

Aus der II. Medizinischen Klinik für Hämatologie und Internistische Onkologie  
am Universitätsklinikum Augsburg in Zusammenarbeit mit der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Trepel

**Veränderungen des zellulären Immunstatus durch die Gabe von  
Spenderlymphozyten bei Patienten nach allogener  
Stammzelltransplantation**

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

vorgelegt von  
Dina Maria Kaiser  
aus Augsburg  
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Andreas Rank

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Rudolph Pihusch  
Prof. Dr. med. Irene Schmid

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ann-Kristin Victoria Schmälder

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 2021

## **Eidesstattliche Versicherung**

Kaiser, Dina Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Veränderungen des zellulären Immunstatus durch die Gabe von Spenderlymphozyten bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.11.2021

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Meinem verstorbenen Vater  
und ärztlichen Vorbild

## Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>03</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>05</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>07</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1. DLI – Begriffsdefinition und klinische Anwendung	10
1.1.1. Begriffsdefinition	10
1.1.2. Klinische Anwendung	10
1.2. Indikationen zur DLI	11
1.3. Komplikationen der DLI	12
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2. Patienten, Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1. Messung mittels Durchflusszytometrie	15
2.1.1. Prinzip	15
2.1.2. Präanalytik und Probenaufarbeitung	17
2.1.3. Immunphänotypisierung	18
2.2. Studienaufbau und Strategie	24
2.3. Studiendesign und Statistische Auswertung	24
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1. Studienpopulation	25
3.1.1. Ethik und Datenschutz	25
3.1.2. Patientenkollektiv	25
3.1.3. Therapieerfolg	27
3.1.3.1. Allgemeine Kriterien	27
3.1.3.2. Individueller Therapieverlauf	28
3.1.3.3. Auftreten von GvHD	30
3.1.3.4. Gesamtüberleben und Mortalität	32
3.2. Ergebnisse der Lymphozytenmessungen	32
3.2.1. B-Lymphozyten	34
3.2.2. T-Lymphozyten	34

3.2.2.1. CD8-Lymphozyten	35
3.2.2.2. CD4-Lymphozyten	36
3.2.3. NK- ähnliche T-Lymphozyten	37
3.2.4. NK-Zellen	38
<b>4. Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1. Interpretation der Ergebnisse	39
4.1.1. Dosierung der DLI	39
4.1.2. Remission und Auftreten einer GvHD	39
4.1.3. Lymphozyten-Subpopulationen	41
4.1.3.1. B-Lymphozyten	42
4.1.3.2. T-Lymphozyten	43
4.1.3.3. NK-ähnliche T-Lymphozyten	51
4.1.3.4. NK-Zellen	52
4.2. Stärken und Schwächen	54
4.3. Fazit	55
<b>5. Ausblick</b>	<b>58</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>Abbildungs- und Grafikenverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>Anhang</b>	<b>78</b>
Anhang 1: Pipettiervorlage	
Anhang 2: Begutachtung BKF	
Anhang 3: Patienteninformation & Einverständniserklärung	
<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>87</b>
<b>Anlage</b>	
Anlage 1: Tabelle 2 als herausnehmbarer Faltplan	
Anlage 2: Tabelle 4 als herausnehmbarer Faltplan	

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung:</b>	<b>Bedeutung:</b>
aGvHD	Akute GvHD
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BKF	Beratungskommission für klinische Forschung
CA	Carcinom / Karzinom
CC	Complete chimerism / Vollständiger Chimärismus
CD	Cluster of Differentiation (= Oberflächenantigene)
CD3+	Charakteristischer Marker für T-Lymphozyten, auch als Synonym für T-Lymphozyten gebraucht
CD3+/ kg KG	T-Lymphozyten pro Kilogramm Körpergewicht
cGvHD	Chronische GvHD
CM, T <sub>CM</sub>	Central memory -T-Zellen
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CR	Complete Response / Komplettremission
CUP	Cancer of unknown primary / Krebserkrankung mit unbekanntem Primärtumor
d	Day / Tag (hier: Tag der ersten DLI innerhalb eines Zyklus)
DAG-KBT	Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation
DLI	Donor lymphocyte infusion / Spenderlymphozytengabe
d+/-X	X Tage nach/vor d
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (= Kalziumpuffer zur Antikoagulation von Blutproben)
EM, T <sub>EM</sub>	Effector memory -T-Zellen

EMRA, T <sub>EMRA</sub>	Effector memory -T-Zellen, die CD45RA exprimieren
E-Signale	Empfängersignale
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward scatter / Vorwärtslichtstreuung
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor / Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft-versus-host disease / Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
GvL	Graft-versus-leukemia / Transplantat-gegen-Leukämie
GvT	Graft-versus-tumor / Transplantat-gegen-Tumor
HLA	Human leukocyte antigen / Humane Leukozyten-Antigene
HLA-DR	Human leukocyte antigen - DR isotype / Humane Leukozyten-Antigene vom DR Isotyp
HSCT	Haematopoietic stem cell transplantation / Hämatopoetische Stammzelltransplantation
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KMP	Knochenmarkpunktion
LFS	Leukemia-free survival / Leukämiefreies Überleben
MC	Mixed chimerism / Gemischter Chimärismus
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mglw.	Möglicherweise
MHC	Major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
Molek.	Molekular
MRD	Minimal residual disease / Minimale Resterkrankung
n	Number / Anzahl
NIH	National Institute of Health / Nationales Gesundheitsinstitut
NK -Zellen	Natürliche Killerzellen



NKT -Zellen	NK-ähnliche T-Zellen
NRM	Nicht-Rezidiv Mortalität
OS	Overall survival / Gesamtüberleben
PBL	Peripheral blood lymphocytes / Lymphozyten aus dem peripheren Blut
PBSCT	Peripheral blood stem cell transplantation / Periphere Blutstammzelltransplantation
PD	Progressive disease / Progredienz
PMT	Photomultiplier tube / Photomultiplier
PR	Partial remission / Teilremission
Pro-B-ALL	Unreife B-lymphozytäre Vorläufer-ALL
P-Wert	Probabilias-Wert / Signifikanzwert / Überschreitungswahrscheinlichkeit
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (= Kriterien zur Bewertung des Ansprechens der Behandlung bei soliden Tumoren)
RO+	Memory T-Zellen
sAML	Sekundäre AML
SD	Stable disease / Stabile Erkrankung
Serolog.	Serologisch
SSC	Sideward scatter / Seitwärtslichtstreuung
t	Zeitpunkt der ersten erhaltenen DLI
tAML	Therapieassoziierte AML
Th (Th1/Th2/Th17)	T-Helferzelle (Typ1/Typ2/Typ17)
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
t+/-X	X Monate nach/vor t
T4	CD4+ T-Lymphozyten
T8	CD8+ T-Lymphozyten
vs.	Versus / „im Vergleich zu“
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation

## **1. Einleitung**

### **1.1 DLI - Begriffsdefinition und klinische Anwendung**

#### **1.1.1 Begriffsdefinition**

Bei einer Spenderlymphozytengabe (DLI) werden dem Transplantatempfänger nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) Lymphozyten des Stammzellspenders transfundiert.

Kolb et al. beschrieben 1990 die erste klinische Anwendung von DLI zur Behandlung von Rezidiven der chronisch myeloischen Leukämie (CML) nach allogener HSCT [1]. In nachfolgenden Studien wurde auch von Remissionen bei Rezidiven anderer Erkrankungen nach HSCT berichtet [2, 3]. Seither nimmt die Behandlung mit DLI eine wichtige therapeutische Rolle in der Therapie von malignen hämatologischen Erkrankungen ein [4].

Die Wirkung alloreaktiver Spender-T-Zellen gegen Leukämiezellen nennt sich Graft-versus-Leukemia (GvL) oder Graft-versus-Tumor (GvT) Effekt. Allerdings können sich die Spender-T-Zellen auch gegen anderes Wirtsgewebe richten und so die Komplikation einer Graft-versus-host disease (GvHD) verursachen [5].

#### **1.1.2 Klinische Anwendung**

Spenderlymphozyten werden durch Apherese gewonnen. Dies kann entweder direkt bei Gewinnung des Stammzellpräparats oder zu einem beliebigen anderen Zeitpunkt aus dem Blut des Spenders geschehen. Die Lymphozytenpräparate werden dann therapiegerecht portioniert und kryokonserviert oder direkt verabreicht. Studien weisen darauf hin, dass bezüglich der Wirksamkeit kein entscheidender Unterschied besteht, wie die Spenderlymphozyten gewonnen werden und ob diese vor Applikation kryokonserviert wurden [6, 7].

Das Behandlungskonzept orientiert sich neben der Leitlinie der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT) [8] an Studien zum Thema, Erfahrungswerten, der Indikation und der individuellen Situation des jeweiligen Patienten.

DLI werden in mehreren Zyklen im Abstand von 4-8 Wochen verabreicht. Je nach Indikation wird mit einer Zelldosis von  $1 \times 10^4$  T-Lymphozyten pro Kilogramm Körpergewicht (CD3+/ kg KG) bis maximal  $1 \times 10^8$  CD3+/ kg KG begonnen. In der Regel findet mit jedem weiteren Zyklus eine Dosisescalation statt. [9, 10]

Eine sichere Applikation von DLI ist gegeben, wenn ein etablierter Spender-chimärismus vorliegt, alle Immunsuppressiva beendet sind und keine Anzeichen von Infektionen oder eine GvHD vorliegen [11, 12].

Das Ansprechen auf die Therapie mit DLI ist abhängig von der Grunderkrankung und der Phase der Krankheit [13, 14]. Die wichtigsten Prognosefaktoren für einen Therapieerfolg sind eine geringe Blastenzahl im Knochenmark während eines Rezidivs einer akuten Leukämie (< 35%), weibliches Geschlecht, günstige Zytogenetik und eine Remission zum Zeitpunkt der DLI [15].

## 1.2 Indikationen zur DLI

Eine wichtige kurative Therapie hämatonkologischer Erkrankungen stellt die allogene HSCT dar [16-18], doch die Rezidivrate nach Behandlung ist ein erhebliches Problem [19-22].

Die DLI ist durch den GvL-Effekt eine der wirksamsten Möglichkeiten Rezidive zu behandeln [6, 12, 22-48]. Doch auch gegen persistierende hämatologische Neoplasien nach HSCT kann mit DLI effektiv vorgegangen werden [1, 28, 34, 36, 49, 50].

Grundsätzlich gibt es drei Indikationen zur Behandlung mit DLI: Prophylaktisch bei Patienten mit hohem Rezidivrisiko oder Hochrisikogenetik (zum Beispiel ein komplex aberranter Karyotyp oder Mutationen in Genen wie dem RUNX1-, dem ASXL1- oder dem TP53-Gen) [34, 51, 52], präemptiv bei Vorhandensein eines gemischten Chimärismus [53-55] oder Messung einer minimalen Rest-erkrankung (MRD) [49] auf molekularer oder immunphänotypischer Ebene und therapeutisch bei hämatologisch nachweisbarem Rezidiv oder Progression [15, 50].

Der Vorzug der präemptiven Behandlung vor therapeutischer Intervention resultiert aus dem Umstand, dass DLI bei einem „aktiven hämatologischen Rezidiv“ nur eingeschränkt wirksam sind [56, 57]. Eine routinemäßige Rezidivprophylaxe ist aufgrund der Nebenwirkungen derzeit jedoch nicht empfohlen [28, 40, 58, 59].

Es wird intensiv daran geforscht den GvL-Effekt zu verstärken oder Strategien zur Prävention von GvHD mit minimalen Auswirkungen auf die GvL-Effekte zu

entwickeln. Dazu wurde versucht die klassische DLI in Abhängigkeit von verschiedenen klinischen Situationen zu modifizieren.

Getestet wurden dabei insbesondere Methoden in Verbindung mit haploidentischer Stammzelltransplantation. Dazu gehören mit Wachstumsfaktoren (wie Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)) stimulierte DLI [26], das Einfügen von Suizidgenen in T-Lymphozyten [57, 60], die Depletion alloreaktiver T-Zell-Untergruppen [61] und die Infusion von T-Zellen, die mit speziellen Rezeptoren gegen bestimmte Tumorantigene ausgestattet wurden [62]. Auch eine Kombination von DLI mit pharmazeutischen Wirkstoffen kam zum Einsatz [63-66], wie auch die Gabe von Lymphodepletions-Chemotherapie [67] vor der DLI oder in Kombination mit einer von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) depletierten DLI [30].

Durch jüngste Fortschritte ist es mittlerweile gelungen die Therapie mit DLI zu verbessern, den GvL-Effekt zu verstärken und Komplikationen zu verringern [30, 38, 53, 68, 69]. Dennoch sind die Möglichkeiten noch nicht ausgeschöpft und das Wissen in einigen Bereichen noch immer gering. So ist auch nicht bekannt, was bei der Behandlung mit DLI auf zellulärer Ebene genau passiert und welche Faktoren und Mechanismen für den GvL-Effekt und die GvHD verantwortlich sind.

### **1.3      Komplikationen der DLI**

Die bedeutendste und häufigste Nebenwirkung der DLI ist die GvHD [70], eine systemische, entzündliche Erkrankung. Die kumulative Inzidenz einer akuten GvHD (aGvHD) nach DLI beträgt 40-60%, die einer chronischen GvHD (cGvHD) 33-61%. Die auf eine GvHD zurückzuführenden Todesfälle belaufen sich auf 6-11%. [15, 42, 71-73]

Die Einteilung in akute und chronische GvHD basiert nach der Überarbeitung der Definition des National Institute of Health (NIH) von 2014 im Gegensatz zu einer früheren Version auf der Kombination klinischer Symptome und nicht auf dem Zeitpunkt des Auftretens [74].

Bei der aGvHD sind hauptsächlich Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt betroffen. Je nach Ausprägung und Anzahl der befallenen Organe wird die aGvHD in vier Schweregrade eingeteilt. [74]

Die Symptome einer cGvHD sind sehr heterogen und sind mit (auto-) immunologischen Störungen vergleichbar. Sie können sich auf eine einzelne Lokalisation beschränken oder sich ausbreiten und einen gravierenden Einfluss auf die Lebensqualität nehmen. Der Schweregrad wird als mild, moderat oder schwer angegeben. Bei einem Auftreten von Symptomen beider Typen spricht man von einem Überlappungssyndrom. [75, 76]

Haupttrisikofaktoren der GvHD sind der Grad der Kompatibilität der Humanen Leukozyten-Antigene (HLA) zwischen Spender und Empfänger, das Alter des Empfängers sowie des Spenders, Infektionen (zum Beispiel Pneumonie, Gastroenteritis, Zytomegalievirus (CMV) -Infektion) und die Art der verwendeten aGvHD-Prophylaxe (Wahl der Medikamente, Dosis und Dauer der Immunsuppression) [74].

Zudem hat sich in Studien gezeigt, dass die Inzidenz von GvHD mit steigender Zelldosis der DLI zunimmt [77, 78]. Dennoch ist das Auftreten einer solchen auch ein Zeichen für das Ansprechen auf die DLI und sagt sogar ein längeres krankheitsfreies Überleben voraus [79].

Dies macht deutlich, dass der GvL-Effekt sehr stark mit der GvHD korreliert [80-82] und letztere die Behandlung mit DLI erheblich einschränkt [70].

Erstlinientherapie bei sowohl der akuten als auch der chronischen GvHD sind Corticosteroide gegebenenfalls in Kombination mit einem Calcineurin-Inhibitor. Ein dauerhaftes Ansprechen auf die Steroide wird jedoch bei weniger als der Hälfte der Patienten mit aGvHD und bei 40-50% der Patienten mit cGvHD beobachtet. [74]

Anzustreben ist also die Prävention einer GvHD, denn „Vorbeugen ist besser als heilen“ (Zitat: Christoph Wilhelm Hufeland (1763 - 1836), Arzt).

Eine weitere Komplikation der klassischen DLI ist die Aplasie, die eine Inzidenz von 20-40% aufweist. Die Gesamtmortalität beträgt 5% und ist meist Folge von Infektionen oder Blutungen. Der Umfang der restlichen Wirtshämatopoese gilt als Hauptindikator für die Prognose einer Aplasie. [83]

Die betroffenen Patienten benötigen in der Regel nur eine supportive Behandlung im Sinne einer Infektionsprophylaxe oder einer antiinfektiven Therapie, eine restriktive Transfusionsstrategie, sowie bei Bedarf die Therapie mit Chelatbildnern bei Eisenüberladung.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es vergehen Tage bis Wochen bis ersichtlich ist, ob eine Therapie mit DLI den gewünschten Erfolg bringt oder in welchem Ausmaß Komplikationen auftreten. Wenn es möglich wäre die Behandlung genau zu monitoren und anhand von Blutanalysen Tendenzen in Richtung GvL oder GvHD zu erkennen, wäre man in der Lage die Therapie frühzeitig anzupassen. Dies wäre ein großer Gewinn, der es ermöglichen würde, noch individuellere Behandlungskonzepte zu verfolgen und Komplikationen zu vermeiden. Zu diesem Zweck ist es jedoch wesentlich, die Abläufe auf zellulärer Ebene zu verstehen.

Aus diesem Grund beschäftigte sich diese Arbeit mit Beobachtungen und Analysen von Veränderungen der Lymphozytenzusammensetzung im Blut von Patienten während einer Therapie mit DLI.

Um das Forschungsgebiet abzustecken wurden vorab folgende Fragen formuliert:

- 1) Wie ändern sich die Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut innerhalb eines DLI-Zyklus (24 Stunden und 7 Tage später im Vergleich zur Messung direkt vor der DLI)?
- 2) Ab welcher Konzentrationsstufe der DLI sind die Veränderungen der Lymphozytenzusammensetzung am deutlichsten zu sehen?
- 3) Inwieweit sind klinische Effekte einer DLI wie das Erreichen einer Remission und das Auftreten einer GvHD mit Auffälligkeiten in den einzelnen Lymphozytensubpopulationen verbunden?
- 4) Korrelieren die Änderungen der einzelnen Lymphozytensubpopulationen bei Therapieansprechen oder -versagen mit den bisher in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen über die Funktionen der Lymphozytensubpopulationen?

## 2. Methodik

### 2.1 Messung mittels Durchflusszytometrie

#### 2.1.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, um unterschiedliche Zellen anhand verschiedener Eigenschaften zu analysieren.

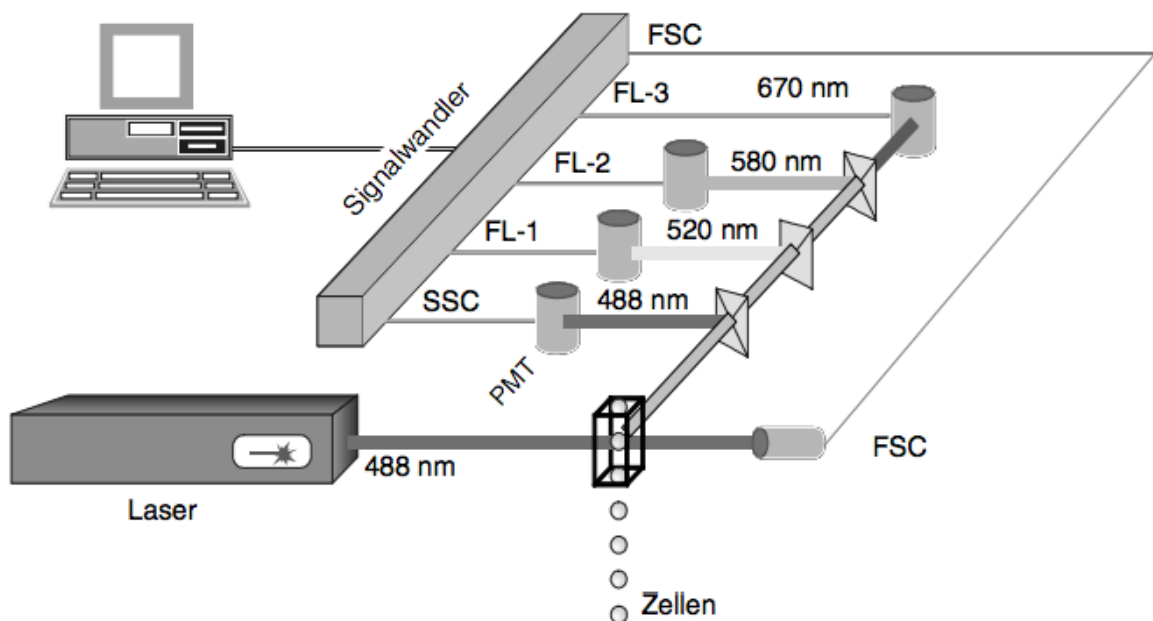


Abb. 1: Aufbau eines Durchflusszytometers [84]

Das Messprinzip besteht darin, dass Zellen, die sich in einer Suspension befinden, einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Dabei wird im flachen Winkel durch die Vorwärtslichtstreuung (FSC, forward scatter) die Größe der Zelle und im rechten Winkel durch die Seitwärtslichtstreuung (SSC, sideward scatter) die Granularität der Zelle erfasst [84]. Sensitiver wird die Differenzierung der Zellen durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die an Antikörpern gekoppelt mit den Zellen verbunden sind. Anhand spezifischer Wellenlängen können diese schließlich gemessen werden [85, 86]. Dabei registrieren verschiedene Detektoren bei Anregung durch einen 488-nm-Argon-Laser (blau-grün) unterschiedliches Licht (FL1-Detektor: grün / FL2-Detektor: orange / FL3-

Detektor: rot). Ein Photomultiplier (PMT) erkennt das optische Signal und konvertiert es in ein Elektrisches. Dadurch können die Daten über eine entsprechende Software registriert und in Diagrammform wiedergegeben werden [84]. Dabei entstehen sogenannte Dot-Plots (Abb. 2).

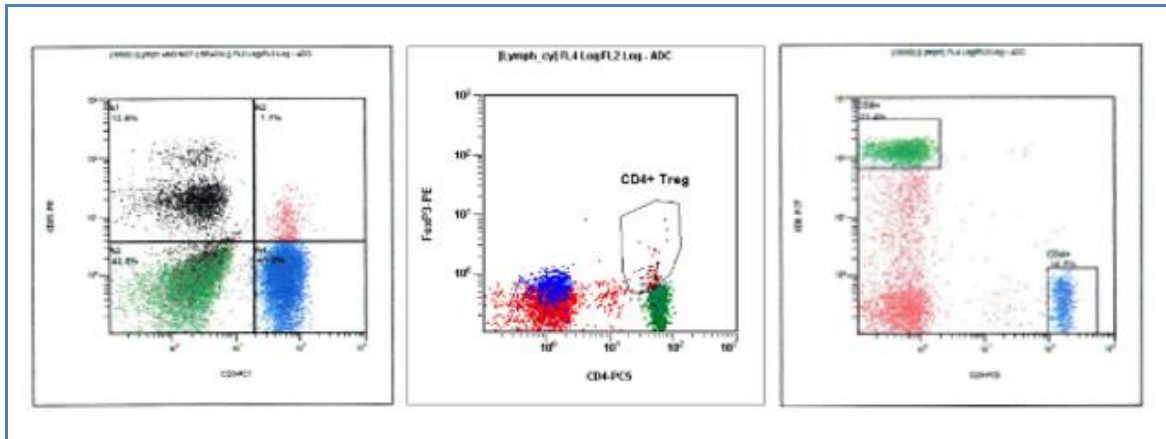


Abb. 2: Beispiele für die Darstellung von Dot-Plots

Die beiden Achsen entsprechen zwei Messparametern. Wird nun eine Zelle gemessen, erscheint sie als Punkt („dot“) im Koordinatensystem. So kann ihre Intensität beurteilt werden, sowie die Korrelation mit anderen Zellen.

Es passiert jedoch häufig, dass es durch ähnliche Emissionsspektren der eingesetzten Farbstoffe zu einer Überlappung zwischen verschiedenen Anteilen kommt. Diese Fehlerquelle wird durch automatisierte Datenanalyse sehr geringgehalten. Dabei werden definierte Regionen und so genannte „Gates“ in abgespeicherten Auswerteformaten angewendet, um mehrere Datensätze aus unterschiedlichen Proben in vergleichbarer Weise analysieren zu können. Dies birgt jedoch die Gefahr, dass es zu Fehlern bei der Erkennung von Zellen kommt, die abnorm oder unterschiedlich aktiviert sind [84].

Abhängig vom Gerätetyp und der Menge an darin enthaltenen Lasern, können unterschiedlich viele Fluoreszenzen gemessen werden. Von Vorteil ist dabei, dass mehrere Antigene gleichzeitig nachweisbar sind und durch eine höhere Auflösung bei der digitalen Datenverarbeitung die Ergebnisse klarer bestimmt werden können. Messungen, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, wurden alle am Durchflusszytometer FC500 der Firma Beckman Coulter durchgeführt.



Die erhaltenen Dot-Plots wurden manuell nachgated, um Fehler bei der Zellerkennung zu vermeiden und vergleichbare Ergebnisse bei der Datenauswertung zu erhalten. Hierfür wurden etablierte Standard- und gut beschriebene Gating-Strategien angewandt [87, 88].

### 2.1.2 Präanalytik und Probenaufarbeitung

Den Patienten wurde pro DLI-Zyklus zu drei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen: vor DLI (d-1), 24 Stunden (d+1) und 7 Tage (d+7) nach DLI.

Innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben weiterverarbeitet, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und so zur Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Zellfärbung wurde mit handelsüblichen, markierten Antikörpern von Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA) und Biolegend (San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt:

Abkürzung/Synonym	Fluoreszenzfarbstoff
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
AF488	AlexaFluor®488
PE	Phycoerythrin
ECD	Phycoerythrin - Texas Red®
PE/Dazzle5	PE/Dazzle®594
PC5	Phytoerythin-Cyanin 5.1
PC7	Phytoerythin-Cyanin 7

Grundlage war eine Pipettiervorlage, die von Privatdozent Dr. Andreas Rank in Zusammenarbeit mit der Firma Beckman Coulter erstellt wurde.

Es wurden sieben Reagiergefäße initial mit je 50-100 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut befüllt und gemäß Anleitung mit den entsprechenden Antikörpern gemischt. Die Abbildung in Anhang 1 beschreibt die Probenaufarbeitung/-färbung inklusive der einzelnen Schritte von Antikörperzugabe, Inkubation, Zentrifugation und Waschen. Im Anschluss wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert.

### 2.1.3 Immunphänotypisierung

Unterteilt werden Lymphozyten mittels ihrer Oberflächenantigene (Cluster of Differentiation (CD)) in T-, B- und natürliche Killerzellen (NK) -Zellen. Durch Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren wie Zytokine wird die Reifung der Zellen in der Hämatopoese und die Aktivierung der Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen beeinflusst [89]. So können die Hauptgruppen jeweils in Subpopulationen unterteilt werden, die die Zellen während ihrer Entwicklung genauer charakterisieren [90, 91]. Die CD-Moleküle dienen unter anderem als Rezeptoren für Interleukine, Komplementfaktoren und Adhäsionsmoleküle und erfüllen Funktionen wie Antigenpräsentation, Signaltransduktion und Zellaktivierung [89]. Über markierte Antikörper, die an diesen Immunglobulinen koppeln, können die Lymphozyten einer bestimmten Zellart, Entwicklungs- und Aktivierungsstufe gemessen werden [92].

Anhand des Antigens CD19 wurden die B-Lymphozyten identifiziert und weiter unterteilt in naive (IgD+ CD 27), memory (IgD+ CD 27+), class switched (IgD- CD 27+) und transitional -Zellen (CD24<sup>hi</sup>, CD38<sup>hi</sup>).

T-Lymphozyten (CD3+) wurden je nach Positivität für CD4 oder CD8 jeweils differenziert in naive (CD62L+ CD45RA+), memory (RO+) (CD4+ CD45RA- CD45RO+ oder CD8+ CD45RA- CD45RO+), central memory (CM) (CD62L+ CD45RA), effector memory (EM) (CD62L- CD45RA-), effector memory -RA+ (EMRA) (CD62L- CD45RA+), aktivierte (Humane Leukozyten-Antigene vom DR Isotyp (HLA-DR+) und CD69+) und regulatorische T-Zellen (über CD25+ und die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3+)).

Bei den CD4+ T-Helferzellen wurden außerdem die Typen 1 (Th1), 2 (Th2) und 17 (Th17) durch Bindung der Antikörper an den Rezeptoren CD4+ CXCR3+ CCR4- CCR5+ CCR6- für Th1, CD4+ CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6- für Th2 und CD4+ CXCR3- CCR4+ CCR5- CCR6+ für Th17 unterschieden.

Bei den zytotoxischen CD8+ -Lymphozyten wurden die aktivierten Untergruppen im frühen (CD28+ CD27+), im mittleren (CD28- CD27+) und im späten Status (CD28- CD27-) weiter identifiziert und es wurden exhausted (CD279+) und terminal effector -Zellen (CD279- CD57+) differenziert.

NK-ähnliche T-Zellen (NKT-Zellen) wurden definiert über die Marker CD3+ CD56+.

Durch das Vorhandensein von CD56+ konnten NK-Lymphozyten identifiziert werden und durch CD56+ CD16+, CD56dim CD16bright und CD56bright CD16dim in drei NK-Subgruppen unterteilt werden. [93-95]

Details dieser Methode, insbesondere Gating-Strategien und Identifizierung von Teilmengen, wurden 2019 von Waidhauser et al. beschrieben [88].

Pro Reagiergefäß ergab die Durchflusszytometrie eine Grafik mit Dot-Plots inklusive Farb-Legende, die durch die oben genannten Gatingstrategien die einzelnen Lymphozytensubpopulationen darstellten (siehe Abb. 3-9).

Schließlich wurden für alle Lymphozytensubpopulationen Prozentsätze bestimmt und absolute Zahlen berechnet.

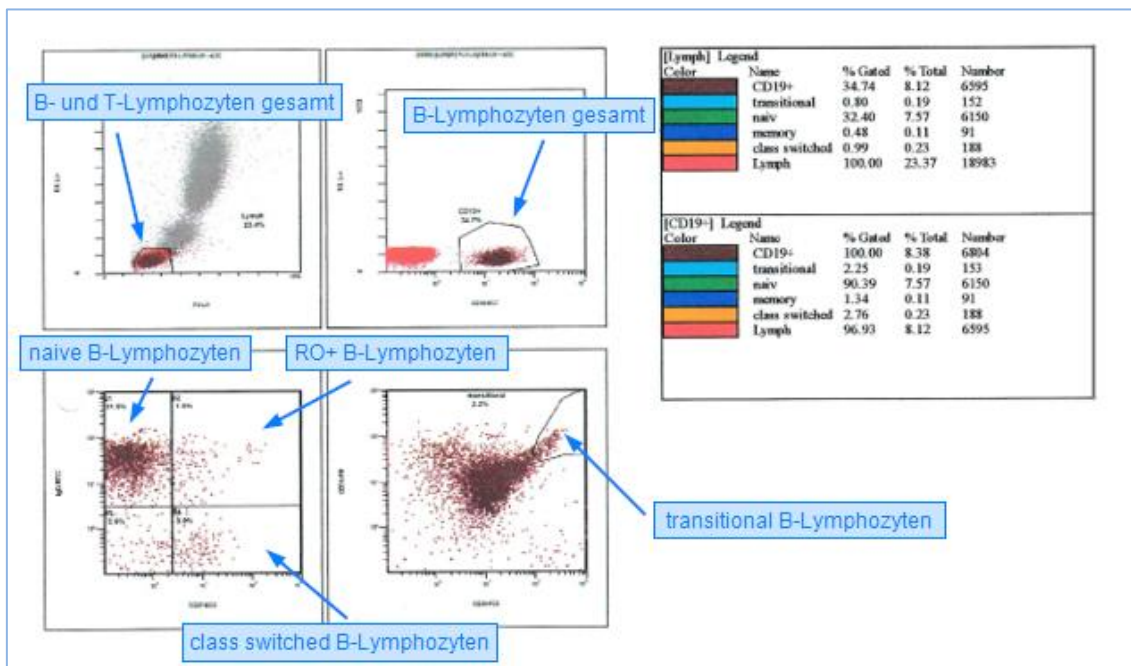


Abb. 3: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 1: B- und T-Lymphozyten gesamt, B-Lymphozyten und deren Subgruppen

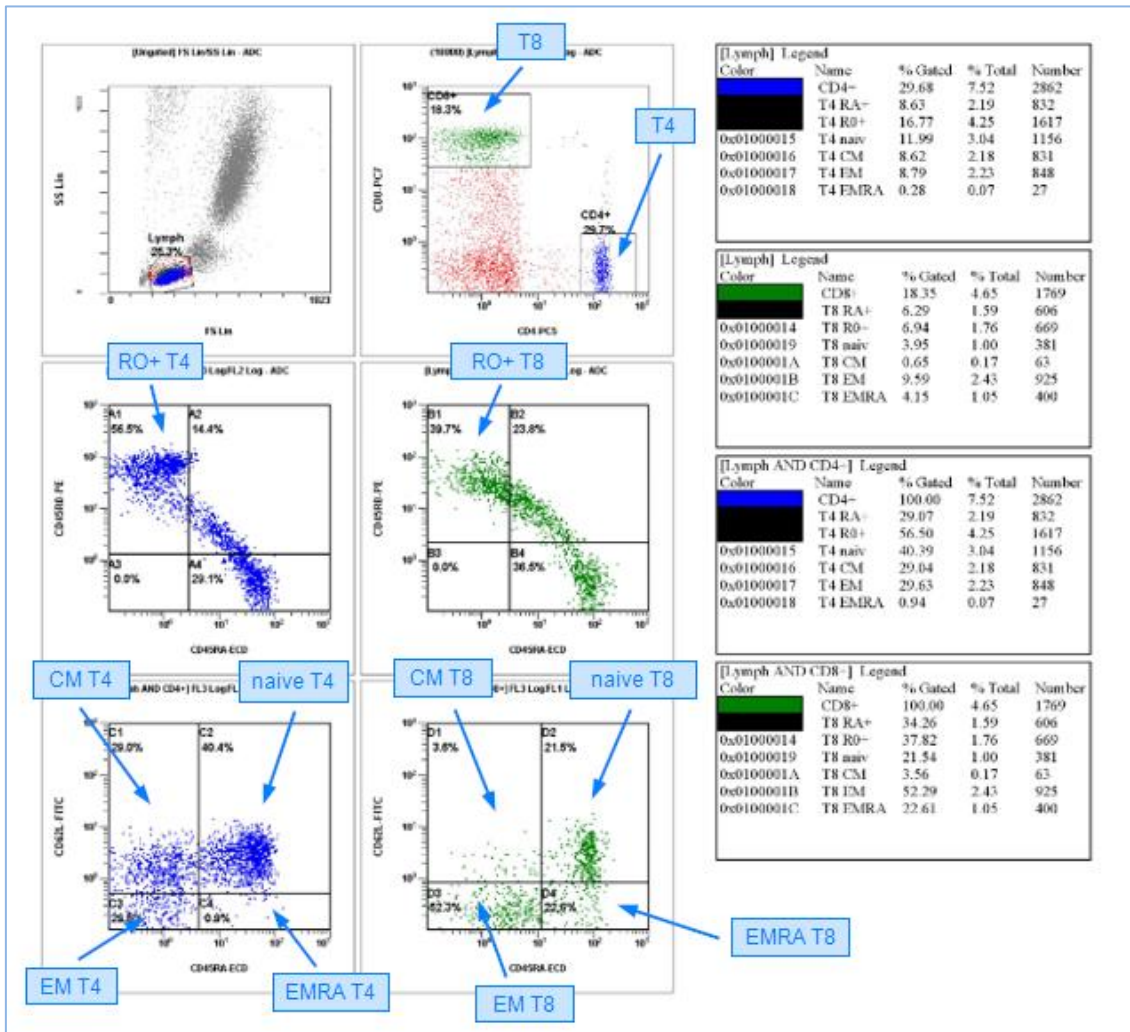


Abb. 4: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 2: B- und T-Lymphozyten mit ihren Subgruppen; Abkürzungen: CD4+ T-Lymphozyten (T4), CD8+ T-Lymphozyten (T8), memory-Zellen (RO+), central memory -Zellen (CM, T<sub>CM</sub>), effector memory -Zellen (EM, T<sub>EM</sub>), effector memory -Zellen, die CD45RA exprimieren (EMRA)

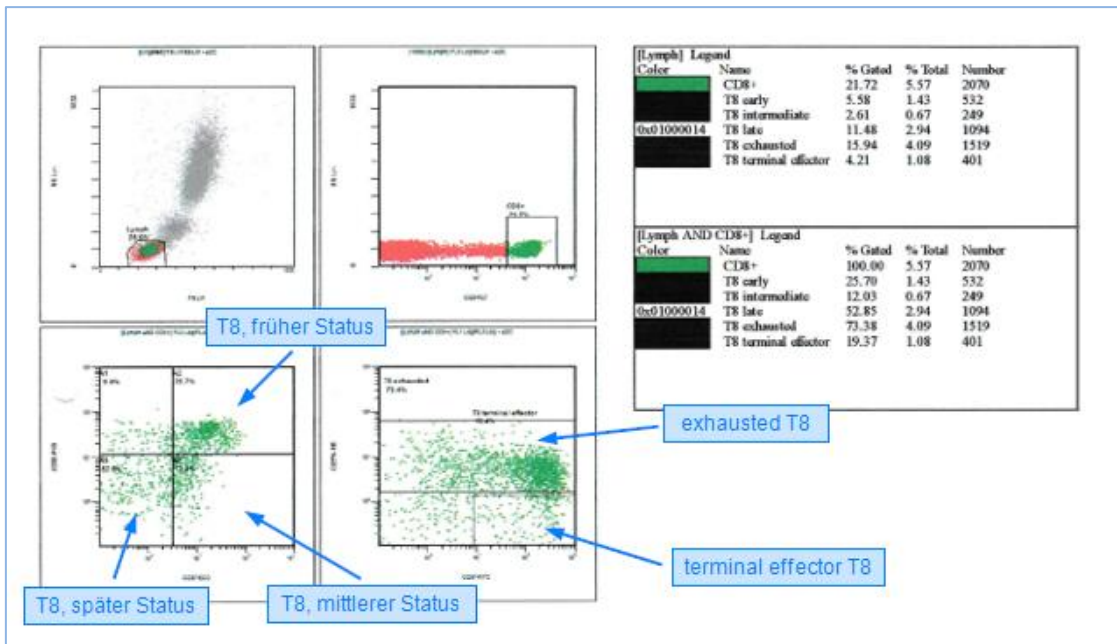


Abb. 5: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 3: CD8+ T-Lymphozyten mit den aktivierten Subgruppen im frühen, mittleren und späten Status, sowie exhausted und terminal effector -Zellen; Abkürzungen: CD8+ T-Lymphozyten (T8)

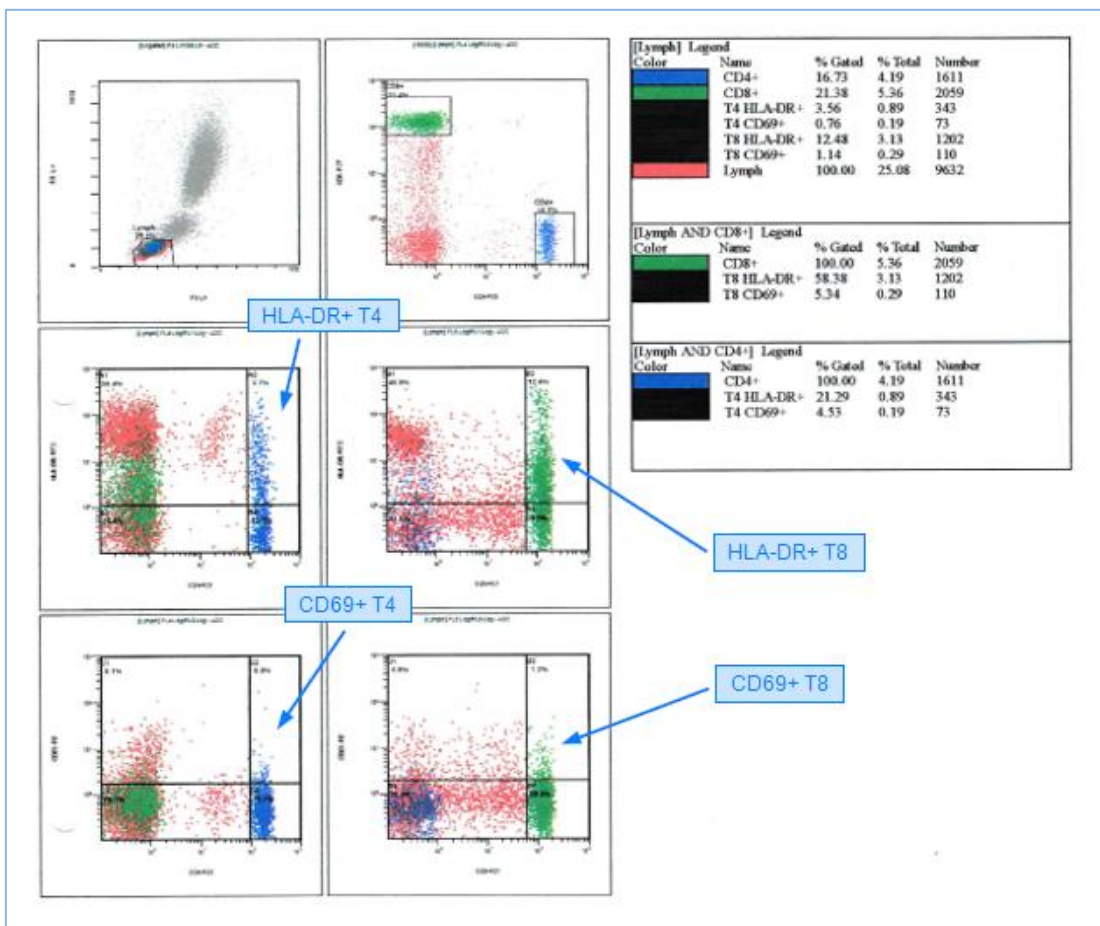


Abb. 6: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 4: Aktivierte T-Zellen; Abkürzungen: CD4+ T-Lymphozyten (T4), CD8+ T-Lymphozyten (T8), aktivierte (Humane Leukozyten-Antigene vom DR Isotyp (HLA-DR+) und CD69+) T-Zellen



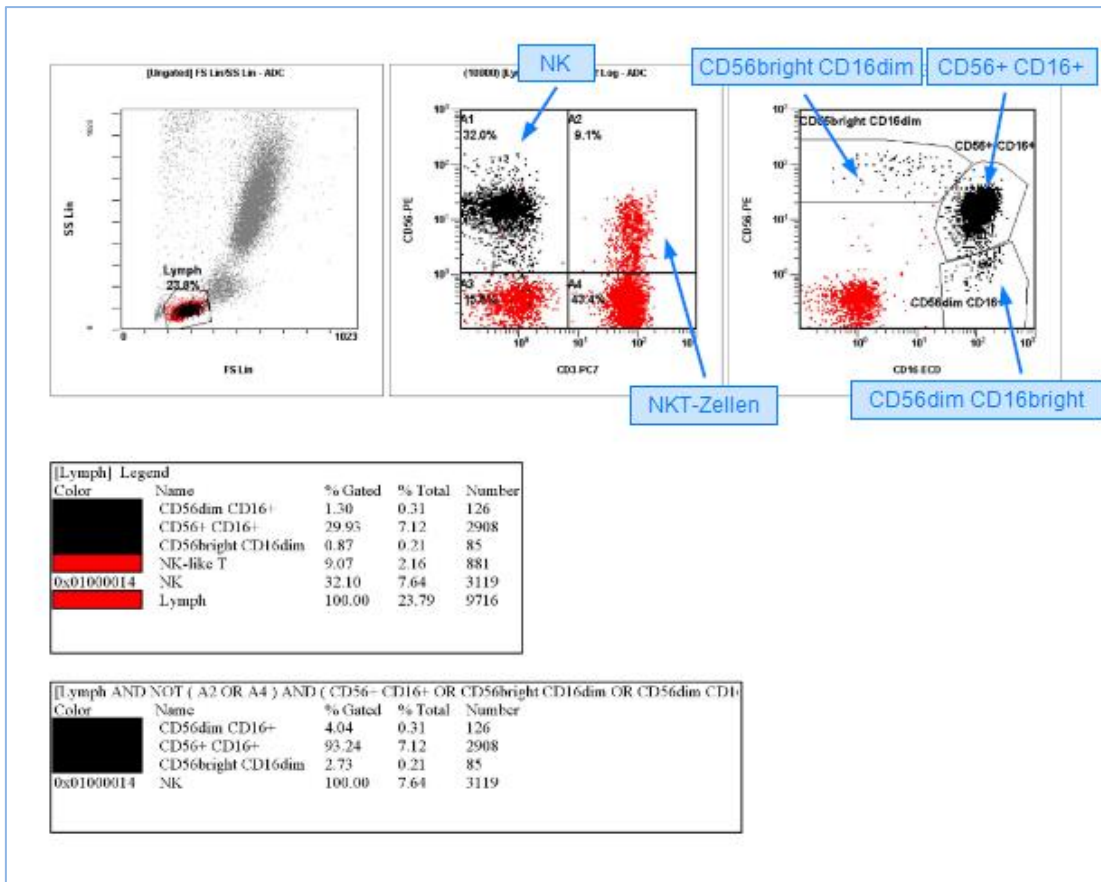


Abb. 7: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 5: NKT und NK-Zellen mit den NK-Subgruppen; Abkürzungen: natürliche Killerzellen (NK), NK-ähnliche T-Zellen (NKT-Zellen)

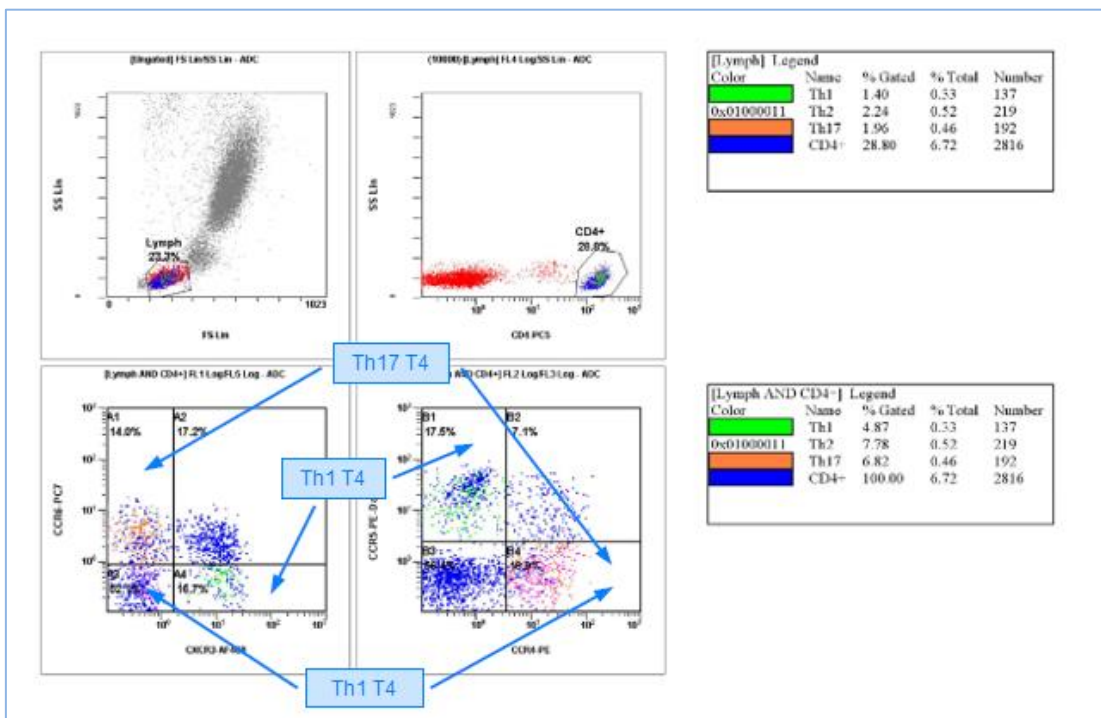


Abb. 8: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 6: CD4+ T-Lymphozyten mit den Subgruppen Th1, Th2 und Th17 (je das Ergebnis zweier Gates); Abkürzungen: CD4+ T-Lymphozyten (T4), T-Helferzellen Typ 1 (Th1), Typ 2 (Th2), Typ17 (Th17)

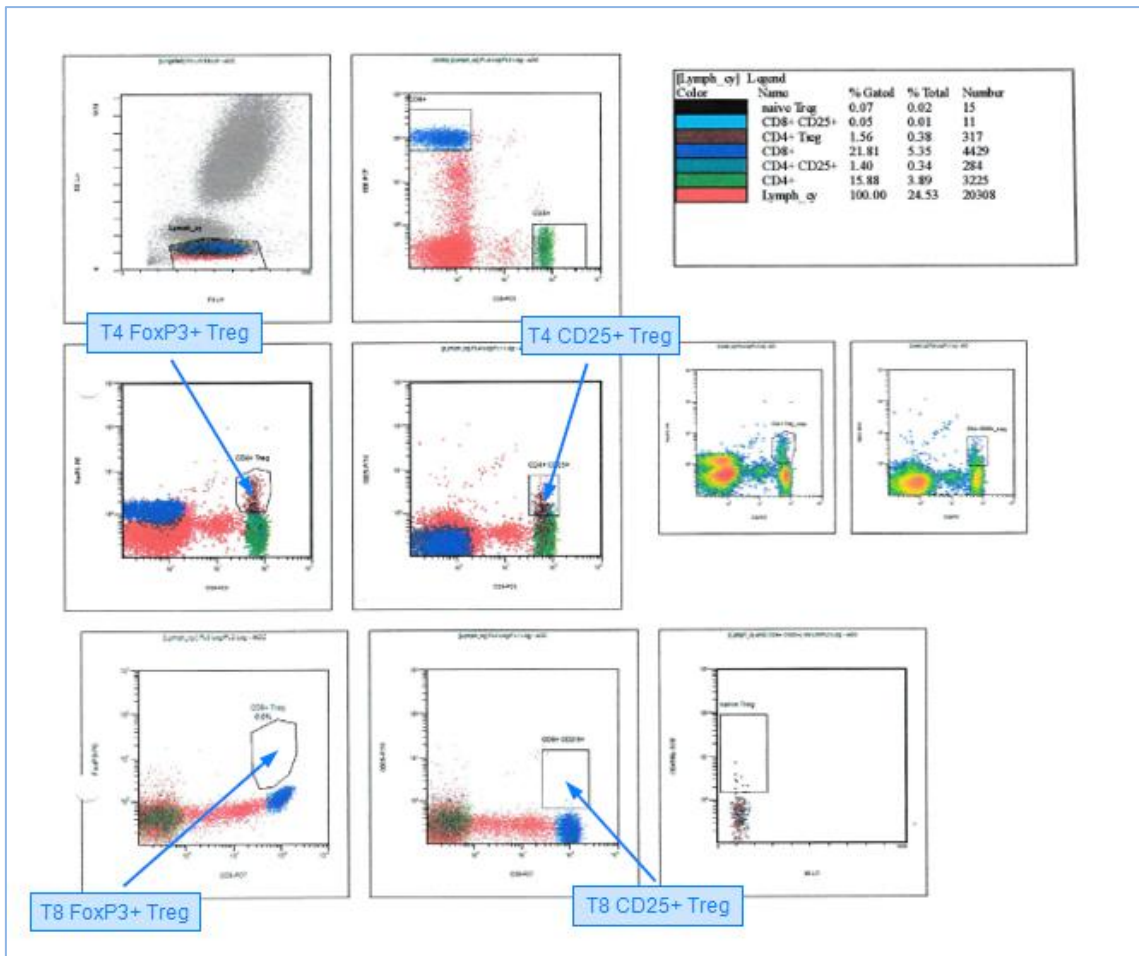


Abb. 9: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 7: Regulatorische T-Lymphozyten; Abkürzungen: CD4+ T-Lymphozyten (T4), CD8+ T-Lymphozyten (T8), Regulatorische T-Lymphozyten (T<sub>reg</sub>), Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3+)

## 2.2 Studienaufbau und Strategie

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Patienten inkludiert, die die klassische, nicht modifizierte DLI erhielten. Analysiert wurden Lymphozytensubpopulationen vor und nach drei DLI in den ansteigenden Dosierungen  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG. DLI mit höherer Dosis wurden aufgrund einer geringen Fallzahl ausgeschlossen.

Die kleinste Anfangsdosis von  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG wurde bei Patienten angewendet, die von einem nicht verwandten oder haploidentischen Spender transplantiert wurden. Die DLI nach allogener HSCT von einem passenden Geschwisterspender wurde mit einer höheren Anfangsdosis von  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG oder bei einem Patienten in therapeutischer Indikation mit einer Anfangsdosis von  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG verabreicht.

Insgesamt waren Messungen bei DLI mit  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG von 10 Patienten, bei DLI mit  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG von 13 Patienten und bei DLI mit  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG von 15 Patienten vorhanden. In Tabelle 1 in Kapitel 3.1.2 sind diese Details übersichtlich dargestellt.

Die Lymphozytensubpopulationen wurden jeweils vor der DLI, 1 Tag und 7 Tage nach der DLI gemessen. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

## 2.3 Studiendesign und statistische Auswertung

Bei dieser Studie handelte es sich um eine interventionelle klinische Längsschnittstudie mit interner Negativkontrolle zur deskriptiven Analyse.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben wurde angewandt und Signifikanzwerte ( $p$ -Werte)  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Daten sind als Medianwerte mit [min; max] und  $p$ -Wert dargestellt. Zur internen Negativkontrolle wurden die B-Lymphozyten analysiert.

Eine genaue Übersicht über die einzelnen Werte mit Median [min; max] und  $p$ -Wert ist in Tabelle 4 (siehe Kapitel 3.2) zu finden.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Studienpopulation**

##### **3.1.1 Ethik und Datenschutz**

Für die Durchführung der Studie besteht die Zustimmung einer hausinternen Ethikgewerkschaft, der Beratungskommission für klinische Forschung (BKF) (siehe Anhang 2).

Die Patienten erhielten vorab eine Aufklärung und unterschrieben eine Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie und zum Datenschutz (siehe Anhang 3).

##### **3.1.2 Patientenkollektiv**

Eingeschlossen wurden alle Patienten (Anzahl (n) = 16) nach allogener Stammzelltransplantation, die mit mindestens einer DLI im Universitätsklinikum Augsburg im Zeitraum von 2016 bis 2020 behandelt wurden. Voraussetzungen für die Anwendung waren die Beendigung der Immunsuppression mindestens vier Wochen vor der ersten DLI, ein etablierter Spenderchimärismus und fehlende Anzeichen einer Infektion oder GvHD. Die mediane Zeit von allogener HSCT bis zur ersten DLI betrug 12,5 Monate.

Der Nachbeobachtungszeitraum betrug bei jedem Probanden mindestens 2 Jahre, beginnend mit dem Zeitpunkt der jeweils ersten erhaltenen DLI, im Folgenden bezeichnet als t. Klinischer Endpunkt der vorliegenden Arbeit ist das bei jedem Patienten individuell betrachtete Zeitintervall zwischen t und t+24, also 24 Monate nach t. Der zu diesem Zeitpunkt vorliegende Remissionsstatus definiert das Ansprechen auf die Therapie.

Tabelle 1 stellt im Folgenden die Charakteristika der gewählten Patienten-Stichprobe übersichtlich dar.

VARIABLEN	ERGEBNISSE
<b>Alter;</b> Median/Mittelwert (Range)	55,5/57 (41-70)
<b>Geschlecht</b>	
Männlich; n (%)	11 (68,75)
Weiblich; n (%)	5 (31,25)
<b>Histologie</b>	
AML; n (%)	10 (62,5)
sAML; n	6
tAML; n	1
CML; n (%)	2 (12,5)
Multiples Myelom; n (%)	3 (18,75)
Pro-B-ALL; n (%)	1 (6,25)
<b>Indikation zur DLI</b>	
Prophylaktisch; n (%)	5 (31,25)
Therapeutisch; n (%)	3 (18,75)
Präemptiv; n (%)	8 (50)
MC; n	6
Molekulares Rezidiv; n	1
MC und molekulares Rezidiv; n	1
<b>Messungen pro Dosierung</b>	
2x10 <sup>5</sup> ; n (%)	10 (62,5)
1x10 <sup>6</sup> ; n (%)	13 (81,25)
5x10 <sup>6</sup> ; n (%)	15 (93,75)
<b>Ansprechen*</b>	
CR; n (%)	10 (62,5)
PR; n (%)	0 (0)
PD; n (%)	6 (37,5)
SD; n (%)	0 (0)
<b>GvHD</b>	
Ja; n (%)	5 (31,25)
Akut; n	4
Chronisch; n	3
Nein; n (%)	11 (68,75)

Tabelle 1: Patientencharakteristika, \*Remissionsstatus an Tag t+24 oder vorher bei Tod; Abkürzungen: Akute myeloische Leukämie (AML), sekundäre AML (sAML), therapiassoziierte AML (tAML), Chronisch myeloische Leukämie (CML), Akute lymphatische Leukämie (ALL), unreife B-lymphozytäre Vorläufer-ALL (Pro-B-ALL), gemischter Chimärismus (MC), Komplette Remission (CR), Teilremission (PR), Progression (PD), stabile Erkrankung (SD)

Das Durchschnittsalter der Kohorte betrug 57 Jahre, 11 Probanden waren männlich und 5 weiblich. Die Patienten waren an unterschiedlichen hämatologischen Neoplasien erkrankt. Am häufigsten handelte es sich dabei um eine AML, davon entstanden 60% sekundär nach anderen zugrunde liegenden hämatologischen Neoplasien, 10% waren therapieassoziiert. Ein Multiples Myelom fand sich bei 3 Patienten, 2 hatten eine CML und 1 Proband wies eine Pro-B-ALL (unreife B-lymphozytäre Vorläufer-ALL) auf.

Die Indikationen für die DLI waren bei 5 Patienten prophylaktisch, bei 3 Patienten therapeutisch und bei 8 Patienten präemptiv. Von letzteren wiesen 6 einen gemischten Chimärismus auf, 1 Patient hatte ein molekulares Rezidiv und bei 1 Probanden war sowohl ein gemischter Chimärismus als auch ein molekulares Rezidiv ausschlaggebend für die präemptive Behandlung.

### **3.1.3 Therapieerfolg**

#### **3.1.3.1 Allgemeine Kriterien**

Neben Toxizität, Überlebenszeit, Symptomkontrolle, Lebensqualität und Remissionsdauer ist der Grad der Remission ein objektiver Parameter zur Beurteilung des Therapieerfolgs in der Onkologie. Für solide Tumoren gibt es die WHO- (Weltgesundheitsorganisation) oder RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors), für hämatologische Neoplasien werden andere, je nach Erkrankung getrennte Evaluationssysteme angewendet. Die Grundprinzipien sind allerdings ähnlich. So erfolgt immer eine Verlaufskontrolle im Vergleich zum Ausgangsbefund. Zur Klassifikation gibt es in allen Evaluationssystemen die vier Standardkriterien Komplettremission (CR), Teilremission (PR), Progredienz (PD) und stabile Erkrankung (SD). Je nach Grunderkrankung liegen eventuell genetische Marker vor. Durch den Nachweis dieser Marker kann neben dem klinischen Ansprechen auch ein zyto-beziehungsweise molekulargenetisches Ansprechen gemessen werden. [96]

Ein wichtiger Bestandteil zur Verlaufskontrolle nach allogener HSCT ist die Chimärismusanalyse, also die Differenzierung von Spender- und Empfängerzellen im Knochenmark oder im peripheren Blut. Sie dient der Beurteilung des Engraftments (= Anwachsen der Stammzellen) und zur Einschätzung des Rezidivrisikos. Besteht im Empfänger eine vollständige

Hämatopoese des Spenders, so gilt dies als Grundlage für ein erfolgreiches Engraftment und langfristiges Therapieansprechen. [97-99] Man spricht von einem vollständigen Spenderchimärismus (CC). Sind jedoch noch Empfängerzellen vorhanden spricht man vom gemischten Chimärismus (MC). Durch die Gabe von DLI kann durch Immunmodulation ein MC in einen CC konvertiert werden [100].

### **3.1.3.2 Individueller Therapieerfolg**

Zum Zeitpunkt t+24 waren 10 Patienten in CR, 4 Patienten waren bereits verstorben und 2 Patienten befanden sich im aktiven Rezidiv.

Insgesamt konnte innerhalb der 2 Jahre eine PD bei 6 Patienten festgestellt werden, 3 davon verstarben bis zum Endpunkt, einer erst danach. Ein Patient erreichte vor Ablauf der 2 Jahre durch eine erneute PBSCT eine CR, der andere erst nach t+24 durch erneute Therapie mit DLI.

Völlig rezidivfrei waren im gesamten Nachbeobachtungszeitraum 9 Patienten, wovon einer jedoch danach an einer anderen Neoplasie verstarb.

Auf der nächsten Seite gibt Tabelle 2 einen Überblick über den individuellen Behandlungsweg sowie den Remissionsstatus der einzelnen Patienten nach DLI. Diese Tabelle findet sich zusätzlich noch einmal vergrößert als herausnehmbares Exemplar im rückseitigen Einband.

Pat	Alter*	Diagnose (ED)	PBSCT / Outcome PBSCT**	Indikation für DLI	DLI	DLI - Dosis	Auftreten einer GvHD	Outcome DLI***	Letzte KMP	Letzte PBL	Verlauf
1	63	w sAML (t-34) bei Polycythaemia vera (t-113)	t-30 / CR, CC	Präemptiv: Molek. Rezidiv	t t+1 t+2 t+3 t+4	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>6</sup> 2x10x10 <sup>6</sup> ↓	t+5: Akut °IV (GI-Trakt)	CR, CC	t+8: CR, CC, Ø E-Signale	t+35: CR, CC, Ø E-Signale	
2	52	m AML (t-13)	t-8 / CR, CC	Präemptiv: MC	t t+1 t+2	1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>7</sup>	Ø	CR, CC	t+9: CR, CC, Ø E-Signale	t+27: CR, CC, Ø E-Signale	
3	48	w CML (t-28)	t-18 / CR, CC	Präemptiv: Molek. Rezidiv, MC	t t+1 t+2	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup>	Ø	CR, CC	t+17: CR, CC, Ø E-Signale	t+34: CR, CC, Ø E-Signale	
4	68	w sAML (t-9) bei MDS (t-17)	t-6 / CR, MC	Präemptiv: MC, zytogen. Hochrisiko-situation	t t+1 t+2 t+3 t+4 t+5	1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>7</sup> 6x10 <sup>7</sup> 6x10 <sup>7</sup>	Ø	CR, CC	t+6: CR	t+11: CR, CC, Ø E-Signale	t+14: † Sepsis (unklarer abdominaler Fokus) t+17: † PD
5	53	m Multiples Myelom (t-39)	t-28 / CR, CC	Therapeutisch: Rezidiv (t-28)	t t+7 t+8	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup>	Ø	PD, CC	t+15: CC, Ø E-Signale	t+15: serolog. Progress	
6	56	m tAML (t-11) bei Hoden-CA (t-275)	t-5 / CR, MC	Präemptiv: MC	t t+1 t+2 t+6 t+7	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>7</sup> 0,5x10 <sup>8</sup> ↓	t+10: chronisch, moderat (Haut)	CR, CC	t+19: CR, CC, Ø E-Signale	t+25: ED CUP (linker Bronchus) → t+26: † CUP	
7	54	m sAML (t-6) bei MDS (t-15)	t-5 / CR, MC	Präemptiv: MC	t t+1 t+2 t+8 t+9	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 10x10 <sup>6</sup> 4x10 <sup>7</sup>	Ø	CR, CC	t+18: CR, CC, Ø E-Signale	t+28: CR, CC, Ø E-Signale	
8	55	m AML (t-15)	t-11 / CR, MC	Präemptiv: MC	t t+9 t+10 t+11	2x10 <sup>5</sup> ↓ 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>7</sup> ↓	t+1: akut °I (Haut); t+13: Übergang in chronisch, moderat (Haut, Mundschleimhaut, Nägel, Konjunktiven, mglw. Leberbeteiligung)	CR, CC	t+22: CR	t+35: CR, Ø E-Signale	
9	60	w CML (t-32)	t-8 / Zytogen. Persistenz, CC	Therapeutisch: Rezidiv (t-5), Meningeosis leucaemia	t t+1 t+7	5x10 <sup>6</sup> 10x10 <sup>6</sup> ↓ 2x10 <sup>7</sup>	t+8: Akut °I (Darm)	PD	Ø nach DLI	t+7: Zytogen. Persistenz	t+9: † PD
10	49	m Multiples Myelom (t-21)	t-5 / Serolog. Persistenz, CC	Prophylaktisch: serolog. Persistenz	t t+1 t+2 t+3 t+4	1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 10x10 <sup>6</sup> 41x10 <sup>6</sup> 41x10 <sup>6</sup>	Ø	PD	Ø nach DLI	t+39: CR, CC	Seit t+22 PD (serolog.) → Konsolidierung mit DLI
11	70	m Rezidiv sAML (t-49) von sAML (t-67) bei MDS (t-84)	t-44 / CR, CC	Prophylaktisch: Rezidiv der sAML (t-7)	t t+1 t+2 t+3	1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>7</sup> 4x10 <sup>7</sup> ↓	t+4: Akut °II (Haut, Schleimhäute, Leber); t+7: Übergang in chronisch, moderat (Augen, Mundschleimhaut, Leber)	CR, CC	t+4: CR	t+22: CR	
12	61	m Multiples Myelom (t-151)	t-20 / Serolog. SD, molek. Persistenz, CC	Therapeutisch: PD, MC	t t+1 t+2 t+3	1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 1x10 <sup>6</sup> 2x10 <sup>7</sup>	Ø	PD	Ø nach DLI	t+15: PD	t+21: † PD
13	55	w AML (t-7)	t-5 / CR, CC	Prophylaktisch: Hochrisiko-situation (Hochrisiko-genetik und refraktäre Erkrankung bei PBSCT)	t t+1 t+2	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup>	Ø	CR, CC	t+8: CR, CC, Ø E-Signale	t+24: CR, CC, Ø E-Signale	t+11 Rezidiv → t+13 2. PBSCT → t+14 KMP: CR, CC, Ø E-Signale
14	64	m sAML (t-16) bei CMML (t-25)	t-8 / CR, CC	Prophylaktisch: Hochrisiko-situation	t t+1 t+2	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup>	Ø	PD	t+15: CR, CC, Ø E-Signale	t+16: CR, CC, Ø E-Signale	t+24 Rezidiv → t+26: † PD
15	41	m Pro-B-ALL (t-19)	t-14 / CR, CC	Präemptiv: MC	t t+1 t+2 t+3	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 10x10 <sup>6</sup>	Ø	CR, CC	t+4: CR	t+21: CR, CC, Ø E-Signale	
16	63	m sAML (t-10) bei MDS (t-30)	t-8 / CR, CC	Prophylaktisch: Hochrisiko-situation	t t+1 t+2	2x10 <sup>5</sup> 1x10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup>	Ø	CR, CC	t+9: CR, CC, Ø E-Signale	t+22: CR, CC, Ø E-Signale	

Tabelle 2: Übersicht über die Probanden mit Krankheits- und Therapieverlauf; türkis hinterlegt sind die in die Arbeit eingegangenen Dosierungen; ein roter Blitz kennzeichnet die der GvHD vorausgegangene DLI-Dosis; \*Alter in Jahren zum Zeitpunkt der 1. DLI, \*\*Outcome 28 Tage nach PBSCT, \*\*\*Outcome 24 Monate nach 1. DLI oder Remissionsstatus bei Tod vor t+24; Abkürzungen: Erstdiagnose (ED), allogene periphere Blutstammzelltransplantation (PBSCT), Spenderlymphozytengabe (DLI), Zeitpunkt der 1. DLI +/- Zeit in Monaten (t+/X), Graft-versus-host-Erkrankung (GvHD), Knochenmarkpunktion (KMP), Lymphozyten aus dem peripheren Blut (PBL), sekundäre AML (sAML), Komplettremission (CR), vollständiger Chimärismus (CC), molekular (molek.), Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt), Empfängersignale (E-Signale), Akute myeloische Leukämie (AML), gemischter Chimärismus (MC), Chronisch myeloische Leukämie (CML), Myelodysplastisches Syndrom (MDS), zytogenetisch (zytogen.), Progredienz (PD), serologisch (serolog.), therapieassoziierte AML (tAML), Karzinom (CA), Krebserkrankung mit unbekanntem Primärtumor (CUP), möglicherweise (mglw.), Chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML), unreife B-lymphozytäre Vorläufer-ALL (Pro-B-ALL)

### 3.1.3.3 Auftreten von GvHD

Als Nebenwirkung auf die DLI trat bei 5 Patienten eine GvHD auf. Vier von diesen erhielten das Transplantat von einem in 10 von 10 HLA-Merkmalen passenden nicht verwandten Spender und einer von einem HLA-identischen Geschwisterspender.

2 Patientinnen erlitten einmalig eine aGvHD, wobei die eine Patientin nach der zweiten von drei DLI mit  $10 \times 10^6$  CD3+/ kg KG eine nicht behandlungsbedürftige GvHD °I des Darmes aufwies. Bei der anderen Patientin handelte es sich um eine GvHD °IV des GI-Traktes, die erfolgreich mit Ruxolitinib behandelt wurde. Aufgetreten war diese nach der fünften und letzten DLI mit einer Dosis von zweimal  $10 \times 10^6$  CD3+/ kg KG.

Eine isolierte cGvHD konnte bei einem Patienten drei Monate nach Behandlungsende mit fünf DLI beobachtet werden, wovon die letzte DLI eine Dosierung von  $0,5 \times 10^8$  CD3+/ kg KG hatte. Die cGvHD betraf die Haut und war von moderater Ausprägung, so dass die Therapie initial mit Steroiden begonnen wurde und einen Monat später um Cyclosporin erweitert wurde. Zehn Monate später war keine klinische Aktivität der cGvHD mehr zu registrieren.

2 der 5 Patienten entwickelten aus einer aGvHD eine cGvHD. Der erste der Beiden reagierte bereits auf die erste DLI mit  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG mit einer aGvHD °I der Haut, die nicht therapiebedürftig war. Zwei Monate nach der letzten DLI mit  $1 \times 10^7$  CD3+/ kg KG ging diese in eine moderate cGvHD der Haut, Mundschleimhaut, Nägel und Konjunktiven über, eine mögliche Leberbeteiligung konnte nicht sicher ausgeschlossen werden. Therapeutisch erhielt er Cyclosporin und Ruxolitinib, worunter bis t+41 eine allmähliche Besserung eintrat. Der zweite der Patienten hatte nach der vierten und letzten DLI mit  $4 \times 10^7$  CD3+/ kg KG eine aGvHD °II der Haut, Schleimhäute und Leber, die mit Steroiden und Cyclosporin behandelt wurde. Dennoch ging diese drei Monate später in eine milde cGvHD der Augen, Mundschleimhaut und Leber über. Die Therapie mit Cyclosporin wurde eineinhalb Jahre weitergeführt.

Tabelle 3 zeigt die aufgetretenen GvHD strukturiert aufgearbeitet.

Patienten mit GvHD					
gesamt		aGvHD		cGvHD	
5		4		3	
Geschlecht der Patienten mit GvHD					
Geschlecht		aGvHD		cGvHD	
w		2		0	
m		2		3	
Betroffene Organsysteme					
gesamt		aGvHD		cGvHD	
Haut	4	Haut	2	Haut	2
Schleimhäute	3	GI-Trakt	2	Schleimhäute	2
Leber	3	Schleimhäute	1	Leber	2
GI-Trakt	2	Leber	1	Augen/Konjunktiven	2
Augen/Konjunktiven	2			Nägel	1
Nägel	1				
Zeitpunkt					
Nach 1. DLI		Nach 2. DLI		Nach letzter DLI	
1		1		4 (2x nach 4. DLI, 2x nach 5. DLI)	
Ausprägung					
		aGvHD		cGvHD	
		°I	2	mild	0
		°II	1	moderat	3
		°III	0	schwer	0
		°IV	1		
		°V	0		
DLI-Dosierung vor GvHD in CD3+/ kg KG					
gesamt		aGvHD		cGvHD	
2x10 <sup>5</sup>	1	2x10 <sup>5</sup>	1	1x10 <sup>7</sup>	1
10x10 <sup>6</sup>	1	10x10 <sup>6</sup>	1	4x10 <sup>7</sup>	1
2x10x10 <sup>6</sup>	1	2x10x10 <sup>6</sup>	1	0,5x10 <sup>8</sup>	1
1x10 <sup>7</sup>	1	4x10 <sup>7</sup>	1		
4x10 <sup>7</sup>	2				
0,5x10 <sup>8</sup>	1				

Tabelle 3: GvHD; Abkürzungen: Graft-versus-host disease (GvHD), akute GvHD (aGvHD), chronische GvHD (cGvHD), T-Lymphozyten (CD3+)

### 3.1.3.4 Gesamtüberleben und Mortalität

Das 2-Jahres Gesamtüberleben (OS) der Gesamtkohorte belief sich auf 75%, die Mortalität lag bei 25%. Haupttodesursache war die Progression, die Nicht-Rezidiv Mortalität (NRM) betrug 6,25%. Betrachtet man das leukämiefreie Überleben, so waren zum Zeitpunkt d+24 knapp 63% ohne Rezidiv.

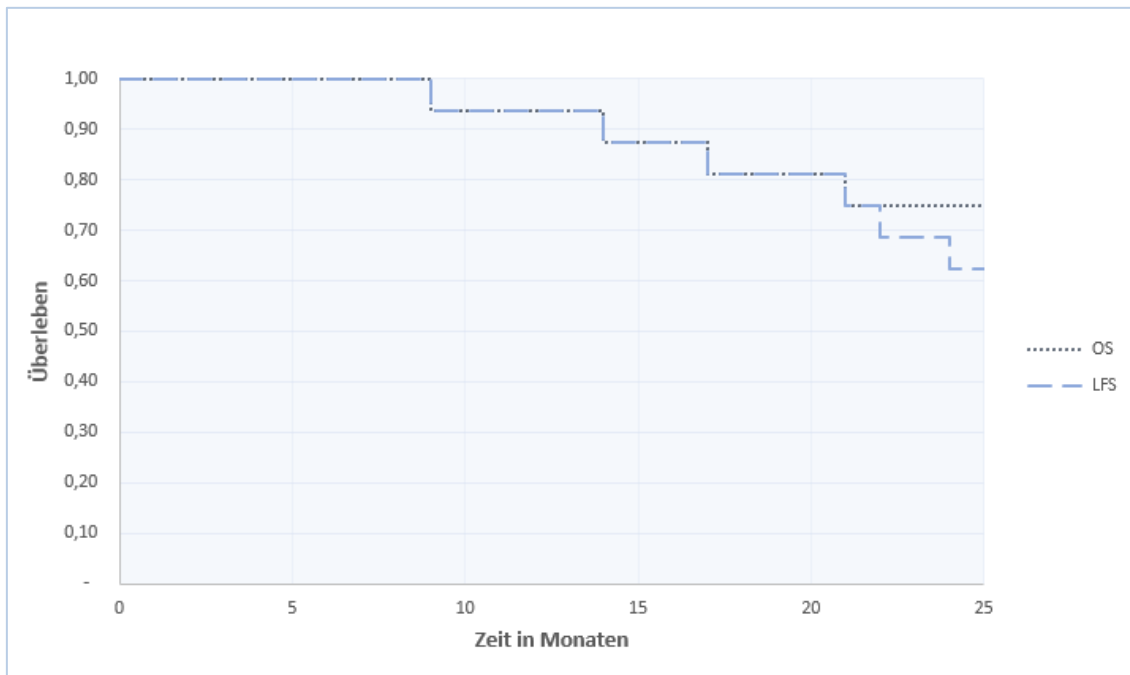


Abb. 10: Gesamtüberleben und Leukämiefreies Überleben an t+24; Abkürzungen: Gesamtüberleben (OS), Leukämiefreies Überleben (LFS)

## 3.2 Ergebnisse der Lymphozytenmessungen

Die gesamten analysierten Lymphozytensubpopulationen einen Tag vor, einen Tag nach und sieben Tage nach der jeweiligen DLI sind auf der nächsten Seite in Tabelle 4 mit Median [min; max] und p-Wert dargestellt. Diese Tabelle findet sich zusätzlich noch einmal vergrößert als herausnehmbares Exemplar im rückseitigen Einband.



	2x 10 <sup>5</sup>			1x 10 <sup>6</sup>			5x 10 <sup>6</sup>			p (d-1 vs. d+7)					
	d-1	d+1	p (d-1 vs. d+1)	d-1	d+1	p (d-1 vs. d+1)	d-1	d+1	p (d-1 vs. d+1)		d+7				
<b>Lymphozyten</b>	1.117 [0.86;1.554]	1.212 [0.96;2.396]	0.484	1.396 [0.914;1.572]	0.173	1.191 [0.546;2.279]	1.267 [0.592;2.003]	0.131	1.208 [0.658;3.049]	0.666	1.183 [0.746;3.0]	1.308 [0.7;3.3]	0.013	1.315 [0.718;2.822]	0.575
<b>B-Lymphozyten</b>	0.231 [0.097;0.617]	0.245 [0.1;0.352]	1	0.265 [0.074;0.501]	0.6	0.298 [0.027;0.957]	0.333 [0.039;0.769]	0.286	0.325 [0.038;1.14]	0.767	0.230 [0.05;1.019]	0.263 [0.036;1.281]	0.388	0.322 [0.039;1.231]	0.878
naive	0.18 [0.082;0.582]	0.223 [0.082;0.328]	1	0.229 [0.061;0.446]	0.6	0.270 [0.018;0.904]	0.262 [0.025;0.656]	0.248	0.294 [0.018;1.05]	0.575	0.196 [0.041;0.949]	0.219 [0.03;1.186]	0.388	0.274 [0.033;1.29]	0.959
memory	0.003 [0.001;0.015]	0.004 [0.001;0.009]	0.6	0.004 [0.001;0.023]	0.6	0.004 [0.001;0.016]	0.004 [0.001;0.015]	0.333	0.006 [0.002;0.041]	0.374	0.004 [0.001;0.012]	0.006 [0.001;0.012]	1	0.005 [0.001;0.018]	0.445
class switched	0.004 [0.0;0.015]	0.005 [0.0;0.009]	0.115	0.005 [0.002;0.017]	0.116	0.006 [0.001;0.016]	0.007 [0.001;0.017]	0.285	0.008 [0.001;0.041]	0.327	0.007 [0.001;0.019]	0.007 [0.001;0.021]	0.347	0.009 [0.002;0.025]	0.575
transitional	0.014 [0.004;0.068]	0.009 [0.001;0.043]	0.108	0.010 [0.004;0.049]	0.345	0.021 [0.002;0.068]	0.017 [0.003;0.039]	0.477	0.018 [0.001;0.065]	0.086	0.013 [0.005;0.061]	0.009 [0.004;0.056]	0.433	0.01 [0.004;0.046]	0.508
<b>T-Lymphozyten</b>	0.002 [0.0;0.008]	0.003 [0.0;0.013]	0.225	0.002 [0.0;0.009]	0.273	0.001 [0.0;0.0]	0.002 [0.0;0.011]	0.285	0.003 [0.0;0.015]	0.327	0.002 [0.0;0.012]	0.003 [0.0;0.009]	0.959	0.003 [0.0;0.011]	0.674
CD4+CD8+	0.435 [0.031;0.874]	0.471 [0.035;1.718]	0.31	0.492 [0.086;0.938]	0.686	0.276 [0.051;0.617]	0.345 [0.039;0.868]	0.026	0.604 [0.062;0.869]	0.011	0.267 [0.044;1.078]	0.331 [0.091;1.289]	0.01	0.344 [0.059;0.816]	0.575
<b>CD8+ Lymphozyten</b>	0.227 [0.021;0.602]	0.244 [0.024;0.582]	0.237	0.219 [0.046;0.602]	0.893	0.136 [0.01;0.439]	0.204 [0.021;0.625]	0.11	0.216 [0.031;0.62]	0.038	0.155 [0.02;0.67]	0.224 [0.068;0.803]	0.026	0.176 [0.058;0.523]	0.374
RO+	0.056 [0.0;0.173]	0.047 [0.001;0.196]	0.499	0.065 [0.008;0.129]	0.225	0.038 [0.0;0.143]	0.049 [0.0;0.13]	0.075	0.0565 [0.0;0.114]	0.014	0.057 [0.002;0.193]	0.06 [0.002;0.164]	0.173	0.065 [0.001;0.126]	0.26
central memory	0.035 [0.001;0.068]	0.031 [0.001;0.192]	0.753	0.034 [0.004;0.114]	0.893	0.017 [0.001;0.067]	0.018 [0.001;0.09]	0.062	0.032 [0.003;0.119]	0.028	0.02 [0.007;0.225]	0.029 [0.01;0.085]	0.041	0.026 [0.008;0.124]	0.515
effector memory	0.215 [0.022;0.527]	0.269 [0.025;0.594]	0.128	0.290 [0.044;0.529]	0.225	0.147 [0.029;0.396]	0.158 [0.023;0.581]	0.041	0.264 [0.029;0.615]	0.028	0.12 [0.022;0.524]	0.14 [0.044;0.704]	0.075	0.127 [0.042;0.590]	0.515
EMRA	0.073 [0.008;0.421]	0.096 [0.008;0.735]	0.237	0.063 [0.031;0.370]	0.068	0.043 [0.006;0.281]	0.046 [0.009;0.369]	0.05	0.117 [0.004;0.376]	0.011	0.087 [0.013;0.602]	0.08 [0.008;0.757]	0.021	0.049 [0.006;0.131]	0.953
früherer Status	0.07 [0.013;0.219]	0.117 [0.057;0.424]	0.893	0.091 [0.04;0.215]	0.893	0.097 [0.02;0.273]	0.102 [0.015;0.236]	0.123	0.082 [0.022;0.668]	0.038	0.111 [0.025;0.390]	0.147 [0.054;0.291]	0.062	0.113 [0.052;0.255]	0.878
mittlerer Status	0.247 [0.01;0.162]	0.045 [0.011;0.297]	0.249	0.032 [0.02;0.111]	0.345	0.04 [0.016;0.079]	0.052 [0.011;0.118]	0.021	0.046 [0.011;0.13]	0.015	0.034 [0.012;0.147]	0.049 [0.019;0.205]	0.06	0.049 [0.017;0.095]	0.386
später Status	0.296 [0.007;0.547]	0.334 [0.007;1.541]	0.398	0.293 [0.022;0.819]	0.345	0.053 [0.01;0.441]	0.043 [0.012;0.633]	0.075	0.317 [0.008;0.644]	0.021	0.06 [0.006;0.703]	0.109 [0.013;0.91]	0.05	0.071 [0.014;0.64]	0.285
exhausted	0.141 [0.021;0.631]	0.167 [0.024;0.566]	0.237	0.158 [0.049;0.624]	0.5	0.134 [0.032;0.459]	0.21 [0.026;0.675]	0.041	0.266 [0.041;0.558]	0.021	0.17 [0.026;0.465]	0.208 [0.063;0.437]	0.019	0.24 [0.065;0.383]	0.878
terminal effector	0.132 [0.001;0.361]	0.126 [0.001;1.0235]	0.866	0.119 [0.004;0.670]	0.5	0.031 [0.001;0.141]	0.029 [0.002;0.341]	0.075	0.182 [0.01;0.229]	0.011	0.03 [0.001;0.549]	0.067 [0.001;0.678]	0.131	0.034 [0.001;0.389]	0.139
HLA-DR+	0.316 [0.006;0.777]	0.33 [0.01;1.11]	0.398	0.241 [0.048;0.674]	0.5	0.168 [0.011;0.549]	0.194 [0.008;0.74]	0.047	0.371 [0.012;0.766]	0.015	0.205 [0.009;0.701]	0.222 [0.016;0.813]	0.01	0.22 [0.007;0.602]	0.799
CD69+	0.013 [0.003;0.088]	0.026 [0.003;0.067]	0.612	0.026 [0.013;0.055]	0.345	0.015 [0.003;0.066]	0.012 [0.006;0.069]	0.534	0.025 [0.004;0.192]	0.26	0.016 [0.004;0.208]	0.017 [0.009;0.203]	0.182	0.015 [0.004;0.073]	0.721
regulatory	0.0 [0.0;0.11]	0.0 [0.0;0.019]	0.463	0.0 [0.0;0.002]	0.345	0.0 [0.0;0.007]	0.0 [0.0;0.007]	0.678	0.0 [0.0;0.01]	0.463	0.0 [0.0;0.001]	0.0 [0.0;0.004]	0.075	0.0 [0.0;0.004]	0.5
CD25+	0.0 [0.0;0.001]	0.0 [0.0;0.003]	0.735	0.0 [0.0;0.001]	0.463	0.0 [0.0;0.001]	0.0 [0.0;0.002]	0.878	0.0 [0.0;0.001]	0.249	0.0 [0.0;0.001]	0.0 [0.0;0.001]	0.721	0.0 [0.0;0.001]	0.499
<b>CD4+ Lymphozyten</b>	0.129 [0.109;0.3]	0.158 [0.108;0.284]	0.107	0.129 [0.097;0.274]	0.917	0.137 [0.104;0.326]	0.166 [0.042;0.29]	0.929	0.159 [0.104;0.41]	0.11	0.166 [0.117;0.358]	0.226 [0.119;0.4]	0.041	0.165 [0.05;0.383]	0.721
RO+	0.124 [0.105;0.243]	0.139 [0.1;0.221]	0.263	0.122 [0.095;0.214]	0.917	0.125 [0.101;0.286]	0.146 [0.039;0.254]	0.929	0.156 [0.85;0.365]	0.066	0.155 [0.107;0.318]	0.202 [0.155;0.359]	0.041	0.158 [0.038;0.34]	0.859
central memory	0.072 [0.028;0.165]	0.062 [0.036;0.153]	0.484	0.06 [0.034;0.147]	0.046	0.062 [0.021;0.618]	0.069 [0.018;0.141]	0.424	0.065 [0.033;0.225]	0.093	0.069 [0.030;0.191]	0.096 [0.032;0.232]	0.026	0.083 [0.019;0.21]	0.953
naive	0.007 [0.001;0.054]	0.011 [0.003;0.057]	0.028	0.009 [0.0;0.056]	0.116	0.008 [0.001;0.045]	0.009 [0.001;0.055]	0.859	0.009 [0.005;0.047]	0.011	0.01 [0.001;0.057]	0.011 [0.001;0.046]	0.182	0.009 [0.002;0.052]	0.441
effector memory	0.062 [0.043;0.079]	0.068 [0.051;0.136]	0.123	0.06 [0.053;0.126]	0.116	0.064 [0.037;0.151]	0.077 [0.021;0.164]	1	0.084 [0.045;0.249]	0.214	0.08 [0.044;0.14]	0.088 [0.037;0.138]	0.286	0.071 [0.022;0.139]	0.953
EMRA	0.015 [0.001;0.045]	0.021 [0.001;0.071]	0.237	0.028 [0.0;0.052]	0.046	0.024 [0.001;0.09]	0.022 [0.002;0.07]	0.213	0.037 [0.002;0.108]	0.441	0.031 [0.003;0.071]	0.031 [0.003;0.069]	0.093	0.026 [0.001;0.075]	0.26
HLA-DR+	0.062 [0.16;0.091]	0.074 [0.22;0.105]	0.05	0.082 [0.023;0.089]	0.5	0.062 [0.012;0.09]	0.056 [0.009;0.103]	0.722	0.074 [0.01;0.149]	0.327	0.068 [0.012;0.145]	0.084 [0.01;0.15]	0.117	0.066 [0.002;0.143]	0.333
CD69+	0.008 [0.003;0.014]	0.006 [0.002;0.009]	0.068	0.009 [0.002;0.015]	0.753	0.011 [0.003;0.022]	0.008 [0.002;0.02]	0.424	0.009 [0.004;0.166]	0.26	0.006 [0.003;0.02]	0.008 [0.003;0.028]	0.272	0.006 [0.004;0.019]	0.959
Th1	0.013 [0.002;0.041]	0.022 [0.002;0.075]	0.528	0.017 [0.003;0.028]	0.917	0.014 [0.001;0.062]	0.017 [0.003;0.039]	0.286	0.019 [0.006;0.087]	0.26	0.021 [0.001;0.051]	0.032 [0.002;0.072]	0.209	0.021 [0.001;0.054]	0.594
Th2	0.009 [0.005;0.03]	0.009 [0.005;0.037]	0.075	0.008 [0.006;0.036]	0.116	0.013 [0.002;0.056]	0.009 [0.006;0.042]	0.213	0.021 [0.002;0.131]	0.401	0.015 [0.001;0.053]	0.014 [0.001;0.053]	0.099	0.016 [0.002;0.042]	0.646
Th17	0.013 [0.004;0.029]	0.01 [0.005;0.025]	0.262	0.008 [0.0;0.024]	0.345	0.012 [0.0;0.064]	0.007 [0.0;0.057]	0.333	0.007 [0.002;0.076]	0.889	0.011 [0.002;0.074]	0.012 [0.002;0.07]	0.155	0.011 [0.0;0.078]	0.878
regulatory	0.003 [0.0;0.01]	0.001 [0.0;0.014]	0.735	0.001 [0.0;0.01]	0.917	0.002 [0.001;0.026]	0.002 [0.001;0.022]	1	0.002 [0.001;0.027]	0.678	0.002 [0.001;0.019]	0.003 [0.001;0.02]	0.005	0.002 [0.001;0.005]	0.721
CD25+	0.001 [0.001;0.007]	0.002 [0.0;0.007]	0.799	0.001 [0.0;0.004]	0.753	0.001 [0.0;0.013]	0.001 [0.0;0.013]	0.374	0.001 [0.0;0.01]	0.594	0.001 [0.0;0.007]	0.001 [0.0;0.008]	0.034	0.001 [0.001;0.002]	0.959
<b>NKT-Zellen</b>	0.004 [0.0;0.043]	0.011 [0.001;0.053]	0.183	0.019 [0.001;0.047]	0.075	0.007 [0.001;0.059]	0.009 [0.0;0.041]	0.028	0.007 [0.002;0.06]	0.021	0.006 [0.001;0.052]	0.01 [0.002;0.048]	0.031	0.007 [0.001;0.035]	0.767
NK	0.189 [0.067;0.46]	0.204 [0.063;0.322]	0.674	0.168 [0.071;0.459]	0.705	0.158 [0.088;0.441]	0.2 [0.125;0.369]	0.859	0.231 [0.066;0.322]	0.374	0.162 [0.093;0.401]	0.195 [0.093;0.369]	0.695	0.189 [0.127;0.438]	0.037
CD56+CD16+	0.097 [0.027;0.172]	0.1 [0.036;0.183]	0.484	0.097 [0.025;0.194]	0.173	0.098 [0.044;0.289]	0.107 [0.062;0.252]	0.79	0.112 [0.043;0.251]	0.26	0.104 [0.049;0.289]	0.099 [0.066;0.273]	0.754	0.13 [0.064;0.305]	0.017
CD56bright CD16dim	0.042 [0.016;0.311]	0.044 [0.015;0.217]	0.833	0.035 [0.028;0.053]	0.917	0.036 [0.018;0.229]	0.042 [0.017;0.203]	0.328	0.036 [0.013;0.223]	0.859	0.036 [0.013;0.211]	0.038 [0.016;0.076]	0.272	0.029 [0.015;0.101]	0.285
CD56dim CD16bright	0.027 [0.015;0.121]	0.036 [0.013;0.094]	0.779	0.034 [0.018;0.235]	0.046	0.023 [0.01;0.158]	0.03 [0.008;0.086]	0.959	0.037 [0.006;0.078]	0.374	0.027 [0.007;0.12]	0.018 [0.004;0.101]	0.53	0.023 [0.012;0.164]	0.445

Tabelle 4: Kumulative Tabelle der gemessenen Lymphozyten und deren Subgruppen, angegeben ist der Median mit [min; max], sowie der p-Wert des Vergleichs der Messungen einen Tag und sieben Tage nach DLI. Signifikante p-Werte und die davon betroffenen Lymphozyten sind blau unterlegt. Abkürzungen: 1 Tag vor DLI (d-1), 1/7 Tag nach DLI (d+1/7), "im Vergleich zu" /versus (vs.), CD4/CD8-Ratio (CD4+CD8+), memory T-cells (RO+), effector memory -Zellen, die CD45RA exprimieren (EMRA), aktivierte T-Zellen (HLA-DR+, CD69+), regulatorische T-Zellen (Th1/Th2/Th17)

### 3.2.1 B-Lymphozyten

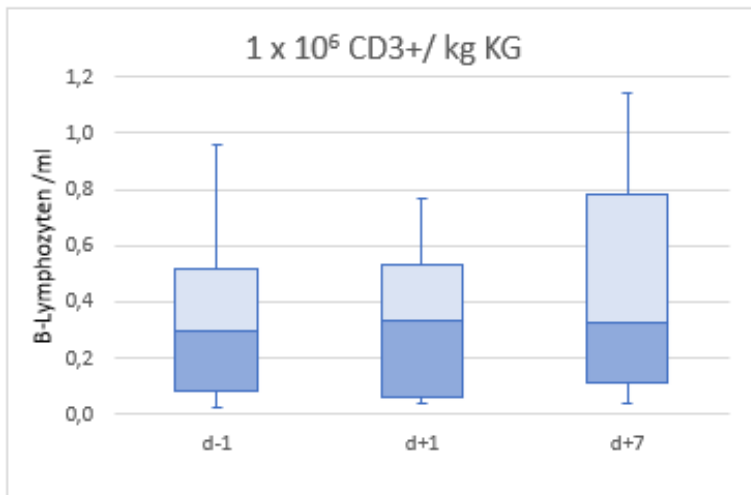


Abb. 11: Boxplot B-Lymphozyten gesamt: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; Abkürzungen: 1 Tag vor DLI (d-1), 1 Tag nach DLI (d+1), 7 Tage nach DLI (d+7)

Die B-Zellen wurden als interne Negativkontrolle gemessen.

Wie erwartet zeigte die Gesamtzahl der B-Lymphozyten in keiner Messung innerhalb der drei Konzentrationsstufen signifikante Änderungen. Auch die einzelnen Untergruppen wiesen in keiner Messung signifikante Veränderungen auf. Naive, memory-, class switched und transitional -Zellen blieben sowohl bezüglich der Konzentrationsstufen der DLI als auch bezüglich des Vergleiches von Tag 1 und Tag 7 nach DLI im Vergleich zu vor DLI auf einem ähnlichen Niveau.

### 3.2.2 T-Lymphozyten

Die CD4/CD8 -Ratio änderte sich in keiner Konzentrationsstufe, weder an Tag 1 noch an Tag 7 nach DLI signifikant. Auch nach abgeschlossener Therapie mit DLI konnte keine signifikante Änderung der Menge an T-Lymphozyten zum Ausgangswert vor der ersten DLI gemessen werden.

### 3.2.2.1 CD8 -Lymphozyten

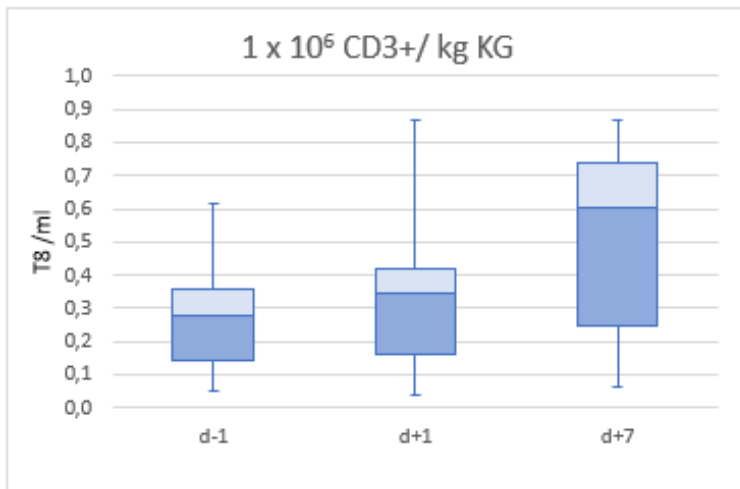


Abb. 12: Boxplot CD8+ -Lymphozyten: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; Abkürzungen: CD8+ T-Lymphozyten (T8), 1 Tag vor DLI (d-1), 1 Tag nach DLI (d+1), 7 Tage nach DLI (d+7)

Innerhalb der niedrigsten Konzentrationsstufe mit  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG gab es keine signifikanten Veränderungen der CD8+ -Zellen und ihrer Untergruppen an Tag 1 und Tag 7 nach DLI verglichen zur Messung vor der DLI.

In der Konzentrationsstufe mit  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG gab es signifikante Änderungen bei 17 Subpopulationen.

Dabei zeigte die Gesamtzahl der CD8+ - Lymphozyten an Tag 1 nach DLI einen signifikanten Zuwachs ( $p = 0,026$ ). Von den Subgruppen vermehrten sich die EM ( $p = 0,041$ ), die EMRA ( $p = 0,05$ ), die Effektorzellen im mittleren Status ( $p = 0,021$ ), die exhausted ( $p = 0,041$ ) und die HLA-DR+ ( $p = 0,047$ ) -Zellen signifikant.

An Tag 7 nach DLI stieg die Gesamtzahl der CD8+ -Lymphozyten ( $p = 0,011$ ). Davon erhöhten sich die memory ( $p = 0,038$ ), die naiven ( $p = 0,028$ ), die EM ( $p = 0,028$ ), die EMRA ( $p = 0,011$ ), die Effektorzellen im mittleren Status ( $p = 0,015$ ), die Effektorzellen im späten Status ( $p = 0,021$ ), die exhausted ( $p = 0,021$ ), die terminal effector ( $p = 0,011$ ) und die HLA-DR+ ( $p = 0,015$ ) -Zellen signifikant. Eine signifikante Abnahme zeigte sich bei den Effektorzellen im frühen Status ( $p = 0,038$ ).

Central memory, CD69+, regulatory und CD25+ -Zellen waren zu keiner Zeit in dieser Konzentrationsstufe von signifikanten Veränderungen betroffen.

Nach der DLI mit der höchsten Dosierung von  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG gab es signifikante Veränderungen nur an Tag 1, jedoch keine an Tag 7. Die Gesamtzahl der CD8+ -Zellen erhöhte sich ( $p = 0,01$ ). Die memory ( $p = 0,026$ ), die naiven ( $p = 0,041$ ), die Effektorzellen im späten Status ( $p = 0,05$ ), die exhausted ( $p = 0,019$ ) und die HLA-DR+ ( $p = 0,01$ ) -Zellen waren diejenigen Untergruppen, die signifikant zunahmten. Ein signifikanter Rückgang konnte bei den EMRA -Zellen beobachtet werden ( $p = 0,021$ ).

Central memory, EM, die Effektorzellen im frühen Status, die Effektorzellen im mittleren Status, terminal effector, CD69+, die regulatorischen und die CD25+ - Zellen änderten sich innerhalb dieser Konzentrationsstufe zu keiner Zeit signifikant.

### 3.2.2.2 CD4 -Lymphozyten

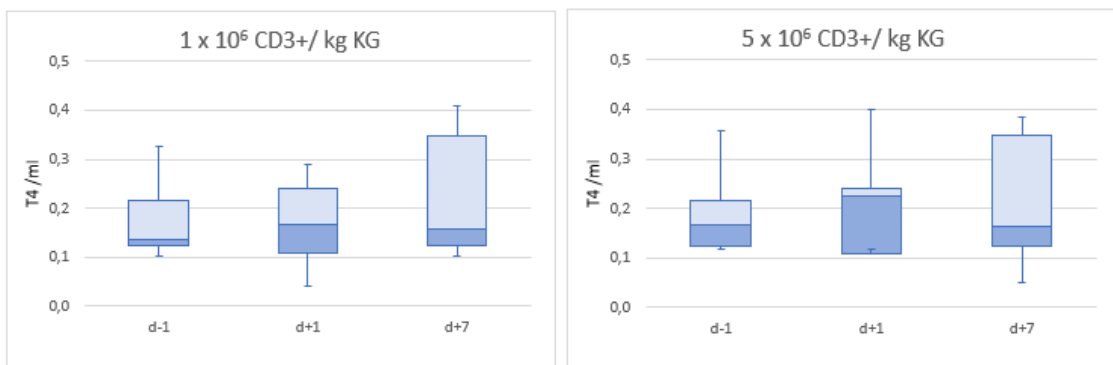


Abb. 13: Boxplots CD4+ -Lymphozyten: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in den Dosierungen  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG und  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; Abkürzungen: CD4+ T-Lymphozyten (T4), 1 Tag vor DLI (d-1), 1 Tag nach DLI (d+1), 7 Tage nach DLI (d+7)

Im DLI-Zyklus der niedrigsten Konzentrationsstufe gab es an Tag 1 signifikante Zunahmen in den Untergruppen der naiven ( $p = 0,028$ ) und der HLA-DR+ -Zellen ( $p = 0,05$ ). Nach sieben Tagen verminderten sich die central memory -Zellen signifikant ( $p = 0,046$ ) und die EMRA -Zellen stiegen signifikant ( $p = 0,046$ ).

Sowohl die Gesamtzahl der CD4+ -Lymphozyten, als auch die Subgruppen memory, effector memory, CD69+, Th1, Th2, Th17, regulatory und CD25+ -Zellen blieben bei der Dosis  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG von signifikanten Veränderungen unberührt.

In der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG trat nur eine einzige signifikante Änderung auf. Diese betraf die naiven CD4+ -Lymphozyten, die sich an Tag 7 erhöhten ( $p = 0,011$ ). In der Gesamtzahl der CD4+ -Zellen sowie in sämtlichen anderen Untergruppen konnten keine signifikanten Änderungen an Tag 1 und Tag 7 nach DLI registriert werden.

Beim Vergleich von Tag 1 nach DLI in der höchsten Dosierung von  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG zum Wert davor stieg die Gesamtzahl der CD4+ -Lymphozyten signifikant ( $p = 0,041$ ). Von den Subgruppen erhöhten sich signifikant die memory ( $p = 0,041$ ), die central memory ( $p = 0,026$ ), die regulatory ( $p = 0,005$ ) und die CD25+ ( $p = 0,034$ ) -Zellen.

Keine signifikanten Änderungen zeigten naive, effector memory, EMRA, HLA-DR+, CD69+, Th1, Th2 und Th17 -Zellen.

An Tag 7 wurde keine signifikante Veränderung der CD4+ -Lymphozyten mehr gemessen.

### 3.2.3 NK-ähnliche T-Lymphozyten

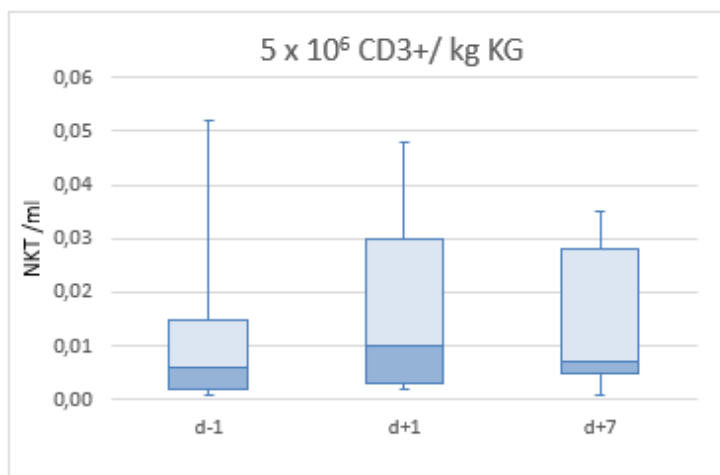


Abb. 14: Boxplot NKT-Zellen: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; Abkürzungen: NK-ähnliche T-Zellen (NKT-Zellen), 1 Tag vor DLI (d-1), 1 Tag nach DLI (d+1), 7 Tage nach DLI (d+7)

NKT-Zellen wiesen in der niedrigsten Konzentrationsstufe keine signifikanten Änderungen auf.

In der mittleren Konzentrationsstufe konnten sowohl an Tag 1 nach DLI ( $p = 0,028$ ), als auch an Tag 7 nach DLI ( $p = 0,021$ ) signifikante Werte gemessen werden.

Eine signifikante Zunahme der NKT-Zellen wurde mit der höchsten DLI-Dosis an Tag 1 beobachtet ( $p = 0,031$ ).

### 3.2.4 NK-Zellen

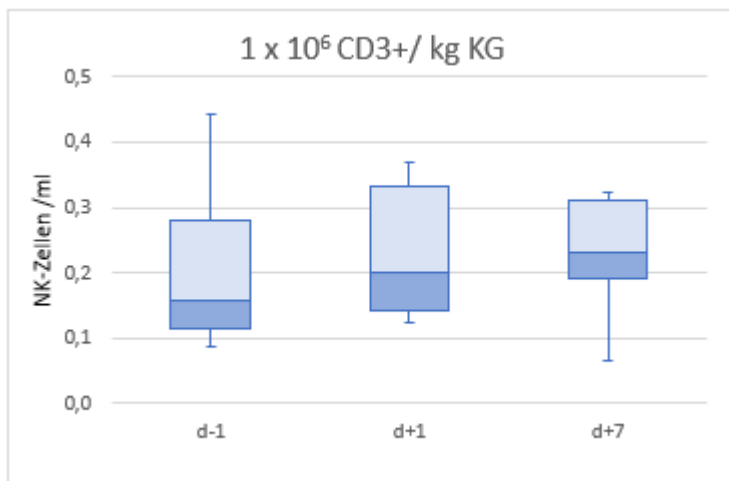


Abb. 15: Boxplot NK-Zellen: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/kg KG; Abkürzungen: natürliche Killerzellen (NK), 1 Tag vor DLI (d-1), 1 Tag nach DLI (d+1), 7 Tage nach DLI (d+7)

Innerhalb der niedrigsten Konzentrationsstufe vermehrten sich CD56dim CD16bright -Zellen an Tag 7 nach DLI signifikant ( $p = 0,046$ ).

In der mittleren Konzentrationsstufe mit  $1 \times 10^6$  CD3+/kg KG gab es keine signifikanten Änderungen der NK-Zellen und deren Untergruppen.

An Tag 7 nach DLI in der höchsten Dosierung stieg die Gesamtzahl der NK-Zellen signifikant ( $p = 0,037$ ). Ebenso konnte bei gleicher Dosierung und im gleichen Zeitintervall eine signifikante Zunahme der CD56+ CD16+ -Lymphozyten ( $p = 0,017$ ) gemessen werden.

In den CD56bright CD16dim -Zellen gab es in keiner Messung innerhalb der drei Konzentrationsstufen signifikante Änderungen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Interpretation der Ergebnisse

#### 4.1.1 Dosierung der DLI

Ein Anstieg der Gesamtlymphozyten und T-Lymphozyten nach DLI konnte im peripheren Blut nicht gemessen werden. Jedoch wurden signifikante Änderungen innerhalb verschiedener T-Lymphozytensubpopulationen festgestellt.

Die meisten Änderungen der Lymphozytenzusammensetzung gab es in der Konzentrationsstufe  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG, sowohl an Tag 1 wie auch an Tag 7 nach DLI. An Tag 1 nach Gabe von  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG fanden sich geringfügig weniger Änderungen, jedoch nicht mehr an Tag 7 nach DLI. Dort fanden sich wie innerhalb der Konzentrationsstufe  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG nur vereinzelt Änderungen der Lymphozytensubpopulationen.

Es konnte also gezeigt werden, dass die DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG die deutlichsten Änderungen der Lymphozytenzusammensetzung induzierte. Das deutet darauf hin, dass die optimale Dosierung einer DLI mit der stärksten Anstoßung der immunmodulatorischen Wirkung im Bereich um diese Konzentrationsstufe liegt. Dies korreliert auch mit der Erkenntnis klinischer Studien, in denen zur Trennung von GvHD und GvL die CD3+ -Zelldosis variiert wurde und die dadurch zu dem Ergebnis kamen, dass die Anzahl der Spender-T-Zellen entscheidend für den Effekt der DLI ist [45, 101].

#### 4.1.2 Remission und Auftreten einer GvHD

Bei den Messungen wurde das individuelle Outcome mit den Veränderungen in der Lymphozytensubpopulation nicht einzeln analysiert, sondern die Ergebnisse der jeweiligen Dosierung zusammengefasst, um eine aussagekräftige statistische Auswertung zu erhalten.

Insgesamt zeigten an t+24 10 Patienten ein klinisches Ansprechen auf die Behandlung mit DLI. Dies entspricht ca. 63% in einem Beobachtungszeitraum von 2 Jahren nach erster DLI. 2 Patienten (ca. 13%) befanden sich zu diesem Zeitpunkt im aktiven Rezidiv. 25% der Patienten waren zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben, 19% aufgrund des Rezidivs.

Innerhalb jeder einzelnen Konzentrationsstufe lag die Remissionsrate der untersuchten Patienten bei mindestens 60%. In der Konzentrationsstufe  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG erlangten sogar 80% der Patienten eine CR.

Dies deutet darauf hin, dass die in dieser Arbeit gemessenen Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen in allen Dosierungen stellvertretend für eine Entwicklung in Richtung Remission betrachtet werden können.

Das Erreichen einer Remission hängt jedoch nicht nur von der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen ab, sondern auch von der Art der malignen Zellen. So zeigen unterschiedliche Grunderkrankungen nicht die gleiche Empfindlichkeit für den GvL-Effekt [13]. Dies könnte ursächlich dafür sein, dass nur einer der 2 Patienten mit CML und alle der 3 Patienten mit Multiplem Myelom keine CR erreichten.

Bei 5 Personen sind innerhalb des beobachteten Zeitraums GvHD aufgetreten. Vorausgegangen waren diesen jeweils eine andere Dosierung der DLI mit  $2 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $2 \times 10 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$  und  $0,5 \times 10^8$  CD3+/ kg KG. Von diesen war lediglich die DLI-Konzentration  $2 \times 10^5$  CD3+/ kg KG eine der durch uns intensiver betrachteten Dosierungen, die anderen Konzentrationsstufen wurden nur wenigen der Patienten verabreicht. Durch diese Umstände ist ein objektiver Vergleich der aufgetretenen GvHD nicht sinnvoll möglich.

Grundsätzlich handelt es sich bei fünf Patienten mit GvHD zudem um eine sehr geringe Stichprobe, die ohnehin wenig aussagekräftig ist. Hinzu kommt, dass sowohl aGvHD wie cGvHD aufgetreten sind, wodurch die Anzahl der unmittelbar miteinander vergleichbaren GvHD weiter sinkt.

Des Weiteren hatten die Patienten, die von einer GvHD betroffen waren, unterschiedliche Grundvoraussetzungen. Diese betreffen einerseits das Geschlecht, die Grunderkrankung, sowie die Indikation für eine Behandlung mit DLI. Dazu erhielten die Patienten die DLI, welche der GvHD vorausgegangen war, zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihres jeweiligen Zyklus mit unterschiedlich vielen vorausgegangenen DLI in unterschiedlich hohen Dosierungen.

Aufgrund dieser vielen abweichenden Parameter ist eine repräsentative Aussage über Auffälligkeiten in der Lymphozytensubpopulation bei Auftreten einer GvHD aus den hier gewonnenen Ergebnissen nicht möglich.



Dies bestätigt jedoch erneut die Annahme, dass die in dieser Arbeit gemessenen signifikant veränderten Zellen mit dem GvL-Effekt assoziiert sein müssen, da keine Korrelation zwischen behandlungsbedürftiger GvHD und den untersuchten Dosierungen besteht.

In dieser Arbeit traten therapiebedürftige GvHD erst nach Ende der Therapie mit allen DLI-Zyklen oder nach Verabreichen von DLI in sehr hohen Dosierungen auf.

Zudem fällt auf, dass 4 der 5 von einer GvHD betroffenen Patienten an einer Form der AML erkrankt waren und dass 3 der Patienten präemptiv mit DLI behandelt wurden. Diese Umstände müssen nicht zwingend eine tiefere Bedeutung haben, zumal von den 16 Patienten die AML die häufigste Erkrankung und präemptiv die häufigste Indikation zur Behandlung darstellte. Allerdings könnten diese Beobachtungen Hinweise auf derzeit noch nicht ausreichend untersuchte Zusammenhänge geben.

So können mit dieser Arbeit einige in anderen Studien bereits gewonnene Erkenntnisse bestätigt werden. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der Entstehung einer GvHD und einer hohen CD3+ -Zelldosis der DLI [45, 77, 78] beziehungsweise der Grunderkrankung des Patienten [10, 45, 102].

#### **4.1.3 Lymphozyten-Subpopulationen**

Mehrere Studien haben sich mittlerweile mit der Thematik befasst, welche Immunzellen für den GvL- und welche für den GvHD-Effekt verantwortlich sind. Forscher sind sich einig, dass CD8+ -Zellen den wichtigsten Mediator der GvL-Aktivität darstellen [103-111]. Ebenso aktiv beteiligt sind jedoch auch NKT und NK-Zellen [104].

Auch antigenspezifische Subgruppen der CD4+ -Zellen sind als relevante Effektoren für die GvL-Reaktion genannt worden [105], da sie über die Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren aktivierende, unterstützende und kontrollierende Eigenschaften besitzen. Zur Aufrechterhaltung einer kompetenten Funktion von CD8+ -Zellen sind CD4+ -Zellen also

unabdingbar [112], direkter Auslöser der GvL-Reaktion sind sie damit jedoch eher nicht.

Bei Versuchen isolierte Zellreihen zu verabreichen, konnte GvHD zwar wirksam reduziert werden, allerdings hatte dies auch Folgen wie fehlendes Engraftment, Infektionen und erhöhte Rezidivraten [113].

Um also den größtmöglichen Effekt einer GvL-Aktivität zu erzielen, ist ein komplexes Zusammenspiel von CD8+, CD4+, NKT und NK-Zellen erforderlich [108, 109].

In Hinblick auf die einzelnen Untergruppen der Zellreihen gibt es derzeit nur wenige Erkenntnisse, welche für die GvL-Reaktion verantwortlich sind. Es gibt Hinweise darauf, dass naive, Effektorzellen und central memory -Zellen beteiligt sind [108, 114, 115].

In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf den Subgruppen der verschiedenen Zellreihen, um noch präziser herausarbeiten zu können, wo im Detail die für den GvL-Effekt wirksame Immunmodulation stattfindet.

#### **4.1.3.1 B-Lymphozyten**

B-Lymphozyten erkennen Antigene und differenzieren dann in Plasmazellen, die Antikörper synthetisieren und sezernieren. Diese Immunglobuline können Mikroorganismen durch Opsonierung, direkte Neutralisierung und durch Aktivierung des Komplementsystems inaktivieren. Sie spielen also eine wichtige Rolle bei der pathogenspezifischen Immunabwehr. [116]

Auch bei der Bekämpfung von soliden Tumoren nehmen sie durch lymphatische Infiltration über ihr zytotoxisches Potential und der Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen einen wichtigen Stellenwert ein [117-119]. Bei der Behandlung von hämatologischen Neoplasien sind B-Lymphozyten jedoch nicht von großer Bedeutung, zudem beruhen Immuntherapien hauptsächlich auf der Aktivierung von T-Zellen [120].

Vor diesem Hintergrund war zu erwarten, dass sich die Anzahl der B-Lymphozyten und ihrer Untergruppen durch das Verabreichen von DLI nicht ändert, weshalb sie als interne Negativkontrolle herangezogen wurden.

Durch das Ausbleiben von signifikanten Veränderungen innerhalb der gesamten B-Zell-Subpopulation innerhalb aller untersuchten Konzentrationsstufen zu

jedem Zeitpunkt konnte bekräftigt werden, dass die DLI ursächlich für die Immunmodulation innerhalb der T-Zellen waren.

#### 4.1.3.2 T-Lymphozyten

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Gesamtzahl der Lymphozyten sich vom Zeitpunkt vor Therapiebeginn mit DLI zur Messung nach der letzten DLI erhöht, da durch die DLI viele CD3+ -Zellen infundiert worden sind. Auffällig ist jedoch, dass die Anzahl der Gesamt-CD3+ -Zellen ohne signifikanten Anstieg geblieben ist. Dies lässt vermuten, dass die infundierten Zellen großteils in Gewebe migrieren oder in Apoptose gehen. Da nach DLI jedoch nachweislich eine Reaktion im Sinne eines GvL-Effekts ausgelöst wird, ist es wahrscheinlich, dass die verabreichten CD3+ -Zellen zwar nicht selbst aktiv werden, aber dennoch als starker Induktor und Mediator der körpereigenen Immunreaktion fungieren.

T-Zellen unterliegen einer dynamischen Entwicklung, in der sie verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen. Aus naiven T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, entstehen so unterschiedliche Effektor- und Gedächtniszellen. [121-125]

Naive T-Lymphozyten sind die Hauptquelle für das große Repertoire der T-Zellen und somit maßgeblich an der effektiven Reaktion des Immunsystems auf fremde Reize beteiligt. Obwohl sie dadurch unentbehrlich sind, gibt es zahlreiche Quellen, die naive T-Zellen als mitverantwortlich für den GvHD-Effekt identifiziert haben [56, 113-115, 126-134].

In dieser Arbeit konnte zu verschiedenen Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg der naiven T-Zellen verzeichnet werden, jedoch konnte kein direkter Zusammenhang mit dem Auftreten von GvHD oder der GvL-Reaktion festgestellt werden.

In den hier vorliegenden Messungen konnte ein signifikanter Anstieg der naiven CD8+ -Zellen an Tag 7 in der mittleren Dosierung und an Tag 1 in der höchsten Dosierung festgestellt werden. Zu diesen Zeitpunkten ist die Immunmodulation bereits maximal aktiv und es werden neue CD8+ -Zellen benötigt, um eine ausreichende Deckung mit den benötigten Untergruppen zu gewährleisten. Eine

Rekrutierung von naiven CD8+ -Zellen zu diesem Zeitpunkt ist demnach sinnvoll und ein passender Befund zu einer Immunreaktion.

Naive CD4+ -Zellen vermehrten sich signifikant in der niedrigsten Dosierung an Tag 1, sowie in der mittleren Dosierung an Tag 7. Der bereits in der niedrigsten Dosierung bestehende frühe Anstieg spricht dafür, dass schon diese Dosierung ausreichend war, um Reize für das Immunsystem zu setzen. Wie bekannt ist beginnt die Initiierung der GvL-Reaktion mit der Aktivierung der entsprechenden Effektoren durch CD4+ -Zellen [112], die hier als Erhöhung der naiven CD4+ -Zellen zu erkennen ist. Der erneute Anstieg an Tag 7 der mittleren Dosierung könnte die Vorbereitung auf die Ausbildung eines Immungedächtnisses und eine hemmende Aktion der CD4+ -Zellen sein, damit es nicht zu einer überschießenden Immunreaktion, also zu einer GvHD kommt.

Initialisiert durch z.B. eine akute Infektion bilden sich Effektor-T-Zellen aus, die in nicht lymphatisches, peripheres Gewebe einwandern können und in der Lage sind Zytokine und zytotoxische Moleküle wie Perforine zu produzieren [135-137]. Effektorzellen sind eine sehr heterogene Gruppe. Sie lassen sich in EM und EMRA unterteilen, die sich wiederum in einem frühen, mittleren und späten Status der Differenzierung befinden können. [122, 136] Ihre Funktion besteht in der antigenspezifischen Zytolyse, sowie der Ausschüttung von Interferon [123]. Das Endstadium stellen terminal effector -Zellen dar, die eine geringe Proliferation und Funktion aufweisen und zum Absterben bestimmt sind [122, 137, 138]. Eine kleine Teilmenge bleibt nach Abklingen der Infektion jedoch bestehen und differenziert sich in central memory -Zellen, die als langlebiges T-Zell-Gedächtnis bestehen bleiben. Sie können sich selbst erneuern und differenziertere Nachkommen bilden. Sie bewegen sich wie naive T-Zellen wiederholt durch den Lymphknoten, bis sie auf antigenpräsentierende Zellen treffen. [135-137]

Die Effektorzellen EM und EMRA sind die einzigen Subpopulationen, bei denen die Fähigkeit GvL zu vermitteln aber keine GvHD auszulösen vermutet wird [56, 115, 130, 132, 133]. Ihnen scheint also eine sehr wichtige Rolle für das Erreichen einer Remission zuzukommen.

In dieser Arbeit waren CD8+ EM sowie EMRA in mittlerer Dosierung an Tag 1 und 7 signifikant gestiegen. In höchster Dosierung konnte ein Absinken der EMRA an Tag 1 festgestellt werden. Betrachtet man zusätzlich den Status der Effektorzellen, so fällt auf, dass sich an Tag 7 bei mittlerer Dosierung der frühe Status signifikant verringerte. Der mittlere Status erhöhte sich an Tag 1 und 7 der mittleren Dosierung und wurde an Tag 7 der mittleren Dosierung abgelöst durch den späten Status, der an diesem und an Tag 1 der höchsten Dosierung angestiegen ist. Blazar et al. zeigten, dass die GvL-Reaktion erhalten blieb und GvHD reduziert wurde, wenn die CD28 Costimulation blockiert wurde [139]. In diesem Sinne könnte das Absinken der CD28+ -Zellen erklärt werden. Die Zellen im mittleren und späten Status haben sich in anderer Quelle als die deutlich effektiveren Zellen zur Immunabwehr gezeigt [140], so dass hier eine zur Literatur passende Entwicklung stattfand. Parallel zur Abnahme des frühen Status stiegen die Zellen der anderen Status innerhalb der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG an, was auf eine starke immunmodulatorische Wirkung der DLI hinweist und auf die klinische Entwicklung in die gewünschte therapeutische Richtung hindeutet. Dass innerhalb der Dosierung  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG keine EM und nur noch eine verringerte Anzahl an EMRA zu messen war könnte dadurch erklärt werden, dass die Effektorzellen in peripheres Gewebe abgewandert sind.

Innerhalb der CD4+ -Zellen waren EM komplett unauffällig und EMRA wurden innerhalb der niedrigsten Dosierung an Tag 7 einmal erhöht gemessen. Diese initiieren die Aktivierung von CD8+ -Zellen. Vorausgegangen war diesem Anstieg sieben Tage zuvor eine vermehrte Rekrutierung von naiven CD4+ -Zellen. Diese bilden die Basis für die Entstehung weiterer Subgruppen und sind somit die Voraussetzung für eine angehende Immunreaktion. Die gleichzeitige Erhöhung von HLA-DR+ spricht ebenfalls für eine Aktivierung der naiven Zellen und bestätigt damit nicht nur eine vermehrte Anzahl, sondern auch eine erhöhte Funktionalität. An Tag 7 nahmen central memory -Zellen signifikant ab, da sich aus diesen die EMRA entwickelten. Die gesamten Veränderungen innerhalb der niedrigsten Dosierung entsprechen einer logischen Abfolge von Veränderungen, die eine anlaufende Immunreaktion anschaulich darstellen.

Terminal effector -Zellen konnten nur an Tag 7 der mittleren Dosierung erhöht gemessen werden. Es fallen also entweder nur wenige enddifferenzierte Zellen

an oder sie werden sehr schnell abgebaut, so dass sie in den Messungen dieser Arbeit nur in geringem Maße auftauchen.

Interessanter ist jedoch die Entwicklung zu memory und central memory -Zellen. Ein Anstieg von memory -Zellen konnte innerhalb der CD8+ -Zellen an Tag 7 der mittleren und an Tag 1 der höchsten Dosierung und innerhalb der CD4+ -Zellen an Tag 1 der höchsten Dosierung beobachtet werden. Central memory -Zellen blieben innerhalb der CD8+ -Zellen unverändert, während sie innerhalb der CD4+ -Zellen nach ihrer Abnahme an Tag 1 in der niedrigsten Dosierung dann an Tag 1 der höchsten Dosierung signifikant anstiegen. Dass der Verbrauch der CD4+ central memory -Zellen der Induktion von EMRA -Zellen zur Aktivierung der CD8+ -Zellen dient, wurde oben bereits erörtert. Die Vermehrung spricht für die Ausbildung eines zentralen Gedächtnisses am Ende der Immunreaktion, die durch die Erhöhung von CD4+ -T<sub>reg</sub> eingeleitet wurde. Das ein entsprechender Anstieg innerhalb der CD8+ -Zellen fehlt, könnte daran liegen, dass central memory -Zellen in lymphoides Gewebe migrieren und deshalb durch die Messungen im peripheren Blut nicht erfasst wurden. Die Entwicklung innerhalb der Gedächtniszellen dokumentiert jedoch eine sichtbare Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Ein klarer Hinweis auf eine bevorstehende oder verhinderte GvHD wurde durch die Veränderung der Effektor- und Gedächtniszellen nicht gefunden. Dies entspricht der Studienlage, die keine eindeutige Beziehung zwischen GvHD und diesen Subgruppen herstellen konnte. Einige Quellen postulieren eine Auslösung von GvHD durch Effektor- und Gedächtniszellen [56, 106, 113-115, 126-133, 141, 142], andere wiederum verneinen genau diesen Zusammenhang [113, 115, 130].

Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche von T-Zellen können verschiedene Phasen einer Immunaktivierung beschreiben. Der erste Marker in der Frühphase ist CD69, dessen Expression innerhalb der ersten 3-12 Stunden ansteigt, bis 24 Stunden erhöht bleibt und danach wieder abnimmt. Der Marker CD25, der konstitutiv auch auf T<sub>reg</sub> und ruhenden memory-Zellen vorhanden ist, beginnt seinen Anstieg nach 24 Stunden und bleibt einige Tage erhöht. Die Spätphase wird durch die HLA-DR+ -Expression nach 24 Stunden induziert und bleibt dann bis zu einigen Wochen anhaltend hoch. [143]

Ein Anstieg des Markers CD69+ konnte über alle Dosierungen hinweg weder bei den CD4+, noch bei den CD8+ -Zellen gemessen werden. Da die erste Messung innerhalb dieser Arbeit erst nach 24 Stunden stattfand, war zu erwarten, dass hier keine Veränderungen stattfinden.

Der Marker CD25+ wurde nur einmal erhöht gemessen, nämlich einen Tag nach der DLI in höchster Dosierung innerhalb der CD4+ -Zellen. Diese Erhöhung fand parallel zu der Erhöhung der CD4+ -T<sub>reg</sub> statt und auch sonst wurden keine Veränderungen innerhalb der CD25+ -Zellreihe festgestellt. Dadurch wird ersichtlich, dass es sich hierbei nicht um die Darstellung des Aktivierungsmarkers handelt, sondern um die Messung von CD4+ -T<sub>reg</sub>. Wahrscheinlich ist, dass der Anstieg des Aktivierungsmarkers CD25+ erst über die 24 Stunden hinaus stattfindet und sieben Tage nach DLI bereits abgeflacht ist und deshalb durch die Messungen hier auch nicht erfasst werden würde.

Auch HLA-DR+ dient dazu den Aktivitätsgrad zu messen, eine Erhöhung weist also darauf hin, dass Zellen funktionell aktiv sind. Dies ist einen Tag nach DLI in der niedrigsten Dosierung der CD4+ -Zellen der Fall, sowie innerhalb der CD8+ -Zellen an Tag 1 und 7 der mittleren Dosierung, sowie an Tag 1 der höchsten Dosierung. Eine Vermehrung dieses Markers wurde auch immer nur dann erfasst, wenn auch eine Erhöhung von Lymphozytensubpopulationen gemessen werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Anstieg von Zellen auch für eine Aktivierung dieser Untergruppen spricht, auch wenn die Anzahl von Zellen primär nicht unbedingt eine Aussage über deren Funktionalität zulässt. In diesem Fall sind innerhalb der CD8+ -Zellen neben einer signifikanten Erhöhung von HLA-DR+ mehrere Zellreihen signifikant gestiegen, so dass nicht mit Sicherheit zugeordnet werden kann für welche Zellen dieser Zusammenhang besteht. Die Aktivierung könnte also theoretisch auch nur für einen Teil dieser in vermehrter Anzahl gemessenen Zellen gültig sein.

Bei chronischen Infektionen oder Tumorerkrankungen entwickelt sich das T-Zell-Gedächtnis durch einen anhaltenden hohen Antigenspiegel nicht effizient und es bilden sich exhausted T-Zellen. Diese Zellen sind nicht in der Lage in einen antigen-unabhängigen Ruhezustand überzugehen, wie dies bei memory -Zellen der Fall ist. Viel mehr befinden sie sich in einer metabolischen

Entwicklung mit verminderter Proliferationskapazität, Verlust von Effektorfunktionen und einer erhöhten und anhaltenden Expression von inhibitorischen Rezeptoren. Sinn ihrer Entstehung ist vermutlich der Schutz des Wirts vor Autoaggressivität, hat aber andererseits eine begrenzte Kontrolle von Krankheitserregern und onkologischen Erkrankungen zur Folge. [135, 144]

In dieser Arbeit waren exhausted -Zellen an Tag 1 und 7 in mittlerer Dosierung, sowie an Tag 1 in höchster Dosierung signifikant erhöht. Durch die anhaltende Aktivierung des Immunsystems aufgrund der Neoplasie und die Verstärkung durch die DLI resultierte daraus eine vermehrte Bildung dieser Zellen. Eine Studie von Bachireddy et al. deutet darauf hin, dass CD4+ -Zellen durch DLI möglicherweise in der Lage sein könnten exhausted -Zellen zu reaktivieren und deren bereits erfolgte Spezifikation zu nutzen, um einen schnelleren und größeren Antitumor-Effekt zu induzieren [145]. Jedoch hat sich die Anzahl der exhausted -Zellen in dieser Arbeit parallel zur Vermehrung anderer CD8+ -Zellen erhöht. Dies deutet darauf hin, dass diese als Folge einer verstärkten Rekrutierung von CD8+ -Zellen, die den exhausted -Zellen vorausgehen, entstanden sind und keine Reaktivierung erfahren haben. Außerdem kann kein Zusammenhang mit der Erhöhung bestimmter CD4+ -Zellen hergestellt werden, was ebenfalls zur Unterstützung dieser These beiträgt. Die Studie von Bachireddy et al. behandelte allerdings nur CML-Patienten, so dass dies der entscheidende Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit sein könnte und aus diesem Grund keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt wurden.

Aktivierte CD4+ -Zellen können je nach Zytokinsezernierung in unterschiedliche Helferzellgruppen eingeteilt werden [146], die dementsprechend unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem übernehmen. Dabei aktivieren Th1 Makrophagen, um intrazelluläre Erreger zu eradizieren und fördern die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen [147]. Th2 dienen der Abwehr parasitärer Infektionen, indem sie die Entwicklung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten unterstützen [147, 148]. Die Aufgabe von Th17 besteht in der extrazellulären Abwehr von Bakterien und Pilzen [149], sowie der Aktivierung von NK-Zellen, CD8+ -Zellen, B-Zellen und Makrophagen [150].



In den CD4<sup>+</sup>-Untergruppen Th1, Th2 und Th17 wurde in keiner Dosierung eine signifikante Änderung der Zellzahl gemessen. Da diese Helferzellgruppen hauptsächlich für die Abwehr von Parasiten, Bakterien und Pilzen sowie zur Aktivierung von Makrophagen notwendig sind, war ein Gleichbleiben der Zellzahlen zu erwarten, da in unserem Patientenkollektiv zwischen Tag 1 und 7 nach DLI in keinem Zyklus Infektionen auftraten. Wie die B-Zellzahlen bestätigen auch die ausbleibenden Veränderungen der Helferzellen, dass DLI und keine anderen Ursachen verantwortlich für die gemessenen Werte sind. Zwar aktivieren CD4<sup>+</sup>-Helferzellen auch NK und CD8<sup>+</sup>-Zellen, jedoch ist hierfür erst eine Aktivierung der Helferzellreihe durch mindestens eine der oben genannten Auslöser von Nöten, da entsprechende Funktionen nicht losgelöst voneinander ablaufen können.

T<sub>reg</sub> regulieren die Immunantwort, indem sie die Aktivität selbstreaktiver T-Zellen unterdrücken. Dies geschieht über unterschiedliche Mechanismen wie Suppression oder Apoptose von Effektorzellen, Aufnahme großer Mengen an Interleukinen, Unterdrückung der Reifung naiver T-Zellen, Modulation der Funktion Antigen präsentierender Zellen, Immunsuppression von NK und B-Zellen und Aktivierung dendritischer Zellen, die selbst wiederum T<sub>reg</sub>-Zellen aktivieren. Eine Unterfunktion der T<sub>reg</sub> hätte eine Autoimmunität, eine Überfunktion eine Immunsuppression und Tumorentstehung zur Folge. [151-156]

Die Beziehung zwischen der Anzahl von T<sub>reg</sub> und der Entwicklung einer GvHD ist umstritten. In zahlreichen Untersuchungen konnten diesbezüglich keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> in der Lage sind GvHD zu unterdrücken, ohne den GvL-Effekt negativ zu beeinflussen [106, 107, 110, 157-159].

Heinrichs et al. [160] kamen zu dem detaillierteren Ergebnis, dass einerseits Spender-CD4<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> zwar wirksam eine GvHD verhindern, aber die GvL-Aktivität aufheben, und Spender-CD8<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> andererseits den GvL-Effekt unbeeinflusst lassen, während die GvHD allerdings nur mäßig reduziert wird. Sie schlussfolgerten, dass das Verabreichen einer Kombination aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T<sub>regs</sub> die erfolgversprechendste Option darstellt.

Nach Transplantation einer hohen Anzahl an  $T_{reg}$  bestätigten die meisten Studien einen Schutz vor GvHD [161-165]. Danby et al. berichteten sogar von einem verbesserten Gesamtüberleben und einer verringerten Mortalität ohne Rezidiv [166]. Studien, in denen die Anzahl der  $T_{reg}$  im Blut gemessen wurde, bekräftigten dies mit der Feststellung, dass niedrige Zahlen an  $T_{reg}$  bzw. eine mangelhafte numerische Erholung von  $T_{reg}$  mit cGvHD vergesellschaftet war [167, 168]. Bei aGvHD wurde ein Absinken der  $T_{reg}$  im Verhältnis zur Gesamt-CD4+ -Zellzahl beobachtet [169].

Doch es wurde nach Transplantation von  $T_{reg}$  auch von ungünstigen Auswirkungen auf das klinische Ergebnis berichtet [170], was auch in anderen Studien durch in vivo Messungen hoher Mengen an  $T_{reg}$  zutraf [171-175]. Im Umkehrschluss zeigen Hofmann et al., dass eine abnehmende Anzahl an  $T_{reg}$  im Blut bei klinischen Respondern und eine stabil bleibende Anzahl bei Nonrespondern zu finden war [176].

Andere Studien wiederum konnten keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der verabreichten  $T_{reg}$  und der Entstehung einer GvHD nachweisen [177, 178]. Weitere Studien kamen zu dem Schluss, dass nicht nur die  $T_{reg}$  -Zahl allein, sondern das Gesamtgleichgewicht von  $T_{reg}$ , myeloiden Suppressorzellen und Effektorzellen die Auswirkungen auf GvHD und GvL steuert [106, 160, 179-184].

In der vorliegenden Arbeit konnten kaum Veränderungen der  $T_{reg}$  -Zahl festgestellt werden. In den CD8+ -Lymphozyten wurden keine signifikanten Änderungen gemessen und in den CD4+ -Lymphozyten lediglich eine Erhöhung an Tag 1 in der höchsten Dosierung. Letztere spricht dafür, dass eine sehr starke Aktivierung des Immunsystems stattgefunden hat, die eine Suppression zum Schutz vor GvHD notwendig gemacht hat. In Form einer Gegenregulation fand deshalb ein Anstieg der  $T_{reg}$  statt. Als logische Folge konnte sieben Tage später beobachtet werden, dass keine der zuvor angestiegenen Zellreihen noch signifikante Erhöhungen verzeichnete. Lediglich die NK-Zellen waren vermehrt, was womöglich die Bildung von memory NK-Zellen abbildet.

Aus der Abnahme beziehungsweise dem Gleichbleiben der CD8+ -Effektorzellen an Tag 1 und dem Ausbleiben von Veränderungen jeglicher CD8+ -Untergruppen an Tag 7 ist zu schließen, dass innerhalb der höchsten Dosierung offensichtlich

eine so starke Aktivierung des Immunsystems stattfand, dass diese zu einer Stagnation der GvL-Reaktion führte. Dies könnte Ausdruck dafür sein, dass die Dosierung der DLI hier zu hoch war, die Anzahl der stattgehabten DLI-Zyklen ausreichend war oder der Abstand zum vorhergehenden DLI-Zyklus zu kurz war. Dieser Befund stellt eine sehr wichtige Erkenntnis für die klinische Anwendung dar. Denn diese Entwicklung könnte bei einem künftigen Monitoring einen Hinweis darauf geben, dass an diesem Punkt die Dosisescalation oder auch weitere DLI-Zyklen vermieden werden sollten oder der Abstand zum nächsten Zyklus vergrößert werden müsste, um GvHD oder das Ausbleiben einer GvL-Reaktion zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich dieser Zusammenhang klinisch jedoch nicht so deutlich wie auf zellulärer Ebene, was die Schwierigkeit der unmittelbaren Anwendbarkeit deutlich macht.

#### **4.1.3.3 NK-ähnliche T-Lymphozyten**

NKT-Zellen besitzen einerseits einen T-Zell-Rezeptor, der präsentierte Antigene erkennt und sind andererseits auch in der Lage ohne Voraktivierung Zytokine auszuschütten. Durch diese Funktionen und ihre Oberflächenmoleküle lassen sie sich sowohl den regulatorischen T-Zellen als auch den NK-Zellen und somit dem unspezifischen Immunsystem zuordnen. [185-188] NKT-Zellen aktivieren NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Zellen [189] und haben direkte zytolytische und zytotoxische Effekte auf Tumorzellen [186, 190]. Sie haben also bezüglich Tumoren sowohl immunregulatorische als auch suppressive und damit protektive Fähigkeiten [185, 189, 191].

In Studien konnte gezeigt werden, dass NKT-Zellen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung des GvL-Effekts zukommt [104, 105, 108, 109]. Eine erhöhte Zellzahl von NKT-Zellen scheint mit einer besseren Prognose bei Tumoren verbunden zu sein [192-201] und schützt vor GvHD [202, 203]. Dennoch kann durch NKT-Zellen unter gewissen Bedingungen auch eine Abstoßung des Transplantates verursacht werden [204]. Hauptbeschränkung im Einsatz von NKT-Zellen stellen tumorinduzierte Veränderungen von Anzahl und Funktion der

NKT-Zellen dar [192, 193, 195-197, 200, 205, 206]. Wie diese umgangen oder aufgehoben werden können ist Gegenstand aktueller Forschungen.

Die derzeitige Studienlage spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wider, in der signifikante Änderungen der NKT-Zellen einen und sieben Tage nach DLI mit  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG und einen Tag nach DLI mit  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG ermittelt werden konnten. Die Korrelation mit signifikanten Änderungen in der CD8+ -Population spricht für die Rekrutierung dieser Zellreihen infolge der Aktivierung von NKT-Zellen.

Die erhöhte Anzahl von NKT-Zellen entspricht hier einer Aktivierung dieser Zellen assoziiert mit einem aktiven GvL-Effekt. Die fehlende Erhöhung dieser Zellreihe in der niedrigsten Dosierung der DLI könnte darauf hindeuten, dass eine höhere Dosierung der DLI notwendig ist, um den GvL-Effekt ausreichend zu stimulieren und verdeutlicht, warum DLI in mehreren Zyklen verabreicht werden müssen, um eine ausreichende Immunmodulation zu erreichen.

#### 4.1.3.4 NK-Zellen

NK-Zellen gehören zur unspezifischen Abwehr des Körpers und lysieren von Viren befallene oder mutierte körpereigene Zellen. CD56bright CD16dim -Zellen vermehren sich nach Aktivierung stark und produzieren Zytokine und Chemokine. CD56dim CD16bright -Zellen besitzen das größere zytotoxische Potential und werden vor allem durch verminderte Expression des Membranproteins Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-I) aktiviert. Da Tumorzellen häufig eine geringere MHC-I-Molekül-Dichte aufweisen, kommt CD56dim CD16bright -Zellen in der Tumorbekämpfung eine besondere Bedeutung zu. [207, 208]

Viele Studien bestätigen, dass NK-Zellen wesentlich an der Vermittlung des GvL-Effekts beteiligt sind [105, 209-214]. Bei onkologischen Patienten zeigte sich, dass die Aktivität der körpereigenen NK-Zellen häufig reduziert ist [215]. Versuche mit der Verabreichung von autologen NK-Zellen führten nicht zu anhaltenden GvL-Effekten [216-219]. Es ist also eine Infusion von voll

funktionsfähigen Spender-NK-Zellen für den erfolgreichen Einsatz in Bezug auf den GvL-Effekt notwendig.

Zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen Forscher in Bezug auf die GvHD. Einerseits konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in der Lage sind das Auftreten von GvHD zu reduzieren [210, 211] oder sogar zu verhindern [212-214]. Andererseits gab es auch Ergebnisse, bei denen GvHD durch aktivierte NK-Zellen gefördert wurde. Insbesondere durch die Produktion (oder Verabreichung) von proinflammatorischen Zytokinen kam es zu vermehrter Aktivierung von T-Zellen und somit zum vermehrten Auftreten von GvHD [220-222], teilweise aber auch zu verstärkten GvL-Effekten [220].

Im Gegensatz zu den unterschiedlichen Ergebnissen bei erhöhter Aktivität der NK-Zellen scheint eine erniedrigte NK-Zellaktivität im peripheren Blut mit einem erhöhtem Tumorrisiko verbunden zu sein [223].

In dieser Arbeit vermehrten sich CD56dim CD16bright -Zellen 7 Tage nach DLI innerhalb der niedrigsten Konzentrationsstufe signifikant. Diese könnten zytotoxische NK-Zellen darstellen, die durch Zytokinausschüttung der verabreichten funktionsfähigen Spender-NK-Zellen aktiviert wurden. Allerdings wäre dadurch nicht erklärt, warum eine ähnliche Reaktion nicht auch in den anderen Konzentrationsstufen vorlag.

In der mittleren Konzentrationsstufe fand keine positive oder negative signifikante Abweichung der NK-Zellzahl statt. Eine gleichbleibende Zellzahl ist nach der derzeitigen Studienlage im Gegensatz zu einer verringerten Zellzahl dennoch als positiver Status zu werten [215, 223].

Da zudem bei den meisten Patienten dieser Arbeit eher molekulare Marker auffällig waren, könnte dies ebenso ein Grund für die ausbleibende Erhöhung von NK-Effektorzellen gewesen sein. Dies würde dann auch die fehlenden Auffälligkeiten innerhalb der CD56bright CD16dim -Zellen erklären.

NK-Zellen sind ebenfalls eine heterogene Gruppe und bilden wie T-Zellen unter anderem auch Gedächtniszellen aus [211, 224-226]. Diese können durch Kreuzreaktivität auch nach Aktivierung durch tumorfremde Auslöser an der Tumorbekämpfung mitwirken [226], indem sie durch Zytokine und Chemokine CD56dim CD16bright -Zellen aktivieren.

Dies könnte gleichermaßen als Erklärungsmodell für den Anstieg der CD56dim CD16bright -Zellen als NK-Effektorzellen innerhalb der ersten Konzentrationsstufe 7 Tage nach DLI dienen. Damit wäre auch der zeitliche Abstand zur DLI begründet. Außerdem könnte die Bildung von NK-Gedächtniszellen ursächlich für die Erhöhung der NK-Gesamtpopulation 7 Tage nach Verabreichen der DLI innerhalb der höchsten Konzentrationsstufe sein.

## 4.2 Stärken und Schwächen

Die Stärken dieser Arbeit liegen insbesondere an der sehr feinen Methodik und an der zeitgleichen Betrachtung von vielen einzelnen Lymphozytensubpopulationen. Bisher gab es noch keine Studie, die die Auswirkungen von DLI anhand von so vielen Untergruppen gemessen und verfolgt hat. In den meisten Forschungen wurden eine bis drei Lymphozytensubpopulationen isoliert verabreicht und dann Veränderungen innerhalb dieser Gruppen gemessen. Die Veränderungen beruhten in diesen Fällen auf einer schon zu Beginn ungleichen Anhäufung von bestimmten Untergruppen. Andere Studien untersuchten den Einfluss unterschiedlichster Mediatoren auf bestimmte Subpopulationen oder aktivierten einzelne Zellreihen vor den Messungen.

In dieser Arbeit jedoch wurde Wert darauf gelegt das physiologische Gleichgewicht der Zellen abzubilden. Aus diesem Grund wurden nicht manipulierte DLI verwendet und ein möglichst großes Spektrum an Untergruppen gemessen. Dies ermöglicht eine sehr genaue Abbildung der Veränderung von Zellzahlen innerhalb einer natürlichen Umgebung und befindet sich so sehr nah an der tatsächlichen Auswirkung der therapeutischen Anwendung im klinischen Alltag.

Eine so aufgebaute Arbeit ist in dieser Form bisher noch nicht existent und ist vielen anderen Untersuchungen dadurch überlegen.

Die große Schwäche dieser Arbeit liegt in der Probandenzahl, der Heterogenität des Patientenkollektivs und des relativ geringen Nachbeobachtungszeitraums ohne regelmäßige Analyse der Lymphozytensubpopulationen.

In die Studie sind lediglich 16 Patienten aufgenommen. Je höher jedoch die Anzahl an Patienten ist, desto genauer und repräsentativer werden die Ergebnisse. Dies ist auch ursächlich dafür, dass das Ziel, Hinweise für eine Zellveränderung bei GvHD zu finden, nicht erreicht werden konnte.

Zudem hatten die Patienten unterschiedlichste Grundvoraussetzungen. Sie litten an verschiedenen Grunderkrankungen und standen innerhalb ihrer Erkrankung an unterschiedlichen klinischen Wegpunkten. Deshalb erhielten sie die DLI aufgrund unterschiedlicher Indikationen mit einem individuellen Therapieplan mit einem jeweils anderen Eskalationsschema für die Verabreichung von DLI. Sie starteten und endeten also mit unterschiedlichen DLI-Dosierungen und einer jeweils anderen Anzahl an DLI-Zyklen und erhielten von den in dieser Arbeit betrachteten Konzentrationen nicht immer alle drei.

Dadurch sind das Patientenkollektiv und die individuellen Auswirkungen der DLI nicht optimal miteinander vergleichbar. Es ist möglich, dass die tatsächlichen Resultate in Wahrheit größeren Schwankungen unterliegen, als die hier zusammengefassten Ergebnisse vermuten lassen. Oder, dass aufgrund größerer Abweichungen andere Zusammenhänge nicht als solche erkannt werden konnten.

#### 4.3 Fazit

Naive Zellen wurden in vorangegangenen Studien sowohl ein Beitrag zur GvL-Reaktion als auch zur GvHD attestiert. In dieser Arbeit gab es jedoch keinen Hinweis auf die Auslösung einer GvHD durch naive Zellen, allerdings wurde auch kein Anhalt für die aktive Vermittlung einer GvL-Reaktion gefunden. Vielmehr konnten naive Zellen als elementare Untergruppe für eine funktionsfähige Immunreaktion identifiziert werden, da sie die Basis bilden, aus der sich sowohl Effektorzellen als auch Gedächtniszellen entwickeln.

Gedächtniszellen, denen ebenfalls Verantwortung für den GvL-Effekt und die GvHD zugeschrieben wurden, sind in dieser Arbeit ebenfalls nicht als direkt daran beteiligt aufgefallen. Vielmehr ermöglichen Gedächtniszellen nach erneuter Aktivierung durch die DLI eine schnellere Reaktion, wie dies an der Umwandlung von central memory -Zellen in EMRA -Zellen innerhalb der

niedrigsten Konzentrationsstufe der CD4+ -Zellen zu erkennen ist. Dadurch sind auch sie am GvL-Effekt beteiligt, aber nicht direkter Auslöser.

Effektorzellen wurden hier als die wichtigsten Zellen zur Auslösung eines GvL-Effekts ermittelt. Sie scheinen außerdem der sensibelste Marker zu sein, wenn es zu erkennen gilt, ob noch GvL-Aktivität vorhanden ist. Sie sind die einzigen Zellen, die an Tag 1 innerhalb der höchsten Dosierung - dem Punkt, an dem mutmaßlich eine Gegenregulation des Immunsystems stattfindet - erniedrigt gemessen wurden. Dabei scheinen die Zellen im mittleren und späten Status besonders effektiv zu sein, die Zellen im frühen Status eher unwichtig oder vielleicht sogar von gegenteiliger Wirksamkeit.

Die Erhöhung von exhausted -Zellen scheint den GvL-Effekt zumindest nicht einzuschränken und auch keine GvHD zu induzieren. Die Idee diese Zellen wieder zu reaktivieren ist interessant und birgt in Hinblick auf ihre Anzahl sicherlich auch ein enormes Potential. Womöglich konnte die These der Reversibilität von exhausted -Zellen durch die Arbeit aufgrund des heterogenen Patientenguts nicht bestätigt werden.

Terminal effector -Zellen spielten weder in früheren Studien noch innerhalb dieser Untersuchungen eine entscheidende Rolle.

CD4+ -T<sub>reg</sub>, die bisher in den meisten Studien untersucht wurden und als Schlüsselzellen zur Verhinderung der GvHD bekannt sind, sind auch hier von entscheidender Bedeutung. Ihr Anstieg markiert wahrscheinlich den Moment, an dem sich eine GvHD zu entwickeln droht. Sie sind also der wichtigste Indikator dafür, dass die laufende Therapie evaluiert und angepasst werden muss.

Die Veränderungen innerhalb der CD4+ -Untergruppen bestätigen, dass diese zwar für eine effektive CD8+ -Immunantwort unterstützend wichtig sind, aber mutmaßlich selbst keinen aktiven Anteil am GvL-Effekt haben. EMRA scheinen hier die bedeutsamste Untergruppe für die Anregung der Effektoren der CD8+ und NKT -Zellen darzustellen.

NKT-Zellen wurden bisher sowohl für den GvL-Effekt als auch für die GvHD verantwortlich gemacht. Auch in dieser Arbeit konnten sie als am GvL-Effekt beteiligt identifiziert werden, wohingegen eine Assoziation mit GvHD nicht festgestellt werden konnte.

NK-Zellen, die ebenfalls an der GvL-Reaktion beteiligt sein sollen, waren in diesen Messungen weitestgehend unauffällig. Offenbar sind sie bei soliden



Tumoren deutlich relevanter, hier scheinen sie eher eine supportive Rolle einzunehmen, wie auch die CD4+ -Zellen. Interessant ist jedoch der Hinweis auf die Ausbildung von memory NK-Zellen, die eventuell eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Remission einnehmen könnten.

Durch die Aktivierungsmarker konnte demonstriert werden, dass die Anzahl der Zellen auch mit ihrer Funktionalität korreliert.

Hinsichtlich der Veränderungen der Subpopulationen während der Entwicklung einer GvHD konnten innerhalb dieser Arbeit nicht genug Daten gesammelt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Das Resultat der Messungen hier spiegelt am ehesten die Veränderung der Lymphozyten-subpopulationen bei Remission wider.

Zur Dosierung der DLI lässt sich hervorheben, dass mit diesen drei Konzentrationen eine sehr gute Auswahl getroffen wurde, da sie viele Aspekte innerhalb einer durch DLI hervorgerufenen Immunmodulation darstellen. Innerhalb der niedrigsten Dosierung lässt sich ein Anstoßen einer Immunreaktion erkennen. Die mittlere Dosierung zeigt das volle Bild einer Immunmodulation und bildet typische Veränderungen der Subpopulationen ab. Innerhalb der höchsten Dosierung ist ein Umschlagpunkt zu sehen, an dem die laufende Immunreaktion durch körpereigene Mechanismen blockiert wird.

## 5. Ausblick

Die Idee und Methodik dieser Arbeit legen den Grundstein für die Intensivierung der Forschung mit ähnlichen Methoden, um die hier erworbenen Ergebnisse zu verifizieren und zu erweitern. Es wäre gewinnbringend eine größere Studie anzustreben, die mehr Patienten und ein besser vergleichbares Patientenkollektiv beinhaltet. Die Parameter, die beachtet werden sollten, sind Grunderkrankung, Zeitpunkt der DLI zum Zeitpunkt der HSCT, Indikation für DLI, die klinische Situation des Patienten, Dosierungen der DLI mit Anzahl von Zyklen und Dosisescalationsstufen.

Dies macht bereits deutlich, wie vielschichtig und komplex sowohl die Anwendung von DLI als auch die Auswirkungen von DLI auf den Organismus sind. Um ausreichend viele vergleichbare Ergebnisse auf so vielen Ebenen zu finden, ist eine sehr große Patientenzahl notwendig. Zudem muss bedacht werden, dass in die Planung und Entwicklung eines individuell patientenorientierten Therapiekonzepts viele Faktoren mit einfließen. Das macht eine solche Studie zu einem sehr aufwendigen und schwierigen Unterfangen.

Insbesondere sollte dem Monitoring der Veränderung der Subgruppen innerhalb der DLI-Zyklen intensive Beachtung geschenkt werden, um künftig sicher vorhersagen zu können, ob die Therapie den gewünschten Erfolg bringen wird oder Komplikationen drohen und das Therapiekonzept angepasst werden sollte. Des Weiteren sollten die Beobachtungen auch anschließend an die DLI-Zyklen fortgeführt werden, um die Erhaltung der Remission oder das Auftreten von Rezidiven auf zellulärer Ebene darstellen zu können. Vorstellbar wäre das Immunpanel zum Immunmonitoring als Verlaufskontrolle nach abgeschlossener Behandlung zu verwenden.

Die in dieser Arbeit angesprochene Reaktivierung von exhausted -Zellen und die Entstehung von NK-Gedächtniszellen sind ebenfalls interessante Themen, die noch mehr Aufmerksamkeit benötigen, um deren eventuelles Potential beurteilen zu können.

Eine weitere Möglichkeit - wenn auch mit anderen Vor- und Nachteilen - ist die Verabreichung von mononukleären Zellfraktionen, um zelluläre Mechanismen intensiver zu verstehen und so zur Entwicklung einer besseren T-Zell-basierten Therapie beizutragen.

Ebenfalls relevant sind jedoch auch Vorgänge auf nicht zellulärer Ebene, die durch Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, Zell-Zell-Kontakte und Antigene vermittelt werden und die Anzahl und Funktionalität der einzelnen Untergruppen beeinflussen. Auch hierzu gibt es bereits viele Studien, die jedoch bisher keine ausreichenden Ergebnisse geliefert haben, um dahingehend ein effektives Therapiekonzept zu entwickeln.

DLI ist jedoch nicht nur für die monotherapeutische Anwendung, sondern - wie bereits in vielen Studien schon thematisiert - auch für die kombinierte Anwendung eine wichtige Ressource. Genannt seien an dieser Stelle die Kombination mit Immuncheckpointinhibitoren, Tyrosinkinase-Inhibitoren oder Kinase-Inhibitoren, modifizierte DLI (wie lymphodepletierte, aktivierte oder G-CSF geprimte DLI), antigenspezifische DLI (wie cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs)) oder gentechnisch veränderte DLI (wie veränderte T-Zellen des T-Zell-Rezeptors (TCR) oder des chimären Antigenrezeptors (CAR)). Auch hier gilt es viele Faktoren zu berücksichtigen, weshalb noch intensiv geforscht und entwickelt werden muss.

Viele dieser Ansätze sind vielversprechende Optionen, um ein effektives und sicheres Therapiekonzept zu entwickeln, allerdings auch eine sehr große Herausforderung. Mit dieser Arbeit ist ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung des stetig selben und bisher nicht hinreichend erlangten Ziels getan: Die Therapie von malignen Neoplasien durch die Entwicklung einer Methode zur Erhöhung des GvL-Effekts mit Reduktion der GvHD.

## 6. Zusammenfassung

Donorlymphozyteninfusionen (DLI) nach allogener Stammzelltransplantation sind eine etablierte Methode zur Erzielung eines Graft-versus-leukemia (GvL) -Effekts und einer langfristigen Remission bei verschiedenen malignen hämatologischen Neoplasien. Eine DLI kann prophylaktisch bei Hochrisikopatienten, präemptiv bei Patienten mit gemischtem Chimärismus oder molekularer Persistenz der hämatologischen Neoplasie oder als therapeutische Option bei einem hämatologischen Rezidiv verabreicht werden.

Ein relevantes Problem bei der Verabreichung von DLI stellt jedoch das Risiko einer Graft-versus-host Erkrankung (GvHD) als limitierender Faktor in der erfolgreichen Tumorbehandlung mittels Immunmodulation dar.

Bisherige Bemühungen den GvL-Effekt von der Entwicklung einer GvHD zu trennen sind bisher nicht ausreichend gelungen. Dies wäre ein wichtiger Fortschritt, um eine effektive und sichere Anwendung von DLI zu entwickeln. Hierzu ist ein genaueres pathophysiologisches Verständnis auf zellulärer Ebene nach der Gabe von Spenderlymphozyten nötig.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 16 Patienten nach Verabreichen von DLI in unterschiedlichen Dosierungen CD4+, CD8+, NK und NKT-Zellen sowie ihre jeweiligen Untergruppen im peripheren Blut mittels Immunphänotypisierung analysiert. Als interne Negativkontrolle wurden absolute B-Zellen und deren Untergruppen herangezogen, die nach DLI wie erwartet keine signifikanten Änderungen aufwiesen. Die verabreichten DLI hatten die Dosierungen  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG. Die Ergebnisse von jeweils einem und sieben Tage nach der DLI wurden mit der Messung vor der DLI verglichen.

Nach Anwendung der niedrigsten Dosierung konnten keine signifikanten Veränderungen der CD8+ und der NKT-Zellen gefunden werden, auch innerhalb der CD4+ und NK-Zellen wurden keine relevanten Änderungen gemessen.

Nach der Gabe von  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG konnte einen und sieben Tage nach DLI ein signifikanter Anstieg von CD8+ memory, naiven, effector memory, effector memory-RA+, Effektorzellen im mittleren und späten Status, exhausted, terminal effector und NKT-Zellen beobachtet werden. Effektorzellen im frühen Status nahmen signifikant ab. Innerhalb der CD4+ -Zellen und der NK-Zellen konnten bis auf eine Erhöhung der naiven Zellen am siebten Tag keine signifikanten Änderungen registriert werden.

Die Anwendung der höchsten Dosierung führte innerhalb der CD8<sup>+</sup> -Zellen einen Tag nach DLI zu einem Anstieg von memory, naiven und exhausted -Zellen und zu einem Absinken von effector memory-RA<sup>+</sup> -Zellen. Die CD4<sup>+</sup> -Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung von memory, central memory und regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>). Ebenfalls vermehrt zeigten sich NKT-Zellen. Am siebten Tag nach DLI waren isoliert NK-Zellen signifikant angestiegen.

Diese Daten weisen auf eine maximale Immunmodulation innerhalb der mittleren Dosierung hin, in der sich insbesondere CD8<sup>+</sup> -Effektorzellen im mittleren und späten Status und NKT-Zellen mutmaßlich verantwortlich für die GvL-Reaktion zeigen. Als wichtige supportive Zellen erwiesen sich CD8<sup>+</sup> naive und memory -Zellen sowie CD4<sup>+</sup> central memory -Zellen.

Das Fehlen beziehungsweise Absinken der Effektorzellen am ersten Tag in der höchsten Dosierung in Verbindung mit einer Erhöhung der CD4<sup>+</sup> -T<sub>reg</sub> mit dem am siebten Tag ausbleibenden Anstieg nahezu aller Zellreihen weist wahrscheinlich auf eine Suppression der Immunreaktion und somit des GvL-Effekts durch regulatorische Zellen hin.

Die Zunahme der NK-Zellen am siebten Tag in der höchsten Dosierung könnte auf eine Ausbildung von Gedächtnis-NK-Zellen hinweisen und möglicherweise relevant zur Erhaltung einer Remission sein.

Mit dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Veränderung von Lymphozytensubpopulationen während der Behandlung mit DLI erbracht werden. Diese können helfen den GvL-Effekt besser zu verstehen und künftig eine genauere Steuerung und Therapieplanung zu entwickeln.

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Patientencharakteristika; eigene Darstellung.
- Tab. 2: Übersicht über die Probanden mit Krankheits- und Therapieverlauf; eigene Darstellung.
- Tab. 3: GvHD; eigene Darstellung.
- Tab. 4: Kumulative Tabelle der gemessenen Lymphozyten und deren Subgruppen mit Median [min; max] und p-Wert des Vergleichs der Messungen einen Tag und sieben Tage nach DLI; eigene Darstellung.

## Abbildungs- und Grafikenverzeichnis

- Abb. 1: Sack, U., A. Tárnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. 2007, Basel: Karger. Abb. 2.
- Abb. 2: Beispiele für die Darstellung von Dot-Plots; Beliebig ausgewählte Durchflusszytometrie-Messungen verschiedener Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten.
- Abb. 3: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 1: B- und T-Lymphozyten gesamt, B-Lymphozyten und deren Subgruppen; Beliebig ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.
- Abb. 4: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 2: B- und T-Lymphozyten mit ihren Subgruppen; Beliebig ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.
- Abb. 5: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 3: CD8+ T-Lymphozyten mit den aktivierten Subgruppen im frühen, mittleren und späten Status, sowie exhausted und terminal effector -Zellen; Beliebig ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.

- Abb. 6: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 4: Aktivierte T-Zellen; Beliebige ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.
- Abb. 7: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 5: NKT und NK-Zellen mit den NK-Subgruppen; Beliebige ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.
- Abb. 8: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 6: CD4+ T-Lymphozyten mit den Subgruppen Th1, Th2 und Th17; Beliebige ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.
- Abb. 9: Lymphozytensubpopulationen, Reagiergefäß 7: Regulatorische T-Lymphozyten; Beliebige ausgewählte Durchflusszytometrie-Messung eines Patienten; inklusive eigener Ergänzungen.
- Abb. 10: Gesamtüberleben und Leukämiefreies Überleben an t+24; eigene Darstellung.
- Abb. 11: Boxplot B-Lymphozyten gesamt: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; eigene Darstellung.
- Abb. 12: Boxplot CD8+ -Lymphozyten: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; eigene Darstellung.
- Abb. 13: Boxplots CD4+ -Lymphozyten: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in den Dosierungen  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG und  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; eigene Darstellung.
- Abb. 14: Boxplot NKT-Zellen: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $5 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; eigene Darstellung.
- Abb. 15: Boxplot NK-Zellen: Darstellung der Verteilung der Messwerte mit Median einen Tag vor, sowie einen und sieben Tage nach DLI in der Dosierung  $1 \times 10^6$  CD3+/ kg KG; eigene Darstellung.

## Literaturverzeichnis

1. Kolb, H.J., et al., *Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2462-5.
2. Kolb, H.J., et al., *Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients*. Blood, 1995. **86**(5): p. 2041-50.
3. Lokhorst, H.M., et al., *Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4206-11.
4. Slavin, S., et al., *Donor lymphocyte infusion: the use of alloreactive and tumor-reactive lymphocytes for immunotherapy of malignant and nonmalignant diseases in conjunction with allogeneic stem cell transplantation*. J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(2): p. 265-76.
5. Pierini, A., et al., *T cell depletion and no post transplant immune suppression allow separation of graft versus leukemia from graft versus host disease*. Bone Marrow Transplant, 2019. **54**(Suppl 2): p. 775-779.
6. Hasskarl, J., et al., *Induction of graft versus malignancy effect after unrelated allogeneic PB SCT using donor lymphocyte infusions derived from frozen aliquots of the original graft*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(2): p. 277-82.
7. Abbi, K.K., et al., *G-CSF mobilized vs conventional donor lymphocytes for therapy of relapse or incomplete engraftment after allogeneic hematopoietic transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(3): p. 357-62.
8. Zeiser, R., et al. *Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT)*. 2018, Januar; Guideline]. Available from: [https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien\\_Kap-12\\_Pra%CC%88vention%20und%20Behandlung%20von%20Rezidiven%20nach%20allogener%20Stammzelltransplantation.pdf](https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-12_Pra%CC%88vention%20und%20Behandlung%20von%20Rezidiven%20nach%20allogener%20Stammzelltransplantation.pdf).
9. Mackinnon, S., et al., *Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease*. Blood, 1995. **86**(4): p. 1261-8.
10. Bar, M., et al., *Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(6): p. 949-57.
11. Jedlickova, Z., et al., *Long-term results of adjuvant donor lymphocyte transfusion in AML after allogeneic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(5): p. 663-7.
12. Schmid, C., et al., *Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. J Clin Oncol, 2005. **23**(24): p. 5675-87.
13. Stern, M., et al., *Sensitivity of hematological malignancies to graft-versus-host effects: an EBMT megafile analysis*. Leukemia, 2014. **28**(11): p. 2235-40.
14. Tomblyn, M. and H.M. Lazarus, *Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled?* Bone Marrow Transplant, 2008. **42**(9): p. 569-79.



15. Schmid, C., et al., *Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party*. J Clin Oncol, 2007. **25**(31): p. 4938-45.
16. Passweg, J.R., et al., *The EBMT activity survey: 1990-2010*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(7): p. 906-23.
17. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
18. Chang, Y.J. and X.J. Huang, *Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with unmanipulated granulocyte colony stimulating factor mobilized marrow and blood grafts*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(6): p. 454-61.
19. Huang, X.J., *Immunomodulatory strategies for relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in hematologic malignancy patients*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(3): p. 351-8.
20. Oran, B. and M. de Lima, *Prevention and treatment of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic stem cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2011. **18**(6): p. 388-94.
21. Zhao, X.S., et al., *Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(4): p. 499-507.
22. Wang, Y., et al., *Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T-cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(8): p. 1099-104.
23. El-Cheikh, J., et al., *Lenalidomide plus donor-lymphocytes infusion after allogeneic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with high-risk multiple myeloma*. Exp Hematol, 2012. **40**(7): p. 521-7.
24. Lokhorst, H.M., et al., *The occurrence of graft-versus-host disease is the major predictive factor for response to donor lymphocyte infusions in multiple myeloma*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4362-4.
25. Huang, X.J., et al., *Administration of short-term immunosuppressive agents after DLI reduces the incidence of DLI-associated acute GVHD without influencing the GVL effect*. Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(5): p. 309-16.
26. Huang, X.J., et al., *Donor lymphocyte infusion for the treatment of leukemia relapse after HLA-mismatched/haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation*. Haematologica, 2007. **92**(3): p. 414-7.
27. Huang, X.J., et al., *Modified donor lymphocyte infusion after HLA-mismatched/haploidentical T cell-replete hematopoietic stem cell transplantation for prophylaxis of relapse of leukemia in patients with advanced leukemia*. J Clin Immunol, 2008. **28**(3): p. 276-83.
28. Deol, A. and L.G. Lum, *Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited*. Cancer Treat Rev, 2010. **36**(7): p. 528-38.
29. Bethge, W.A., et al., *Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning*. Blood, 2004. **103**(3): p. 790-5.

30. Maury, S., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(41): p. 41ra52.
31. Ash, S., et al., *Immunomodulation with dendritic cells and donor lymphocyte infusion converge to induce graft vs neuroblastoma reactions without GVHD after allogeneic bone marrow transplantation*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(10): p. 1597-605.
32. Peggs, K.S., et al., *Donor lymphocyte infusions modulate relapse risk in mixed chimeras and induce durable salvage in relapsed patients after T-cell-depleted allogeneic transplantation for Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(8): p. 971-8.
33. Peggs, K.S., et al., *Reduced-intensity conditioning for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: impact of alemtuzumab and donor lymphocyte infusions on long-term outcomes*. *Br J Haematol*, 2007. **139**(1): p. 70-80.
34. Huang, X.J., et al., *Modified donor lymphocyte infusion (DLI) for the prophylaxis of leukemia relapse after hematopoietic stem cell transplantation in patients with advanced leukemia--feasibility and safety study*. *J Clin Immunol*, 2008. **28**(4): p. 390-7.
35. Thomson, K.J., et al., *T-cell-depleted reduced-intensity transplantation followed by donor leukocyte infusions to promote graft-versus-lymphoma activity results in excellent long-term survival in patients with multiply relapsed follicular lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(23): p. 3695-700.
36. Choi, S.J., et al., *Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a prospective study*. *Bone Marrow Transplant*, 2005. **36**(2): p. 163-9.
37. Wang, Y., et al., *Prevention of relapse using DLI can increase survival following HLA-identical transplantation in patients with advanced-stage acute leukemia: a multi-center study*. *Clin Transplant*, 2012. **26**(4): p. 635-43.
38. Yan, C.H., et al., *Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2012. **119**(14): p. 3256-62.
39. Kolb, H.J., *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes*. *Blood*, 2008. **112**(12): p. 4371-83.
40. Lutz, C., et al., *A pilot study of prophylactic donor lymphocyte infusions to prevent relapse in adult acute lymphoblastic leukemias after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 2008. **41**(9): p. 805-12.
41. Massenkeil, G., et al., *Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved*. *Bone Marrow Transplant*, 2003. **31**(5): p. 339-45.
42. Levine, J.E., et al., *Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(2): p. 405-12.
43. Ritgen, M., et al., *Graft-versus-leukemia activity may overcome therapeutic resistance of chronic lymphocytic leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status: implications of minimal residual disease measurement with quantitative PCR*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2600-2.

44. Sohn, S.K., et al., *Prophylactic growth factor-primed donor lymphocyte infusion using cells reserved at the time of transplantation after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with high-risk hematologic malignancies*. *Cancer*, 2002. **94**(1): p. 18-24.
45. Guglielmi, C., et al., *Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose*. *Blood*, 2002. **100**(2): p. 397-405.
46. Hoevenaren, I.A., et al., *Bortezomib and donor lymphocyte infusion in multiple myeloma relapsed after allo-SCT does not result in durable remissions*. *Bone Marrow Transplant*, 2011. **46**(2): p. 319-21.
47. Campregher, P.V., et al., *Results of donor lymphocyte infusions for relapsed myelodysplastic syndrome after hematopoietic cell transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 2007. **40**(10): p. 965-71.
48. Yan, C.H., et al., *Modified donor lymphocyte infusion-associated acute graft-versus-host disease after haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation: incidence and risk factors*. *Clin Transplant*, 2012. **26**(6): p. 868-76.
49. Dominietto, A., et al., *Donor lymphocyte infusions for the treatment of minimal residual disease in acute leukemia*. *Blood*, 2007. **109**(11): p. 5063-4.
50. Huang, X., et al., *An improved anti-leukemic effect achieved with donor progenitor cell infusion for relapse patients after allogeneic bone marrow transplantation*. *Chin Med J (Engl)*, 2003. **116**(5): p. 736-41.
51. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. *Blood*, 2017. **129**(4): p. 424-447.
52. Schmid, C., et al., *Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation in acute leukaemia - a matched pair analysis by the Acute Leukaemia Working Party of EBMT*. *Br J Haematol*, 2019. **184**(5): p. 782-787.
53. Rettinger, E., et al., *Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation*. *Blood*, 2011. **118**(20): p. 5681-8.
54. Tsirigotis, P., et al., *Relapse of AML after hematopoietic stem cell transplantation: methods of monitoring and preventive strategies. A review from the ALWP of the EBMT*. *Bone Marrow Transplant*, 2016. **51**(11): p. 1431-1438.
55. Zeiser, R., et al., *Biology-Driven Approaches to Prevent and Treat Relapse of Myeloid Neoplasia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019. **25**(4): p. e128-e140.
56. Zheng, H., et al., *Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease*. *Blood*, 2008. **111**(4): p. 2476-84.
57. Di Stasi, A., et al., *Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(18): p. 1673-83.
58. Millot, F., et al., *Imatinib mesylate is effective in children with chronic myelogenous leukemia in late chronic and advanced phase and in relapse after stem cell transplantation*. *Leukemia*, 2006. **20**(2): p. 187-92.
59. Chen, H., et al., *Administration of imatinib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation may improve disease-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*. *J Hematol Oncol*, 2012. **5**: p. 29.

60. Bonini, C., et al., *HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia*. *Science*, 1997. **276**(5319): p. 1719-24.
61. Maury, S., et al., *Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice*. *Blood*, 2001. **98**(10): p. 3156-8.
62. Dotti, G., *Control of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: integrating transplantation with genetically modified T cell therapies*. *Curr Opin Hematol*, 2015. **22**(6): p. 489-96.
63. Lubbert, M., et al., *Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting*. *Bone Marrow Transplant*, 2010. **45**(4): p. 627-32.
64. Reikvam, H., et al., *Targeted anti-leukemic therapy as disease-stabilizing treatment for acute myeloid leukemia relapse after allogeneic stem cell transplantation: Will it be possible to combine these strategies with retransplantation or donor lymphocyte infusions?* *Curr Cancer Drug Targets*, 2013. **13**(1): p. 30-47.
65. Schroeder, T., et al., *Azacitidine and donor lymphocyte infusions as first salvage therapy for relapse of AML or MDS after allogeneic stem cell transplantation*. *Leukemia*, 2013. **27**(6): p. 1229-35.
66. Schroeder, T., et al., *Treatment of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome relapse after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine and donor lymphocyte infusions--a retrospective multicenter analysis from the German Cooperative Transplant Study Group*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015. **21**(4): p. 653-60.
67. Miller, J.S., et al., *Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone*. *Blood*, 2007. **110**(7): p. 2761-3.
68. Klyuchnikov, E., et al., *Purification of CD4+ T cells for adoptive immunotherapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011. **17**(3): p. 374-83.
69. Warren, E.H., et al., *Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens*. *Blood*, 2010. **115**(19): p. 3869-78.
70. Frey, N.V. and D.L. Porter, *Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008. **21**(2): p. 205-22.
71. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia*. *Bone Marrow Transplant*, 2000. **26**(5): p. 511-6.
72. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(2): p. 433-44.
73. Shiobara, S., et al., *Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: indications and dose escalation*. *Ther Apher*, 2001. **5**(1): p. 40-5.
74. Jamil, M.O. and S. Mineishi, *State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment*. *Int J Hematol*, 2015. **101**(5): p. 452-66.
75. Jacobsohn, D.A. and G.B. Vogelsang, *Acute graft versus host disease*. *Orphanet J Rare Dis*, 2007. **2**: p. 35.



76. Jagasia, M.H., et al., *National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(3): p. 389-401 e1.
77. Chalandon, Y., et al., *Outcome of patients developing GVHD after DLI given to treat CML relapse: a study by the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(3): p. 558-64.
78. Warlick, E.D., et al., *Successful remission rates and survival after lymphodepleting chemotherapy and donor lymphocyte infusion for relapsed hematologic malignancies postallogeneic hematopoietic cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(3): p. 480-6.
79. Carlens, S., et al., *The role of disease stage in the response to donor lymphocyte infusions as treatment for leukemic relapse*. Biol Blood Marrow Transplant, 2001. **7**(1): p. 31-8.
80. Warren, E.H. and H.J. Deeg, *Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies*. Tissue Antigens, 2013. **81**(4): p. 183-93.
81. Hobo, W., et al., *Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(2): p. 274-82.
82. Zhang, C., X. Zhang, and X.H. Chen, *Cellular mechanism for granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of graft-versus-host disease in combined bone marrow and peripheral blood transplantation for hematological malignancies: the composition in collection*. Transfus Apher Sci, 2013. **48**(1): p. 3-9.
83. Keil, F., et al., *Donor leukocyte infusion for leukemic relapse after allogeneic marrow transplantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3113-7.
84. Sack, U., A. Tárnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. 2007, Basel: Karger.
85. Ormerod, M.G. and P.R. Imrie, *Flow cytometry*. Methods Mol Biol, 1990. **5**: p. 543-58.
86. Rothe, G. and G. Schmitz, *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. 1994, Stuttgart: Schattauer.
87. Streitz, M., et al., *Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study*. Transplant Res, 2013. **2**(1): p. 17.
88. Waidhauser, J., et al., *Frequency, localization, and types of gastrointestinal stromal tumor-associated neoplasia*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(30): p. 4261-4277.
89. Piper, W., *Innere Medizin*. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
90. Sack, U., et al., *Durchflußzytometrie in der Klinischen Diagnostik. Positionspapier der Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie und Quantitative Mikroskopie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin*. Journal of Laboratory Medicine, 2000. **24**(6-7): p. 277-297.

91. Pechhold, K., T. Pohl, and D. Kabelitz, *Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry*. Cytometry, 1994. **16**(2): p. 152-9.
92. Fuchs, R. and P. Staib, *Manual Hämatologie*. 2008, 52223 Stolberg: Nora-Verlag GmbH.
93. Finak, G., et al., *Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20686.
94. van Gent, R., et al., *Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments*. Clin Immunol, 2009. **133**(1): p. 95-107.
95. van Tilburg, C.M., et al., *Immune reconstitution in children following chemotherapy for haematological malignancies: a long-term follow-up*. Br J Haematol, 2011. **152**(2): p. 201-10.
96. Berger, D.P., R. Engelhardt, and R. Mertelsmann, *Das Rote Buch Hämatologie und Internistische Onkologie*. Vol. 5. 2014.
97. Lawler, M., P. Humphries, and S.R. McCann, *Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction*. Blood, 1991. **77**(11): p. 2504-14.
98. Petz, L.D., et al., *Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies*. Blood, 1987. **70**(5): p. 1331-7.
99. Bader, P., et al., *Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21**(5): p. 487-95.
100. Park, S.J., et al., *Effects of mixed chimerism and immune modulation on GVHD, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for hematologic malignancies*. Korean J Intern Med, 2000. **15**(3): p. 224-31.
101. Porter, D.L. and J.H. Antin, *Donor leukocyte infusions in myeloid malignancies: new strategies*. Best Pract Res Clin Haematol, 2006. **19**(4): p. 737-55.
102. Levine, J.E., et al., *Donor leukocyte infusions to treat hematologic malignancy relapse following allo-SCT in a pediatric population*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42**(3): p. 201-5.
103. Zhang, C., et al., *Donor CD8+ T cells mediate graft-versus-leukemia activity without clinical signs of graft-versus-host disease in recipients conditioned with anti-CD3 monoclonal antibody*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 838-50.
104. Stewart, T.J., et al., *Inhibition of early tumor growth requires J alpha 18-positive (natural killer T) cells*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3058-60.
105. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 371-80.
106. Edinger, M., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1144-50.
107. Trenado, A., et al., *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1688-96.
108. Morris, E.S., K.P. MacDonald, and G.R. Hill, *Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL?* Blood, 2006. **107**(9): p. 3430-5.

109. Morris, E.S., et al., *NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3093-103.
110. Jones, S.C., G.F. Murphy, and R. Korngold, *Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response*. Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(4): p. 243-56.
111. van Bergen, C.A., et al., *Selective graft-versus-leukemia depends on magnitude and diversity of the alloreactive T cell response*. J Clin Invest, 2017. **127**(2): p. 517-529.
112. Ryu, S.J., et al., *Cognate CD4 help is essential for the reactivation and expansion of CD8 memory T cells directed against the hematopoietic cell-specific dominant minor histocompatibility antigen, H60*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4273-80.
113. Huang, W. and N.J. Chao, *Memory T cells: A helpful guard for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation without causing graft-versus-host disease*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2017. **10**(4): p. 211-219.
114. Zheng, H., et al., *Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 5938-48.
115. Chen, B.J., et al., *Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1534-41.
116. Long, S., C. Prober, and M. Fischer, *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. 5 ed. 2018, Philadelphia: Elsevier.
117. Flammiger, A., et al., *Intratumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer*. APMIS, 2012. **120**(11): p. 901-8.
118. Wouters, M.C.A. and B.H. Nelson, *Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(24): p. 6125-6135.
119. Mei, Z., et al., *Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis*. Br J Cancer, 2014. **110**(6): p. 1595-605.
120. Fessas, P., et al., *A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab*. Semin Oncol, 2017. **44**(2): p. 136-140.
121. Appay, V., et al., *Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 379-85.
122. Koch, S., et al., *Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people*. Immun Ageing, 2008. **5**: p. 6.
123. Anichini, A., et al., *Differentiation of CD8+ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common gamma-chain cytokines*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 2134-41.
124. Huttunen, P., et al., *Impact of very early CD4(+) /CD8(+) T cell counts on the occurrence of acute graft-versus-host disease and NK cell counts on outcome after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Pediatr Blood Cancer, 2015. **62**(3): p. 522-8.
125. Kanakry, C.G., et al., *Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide*. JCI Insight, 2016. **1**(5).
126. Teschner, D., et al., *Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis*. Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(1): p. 138-44.

127. Distler, E., et al., *Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naive precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells*. *Haematologica*, 2011. **96**(7): p. 1024-32.
128. Foster, A.E., et al., *Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2403-9.
129. Chen, B.J., *Allogeneic memory T cell response*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008. **14**(1 Suppl 1): p. 20-2.
130. Chen, B.J., et al., *Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse*. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 3115-23.
131. Zhang, Y., et al., *Dendritic cell-activated CD44<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3970-8.
132. Anderson, B.E., et al., *Memory CD4<sup>+</sup> T cells do not induce graft-versus-host disease*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(1): p. 101-8.
133. Dutt, S., et al., *Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease*. *J Immunol*, 2007. **179**(10): p. 6547-54.
134. Maeda, Y., et al., *Lymphopenia-induced proliferation of donor T cells reduces their capacity for causing acute graft-versus-host disease*. *Exp Hematol*, 2007. **35**(2): p. 274-86.
135. McLane, L.M., M.S. Abdel-Hakeem, and E.J. Wherry, *CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2019. **37**: p. 457-495.
136. Romero, P., et al., *Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4112-9.
137. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
138. Youngblood, B., et al., *Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells*. *Nature*, 2017. **552**(7685): p. 404-409.
139. Blazar, B.R., et al., *CD28/B7 interactions are required for sustaining the graft-versus-leukemia effect of delayed post-bone marrow transplantation splenocyte infusion in murine recipients of myeloid or lymphoid leukemia cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(7): p. 3460-73.
140. Opata, M.M., et al., *Protection by and maintenance of CD4 effector memory and effector T cell subsets in persistent malaria infection*. *PLoS Pathog*, 2018. **14**(4): p. e1006960.
141. Zhang, P., et al., *Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 in vivo*. *J Immunol*, 2013. **191**(10): p. 5291-303.
142. Nguyen, V.H., et al., *In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation*. *Blood*, 2007. **109**(6): p. 2649-56.
143. Bajnok, A., et al., *The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 8045161.
144. Hashimoto, M., et al., *CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions*. *Annu Rev Med*, 2018. **69**: p. 301-318.
145. Bachireddy, P., et al., *Reversal of in situ T-cell exhaustion during effective human antileukemia responses to donor lymphocyte infusion*. *Blood*, 2014. **123**(9): p. 1412-21.



146. Schmitt, N. and H. Ueno, *Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **34**: p. 130-6.
147. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
148. Bonecchi, R., et al., *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 129-34.
149. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 942-9.
150. Annunziato, F., et al., *Defining the human T helper 17 cell phenotype*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(10): p. 505-12.
151. Smyth, M.J., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer*. *J Immunol*, 2006. **176**(3): p. 1582-7.
152. Metenou, S. and T.B. Nutman, *Regulatory T cell subsets in filarial infection and their function*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 305.
153. Dasgupta, A. and R. Saxena, *Regulatory T cells: a review*. *Natl Med J India*, 2012. **25**(6): p. 341-51.
154. Petrausch, U., et al., *Cancer immunotherapy: the role regulatory T cells play and what can be done to overcome their inhibitory effects*. *Curr Mol Med*, 2009. **9**(6): p. 673-82.
155. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
156. Ma, M.W., et al., *Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node*. *Mod Pathol*, 2012. **25**(7): p. 1000-10.
157. Di Ianni, M., et al., *Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation*. *Blood*, 2011. **117**(14): p. 3921-8.
158. Martelli, M.F., et al., *HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse*. *Blood*, 2014. **124**(4): p. 638-44.
159. Riley, J.L., C.H. June, and B.R. Blazar, *Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 656-65.
160. Heinrichs, J., et al., *CD8(+) Tregs promote GVHD prevention and overcome the impaired GVL effect mediated by CD4(+) Tregs in mice*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(6): p. e1146842.
161. Rezvani, K., et al., *High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT*. *Blood*, 2006. **108**(4): p. 1291-7.
162. Pastore, D., et al., *CD3+/Tregs ratio in donor grafts is linked to acute graft-versus-host disease and immunologic recovery after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012. **18**(6): p. 887-93.
163. Delia, M., et al., *Outcome of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation by donor graft CD3+/Tregs ratio: a single-center experience*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013. **19**(3): p. 495-9.
164. Pabst, C., et al., *The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after*

- transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2916-22.
165. Wolf, D., et al., *Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation.* Transplantation, 2007. **83**(8): p. 1107-13.
166. Danby, R.D., et al., *High proportions of regulatory T cells in PBSC grafts predict improved survival after allogeneic haematopoietic SCT.* Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(1): p. 110-8.
167. Ukena, S.N., et al., *Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)CD25 (high)CD127 (low/-) regulatory T cells.* Ann Hematol, 2011. **90**(2): p. 213-8.
168. Zorn, E., et al., *Combined CD4+ donor lymphocyte infusion and low-dose recombinant IL-2 expand FOXP3+ regulatory T cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(3): p. 382-8.
169. Fujioka, T., et al., *Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD.* Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(6): p. 859-64.
170. Stanzani, M., et al., *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, 2004. **103**(3): p. 1140-6.
171. Gjerdrum, L.M., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival.* Leukemia, 2007. **21**(12): p. 2512-8.
172. Yang, W. and Y. Xu, *Clinical significance of Treg cell frequency in acute myeloid leukemia.* Int J Hematol, 2013. **98**(5): p. 558-62.
173. D'Arena, G., et al., *Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease.* Leuk Res, 2011. **35**(3): p. 363-8.
174. Mailloux, A.W., et al., *Expansion of effector memory regulatory T cells represents a novel prognostic factor in lower risk myelodysplastic syndrome.* J Immunol, 2012. **189**(6): p. 3198-208.
175. Idris, S.Z., et al., *Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients.* Hematology, 2016. **21**(4): p. 206-12.
176. Hofmann, S., et al., *Donor lymphocyte infusion leads to diversity of specific T cell responses and reduces regulatory T cell frequency in clinical responders.* Int J Cancer, 2019. **144**(5): p. 1135-1146.
177. Rosenzweig, M., et al., *Regulatory T cell content in the bone marrow graft does not predict the occurrence of acute GVHD.* Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(2): p. 265-9.
178. Noel, G., et al., *Patients suffering from acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation have functional CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cells.* Clin Immunol, 2008. **129**(2): p. 241-8.
179. Brennan, T.V. and Y. Yang, *PD-L1 serves as a double agent in separating GVL from GVHD.* J Clin Invest, 2017. **127**(5): p. 1627-1630.
180. Li, H., et al., *CCR7 guides migration of mesenchymal stem cell to secondary lymphoid organs: a novel approach to separate GvHD from GvL effect.* Stem Cells, 2014. **32**(7): p. 1890-903.

181. Hu, Y., et al., *Regulatory B cells promote graft-versus-host disease prevention and maintain graft-versus-leukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(3): p. e1284721.
182. Highfill, S.L., et al., *Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13*. *Blood*, 2010. **116**(25): p. 5738-47.
183. Handgretinger, R. and K. Schilbach, *The potential role of gammadelta T cells after allogeneic HCT for leukemia*. *Blood*, 2018. **131**(10): p. 1063-1072.
184. Zilberberg, J., R. Feinman, and R. Korngold, *Strategies for the identification of T cell-recognized tumor antigens in hematological malignancies for improved graft-versus-tumor responses after allogeneic blood and marrow transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015. **21**(6): p. 1000-7.
185. Scheuplein, F., et al., *A humanized monoclonal antibody specific for invariant Natural Killer T (iNKT) cells for in vivo depletion*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e76692.
186. Fujii, S., *Exploiting dendritic cells and natural killer T cells in immunotherapy against malignancies*. *Trends Immunol*, 2008. **29**(5): p. 242-9.
187. Brennan, P.J., M. Brigl, and M.B. Brenner, *Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(2): p. 101-17.
188. Gibson, S.E., S.H. Swerdlow, and R.E. Felgar, *Natural killer cell subsets and natural killer-like T-cell populations in benign and neoplastic B-cell proliferations vary based on clinicopathologic features*. *Hum Pathol*, 2011. **42**(5): p. 679-87.
189. Van Kaer, L., V.V. Parekh, and L. Wu, *Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity*. *Cell Tissue Res*, 2011. **343**(1): p. 43-55.
190. Taniguchi, M., et al., *The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy*. *Int Immunol*, 2010. **22**(1): p. 1-6.
191. Van Kaer, L., *NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(3): p. 354-64.
192. Tahir, S.M., et al., *Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer*. *J Immunol*, 2001. **167**(7): p. 4046-50.
193. Yanagisawa, K., et al., *Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6494-9.
194. Tachibana, T., et al., *Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(20): p. 7322-7.
195. Molling, J.W., et al., *Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(1): p. 87-93.
196. Schneiders, F.L., et al., *Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(5): p. 567-70.
197. Exley, M.A., et al., *Developing understanding of the roles of CD1d-restricted T cell subsets in cancer: reversing tumor-induced defects*. *Clin Immunol*, 2011. **140**(2): p. 184-95.

198. Shaulov, A., et al., *Peripheral blood progenitor cell product contains Th1-biased noninvariant CD1d-reactive natural killer T cells: implications for posttransplant survival*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(4): p. 464-72.
199. Najera Chuc, A.E., et al., *Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012. **138**(8): p. 1427-32.
200. Molling, J.W., et al., *Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(7): p. 862-8.
201. Motohashi, S., et al., *Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer*. *Clin Immunol*, 2011. **140**(2): p. 167-76.
202. Pillai, A.B., et al., *Host NKT cells can prevent graft-versus-host disease and permit graft antitumor activity after bone marrow transplantation*. *J Immunol*, 2007. **178**(10): p. 6242-51.
203. Lan, F., et al., *Host conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin prevents graft-versus-host disease: the role of CD1-reactive natural killer T cells*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003. **9**(6): p. 355-63.
204. Haraguchi, K., et al., *Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity*. *J Immunol*, 2005. **175**(2): p. 1320-8.
205. Dhodapkar, M.V., et al., *A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma*. *J Exp Med*, 2003. **197**(12): p. 1667-76.
206. Fujii, S., et al., *Severe and selective deficiency of interferon-gamma-producing invariant natural killer T cells in patients with myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*, 2003. **122**(4): p. 617-22.
207. Cooley, S., et al., *Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(14): p. 2411-9.
208. Zamai, L., et al., *NK cells and cancer*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4011-6.
209. Davis, Z.B., et al., *Natural Killer Cell Adoptive Transfer Therapy: Exploiting the First Line of Defense Against Cancer*. *Cancer J*, 2015. **21**(6): p. 486-91.
210. Gill, S., J.A. Olson, and R.S. Negrin, *Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft-versus-tumor, and graft-versus-host responses*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(7): p. 765-76.
211. Meinhardt, K., et al., *Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(1): p. e981483.
212. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science*, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
213. Olson, J.A., et al., *NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects*. *Blood*, 2010. **115**(21): p. 4293-301.
214. Asai, O., et al., *Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(9): p. 1835-42.

215. Terme, M., et al., *Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 486-94.
216. Parkhurst, M.R., et al., *Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(19): p. 6287-97.
217. Krause, S.W., et al., *Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase i trial*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3699-707.
218. Ishikawa, E., et al., *Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma*. Anticancer Res, 2004. **24**(3b): p. 1861-71.
219. Burns, L.J., et al., *IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial*. Bone Marrow Transplant, 2003. **32**(2): p. 177-86.
220. Blaser, B.W., et al., *Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **105**(2): p. 894-901.
221. Shah, N.N., et al., *Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation*. Blood, 2015. **125**(5): p. 784-92.
222. Cooley, S., et al., *KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4370-6.
223. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. Lancet, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.
224. Hayakawa, Y. and M.J. Smyth, *CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1517-24.
225. Chiossone, L., et al., *Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5488-96.
226. Bukowski, J.F., C.A. Biron, and R.M. Welsh, *Elevated natural killer cell-mediated cytotoxicity, plasma interferon, and tumor cell rejection in mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus*. J Immunol, 1983. **131**(2): p. 991-6.



## Anhang

### Anhang 1: Pipettiervorlage

488 Excitation				
FITC	PE	ECD	PC5	PC7
no wash	<b>IgD</b>	<b>CD24</b>	<b>CD27</b>	<b>CD38</b>
<b>B-Zellen</b>		B26603	A07780	IM3628

488 Excitation				
FITC	PE	ECD	PC5	PC7
T-Zell	<b>CD62L</b>	<b>CD45R0</b>	<b>CD45RA</b>	<b>CD4</b>
memory	IM1231U	A07787	IM2711U	A07752

CD8 T-Zell	<b>CD57</b>	<b>CD279</b>	<b>CD27</b>	<b>CD28</b>
exhaustion			6697108	737661

T-Zell	<b>HLA-DR</b>	<b>CD69</b>		<b>CD4</b>
Aktivierung	IM1638U	IM1943U		A07752

Treg	<b>CD25</b>	<b>FoxP3</b>	<b>CD45RA</b>	<b>CD4</b>
Perfix nc		B46031		A07752

T/NK	<b>CD16</b>	<b>CD56</b>	<b>CD3</b>	<b>(CD8)</b>
	B49215	A07788	A07748	

488 Excitation				
AF488	PE	PE/Daz zel 594	PC5	PC7
Th subsets	<b>CD183/CXCR3</b>	<b>CD194/CCR4</b>	<b>CD195/CCR5</b>	<b>CD4</b>
	B68144	359412	359126	A07752
				B68132

Biologend Biologend

### Studienpanel

		20µl	20µl	10µl	10µl	10µl
		<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>ECD</b>	<b>PC5</b>	<b>PC7</b>
no wasch B-Zellen	1.	<b>IgD</b> B30652	<b>CD24</b> IM1428U	<b>CD27</b> B26603	<b>CD38</b> A07780	<b>CD19</b> IM3628
T-Zell Memory	2.	<b>CD62L</b> IM1231U	<b>CD45RO</b> A07787	<b>CD45RA</b> IM2711U <i>B49193</i>	<b>CD4</b> A07752	<b>CD8</b> 737661
CD8 T-Zell exhaustion	3.	<b>CD57</b> B49188	<b>CD279</b> B30634	<b>CD27</b> B26603	<b>CD28</b> 6607108	<b>CD8</b> 737661
T-Zell Aktivierung	4.	<b>HLA-DR</b> IM1638U	<b>CD69</b> IM1943U		<b>CD4</b> A07752	<b>CD8</b> 737661
T/NK plus 100µl Stem-Count	5.		<b>CD56</b> A07788	<b>CD16</b> <del>A33098</del> <i>B49216</i>	<b>CD19</b> A07771	<b>CD3</b> 737657
		10µl	5µl	5µl	10µl	10µl
		<b>AF488</b>	<b>PE</b>	<b>PE/Dazzel</b>	<b>PC5</b>	<b>PC7</b>
Th subsets	6.	<b>CD183</b> B68144	<b>CD194</b> 359412	<b>CD195</b> 359126	<b>CD4</b> A07752	<b>CD196</b> B68132
Treg Perfix nc	7.	10µl <b>CD25</b> IM0478U	10µl <b>FOXP3</b> B46031	5µl <b>CD45RA</b> IM2711U	5µl <b>CD4</b> A07752	5µl <b>CD8</b> 737661

**Röhrchen 1-6** 100µl PB (ohne vorwaschen)

**Röhrchen 7** 50µl PB (ohne vorwaschen)  
Zentrifugieren: bei 500g = Programm 7 = 1770rpm

**Röhrchen 5:** nach Lyseeinwirkung **nicht waschen**; vor dem Messen 100µl Stem-Count (aus aktuellem Stem-Kit) zugeben und **Calibrationsfaktor in Worklist eingeben**

1-6 nach Ak-Zugabe 15' inkubieren  
 1-6 nach Ak-Inkubation je 1ml Versa-Lyse, 15' inkubieren  
 1,2,3,4,6 mit PBS (Apothek) auffüllen u. 5' bei 360g waschen = Programm 2 = 1500rpm  
 - mit PBS auffüllen.

## Pipettiervorlage Studienpanel Röhrchen 7

### Treg mit PerFix-nc (Ansatz Patient)

- **50µl PB** (EDTA oder Heparin) + **5µl Puffer 1** (Fixativ-Reagenz)  
vortexen und 15 Min. bei RT inkubieren
- vorbereiten in Eppendorfgefäß:
  - 10µl CD25 - FITC
  - +10µl Anti-FoxP3 - PE
  - + 5µl CD45RA - ECD
  - + 5µl CD4 - PC5
  - + 5µl CD8 - PC7
  - + 300µl Puffer 2 (Permeabilisierungs-Reagenz)

*⇒ in bl. Röhrchen vorpipetieren*  
*PP + 5µl Puffer nach Fixation vortexen*  
*+ 300 µl Puffer 2*  
*Zusammen in Röhrchen mit AK pipetieren*
- fixiertes Blut vortexen und vorbereitete **AK/Puffer 2 -Mischung** zugeben
- vortexen und im Dunkeln bei RT 60 - 120 Min. inkubieren
- dann + **3ml PBS-Puffer** (aus Apotheke) und 5 Min. bei 500 g zentrifugieren  
(entspricht im 4. Stock: Programm 7 = 1770 rpm)
- Überstand absaugen (nicht dekantieren!), max. 1 Tropfen drinlassen
- vortexen und **3ml verdünnten Puffer 3** (aus Final 10x Solution) zugeben und 5 Min. bei Programm 7 waschen
- Überstand absaugen und mit **500µl verdünntem Puffer 3** resuspendieren

### **Verdünnung von Puffer 3 (10x) für 4ml Verdünnung:**

0,4ml Puffer-Konzentrat + 3,6 ml A. dest.

09.06.2016

*Zie*

*Jedes Röhrchen einzeln sofort nach Zugabe der Lyse vortexen!*



## Anhang 2: Begutachtung BKF

KLINIKUM AUGSBURG



### Beratungskommission für klinische Forschung - BKF

Klinikum Augsburg  
Lehrkrankenhaus der LMU München

Klinikum Augsburg, Beratungskommission  
Stenglinstraße 2, 86156 Augsburg

PD. Dr. A. Rank  
II. Medizinische Klinik  
Klinikum Augsburg

Vorsitzende:  
Prof. Dr. med. Julia Welzel  
Dr. med. Stefanie Grützner

Zentrale Studienassistentin:  
Franziska Knieler

Telefon: 0821 - 400 3715  
Telefax: 0821 - 400 3717  
e-mail:  
franziska.knieler@klinikum-augsburg.de

10.10.2016

### Begutachtung der Studie 2016/16

Veränderungen des zellulären Immunstatus durch die Gabe von  
Spenderlymphozyten bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation

Eingereicht bei der Beratungskommission klinische Forschung am 16.07.2016

#### Projektleiter:

PD. Dr. A. Rank  
II. Medizinische Klinik  
Klinikum Augsburg

#### Gutachter:

Prof. Dr. med. G. Buheitel  
Prof. Dr. med. Th. Kröncke  
Prof. Dr. Dr. h.c. V. Heidecke

Fallzahl/Statistik: 25, Wilcoxon Test.

Einschluss- Ausschlusskriterien: klar definiert

Aufklärung/Patienteninformation: liegen den Unterlagen bei und sind nicht zu beanstanden.

Datenschutz: pseudonymisiert, keine Bedenken.

Finanzierung: entfällt

Ethische Gesichtspunkte/Probleme: keine Bedenken

Sonstige Anmerkungen: keine

Beurteilung:

Es handelt sich um eine prospektive Studie mit klarer Zielsetzung und klinisch relevanten Gewinn.  
Es bestehen keine prinzipiellen oder ethischen Bedenken gegen die Studie.  
Das Beratungsverfahren ist hiermit abgeschlossen.

Augsburg, den 10.10.2016 Dr. S. Grützner

### II. Medizinische Klinik

Hämatologie, Onkologie, Nephrologie, Angiologie

**Prof. Dr. med. Martin Trepel**  
Chefarzt

Sekretariat: Frau Sibylle Blank

Telefon: 08 21 - 400 - 23 53

Telefax: 08 21 - 400 - 33 44

E-Mail: [2.med@klinikum-augsburg.de](mailto:2.med@klinikum-augsburg.de)

## Patienteninformation zur Studie

### „Veränderungen des zellulärer Immunstatus durch die Gabe von Spenderlymphozyten bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen wurde eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Aktuell ist bei Ihnen die Infusion von Abwehrzellen (Lymphozyten) des Spenders geplant, um den Effekt des Spender-Immunsystems gegen Ihre Grunderkrankung zu verstärken oder das komplette Anwachsen des Spender-Knochenmarks zu unterstützen.

Diese Effekte konnten bereits bei vielen Patienten beobachtet werden, allerdings wissen wir noch sehr wenig über die genauen Mechanismen, die bei dieser Behandlung ablaufen.

Wir möchten daher Ihr Immunsystem vor und nach der Gabe der Spenderlymphozyten genauer untersuchen, um Hinweise zu bekommen, von welchen Faktoren es abhängt, ob die Therapie erfolgreich ist. Zugleich versuchen wir im Rahmen dieser Untersuchung, das Risiko einer unerwünschten Reaktion der übertragenen Lymphozyten insbesondere gegen Haut, Darm oder Leber (die sog. Transplantat-Erkrankung oder Graft-versus-Host Erkrankung, über die sie bereits im Zusammenhang mit der Stammzell-Transplantation viel gehört haben und auf die in der Patienteninformation zur Lymphozyten-Transfusion ausführlich eingegangen wird) abzuschätzen.

Die von uns geplanten Analysen Ihres Immunsystems erfolgt aus dem Blutröhrchen, welches Ihnen im Rahmen der Routine ohnehin zur Bestimmung Ihres Blutbildes abgenommen wird. Eine zusätzliche Blutabnahme ist also nicht erforderlich. Diese Analysen sollen vor der ~~Spenderlymphozytengabe~~ sowie 1 und 7 Tage später im Rahmen der geplanten Routinekontrollen durchgeführt werden.

Selbstverständlich sind Sie keinesfalls dazu verpflichtet, unserer Bitte zu entsprechen. Wenn Sie sich dagegen entscheiden oder wenn Sie Ihr Einverständnis zu irgendeinem Zeitpunkt widerrufen wollen, entstehen Ihnen dadurch keinerlei Nachteile. Sie brauchen Ihre Entscheidung auch weder jetzt noch zu einem späteren Zeitpunkt zu begründen. Da wir uns noch in einem recht frühen Stadium der Untersuchungen befinden, ist für Sie persönlich noch nicht mit einem konkreten Informationsgewinn oder gar einer klinischen Nutzenanwendung zu rechnen, vielmehr würde die Untersuchung Ihres Blutes dazu beitragen, dass sich für unsere zukünftigen Patienten effektivere Therapieansätze entwickeln lassen.

**Datenschutz und Datenweitergabe:**

Im Rahmen der Auswertung der Untersuchungsergebnisse ist es nötig, dass Ihre personenbezogenen Daten erfasst und in pseudonymisierter Form weiterverarbeitet werden. Dies dient der Korrelierung der Ergebnisse unserer Laboruntersuchungen mit den klinischen Daten und ist für eine sinnvolle Interpretation unerlässlich. Nur autorisierte Personen haben im Rahmen der entsprechenden gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen Sie namentlich genannt werden. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Die Weitergabe der Daten erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken, und Sie werden ausnahmslos darin nicht namentlich genannt. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser klinischen Prüfung werden Sie nicht namentlich genannt.

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient, falls Sie sich dafür entscheiden sollten, uns Material für die o.g. Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, dürfen wir Sie bitten, uns auf der beiliegenden Einverständniserklärung die Erlaubnis zur Entnahme zu geben. Für Rückfragen stehen wir (Herr PD Dr. A. Rank, Herr Prof. Dr. C. Schmid) oder ihr(e) behandelnde(r) Ärztin/Arzt jederzeit zur Verfügung. Wir bedanken uns für ihre Mühe und ihre Unterstützung und wünschen Ihnen für Ihre Therapie alles Gute.

Für Ihre Fragen stehen wir Ihnen gerne jederzeit zur Verfügung.

PD Dr. A. Rank

Prof. Dr. C. Schmid

# Klinikum Augsburg

## II. Medizinische Klinik

Hämatologie, Onkologie, Nephrologie, Angiologie

Prof. Dr. med. Martin Trepel

Chefarzt

Sekretariat: Frau Sibylle Blank

Telefon: 08 21 - 400 - 23 53

Telefax: 08 21 - 400 - 33 44

E-Mail: 2.med@klinikum-augsburg.de

## Einverständniserklärung zur Studie

### Zellulärer Immunstatus von Patienten, die eine Transfusion von Spenderlymphozyten erhalten

[Patientenetikett]

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis in die Analyse und pseudonymisierte Auswertung meines Immunstatus vor und nach der Übertragung von Spender-Lymphozyten. Ich wurde von Dr. .... über Inhalt und Zweck der o.g. Studie umfassend aufgeklärt und hatte Gelegenheit, alle meine Fragen zu stellen. Mein Einverständnis kann ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen zurückziehen.

Bemerkungen:

---

---

---

---

Ort und Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient/-in

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Ärztin / Arzt

Kopie erhalten

Ort und Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient/-in