minuten bei RT folgte nach Zugabe von 2 ml *Staining Buffer (eBioscience)* ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1700 rpm). Anschließend wurde 1 ml Fix/Perm-Lösung hinzugegeben und inkubiert (30 min, 4°C). Nach einem weiteren Waschvorgang mit 2 ml PBS wurde zweimalig mit 2 ml Perm. Puffer permeabilisiert und jeweils anschließend zentrifugiert (5 min, 1700 rpm) sowie die Überstände dekantiert.

Danach erfolgte die Zugabe von 2 μ l *Rat serum* (eBioscience) sowie eine erneute Dunkelinkubation (15 min, 4°C). Anschließend wurde der Antihuman-foxP3-Antikörper bzw. die Kontrolle (Rat IgG2A) hinzugefügt und ein letztes Mal inkubiert (30 min, 4°C). Nach einem erneuten Permeabilisierungsvorgang mit 2 ml Perm. Puffer und Dekantieren der Überstände wurden die Pellets in 100 μ l PBS aufgenommen und sofort durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.6 FACS-Analyse und Geräte

Alle Messungen wurden an einem *BD FACSCalibur* (1997) mit Hilfe der Software *BD Cell Quest Pro 4.0.2* durchgeführt. Ausgehend vom Leukozytengate (SSC/ FSC) wurde auf die NK-Zellen (CD16/56⁺), die T-Lymphozyten (CD3⁺) und auf die B-Lymphozyten (CD19⁺) gegatet. Die T-Lymphozyten wurden in cT-Zellen (CD8⁺) und Th-Zellen (CD4⁺) selektiert. Schließlich wurde über die Th-Zellen auf die T_{reg} (CD127, CD25, foxP3) gegatet. Für alle Messungen wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt, welche von den ermittelten Zellzahlen abgezogen wurde um unspezifische Färbungen auszugrenzen. (*Abb. 5*)

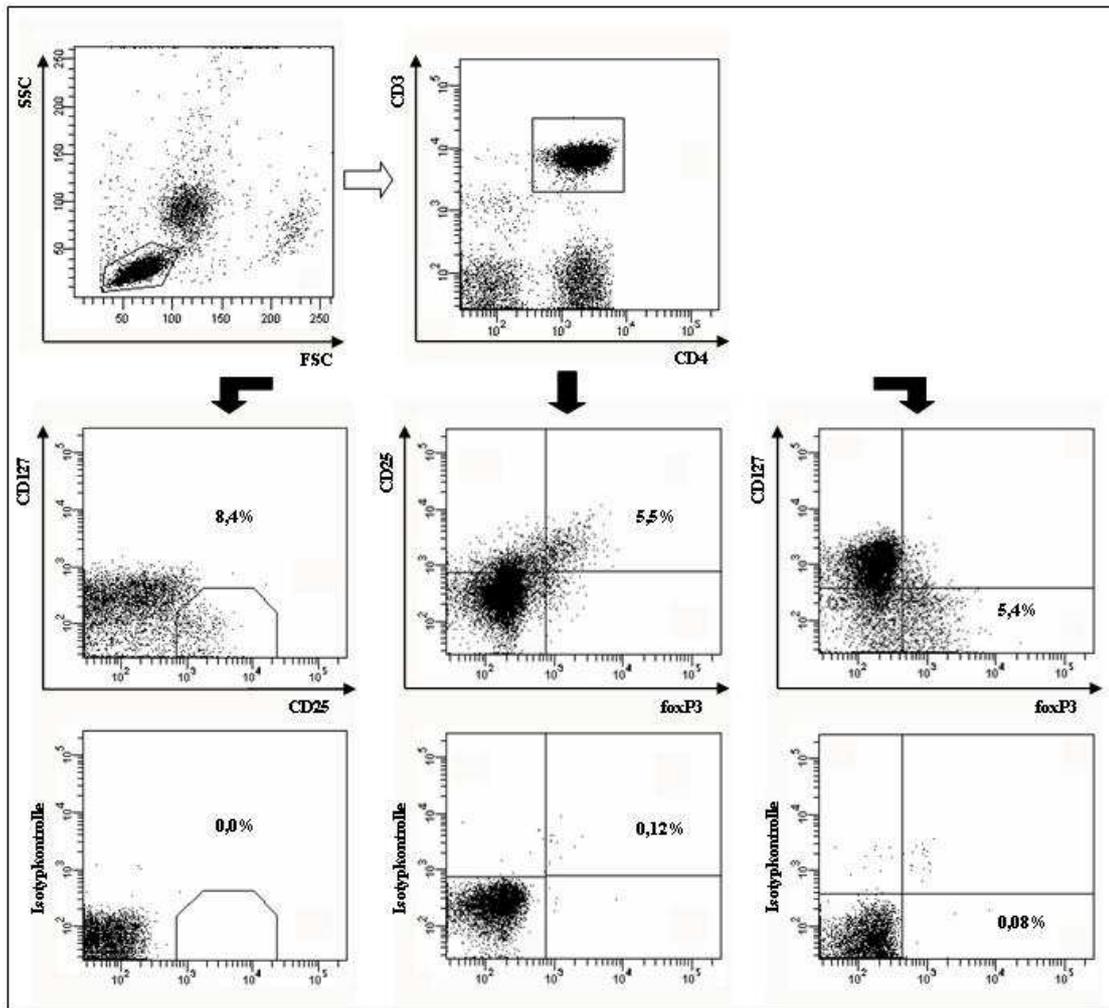


Abb. 5: Beispielhafte FACS-Analyse anhand einer T_{reg} -Population.

Ausgehend vom Leukozytengate (SSC/ FSC) wurde über die $CD3^+$ T-Zellen und die $CD4^+$ Th-Zellen (oben) auf die T_{reg} -Population mittels verschiedener Marker (CD25, CD127, foxP3) gegatet (Mitte). Für jede Messung wurde eine Negativkontrolle durchgeführt (unten). Alle dargestellten T_{reg} -Zahlen in % der Th-Zellen nach Abzug der jeweiligen Isotypkontrolle.

2.3 Chimärismusanalyse und klinische Verlaufsbeobachtung

Nach erfolgreicher Transplantation und Etablierung der Spenderhämatopoese kommt es allmählich zur vollständigen Verdrängung der Empfängerhämatopoese. Dabei wird ein Übergangszustand durchlaufen, in dem noch ein kleiner Anteil ursprünglicher Empfängerblutbildung vorhanden ist. In diesem Fall spricht man von einem gemischten Chimärismus. Der Begriff Chimärismus wird in Anlehnung an ein Fabelwesen aus der griechischen Mythologie - ein dreiköpfiges Feuer speiendes Ungeheuer aus Lykien, bestehend aus einem Löwen vorn, einer Ziege in der Mitte und einer Schlange hinten - verwendet.

Ein so genannter vollständiger Chimärismus liegt vor, wenn die gesamte Hämatopoese aus den Spenderzellen gebildet wird. Dieser Zustand sollte im Idealfall nach einer gewissen Zeit erreicht sein. Den „anderen Teil der Chimäre“ stellen in diesem Fall die übrigen Zellen des Empfängerorganismus dar. Die Bestimmung des hämatopoetischen Chimärismus hat klinische Relevanz, da sich mit seiner Hilfe ein Rezidiv oder ein Versagen des Transplantates frühzeitig erkennen lässt. [Baron und Sandmaier 2006; Khan et al. 2004]

Den Patienten wurde zu den festgelegten Zeitpunkten (Tag +30, +60, +90, +150) Blut entnommen, um unter anderem eine Chimärismusanalyse durchzuführen (*Abb. 4*). Die Bestimmung der Verteilung von Spender- und Empfängerhämatopoese erfolgte sowohl aus Vollblut, d.h. unter Einbeziehung aller kernhaltigen Zellen, als auch aus CD3⁺ selektierten T-Zellen, als so genannter T-Zellchimärismus mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Sämtliche Chimärismusanalysen wurden am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg durchgeführt. Für die Quantifizierung des Spenderchimärismus wurden je nach Spender-Empfängerkonstellation entweder geschlechtschromosomale Unterschiede oder DNA-Sequenzpolymorphismen als minimale genetische Differenzen zwischen Empfänger und Spender mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder PCR-basierten Methoden bestimmt. Für letztere diente beispielsweise die Untersuchung der Anzahl von so genannten „short tandem repeats“ (STR) und einzelner Nukleotide („single nucleotide polymorphism“, SNP). Mit Hilfe der so genannten Realtime-PCR konnten die Ergebnisse quantitativ dargestellt werden.

Der klinische Zustand der Patienten wurde im Rahmen dieser Untersuchungen regelmäßig kontrolliert und dokumentiert. Neben der Dokumentation von GvHD und dem Krankheitsstatus wurden insbesondere auch Infektionen (viral, bakteriell und mykotisch) erfasst. Die GvHD wurde anhand der klassischen Stadieneinteilung nach *Glucksberg et al.* dokumentiert (*Tab. 6* und *7*).

Infektionen mit Bakterien oder Pilzen sowie Reaktivierungen von Cytomegalieviren (CMV) und Epstein-Barr-Viren (EBV) wurden definiert als der Zeitraum zwischen dem ersten und dem letzten Tag eines positiven Keimnachweises in der mikrobiologischen Untersuchung von peripherem Blut, Stuhl, Urin oder Biopsien.

Alle mikrobiologischen Untersuchungen wurden im Rahmen der klinischen Routine vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der MLU Halle-Wittenberg vorgenommen. Für die Definition einer relevanten Infektion wurden zusätzlich zum Keimnachweis das Vorhandensein einer klinischen Symptomatik sowie die konsekutive Notwendigkeit einer Therapie festgelegt.

Tab. 6: Klassische Stadieneinteilung der akuten GvHD.

Die Einteilung erfolgte entsprechend dem von Glucksberg et al. entworfenen klassischen Schema aus dem Jahr 1974. Anhand der in Tab. 6.1 genannten Kriterien wurde zunächst eine Stadieneinteilung (1 bis 4) für die jeweiligen Einzelorgane Haut, Leber und Darm getroffen, um anschließend mit Hilfe von Tab. 6.2 die einzelnen Organstadien in einem Gesamtgrad (I bis IV) der akuten GvHD zusammenfassen zu können. [Glucksberg et al. 1974]

Tab. 6.1: Stadieneinteilung der akuten GvHD von Einzelorganen

Stadium	1	2	3	4
<i>Haut</i>	Exanthem < 25% KOF	Exanthem 25-50% KOF	generalisierte Erythrodermie	generalisierte Erythrodermie, bullöse Formation und Desquamation
<i>Leber</i>	Bilirubin 34 - 50 µmol/l (2 - 3 mg/dl)	Bilirubin 51 - 100 µmol/l (3 - 6 mg/dl)	Bilirubin 101 - 255 µmol/l (6 - 15 mg/dl)	Bilirubin > 255 µmol/l (> 15 mg/dl)
<i>Darm</i>	Diarrhoe 500 - 1000 ml/d oder persistierende Übelkeit	Diarrhoe 1000 - 1500 ml/d	Diarrhoe > 1500 ml/d für > 3 Tage	Schmerz +/- Ileus

Tab. 6.2: Gesamtgradeinteilung der akuten GvHD

Grad	I	II	III	IV
<i>Haut</i>	1 - 2	1 - 3	2 - 3	2 - 4
<i>Darm</i>	0	1 (+/- Leber)	2 - 3 (+/- Leber)	2 - 4
<i>Leber</i>	0	1 (+/- Darm)	2 - 3 (+/- Darm)	2 - 4
	keine klinische Beeintr.	milde klinische Beeintr.	moderate klinische Beeintr.	extreme klinische Beeintr.

Tab. 7: Klinische Einteilung der chronischen GvHD.

Hautbeteiligung meint das Auftreten eines Exanthems mit Erythem, Trockenheit und Schuppung. Eine Beteiligung der Speicheldrüsen und Mundschleimhaut beinhaltet eine so genannte Sicca-Symptomatik mit verminderter Sekretionsleistung und konsekutiver Schleimhautschädigung. [Vigorito et al. 2009]

Limitierte cGvHD (1 von 2 oder beide Kriterien erfüllt)	Extensive cGvHD (1 Kriterium ausreichend)
1. Lokale Hautbeteiligung	1. generalisierte Hautbeteiligung
2. Leberdysfunktion i.R. der cGvHD	2. lokale Hautbeteiligung und/ oder Leberdysfunktion i.R. der cGvHD <i>UND</i> a) histologisch nachgewiesene chronisch aktive Hepatitis, Brückennekrosen oder Zirrhose <i>ODER</i> b) Augenbeteiligung (pathologischer SCHIRMER-Test) <i>ODER</i> c) Beteiligung von Speicheldrüsen <i>ODER</i> Mundschleimhaut, bioptisch gesichert <i>ODER</i> d) Beteiligung jedes anderen Organs

2.4 Statistik

Alle angegebenen p-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes für zwei unabhängige Stichproben ermittelt. Das Signifikanzniveau der p-Werte wurde mit $< 0,05$ festgelegt. Alle angegebenen p-Werte wurden im Rahmen der explorativen Analyse im Sinne einer Pilotstudie nicht für das Problem des multiplen Testens korrigiert. Insgesamt wurde die statistische Datenanalyse vor allem zur Orientierung im Sinne einer Pilotstudie durchgeführt. Die statistischen Analysen und gezeigten Abbildungen wurden unter Verwendung der Software *SPSS* in Version 15.0.1, *Microsoft Excel* und *Powerpoint 2003*, sowie *Adobe Photoshop CS2* erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung und Vergleich der Transplantate beider Patientengruppen

Alle Transplantate wurden vor ihrer Transfusion am Tag Null mittels FACS auf ihren Gehalt von CD34⁺ Stammzellen, CD3⁺ T-Zellen und CD4⁺/CD25⁺/foxP3⁺ sowie CD4⁺/CD25⁺/CD127^{low/-} T_{reg} analysiert. Der Zellgehalt wurde auf das Körpergewicht des jeweiligen Patienten bezogen und in Zellen/ kg KG angegeben. Die Analyse ergab, dass sich die Transplantate zwischen beiden Gruppen (ATG vs. Kein Antikörper) im Hinblick auf den Gehalt der transplantierten CD34⁺ Stammzellen (p=0,248), der CD3⁺ T-Zellen (p=0,468) und der CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ T_{reg} (p=0,564) nicht signifikant unterschieden. Auch die CD4⁺/CD25⁺/CD127^{low/-} T_{reg}-Population zeigte vergleichbare Zahlen in beiden Patientengruppen (p=1,0). (Tab. 8)

Tab. 8: Vergleich der transplantierten Zellzahlen zwischen beiden Patientengruppen.

Dargestellt sind die Zahlen der transplantierten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC), der CD3⁺ T-Lymphozyten, sowie der CD25⁺/CD127^{low/-} und CD25⁺/foxP3⁺ T_{reg}. Neben der Spannweite der Zellzahlen sind in Klammern die entsprechenden Mediane angegeben. Die rechte Spalte zeigt in Klammern die jeweiligen p-Werte für den Vergleich zwischen beiden Gruppen. Beide Patientengruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander in ihrer Transplantatzusammensetzung. Insbesondere die transplantierten T_{reg}-Zahlen zeigten sowohl in der CD127^{low/-} als auch in der foxP3⁺ Population vergleichbare Zahlen in beiden Gruppen (p=1,0 bzw. p=0,564). Alle Angaben in x10⁶ Zellen/kg KG.

	ATG	Kein Antikörper	
Transplantierte Zellzahlen x10⁶/ kg KG (Median)			
HSC CD34 ⁺	5,2 – 11,0 (9,57)	4,91 – 9,47 (7,28)	(p=0,248)
T-Zellen CD3 ⁺	150 - 480 (230)	120 - 540 (175)	(p=0,468)
T _{reg} CD127 ^{low/-}	4,94 – 7,36 (6,15)	5,65 – 34,63 (9,70)	(p=1,00)
T _{reg} foxP3 ⁺	3,73 – 5,58 (4,66)	0,95 – 18,29 (2,87)	(p=0,564)

3.2 Spenderchimärismus und Engraftment

Alle acht Patienten boten ein regelrechtes Anwachsen des Transplantates (Engraftment) und entwickelten mit Ausnahme eines Patienten aus der ATG-Gruppe einen vollständigen Spenderchimärismus mit einem Spenderanteil von über 95 Prozent bis Tag +30. (Tab. 9) Nach Tag 90 war bei allen Patienten ein vollständiger Spenderchimärismus nachweisbar.

Tab. 9: Spenderchimärismus aller acht Patienten an Tag +30.

Angegeben sind die Anteile der residualen Empfängerhämatoopoese am Chimärismus in Prozent (% Empf.) an Tag +30. Bis auf eine Ausnahme in der ATG-Gruppe war bei allen Patienten bereits an Tag +30 ein Chimärismus mit einem Spenderanteil von über 95 Prozent nachweisbar. Patient 4 erreichte diesen erst an Tag +90.

	ATG				Kein Antikörper			
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Chimärismus Tag +30 (% Empf)	0	2	0	33	0	2	3	5

Zusätzlich wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem erstmals das Engraftment für die neutrophilen Granulozyten ($> 5 \times 10^9$ Zellen/l an zwei konsekutiven Tagen) bzw. für die Thrombozyten ($> 20 \times 10^9$ Zellen/l) festzustellen war. Sowohl bei den mit ATG behandelten Patienten als auch in der Gruppe ohne Antikörpertherapie war das mediane Engraftment der Neutrophilen jeweils vor Tag +15 messbar. Die Rekonstitution der Thrombozyten erfolgte im Median in beiden Gruppen an Tag +12. (Tab. 10)

Tab. 10: Zeitpunkte des neutrophilen und thrombozytären Engraftments.

Beide Gruppen erreichten das neutrophile Engraftment im Median vor Tag +15, die Rekonstitution der Thrombozyten stellte sich in beiden Patientengruppen vor Tag +12 ein. Alle Angaben in Tagen.

	ATG	Kein Antikörper
Engraftment, d (Median)		
Neutrophile	14 - 17 (15)	12 - 14 (12)
Thrombozyten	11 - 19 (12)	11 - 12 (11)

3.3 Immunzellrekonstitution

Zur Bestimmung des zellulären Immunstatus wurden alle kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes analysiert. Zu diesen Zellen gehören Granulozyten, Monozyten sowie Lymphozyten. Mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer wurden die Leukozyten zunächst insgesamt manuell ausgezählt und anschließend mittels FACS einer Subpopulationsanalyse unterzogen. (siehe 2.2) Hierzu wurden die entsprechenden Antikörper eingesetzt, um den Gehalt von $CD3^+$ T-Zellen, $CD19^+$ B-Lymphozyten, $CD4^+$ Th-Zellen, $CD8^+$ cT-Zellen und $CD16/56^+$ NK-Zellen zu bestimmen. Der Panleukozytenmarker CD45 diente zur Analyse aller Leukozyten mittels FACS. In *Tabelle 11* sind in einer Übersicht die Normwerte für den allgemeinen zellulären Immunstatus zusammengefasst.

Tab. 11: Normwerte für den allgemeinen zellulären Immunstatus.

[in Anlehnung an: http://www1.medizin.unihalle.de/imi/download/vorlesungsscripte/BioChem2007/Praktikum_2007.pdf;
http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/b/Blutbild_gross.htm]

absolute Zellzahlen (Zellen/ μ l)		
Leukozyten	CD45	4000 - 10000
Monozyten	CD14+	180 - 550
Granulozyten		2000 - 7000
NK-Zellen	CD16/ 56+	100 - 500
B-Lymphozyten	CD19+	90 - 350
T-Lymphozyten	CD3+	900 - 2000
Th-Zellen	CD4+	600 - 1000
cT-Zellen	CD8+	400 - 800
CD4/ CD8-Ratio		0,9 - 2,5

Die Verläufe der Rekonstitution der Zellzahlen der jeweiligen Zellpopulationen wurden in Form von Boxplots dargestellt. (Abb.6-12 und 16-18) Die horizontale Linie in jeder Box repräsentiert dabei den jeweiligen Median. Die Anker ober- und unterhalb zeigen die 95%-Konfidenzintervalle.

3.3.1 CD45⁺ Leukozyten

Die so genannten weißen Blutkörperchen werden morphologisch den roten Blutkörperchen, den Erythrozyten, gegenübergestellt. Mit Hilfe des Differentialblutbildes wird die genaue Zusammensetzung der Leukozytenpopulation untersucht. Die Leukozyten umfassen neben den Granulozyten (50-65%) und Monozyten (5-10%) auch die Lymphozyten mit einem relativen Anteil von normalerweise 20 bis 40%. Dabei entspringen die Lymphozyten der lymphatischen und die Monozyten und Granulozyten der myeloischen Zellreihe. Letztere bildet vor allem das unspezifische bzw. angeborene Immunsystem, während die Lymphozyten für die spezifische Immunität verantwortlich sind. [Segal 2005; Strauss-Ayali et al. 2007] Alle Leukozyten haben ein transmembranöses Glykoprotein gemeinsam, den Panleukozytenmarker CD45. Er wird von allen hämatopoetischen Zellen, mit Ausnahme der Erythrozyten und Thrombozyten in großer Dichte exprimiert und spielt vor allem für die Regulierung der Signaltransduktion im Rahmen der Zellaktivierung eine wichtige Rolle. Außerdem wird er in der FACS-Analyse zur Identifizierung der Leukozytenpopulationen verwendet. [Trowbridge 1991]

Der Verlauf der Rekonstitution der CD45⁺ Leukozyten verhielt sich in beiden Gruppen sehr ähnlich. (Abb. 6) Vor Beginn der Therapie sowie ab Tag +30 nach Durchlaufen des Nadirs und erfolgtem Engraftment (siehe 3.2) befanden sich die medianen Leukozytenzahlen im unteren Normbereich (> 4000 Zellen/ μ l). Vor Therapiebeginn zeigten beide Gruppen ähnliche mediane Leukozytenzahlen (ATG: 3725 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 4300 Zellen/ μ l), auch zu erkennen an der Lage der Mediane im Boxplot. (Abb. 6) Im weiteren Verlauf fielen in der ATG-Gruppe an allen Messtagen geringere Zellzahlen auf. Vor allem an den Tagen +30 und +60 waren in der Kein Antikörper-Gruppe doppelt so hohe Leukozytenzahlen nachweisbar. An Tag +150 wurden in der Kein Antikörper-Gruppe fünf Mal so hohe mediane Leukozytenzahlen (ATG: 2850 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 10850 Zellen/ μ l) gemessen mit einem großen Unterschied in den maximalen Werten (ATG: 5700 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 19100 Zellen/ μ l). An den übrigen Tagen waren die Spannweiten der Leukozytenzahlen zwischen beiden Gruppen gut vergleichbar. (Tab. 12)

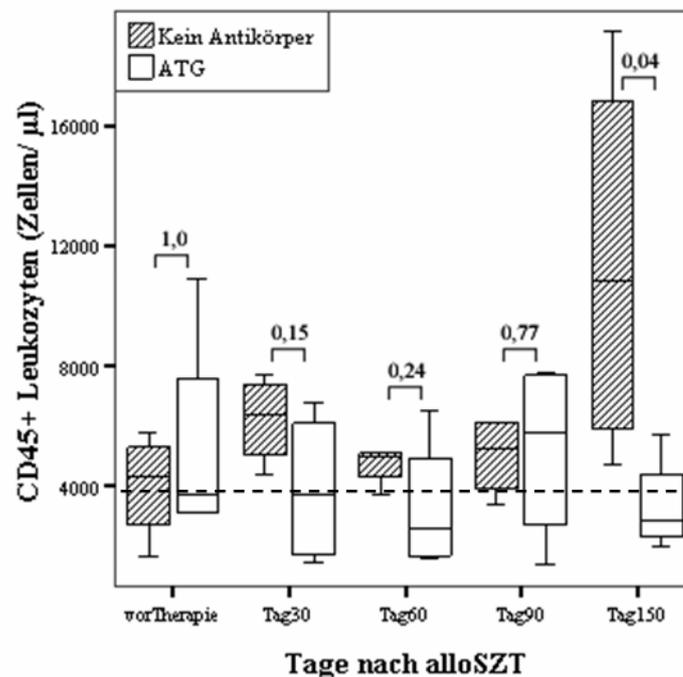


Abb. 6: Rekonstitution der CD45⁺ Leukozyten.

Vor Therapiebeginn zeigten beide Gruppen ähnliche mediane Leukozytenzahlen, während diese im weiteren Verlauf in der ATG-Gruppe mit Ausnahme von Tag +90 an allen Tagen um das zwei- bis fünffache geringer ausfielen. Außer an Tag +150 lagen die Spannweiten der Leukozytenzahlen in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der Leukozytenzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 4000 Zellen/ μ l). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 12: Zusammenfassung der CD45⁺ Leukozytenzahlen.

Vor Beginn der Therapie waren in beiden Gruppen ähnliche Leukozytenzahlen nachweisbar. An den Tagen +30 und +60 waren diese in der Kein Antikörper-Gruppe um das zweifache, am Tag +150 um das fünffache höher als in der ATG-Gruppe. Außer am Tag +150 waren die Spannweiten der Leukozytenzahlen beider Gruppen an allen Messtagen gut vergleichbar. Alle Angaben in Zellen/ μ l.

Tab. 12.1: CD45⁺ Leukozyten (Zellen/ μ l) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	3725	3725	2575	5800	2850
<i>Minimum</i>	3100	1500	1600	1400	2000
<i>Maximum</i>	10900	6750	6500	7800	5700

Tab. 12.2: CD45⁺ Leukozyten (Zellen/ μ l) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	4300	6400	5000	5275	10850
<i>Minimum</i>	1650	4400	3700	3400	4700
<i>Maximum</i>	5800	7700	5100	6100	19100

CD14⁺ Monozyten. Das System der mononukleären Phagozyten ist Bestandteil des unspezifischen Immunsystems und setzt sich aus den zirkulierenden Monozyten des Blutes, aus Gewebsmakrophagen sowie spezialisierten Phagozyten wie den Kupffer-Zellen der Leber zusammen. Monozyten entstehen aus Vorläuferzellen der myeloischen Entwicklungsreihe der CD34⁺ Stammzellen. Im Gewebe differenzieren sie zu Makrophagen und entwickeln so Phagozytose-Eigenschaften. Durch die Wirkung ihrer Zytokine (IL-1, TNF- α) induzieren Monozyten vor allem proinflammatorische Reaktionen. Opsonierte, d.h. Komplement- oder Antikörper-beladene Antigene werden durch Monozyten phagozytiert und intrazellulär lysiert. Auf ihrer Oberfläche exprimieren Monozyten verschiedene Epitope wie LFA-1 und CD14, von denen letzteres dazu verwendet wird Monozyten in der FACS-Analyse zu identifizieren. [Strauss-Ayali et al. 2007]

Vor Beginn der Therapie waren in den Blutproben der ATG-Patienten doppelt so hohe mediane Monozytenzahlen wie in denen der Kein Antikörper-Gruppe messbar (ATG: 730 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 395 Zellen/ μ l). Im Verlauf wurden in beiden Gruppen vergleichbare mediane Zellzahlen an allen Messtagen nachgewiesen, mit Ausnahme von Tag +150. Hier erreichten die Patienten der Kein Antikörper-Gruppe rund drei Mal höhere Zellzahlen (ATG: 280 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 775 Zellen/ μ l).

An den Tagen +30 bis +90 wiesen neben den medianen Zellzahlen auch die Spannweiten beider Gruppen vergleichbare Niveaus auf. Während der gesamten Posttransplantationsphase wurden in beiden Patientengruppen normale Monozytenzahlen gemessen. (Abb. 7 und Tab. 13)

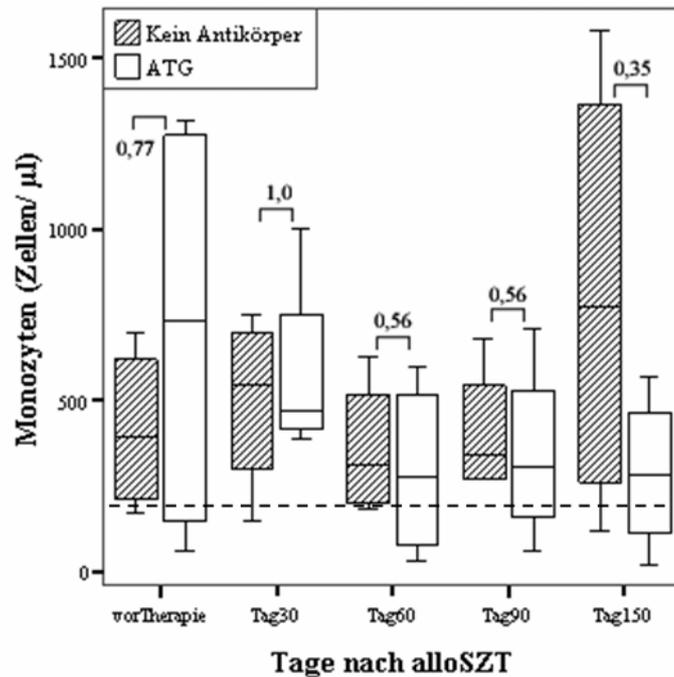


Abb. 7: Rekonstitution der $CD14^+$ Monozyten.

Vor Beginn der Konditionierung wiesen die Patienten der ATG-Gruppe im Median höhere $CD14^+$ Monozytenzahlen auf. Mit Ausnahme von Tag +150 waren die Zellzahlen beider Gruppen sowohl im Median als auch in ihren Spannweiten vergleichbar. Bereits ab Tag +30 waren bei den Patienten beider Gruppen erneut Monozytenzahlen im Normbereich nachweisbar. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der Monozytenzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 180 Zellen/ μ l). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 13: Zusammenfassung der $CD14^+$ Monozytenzahlen.

Vor Therapiebeginn waren in der ATG-Gruppe doppelt so hohe Monozytenzahlen wie in der Kein Antikörper-Gruppe nachweisbar. Außer an Tag +150 zeigten die Mediane und Spannweiten der monozytären Zellzahlen in beiden Gruppen während der gesamten Posttransplantationsphase ähnliche Niveaus. Alle Angaben in Zellen/ μ l.

Tab. 13.1: $CD14^+$ Monozyten (Zellen/ μ l) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	730	470	275	305	280
Minimum	60	390	30	60	20
Maximum	1320	1000	600	710	570

Tab. 13.2: CD14⁺ Monozyten (Zellen/ μ l) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	395	545	310	340	775
<i>Minimum</i>	170	150	180	270	120
<i>Maximum</i>	700	750	630	680	1580

Neutrophile Granulozyten. Mit einem Anteil von 50 bis 65 % machen die neutrophilen Granulozyten den größten Anteil der CD45⁺ Leukozyten aus. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und bilden durch ihre phagozytierenden Eigenschaften zusammen mit den Monozyten die erste Barriere beispielsweise für körperfremde Antigene. Über verschiedene Mechanismen wie Lysozym und Defensine, so genannte antimikrobielle Proteine, oder sauerstoffabhängige Abwehrmechanismen dienen Granulozyten in der Peripherie vor allem der Bekämpfung von bakteriellen und Pilzinfektionen. Nach ihrer Aktivierung haben neutrophile Granulozyten eine mittlere Überlebensdauer von sechs bis acht Stunden. [Segal 2005]

Die medianen neutrophilen Granulozytenzahlen zeigten vor Therapiebeginn vergleichbare Ausgangsniveaus (ATG: 2440 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 3180 Zellen/ μ l; $p=0,77$). Nach der Transplantation waren ähnliche mediane Granulozytenzahlen in beiden Gruppen an den Tagen +30 (ATG: 2860 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 3380 Zellen/ μ l) und +90 (ATG: 3630 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 3785 Zellen/ μ l) nachweisbar. Die Spannweiten der granulozytären Zellzahlen waren mit Ausnahme von Tag +150 an allen Messtagen vergleichbar. An Tag +150 erreichten die ATG-Patienten sechs Mal niedrigere Granulozytenzahlen als die Patienten der Kein Antikörper-Gruppe (ATG: 1185 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 6555 Zellen/ μ l), ein Unterschied, welcher sich als signifikant herausstellte ($p=0,04$) und zusätzlich unterhalb des Normbereichs lag. Insgesamt wurden in beiden Patientengruppen normale mediane Granulozytenzahlen an allen Messtagen festgestellt. (Abb. 8 und Tab. 14)

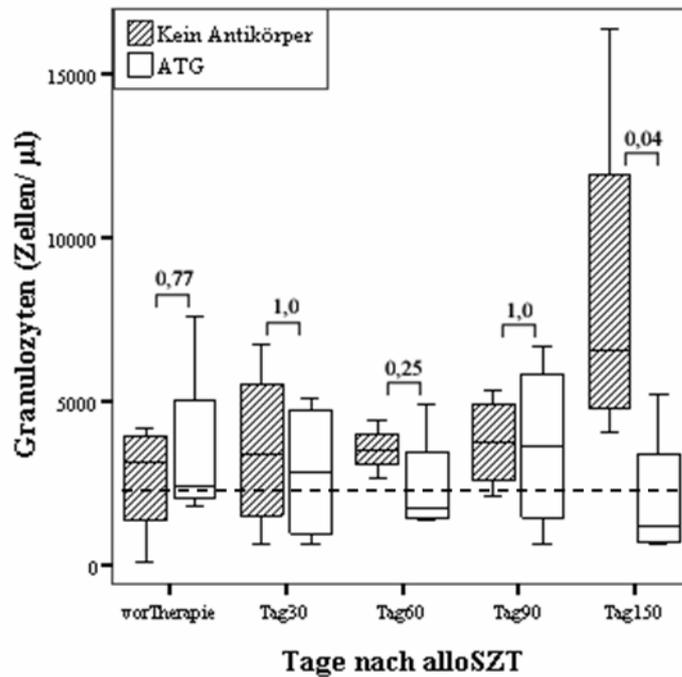


Abb. 8: Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten.

Vor Therapiebeginn zeigten beide Gruppen ähnliche mediane Granulozytenzahlen. An allen Messtagen wurden in beiden Gruppen normale Zellzahlen gemessen. Nur an Tag +150 wurden in der ATG-Gruppe signifikant niedrigere Granulozytenzahlen unterhalb der Norm nachgewiesen. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der Granulozytenzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 2000 Zellen/ μ l). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 14: Zusammenfassung der neutrophilen Granulozytenzahlen.

Vor Therapiebeginn waren in beiden Gruppen vergleichbare mediane Granulozytenzahlen nachweisbar. Außer an Tag +150 zeigten die Mediane und Spannweiten der neutrophilen Granulozytenzahlen in beiden Gruppen während der gesamten Posttransplantationsphase ähnliche Niveaus. An Tag +150 stellten sich im Median signifikant niedrigere Granulozytenzahlen in der ATG-Gruppe ein. Alle Angaben in Zellen/ μ l.

Tab. 14.1: Granulozyten (Zellen/ μ l) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	2440	2860	1770	3630	1185
Minimum	1840	650	1390	680	650
Maximum	7580	5120	4930	6680	5260

Tab. 14.2: Granulozyten (Zellen/ μ l) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	3180	3380	3555	3785	6555
Minimum	110	640	2700	2110	4060
Maximum	4200	6780	4420	5370	16360

3.3.2 CD16/56⁺ NK-Zellen

Die CD16/56⁺ NK-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Anders als T-Lymphozyten sind sie in der Lage Tumorzellen oder körperfremde Antigene ohne vorherige Aktivierung zu lysieren. Diese Lyse kann über die Sekretion von Perforinen und Zytokinen, die Apoptoseaktivierung über das Fas-Rezeptor/Fas-Ligand-System (CD95) oder im Rahmen einer Antikörperabhängigen Zytotoxizität durch oberflächlich gebundene Antikörper erfolgen (Antibody dependent cytotoxicity, ADCC). Die Steuerung dieser Vorgänge unterliegt verschiedenen Killerzell-Immunglobulin ähnlichen Rezeptoren (KIRs) auf der Oberfläche der NK-Zellen. Als Liganden für die KIRs sind unter anderem HLA-Moleküle identifiziert worden. [Long 2008]

Die CD16/56⁺ NK-Zellen boten vor Beginn der Therapie innerhalb beider Gruppen im Median normale Werte (> 100 Zellen/ μ l) und zeigten im gesamten weiteren Verlauf Werte im Normbereich. (Abb. 9) Bereits ab Tag +30 konnten erneut Normalwerte in den Patienten beider Gruppen nachgewiesen werden (ATG: 245 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 265 Zellen/ μ l). Im weiteren Verlauf blieben die Werte bis zum Tag +150 (ATG: 130 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 155 Zellen/ μ l) innerhalb des Referenzbereichs, wobei die medianen Zellzahlen in der ATG-Gruppe stets geringere Werte erreichten. Bis auf Tag +60 erreichten die Mediane der NK-Zellzahlen beider Gruppen an allen Messtagen vergleichbare Niveaus. Die Spannweiten der Zellzahlen zeigten an allen Messtagen eine ähnliche Tendenz. (Tab. 15)

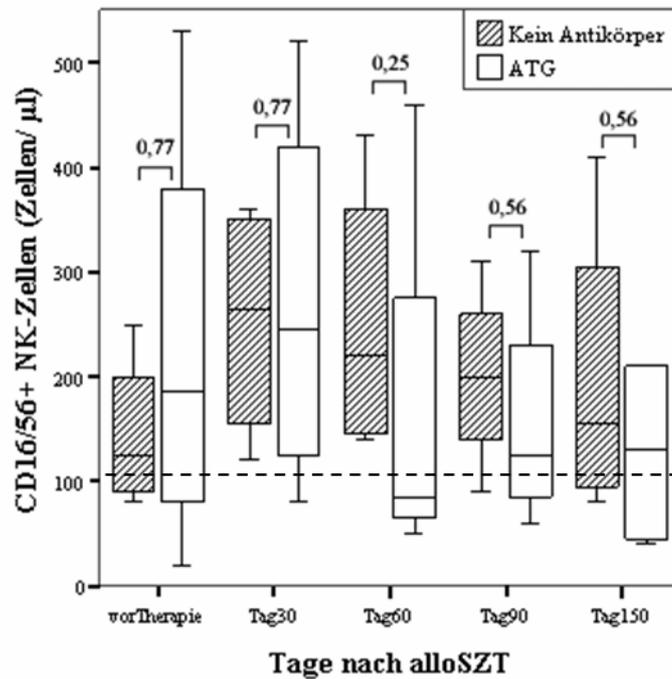


Abb. 9: Rekonstitution der CD16/56⁺ NK-Zellen.

Vor Therapiebeginn und während des gesamten weiteren Verlaufes lagen die medianen CD16/56⁺ NK-Zellzahlen im Normbereich mit geringeren Werten in der ATG-Gruppe an allen Messtagen. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der NK-Zellzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 100 Zellen/µl). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 15: Zusammenfassung der CD16/56⁺ NK-Zellzahlen.

Vor Therapiebeginn und während des gesamten Verlaufes nach der Transplantation waren in beiden Gruppen normale mediane NK-Zellzahlen nachweisbar. Mit Ausnahme von Tag +60 erreichten die Mediane der NK-Zellzahlen beider Gruppen vergleichbare Niveaus an allen Messtagen und die Spannweiten der Zellzahlen zeigten ähnliche Tendenzen. Alle Angaben in Zellen/µl.

Tab. 15.1: CD16/56⁺ NK-Zellen (Zellen/µl) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	185	245	85	125	130
Minimum	20	80	50	60	40
Maximum	530	520	460	320	210

Tab. 15.2: CD16/56⁺ NK-Zellen (Zellen/µl) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	125	265	220	200	155
Minimum	80	120	140	90	80
Maximum	250	360	430	310	410

3.3.3 CD19⁺ B-Zellen

Die CD19⁺ B-Lymphozyten bedingen eine spezifische Immunabwehr auf humoraler Ebene, indem sie antigenspezifische Antikörper bilden. Diese binden mit ihrem Fab-Segment an spezielle Epitope und leiten so eine Komplementaktivierung oder anschließende Phagozytose der entsprechenden Antigene ein. Durch die Bildung von CD20⁺ Memory-B-Zellen sind sie wesentlich an der Entwicklung des Immungedächtnisses beteiligt. [Moura et al. 2008]

Eine Auswertung der CD19⁺ B-Zellzahlen für beide Patientengruppen war im Verlauf der Analysen nur eingeschränkt möglich. Die B-Zellzahlen für die ATG-Gruppe konnten aufgrund zahlreicher Fehlwerte nicht verwertet werden und sind deshalb nicht abgebildet. Patienten der Kein Antikörper-Gruppe erreichten im gesamten Verlauf der Beobachtung B-Zellzahlen unterhalb des Normbereiches (< 90-350 Zellen/ μ l). Lediglich am Tag +150 wurde ein normaler medianer Wert (134 Zellen/ μ l) beobachtet. (Tab. 16)

Tab. 16: Zusammenfassung der CD19⁺ B-Zellzahlen (Kein Antikörper).

Die Auswertung und Darstellung der CD19⁺ B-Zellzahlen im Verlauf wurde aufgrund zahlreicher Fehlwerte innerhalb der ATG-Gruppe lediglich auf die Kein Antikörper-Gruppe beschränkt. Einzig an Tag +150 wurde in dieser Gruppe ein medianer Wert im Normbereich festgestellt. Alle Angaben in Zellen/ μ l.

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	36	8	26	39,5	134
Minimum	17	2	2	16	55
Maximum	84	11	36	69	141

3.3.4 CD3⁺ T-Lymphozyten

Die CD3⁺ T-Lymphozyten, welche sowohl die CD4⁺ Th-Zellen als auch die CD8⁺ cT-Zellen umfassen, bilden neben den CD19⁺ B-Lymphozyten die Haupteffektorzellen des spezifischen, adaptiven Immunsystems. Ihnen obliegt die Regulierung der zellulären Immunabwehr. T-Lymphozyten entstehen im Rahmen der so genannten Thymopoese im Thymus aus Thymozyten. Dort findet neben einer positiven (gegen körperfremde Antigene) und negativen (gegenüber Autoantigenen) Selektion über die Stadien der doppelt negativen (CD4⁻/ CD8⁻) und doppelt positiven (CD4⁺/ CD8⁺) Thymozyten die Entwicklung zur reifen einfach positiven CD4⁺ Th- oder CD8⁺ cT-Zelle statt.

Diese naiven T-Lymphozyten emigrieren in die Peripherie und zirkulieren bis zu einem eventuellen Antigenkontakt außerhalb der lymphatischen Organe. [Haynes et al. 2000; Kabouridis und Jury 2008]

Die Rekonstitution der CD3⁺ T-Lymphozyten bot in beiden Patientengruppen einen ähnlichen Verlauf. (Abb. 10) Während vor der Therapie die medianen T-Zellzahlen für beide Gruppen im unteren Normbereich lagen (ATG: 820 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 930 Zellen/ μ l), wurde im weiteren Verlauf eine ausgeprägte Zytopenie der CD3⁺ T-Lymphozyten in der frühen Rekonstitutionsphase (Tag +30 bis +90) in beiden Gruppen beobachtet. Die mit ATG behandelten Patienten entwickelten bis Tag +150 im Median keine normalen T-Zellzahlen (> 900 Zellen/ μ l). Patienten der Kein Antikörper-Gruppe erreichten bereits an Tag +90 niedrignormale Werte (860 Zellen/ μ l) bis sich am Tag +150 mediane T-Zellzahlen im Normbereich (1180 Zellen/ μ l) einstellten. Die Spannweiten der T-Zellzahlen bewegten sich an allen Messtagen auf vergleichbaren Niveaus. (Tab. 17)

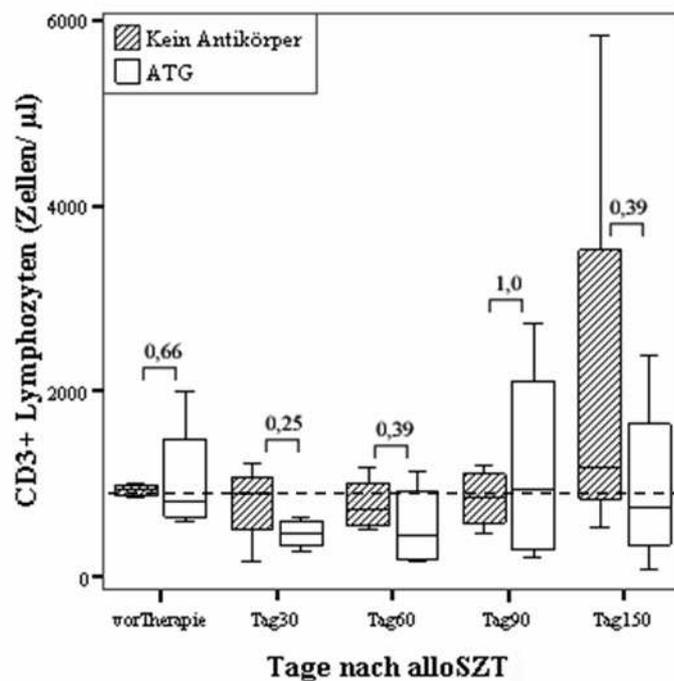


Abb. 10: Rekonstitution der CD3⁺ T-Lymphozyten.

Die Rekonstitution der CD3⁺ T-Lymphozyten bot in beiden Patientengruppen einen ähnlichen Verlauf. Vor Therapiebeginn und im weiteren Verlauf der Untersuchung befanden sich die medianen CD3⁺ T-Zellzahlen einschließlich ihrer Spannweiten an allen Messtagen auf vergleichbaren Niveaus. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der CD3⁺ T-Zellzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 900 Zellen/ μ l). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 17: Zusammenfassung der CD3⁺ T-Zellzahlen.

Vor Therapiebeginn sowie im weiteren Verlauf waren in beiden Patientengruppen an fast allen Messtagen ähnliche CD3⁺ T-Lymphozytenzahlen nachweisbar. An den Tagen +30 und +60 erreichten die Patienten der Kein Antikörper-Gruppe im Median doppelt so hohe T-Zellzahlen im Vergleich zur ATG-Gruppe. Alle Angaben in Zellen/ μ l.

Tab. 17.1: CD3+ Lymphozyten (Zellen/ μ l) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	820	475	445	935	755
<i>Minimum</i>	600	280	170	210	80
<i>Maximum</i>	2000	630	1140	2720	2380

Tab. 17.2: CD3+ Lymphozyten (Zellen/ μ l) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	930	885	725	860	1180
<i>Minimum</i>	850	160	500	460	520
<i>Maximum</i>	1000	1210	1180	1190	5830

CD4⁺ T-Helferzellen. Im Rahmen eines Antigenkontaktes präsentieren APCs über ihre MHC II-Moleküle (Major Histokompatibilitätskomplex) den CD4⁺ Th-Zellen Peptide. Diese aktivieren daraufhin Makrophagen, NK-Zellen oder B-Zellen über die Sekretion bestimmter Mediatoren, wie Interleukinen und Interferonen. Die Immunantwort kann durch eine bestimmte Zusammensetzung dieses Zytokinmilieus pro- oder antiinflammatorischen Charakter erhalten. [Kabouridis und Jury 2008]

Bereits vor der Therapie zeigten sich in beiden Patientengruppen subnormale CD4⁺ Th-Zellzahlen (< 600 Zellen/ μ l). Die Mediane beider Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant unterschiedlich (p=0,149). Während des gesamten Beobachtungszeitraums erreichten die medianen CD4⁺ Th-Zellzahlen in beiden Gruppen nicht den Normbereich. (Abb. 11) Diese verliefen innerhalb der ATG-Gruppe an allen posttherapeutischen Messtagen unterhalb derer aus der Kein Antikörper-Gruppe und erreichten am Tag +30 achtzehn Mal niedrigere Werte (ATG: 20 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 360 Zellen/ μ l; p=0,081). Patienten der ATG-Gruppe erreichten bis Tag +150 nur ein Zehntel (ATG: 70 Zellen/ μ l vs. Kein Antikörper: 270 Zellen/ μ l) der Zellzahlen in der Kein Antikörper-Gruppe, ein Unterschied, welcher sich an den Tagen +60 (p=0,04), +90 (p=0,02) und +150 (p=0,04) als statistisch signifikant herausstellte. (Abb. 11 und Tab. 18)

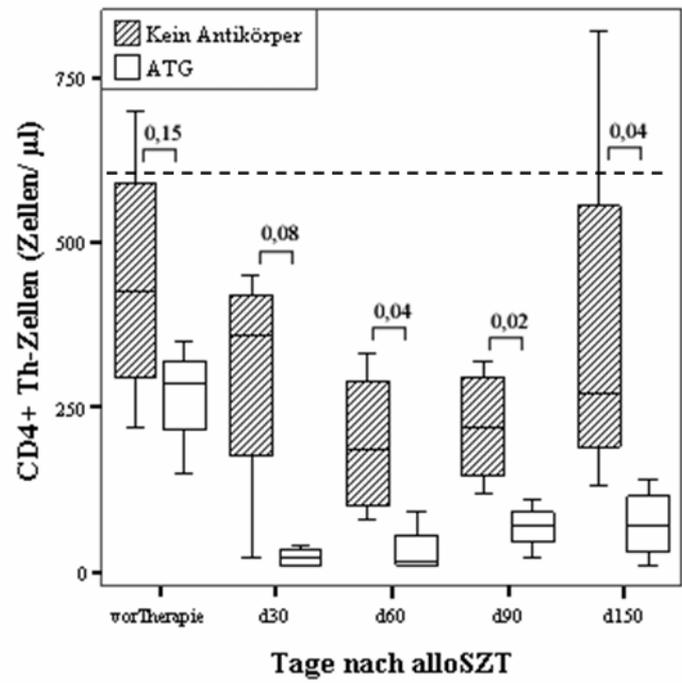


Abb. 11: Rekonstitution der CD4⁺ Th-Zellen.

Vor Therapiebeginn und während des gesamten Verlaufes erreichten die medianen Th-Zellzahlen beider Gruppen keine Normalwerte. Die Th-Zellzahlen innerhalb der ATG-Gruppe waren an den Tagen +60, +90 und +150 statistisch signifikant niedriger als die der Kein Antikörper-Gruppe. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der CD4⁺ Th-Zellzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 600 Zellen/µl). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 18: Zusammenfassung der CD4⁺ Th-Zellzahlen.

Vor Beginn der Therapie lagen die Mediane der CD4⁺ Th-Zellzahlen beider Gruppen nahe beieinander. Im weiteren Verlauf stellten sich in der ATG-Gruppe an allen Messtagen niedrigere Zellzahlen als in der Kein Antikörper-Gruppe ein. An keinem Tag erreichten die medianen Th-Zellzahlen normale Werte. Alle Angaben in Zellen/µl.

Tab. 18.1: CD4⁺ (Zellen/µl) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	285	20	15	70	70
Minimum	150	10	10	20	10
Maximum	350	40	90	110	140

Tab. 18.2: CD4⁺ (Zellen/µl) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	425	360	185	220	270
Minimum	220	20	80	120	130
Maximum	700	450	330	320	820

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Die CD8⁺ cT-Zellen erkennen Komplexe aus fremdem Peptid und Klasse I MHC-Molekülen auf infizierten bzw. malignen Zellen und induzieren eine aktivierungsabhängige Lyse oder Apoptose über die Sekretion von Perforinen oder Zytokinen. Die Regulierung der CD8⁺ Immunantwort wird unter anderem über Th-Zellen und T_{reg} reguliert. [Kabouridis und Jury 2008]

Auch für die CD8⁺ cT-Zellen wurden in beiden Patientengruppen vor Beginn der Therapie mediane Zellzahlen unterhalb der Norm festgestellt (< 400 Zellen/ μ l). Diese entwickelten nach der Transplantation bis Tag +150 normale Werte. (Abb. 12) Die Patienten ohne ATG wiesen bereits an Tag +90 niedrignormale mediane cT-Zellzahlen (395 Zellen/ μ l) auf. In der ATG-Gruppe stellte sich eine Normalisierung der medianen Zellzahlen (520 Zellen/ μ l) am Tag +150 ein. Während des gesamten Verlaufes zeigten neben den Medianen auch die Spannweiten der CD8⁺ cT-Zellzahlen ähnliche Trends in beiden Gruppen. (Tab. 19)

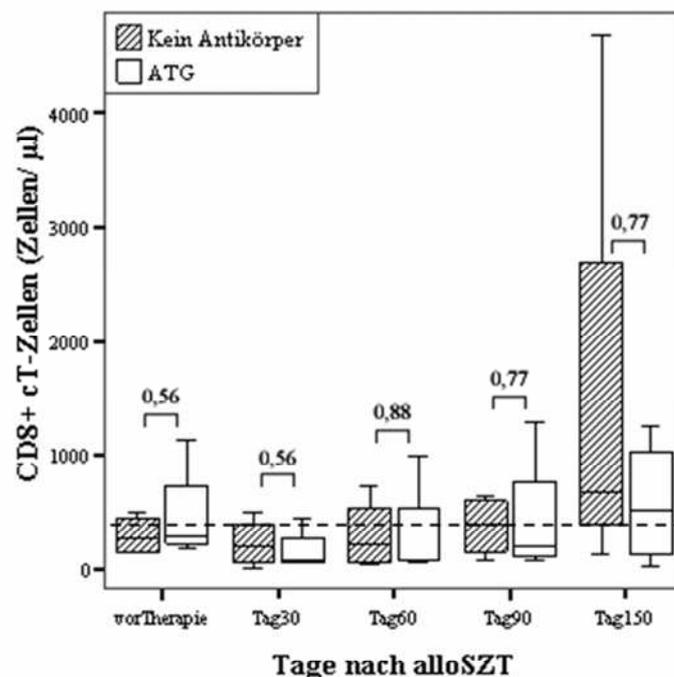


Abb. 12: Rekonstitution der CD8⁺ cT-Zellen.

Vor Therapiebeginn und im weiteren Verlauf zeigten die CD8⁺ cT-Zellzahlen in beiden Patientengruppen ähnliche Werte. Patienten der Kein Antikörper-Gruppe erreichten erstmals an Tag +90 normale Werte. Die ATG-Gruppe bot diese erstmals an Tag +150. Die gestrichelte Linie entspricht der unteren Grenze des Normbereichs der CD8⁺ cT-Zellzahlen im normalen zellulären Immunstatus (> 400 Zellen/ μ l). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 19: Zusammenfassung der CD8⁺ cT-Zellzahlen.

Vor Therapiebeginn und im weiteren Verlauf zeigten die medianen CD8⁺ cT-Zellzahlen einschließlich ihrer Spannweiten in beiden Patientengruppen ähnliche Werte. In der Kein Antikörper-Gruppe waren normale Zellzahlen erstmals an Tag +90, in der ATG-Gruppe an Tag +150 nachweisbar. Alle Angaben in Zellen/μl.

Tab. 19.1: CD8+ (Zellen/μl) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	295	80	85	200	520
<i>Minimum</i>	190	60	60	70	20
<i>Maximum</i>	1130	440	990	1280	1250

Tab. 19.2: CD8+ (Zellen/μl) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	270	195	215	395	675
<i>Minimum</i>	140	10	50	80	130
<i>Maximum</i>	500	500	720	630	4680

CD4/ CD8-Ratio. Die CD4/ CD8-Ratio ist eine einfache Labormethode, welche den Anteil der CD3⁺/ CD4⁺ Th- und der CD3⁺/ CD8⁺ cT-Zellen in ein Verhältnis zueinander setzt. Sie beschreibt den allgemeinen T-Zellimmunstatus und kann durch die Verschiebung des Quotienten einen Hinweis auf beispielsweise infektionsassoziierte Lymphozytopenien bieten. [Laurence 1993]

Die Mediane der CD4/ CD8-Ratio lagen vor der Therapie bei beiden Gruppen im Normbereich (ATG: 0,94 vs. Kein Antikörper: 2,2). Auch nach der Transplantation normalisierten sich diese nicht und blieben bis Tag +150 invertiert (< 0,9), wengleich die Invertierung in der ATG-Gruppe etwas stärker ausfiel (ATG: 0,24 vs. Kein Antikörper: 0,4). Einzig am Tag +30 ergab die mediane CD4/ CD8-Ratio innerhalb der Kein Antikörper-Gruppe einmalig einen normalen medianen Wert. (Tab. 20)

Tab. 20: Zusammenfassung der Werte der CD4/ CD8-Ratio.

Vor Therapiebeginn ergab die CD4/ CD8-Ratio in beiden Patientengruppen normale Werte. Nach der Transplantation blieben mit Ausnahme des Tages +30 in der Kein Antikörper-Gruppe die medianen Ratios bis zum Tag +150 in beiden Gruppen invertiert.

Tab. 20.1: CD4/ CD8-Ratio - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	0,94	0,17	0,15	0,19	0,24
<i>Minimum</i>	0,26	0,08	0,09	0,05	0,06
<i>Maximum</i>	1,1	0,62	0,21	0,48	0,57

Tab. 20.2: CD4/ CD8-Ratio - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	2,2	1,57	0,99	0,62	0,4
<i>Minimum</i>	0,44	0,67	0,34	0,48	0,17
<i>Maximum</i>	4,63	3,83	2,49	1,49	1,0

3.4 Rekonstitution der regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen exprimieren neben dem Oberflächenmolekül CD25 auch das Epitop CD4 und bilden somit eine spezielle Subpopulation der Th-Zellen. Mit Hilfe der T_{reg}-Marker foxP3 und CD127 ist eine selektive Analyse der T_{reg} möglich. Sie sind verantwortlich für die Regulierung einer Vielzahl immunologischer Prozesse. Neben der Steuerung der Immunantwort auf Eigen- und Fremdartigene, Allergene und Tumorantigene unterdrücken sie effektiv allogene Immunreaktionen (GvHD) nach allogener SZT. (siehe 1.3)

Die Menge der im Rahmen der SZT transfundierten T_{reg} war in beiden Gruppen gleich verteilt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen sowohl für die CD4⁺/ CD25⁺/ CD127^{low} als auch für die CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg}. (Tab. 8) Zu beachten ist, dass die Angabe der Zellzahlen für die T_{reg} fortführend als Anteil der CD4⁺ Th-Zellen (%Th) erfolgt.

Drei T_{reg}-Populationen wurden mit Hilfe der Marker CD4, CD25, foxP3 und CD127 identifiziert: CD4⁺/ CD25⁺/ CD127^{low/-} (Abb. 13), CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ (Abb. 14), CD25⁺/ foxP3⁺/ CD127^{low/-}. Für alle Analysen wurden die gleichen Gategrenzen verwendet. (Abb. 15)

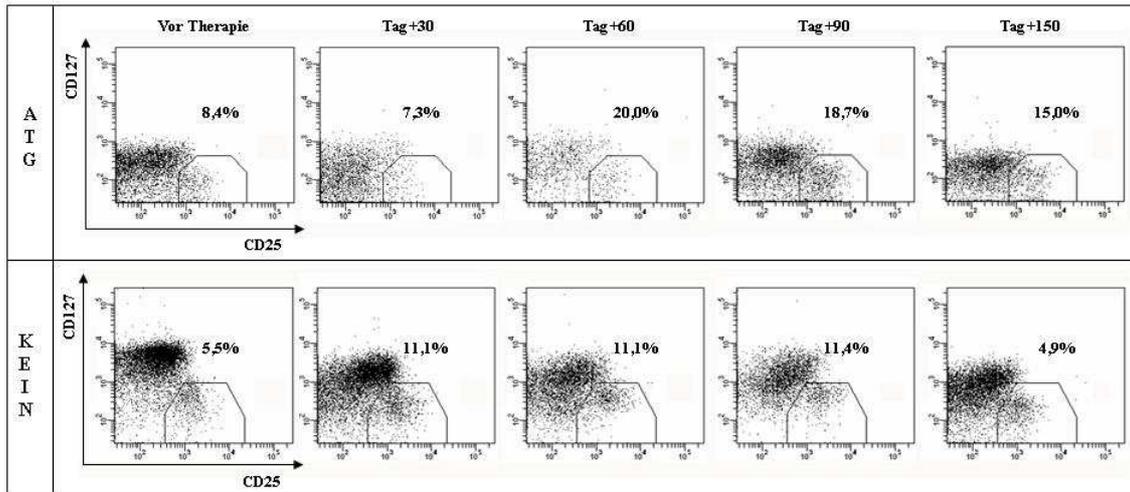


Abb. 13: FACS-Analyse der $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ von zwei Patienten.

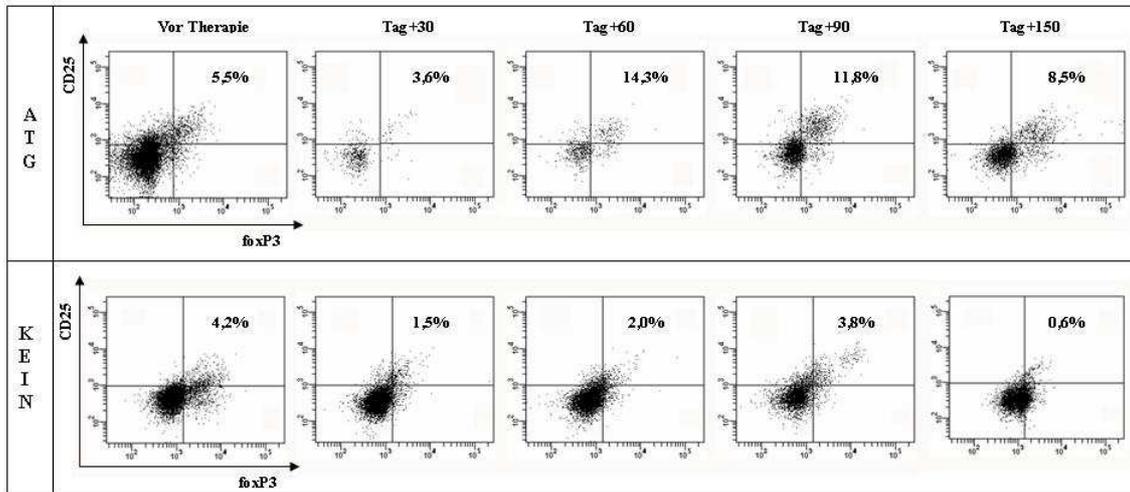


Abb. 14: FACS-Analyse der $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ von zwei Patienten.

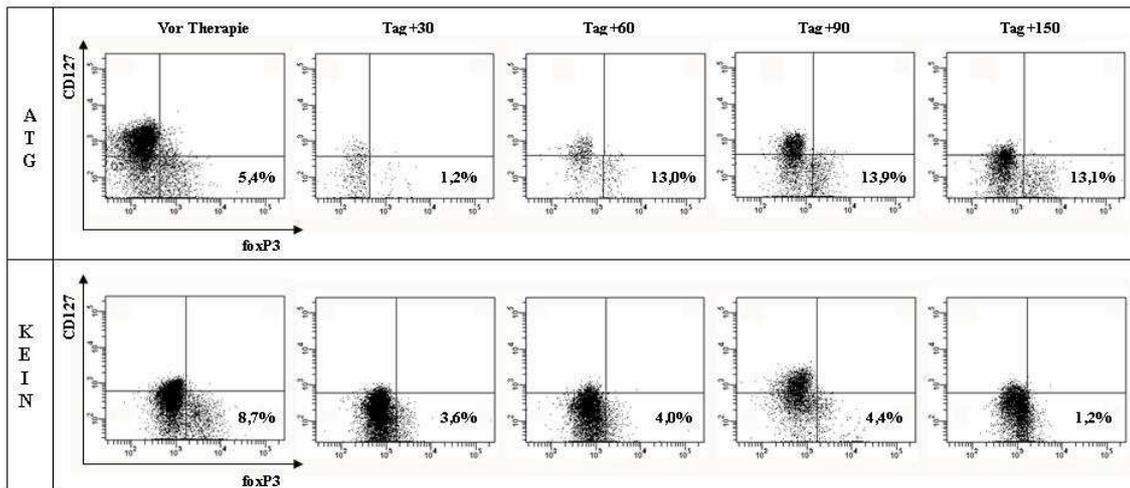


Abb. 15: FACS-Analyse der $CD25^+ / foxP3^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ von zwei Patienten.

Abb. 13-15: Angaben der T_{reg} -Zahlen für das entsprechende Gate als Anteil der $CD4^+$ Th-Zellen (%Th) sowie nach Abzug der jeweiligen Isotypkontrollen.

3.4.1 $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$

Diese T_{reg} -Population ist gekennzeichnet durch den spezifischen Marker CD127, der Alpha-Kette des IL-7-Rezeptors. Dieser wird nur sehr schwach bzw. gar nicht auf der Zelloberfläche der T_{reg} exprimiert und ermöglicht eine selektive Identifizierung von T_{reg} . (siehe 1.3)

Vor Beginn der Therapie waren in beiden Gruppen vergleichbare mediane relative Werte für die Population der $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ messbar (ATG: 8,7 %Th vs. Kein Antikörper: 7,7 %Th; $p=1,0$). Die relativen $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ -Werte in der ATG-Gruppe stiegen im Verlauf stärker an als bei Patienten, die keinen Antikörper erhalten hatten. Bereits an Tag +30 (ATG: 12 %Th vs. Kein Antikörper: 9,6 %Th; $p=0,72$) zeigte sich ein Unterschied in den medianen relativen $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ -Werten, welcher bis zum Tag +150 noch deutlicher hervortrat (ATG: 24,8 %Th vs. Kein Antikörper: 6,4 %Th). Die Unterschiede erreichten an Tag +60 statistische Signifikanz ($p=0,03$) und lagen an den Tagen +90 ($p=0,08$) und +150 ($p=0,08$) außerhalb des Signifikanzbereiches. Diese Tendenz spiegelte sich nicht nur in den medianen T_{reg} -Zahlen sondern auch im Verlauf der maximalen und minimalen Werte beider Gruppen wieder. (Abb. 16 und Tab. 21)

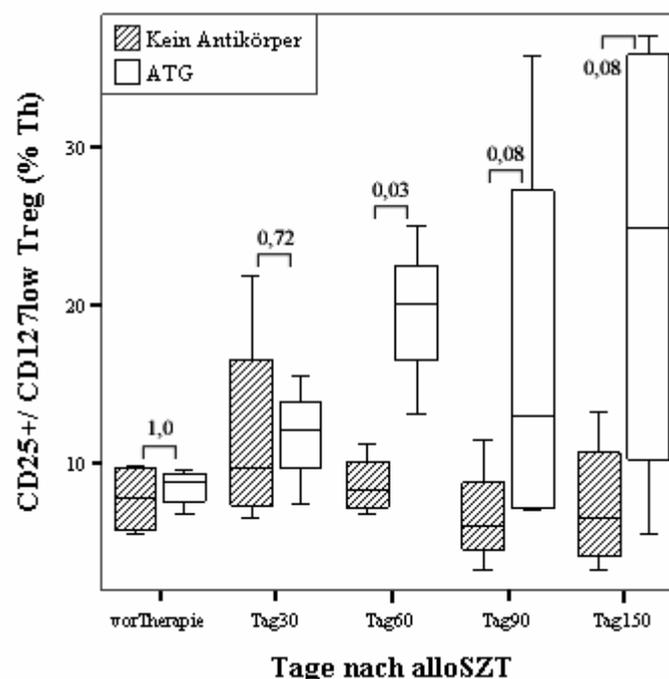


Abb. 16: Rekonstitution der $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$

Vor Therapiebeginn waren in beiden Patientengruppen vergleichbare mediane relative $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ -Zahlen nachweisbar. Bereits ab Tag +30 stellte sich ein Unterschied mit höheren relativen T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe ein, welcher bis zum Tag +150 noch deutlicher hervortrat. Am Tag +60 erreichte der Unterschied statistische Signifikanz ($p=0,03$). Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 21: Zusammenfassung der Zahlen der $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$.

Vor Beginn der Therapie wiesen beide Gruppen vergleichbare mediane relative $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ -Zahlen auf. Ab Tag +30 stellte sich ein Unterschied mit höheren medianen T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe ein, welcher sich bis Tag +150 verstärkte. Die Minima und Maxima der jeweiligen Messtage zeigten eine vergleichbare Tendenz. Alle Angaben als Anteil der $CD4^+$ Th-Zellen (%Th).

Tab. 21.1: $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ (%Th) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	8,7	12,0	20,0	12,9	24,8
Minimum	6,6	7,3	13,0	7,0	5,4
Maximum	9,5	15,5	24,9	35,7	37,0

Tab. 21.2: $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ (%Th) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	7,7	9,6	8,3	5,9	6,4
Minimum	5,5	6,4	6,7	3,2	3,2
Maximum	9,7	21,8	11,1	11,4	13,2

3.4.2 $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$

Diese T_{reg} -Population kennzeichnet sich durch den intrazellulären Transkriptionsfaktor foxP3. Für die Immunfärbung des intrazellulären Markers mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper ist eine vorherige Permeabilisierung der Zellmembran der T_{reg} nötig. (siehe 2.2.5)

Vor Beginn der Therapie erreichten die relativen Zahlen der $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ in beiden Patientengruppen vergleichbare Werte (ATG: 4,3 %Th vs. Kein Antikörper: 4,9 %Th; $p=0,77$). In der Spanne der T_{reg} -Zahlen waren beide Gruppen ebenso gut vergleichbar und boten ähnliche Ausgangsniveaus (ATG: 2,0–9,5 %Th vs. Kein Antikörper: 0,8–11,9 %Th). Ein Unterschied in den medianen $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ -Zahlen war erstmals ab Tag +60 sichtbar (ATG: 11,5 %Th vs. Kein Antikörper: 2,1 %Th) mit fünf Mal höheren Werten in der ATG-Gruppe. Im weiteren Verlauf stellten sich ähnlich den $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-} T_{reg}$ im Median höhere Zellzahlen bis Tag +150 ein (ATG: 8,5 %Th vs. Kein Antikörper: 4,0 %Th). An diesem Messtag waren die Mediane der relativen $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ -Zahlen in der ATG-Gruppe doppelt so hoch. Die beobachteten Unterschiede lagen an den Tagen +60 ($p=0,07$), +90 ($p=0,05$) und +150 ($p=0,07$) außerhalb des Signifikanzniveaus. Die Minima und Maxima der T_{reg} -Zahlen an den einzelnen Messtagen zeigten einen ähnlichen Verlauf. (Abb. 17 und Tab. 22)

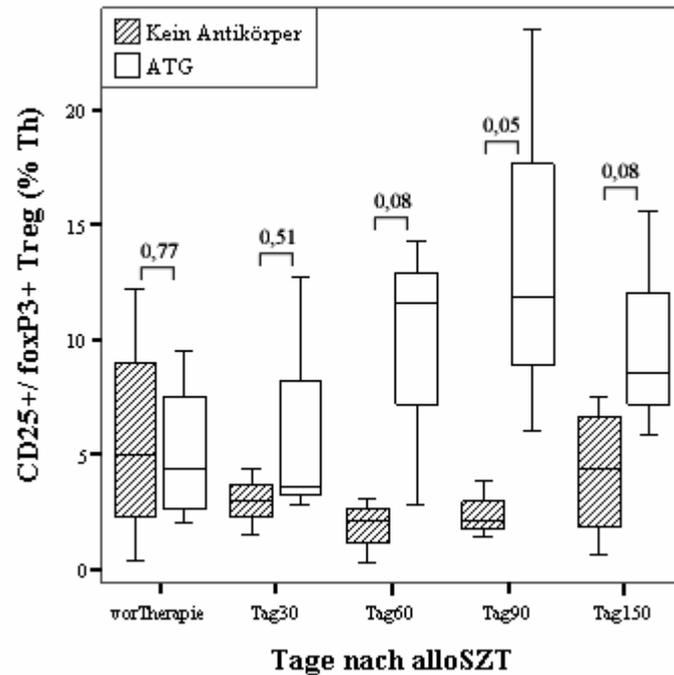


Abb. 17: Rekonstitution der $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$

Vor Beginn der Therapie zeigten beide Gruppen vergleichbare mediane $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ -Zahlen. Ab Tag +60 stellte sich ein Unterschied mit höheren relativen T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe ein, welcher bis zum Tag +150 nachweisbar war. Dieser lag an den Tagen +60 bis +150 knapp oberhalb des Signifikanzniveaus. Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 22: Zusammenfassung der Zahlen der $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$

Vor Therapiebeginn boten beide Gruppen vergleichbare relative $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ -Zahlen. Ab Tag +60 stellte sich ein Unterschied mit fünf Mal höheren medianen T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe ein. Dieser blieb bis Tag +150 nachweisbar. An diesem Tag wurden in der ATG-Gruppe doppelt so hohe mediane Werte im Vergleich zur Kein Antikörper-Gruppe beobachtet. Die Spannweiten der jeweiligen Messtage zeigten einen ähnlichen Verlauf. Alle Angaben als Anteil der $CD4^+$ Th-Zellen (%Th).

Tab. 22.1: $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ (%Th) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	4,3	3,6	11,5	11,8	8,5
Minimum	2,0	2,8	2,8	6,0	5,8
Maximum	9,5	12,7	14,3	23,4	15,6

Tab. 22.2: $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ (%Th) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
Median	4,9	3,0	2,1	2,1	4,4
Minimum	0,4	1,4	0,3	1,4	0,6
Maximum	12,2	4,4	3,1	3,8	7,5

3.4.3 $CD25^+/foxP3^+/CD127^{low/-}$ T_{reg}

Diese T_{reg} -Population ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein des intrazellulären Markers foxP3 bei gleichzeitig schwacher bzw. fehlender Expression des Oberflächenmoleküls CD127. Diese Kombination stellt eine der aktuell selektivsten Möglichkeiten der Identifizierung von T_{reg} dar. Für ihre Messung ist ein Lyseschritt im Rahmen der Immunfärbung des intrazellulären foxP3 notwendig. (siehe 2.2.5)

Die $CD25^+/CD127^{low/-}/foxP3^+$ T_{reg} zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die beiden bereits beschriebenen T_{reg} -Populationen. Vor der Therapie waren in beiden Gruppen ähnliche Niveaus der Mediane der relativen $CD25^+/CD127^{low/-}/foxP3^+$ T_{reg} -Zahlen nachweisbar (ATG: 5,9 %Th vs. Kein Antikörper: 8,4 %Th; $p=0,29$). Im Verlauf stellten sich ab Tag +60 Unterschiede in Richtung höherer medianer T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe bis Tag +150 ein (ATG: 15,5 %Th vs. Kein Antikörper: 4,0 %Th; $p=0,15$). Diese waren nicht so deutlich anhand der Minima und Maxima an den einzelnen Tagen zu beobachten, wie in den beiden zuvor beschriebenen T_{reg} -Populationen. Vor allem an den Tagen +90 und +150 war der Unterschied nicht mehr deutlich sichtbar. Die Unterschiede erreichten in dieser Population zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz. (Abb. 18 und Tab. 23)

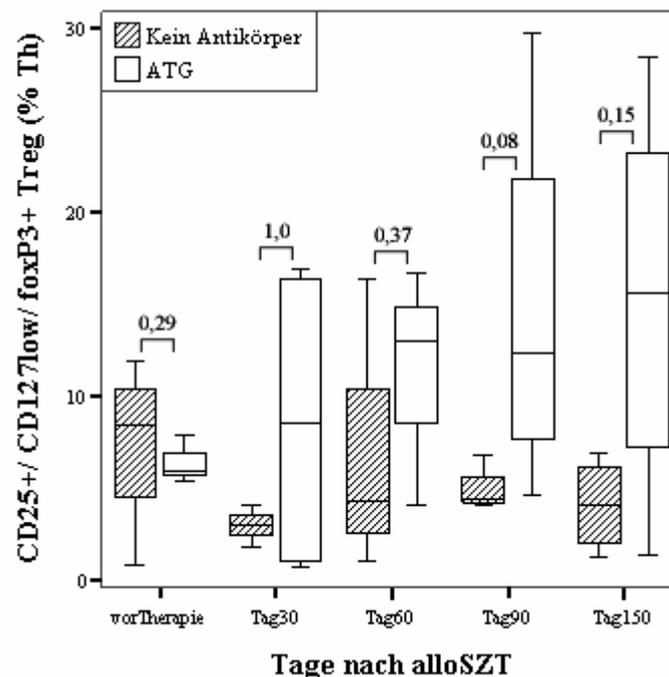


Abb. 18: Rekonstitution der $CD25^+/CD127^{low/-}/foxP3^+$ T_{reg} .

Vor Beginn der Therapie wurden in beiden Patientengruppen vergleichbare mediane $CD25^+/CD127^{low/-}/foxP3^+$ T_{reg} -Zahlen festgestellt. Ein Unterschied mit höheren medianen T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe war bis Tag +150 nachweisbar. Dieser zeigte sich besonders deutlich an Tag +60 ($p=0,07$). An keinem Messtag erreichten die Unterschiede statistische Signifikanz. Jedem Messtag wurde anhand von Klammern der entsprechende p-Wert zugeordnet.

Tab. 23: Zusammenfassung der Zahlen der $CD25^+ / CD127^{low-} / foxP3^+ T_{reg}$.

Vor Therapiebeginn waren in beiden Gruppen vergleichbare mediane $CD25^+ / CD127^{low-} / foxP3^+ T_{reg}$ -Zahlen nachweisbar. Ab Tag +30 stellte sich bis zum Tag +150 ein Unterschied mit höheren medianen T_{reg} -Zahlen in der ATG-Gruppe ein, welcher besonders deutlich am Tag +60 hervortrat. Die Spannweiten an den einzelnen Messtagen zeigten ähnliche Tendenzen mit höheren Maximalwerten in der ATG-Gruppe. Alle Angaben als Anteil der $CD4^+$ Th-Zellen (%Th).

Tab. 23.1: $CD25^+ / CD127^{low-} / foxP3^+ T_{reg}$ (%Th) - ATG

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	5,9	8,5	13,0	12,3	15,5
<i>Minimum</i>	5,4	0,7	4,0	4,6	1,3
<i>Maximum</i>	7,9	16,9	16,7	29,7	28,4

Tab. 23.2: $CD25^+ / CD127^{low-} / foxP3^+ T_{reg}$ (%Th) - Kein Antikörper

	vor Therapie	Tag +30	Tag +60	Tag +90	Tag +150
<i>Median</i>	8,4	3,0	4,2	4,4	4,0
<i>Minimum</i>	0,8	1,8	1,0	4,0	1,2
<i>Maximum</i>	11,9	4,0	16,3	6,8	6,9

3.5 Klinischer Verlauf der Patienten

3.5.1 Graft-versus-Host-Erkrankung

Mit einer Ausnahme aus der ATG-Gruppe entwickelten alle Patienten eine akute GvHD. Drei Patienten der Kein Antikörper-Gruppe und zwei aus der ATG-Gruppe boten eine aGvHD Grad I bis II. Je ein Patient aus jeder Gruppe zeigte die Symptomatik einer aGvHD Grad III bis IV.

Alle Patienten, die kein ATG erhalten hatten, entwickelten eine cGvHD. Drei von ihnen boten die Symptomatik einer extensiven cGvHD mit Darm-, Leber- und Hautbeteiligung. Ein Patient der Kein Antikörper-Gruppe erlitt eine cGvHD vom limitierten Typ. Eine Extensive und limitierte chronische GvHD wurde bei je einem Patienten aus der ATG-Gruppe beobachtet. (Tab. 24)

3.5.2 Infektionen

CMV-Reaktivierungen wurden häufiger nach ATG-Gabe (ATG: n=3 vs. Kein Antikörper: n=1) beobachtet. Hier konnte im Median eine zweifach höhere Viruslast nachgewiesen werden als in den Patienten ohne ATG (ATG: 2610 Kopien/ml vs. Kein Antikörper: 1090 Kopien/ml). Die mediane Dauer der Reaktivierung war in der ATG-Gruppe ebenfalls höher (ATG: 20 d vs. Kein Antikörper: 4 d). (Tab. 24)

EBV-Reaktivierungen wurden häufiger in der Kein Antikörper-Gruppe beobachtet (ATG: n=1 vs. Kein Antikörper: n=2). Die Viruslast sowie die Dauer der Infektion waren bei den Patienten aus der ATG-Gruppe höher als bei den Kein Antikörper-Patienten. (Tab. 24)

Klinisch relevante Infektionen mit Pilzen, Bakterien oder anderen Viren wurden nicht beobachtet. 150 Tage nach der allogenen Stammzelltransplantation waren sieben von acht Patienten am Leben. Eine Patientin aus der ATG-Gruppe verstarb nach Beendigung des Follow-up an den Folgen einer schweren aGvHD im Rahmen einer schweren Sepsis und Multiorganversagen.

Tab. 24: Zusammenfassung des klinischen Verlaufes aller Patienten.

	ATG	Kein Antikörper
Akute GvHD (bis Tag 100)		
<i>keine</i>	1	
<i>I - II</i>	2	3
<i>III - IV</i>	1	1
Chronische GvHD (> Tag 100)		
<i>keine</i>	2	
<i>limited</i>	1	1
<i>extensive</i>	1	3
CMV-Reaktivierung		
<i>Kopien/ml, (Median)</i>	1180 - 6300 (2610)	1090 (1090)
<i>Dauer, d (Median)</i>	5 - 61 (20)	4 (4)
EBV-Reaktivierung		
<i>Kopien/ml, (Median)</i>	11300 (11300)	1035 - 1350 (1193)
<i>Dauer, d (Median)</i>	92 (92)	6 - 7 (7)

4. DISKUSSION

4.1 Zum Engraftment und hämatopoetischen Chimärismus

Die Transplantation allogener peripherer, hämatopoetischer Stammzellen hat für die Therapie sowohl maligner als auch benigner Neoplasien des hämatopoetischen Systems stark an Bedeutung gewonnen. [Goldman et al. 1998; Gratwohl et al. 2002; Lennard und Jackson 2000] Das zentrale Problem dieses Therapieprinzips liegt in einer bisher untrennbaren Verbindung zwischen GvL-Effekt und GvHD, da beide durch T-Lymphozyten induziert werden. [Anderson et al. 2005] Patienten, die keine GvHD im Verlauf nach der Transplantation entwickeln, haben demnach ein höheres Rezidivrisiko. [Gale und Horowitz 1990; Martin et al. 1985; Weiden et al. 1979] Untersuchungen am Mausmodell haben gezeigt, dass T_{reg} die GvHD-Rate vermindern können, ohne den GvL-Effekt zu unterdrücken. [Edinger et al. 2003; Hoffmann et al. 2002] Des Weiteren existieren Hinweise dafür, dass ATGs in der Lage sind *in vitro* $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+$ T_{reg} aus $CD4^+ / CD25^-$ T_{con} zu induzieren. [Lopez et al. 2006; Ruzek et al. 2008] Hinweise für einen solchen Effekt *in vivo* im Menschen fehlten bisher.

Ziel dieser Arbeit war es die Rekonstitution des zellulären Immunsystems mit und ohne ATG-Gabe nach allogener SZT zu untersuchen, mit besonderem Fokus auf die Frage nach einer möglichen ATG-induzierten *in vivo*-Expansion von T_{reg} . (siehe 1.4)

Dynamik des Engraftments. Aktuell werden vornehmlich mobilisierte periphere Blutstammzellen (PBSC) als allogenes Transplantat verwendet, weniger häufig kommt in bestimmten Situationen auch Knochenmarkspirat zur Anwendung. PBSC enthalten zehnmal mehr Lymphozyten als solche aus dem Knochenmark. [Barrett 2006; Korbling und Anderlini 2001; Kroger et al. 1999] Diese Lymphozyten bewirken zum Einen ein schnelleres Engraftment, zum anderen jedoch ein höheres GvHD-Risiko bei PBSCT im Vergleich zur BMT. [Champlin et al. 2000; Xie et al. 2007] Im Vergleich mit der BMT wird das Engraftment der Neutrophilen nach PBSCT ca. ein bis sechs Tage, das der Thrombozyten vier bis sieben Tage früher erreicht. Weiterhin konnten Untersuchungen zeigen, dass die PBSCT der BMT hinsichtlich einer rascheren zellulären Immunrekonstitution, vor allem der $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen, überlegen ist. [Ottinger et al. 1996; Storek et al. 2001]

Die in dieser Studie transplantierten mononukleären und lymphozytären Zellzahlen (siehe 3.1) sowie die Geschwindigkeit sowohl des neutrophilen als auch des thrombozytären Engraftments nach PBSCT (siehe 3.2) decken sich mit den Erfahrungen der letzten zehn Jahre. [Champlin et al. 2000; Pavletic et al. 1998; Xie et al. 2007]

Entwicklung des hämatopoetischen Chimärismus. Nach der Regeneration der Hämatopoese kommt es nach einer allogenen PBSCT allmählich zu einer vollständigen Verdrängung der ursprünglichen Empfängerhämatopoese, was als vollständiger Chimärismus bezeichnet wird. Eine Persistenz von Empfängerblutzellen wird als gemischter Chimärismus bezeichnet. Nach einer volldosierten Standard-Konditionierungstherapie wird ein vollständiger Chimärismus ab Tag +30 nach der Transplantation erwartet. [Baron et al. 2004; Thiede et al. 2004]

In der vorliegenden Studie wiesen sieben von acht Patienten an Tag +30 einen vollständigen Spenderchimärismus auf. In einem Fall aus der ATG-Gruppe wurde ein vollständiger Spenderchimärismus erst an Tag +90 nach Transplantation erreicht. *Mattsson et al.* und *Baron et al.* beschrieben bei 82% bzw. 83% ihrer Patienten nach myeloablativer Konditionierung einen gemischten Chimärismus zum Zeitpunkt des Beginns einer akuten GvHD Grad II bis IV. [Baron et al. 2004; Mattsson et al. 2001] Im vorliegenden Fall wurde an Tag +30 ein gemischter Spenderchimärismus mit einem Empfängeranteil von 33% nachgewiesen. (siehe 3.2) Zu diesem Zeitpunkt entwickelte sich eine akute kutane GvHD Stadium III (vgl. *Tab. 24*). Der leicht prolongierte gemischte Chimärismus ist deshalb am ehesten als Folge der akuten GvHD anzusehen. Die anschließende Intensivierung der Immunsuppression im Rahmen der GvHD-Therapie hat die Entwicklung eines vollständigen Spenderchimärismus wiederum gefördert, so dass dieser an Tag +90 erreicht war.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass bei allen Patienten spätestens ab Tag +90 die Hämatopoese vollständig aus den Spenderzellen resultierte. Somit sind auch alle gemessenen Immunzellen, insbesondere die regulatorischen T-Zellen, allesamt vom Transplantat abzuleiten.

4.2 Zur allgemeinen Immunzellrekonstitution

Ein entscheidendes Therapieprinzip der allogenen SZT stellt die Etablierung eines durch Spenderlymphozyten getragenen Immunsystems im Empfänger dar. Im Rahmen der Konditionierungsprotokolle wird ein Großteil des Empfängerimmunsystems vor der Transplantation zerstört. Über einen langen Zeitraum nach der Transplantation (mindestens bis zu 180 Tagen) muss eine medikamentöse Immunsuppression verabreicht werden, um eine Abstoßung des Transplantates durch Empfängerlymphozyten sowie eine akute schwere GvHD zu verhindern. Nach Ausbildung eines vollständigen Spenderchimärismus stammen die Immunzellen letztlich nur vom Spender und es besteht im günstigsten Falle eine Toleranz zwischen Empfänger und Spenderzellen. (siehe 1.1)

Einfluss der Patientencharakteristika. Die PBSCT geht im Vergleich zur BMT aufgrund ihrer hohen Zahlen kotransplantiertes $CD34^+$ Stammzellen und $CD3^+$ T-Lymphozyten mit einem schnelleren Engraftment und beschleunigter zellulärer Immunrekonstitution einher. [Ottinger et al. 1996; Storek et al. 2001] In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die transplantierte Dosis der $CD34^+$ Stammzellen und $CD3^+$ T-Lymphozyten dafür ausschlaggebend sind. [Baron et al. 2005; Carvallo et al. 2004; Zaucha et al. 2001] Sowohl in der BMT [Mavroudis et al. 1996] als auch in der allogenen PBSCT [Przepiora et al. 1999] verringern höhere Stamm- und T-Zelldosen durch schnelleres Engraftment und geringeres GvHD-Risiko die Therapieassoziierte Mortalität (TRM).

Die Patienten beider Gruppen erhielten vergleichbare Mengen an hämatopoetischen Stamm- und T-Zellen bezogen auf das Empfängerkörpergewicht. (siehe 3.1) Auch die vor Beginn der Therapie bei den Patienten ermittelten Werte für die unterschiedlichen Immunzellen waren im Median ohne signifikanten Unterschied in beiden Gruppen gleich verteilt. (siehe 3.3)

Zusätzlich nimmt auch das Konditionierungsschema wesentlichen Einfluss auf die Immunrekonstitution nach allogener SZT mit schnellerer Erholung der Immunzellen nach dosisreduzierter Konditionierung. [Carvallo et al. 2004] Hinsichtlich der Konditionierung (Standard vs. RIC) zeigten die Patienten ebenso eine Gleichverteilung. (siehe 2.1.2)

Somit waren insgesamt die Ausgangsbedingungen und Patientencharakteristiken bezüglich wichtiger grundlegender Einflussfaktoren auf die zelluläre Immunrekonstitution gut vergleichbar, was insbesondere in Anbetracht der kleinen Fallzahl von entscheidender Bedeutung ist.

Einflussfaktoren auf die Rekonstitution der CD45⁺ Leukozyten. Die CD45⁺ Leukozyten erholten sich im Verlauf der Beobachtung deutlich schneller in der Kein Antikörper-Gruppe. An allen Messtagen zeigten die ATG-Patienten deutlich geringere Leukozytenzahlen, obwohl beide Patientengruppen ähnliche Ausgangsniveaus aufwiesen. Die CD14⁺ Monozyten und neutrophilen Granulozyten boten eine schnelle Rekonstitution. Bereits sehr früh nach der SZT waren für beide Zellpopulationen normale Zellzahlen nachweisbar. Bis Tag +150 stellten sich in der ATG-Gruppe zunehmend geringere monozytäre und granulozytäre Zellzahlen als in der Kein Antikörper-Gruppe ein, wobei letztere einen signifikanten Unterschied an diesem Messtag aufwiesen. (siehe 3.3.1)

Monozyten und neutrophile Granulozyten rekonstituieren nach einer allogenen SZT am schnellsten und etablieren somit bereits in der frühen Rekonstitutionsphase das neue unspezifische Immunsystem im Empfänger. Die Lymphozyten hingegen zeigen in der frühen Rekonstitutionsphase eine ausgeprägte Zytopenie, die sich nur langsam erholt. [Auffermann-Gretzinger et al. 2002; Chklovskaja et al. 2004; Storek et al. 2001] Da die Leukozyten neben den Monozyten und Granulozyten auch die Lymphozyten mit einem Anteil von 20 bis 40 % einschließen, handelt es sich bei den starken Unterschieden in der Rekonstitution der Leukozyten zwischen beiden Gruppen am ehesten um einen Summationseffekt. Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkmechanismen und Polyklonalität bedingen ATGs eine ausgeprägte Depletion aller Leukozytensubpopulationen, einschließlich der Monozyten und Granulozyten, was die geringeren Werte in der ATG-Gruppe über den gesamten Verlauf mit zunehmendem Unterschied gegen Ende des Beobachtungszeitraumes erklären könnte. (Tab. 25)

Tab. 25: Übersicht der bisher bekannten Zielantigene von ATG.

Dargestellt sind die drei Hauptsäulen der Wirkungsweise von ATG und die ihnen zugeordneten Zielantigene. Bei den Oberflächenepitopen CD3/ TCR und CD152 handelt es sich um T-zell-spezifische Antigene. Die Epitope CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25 und CD28 werden nicht ausschließlich, aber vorwiegend von T-Zellen exprimiert. CD2 findet sich auf NK-Zellen, CD25 auf B-Lymphozyten und Monozyten. Monozyten exprimieren außerdem die Antigene CD11a/ b, CD16, LFA, CD32 den Panleukozytenmarker CD45. LFA (Leukocyte Function associated Antigen), ICAM (Intracellular Adhesion Molecule), VLA (Very Late Antigen = Integrine, Liganden für VCAM [Vascular Adhesion Molecule]), LPAM (Lymphocytic Adhesion Molecule), CCR und CXCR (Chemokinrezeptoren) [Mohty 2007]

Auslösung einer Immunantwort	Zelladhäsion und Zellinteraktion	Heterogene Pathways (Entzündung, Apoptose, Proliferation)
CD1a	CD11a/ CD18 (LFA-1)	CD2
CD3/ TCR	CD44	CD5
CD4	CD49/ CD29 (VLA-4)	CD6
CD6	CD50 (ICAM-3)	CD11b
CD7	CD51/ 61	CD29
CD8	CD54 (ICAM-1)	CD38
CD16	CD56	CD40
CD19	CD58 (LFA-3)	CD45
CD20	LPAM-1 (Integrin alpha4beta7)	CD95
CD25	CD102 (ICAM-2)	CD126
CD28	CD195 (CCR5)	CD138
CD30	CD197 (CCR7)	
CD32	CD184 (CXCR4)	
CD40		
CD80		
CD86		
CD152 (CTLA-4)		
HLA Klasse I		
HLA Klasse II		
Beta2-M		

Einflussfaktoren auf die Rekonstitution der CD16/56⁺ NK-Zellen. Die CD16/56⁺ NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem, welches sich nach einer SZT wesentlich schneller erholt als das adaptive. In der frühen Rekonstitutionsphase sind sie die ersten Lymphozyten, die bereits nach ungefähr zehn bis vierzehn Tagen nachgewiesen werden können und erreichen in der Regel innerhalb des ersten Monats erneut normale Zellzahlen. Nach zwei weiteren Monaten bilden sie die größte Lymphozytensubpopulation, bis später erneut die T-Zellen des adaptiven Immunsystems dominieren. [Chklovskaja et al. 2004; Eyrich et al. 2003; Vitale et al. 2000]

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten die NK-Zellen einen ähnlichen Verlauf in beiden Patientengruppen. Diese Zellpopulation verhielt sich bezüglich ihrer Zellzahlen über den gesamten Beobachtungszeitraum am stabilsten in beiden Patientengruppen. Bereits ab Tag +30 lagen die NK-Zellzahlen wieder innerhalb des Normbereiches. (siehe 3.3.2) Dementsprechend waren letztlich anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu erkennen.

Über einen eventuellen Einfluss von ATG auf die Rekonstitution der NK-Zellen ist aktuell nur wenig bekannt. Während einige Daten einen Effekt von ATG auf die NK-Zellzahlen verneinen [Giebel et al. 2005], wurde im Gegensatz dazu in anderen Analysen ein stark unterschiedlicher Einfluss verschiedener ATG-Typen auf die NK-Zellen angedeutet [Penack et al. 2007].

Zwar ist außerdem bekannt, dass die polyklonalen ATGs die Epitope CD2, CD16 und CD56 auf der Oberfläche von NK-Zellen erkennen und binden können. (Tab. 25) Jedoch weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass ATG als Teil der Konditionierungstherapie vor allogener SZT zumindest in dieser kleinen Patientenpopulation keinen relevanten Einfluss auf die NK-Zellrekonstitution zu haben scheint. Das unspezifische Immunsystem etablierte sich in allen acht Patienten sehr schnell bereits in der frühen Rekonstitutionsphase (Tag +30 bis +60). Ein geringfügiger Einfluss von ATG auf NK-Zellen kann letztlich anhand der kleinen Fallzahl der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht sicher beurteilt werden.

Einflussfaktoren auf die Rekonstitution der CD19⁺ B-Zellen. Die CD19⁺ B-Zellen erwiesen sich während der gesamten Posttransplantationsphase als schwer nachweisbar, so dass für die ATG-Gruppe keine verwertbaren Zahlen vorliegen. (siehe 3.3.3) Aufgrund methodischer Grenzen war in vielen Fällen eine valide Quantifizierung der CD19⁺ B-Zellen nicht möglich.

Im Großteil der Blutproben aus der ATG-Gruppe waren nicht genug B-Zellen vorhanden, so dass die Antikörper aufgrund ihres Überschusses keine optimale Bindung mit den Oberflächenepitopen eingehen konnten und folglich in der FACS-Analyse kaum messbare Signale vorlagen.

Ähnliche Beobachtungen wurden bereits mehrfach beschrieben. In den ersten zwei Monaten der frühen Rekonstitutionsphase nach der Transplantation sind B-Zellen in der Peripherie kaum nachweisbar. Erst mit einer Verzögerung von ungefähr ein bis zwei Jahren erreichen sie erneut normale Zellzahlen. Diese liegen dann oft sogar oberhalb des Normbereiches. [Hong et al. 2008; Kook et al. 1996; Storek et al. 1993]

Als eine entscheidende Ursache für die oben beschriebene Beobachtung kann die Polyklonalität der ATGs angesehen werden. ATGs erkennen unter anderem die B-Zell-spezifischen Oberflächenproteine CD19 und CD20 sowie die Epitope CD40, CD 80, CD30, CD38 und CD95, was die starke B-Zelldepletion in der ATG-Gruppe erklären könnte. [Pistillo et al. 2002; Rebellato et al. 1994; Zand et al. 2005] Weiterhin ist bekannt, dass ATGs sowohl naive, aktivierte B-Zellen [Zand et al. 2005] als auch von den B-Zellen abstammende Myelomzellen [Timm et al. 2006] effektiv in eine komplementunabhängige Apoptose führen können. Vergleichende Untersuchungen zwischen ATG- und nicht-ATG-haltigen Therapieschemata hinsichtlich der B-Zellentwicklung fehlen.

Für eine ausreichend valide Interpretation des Einflusses von ATGs auf die B-Zellrekonstitution nach allogener SZT werden letztlich größere Fallzahlen vonnöten sein, wengleich sich eine prospektive Analyse der B-Zellzahlen in der frühen Rekonstitutionsphase auch in naher Zukunft aufgrund methodischer Limitierungen wahrscheinlich als schwierig erweisen wird.

Einflussfaktoren auf die Rekonstitution der CD3⁺ T-Lymphozyten. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine stark verzögerte Rekonstitution der CD3⁺ T-Lymphozyten festgestellt werden, welche sich über den gesamten Beobachtungszeitraum bis Tag +150 erstreckte. Die CD8⁺ cT-Zellen erholten sich in beiden Patientengruppen schneller als die CD4⁺ Th-Zellen und erreichten bis Tag +150 normale Werte. Bei mit ATG behandelten Patienten waren deutlich weniger CD4⁺ T-Zellen nachweisbar, wobei der Unterschied zur Kontrollgruppe an den Tagen +60, +90 und +150 statistische Signifikanz erreichte. Die rasche Rekonstitution der cT-Zellzahlen bei konstant niedrigen Th-Zellzahlen bedingte eine invertierte CD4/ CD8-Ratio, welche in beiden Gruppen bis zum Ende der Beobachtung nachweisbar blieb. (siehe 3.3.4)

Die oben beschriebene Dynamik der T-Zellrekonstitution deckt sich mit zahlreichen Untersuchungen anderer Forschungsgruppen. Die Lymphozytenzahlen erreichten in einer Vielzahl der Fälle erst zwei Jahre nach der Transplantation stabile Normwerte. [Eyrich et al. 2003; Kook et al. 1996; Pavletic et al. 1998; Tayebi et al. 2001]

Für die starke Verzögerung der T-Zellrekonstitution wird unter anderem eine gestörte T-Zellreifung im Thymus verantwortlich gemacht. Diese ist zum Einen Folge des physiologischen Involutionsprozesses im Erwachsenenalter. Zum Anderen entsteht sie im Rahmen einer Konditionierungstherapie und durch weitere Faktoren wie zum Beispiel ausgeprägten Zytokinmangel. Im Thymus reifen die zuvor aus dem Knochenmark eingewanderten Progenitor-T-Zellen und emigrieren nach erfolgreicher positiver und negativer Selektion als naive T-Zellen in die Peripherie. Dort werden sie unter anderem durch direkten Antigenkontakt aktiviert [Haynes et al. 2000]

Auch auf einem anderen Weg kann es zu einer T-Zellregeneration nach allogener SZT kommen: der so genannten „homöostatischen peripheren Expansion“ (HPE), in deren Rahmen durch eine klonale Vermehrung in der Peripherie Klone aus reifen T-Zellen des Spenders entstehen. [Mackall et al. 1995; Mackall und Gress 1997]

Es wird angenommen, dass die frühe T-lymphozytäre Rekonstitution nach allogener SZT zunächst auf einer klonalen Expansion reifer Spender- oder Empfänger-T-Zellen in der Peripherie beruht und erst später eine erneute zusätzliche Lymphopoese im Thymus einsetzt. *Larosa et al.* konnten dementsprechend zeigen, dass in ihren Untersuchungen die rekonstituierten CD8⁺ cT-Zellen aus der Peripherie stammten und am ehesten durch klonale Expansion aus reifen T-Zellen entstanden waren. [Larosa et al. 2005] Einige Faktoren, welche die HPE beeinflussen, wurden bereits identifiziert, so zum Beispiel die Zytokine IL-7 [Fry et al. 2003; Rosenberg et al. 2006] und IL-15 [Anichini et al. 2003; Li et al. 2005] als wichtige fördernde Faktoren. Des Weiteren konnte den regulatorischen T-Zellen ein die T-Zellrekonstitution behindernder Effekt zugeordnet werden [Shen et al. 2005], was auf deren Produktion des direkten IL-15-Antagonisten Transforming Growth Factor Beta (TGF-β) zurückgeführt werden könnte [Ahmadzadeh und Rosenberg 2005; Lucas et al. 2006; Lucas et al. 2000; Zheng 2008].

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse ist zu diskutieren, ob ein erhöhtes T_{reg}-Vorkommen nach ATG-Gabe, wie es in dieser Pilotstudie beobachtet wurde und in der weiteren Diskussion noch eingehend betrachtet wird, demnach zu einer verzögerten Regeneration von CD4⁺ Th- und CD8⁺ cT-Zellen geführt haben kann. (siehe 3.3 und 3.4)

Der Einfluss von ATG. Die in dieser Studie beobachteten signifikanten Unterschiede der T-Zellzahlen sind jedoch zu allererst der depletierenden Wirkung der ATG-Präparate zuzuschreiben. (siehe 1.2) Sie haben eine stark T-zelldepletierende Wirkung und können somit die T-lymphozytäre Immunrekonstitution deutlich verzögern. Die T-Zelldepletion stellt dabei den bisher am besten untersuchten Wirkmechanismus der ATGs dar. Bei den Oberflächenepitopen CD3/ TCR und CD152 handelt es sich um T-zellspezifische Antigene. Die Epitope CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25 und CD28 werden ebenfalls nicht ausschließlich, aber vorwiegend von T-Zellen exprimiert. (Tab. 25) ATGs bedingen zudem eine dosisabhängige Abnahme der T-Zellzahlen sowohl im peripheren Blut als auch in peripheren lymphatischen Organen und der Milz, wobei der Thymus ausgespart zu bleiben scheint. [Preville et al. 2001]

Die unterschiedlichen Quellen zur Herstellung der ATGs scheinen ebenso Auswirkungen auf die zelluläre Immunrekonstitution zu haben. [Penack et al. 2007] Während ATG-G aufgrund seiner Herstellung aus nativen humanen Thymozyten eine größere Anzahl an Oberflächenantigenen erkennt und eine ausgedehntere Depletion erreicht, ist ATG-F insbesondere gegen aktivierte T-Zellen gerichtet. Ein Grund dafür liegt darin, dass die zur Herstellung verwendeten Jurkat-Zellen einer lymphozytären Tumorzelllinie entstammen. Des Weiteren resultieren die meisten verfügbaren *in vitro*-Daten zu den Wirkmechanismen bisher aus Untersuchungen mit ATG-G. [Craddock 2008; Mohty 2007] Aufgrund der geringen Fallzahl der vorliegenden Untersuchungen und der Tatsache, dass die beiden ATG-Typen mit je zwei Patienten in der ATG-Gruppe gleich verteilt waren (siehe 2.1.2), wird in den weiteren Betrachtungen keine Trennung der beiden ATGs vorgenommen. Außerdem deuteten *Penack et al.* in ihren Untersuchungen an, dass der Unterschied zwischen beiden ATGs bezogen auf die zelluläre Immunrekonstitution nicht so groß zu sein scheint wie bisher vermutet, wenngleich die Autoren speziell über T_{reg} in ihren Untersuchungen jedoch keine Aussagen machten. [Penack et al. 2007]

Nach einer ATG-Infusion nimmt ihre Konzentration im Sinne eines einfachen exponentiellen Abfalls im Serum allmählich ab und zeigt eine lange Halbwertszeit von durchschnittlich 30 Tagen im menschlichen Blutplasma. [Bunn et al. 1996] Zusätzlich wurde festgestellt, dass selbst fünf Wochen nach Transplantation zwar noch immer ATG-Moleküle im Serum nachgewiesen werden können. [Remberger und Sundberg 2005] Jedoch wurden diese Untersuchungen mit Hilfe von Enzymgekoppelten Radio-Absorptions-Assays (ELISA) durchgeführt, einer Methode, welche auch inaktive Antikörper detektiert und somit sehr wahrscheinlich falsch-hohe Ergebnisse liefert.

Waller *et al.* haben auf diese Tatsache hingewiesen und in ihren Analysen eine korrigierte geringere Halbwertszeit von ungefähr sechs Tagen für die biologisch wirksame Fraktion des zirkulierenden ATG konstatiert. Sie wiesen bereits fünfzehn Tage nach der Transplantation subtherapeutische Konzentrationen ($< 1 \mu\text{g/ml}$) von biologisch aktivem ATG-G in ihren Patienten nach. [Waller *et al.* 2003]

Bezugnehmend auf diese Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die biologisch aktiven ATG-Moleküle zum Beginn der vorliegenden Untersuchungen an Tag +30 nach der Transplantation zwar nicht mehr in therapeutisch wirksamen Dosen vorhanden waren. Jedoch wird das Transplantat am Tag Null in ein Milieu gegeben, in dem viele ATG-Moleküle biologisch aktiv sind, welche einen maximalen Einfluss auf das Transplantat ausüben können. Diese biologisch aktiven ATG-Moleküle beeinflussen somit zum Zeitpunkt der Transplantation die kotransplantierten CD3^+ T-Lymphozyten nachhaltig. Diese Annahme wird durch die Beobachtung der ausgeprägten Verzögerung der zellulären Immunrestitution in der ATG-Gruppe unterstrichen. (siehe 3.3) Besonders wichtig diesbezüglich ist jedoch die schnellere Reconstitution aller untersuchten regulatorischen T-Zellpopulationen nach Behandlung mit ATG bei gleichzeitig niedrigeren CD4^+ T-Zellzahlen. (siehe 3.3.4 und 3.4) Die sich daraus ergebende Annahme einer direkten Induktion von T_{reg} aus mit dem Transplantat übertragenen T-Lymphozyten durch ATG soll im folgenden Kapitel diskutiert werden.

4.3 Zur Reconstitution der regulatorischen T-Zellen

Aufgrund intensiver Grundlagenforschung konnten viele der pathophysiologischen Mechanismen von sowohl GvL-Effekt als auch GvHD aufgeklärt werden. Die wichtigste gemeinsame Grundlage beider Entitäten stellen die alloreaktiven kotransplantierten Spender-T-Lymphozyten dar. Diese sind der Grund dafür, dass eine Senkung des GvHD-Risikos ohne negative Beeinflussung des GvL-Effektes bisher unmöglich war. (siehe 1.1) Im Rahmen der GvHD-Prophylaxe hat sich das Konzept der *in vivo*-T-Zelldepletion bewährt. Als besonders effektiv erwiesen sich dabei die ATGs [Byrne *et al.* 2000; Zander *et al.* 2003], welche aufgrund ihrer Polyklonalität die Immunzellrestitution stark beeinträchtigen. (siehe 4.2) *Bacigalupo et al.* konnten in zwei randomisierten Studien an 109 Patienten nach unverwandter BMT zeigen, dass ATG-G im Vergleich zu einer Konditionierung ohne ATG die Inzidenz einer akuten (Grad III-IV) und chronischen extensiven GvHD signifikant senken kann.

Allerdings konstatierten sie gleichzeitig eine unveränderte TRM aufgrund eines stark erhöhten Risikos für schwere Infektionen. [Bacigalupo et al. 2001a]

Neben den ATGs haben auch T_{reg} einen stark hemmenden Einfluss auf die zelluläre Immunrestitution. T_{reg} haben ausgeprägte immunsuppressorische Eigenschaften, vor allem auf Immunantworten gegenüber Alloantigenen. [Joffre et al. 2004; Salama et al. 2003] Dementsprechend wurde eine Verringerung der Inzidenz einer akuten GvHD in Mäusen, bei gleichzeitig erhaltenem GvL-Effekt beobachtet. [Edinger et al. 2003; Hoffmann et al. 2002] Der Nutzen der T_{reg} für die GvHD-Prophylaxe bleibt folglich unumstritten und eine Expansion dieser Lymphozytensubpopulation ist das Ziel aktueller Forschung. Trotz Erfolgen in der *in vitro*-Expansion von T_{reg} , blieben schwierige methodische Probleme wie die Auslösung einer GvHD durch koexpandierte T_{eff} -Zellen bisher bestehen. [Battaglia et al. 2005; Godfrey et al. 2005; Taylor et al. 2002] und eine *in vivo*-Expansion von T_{reg} könnte ein viel versprechendes Therapiekonzept darstellen.

Alle Spender der vorliegenden Untersuchung erhielten vor der Apherese G-CSF mit dem Ziel der Mobilisierung der $CD34^+$ Stammzellen. (siehe 2.1.3) Es ist bekannt, dass diese Substanz zu einer verstärkten Aktivierung von T_{eff} -Zellen des Spenders mit konsekutiver Steigerung der Expression von CD25 führt. [Stanzani et al. 2004] Um den Einfluss dieser aktivierten T_{eff} -Zellen zu minimieren wurden für die Analyse der T_{reg} -Zahlen deshalb unter anderem der Transkriptionsfaktor foxP3 und das Oberflächenmolekül CD127 verwendet. Letzteres hat sich in vielen Untersuchungen als weitaus spezifischer herausgestellt, da es im Gegensatz zu foxP3 nicht von aktivierten $CD4^+/CD25^+ T_{eff}$ -Zellen exprimiert wird. [Hartigan-O'Connor et al. 2007; Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006] Dementsprechend wurden die T_{reg} -Zahlen der $CD4^+/CD25^+/CD127^{low/-}$ und der $CD4^+/CD25^+/foxP3^+ T_{reg}$ bestimmt, wobei durch die zusätzliche Kombination aus foxP3 und CD127 eine weitere Erhöhung der Selektivität angestrebt wurde. (siehe 3.4)

Im Rahmen der vorliegenden Studie stellte sich ein deutlicher Trend in Richtung erhöhter T_{reg} -Anteile aller $CD4^+$ T-Zellen bei den mit ATG behandelten Patienten ein. In allen drei untersuchten T_{reg} -Populationen zeigte sich ein sichtbarer Unterschied bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag +150. Insbesondere während der sehr frühen Posttransplantationsphase schien der Unterschied zwischen beiden Gruppen am prägnantesten zu sein. In der späteren Rekonstitutionsphase schwächte sich dieser zwischen den Tagen +90 bis +150 geringfügig ab (siehe 3.4).

Methodische Limitierungen. Obwohl der Trend in Richtung höherer T_{reg} -Anteile der $CD4^+$ Th-Zellen nach ATG-Gabe in allen drei T_{reg} -Populationen beobachtet wurde, ergaben sich dennoch unterschiedlich hohe Zahlen zwischen den einzelnen Populationen, mit höheren Zellzahlen bei den $CD4^+/CD25^+/CD127^{low/-}$ T_{reg} . Diese Unterschiede müssen vor dem Hintergrund methodischer Limitierungen betrachtet werden. Für die Quantifizierung der T_{reg} anhand des intrazellulären Markers foxP3 ist eine Permeabilisierung der Zellmembran nötig (siehe 2.2.5). Im Rahmen dieses Vorgangs gehen mit großer Wahrscheinlichkeit viele der auf der Oberfläche der Zellmembran lokalisierten Epitope verloren, so dass die Signale in der Durchflusszytometrie deutlich schwächer werden. Diesbezüglich verhielten sich die Zahlen der $CD4^+/CD25^+/foxP3^+$ sowie der $CD25^+/foxP3^+/CD127^{low/-}$ T_{reg} ähnlich, da sie aus demselben Ansatzröhrchen gemessen wurden. (siehe 2.2.2)

Da trotz der Mehrfachbestimmung der T_{reg} -Zahlen mit Hilfe verschiedener Markerkombinationen ähnliche Zahlentrends nachweisbar waren, wird davon ausgegangen, dass die selektive Quantifizierung der untersuchten T_{reg} -Populationen erfolgreich war und aktivierte $CD25^+$ T_{eff} -Zellen nicht mit in die Analysen einbezogen wurden. *Seddiki et al.* konnten zudem zeigen, dass es sich bei den $CD4^+/CD25^+/CD127^{low/-}$ und $CD25^+/CD127^{low/-}/foxP3^+$ T_{reg} im peripheren Blut um die gleiche T_{reg} -Population handelt. [Seddiki et al. 2006] Unter Berücksichtigung der gleichen Trends in allen drei T_{reg} -Populationen unterstreicht dies die Annahme, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen T_{reg} -Populationen am wahrscheinlichsten methodische Ursachen haben.

Die Peripherie als Ursprung der T_{reg} . Natürlich vorkommende T_{reg} entstehen zum Einen primär im Thymus, zum Anderen gehen sie in der Peripherie aus naiven $CD4^+/CD25^-$ T-Vorläuferzellen (T_{con}) hervor. Zwar konstatierten *Walker et al.*, dass es sich bei der Neubildung in der Peripherie wahrscheinlich um einen eher stochastischen Prozess handeln könnte, in dessen Rahmen einige aktivierte $CD25^+$ T-Zellen beginnen foxP3 zu exprimieren. [Walker et al. 2005; Walker et al. 2003] *Zheng et al.* jedoch beschrieben ebenfalls eine Induktion $CD4^+/CD25^+$ aus $CD25^-$ T-Zellen in der Peripherie, wenngleich sie auf die Verwendung der T_{reg} -Marker foxP3 und CD127 verzichteten, so dass ein unbekannter Anteil der von ihnen gemessenen $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen wahrscheinlich aktivierte T_{eff} -Zellen darstellte. [Zheng et al. 2004]

Seddiki et al. konnten zudem zeigen, dass foxP3^+ und $\text{CD25}^+/\text{CD127}^{\text{low}/-}$ T_{reg} in der Peripherie, nämlich in Lymphknoten und Nabelschnurblut, vergleichbare Zellzahlen aufwiesen. Zentral im Thymus hingegen zeigten beide T_{reg} -Populationen unterschiedliche Werte. [Seddiki et al. 2006] Die vergleichbaren Zahlentrends der $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+/\text{CD127}^{\text{low}/-}$ und $\text{CD25}^+/\text{foxP3}^+/\text{CD127}^{\text{low}/-}$ T_{reg} in den vorliegenden Untersuchungen (siehe 3.4) können deshalb als ein wichtiger Hinweis für eine vorwiegend peripher stattfindende Expansion der T_{reg} interpretiert werden.

Der Einfluss von ATG auf die T_{reg} -Rekonstitution. Die Aktivität der reaktiven CD4^+ und CD8^+ T-Zellen wird durch das Verhältnis zu den ihnen gegenüberstehenden, potentiell immunsuppressorisch wirkenden T_{reg} moduliert. Ein höherer T_{reg} -Anteil mündet demnach in einer ausgeprägteren Immunsuppression. [Piccirillo und Shevach 2001; Thornton und Shevach 1998] Vor dem Hintergrund der immunologischen Prozesse nach allogener SZT, (GvL-Effekt und GvHD) und dem potentiellen therapeutischen Nutzen der T_{reg} wurde deshalb für die vorliegenden Untersuchungen der Fokus auf den relativen Anteil der T_{reg} an den CD4^+ T-Lymphozyten gerichtet. (siehe 3.4)

Aufgrund ihrer Polyklonalität verursachen ATGs eine ausgeprägte Zytopenie der T-lymphozytären Populationen, die sich in den vorliegenden Untersuchungen vor allem bei den CD4^+ Th-Zellen nachhaltig auf deren Rekonstitution auswirkte. Zudem werden unter dem Einfluss von ATG nicht nur Th-Zellen sondern auch T_{reg} sowohl vom Spender als auch im Empfänger zum Zeitpunkt der Transplantation anhand ihrer Oberflächenepitope effizient erkannt und depletiert. (siehe 4.2) Es muss deshalb primär von einer deutlich stärkeren absoluten T-Zelldepletion, einschließlich der T_{reg} , in der ATG-Gruppe ausgegangen werden.

Angesichts dieses stärker reduzierten Th- und T_{reg} -Pools in der ATG-Gruppe ist es deshalb umso erstaunlicher, dass in den vorliegenden Untersuchungen die T_{reg} -Anteile nach ATG-Gabe eine wesentlich stärkere Rekonstitution darboten.

Da sich eine Zunahme der T_{reg} -Anteile in der ATG-Gruppe erst ab Tag +30 einstellte, liegt es außerdem nahe, dass im Transplantat enthaltene T_{reg} zum Zeitpunkt der Transplantation ebenso effektiv depletiert wurden wie die CD4^+ Th-Zellen. (siehe 3.3.4 und 3.4) Aus diesem Grund wird anhand der vorliegenden Daten ein *in vivo* stattfindender, nachhaltig expansiver Einfluss von ATG auf die Rekonstitution der T_{reg} als Ursache für den beobachteten Unterschied angenommen.

Die Kinetik der ATG-induzierten in vivo T_{reg} -Expansion. ATGs sind sehr wahrscheinlich in wirksamen therapeutischen Dosen bis Tag +15 nachweisbar. Der Hauptteil ihrer biologischen Aktivität wird nach der direkten Beeinflussung der transplantierten Zellen an Tag Null jedoch in erster Linie von Langzeitwirkungen auf die zelluläre Immunrestitution getragen. (siehe 4.2) Aus diesem Grund liegt es nahe, dass der vermutete direkte Effekt einer T_{reg} -Induktion durch ATGs kinetikbedingt vor allem zum Zeitpunkt der Transplantation und wenige Tage danach stattfindet. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass sich in den vorliegenden Untersuchungen eine geringe Abnahme des Unterschiedes bezüglich der relativen T_{reg} -Anteile in beiden Gruppen im Verlauf der frühen bis mittleren Posttransplantationsphase andeutete. (siehe 3.4)

Während dieses Zeitraumes nimmt eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf die zelluläre Immunrestitution, so dass ein möglicher ATG-abhängiger Effekt im Rahmen einer prospektiven Untersuchung verschwinden könnte. Als einige der wichtigsten seien deshalb an dieser Stelle das Alter des Empfängers, die Zusammensetzung und Quelle der Stammzellpräparate, Art und Dauer der Grunderkrankung oder das Konditionierungsschema erwähnt. Weiterhin sind die Entwicklung einer akuten oder chronischen GvHD sowie die Stärke der pharmakologischen Immunsuppression von Bedeutung. [Socie et al. 2003]

Der Mechanismus der ATG-induzierten in vivo T_{reg} -Expansion. Bezüglich der oben beschriebenen Tendenz in Richtung höherer T_{reg} -Anteile der $CD4^+$ T-Lymphozyten nach einer Behandlung mit ATG während der frühen Posttransplantationsphase ist die Frage nach den möglichen zugrunde liegenden Mechanismen schließlich besonders interessant und wichtig. Lopez et al. stellten drei alternative Ursachen zur Diskussion.

Erstens könnte ATG durch gezielte T-Zelldepletion und induzierte Apoptose das Gleichgewicht zwischen $CD4^+/CD25^+$ und $CD4^+/CD25^-$ T-Zellen auf die Seite der $CD25^+$ lenken. In den vorliegenden Untersuchungen erwiesen sich alle gemessenen T_{reg} -Populationen jedoch als vital. (Abb. 13-15) Lopez et al. wiesen in ihren *in vitro*-Untersuchungen ebenfalls eine Vitalität und Funktionalität der T_{reg} von über 95% in sowohl mit ATG als auch mit der Kontrolle behandelten Zellen nach. [Lopez et al. 2006]

Ein zweiter möglicher Wirkmechanismus ist die Induktion einer verstärkten Proliferation der CD4⁺/ CD25⁺ T-Zellen, so dass sich das Gleichgewicht auf die Seite der CD25⁺ T-Zellen verschiebt. Diesbezüglich wiesen *Lopez et al.* darauf hin, dass in ihren Untersuchungen der Anteil proliferierter CD25⁺ T-Zellen nur 16% betrug, während CD8⁺ cT-Zellen gar keine Proliferationssteigerung nach Inkubation mit ATG aufwiesen. [Lopez et al. 2006] Im Einklang hiermit zeigten auch die vorliegenden Daten eine generalisierte Einschränkung der T-lymphozytären Immunrestitution der ATG-Patienten im Vergleich zur wesentlich rascheren Erholung in der Kein Antikörper-Gruppe. Zudem wurde vor allem für die CD4⁺ Th-Zellen eine signifikant langsamere Reconstitution in der ATG-Gruppe beobachtet (siehe 3.3.4), was zu dem Schluss führt, dass die Proliferationsrate in der ATG-Gruppe als eher gering einzuschätzen ist.

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit stellt die Induktion von CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg} aus CD4⁺/ CD25⁻ T_{con} dar. *Lopez et al.* depletierten CD25⁺ T-Zellen in Proben aus dem peripheren Blut. Nach 24-stündiger *in vitro*-Inkubation mit ATG verzeichneten sie einen signifikanten Anstieg der CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg}. Diese Zellen erwiesen sich in zusätzlichen Lymphozytensuppressionstests als funktional. [Lopez et al. 2006]

Dass ein bestimmter Anteil der CD4⁺/ CD25⁻ T-Zellen foxP3 exprimiert, ist bekannt. [Roncador et al. 2005] In einer Studie konnten *Fontenot et al.* zeigen, dass nach einer Depletion dieser Zellpopulation eine De-novo-Expression von foxP3 weder *in vitro* noch *in vivo* möglich war. [Fontenot et al. 2005] Ohne die CD4⁺/ CD25⁻ T_{con} scheint folglich keine Expansion von T_{reg} möglich zu sein. Diese Beobachtung bildet ein weiteres wichtiges Argument für eine Induktion von CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ T_{reg} aus einer bereits existierenden Zellgruppe, nämlich den CD4⁺/ CD25⁻ T_{con}, in der Peripherie oder im Thymus. Auch die vorliegenden Daten deuten auf diesen Mechanismus hin. Erst im Verlauf nach der Transplantation stellten sich höhere T_{reg}-Anteile der CD4⁺ Th-Zellen mit signifikant niedrigeren Th-Zellen in der ATG-Gruppe ein, was dafür spricht, dass eine Induktion von CD4⁺/ CD25⁻ T_{con} stattgefunden haben muss.

Wenngleich die soeben diskutierten Trends höherer T_{reg}-Anteile in der ATG-Gruppe vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl meist nur knapp außerhalb des Signifikanzniveaus lagen, so waren sie dennoch in allen untersuchten T_{reg}-Populationen sichtbar. (siehe 3.4) Zwar muss davon ausgegangen werden, dass ein statistisch signifikanter Unterschied in einer kleinen Studienpopulation wie in der vorliegenden Untersuchung mit hoher Wahrscheinlichkeit wirklich vorhanden ist.

Nichtsdestotrotz konnten die beschriebenen Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahl lediglich deskriptiv als Trends und Tendenzen wiedergegeben werden. Zusammenfassend kann aber dennoch festgestellt werden, dass die hier vorliegenden Daten erste Hinweise für eine mögliche ATG-induzierte T_{reg}-Expansion *in vivo* im Menschen bieten, welche pharmakodynamisch bedingt insbesondere während der frühen Posttransplantationsphase nachweisbar zu sein scheint.

4.4 Zum klinischen Verlauf.

Die Dynamik der zellulären Immunrekonstitution nach allogener SZT und der klinische Zustand der Patienten, insbesondere das Auftreten einer GvHD, sind eng miteinander verbunden und beeinflussen sich gegenseitig. Eine verzögerte Immunrekonstitution kann Ursache und Folge einer GvHD zugleich sein. *Kook et al.* beschrieben in ihren Untersuchungen an 102 pädiatrischen Patienten nach allogener unverwandter SZT eine verzögerte Erholung der CD3⁺ T-Zellen, der CD4⁺ Th-Zellen und der CD19⁺/ CD20⁺ Memory-B-Zellen, nachdem diese eine GvHD entwickelt hatten. [Kook et al. 1996] *Pavletic et al.* hingegen konstatierten eine signifikante Korrelation zwischen einer schnellen Erholung der Lymphozytenpopulationen und einem besseren Gesamtüberleben, d.h. einer schnelleren Immunrekonstitution bei ausbleibender GvHD. [Pavletic et al. 1998] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der klinische Status von acht Patienten nach allogener SZT bis zum Tag +150 dokumentiert, mit besonderem Blick auf die Inzidenz der GvHD. Seit dem Jahr 2005 gilt *Glucksberg's* klassische Einteilung aus dem Jahr 1974 mit ihrer Grenze von 100 Tagen für die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer GvHD als veraltet. Vor dem Hintergrund der neuen dosisreduzierten Konditionierungsschemata und der Gabe von Spender-Lymphozyten (DLI) nach der SZT wurde der veränderten Kinetik der GvHD im aktuellen NIH-Konsensus (National Institutes of Health) eine größere Bedeutung beigemessen als bisher. Unter Berücksichtigung der aktuellen pathophysiologischen Erkenntnisse werden deshalb neben der klassischen akuten GvHD die verzögerte akute GvHD, welche nach Tag +100 und bei DLI jederzeit auftreten kann, sowie das so genannte Overlap-Syndrom zwischen akuter und chronischer GvHD eingeführt, in dem die Manifestation beider GvHD-Formen präsent sind, unterschieden. [Filipovich et al. 2005] Trotz dieser neuen Erkenntnisse erfolgte die Dokumentation der GvHD aufgrund leichter Handhabbarkeit in der klinischen Routine im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ausschließlich entsprechend der klassischen Stadieneinteilung der akuten und chronischen GvHD nach *Glucksberg et al.* (Tab. 6 und 7).

Einflussfaktoren auf den klinischen Verlauf. Sowohl chronische als auch akute GvHD traten in den mit ATG behandelten Patienten seltener auf. Demgegenüber entwickelten drei der Patienten ohne ATG eine ausgeprägte extensive chronische GvHD. (Tab. 24)

ATGs [Bacigalupo et al. 2001a; Deeg et al. 2006] und T_{reg} , zumindest im Mausmodell, [Edinger et al. 2003; Hoffmann et al. 2002] können die Inzidenz sowohl einer akuten als auch einer chronischen GvHD effektiv verringern. (siehe 4.2 und 4.3) Vor dem Hintergrund der gleich verteilten Patientencharakteristika in beiden Gruppen (siehe 2.1) lässt sich deshalb schlussfolgern, dass die ATG-Gabe und die höheren T_{reg} -Anteile der $CD4^+$ Th-Zellen bei den ATG-Patienten zumindest einen großen Teil zu der oben beschriebenen geringergradigen Ausbildung von akuter und chronischer GvHD in der ATG-Gruppe beigetragen haben. Allerdings muss dieser Unterschied vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl auch hier vorsichtig betrachtet werden.

Weiterführend entwickelten die Patienten der ATG-Gruppe innerhalb des Beobachtungszeitraumes häufigere und länger andauernde CMV-Reaktivierungen mit erhöhter Viruslast im Plasma im Vergleich zu den Patienten ohne ATG (Tab. 24). Dieser Unterschied könnte sich anhand des Wirkspektrums der ATGs erklären lassen. Durch die ausgeprägte T-Zelldepletion und die wahrscheinliche Induktion von immunsuppressorischen T_{reg} (siehe 4.2 und 4.3) wird die Funktionalität des adaptiven Immunsystems stark eingeschränkt. Das damit verbundene erhöhte Risiko von Infektionen oder Virusreaktivierungen wurde in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen und spiegelt sich auch in den vorliegenden Daten wieder. [Bacigalupo et al. 2001a; Mattei et al. 2007; Mohty et al. 2003]

Schließlich muss jedoch eingeräumt werden, dass die beobachteten Unterschiede in Bezug auf den klinischen Zustand in beiden Gruppen zwar sichtbar waren. Bezüglich einer eventuell vorliegenden Kausalität können jedoch mit Hilfe der vorliegenden Daten keine Aussagen getroffen werden.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Regulatorische T-Zellen stellen eine äußerst interessante Zellpopulation für die Transplantationsmedizin dar, da sie in der Lage zu sein scheinen eine Trennung von GvHD und GvL-Effekt nach allogener SZT beeinflussen zu können. Die Expansion von T_{reg} mit anschließendem adoptivem Zelltransfer ist ein diesbezüglich viel versprechender Therapieansatz. Obwohl es gelang T_{reg} selektiv *in vitro* mit erhaltener regulatorischer Funktion zu expandieren [Battaglia et al. 2005], ist die *in vitro*-Expansion von T_{reg} auch aufgrund ihres physiologisch sehr geringen Anteils am humanen T-Zellkompartiment von einem bis zwei Prozent schwierig und noch weit entfernt von einem regulären Einsatz in der Klinik.

Seit zwei Jahren ist bekannt, dass die im Rahmen der Konditionierungstherapie vor allogener SZT eingesetzten ATGs in der Lage sind *in vitro* eine Bildung von $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+ T_{reg}$ aus $CD4^+ / CD25^- T_{con}$ zu induzieren. Ein solcher Effekt könnte *in vivo* viele methodische Probleme des adoptiven Zelltransfers umgehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand von acht Patienten die zelluläre Immunrestitution nach allogener hämatopoetischer SZT mit und ohne vorherige Gabe von ATG in einem Zeitraum von 150 Tagen nach der Transplantation untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Entwicklung der relativen T_{reg} -Zahlen. Es wurden drei T_{reg} -Populationen analysiert: $CD4^+ / CD25^+ / CD127^{low/-}$, $CD4^+ / CD25^+ / foxP3^+$ und $CD25^+ / foxP3^+ / CD127^{low/-}$. Zusätzlich wurde der klinische Verlauf der Patienten anhand des Auftretens von Infektionen sowie einer GvHD dokumentiert.

Alle Patienten zeigten ein frühes Engraftment und entwickelten einen vollständigen Spenderchimärismus. Nach der Transplantation bot das zelluläre unspezifische Immunsystem eine rasche Reconstitution. Die T-lymphozytären Populationen des adaptiven Immunsystems hingegen erreichten erst sehr spät Normalwerte. Hier stellte sich ATG als ein wichtiger hemmender Einflussfaktor vor allem auf die Reconstitution der $CD4^+$ Th-Zellen heraus, welche signifikant geringere Zellzahlen nach ATG-Gabe boten. Gleichzeitig wurden in der ATG-Gruppe deutlich höhere T_{reg} -Anteile an den Th-Zellen in allen drei T_{reg} -Populationen während der Posttransplantationsphase beobachtet. Hinsichtlich der klinischen Entwicklung wurden bei ATG-Patienten weniger ausgeprägte GvHD-Verläufe bei gleichzeitig erhöhtem Infektionsrisiko für CMV und EBV festgestellt, wenngleich diesbezüglich aufgrund der geringen Fallzahl keine kausalen Zusammenhänge nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten schließlich erste Hinweise dafür, dass ATG im Rahmen der Konditionierungstherapie vor allogener SZT nicht nur CD4⁺/CD25⁺/foxP3⁺ sondern auch CD4⁺/CD25⁺/CD127^{low/-} und CD25⁺/foxP3⁺/CD127^{low/-} T_{reg} *in vivo* im Menschen induzieren kann. Als wahrscheinlichster Mechanismus wurde dabei die Induktion von T_{reg} aus CD4⁺/CD25⁻ T_{con} diskutiert. (siehe 4.3)

Die Vielfältigkeit der Einflussfaktoren auf die zelluläre Immunrestitution nach allogener SZT macht eine Untersuchung der Posttransplantationsphase schwierig. Größere Fallzahlen im Rahmen randomisierter Studien werden deshalb nötig sein, um den Prozess der zellulären Immunrestitution unabhängig von den zahlreichen Störgrößen analysieren zu können. Eine Fokussierung auf die frühe Posttransplantationsphase vor dem Hintergrund der Pharmakokinetik der ATGs könnte sich ebenso als nützlich erweisen.

Schließlich wird ein weiterer notwendiger Schritt die Überprüfung der Funktionalität der T_{reg} mit und ohne ATG-Gabe sein. Dies könnte mit Hilfe eines T-Zellstimulationstestes erreicht werden. Hierfür eignet sich ein *in vitro*-Suppressions-Assay. Aktivierte T_{reg} können im Rahmen dieses Testes effektiv eine anit-CD3 stimulierte T_{eff}-Proliferation inhibieren. Nach einer Kultivierung der T-Lymphozyten mit ³H-Thymidin kann mit Hilfe eines β-Szintillationszählers der Einbau des ³H-Thymidins in die DNA der T_{eff}-Zellen bestimmt werden. Funktionale T_{reg} können schließlich aufgrund ihrer suppressorischen Eigenschaften den Anteil des eingebauten ³H-Thymidins durch die verzögerte Proliferation messbar verringern. [Thornton und Shevach 1998]

Weitergehend könnte sich die Untersuchung der Kinetik spezieller T_{reg}-Zytokine, wie zum Beispiel TGF-β, in der Zukunft ebenfalls als wertvoll erweisen. TGF-β wird unter anderem von T_{reg} sezerniert [Roncarolo et al. 2006; Zheng 2008] und scheint zudem eine Induktion von CD4⁺/CD25⁺ T-Lymphozyten mit ausgeprägten regulatorischen Eigenschaften aus CD4⁺/CD25⁻ T_{con} zu fördern. [Yamagiwa et al. 2001; Zheng et al. 2004]

Abschließend stellt die Verwendung von ATGs zur *in vivo*-Expansion von T_{reg} einen interessanten Ansatz für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte dar. Es wäre denkbar geringere Dosen ATG über einen längeren Zeitraum im Sinne einer gepulsten T_{reg}-Induktion nach allogener PBSCT zu verabreichen, um so eine gezielte Verringerung des GvHD-Risikos bei erhaltenem therapeutischen GvL-Effekt zu erreichen. Wenngleich die Probleme der ATG-abhängigen Erhöhung des viralen Infektionsrisikos bisher ungelöst sind, könnte die durch eine *in vivo* T_{reg}-Expansion erreichte Senkung der therapie-assoziierten Mortalität die Sicherheit der allogenen SZT als eine der wichtigsten Therapieformen für die Hämatookologie entscheidend verbessern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- AHMADZADEH M, ROSENBERG SA:** TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* **174** (2005) 5215-23
- ALCINDOR T, GORGUN G, MILLER KB, ROBERTS TF, SPRAGUE K, SCHENKEIN DP, FOSS FM:** Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* **98** (2001) 1622-5
- ANDERSON BE, MCNIFF JM, JAIN D, BLAZAR BR, SHLOMCHIK WD, SHLOMCHIK MJ:** Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* **105** (2005) 2227-34
- ANICHINI A, SCARITO A, MOLLA A, PARMIANI G, MORTARINI R:** Differentiation of CD8+ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common gamma-chain cytokines. *J Immunol* **171** (2003) 2134-41
- AUFFERMANN-GRETZINGER S, LOSSOS IS, VAYNTRUB TA, LEONG W, GRUMET FC, BLUME KG, STOCKERL-GOLDSTEIN KE, LEVY R, SHIZURU JA:** Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* **99** (2002) 1442-8
- BACIGALUPO A, LAMPARELLI T, BRUZZI P, GUIDI S, ALESSANDRINO PE, DI BARTOLOMEO P, ONETO R, BRUNO B, BARBANTI M, SACCHI N, VAN LINT MT, BOSI A:** Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* **98** (2001a) 2942-7
- BACIGALUPO A, ONETO R, LAMPARELLI T, GUALANDI F, BREGANTE S, RAIOLA AM, DI GRAZIA C, DOMINIETTO A, ROMAGNANI C, BRUNO B, VAN LINT MT, FRASSONI F:** Pre-emptive therapy of acute graft-versus-host disease: a pilot study with antithymocyte globulin (ATG). *Bone Marrow Transplant* **28** (2001b) 1093-6
- BAECHER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFLER DA:** CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* **167** (2001) 1245-53
- BARON F, BAKER JE, STORB R, GOOLEY TA, SANDMAIER BM, MARIS MB, MALONEY DG, HEIMFELD S, OPARIN D, ZELLMER E, RADICH JP, GRUMET FC, BLUME KG, CHAUNCEY TR, LITTLE MT:** Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* **104** (2004) 2254-62
- BARON F, MARIS MB, STORER BE, SANDMAIER BM, PANSE JP, CHAUNCEY TR, SORROR M, LITTLE MT, MALONEY DG, STORB R, HEIMFELD S:** High doses of transplanted CD34+ cells are associated with rapid T-cell engraftment and lessened risk of graft rejection, but not more graft-versus-host disease after nonmyeloablative conditioning and unrelated hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* **19** (2005) 822-8
- BARON F, SANDMAIER BM:** Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* **20** (2006) 1690-700

- BARRETT J:** Improving outcome of allogeneic stem cell transplantation by immunomodulation of the early post-transplant environment. *Curr Opin Immunol* **18** (2006) 592-8
- BASARA N, BLAU WI, KIEHL MG, SCHMETZER B, BISCHOFF M, KIRSTEN D, GUNZELMANN S, FAUSER AA:** Mycophenolate mofetil for the prophylaxis of acute GVHD in HLA-mismatched bone marrow transplant patients. *Clin Transplant* **14** (2000) 121-6
- BATTAGLIA M, STABILINI A, RONCAROLO MG:** Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* **105** (2005) 4743-8
- BEIRAS-FERNANDEZ A, THEIN E, HAMMER C:** Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp Clin Transplant* **1** (2003) 79-84
- BENNETT CL, CHRISTIE J, RAMSDELL F, BRUNKOW ME, FERGUSON PJ, WHITESSELL L, KELLY TE, SAULSBURY FT, CHANCE PF, OCHS HD:** The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* **27** (2001) 20-1
- BLAISE D, VEY N, FAUCHER C, MOHTY M:** Current status of reduced-intensity-conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* **92** (2007) 533-41
- BONNEFOY-BERARD N, REVILLARD JP:** Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant* **15** (1996) 435-42
- BRUNKOW ME, JEFFERY EW, HJERRILD KA, PAEPER B, CLARK LB, YASAYKO SA, WILKINSON JE, GALAS D, ZIEGLER SF, RAMSDELL F:** Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27** (2001) 68-73
- BUNN D, LEA CK, BEVAN DJ, HIGGINS RM, HENDRY BM:** The pharmacokinetics of anti-thymocyte globulin (ATG) following intravenous infusion in man. *Clin Nephrol* **45** (1996) 29-32
- BYRNE JL, STAINER C, CULL G, HAYNES AP, BESSELL EM, HALE G, WALDMANN H, RUSSELL NH:** The effect of the serotherapy regimen used and the marrow cell dose received on rejection, graft-versus-host disease and outcome following unrelated donor bone marrow transplantation for leukaemia. *Bone Marrow Transplant* **25** (2000) 411-7
- CARVALLO C, GELLER N, KURLANDER R, SRINIVASAN R, MENA O, IGARASHI T, GRIFFITH LM, LINEHAN WM, CHILDS RW:** Prior chemotherapy and allograft CD34+ dose impact donor engraftment following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in patients with solid tumors. *Blood* **103** (2004) 1560-3
- CEDERBOM L, HALL H, IVARS F:** CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* **30** (2000) 1538-43
- CHAMPLIN RE, SCHMITZ N, HOROWITZ MM, CHAPUIS B, CHOPRA R, CORNELISSEN JJ, GALE RP, GOLDMAN JM, LOBERIZA FR, JR., HERTENSTEIN B, KLEIN JP, MONTSERRAT E, ZHANG MJ, RINGDEN O, TOMANY SC, ROWLINGS PA, VAN HOEF ME, GRATWOHL A:** Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* **95** (2000) 3702-9

CHATILA TA, BLAESER F, HO N, LEDERMAN HM, VOULGAROPOULOS C, HELMS C, BOWCOCK AM: JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* **106** (2000) R75-81

CHKLOVSKAIA E, NOWBAKHT P, NISSEN C, GRATWOHL A, BARGETZI M, WODNAR-FILIPOWICZ A: Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood* **103** (2004) 3860-8

CRADDOCK CF: Full-intensity and reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in AML. *Bone Marrow Transplant* **41** (2008) 415-23

DAZZI F, SZYDLO RM, CROSS NC, CRADDOCK C, KAEDA J, KANFER E, CWYNARSKI K, OLAVARRIA E, YONG A, APPERLEY JF, GOLDMAN JM: Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* **96** (2000) 2712-6

DE PAUW L, TOUNGOUZ M, GOLDMAN M: Infusion of donor-derived hematopoietic stem cells in organ transplantation: clinical data. *Transplantation* **75** (2003) 46S-49S

DEEG HJ, STORER BE, BOECKH M, MARTIN PJ, MCCUNE JS, MYERSON D, HEIMFELD S, FLOWERS ME, ANASETTI C, DONEY KC, HANSEN JA, KIEM HP, NASH RA, O'DONNELL PV, RADICH JP, SANDMAIER BM, SCOTT BL, SORROR ML, WARREN EH, WITHERSPOON RP, WOOLFREY A, APPELBAUM FR, STORB R: Reduced incidence of acute and chronic graft-versus-host disease with the addition of thymoglobulin to a targeted busulfan/cyclophosphamide regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* **12** (2006) 573-84

EDINGER M, HOFFMANN P, ERMANN J, DRAGO K, FATHMAN CG, STROBER S, NEGRIN RS: CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* **9** (2003) 1144-50

EYRICH M, LEILER C, LANG P, SCHILBACH K, SCHUMM M, BADER P, GREIL J, KLINGEBIEL T, HANDGRETINGER R, NIETHAMMER D, SCHLEGEL PG: A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant* **32** (2003) 379-90

FERRARA JL, LEVY R, CHAO NJ: Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **5** (1999) 347-56

FILIPOVICH AH, WEISDORF D, PAVLETIC S, SOCIE G, WINGARD JR, LEE SJ, MARTIN P, CHIEN J, PRZEPIORKA D, COURIEL D, COWEN EW, DINNDORF P, FARRELL A, HARTZMAN R, HENSLEE-DOWNEY J, JACOBSON D, McDONALD G, MITTLEMAN B, RIZZO JD, ROBINSON M, SCHUBERT M, SCHULTZ K, SHULMAN H, TURNER M, VOGELSANG G, FLOWERS ME: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* **11** (2005) 945-56

FONTENOT JD, RASMUSSEN JP, WILLIAMS LM, DOOLEY JL, FARR AG, RUDENSKY AY: Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22** (2005) 329-41

FRY TJ, MONIUSZKO M, CREEKMORE S, DONOHUE SJ, DOUEK DC, GIARDINA S, HECHT TT, HILL BJ, KOMSCHLIES K, TOMASZEWSKI J, FRANCHINI G, MACKALL CL: IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* **101** (2003) 2294-9

GALE RP, HOROWITZ MM: Graft-versus-leukemia in bone marrow transplantation. The Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant* **6 Suppl 1** (1990) 94-7

GENESTIER L, FOURNEL S, FLACHER M, ASSOSSOU O, REVILLARD JP, BONNEFOY-BERARD N: Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* **91** (1998) 2360-8

GIEBEL S, DZIACZKOWSKA J, WOJNAR J, KRAWCZYK-KULIS M, MARKIEWICZ M, KRUZEL T, WYLEZOL I, NOWAK K, JAGODA K, HOLOWIECKI J: The impact of immunosuppressive therapy on an early quantitative NK cell reconstitution after allogeneic haematopoietic cell transplantation. *Ann Transplant* **10** (2005) 29-33

GLUCKMAN E, BROXMEYER HA, AUERBACH AD, FRIEDMAN HS, DOUGLAS GW, DEVERGIE A, ESPEROU H, THIERRY D, SOCIE G, LEHN P, ET AL.: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321** (1989) 1174-8

GLUCKSBERG H, STORB R, FEFER A, BUCKNER CD, NEIMAN PE, CLIFT RA, LERNER KG, THOMAS ED: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18** (1974) 295-304

GODFREY WR, SPODEN DJ, GE YG, BAKER SR, LIU B, LEVINE BL, JUNE CH, BLAZAR BR, PORTER SB: Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* **105** (2005) 750-8

GOLDMAN JM, SCHMITZ N, NIETHAMMER D, GRATWOHL A: Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1998. Accreditation Sub-Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* **21** (1998) 1-7

GRATWOHL A, BALDOMERO H, HORISBERGER B, SCHMID C, PASSWEG J, URBANO-ISPIZUA A: Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* **100** (2002) 2374-86

GUARDIOLA P, RUNDE V, BACIGALUPO A, RUUTU T, LOCATELLI F, BOOGAERTS MA, PAGLIUCA A, CORNELISSEN JJ, SCHOUTEN HC, CARRERAS E, FINKE J, VAN BIEZEN A, BRAND R, NIEDERWIESER D, GLUCKMAN E, DE WITTE TM: Retrospective comparison of bone marrow and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic stem cell transplantation using HLA identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* **99** (2002) 4370-8

HANASH AM, LEVY RB: Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* **105** (2005) 1828-36

HARTIGAN-O'CONNOR DJ, POON C, SINCLAIR E, MCCUNE JM: Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* **319** (2007) 41-52

HAUZENBERGER D, SCHAFFER M, RINGDEN O, HASSAN Z, OMAZIC B, MATTSSON J, WIKSTROM AC, REMBERGER M: Outcome of haematopoietic stem cell transplantation in patients transplanted with matched unrelated donors vs allele-mismatched donors: a single centre study. *Tissue Antigens* (2008)

HAYNES BF, MARKERT ML, SEMPOWSKI GD, PATEL DD, HALE LP: The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* **18** (2000) 529-60

- HEITGER A**, NEU N, KERN H, PANZER-GRUMAYER ER, GREINIX H, NACHBAUR D, NIEDERWIESER D, FINK FM: Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **90** (1997) 850-7
- HO VT**, SOIFFER RJ: The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **98** (2001) 3192-204
- HOFFMANN P**, ERMANN J, EDINGER M, FATHMAN CG, STROBER S: Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* **196** (2002) 389-99
- HOLLER E**, REICHLER A, HAHN J, ANDREESEN R: Stammzelltransplantation bei akuten und chronischen Leukämien - aktuelle Entwicklungen. *Journal Onkologie Online* **03** (2003)
- HONG M**, LI JY, QIAN SX, WU HX, LU H, ZHANG R, ZHANG XY, XU W: [Immune reconstitution after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **16** (2008) 1130-4
- JACOBSON LO**, MARKS EK, ET AL.: The role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med* **70** (1949) 740-2
- JOFFRE O**, GORSSE N, ROMAGNOLI P, HUDRISIER D, VAN MEERWIJK JP: Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* **103** (2004) 4216-21
- KABOURIDIS PS**, JURY EC: Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett* **582** (2008) 3711-8
- KHAN F**, AGARWAL A, AGRAWAL S: Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* **34** (2004) 1-12
- KOLB HJ**, MITTERMULLER J, CLEMM C, HOLLER E, LEDDEROSE G, BREHM G, HEIM M, WILMANN W: Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* **76** (1990) 2462-5
- KOOK H**, GOLDMAN F, PADLEY D, GILLER R, RUMELHART S, HOLIDA M, LEE N, PETERS C, COMITO M, HULING D, TRIGG M: Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery. *Blood* **88** (1996) 1089-97
- KORBLING M**, ANDERLINI P: Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* **98** (2001) 2900-8
- KORBLING M**, BURKE P, BRAINE H, ELFENBEIN G, SANTOS G, KAIZER H: Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* **9** (1981) 684-90
- KRENGER W**, HILL GR, FERRARA JL: Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* **64** (1997) 553-8
- KROGER N**: Mini-Midi-Maxi? How to harness the graft-versus-myeloma effect and target molecular remission after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **21** (2007) 1851-8

KRÖGER N: Konditionierung. In: KRÖGER N, ZANDER AR (Hrsg.): *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. UNI-MED Verlag, Bremen, 2008, S. 76 - 80

KROGER N, ZELLER W, HASSAN HT, KRUGER W, GUTENSOHN K, LOLIGER C, ZANDER AR: Stem cell mobilization with G-CSF alone in breast cancer patients: higher progenitor cell yield by delivering divided doses (2 x 5 microg/kg) compared to a single dose (1 x 10 microg/kg). *Bone Marrow Transplant* **23** (1999) 125-9

LAROSA F, MARMIER C, ROBINET E, FERRAND C, SAAS P, DECONINCK E, BULABOIS CE, ROHRLICH PS, LEDU K, HELIAS P, TIBERGHEN P, CAHN JY: Peripheral T-cell expansion and low infection rate after reduced-intensity conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* **35** (2005) 859-68

LAURENCE J: T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Ann Intern Med* **119** (1993) 55-62

LAZARUS HM, KOC ON, DEVINE SM, CURTIN P, MAZIARZ RT, HOLLAND HK, SHPALL EJ, MCCARTHY P, ATKINSON K, COOPER BW, GERSON SL, LAUGHLIN MJ, LOBERIZA FR, JR., MOSELEY AB, BACIGALUPO A: Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* **11** (2005) 389-98

LENNARD AL, JACKSON GH: Stem cell transplantation. *BMJ* **321** (2000) 433-7

LEVINGS MK, RONCAROLO MG: Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **293** (2005) 303-26

LI Y, ZHI W, WARESKI P, WENG NP: IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* **174** (2005) 4019-24

LIM HW, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH: Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **175** (2005) 4180-3

LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, SZOT GL, LEE MR, ZHU S, GOTTLIEB PA, KAPRANOV P, GINGERAS TR, FAZEKAS DE ST GROTH B, CLAYBERGER C, SOPER DM, ZIEGLER SF, BLUESTONE JA: CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* **203** (2006) 1701-11

LONG EO: Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* **224** (2008) 70-84

LOPEZ M, CLARKSON MR, ALBIN M, SAYEGH MH, NAJAFIAN N: A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* **17** (2006) 2844-53

LORENZ E, CONGDON CC: Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *J Natl Cancer Inst* **14** (1954) 955-65

LUCAS PJ, KIM SJ, MACKALL CL, TELFORD WG, CHU YW, HAKIM FT, GRESS RE: Dysregulation of IL-15-mediated T-cell homeostasis in TGF-beta dominant-negative receptor transgenic mice. *Blood* **108** (2006) 2789-95

LUCAS PJ, KIM SJ, MELBY SJ, GRESS RE: Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *J Exp Med* **191** (2000) 1187-96

MACKALL CL, FLEISHER TA, BROWN MR, ANDRICH MP, CHEN CC, FEUERSTEIN IM, HOROWITZ ME, MAGRATH IT, SHAD AT, STEINBERG SM, ET AL.: Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* **332** (1995) 143-9

MACKALL CL, GRESS RE: Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev* **157** (1997) 61-72

MARMONT AM, HOROWITZ MM, GALE RP, SOBOCINSKI K, ASH RC, VAN BEKKUM DW, CHAMPLIN RE, DICKE KA, GOLDMAN JM, GOOD RA, ET AL.: T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78** (1991) 2120-30

MARTIN PJ, HANSEN JA, BUCKNER CD, SANDERS JE, DEEG HJ, STEWART P, APPELBAUM FR, CLIFT R, FEFER A, WITHERSPOON RP, ET AL.: Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* **66** (1985) 664-72

MATTEI MF, REDONNET M, GANDJBAKHCH I, BANDINI AM, BILLES A, EPAILLY E, GUILLEMAIN R, LELONG B, POL A, TREILHAUD M, VERMES E, DORENT R, LEMAY D, BLANC AS, BOISSONNAT P: Lower risk of infectious deaths in cardiac transplant patients receiving basiliximab versus anti-thymocyte globulin as induction therapy. *J Heart Lung Transplant* **26** (2007) 693-9

MATTSSON J, UZUNEL M, BRUNE M, HENTSCHE P, BARKHOLT L, STIERNER U, ASCHAN J, RINGDEN O: Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* **115** (2001) 935-44

MAVROUDIS D, READ E, COTTLER-FOX M, COURIEL D, MOLLDREM J, CARTER C, YU M, DUNBAR C, BARRETT J: CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* **88** (1996) 3223-9

MIELCAREK M, MARTIN PJ, LEISENRING W, FLOWERS ME, MALONEY DG, SANDMAIER BM, MARIS MB, STORB R: Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **102** (2003) 756-62

MOHTY M: Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* **21** (2007) 1387-94

MOHTY M, JACOT W, FAUCHER C, BAY JO, ZANDOTTI C, COLLET L, CHOUFI B, BILGER K, TOURNILHAC O, VEY N, STOPPA AM, COSO D, GASTAUT JA, VIENS P, MARANINCHI D, OLIVE D, BLAISE D: Infectious complications following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with antithymocyte globulin-based reduced intensity preparative regimen. *Leukemia* **17** (2003) 2168-77

MOURA R, AGUA-DOCE A, WEINMANN P, GRACA L, FONSECA JE: B cells from the bench to the clinical practice. *Acta Reumatol Port* **33** (2008) 137-54

- NASH RA**, ANTIN JH, KARANES C, FAY JW, AVALOS BR, YEAGER AM, PRZEPIORKA D, DAVIES S, PETERSEN FB, BARTELS P, BUELL D, FITZSIMMONS W, ANASETTI C, STORB R, RATANATHARATHORN V: Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* **96** (2000) 2062-8
- OSGOOD EE**, RIDDLE MC, MATTHEWS TJ: Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow. Case report. *Ann Intern Med* **13** (1939) 357-367
- OTTINGER HD**, BEELEN DW, SCHEULEN B, SCHAEFER UW, GROSSE-WILDE H: Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* **88** (1996) 2775-9
- PAVLETIC ZS**, JOSHI SS, PIRRUCCELLO SJ, TARANTOLO SR, KOLLATH J, REED EC, BIERMAN PJ, VOSE JM, WARKENTIN PI, GROSS TG, NASRATI K, ARMITAGE JO, KESSINGER A, BISHOP MR: Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* **21** (1998) 33-41
- PENACK O**, FISCHER L, GENTILINI C, NOGAI A, MUESSIG A, RIEGER K, GANEPOLA S, THIEL E, UHAREK L: The type of ATG matters -- natural killer cells are influenced differentially by Thymoglobulin, Lymphoglobulin and ATG-Fresenius. *Transpl Immunol* **18** (2007) 85-7
- PICCIRILLO CA**, SHEVACH EM: Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* **167** (2001) 1137-40
- PICHLMAYR R**: [Studies on heterologous antilymphocyte sera and their importance for organ transplantation]. *Med Klin* **61** (1966) 895-6
- PISTILLO MP**, TAZZARI PL, BONIFAZI F, BANDINI G, KATO T, MATSUI T, NISHIOKA K, CONTE R, FERRARA GB: Detection of a novel specificity (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemic patients. *Transplantation* **73** (2002) 1295-302
- PREVILLE X**, FLACHER M, LEMAUFF B, BEAUCHARD S, DAVELU P, TIOLLIER J, REVILLARD JP: Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* **71** (2001) 460-8
- 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: Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* **94** (1999) 1465-70
- REBELLATO LM**, GROSS U, VERBANAC KM, THOMAS JM: A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* **57** (1994) 685-94
- REMBERGER M**, SUNDBERG B: Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica* **90** (2005) 931-8

- ROCHA V**, CORNISH J, SIEVERS EL, FILIPOVICH A, LOCATELLI F, PETERS C, REMBERGER M, MICHEL G, ARCESE W, DALLORSO S, TIEDEMANN K, BUSCA A, CHAN KW, KATO S, ORTEGA J, VOWELS M, ZANDER A, SOUILLET G, OAKILL A, WOOLFREY A, PAY AL, GREEN A, GARNIER F, IONESCU I, WERNET P, SIRCHIA G, RUBINSTEIN P, CHEVRET S, GLUCKMAN E: Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* **97** (2001) 2962-71
- RONCADOR G**, BROWN PJ, MAESTRE L, HUE S, MARTINEZ-TORRECUADRADA JL, LING KL, PRATAP S, TOMS C, FOX BC, CERUNDOLO V, POWRIE F, BANHAM AH: Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* **35** (2005) 1681-91
- RONCAROLO MG**, GREGORI S, BATTAGLIA M, BACCHETTA R, FLEISCHHAUER K, LEVINGS MK: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* **212** (2006) 28-50
- ROSENBERG SA**, SPORTES C, AHMADZADEH M, FRY TJ, NGO LT, SCHWARZ SL, STETLER-STEVENSON M, MORTON KE, MAVROUKAKIS SA, MORRE M, BUFFET R, MACKALL CL, GRESS RE: IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother* **29** (2006) 313-9
- RUBINSTEIN P**, CARRIER C, SCARADAVOU A, KURTZBERG J, ADAMSON J, MIGLIACCIO AR, BERKOWITZ RL, CABBAD M, DOBRILA NL, TAYLOR PE, ROSENFIELD RE, STEVENS CE: Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* **339** (1998) 1565-77
- RUGGERI L**, CAPANNI M, MARTELLI MF, VELARDI A: Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol* **8** (2001) 355-9
- RUZEK MC**, WAIRE JS, HOPKINS D, LACORCIA G, SULLIVAN J, ROBERTS BL, RICHARDS SM, NAHILL SR, WILLIAMS JM, SCARIA A, DZURIS J, SHANKARA S, GARMAN RD: Characterization of in vitro antimurine thymocyte globulin-induced regulatory T cells that inhibit graft-versus-host disease in vivo. *Blood* **111** (2008) 1726-34
- SAKAGUCHI S**, SAKAGUCHI N, ASANO M, ITOH M, TODA M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155** (1995) 1151-64
- SALAMA AD**, NAJAFIAN N, CLARKSON MR, HARMON WE, SAYEGH MH: Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* **14** (2003) 1643-51
- SANDMAIER BM**, MACKINNON S, CHILDS RW: Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation: current perspectives. *Biol Blood Marrow Transplant* **13** (2007) 87-97
- SEDDIKI N**, SANTNER-NANAN B, MARTINSON J, ZAUNDERS J, SASSON S, LANDAY A, SOLOMON M, SELBY W, ALEXANDER SI, NANAN R, KELLEHER A, FAZEKAS DE ST GROTH B: Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* **203** (2006) 1693-700
- SEGAL AW**: How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23** (2005) 197-223

SHEN S, DING Y, TADOKORO CE, OLIVARES-VILLAGOMEZ D, CAMPS-RAMIREZ M, CUROTTO DE LAFAILLE MA, LAFAILLE JJ: Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J Clin Invest* **115** (2005) 3517-26

SHLOMCHIK WD, COUZENS MS, TANG CB, MCNIFF J, ROBERT ME, LIU J, SHLOMCHIK MJ, EMERSON SG: Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285** (1999) 412-5

SIERRA J, PEREZ WS, ROZMAN C, CARRERAS E, KLEIN JP, RIZZO JD, DAVIES SM, LAZARUS HM, BREDESON CN, MARKS DI, CANALS C, BOOGAERTS MA, GOLDMAN J, CHAMPLIN RE, KEATING A, WEISDORF DJ, DE WITTE TM, HOROWITZ MM: Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *Blood* **100** (2002) 1997-2004

SOCIE G, SALOOJA N, COHEN A, ROVELLI A, CARRERAS E, LOCASCIULLI A, KORTHOFF E, WEIS J, LEVY V, TICHELLI A: Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **101** (2003) 3373-85

STANZANI M, MARTINS SL, SALIBA RM, ST JOHN LS, BRYAN S, COURIEL D, MCMANNIS J, CHAMPLIN RE, MOLLDREM JJ, KOMANDURI KV: CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood* **103** (2004) 1140-6

STOREK J, DAWSON MA, STORER B, STEVENS-AYERS T, MALONEY DG, MARR KA, WITHERSPOON RP, BENSINGER W, FLOWERS ME, MARTIN P, STORB R, APPELBAUM FR, BOECKH M: Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* **97** (2001) 3380-9

STOREK J, FERRARA S, KU N, GIORGI JV, CHAMPLIN RE, SAXON A: B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* **12** (1993) 387-98

STRAUSS-AYALI D, CONRAD SM, MOSSER DM: Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* **82** (2007) 244-52

TAAMS LS, VAN AMELSFORT JM, TIEMESSEN MM, JACOBS KM, DE JONG EC, AKBAR AN, BIJLSMA JW, LAFEVER FP: Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol* **66** (2005) 222-30

TAYEBI H, TIBERGHIE P, FERRAND C, LIENARD A, DUPERRIER A, CAHN JY, LAPIERRE V, SAAS P, KUENTZ M, BLAISE D, HERVE P, ROBINET E: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation results in less alteration of early T cell compartment homeostasis than bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **27** (2001) 167-75

TAYLOR PA, LEES CJ, BLAZAR BR: The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* **99** (2002) 3493-9

THIEDE C, BORNHAUSER M, EHNINGER G: Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol* **112** (2004) 16-23

THOMAS ED, LOCHTE HL, JR., CANNON JH, SAHLER OD, FERREBEE JW: Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* **38** (1959) 1709-16

- THOMAS ED, STORB R:** Technique for human marrow grafting. *Blood* **36** (1970) 507-15
- THORNTON AM, SHEVACH EM:** CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* **188** (1998) 287-96
- TIMM MM, KIMLINGER TK, HAUG JL, KLINE MP, GREIPP PR, RAJKUMAR SV, KUMAR SK:** Thymoglobulin targets multiple plasma cell antigens and has in vitro and in vivo activity in multiple myeloma. *Leukemia* **20** (2006) 1863-9
- TROWBRIDGE IS:** CD45. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **266** (1991) 23517-20
- VIGORITO AC, CAMPREGHER PV, STORER BE, CARPENTER PA, MORAVEC CK, KIEM HP, FERRO ML, WARREN EH, LEE SJ, APPELBAUM FR, MARTIN PJ, FLOWERS ME:** Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood* **114** (2009) 702-8
- VITALE C, PITTO A, BENVENUTO F, PONTE M, BELLOMO R, FRASSONI F, MINGARI MC, BACIGALUPO A, MORETTA L:** Phenotypic and functional analysis of the HLA-class I-specific inhibitory receptors of natural killer cells isolated from peripheral blood of patients undergoing bone marrow transplantation from matched unrelated donors. *Hematol J* **1** (2000) 136-44
- WALKER MR, CARSON BD, NEPOM GT, ZIEGLER SF, BUCKNER JH:** De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005) 4103-8
- WALKER MR, KASPROWICZ DJ, GERSUK VH, BENARD A, VAN LANDEGHEM M, BUCKNER JH, ZIEGLER SF:** Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* **112** (2003) 1437-43
- WALLER EK, LANGSTON AA, LONIAL S, CHERRY J, SOMANI J, ALLEN AJ, ROSENTHAL H, REDEI I:** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **9** (2003) 460-71
- WEIDEN PL, FLOURNOY N, THOMAS ED, PRENTICE R, FEFER A, BUCKNER CD, STORB R:** Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* **300** (1979) 1068-73
- XIE XS, WAN DM, SUN H, SUN L, LIU LX, JIANG ZX:** [Peripheral blood stem cell transplantation for 53 patients with malignant hematologic diseases]. *Ai Zheng* **26** (2007) 403-6
- YAMAGIWA S, GRAY JD, HASHIMOTO S, HORWITZ DA:** A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* **166** (2001) 7282-9
- ZAND MS, VO T, HUGGINS J, FELGAR R, LIESVELD J, PELLEGRIN T, BOZORGZADEH A, SANZ I, BRIGGS BJ:** Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* **79** (2005) 1507-15
- ZANDER AR, AKSAMIT IA:** Immune recovery following bone marrow transplantation. In: JOHNSON FL, POCHEDLY C (Hrsg.): Bone Marrow Transplantation in Children. Raven Press Ltd., New York, 1990, S.

ZANDER AR, KROGER N, SCHLEUNING M, FINKE J, ZABELINA T, BEELEN D, SCHWERDTFEGER R, BAURMANN H, BORNHAUSER M, EHNINGER G, FAUSER AA, KIEHL M, TRENSCHEL R, OTTINGER HD, BERTZ H, BERGER J, KOLB HJ, SCHAEFER UW: ATG as part of the conditioning regimen reduces transplant-related mortality (TRM) and improves overall survival after unrelated stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Bone Marrow Transplant* **32** (2003) 355-61

ZAUCHA JM, GOOLEY T, BENSINGER WI, HEIMFELD S, CHAUNCEY TR, ZAUCHA R, MARTIN PJ, FLOWERS ME, STOREK J, GEORGES G, STORB R, TOROK-STORB B: CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood* **98** (2001) 3221-7

ZHENG SG: The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med* **1** (2008) 192-202

ZHENG SG, WANG JH, GRAY JD, SOUCIER H, HORWITZ DA: Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* **172** (2004) 5213-21

ZIKOS P, VAN LINT MT, FRASSONI F, LAMPARELLI T, GUALANDI F, OCCHINI D, MORDINI N, BERISSO G, BREGANTE S, DE STEFANO F, SORACCO M, VITALE V, BACIGALUPO A: Low transplant mortality in allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia: a randomized study of low-dose cyclosporin versus low-dose cyclosporin and low-dose methotrexate. *Blood* **91** (1998) 3503-8

8. THESEN

1. Die Ausgangsbedingungen aller Patienten der vorliegenden Untersuchungen sind bezüglich wichtiger grundlegender Einflussfaktoren auf die zelluläre Immunrekonstitution gut vergleichbar.
2. Die in dieser Studie transplantierten mononukleären und lymphozytären Zellzahlen sowie die Geschwindigkeit des Engraftments nach PBSCT decken sich mit den Erfahrungen der letzten zehn Jahre.
3. Das zelluläre unspezifische Immunsystem erholt sich am schnellsten nach PBSCT.
4. Prospektive Analysen des Einflusses von ATG auf die B-Zellrekonstitution in der frühen Rekonstitutionsphase nach allogener SZT werden sich auch in naher Zukunft als schwierig erweisen.
5. ATGs verzögern die Rekonstitution vor allem der CD4⁺ Th-Zellen signifikant.
6. Diese Arbeit bietet erste Hinweise dafür, dass ATGs nicht nur CD4⁺/ CD25⁺/ foxP3⁺ sondern auch CD4⁺/ CD25⁺/ CD127^{low/-} und CD25⁺/ foxP3⁺/ CD127^{low/-} T_{reg} aus CD4⁺/ CD25⁻ T_{con} *in vivo* im Menschen induzieren.
7. Der expansive ATG-Effekt findet dabei vorwiegend in der Peripherie statt und ist vor allem während der frühen Rekonstitutionsphase nachweisbar.
8. Unterschiede zwischen den einzelnen T_{reg}-Populationen in der vorliegenden Arbeit sind am ehesten methodisch bedingt, da alle den gleichen Trend zeigen.
9. Die durch ATG-Gabe *in vivo* erreichte T_{reg}-Expansion stellt einen interessanten Therapieansatz zur Senkung der GvHD-Inzidenz und der damit verbundenen therapieassoziierten Mortalität nach allogener SZT dar.

CURRICULUM VITAE

Name	André Reisberg
Geburtsdatum	19. Juli 1983
Geburtsort	Kyritz (heute Landkreis Ostprignitz-Ruppin/ Brandenburg)
Familienstand	ledig
Anschrift	Eichendorffstr. 35 06114 Halle /Saale
Eltern	Frank Reisberg, Dipl. Historiker Carmen Reisberg, Dipl. Lehrerin
Geschwister	Mathias Reisberg, Student (Pharmazie)
Schulbildung	<i>1990 - 1994</i> Grundschule Staßfurter Höhe, Aschersleben <i>1995 - 2003</i> Gymnasium Ascaneum, Aschersleben
Zivildienst	<i>Juni - Oktober 2003</i> Zivildienst im Kreiskrankenhaus Aschersleben-Staßfurt
Studium	<i>Oktober 2003 – Dezember 2009</i> Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Famulaturen	<i>März 2006</i> Unfallchirurgie, Klinikum Quedlinburg <i>August/ September 2006</i> Innere Medizin (Pulmonologie), Diakonie Halle <i>Februar/ März 2007</i> Nuklearmedizin, Strahlentherapie, Uniklinik Halle

	<i>Juli 2007</i>
	Diagnostische Radiologie, Halle
	<i>Juli /August 2007</i>
	Praxis für Allgemeinmedizin, Berlin
Praktisches Jahr	<i>18. August - 7. Dezember 2008</i>
	Innere Medizin, Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle
	<i>8. Dezember 2008 - 29. März 2009</i>
	Diagnostische Radiologie, Kantonales Spital, Grabs, Schweiz
	<i>30. März – 19. Juli 2009</i>
	Allgemein- und Viszeralchirurgie, Städtisches Klinikum Dessau
Prüfungen	<i>14. September 2005</i>
	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nebenjob	<i>Februar 2008 - August 2008</i>
	Studentische Hilfskraft /Assistenz im OP der Viszeral- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Halle

Halle/ Saale, den 26. Juli 2009

André Reisberg

VERÖFFENTLICHUNGEN

1. Posterbeitrag/ Abstract, DGHO-Kongress, Wien, 2008:

Theurich, S.*, Reisberg, A.*, Christopeit, M., Weber, T., Riemann, D. and Behre, G.
Increased rate of CD4⁺/CD25^{high}/CD127⁻/FOXP3⁺ regulatory T cells after allogeneic
stem cell transplantation and anti-thymocyte globulin containing conditioning regimens.
Onkologie 2008;31(suppl 4):1–240; P92

* gleichberechtigte Erstautorschaft.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg vorgelegte Dissertation mit dem Titel

**„Untersuchungen zum Einfluss von Antithymozytenglobulinen auf die
in vivo-Rekonstitution regulatorischer T-Zellen und des allgemeinen
zellulären Immunstatus nach allogener hämatopoetischer
Stammzelltransplantation“**

selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe sowie keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Halle/ Saale, den 26. Juli 2009

André Reisberg

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll für die Möglichkeit in seiner Abteilung, der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zu promovieren.

Weiterhin danke ich Herrn Oberarzt PD Dr. med. Gerhard Behre für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie für die Unterstützung und fortwährende Motivierung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Dass ich diese Worte nun schreibe, verdanke ich vor allem Herrn Dr. med. Sebastian Theurich. Ohne sein aufopferndes persönliches Engagement und seinen immerwährenden Optimismus wäre diese Arbeit wohl nie fertig gestellt worden. Stets hatte er ein offenes Ohr auch für die scheinbar unwichtigeren Probleme, denen ich mich während der letzten drei Jahre gegenüber sah. Mit seinem Enthusiasmus und unzählbaren Forscherdrang hat er in mir nicht nur das Interesse für die Hämatonkologie geweckt, sondern den vor mir liegenden Weg bereits jetzt entscheidend beeinflusst. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Dagmar Riemann und ihrem Team vom Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die außerordentliche Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten. Ohne Sabrina Kießling und Steffi Richardt wäre das Projekt wahrscheinlich im Chaos versunken.

Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas Wienke vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg danke ich für die freundliche und unkomplizierte Hilfe im Rahmen der statistischen Auswertung und Anfertigung der grafischen Darstellungen.

Für die Möglichkeit Teile dieser Arbeit durch die Teilnahme am Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2008 in Wien präsentieren zu können, bedanke ich mich herzlich bei Herrn Joerg Brenn von der Firma Genzyme.

Betty, Chrissy, Kerstin, Lars und Poya - Danke für die wundervolle Freundschaft und die bedingungslose Unterstützung im Verlauf unserer gemeinsamen letzten sechs Jahre.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich dafür, dass sie die Fertigstellung dieser Arbeit durch ihr reges Interesse und ihre Motivationskünste stets entscheidend vorangetrieben haben.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Konstanze. Stets an vorderster Front mit dabei, begegnete sie mir mit viel Geduld und Verständnis. Sie sorgte dafür, dass es immer weiter ging. Danke auch für das geduldige Zuhören und die Hilfe beim Bändigen des Textbearbeitungsprogrammes.