

CHIMÄRISMUS DENDRITISCHER ZELLEN IM
PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN NACH
ALLOGENER HÄMATOPOETISCHER
ZELLTRANSPLANTATION

Stefan Böck
2005

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

CHIMÄRISMUS DENDRITISCHER ZELLEN IM
PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN NACH
ALLOGENER HÄMATOPOETISCHER
ZELLTRANSPLANTATION

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

vorgelegt von
Stefan Böck
Landsberg am Lech
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-J. Kolb
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. B. Emmerich Prof. Dr. med. A. Borkhardt
Mitbetreuer:	Dr. med. M. Pihusch
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	07. April 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1. Patienten	7
2.2. Messung dendritischer Zellen im peripheren Blut	9
2.2.1. Vorbemerkung	9
2.2.2. Probengewinnung	10
2.2.3. Probenverarbeitung	10
2.2.4. Probenmessung	12
2.3. Isolierung dendritischer Zellen	13
2.3.1. Probengewinnung	13
2.3.2. Probenverarbeitung	13
2.3.3. Isolierung von DC1 und DC2 mittels Cellsorting	15
2.3.4. Morphologie von isolierten dendritischen Zellen	17
2.3.4.1. Pappenheim-Färbung	17
2.3.4.2. Morphologie nach Kultivierung mit TNF- α	17
2.4. Chimärismusanalysen	19
2.4.1. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)	19
2.4.2. Polymerasekettenreaktion von Short Tandem Repeats (STR-PCR)	23
2.4.3. Definitionen	25
2.5. Datenauswertung	26
3. Ergebnisse	28
3.1. Patienten	28
3.2. Kinetik des Dendritenchimärismus nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	32
3.2.1. Dendritenchimärismus beim Engraftment	32

3.2.2. Dendritenchimärismus 6 Monate nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	34
3.2.3. Dendritenchimärismus 12 Monate nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	37
3.2.4. Verlauf des Dendritenchimärismus im ersten Jahr nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	37
3.3. Einfluß des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation	45
3.3.1. Chimärismus der Population DC1	45
3.3.2. Chimärismus der Population DC2	46
3.3.3. Patienten ohne DC Chimärismus beim Engraftment	47
3.3.4. DC Chimärismus 6 und 12 Monate nach Transplantation	49
3.3.5. Patienten mit Unterschieden im DC1 und DC2 Chimärismus	51
4. Diskussion	53
4.1. Kinetik des Dendritenchimärismus	53
4.2. Einfluß des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf	55
4.2.1. DC1 Chimärismus	55
4.2.2. DC2 Chimärismus	57
4.2.3. Einzelkasuistiken	58
4.2.4. Dendritische Zellen und GvH / GvL Reaktionen	59
4.3. Ausblick	64
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	68
7. Danksagung	77
8. Lebenslauf	78

Verzeichnis der Bildtafeln

- Tafel 1:** Patientendaten
- Tafel 2:** Durchflußzytometrische Messung von DC1 und DC2 im peripheren Blut
- Tafel 3:** Reinheit von direkt aus peripherem Blut isolierten DC1 und DC2
- Tafel 4:** Pappenheim-Färbung von direkt aus peripherem Blut isolierten DC2
- Tafel 5:** Morphologie nach Kultivierung mit TNF- α
- Tafel 6:** Chimärismusanalyse mittels FISH
- Tafel 7:** Chimärismusanalyse mittels STR-PCR
- Tafel 8:** Befundbericht von Chimärismusanalysen mittels STR-PCR
- Tafel 9:** akute Graft-versus-Host Erkrankung
- Tafel 10:** chronische Graft-versus-Host Erkrankung
- Tafel 11:** zugrundeliegende/führende Todesursachen
- Tafel 12:** Dendritenchimärismus (Dx) beim Engraftment
- Tafel 13:** qualitativer und quantitativer Chimärismus von dendritischen Zellen im peripheren Blut beim Engraftment
- Tafel 14:** Chimärismusanalysen 6 und 12 Monate (M) nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation
- Tafel 15:** Einfluß des DC1 Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen
- Tafel 16:** Einfluß des DC2 Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen
- Tafel 17:** Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben in Gruppe A und B
- Tafel 18:** Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben in Gruppe C und D

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amsa	Amsacrin
AraC	Cytarabin
APC	Allophycocyanin
ATG	Antithymozytenglobulin
BSA	Bovine Serum Albumine
Bu	Busulfan
Camp	Campath
CC	Complete Chimerism
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CyA	Cyclosporin A
Cyclo	Cylophosphamid
DC	Dendritic Cells
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
Dx	Dendritenchimärismus
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Flu	Fludarabin
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukämie
HLA	Human Leukocyte Antigen
IL	Interleukin
INF	Interferon
KMT	Knochenmarktransplantation
MC	Mixed Chimerism
MDS	Myelodysplastisches Syndrom

MHC	Major Histocompatibility Complex
mHA _g	Minor Histocompatibility Antigen
MM	multiple Myelom
MMF	Mycophenolatmofetil
MW	Mittelwert
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
OMF	Osteomyelofibrose
OMS	Osteomyelosklerose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSCT	Peripheral Blood Stem Cell Transplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
SAA	schwere aplastische Anämie
SCA	Sichelzellanämie
SD	Standardabweichung
STR	Short Tandem Repeat
TBI	Total Body Irradiation
Th	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNI	Total Nodal Irradiation
VOD	Veno-Occlusive Disease
VP	Etoposid

In tiefer Dankbarkeit meinen Eltern

1. Einleitung

Die Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen stellt einen kurativen Therapieansatz bei einer Vielzahl von hämatologischen Erkrankungen dar. Diese Behandlungsform ist jedoch mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Hauptursachen hierfür sind - neben opportunistischen Infektionen und der Venooclusiven Erkrankung (VOD) - die Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) und ein Rezidivieren der zugrundeliegenden Grunderkrankung.

Chimärismusanalysen im Knochenmark oder im peripheren Blut stellen einen wichtigen Bestandteil für die Diagnose verschiedener Komplikationen im Posttransplantationsverlauf dar. Sowohl das qualitative als auch das quantitative Verhältnis hämatopoetischer Zellen des Spenders zu denen des Empfängers kann mit genetischen und molekularbiologischen Methoden aufgeschlüsselt werden (*Thiede et al. 2001*) und erlaubt Aussagen zum Anwachsen des Transplantats, Versagen des Transplantats, zur Transplantatabstoßung und zum Auftreten eines Rezidivs (*Dubovsky et al. 1999, Lion et al. 2001*). Inwiefern ein gemischter Chimärismus aber als diagnostischer oder gar prognostischer Faktor für die Rezidivdiagnose dient, ist aufgrund der zum Teil widersprüchlichen Studienergebnisse (*Schattenberg et al. 1989, Bertheas et al. 1991, Leeuwen et al. 1994, Roux et al. 1994, Choi et al. 2000, Lion et al. 2001*) noch nicht eindeutig geklärt. Wie Frassoni (1990) und Gyger (1998) zeigen konnten, hat der Chimärismus nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation möglicherweise zudem auch einen Einfluß auf das Auftreten einer Graft-versus-Host Reaktion.

Die Graft-versus-Host Erkrankung stellt eine immunologische Reaktion des transplantierten Spender-Immunsystems gegen Empfängergewebe dar. Die drei grundlegenden Voraussetzungen für das Auftreten einer Graft-versus-Host Reaktion wurden bereits 1966 von Billingham formuliert: Erstens eine ausreichende Anzahl immunkompetenter Zellen im Transplantat, zweitens Antigene im Empfänger, die in der Lage sind, Spenderzellen zu aktivieren und drittens ein Empfängerimmunsystem,

das nicht in der Lage ist, eine effektive Immunantwort gegen das Transplantat zu richten. All diese Voraussetzungen sind im Rahmen der Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen gegeben. Die klinischen Manifestationsformen einer GvHD finden sich vor allem an Haut, Darm und Leber. Erste Beschreibungen eines solchen klinischen Phänomens publizierte van Beekum im Jahre 1967.

Seitdem wurden wichtige Faktoren in der Pathogenese der Graft-versus-Host Erkrankung aufgeklärt, die als pathophysiologisches Drei-Phasen-Modell zusammengefasst werden (*Ferrara et al. 1991, Goker et al. 2001*). Die afferente Phase kann in zwei Abschnitte unterteilt werden: Zum einen die Schädigung des Empfängergewebes durch die Konditionierung, die zu einer Endothelzellschädigung und zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (wie TNF- α und IL-1) führt. Nach Infusion des Transplantats folgt zum anderen die Aktivierung, Stimulation und Proliferation von naiven T-Zellen des Spenders, die als die Effektorzellen der Graft-versus-Host Reaktion gelten. Die genetische Grundlage hierfür liefern Major- und Minor-Histokompatibilitätsantigene (MHC/mHAg), in denen Spender und Empfänger differieren (*Gloumy et al. 1996*). Empfängerantigene werden - gebunden an MHC-Moleküle - durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, den alloimmunologisch naiven Spender T-Zellen präsentiert. Dendritische Zellen haben in physiologischen wie auch in pathologischen Immunreaktionen eine bedeutende Funktion (*Banchereau et al. 1998*) und nehmen möglicherweise auch in der Pathophysiologie der Graft-versus-Host Erkrankung eine wichtige Rolle ein (*Shlomchik et al. 1999*). In der dritten Phase, der Effektorphase, kommt es zu einer indirekten und direkten Schädigung der Empfängergewebe. Neben proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1) stellen unspezifische (aktivierte Monozyten und NK-Zellen) und spezifische zelluläre Zytotoxizität (vermittelt durch zytotoxische T-Lymphozyten via Fas-FasL Interaktionen und Perforinen) entzündliche Effektormechanismen dar, die die Endstrecke der Graft-versus-Host Reaktion bilden. (*Krenger et al. 1997*)

Im Hinblick auf eine Assoziation zwischen Chimärismus und GvHD rücken vor allem die Zellen, denen in der Immunpathogenese möglicherweise eine entscheidende Rolle zukommt, in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen und

klinischen Interesses. Der Chimärismus verschiedener Leukozytensubpopulationen (*Lion et al. 2001*), CD34⁺-Zellpopulationen (*Thiede et al. 2001*), oder der T-Lymphozyten (*Mattsson et al. 2001*) bekommen zunehmend auch klinische Bedeutung.

Vor dem Hintergrund der Pathobiologie der Graft-versus-Host Erkrankung ist der Chimärismus von T-Zellen als Effektorzellen der Erkrankung und von dendritischen Zellen als potente Antigen-präsentierende Zellen von großem Interesse. Mattsson (2001) konnte zeigen, daß ein gemischter T-Zell Chimärismus nach der Transplantation allogener Stammzellen mit einem verminderten Risiko für eine akute Graft-versus-Host Erkrankung korreliert. Für den Chimärismus dendritischer Zellen nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation liegen jedoch nur sehr limitierte Daten vor (*Porter et al. 2000, Clark et al. 2001, Auffermann-Gretzinger et al. 2002*). Bis heute jedoch ist es noch nicht vollständig geklärt, ob nun die dendritischen Zellen des Spenders oder die des Empfängers entscheidend in die Initiierung der T-Zellaktivierung involviert sind. Im Mausmodell gibt es Hinweise, daß durch eine Inaktivierung Antigen-präsentierender Zellen des Empfängers eine Graft-versus-Host Erkrankung verhindert werden kann (*Shlomchik et al. 1999*), andere Arbeitsgruppen hingegen konnten zeigen, daß auch dendritische Zellen des Spenders eine Rolle in der Immunmodulation der Graft-versus-Host Reaktion spielen (*Reddy et al. 2000, Aprinati et al. 2000*).

In der vorliegenden Studie wurden Chimärismusuntersuchungen an beiden beschriebenen Subpopulationen von dendritischen Zellen im peripheren Blut durchgeführt: DC1 (CD11c⁺ = Adhäsionsmolekül aus der Gruppe der β_2 -Integrine) und DC2 (CD123⁺ = α -Kette des IL-3-Rezeptors) (*Robinson et al. 1999, Kohrgruber et al. 1999*). DC1 exprimieren die myeloischen Marker CD13 und CD33, sind potente Stimulatoren von alloimmunologisch naiven T-Zellen und führen in der Interaktion mit T-Helfer-Zellen zu einer Th1-Differenzierung. Th1-Zytokine wie IL-2 und INF- γ stimulieren dann die zelluläre Zytotoxizität über eine Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten) und von Monozyten/Makrophagen. Diese Th1-Antwort scheint ein wichtiger Bestandteil der zytotoxischen Reaktion bei der GvHD zu sein. DC2 hingegen exprimieren lymphatische Marker (CD4⁺, CD10⁺),

sind frisch isoliert schwache Aktivatoren von naiven T-Zellantworten und führen bei Helferzellen zu einer Th2-Differenzierung. Wichtige Th2-Zytokine sind unter anderem IL-4 und IL-10, die über einen negativen Feedbackmechanismus die Th1-Differenzierung hemmen und damit einen anti-inflammatorischen Effekt ausüben. (*O'Doherty et al. 1994, Olweus et al. 1997, Rissoan et al. 1999, Aprinati et al. 2000*)

Die genaue Rolle von T1- und T2-Zellen in der GvHD-Pathogenese ist noch ungeklärt. In tierexperimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, daß Typ-2-polarisierte CD4⁺ und CD8⁺ Spender T-Zellen nicht in der Lage sind eine GvHD zu initiieren (*Krenger et al. 1995*). Eine Polarisierung von Spender T-Lymphozyten vor Transplantation durch G-CSF zum Typ-2-Phänotyp führt im Mausmodell zu einem verringerten Schweregrad der GvHD (*Pan et al. 1996*). Hierin liegt auch eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, daß bei der Transplantation peripherer Blutstammzellen im Vergleich zur Knochenmarktransplantation trotz einer ca. 10-fach höheren Anzahl an transplantierten T-Zellen weder eine höhere Inzidenz noch ein ausgeprägterer Schweregrad der GvHD beobachtet wird. Die G-CSF-Behandlung des Spenders zur Mobilisierung peripherer Blutstammzellen führt zu einem Anstieg von Th2-induzierenden dendritischen Zellen (DC2) im peripheren Blut des Spenders (und somit auch im Transplantat), die dann eventuell einen immunmodulatorisch hemmenden Effekt in der GvHD Pathogenese einnehmen (*Pan et al. 1996, Aprinati et al. 2000*). Neueste experimentelle Studienergebnisse hingegen lassen vermuten, daß bei der Induktion der akuten GvHD neben den T1- auch die T2-Zellen eine relevante Rolle spielen (*Liu et al. 2002*). Zudem gibt es Daten, die zeigen, daß eine chronische Graft-versus-Host Reaktion mit einer verstärkten Aktivierung von Th2-Zellen verbunden ist (*De Wit et al. 1993*).

Ein weiterer interessanter Aspekt für die bedeutende Rolle der dendritischen Zellen im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Zelltransplantation ist deren Fähigkeit, in der Interaktion mit T-Zellen Toleranz zu induzieren (*Steptoe et al. 1996*). Unreife DC sind womöglich in der Lage eine Antigen-spezifische Deletion und/oder Anergie von T-Zellen zu induzieren, wobei der genaue Mechanismus hierfür noch nicht geklärt ist (*Adler et al. 1998, Steinmann et al. 2000, Steinmann et al. 2002*). Vor allem vor dem Hintergrund der adoptiven Immuntherapie mit Spender-Lymphozyten

(DLI) ist dieser Mechanismus der Toleranzinduktion von klinischem Interesse (*Kolb et al. 1997*).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Kinetik des Dendritenchimärismus in den beiden Subpopulationen DC1 und DC2 nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation zu analysieren und dessen Einfluß auf verschiedene klinische Variablen wie Inzidenz und Schwere von akuter und chronischer GvHD, Rediziv-freies Überleben und Gesamtüberleben zu untersuchen.

Untersuchte Patienten:	n = 139 (100%)
Männlich:	n = 87 (62,6%)
Weiblich:	n = 52 (37,4%)
Mittleres Alter bei Transplantation:	42,7 Jahre (SD 12,2 Jahre)
Verwandte Spender:	n = 79 (56,8%)
Fremdspender:	n = 60 (43,2%)
HLA-idente Spender:	n = 116 (83,5%)
Nicht-HLA-idente Spender:	n = 23 (16,5%)
Knochenmarktransplantation:	n = 58 (41,7%)
Periphere Blutstammzelltransplantation:	n = 81 (58,3%)

Diagnosen:

AML	46	(33,1%)	MDS	3	(2,2%)
CML	32	(23,0%)	SAA	2	(1,4%)
ALL	20	(14,4%)	M. Hodgkin	2	(1,4%)
NHL	15	(10,8%)	OMF/OMS	2	(1,4%)
MM	13	(9,4%)	SCA	1	(0,7%)
CLL	3	(2,2%)			

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

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Im Zeitraum von September 2000 bis April 2002 wurden prospektiv insgesamt 139 Patienten, die sich in der José-Carreras-Transplantationseinheit der Medizinischen Klinik III (Klinikum der Universität München - Großhadern) einer Transplantation von Knochenmark oder peripherer Blutstammzellen unterzogen, in die Studie eingeschlossen. Alle untersuchten Patienten gaben nach einem ärztlichen Aufklärungsgespräch ihr Einverständnis, freiwillig an der Studie teilzunehmen. Der Beobachtungszeitraum jedes Patienten betrug je 12 Monate. Patienten, die zwischen Juli 2001 und April 2002 transplantiert wurden, wurden bis zum Stichtag 01.07.2002 beobachtet.

Einen Überblick über verschiedene Patientendaten, wie Geschlecht, Alter, Diagnose, Konditionierungsregime, verwandter/unverwandter Spender, HLA-identer/nicht-HLA-identer Spender und Knochenmark oder peripheres Blut als Stammzellquelle gibt Tafel 1.

Der Schweregrad von akuter und chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung wurde anhand klinischer und laborchemischer Parameter eingeteilt (Grading der aGvHD nach *Glucksberg et al. 1974*). Als GvHD-Prophylaxe erhielten die Patienten im wesentlichen zwei verschiedenen Regime: 70 Patienten (50,4%) erhielten Methotrexat i.v. (15mg/m² am Tag +1, 10mg/m² am Tag +3 und 10mg/m² am Tag +6 bzw. am Tag +7 bei haploidenten Spender) und Cyclosporin A, 63 Patienten (45,3%) Mycophenolatmofetil i.v. (Start am Tag 0 mit 2x15mg/kg KG) und Cyclosporin A. Die kontinuierliche CyA-Applikation wurde mittels Perfusorgabe am Tag -1 mit 5mg/kg/d gestartet, am Tag +5 wurde auf 3mg/kg/d reduziert und ab Tag +28 wurde auf orales Cyclosporin A umgestellt (12mg/kg/d). Die CyA-Dosis wurde in den ersten 2-3 Monaten nach Transplantation einem Plasmaspiegel von 150 bis 200 ng/ml angepaßt und dann, je nach klinischem Zustand des Patienten, schrittweise bis Tag +100 reduziert.

Konditionierungsregime:

Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG	51	(36,7%)
12Gy TBI-Cyclo-ATG	20	(14,4%)
4Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG	12	(8,6%)
4Gy TBI-Flu-Cyclo	11	(7,9%)
8Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG	10	(7,2%)
Bu-Cyclo-ATG	9	(6,5%)
12Gy TBI-Vp	7	(5,0%)
Flu-AraC-Amsa · 12Gy TBI-Cyclo-ATG (<i>haplo</i>)	4	(2,9%)
12Gy TBI-Cyclo-ATG (<i>haplo</i>)	3	(2,2%)
2Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG	2	(1,4%)
keine Konditionierung	2	(1,4%)
Flu-AraC-Amsa · 4Gy TBI-Cyclo-ATG (<i>haplo</i>)	1	(0,7%)
Flu-Cyclo	1	(0,7%)
Cyclo-ATG	1	(0,7%)
DexaBEAM-OKT 3	1	(0,7%)
9Gy TNI · 3Gy TBI-Cyclo-ATG	1	(0,7%)
8Gy TNI-Flu-Cyclo-ATG	1	(0,7%)
4Gy TBI-Flu-Cyclo-Camp	1	(0,7%)
OKT 3 · 4Gy TBI-Cyclo-ATG (<i>haplo</i>)	1	(0,7%)

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

Fünf der 139 Patienten (3,6%), die wegen eines Multiplen Myeloms transplantiert wurden, erhielten als GvHD-Prophylaxe nur MMF (Dosierung wie oben). Einem Patienten mit einer schweren aplastischen Anämie wurde neben CyA (Dosierung wie oben) auch Rapamycin zur GvHD-Prophylaxe verabreicht. Ein Großteil der Patienten (n=116) bekam zudem, im Rahmen der Konditionierung, Antithymozytenglobulin (ATG) i.v. als GvHD-Prophylaxe (10 bis 30 mg/kg für 3 Tage, siehe Tafel 1 - Teil II). Die Primärtherapie einer aGvHD \geq Grad III bestand aus Prednisolon (2 bis 3 mg/kg/d), welches dann, je nach Ansprechen, alle 3 Tage schrittweise um 10% reduziert wurde.

2.2. Messung dendritischer Zellen im peripheren Blut

2.2.1. Vorbemerkung

Aufgrund von fehlenden spezifischen Markern für dendritische Zellen im peripheren Blut war es bis vor kurzem noch nicht möglich, diese direkt aus Vollblut zu isolieren. Bisherige Ansätze beinhalteten meist immer eine vorherige Kultivierung in bestimmten Zytokinmedien (z.B. GM-CSF, TNF- α , IL-3; *Fearnley et al. 1997, Fearnley et al. 1999*), die zu einer Reifung der dendritischen Zellen und damit verbunden zu einer vermehrten Expression von Aktivierungsmarkern und co-stimulatorischen Molekülen wie CMRF-44, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) und CD83 führt, welche auf direkt aus peripherem Blut isolierten Dendriten fehlen (*Hock et al. 1994, McLellan et al. 1995, Robinson et al. 1999*).

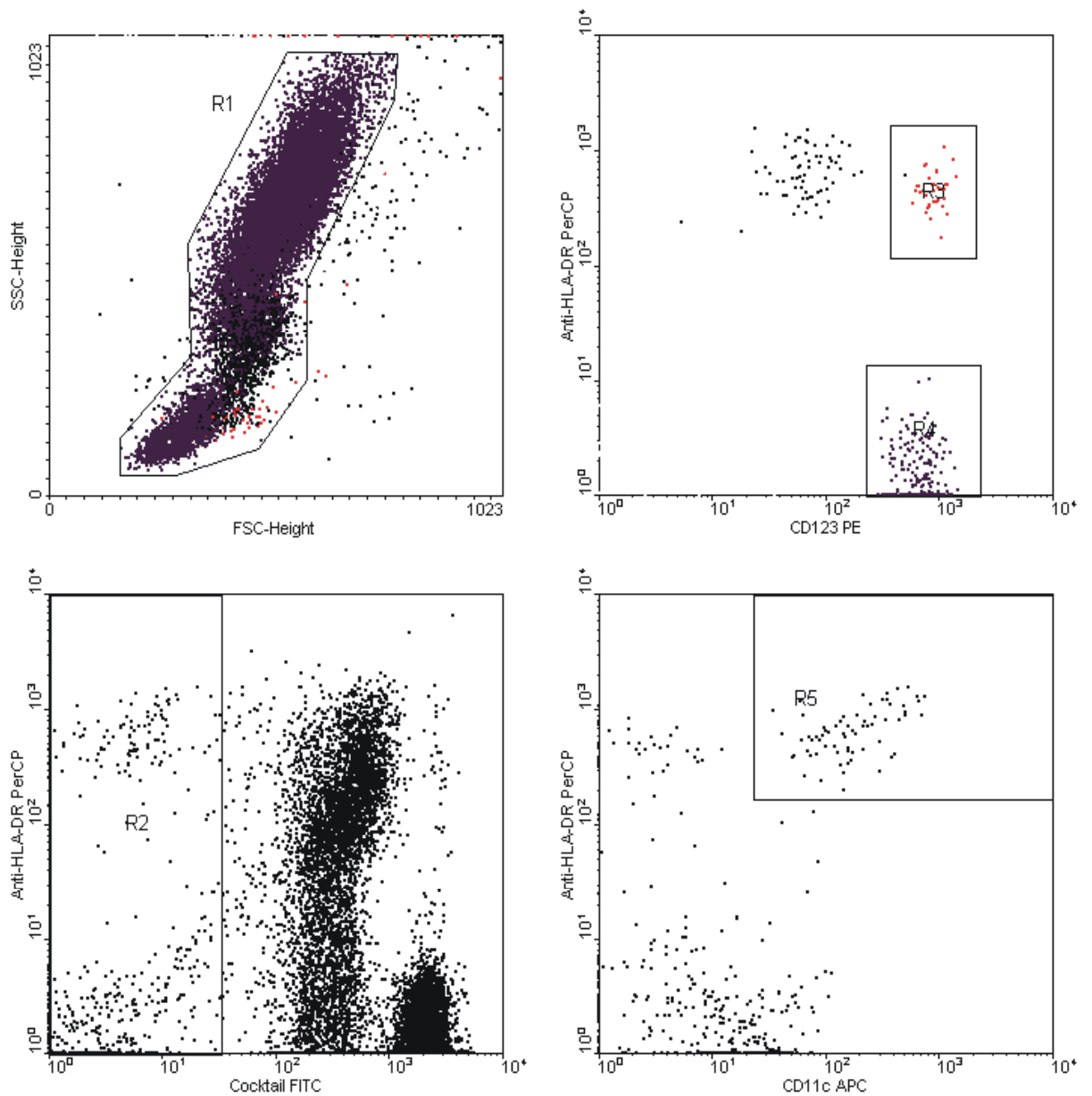
Mit der Identifikation CD11c⁺ (β_2 -Integrin) DC1 und CD123⁺ (IL-3R α) DC2 im peripheren Blut (*Kohrgruber et al. 1999*) war es erstmals möglich, ein Set monoklonaler Antikörper zu konfigurieren, das in Verbindung mit HLA-DR und einem sogenannten lin⁺ Cocktail (linienspezifische Oberflächenantigene wie CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) eine direkte Identifikation der beiden DC Populationen im peripheren Blut erlaubt.

2.2.2. Probengewinnung

Im Rahmen der Routineblutentnahmen wurde bei Patienten in der Posttransplantationsphase ab einem Leukozytengehalt von $>100/\mu\text{l}$ werktäglich um 6:00 Uhr morgens 1 Röhrchen Citratblut über den Hickmann-Katheter (oder alternativ über einen zentralen Venenkatheter) abgenommen. Alle Proben wurden noch am selben Tag im Cellsorting Labor der Medizinischen Klinik III verarbeitet.

2.2.3. Probenverarbeitung

In Probenröhrchen wurden 100 μl Vollblut für 15 Minuten bei Raumtemperatur an einem lichtgeschützten Ort mit folgenden monoklonalen Antikörpern inkubiert: 7 μl anti-HLA-DR-PerCP, 7 μl lin1-FITC (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56), 5 μl anti-CD11c-APC und 5 μl anti-CD123-PE. Als Isotypkontrolle dienten Maus-IgG₁-PE und Maus-IgG_{2a}-APC (alle Antikörper Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA). Danach folgte die Lyse der Erythrozyten mit 2 ml FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA), die zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Nach 10-minütiger Inkubation in Dunkelheit wurden die Probenröhrchen für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert (Labofuge II, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Nach der Zentrifugation wurde die Lösung samt lysierten Erythrozyten abgossen und mit 350 ml PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) als Waschpuffer versetzt (PBS 0,1 M pH 7,3-7,4: Apotheke, Klinikum der Universität München; Natriumazid: Merck KGaA, Darmstadt; BSA: Merck KGaA, Darmstadt). Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 U/min wurden der Überstand an PBS-Puffer abgossen, und die Proben für die Messung am Durchflußzytometer in 300 μl PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) resuspendiert.



Tafel 2: Durchflußzytometrische Messung von DC1 und DC2 im peripheren Blut

Dendritische Zellen im peripheren Blut wurden identifiziert als eine HLA-DR⁺ lin1⁻ Zellpopulation. Die HLA-DR⁺ lin1⁻ CD11c⁺ Zellen sind DC1 (R5), die HLA-DR⁺ lin1⁻ CD123⁺ Zellen DC2 (R3). Die Population HLA-DR⁻ lin1⁻ CD123⁺ Zellen sind basophile Granulozyten (R4).

2.2.4. Probenmessung

Alle Probenmessungen wurden mit dem Durchflußzytometer FACSCalibur™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) des Cellsorting Labors durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Sechsparameter-Zellanalyse-Gerät zur simultanen Messung von Vorwärts-und Seitwärtslichtstreuung sowie von 4 Fluoreszenzen. Das Gerät enthält einen luftgekühlten Argonlaser und einen Rotlaser als Lichtquellen und verfügt über 1024 Kanäle zur Signalauflösung. Die maximale Messrate lag bei etwa 500-800 events/sec. Die Messsignale wurden auf allen Detektoren über 4 Dekaden logarithmisch verstärkt. Als fluoreszierenden Farbstoffe wurden FITC, APC, PerCP und PE eingesetzt. Es wurden jeweils 20.000 Signale / Probe auf dem Forward-Side-Scatter Kanal mit der CELLQuest™-Software Version 3.0 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) aquiriert.

Im Forward-Side-Scatter Dot Plot wurden über R1 die Leukozyten von Zelldebris und toten Zellen getrennt. Der Dot Plot anti-HLA-DR-PerCP/lin1-Cocktail-FITC wurde dann auf R1 gegatet, um die lin1⁻ Zellen (negativ für CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) unter den Leukozyten zu identifizieren (R2). Beiden Subpopulationen von dendritischen Zellen im peripheren Blut sind lin1-Cocktail negative Zellpopulationen. DC1 wurden dann als HLA-DR⁺ lin1⁻ CD11c⁺ Zellen identifiziert und DC2 als HLA-DR⁺ lin1⁻ CD123⁺ Zellen (vergleiche dazu auch Tafel 2).

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels CELLQuest™ Software Version 3.0 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Die angegebenen Werte von DC1 und DC2 im peripheren Blut beziehen sich auf den prozentualen Anteil dieser Populationen an den Leukozyten.

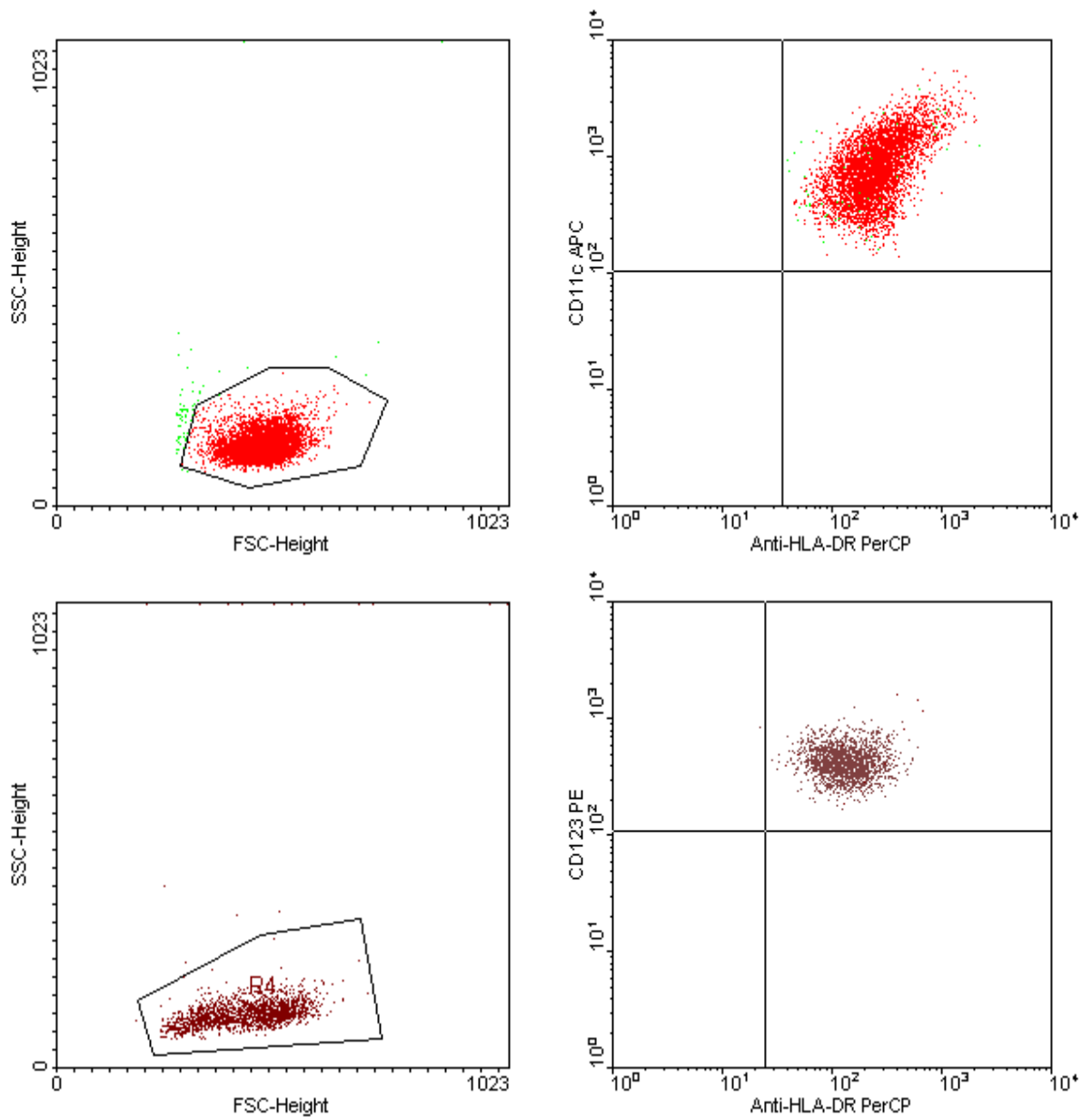
2.3. Isolierung dendritischer Zellen

2.3.1. Probengewinnung

Wenn bei der durchflußzytometrischen Messung dendritischer Zellen im peripheren Blut ein Mindestgehalt von ca. > 0,1% der Leukozyten feststellbar war, wurden dem Patienten am darauffolgenden Tag in gleicher Art wie unter 2.2.2. beschrieben 3-4 Röhrchen Citratblut entnommen. Bei den Chimärismusanalysen 6 und 12 Monate nach Transplantation wurden die Proben im Rahmen der Routineblutentnahmen in der Transplantationsambulanz an einer peripheren Vene entnommen. Alle Proben wurden noch am selben Tag im Cellsorting Labor der Medizinischen Klinik III verarbeitet.

2.3.2. Probenverarbeitung

Durch Dichtezentrifugation wurden zuerst die mononukleären Zellen aus Vollblut isoliert. Dazu wurden je 7 ml Lymphozyten-Separationsmedium (PAA Laboratories GmbH, Linz) mit 4 ml Citratblut überschichtet und für 20 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert (Labofuge II, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Die Schicht mononukleärer Zellen wurde vorsichtig abgehoben und 2 mal mit PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) gewaschen (Zentrifugation bei 2000 U/min für je 5 Minuten). In der Zellsuspension wurde der Leukozytengehalt bestimmt (Cell Counter, Beckman Coulter GmbH, Krefeld), der als Grundlage für die Berechnung der nötigen Antikörpermenge diente. Die gewaschenen und in PBS suspendierten Zellen wurden bei 4°C für 15 Minuten mit folgenden monoklonalen Antikörpern inkubiert: Anti-HLA-DR-PerCP, lin1-FITC (anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56), anti-CD11c-APC und anti-CD123-PE. Darauffolgend wurden die Proben nochmals mit PBS gewaschen (2000 U/min für 5 Minuten) und für die Messung am Cellsorter in PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) resuspendiert.



Tafel 3: Reinheit von direkt aus peripherem Blut isolierten DC1 und DC2

Die dargestellten Dot Plots zeigen die durchflußzytometrische Nachanalyse (siehe 2.2.4 und Tafel 2) der Zellen, die vorher mittels Cellsorting (FACS-Vantage SE™, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) isoliert wurden. Die beiden oberen Grafiken zeigen die isolierten DC1 (CD11c⁺), die beiden unteren die isolierten DC2 (CD123⁺). Die Reinheit lag bei 98,2% (DC1) bzw. 95,6% (DC2).

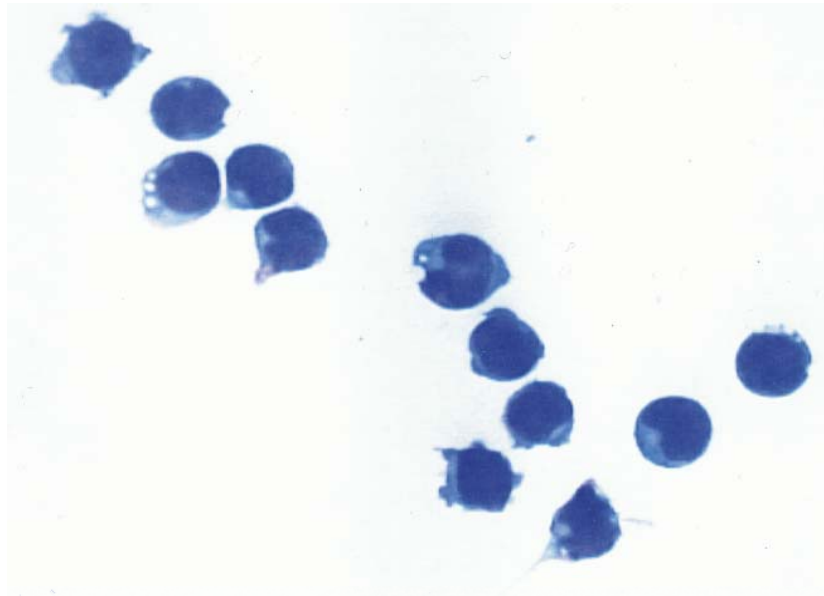
2.3.3. Isolierung von DC1 und DC2 mittels Cellsorting

Die separierten und mit Antikörpern markierten mononukleären Zellen wurden im FACSVantage SETM (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) des Cellsorting Labors sortiert. Die dendritischen Zellen wurden, wie unter 2.2.4 beschrieben, identifiziert. Beide Populationen sind HLA-DR⁺ lin1⁻ Zellen, DC1 sind zudem positiv für CD11c, DC2 für CD123. Diese Phänotypen wurde dem Cellsorter als Sortierungskriterien definiert.

Im Cellsorter wird die Zellsuspension angesaugt und mit optimaler Frequenz in Schwingung versetzt, so daß der Flüssigkeitsstrom in nahezu gleichförmige Tropfen aufgeteilt wird, die jeweils eine Zelle enthalten. Diese Tropfen werden durch eine Düse geleitet, treffen dann auf einen Laserstrahl und reißen alle am selben Punkt, einige Millimeter unterhalb der Düse, vom Strom ab. Dieser Abrißpunkt kann präzise bestimmt werden, so daß im Zytometer die Zeit von der Erfassung durch den Laser bis zum Abrißpunkt errechnet werden kann. Wird vom Laser eine Zelle erfaßt, die den vorher definierten Sortierungskriterien (siehe oben) entspricht, wird dem Flüssigkeitsstrom genau in dem Moment durch eine Elektrode ein Spannungsimpuls vermittelt, in dem der Tropfen mitsamt der enthaltenen Zelle vom Strom abreißt.

Der geladene Tropfen passiert zwei ebenfalls geladene Ablenkungsplatten und wird je nach Polarität durch elektrostatische Abstoßung bzw. Anziehung in das rechte oder linke Sammelröhrchen geleitet. Ungeladene Tropfen werden vom elektrischen Feld nicht erfaßt und in ein Abfallröhrchen in der Mitte geleitet.

Beide Populationen wurden simultan in je ein mit PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) gefülltes Sammelröhrchen sortiert. Die Reinheit der isolierten dendritischen Zellen wurde anschließend durchflußzytometrisch bestimmt und lag durchweg über 95% (vergleiche dazu Tafel 3).



Tafel 4: Pappenheim-Färbung von direkt aus peripherem Blut isolierten DC2

Die hier in Pappenheim-Färbung dargestellte Subpopulation DC2 („lymphatische“ DC) zeigt lichtmikroskopisch eine Morphologie, die auch mit der Lage der dendritischen Zellen im Forward-Side-Scatter übereinstimmt (zwischen Monozyten und Lymphozyten, siehe auch Tafel 2): Großer, leicht eingekerbter Zellkern, perinukleäre Aufhellungen und ein schmaler Zytoplasmasaum.

2.3.4. Morphologie von isolierten dendritischen Zellen

2.3.4.1. Pappenheim-Färbung

Aus den in PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) suspendierten dendritischen Zellen wurde mit einer Zytocentrifuge (800 U/min, Shandon Labortechnik GmbH, Berlin) ein Zytospinpräparat erstellt. Dieses wurde nach Pappenheim gefärbt.

Tafel 4 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von isolierten DC2.

2.3.4.2. Morphologie nach Kultivierung mit TNF- α

Um zu zeigen, daß es sich bei den isolierten Zellen um dendritische Zellen handelt, wurden die sortierten Zellen mit Tumornekrose Faktor α inkubiert. DC im peripheren Blut sind funktionell unreife Zellen (*Kohrgruber et al. 1999*), können aber in Gegenwart von TNF- α in-vitro reifen und entwickeln dann auch die charakteristische Morphologie reifer DC (*Auffermann-Gretzinger et al. 2002*).

Die in PBS (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) suspendierten dendritischen Zellen (Subpopulation DC2) wurden in RPMI + 10% FCS zusammen mit TNF- α (10 μ g/ml auf 1×10^5 Zellen/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Aus den kultivierten DC wurde ein Zytospinpräparat (800 U/min, Zytocentrifuge Shandon Labortechnik GmbH, Berlin) angefertigt, das anschließend nach Pappenheim gefärbt wurde. Tafel 5 zeigt die lichtmikroskopische Morphologie dendritischer Zellen des peripheren Blutes (DC2) nach 24-stündiger Kultivierung mit TNF- α .



Tafel 4: Morphologie nach Kultivierung mit TNF- α

Nach Kultivierung mit Tumornekrose Faktor α entwickelten die mittels Cellsorting aus dem peripheren Blut gewonnenen, unreifen dendritischen Zellen die charakteristische lichtmikroskopische Morphologie funktionell reifer DCs: randständig liegender, leicht eingekerbter Zellkern und baumartig-verzweigte Zytoplasmaausläufer (vergleiche dazu auch Tafel 4).

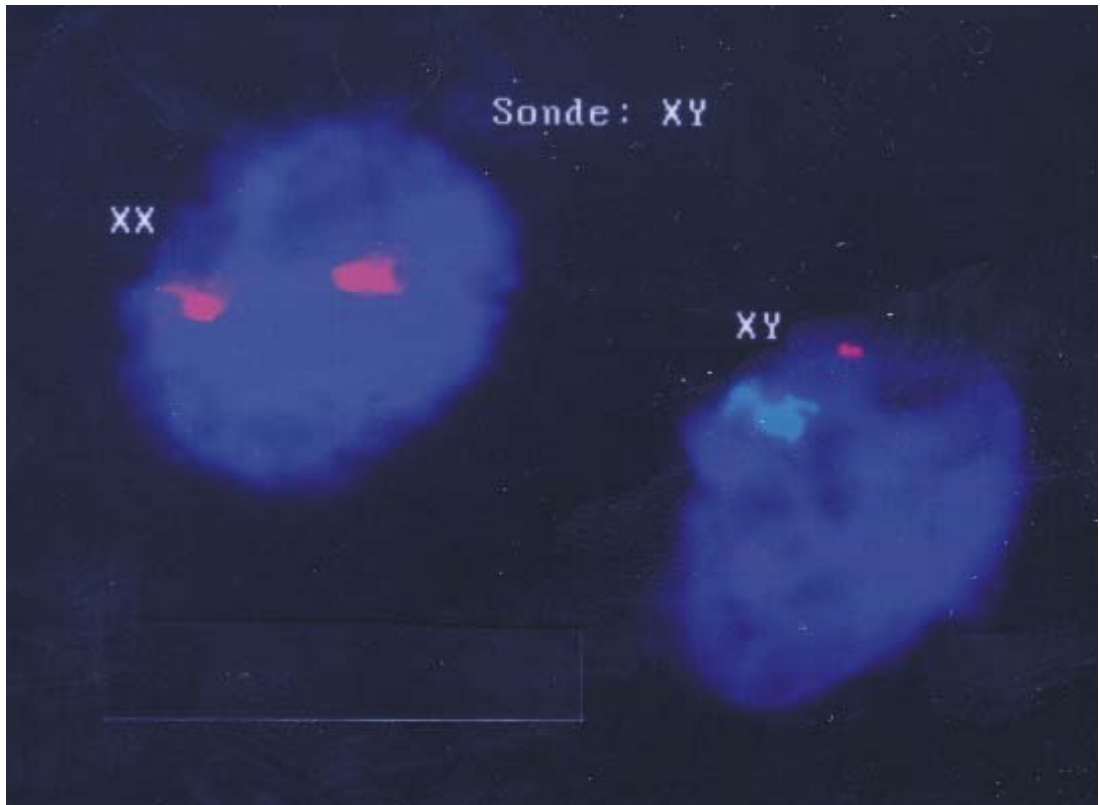
2.4. Chimärismusanalysen

2.4.1. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Bei Patienten, die Knochenmark oder Blutstammzellen von einem gegengeschlechtlichen Spender erhalten, ist es möglich, Chimärismusanalysen anhand der Detektion der Geschlechtschromosomen X und Y durchzuführen. Hierfür eignen sich verschiedene Methoden wie zytogenetische Untersuchungen (*Lawler et al. 1984, Walker et al. 1986*), Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (*Wessman et al. 1989, Durnam et al. 1989*), oder auch Assays, die auf PCR-Technik basieren (*Fehse et al. 2001*). Vor allem aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit ist die FISH-Untersuchung heute der Standard bei Chimärismusanalysen nach gegengeschlechtlicher Transplantation. Zudem zeigt die FISH-Technik eine gute Korrelation mit den Ergebnissen der STR-PCR-Technik (*Thiede et al. 1999, Thiede et al. 2001*), wird ihr aber aufgrund der Praktikabilität im klinischen Alltag vorgezogen.

Die isolierten dendritischen Zellen wurden, wie unter 2.3.3. beschrieben, bei Raumtemperatur direkt in ein mit PBS-Puffer (0,09% Natriumazid, 0,5% BSA) gefülltes Probenröhrchen sortiert. Daraus wurde mittels einer Zytocentrifuge (800 U/min, Shandon Labortechnik GmbH, Berlin) ein Zytospin-Präparat erstellt. Die DC wurden auf 2 Stellen des Objektträgers aufzentrifugiert. Mit einem Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung, Axioskop 20, Fa. Carl Zeiss, Jena) wurden Bereiche, in denen viele Zellen gut verteilt nebeneinander lagen, identifiziert und diese mit einem Diamantkratzer auf der Rückseite des Objektträgers markiert.

Die getrockneten und markierten Präparate wurden zuerst fixiert (20 Minuten Fixierlösung: Methanol : Eisessigsäure 3:1, Merck KGaA, Darmstadt) und darauffolgend durch eine kalte (4°C) aufsteigende Alkoholreihe (70% / 80% / 90% / 100% Ethanol, je 1 Minute) gebracht.



Tafel 6: **Chimärismusanalyse mittels FISH**

An Zytospinpräparaten von DC1 und DC2 wurden Fluoreszenz in-situ Hybridisierungen durchgeführt. Durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden, die spezifisch an bestimmte Regionen der beiden Geschlechtschromosomen binden, kann das X- und das Y-Chromosom identifiziert werden, und somit eine Zuordnung der Zellen zu Spender oder Empfänger erfolgen (bei gegengeschlechtlich transplantierten Patienten).

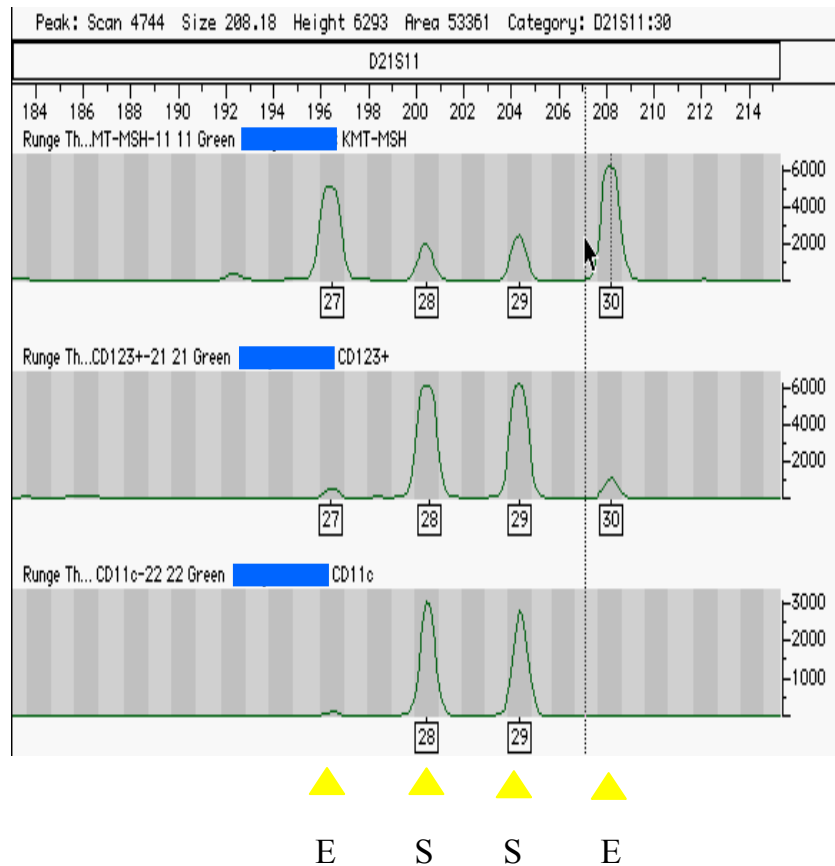
Die hier dargestellte FISH-Untersuchung von isolierten DC2 zeigt neben einer männlichen Spenderzelle (rechts) auch eine weibliche Zelle der Empfängerin (links). Somit liegt definitionsgemäß ein gemischter Chimärismus in den DC2 des peripheren Blutes vor. (Y = blaugrüne Sonde, X = rote Sonde)

Nach Trocknen des Objektträgers wurden je 2 µl der zuvor aufgetauten Sonden (CEP® X SpectrumOrange™ DNA Probe (Zentromerregion Xp11.1-q11.1) und CEP® Y SpectrumGreen™ DNA Probe (Satellit III, Yq12), Vysis GmbH, Bergisch Gladbach) auf die markierten Stellen pipettiert, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogumm abgedichtet. Anschließend wurde das Präparat zur Hybridisierung in den Hybrite gelegt (76°C für 3 Minuten) und die Proben danach bis zum nächsten Tag im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) aufbewahrt.

Nach 24 Stunden wurden das Deckglas samt Fixogumm entfernt, die Präparate zuerst für 2 Minuten in 75°C warmer 0,4% SSC Lösung gewaschen und danach denaturiert (1 Minute in 2x SSC / 0,1% NP 40 bei Raumtemperatur). Die 20x SSC-Stammlösung (sodium chloride and sodium citrate) setzt sich wie folgt zusammen: 175,35 g NaCl plus 88,2 g tri-Na-Citrat-Dihydrat (beides Merck KGaA, Darmstadt) gelöst in 1000 ml Aqua dest (pH 7,0). Die 0,4% SSC Waschlösung (pH 7,0-7,5) wurde hergestellt aus 20 ml 20x SSC Lösung plus 980 ml Aqua dest. Für die Denaturierungslösung 2x SSC / 0,1% NP 40 (pH 7,0-7,5) wurden in 900 ml Aqua dest 100 ml der 20x SSC Stammlösung und 1000 µl NP 40 (nicht ionisches Detergenz, Vysis GmbH, Bergisch Gladbach) gelöst.

Nach dem Trocknen wurden auf die markierten Stellen je 2 Tropfen DAPI-Antifade (125 ng/ml DAPI = blaufluoreszierendes 4,6-Diamidino-2-Phenylindole als spezifischer DNA-Farbstoff gelöst in 1,4-Diaminobenzol, Dihydrochlorid, Glycerol und Puffer; Vysis GmbH, Bergisch Gladbach) aufgetragen, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und die Präparate bis zur Mikroskopie in einer dunklen, trockenen Kammer bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Ausgewertet wurden alle FISH-Präparate mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20, Fa. Carl Zeiss, Jena; Übersicht mit 10-facher Vergrößerung, Auszählung bei 63-facher Vergrößerung mit Ölimmersion) des Cellsorting Labors. Bei jeder Chimärismusanalyse wurde versucht, mindestens 100 Interphasekerne auszuwerten.



Tafel 7: Chimärismusanalyse mittels STR-PCR

In der Grafik ist eine STR-PCR Untersuchung des Locus D21S11 dargestellt. In den DC1 (CD11c⁺) zeigen sich nur Merkmale des Spenders (S; 28/29). In den DC2 (CD123⁺) hingegen zeigt sich eine Mischung von Spender- (28/29) und Empfängermerkmalen (E; 27/30). Die Berechnung des quantitativen DC2-Chimärismus (anhand der Fläche der dargestellten peaks) ergab folgendes Verhältnis von Spender-zu Empfängermerkmalen: 93% ($\pm 5\%$) zu 7% ($\pm 7\%$). Auch der mituntersuchte Mundschleimhautabstrich zeigt eine Mischung von Spender- und Empfängermerkmalen.

Die Zahlen (27, 28, 29, 30) bezeichnen die Anzahl der repetitiven Sequenzen der untersuchten Tetranukleotide, in denen Spender und Empfänger differieren.

Ein Beispiel für eine Chimärismusanalyse mit Hilfe der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung zeigt Tafel 6. Die FISH-Untersuchung am Tag +55 nach Transplantation peripherer Blutstammzellen zeigte neben Dendriten des männlichen Spenders (XY) auch noch residuale Dendriten der Patientin (XX) und somit definitionsgemäß einen gemischten Chimärismus in den dendritischen Zellen im peripheren Blut (hier Subpopulation DC2).

2.4.2. Polymerasekettenreaktion von Short Tandem Repeats

Die PCR-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Dipl. Chemiker B. Rolf am Institut für Rechtsmedizin der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. med. W. Eisenmenger) durchgeführt.

Auch PCR-basierte Methoden eignen sich für Chimärismusbestimmungen, vor allem nach gleichgeschlechtlichen Transplantationen von allogenen hämatopoetischen Zellen. Neben den sogenannten VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats), wurden in letzter Zeit vermehrt Short Tandem Repeats (STR) eingesetzt, die sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Chimärismusanalyse erlauben.

Short Tandem Repeats sind hochpolymorphe repetitive Di-, Tri- und Tetranukleotidsequenzen verschiedener Länge, die über das gesamte Genom verstreut in die DNA inseriert sind (*Thiede et al. 1999*). Die Chimärismusanalyse mit Short Tandem Repeats wird ermöglicht durch die Detektion der verschiedenen Längen der repetitiven Nukleotidsequenzen, in denen Spender und Empfänger differieren. Ursprünglich stammt diese sensitive Methode aus der forensischen Medizin, hat aber, vor allem aufgrund der Möglichkeit der geschlechtsunabhängigen Chimärismusanalyse, auch Einzug in die Transplantationsmedizin gehalten (*Antin et al. 2001*).

Aus den, wie unter 2.2.3. beschrieben, isolierten dendritischen Zellen wurde die DNA mittels des QIAamp Blood Kit (Fa. Qiagen, Hilden) isoliert. Je 1 ng DNA wurde amplifiziert (AmpFISTR Profiler Plus PCR Amplification Kit; Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt).

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

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

Tafel 8: **Befundbericht von Chimärismusanalysen mittels STR-PCR**

Bei der Patientin A.L. wurden mittels STR-PCR der Chimärismus in den T-Zellen und in den dendritischen Zellen untersucht. Als Vergleich dienten Merkmale, die vor Transplantation (siehe „Befund vor KMT“) aus mononukleären Zellen analysiert wurden.

Die untersuchten T-Zellen zeigten einen kompletten Chimärismus. Sowohl in den DC1 (CD11c⁺) als auch in den DC2 (CD123⁺) zeigte sich eine Mischung von Spender- und Empfängermerkmalen. In der unteren Tabelle ist die Quantifizierung des DC1 und des DC2 Chimärismus aufgeführt (siehe dazu auch Tafel 7).

Die mituntersuchte Mundschleimhaut der Patientin zeigte nach Transplantation ebenfalls eine Mischung von Spender- und Empfängermerkmalen.

Die Elektrophorese wurde auf einem ABI 310 Kapillarelektrophoresegerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch Fluoreszenz. Dabei regt ein Laser die an die PCR Primer gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe an, und das emittierte Licht wird von einer CDD-Kamera detektiert. (Keil *et al.* 1999, Anslinger *et al.* 2001).

Untersucht wurde ein Multiplex Kit zur gleichzeitigen Amplifikation von 9 STR-Loci, und zwar D3S1358, VWA, FIBRA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 und D7S820 (AmpFISTR Profiler Plus Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt). Als Vergleichsmaterial, um eine Aussage zum qualitativen und quantitativen Chimärismus zu ermöglichen, wurde in der Regel vor Transplantation DNA aus mononukleären Blutzellen des Patienten isoliert, die auf gleiche Art wie oben beschrieben untersucht wurde. In den Fällen, in denen Vergleichsmaterial vor der Transplantation fehlte, wurde das STR-Muster des Patienten nachträglich aus DNA erstellt, die aus Haarwurzeln oder einem Mundschleimhautabstrich des Patienten nach Transplantation gewonnen wurde.

Tafel 7 zeigt ein Beispiel einer Chimärismusanalyse mittels STR-PCR.

Tafel 8 zeigte beispielhaft einen typischen Befundbericht einer Chimärismusanalyse mittels STR-PCR.

2.4.3. Definitionen

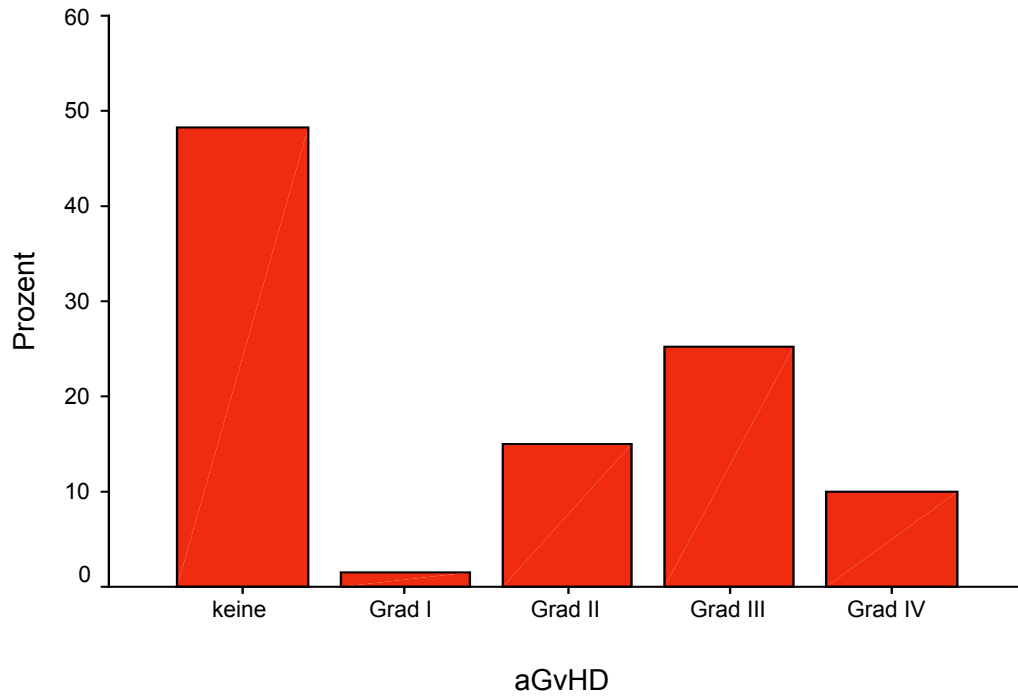
Die Chimärismusbestimmungen wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ durchgeführt. Ein kompletter Chimärismus lag definitionsgemäß vor, wenn nach gleichgeschlechtlicher Transplantation mittels STR-PCR nur noch DNA-Merkmale des Spenders nachweisbar waren bzw. nach gegengeschlechtlicher Transplantation ausschließlich Spenderkerne in der FISH-Auszählung gefunden wurden. Der quantitative Chimärismus wurde jeweils prozentual angegeben: Verhältnis Empfänger- zu Spendermerkmalen (PCR) bzw. Verhältnis Empfänger- zu Spenderkernen (FISH).

2.5. Datenauswertung

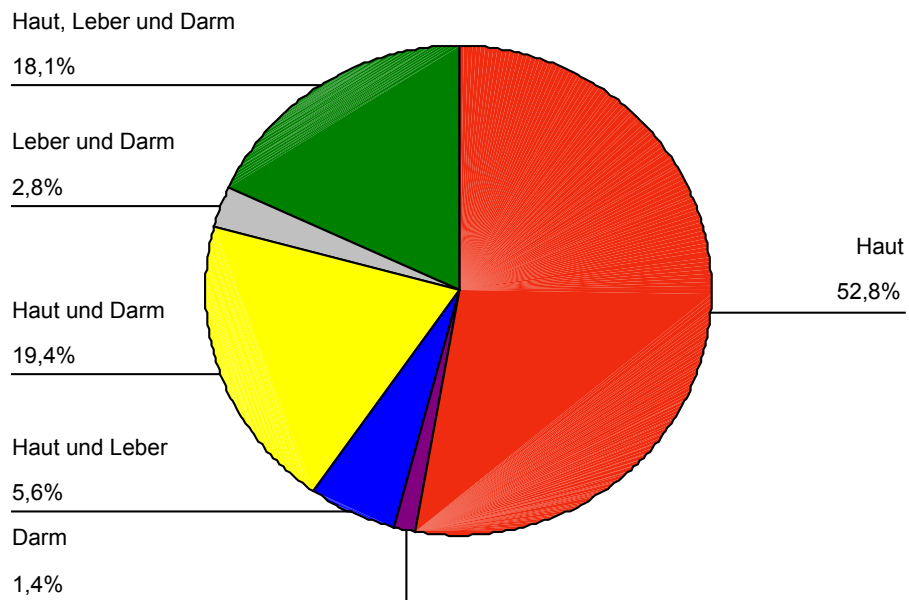
Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS für Windows (Version 10.0.5, SPSS Software GmbH, München) auf einer Workstation SCENIC CELSIUS 2000 P II Xenon 450 GX (Fa. Siemens Nixdorf AG, Kloten, Schweiz).

Alle Ergebnisse sind, falls nicht anders angegeben, als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Vergleiche von Mittelwerten zwischen 2 Gruppen wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Der Vergleich qualitativer Merkmale zwischen 2 Gruppen erfolgte mit dem Chi-Quadrat Test nach Pearson. Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben sind als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem log-rank Test analysiert. Alle p-Werte sind 2-seitig angegeben, als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ betrachtet.

Inzidenz der aGvHD (n=139)



Von aGvHD betroffene Organe (n=72)



Tafel 9: Akute Graft-versus-Host Erkrankung

3. Ergebnisse

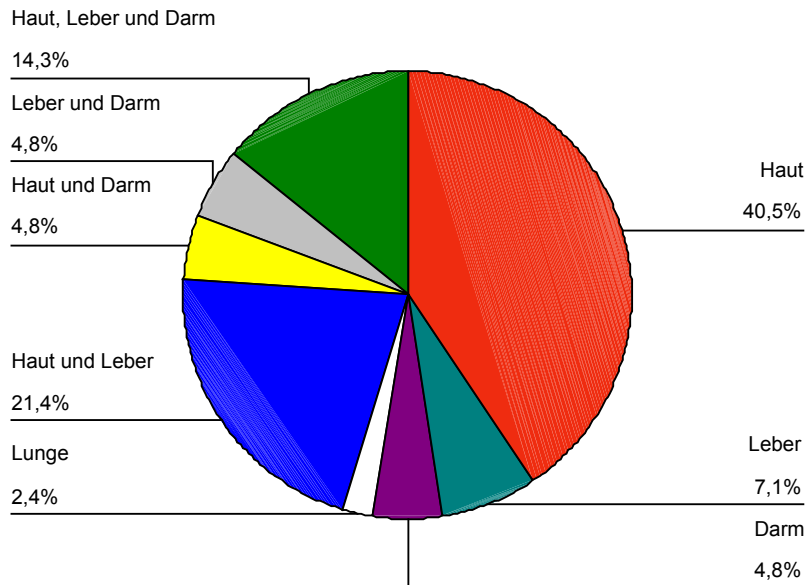
3.1. Patienten

Das untersuchte Kollektiv umfaßte insgesamt 139 Patienten. Wie Tafel 1 zeigt, unterzogen sich deutlich mehr Männer als Frauen einer Transplantation von Knochenmark oder Blutstammzellen (62,6% vs. 37,4%). Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Transplantation lag bei 42,7 Jahren. 79 Patienten erhielten ein Transplantat eines Familienspenders (56,8%), 60 hingegen das eines Fremdsponders (43,2%), wobei 116 Spender HLA-ident waren (83,5%) und 23 nicht-HLA-ident (16,5%). Als Stammzellquelle diente 81 mal peripheres Blut (58,3%) und 58 mal Knochenmark (41,7%). Die zugrundeliegenden Diagnosen und die Konditionierungsregime der 139 Patienten sind ebenfalls in Tafel 1 zusammengefaßt.

Der Tag des Engraftments (definitionsgemäß Leukozytenwerte $>1000/\mu\text{l}$) in der Posttransplantationsphase lag im Mittel bei Tag +18,6 (SD 7,9 Tage). Bei Patienten nach einer Transplantation peripherer Blutstammzellen war das Engraftment signifikant früher als bei den Patienten nach Knochenmarktransplantation (Stammzellen: MW 15,7, SD 5,2 vs. Knochenmark: MW 22,8, SD 9,0; $p<0,001$). Ähnliche Ergebnisse lieferten bereits andere Arbeitsgruppen (*Dreger et al. 2001*).

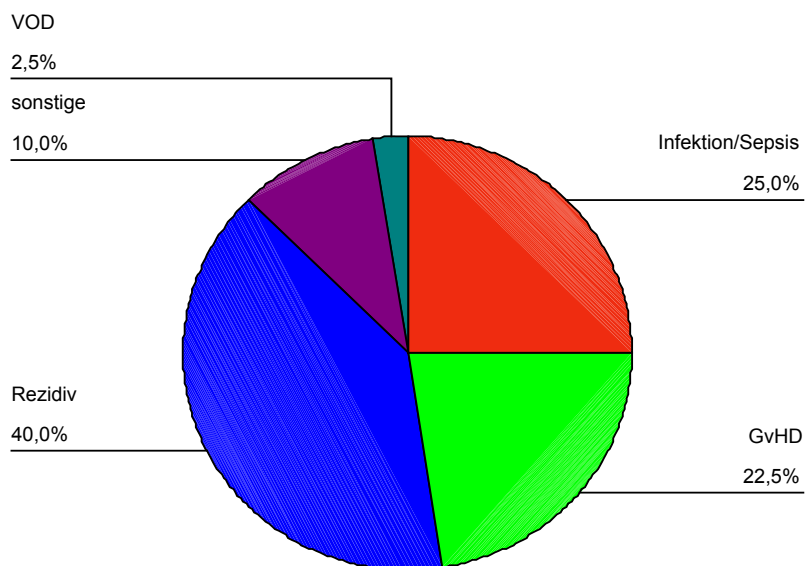
Eine akute Graft-versus-Host Reaktion wurde bei 72 Patienten beobachtet (aGvHD-Inzidenz: 51,8%). Die Verteilung der Schweregrade stellte sich wie folgt dar: 2 Patienten Grad I (2,8%), 21 Grad II (29,2%), 35 Grad III (48,6%) und 14 Grad IV (19,4%). Am häufigsten war die isolierte Haut-GvHD (52,8%), gefolgt von Haut/Darm (19,4%) und Haut/Leber/Darm (18,1%). Einen Überblick über Inzidenz und betroffene Organe der aGvHD gibt Tafel 9. Aufgetreten ist die aGvHD im Mittel um Tag +25 in der Posttransplantationsphase bis Tag +100 (MW 24,5, SD 14,8).

Von cGvHD betroffene Organe (n=42)



Tafel 10: Chronische Graft-versus-Host Erkrankung

zugrundeliegende Todesursachen (n=40)



Tafel 11: Zugrundeliegende/führende Todesursachen

Im Beobachtungszeitraum trat bei 42 von 125 Patienten eine chronische Graft-versus-Host Erkrankung auf (cGvHD-Inzidenz: 33,6%). 19 Patienten hatten eine milde cGvHD, wohingegen es bei 23 zu einer schweren chronischen Graft-versus-Host Reaktion kam. Auch hier war, wie bei der aGvHD, die isolierte Haut-GvHD am häufigsten (40,5%). Eine Übersicht über die von der cGvHD betroffenen Organe ist in Tafel 10 dargestellt. Bei 21 Patienten entwickelte sich die cGvHD aus einer aGvHD heraus, bei den anderen 21 trat die cGvHD de novo auf (= Neuauftreten einer Graft-versus-Host Reaktion nach Tag +100).

Bei 22 der 139 transplantierten Patienten wurde innerhalb des Beobachtungszeitraumes eine Rezidiv diagnostiziert (15,8%). Hierunter fielen sowohl hämatologische, zytogenetische als auch molekularbiologische Rezidive. Die Letalität bei Patienten, die ein Rezidiv ihrer Grunderkrankung erlitten, lag im Beobachtungszeitraum bei 72,7% (16 von 22 Patienten).

Von 139 Patienten verstarben 40 innerhalb des Beobachtungszeitraumes (28,8%). Die 3 Haupttodesursachen waren Rezidiv (40,0%), Infektion/Sepsis (25,0%) und Graft-versus-Host Erkrankung (22,5%) (siehe dazu auch Tafel 11).

	Mittelwert	Standardabweichung
Tag Dx post-KMT (n=115)	23,2	13,1
CD123⁺ DC am Dx Tag [%] (n=115)	0,43	0,51
CD11c⁺ DC am Dx Tag [%] (n=115)	0,75	0,97
Anzahl sortierte CD123⁺ DC (n=114)	11602	7674
Anzahl sortierte CD11c⁺ DC (n=40)	13740	8965

Tafel 12: **Dendritenchimärismus (Dx) beim Engraftment**

Die Chimärismusuntersuchungen wurden an insgesamt 115 Patienten im Mittel um Tag + 23 durchgeführt. Der prozentuale Dendritengehalt an den Leukozyten im peripheren Blut lag zu diesem Zeitpunkt bei 0,43% (DC2) bzw. 0,75% (DC1). Im Durchschnitt wurden 11602 HLA-DR⁺ lin1⁻ CD123⁺ Zellen bzw. 13740 HLA-DR⁺ lin1⁻ CD11c⁺ Zellen mittels Cellsorting isoliert, die dann den Chimärismusbestimmungen zugeführt wurden.

3.2. Kinetik des Dendritenchimärismus nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation

3.2.1. Dendritenchimärismus zum Zeitpunkt des Engraftments

Von den 139 Studienpatienten wurden bei 115 im Mittel um Tag + 23 Chimärismusuntersuchungen durchgeführt. Für die FISH Untersuchungen wurde ein Minimum von ca. 5000 Zellen benötigt, für die STR-PCR Untersuchungen ein Minimum von ca. 2000. Der Dendritengehalt an CD11c⁺ DC1 (MW 0,75%) im peripheren Blut am Tag der Chimärismusuntersuchung war signifikant höher als der der Subpopulation CD123⁺ DC2 (MW 0,43%, p<0,001). Entsprechend wurden für die jeweiligen Chimärismusbestimmung im Durchschnitt auch mehr DC1 (13740 Zellen) als DC2 (11602 Zellen) sortiert (siehe Tafel 12). Von den 115 Patienten wurden 57 in FISH- und 58 in STR-PCR-Technik untersucht.

Bei 114 Patienten wurden nach einer Transplantation hämatopoetischer Zellen mittels Cellsorting die CD123⁺ DC2 isoliert. Bei 112 Patienten war es möglich, eine aussagefähige Chimärismusuntersuchung durchzuführen, 2 Patientenproben waren aufgrund des zu geringen DNA-Gehaltes der Proben nicht auswertbar. Von den 112 untersuchten Patienten zeigten 89 (79,5%) einen kompletten Chimärismus hinsichtlich der DC2 des peripheren Blutes, 20 (17,9%) waren gemischt chimär und bei 3 Patienten (2,6%) war nach Transplantation kein Chimärismus nachweisbar.

CD11c⁺ DC1 wurden bei 40 Patienten isoliert. Zwei Patienten waren nicht auswertbar, so daß bei dieser Population Chimärismusergebnisse von insgesamt 38 Patienten vorliegen. Davon zeigten sich 29 (76,3%) komplett chimär, 8 Patienten (21,0%) wiesen einen gemischten DC1 Chimärismus im peripheren Blut auf und eine Patientin (2,7%) zeigte in der durchgeführten FISH-Untersuchung nur weibliche Zellen, hier war kein Chimärismus nachweisbar.

	DC1 (n=38)	DC2 (n=112)
komplett chimär	29 (76,3%)	89 (79,5%)
gemischt chimär	8 (21,0%)	20 (17,9%)
kein Chimärismus	1 (2,7%)	3 (2,6%)

	Mittelwert	Standardabweichung
Anteile [%] eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem Chimärismus DC1	6,2	8,7
Anteile [%] eigener Merkmale/Zellen bei gemischtem Chimärismus DC2	8,2	13,4

Tafel 13: Qualitativer und quantitativer Chimärismus von dendritischen Zellen im peripheren Blut beim Engraftment

Die obere Tabelle gibt einen Überblick über die Chimärismusergebnisse in den beiden Subpopulationen DC1 (CD11c⁺) und DC2 (CD123⁺).

Die untere Tabelle zeigt die prozentualen Anteile von eigenen Merkmalen (STR-PCR) bzw. eigenen Zellen (FISH) in den beiden Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit gemischtem Dendritenchimärismus.

Zur quantitativen Chimärismusbestimmung bei gemischt chimären Patienten wurde der prozentuale Anteil eigener Merkmale am DNA-Gehalt der Probe (bei STR-PCR Technik) bzw. eigener Zellen an den gesamt ausgezählten Zellen (bei FISH-Technik) berechnet. Bei den 8 Patienten, die in der Subpopulation DC1 gemischt chimär waren, lag der Anteil eigener Merkmale/Zellen im Mittel bei 6,2% (SD 8,7). Die 20 Patienten mit gemischtem DC2 Chimärismus zeigten im Durchschnitt einen Anteil eigener Merkmale/Zellen von 8,2% (SD 13,4).

Bei insgesamt 36 Patienten wurde beim Engraftment sowohl der DC1 als auch der DC2 Chimärismus analysiert. 25 Patienten (69,4%) zeigten hier eine kompletten Chimärismus in beiden Subpopulationen, 5 Patienten (13,9%) waren in beiden Subpopulationen gemischt chimär, 3 Patienten (8,3%) in den DC1 gemischt und in den DC2 komplett chimär, 2 Patienten (5,6%) in den DC1 komplett und in den DC2 gemischt chimär und eine Patientin (2,8%) wies in beiden Subpopulationen keinen Chimärismus auf.

3.2.2. Dendritenchimärismus 6 Monate nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation

Um Kinetik und Verlauf des Dendritenchimärismus nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation beurteilen zu können, wurden Chimärismusanalysen nicht nur beim Engraftment, sondern auch 6 und 12 Monate nach Transplantation durchgeführt. Die deutlich geringeren Fallzahlen als beim Engraftment hatten verschiedene Ursachen: Unzureichende Anzahl an dendritischen Zellen im peripheren Blut wegen einer cGvHD und/oder der Gabe von Prednisolon (*Pihusch et al. 2001*), Tod vor Tag +180 und Probleme Material von Patienten zu erhalten, die sich der Nachsorge der Transplantationsambulanz der Medizinischen Klinik III (Klinikum der Universität München - Großhadern) entzogen.

	DC1(6 M) (n=20)	DC2 (6 M) (n=50)	DC1 (12 M) (n=16)	DC2 (12 M) (n=22)
komplett chimär	18 (90%)	48 (96%)	15 (93,8%)	22 (100%)
gemischt chimär	1 (5%)	1 (2%)	1 (6,2%)	0
kein Chimärismus	1 (5%)	1 (2%)	0	0

Tafel 14: **Chimärismusanalysen 6 und 12 Monate (M) nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die jeweiligen Chimärismusergebnisse in den Subpopulationen DC1 (CD11c⁺) und DC2 (CD123⁺) 6 und 12 Monate nach Transplantation.

Bei 54 Patienten wurden im Mittel am Tag +191 (SD 37,4 Tage) dendritische Zellen aus dem peripheren Blut isoliert. Der Gehalt an CD11c⁺ DC1 im peripheren Blut war auch hier wieder signifikant höher als der an CD123⁺ DC2 (MW 0,18 vs. MW 0,087, p<0,001). Für die jeweiligen Chimärismusuntersuchungen wurden im Durchschnitt 12489 HLA-DR⁺ lin1⁻ CD11c⁺ Zellen (SD 10173) bzw. 9558 HLA-DR⁺ lin1⁻ CD123⁺ Zellen (SD 5333) mittels Cellsorting direkt aus dem peripheren Blut der Patienten isoliert. Von den 54 Patienten wurden 21 in FISH- und 33 in STR-PCR-Technik untersucht.

Die Ergebnisse des DC2 Chimärismus bei 50 Patienten teilten sich wie folgt auf: 48 komplett chimär (96%), 1 Patient (2%) gemischt chimär mit 7% eigenen Merkmalen in der STR-PCR Untersuchung und 1 Patientin (2%) zeigte in den DC2 am Tag +189 nach Knochenmarktransplantation ausschließlich weibliche Empfängerkerne. Bei den restlichen 4 Patienten konnte keine ausreichende Zahl dendritischer Zellen für eine Chimärismusuntersuchung gewonnen werden.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich beim DC1 Chimärismus (n=20): 18 Patienten komplett chimär (90%), 1 Patientin (5%) gemischt chimär mit 1 weiblichen Zellkern in der FISH-Analyse von 101 Zellen und 1 Patientin (5%) zeigte (wie auch in den DC2) am Tag +189 nach Knochenmarktransplantation ausschließlich weibliche Kerne in der FISH-Untersuchung.

Bei 19 Patienten wurde 6 Monate nach Transplantation sowohl der DC1 als auch der DC2 Chimärismus bestimmt. DC1 und DC2 Chimärismus waren beide komplett bei 16 Patienten (84,2%), 1 Patientin (5,3%) war in den DC1 gemischt chimär und in den DC2 komplett chimär, 1 Patient (5,3%) in den DC1 komplett und in den DC2 gemischt chimär und bei 1 Patientin (5,3%) lag in beiden Subpopulationen kein Chimärismus vor.

3.2.3. Dendritenchimärismus 12 Monate nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation

Dendritische Zellen wurden bei 25 Patienten im Mittel um Tag +366 (SD 48,4 Tage) aus dem peripheren Blut isoliert. Auch zu diesem Zeitpunkt war der Gehalt des peripheren Blutes an DC1 signifikant höher als an DC2 (MW 0,19 vs. MW 0,088, $p=0,001$). Im Durchschnitt wurden 11602 HLA-DR⁺ lin1⁻ CD11c⁺ Zellen (SD 5862) bzw. 8642 HLA-DR⁺ lin1⁻ CD123⁺ Zellen (SD 4053) sortiert. Von den 25 Chimärismusuntersuchungen 12 Monate nach Transplantation wurden 10 mittels FISH- und 15 mittels STR-PCR-Technik analysiert.

In den CD123⁺ DC2 waren 22 von 22 Patienten komplett chimär (100%). 3 Patienten waren nicht auswertbar, weil sich aus den sortierten Zellen kein ausreichender DNA-Gehalt für eine STR-PCR isolieren lies, bzw. nicht genügend Zellen für eine FISH-Untersuchung gewonnen werden konnten. Von den CD11c⁺ DC1 konnte bei 16 von 20 sortierten Patienten eine Chimärismusbestimmung erfolgen. Hier waren alle bis auf eine Patientin komplett chimär (93,8%). Diese Patientin mit gemischtem DC1 Chimärismus zeigte am Tag +412 nach Knochenmarktransplantation in der FISH-Untersuchung 2 Empfängerinnenkerne und 600 Spenderkerne (0,33% eigene Zellen).

Bei 16 Patienten wurden 12 Monate nach Transplantation sowohl DC1 als auch DC2 Chimärismen untersucht. 15 Patienten waren in beiden Populationen komplett chimär (93,8%), eine Patientin war nur in der DC2-Population komplett chimär, wohingegen die DC1-Population gemischt chimär war (0,33% eigene Zellen).

3.2.4. Verlauf des Dendritenchimärismus im ersten Jahr nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation

Von den 89 Patienten, die beim Engraftment in den DC2 einen kompletten Chimärismus auswiesen, wurden 23 Patienten 6 Monate nach Transplantation erneut untersucht. Bei 22 zeigte sich weiterhin ein kompletter DC2 Chimärismus, bei einer Patientin wurden in der FISH-Untersuchung nur eigene Zellen gefunden. Alle 14 Patienten, die nach 12 Monaten ein weiteres Mal analysiert wurden, hatten einen kompletten DC2 Chimärismus. Von 20 Patienten, die beim Engraftment in den DC2

gemischt chimär waren, wurden 7 Patienten nach 6 Monaten nachuntersucht, die zu diesem Zeitpunkt alle einen stabilen kompletten DC2 Chimärismus aufwiesen. Nach einem Jahr wurden 2 dieser 20 Patienten nochmals untersucht, auch hier zeigte sich bei beiden ein stabiler kompletter DC2 Chimärismus. Zudem wurde am Tag +70 eine Patientin nachuntersucht, bei der sich am Engraftment nur eigene Merkmale in der PCR-Reaktion fanden. Auch hier hatte sich 70 Tage nach Transplantation ein kompletter DC2 Chimärismus etabliert.

In den DC1 waren beim Engraftment 29 Patienten komplett chimär. Ein Patient wurde 6 Monate nach Transplantation nachuntersucht, hier zeigte sich ein weiterhin bestehender kompletter Chimärismus. Von den gemischt chimären Patienten konnte innerhalb des Beobachtungszeitraumes kein Patient im Verlauf untersucht werden. Die Patientin ohne Chimärismus in den DC1 beim Engraftment verstarb bereits am Tag +58 an einer generalisierten cerebralen Thrombosierung bei Verdacht auf Mikroangiopathie.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe A (CC DCI)</i> n = 29 (100%)	<i>Gruppe B (MC DCI)</i> n = 8 (100%)	<i>p</i>
Stammzellquelle			
KMT	13 (44,8%)	1 (12,5%)	0,095 ^a
PBSCT	16 (55,2%)	7 (87,5%)	
Spender			
verwandt	17 (58,6%)	5 (62,5%)	0,84 ^a
unverwandt	12 (41,4%)	3 (37,5%)	
HLA-ident	21 (72,4%)	5 (62,5%)	0,59 ^a
nicht-HLA-ident	8 (27,6%)	3 (37,5%)	
Grundkrankheit			
Akute Leukämien	16 (80%)	6 (100%)	0,23 ^a
Chronische Leukämien	4 (20%)	0 (0%)	
Myeloische Leukämien	13 (65%)	6 (100%)	0,09 ^a
Lymphatische Leukämien	7 (35%)	0 (0%)	
Konditionierung			
myeloablativ	9 (31,0%)	0 (0%)	0,07 ^a
nicht-myeloablativ	20 (69,0%)	8 (100%)	
Tag Engraftment	20,1	17,1	0,26 ^b
Transplantationsoutcome			
Rezidiv ^d	6 (20,7%)	2 (25,0%)	0,69 ^c
Tod ^d	9 (31,0%)	4 (50,0%)	0,17 ^c

akute GvHD			
Inzidenz	16 (55,2%)	6 (75,0%)	0,31 ^a
Tag aGvHD	21,2	21,3	0,97 ^b
mild (Grad I+II)	7 (43,8%)	2 (33,3%)	0,66 ^a
schwer (Grad III+IV)	9 (56,3%)	4 (66,7%)	
chronische GvHD			
Inzidenz	10 (38,5%)	2 (33,3%)	0,82 ^a
mild	4 (40,0%)	1 (50,0%)	0,79 ^a
schwer	6 (60,0%)	1 (50,0%)	

^a Chi-Quadrat Test nach Pearson, ^b t-Test für unabhängige Stichproben, ^c log-rank Test, ^d Anzahl der Patienten [%] mit Rezidiv / Tod innerhalb des Beobachtungszeitraums

Tafel 15: Einfluß des DC1 Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen

Gruppe A (CC=kompletter Chimärismus) und B (MC=gemischter Chimärismus) wurden auf statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bezüglich verschiedener klinischer Variablen untersucht.

Bei den Grunderkrankungen wurden jeweils die akuten (AML, ALL) mit den chronischen (CML, CLL) Leukämien verglichen, sowie myeloische Leukämien (AML, CML) mit denen der lymphatischen Reihe (ALL, CLL). Bei den Konditionierungsschemata wurden die myeloablativen Regime (alle Schemata mit 12 Gy TBI, sowie Busulfan-Protokolle) gegen die nicht-myeloablativen Regime (alle anderen Protokolle) auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht.

<i>Variable</i>	<i>Gruppe C (CC DC2)</i> n = 89 (100%)	<i>Gruppe D (MC DC2)</i> n = 20 (100%)	<i>p</i>
Stammzellquelle			
KMT	40 (44,9%)	6 (30,0%)	0,22 ^a
PBSCT	49 (55,1%)	14 (70,0%)	
Spender			
verwandt	53 (59,6%)	12 (60,0%)	0,97 ^a
unverwandt	36 (40,4%)	8 (40,0%)	
HLA-ident	74 (83,1%)	16 (80,0%)	0,74 ^a
nicht-HLA-ident	15 (16,9%)	4 (20,0%)	
Grundkrankheit			
Akute Leukämien	47 (70,1%)	7 (53,8%)	0,25 ^a
Chronische Leukämien	20 (29,9%)	6 (46,2%)	
Myeloische Leukämien	50 (74,6%)	10 (76,9%)	0,86 ^a
Lymphatische Leukämien	17 (25,4%)	3 (23,1%)	
Konditionierung			
myeloablativ	34 (38,2%)	4 (20,0%)	0,12 ^a
nicht-myeloablativ	55 (61,8%)	16 (80,0%)	
Tag Engraftment	19,0	16,7	0,20 ^b
Transplantationsoutcome			
Rezidiv ^d	14 (15,7%)	3 (15,0%)	0,99 ^c
Tod ^d	27 (30,3%)	7 (35,0%)	0,64 ^c

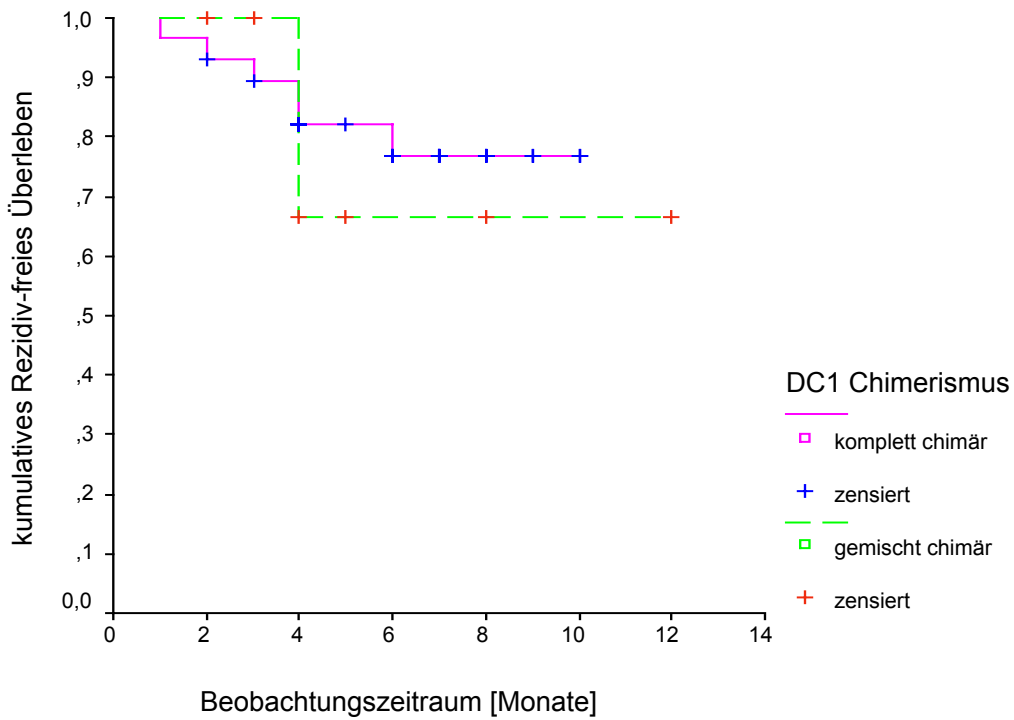
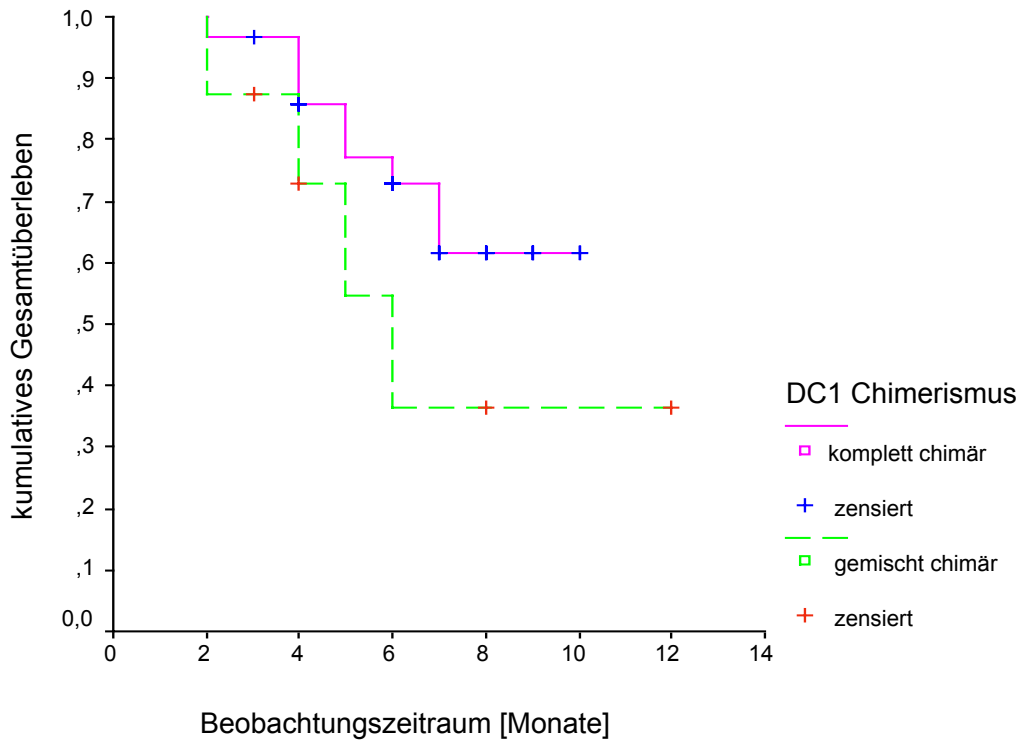
akute GvHD			
Inzidenz	43 (48,3%)	12 (60,0%)	0,35 ^a
Tag aGvHD	26,0	25,4	0,90 ^b
mild (Grad I+II)	12 (27,9%)	6 (50,0%)	0,15 ^a
schwer (Grad III+IV)	31 (72,1%)	6 (50,0%)	
chronische GvHD			
Inzidenz	25 (31,3%)	9 (56,3%)	0,056 ^a
mild	10 (40,0%)	6 (66,7%)	0,17 ^a
schwer	15 (60,0%)	3 (33,3%)	

^a Chi-Quadrat Test nach Pearson, ^b t-Test für unabhängige Stichproben, ^c log-rank Test, ^d Anzahl der Patienten [%] mit Rezidiv / Tod innerhalb des Beobachtungszeitraums

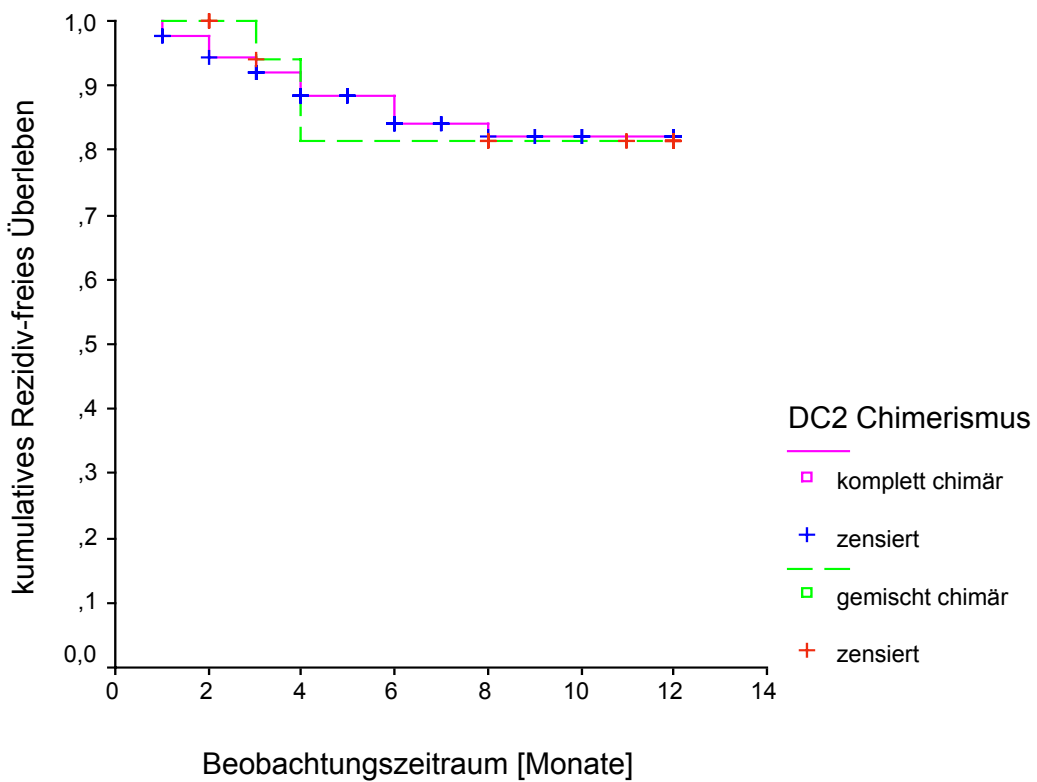
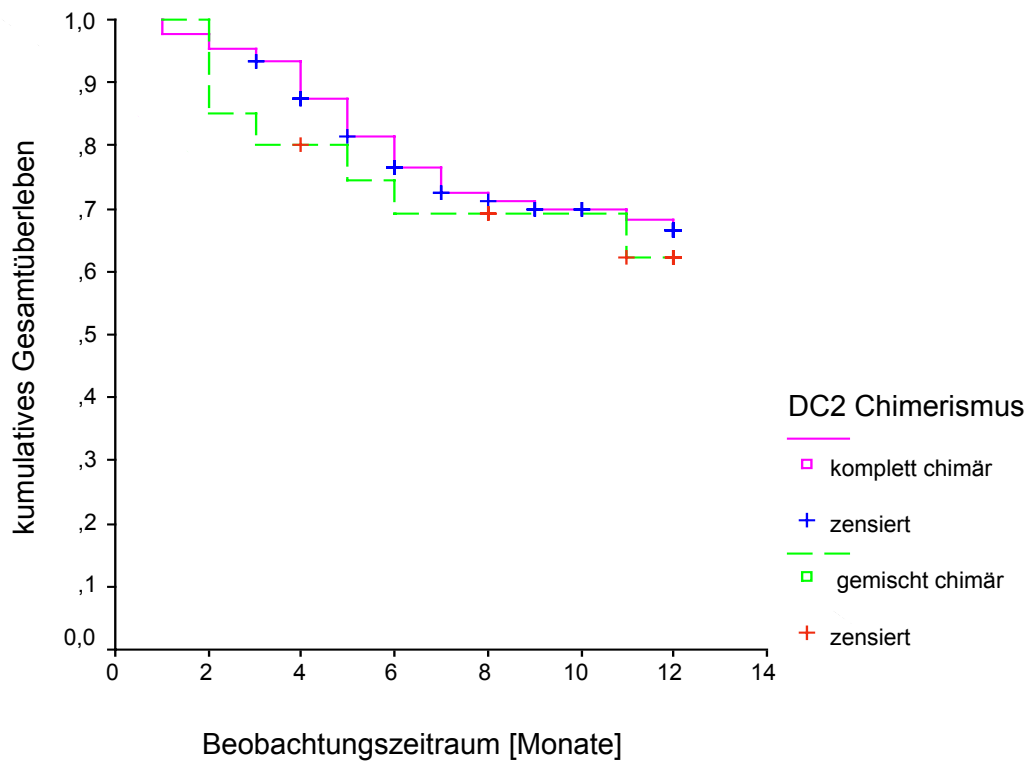
Tafel 16: **Einfluß des DC2 Chimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen**

Gruppe C (CC=kompletter Chimärismus) und D (MC=gemischter Chimärismus) wurden auf statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bezüglich verschiedener klinischer Variablen untersucht.

Bei den Grunderkrankungen wurden jeweils die akuten (AML, ALL) mit den chronischen (CML, CLL) Leukämien verglichen, sowie myeloische Leukämien (AML, CML) mit denen der lymphatischen Reihe (ALL, CLL). Bei den Konditionierungsschemata wurden die myeloablativen Regime (alle Schemata mit 12 Gy TBI, sowie Busulfan-Protokolle) gegen die nicht-myeloablativen Regime (alle anderen Protokolle) auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht.



Tafel 17: Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben in Gruppe A und B



Tafel 18: Gesamtüberleben und Rezidiv-freies Überleben in Gruppe C und D

3.3. Einfluß des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation

Um den Einfluß des Dendritenchimärismus beim Engraftment auf verschiedene klinische Variablen zu untersuchen, wurden die Patienten in 4 Gruppen unterteilt: Kompletter DC1 Chimärismus (Gruppe A) - gemischter DC1 Chimärismus (Gruppe B), kompletter DC2 Chimärismus (Gruppe C) - gemischter DC2 Chimärismus (Gruppe D). Die Patienten, die hinsichtlich ihrer DC im peripheren Blut keinen Chimärismus zeigten, werden - aufgrund der geringen Fallzahl - gesondert betrachtet. Ebenso eigens analysiert werden die Patienten 6 und 12 Monate nach Transplantation, da in dieser Gruppe nur insgesamt 3 gemischt chimäre Patienten gefunden wurden.

3.3.1. Chimärismus der Population DC1

Gruppe A und B wurden auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich verschiedener Variablen hin untersucht. In Gruppe A erhielten von 29 Patienten 13 Knochenmark, wohingegen in Gruppe B nur einer von 8 Patienten Knochenmark als Stammzellquelle hatte (44,8% vs. 12,5%, $p=0,095$). Bezüglich der Art des Spenders (verwandt/unverwandt, HLA-ident/nicht-HLA-ident) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit kompletten (A) und der mit gemischtem (B) DC1 Chimärismus (vergleiche Tafel 15). Bei den zugrundeliegenden Grunderkrankungen wurden akute mit chronischen und myeloische mit lymphatischen Leukämien verglichen. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (akut vs. chronisch: $p=0,23$, myeloisch vs. lymphatisch: $p=0,09$). Auffallend war, daß in Gruppe B bei den Leukämien ausschließlich Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) vertreten waren. Alle 8 Patienten in Gruppe B unterzogen sich vor Transplantation einer nicht-myeloablativen Konditionierung, in Gruppe A waren es 20 von 29 (69% (A) vs. 100% (B), $p=0,07$). Der Tag des

Engraftments (Leukozyten $>1000/\mu\text{l}$) lag in Gruppe A im Mittel bei Tag +20, bei Gruppe B um Tag +17 (20,1 vs. 17,1, $p=0,26$). Das Gesamtüberleben und das Rezidiv-freie Überleben sind in Tafel 17 dargestellt. In Gruppe A hatten von 29 Patienten 6 innerhalb des Beobachtungszeitraumes ein Rezidiv, in Gruppe B waren es 2 von 8 Patienten (20,7% vs. 25,0%, $p=0,69$). Auch beim Gesamtüberleben gab es zwischen den beiden Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied (69% (A) vs. 50% (B), $p=0,17$).

Die Inzidenz der aGvHD lag in Gruppe A niedriger als in Gruppe B (55,2% vs. 75,0%, $p=0,31$). Die Diagnose einer akuten Graft-versus-Host Reaktion wurde sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B im Mittel um Tag +21 gestellt (21,2 vs. 21,3, $p=0,97$). Im Hinblick auf den Schweregrad der aGvHD ergaben sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Von 16 Patienten mit aGvHD in Gruppe A hatten 7 (43,8%) eine milde (Grad I+II) und 9 Patienten (56,3%) eine schwere (Grad III+IV) Graft-versus-Host Erkrankung. In Gruppe B wurde bei 2 Patienten (33,3%) eine milde aGvHD diagnostiziert, bei 4 (66,7%) ein schwerer klinischer Verlauf. Auch bei der cGvHD-Inzidenz gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen A und B (38,5% vs. 33,3%, $p=0,82$). Von den 10 Patienten mit cGvHD in Gruppe A hatten 4 eine milde Verlaufsform, wohingegen es bei 6 zu einer schweren chronischen Graft-versus-Host Reaktion kam. In Gruppe B entwickelte ein Patient im Beobachtungszeitraum eine milde cGvHD, einer eine schwere cGvHD.

3.3.2. Chimärismus der Population DC2

Von 89 Patienten in Gruppe C (kompletter DC2 Chimärismus) hatten 40 Patienten (44,9%) Knochenmark als Stammzellquelle und 49 Patienten (55,1%) periphere Blutstammzellen. In Gruppe D (gemischter DC2 Chimärismus) erhielten 6 von 20 (30%) Patienten Knochenmark, 14 (70%) periphere Blutstammzellen ($p=0,22$). Auch beim DC2 Chimärismus ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Spendermerkmale (Familien-oder Fremdspender, HLA-ident) zwischen den beiden Gruppen finden (siehe Tafel 16). Keine statistisch signifikanten Differenzen gab es ebenfalls bei den Grunderkrankungen akute/chronische und myeloische/lymphatische

Leukämie (vergleiche dazu Tafel 16). In Gruppe C unterzogen sich 34 Patienten (38,2%) einer myeloablativen Konditionierung, 55 (61,8%) wurden mit einem nicht-myeloablativen Schema behandelt. In Gruppe D waren es 4 von 20 (20%), die ein myeloablatives Protokoll erhielten und 16 Patienten (80%) mit nicht-myeloablativem Konditionierungsschema ($p=0,12$). Der Tag des Engraftments (Leukozyten $>1000/\mu\text{l}$) lag in Gruppe C etwas später als in Gruppe D (19,0 vs. 16,7, $p=0,20$). Sowohl beim Rezidiv (15,7% (C) vs. 15,0% (D), $p=0,99$), als auch beim Gesamtüberleben (69,7% (C) vs. 65,0% (D), $p=0,64$) gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen innerhalb des Beobachtungszeitraumes (siehe auch Tafel 16 und 18).

Die Inzidenz der aGvHD war in Gruppe C niedriger als in Gruppe D (48,3% vs. 60,0%, $p=0,35$). In beiden Gruppen wurde die akute Graft-versus-Host Reaktion um Tag +26 diagnostiziert (26,0 (C) vs. 25,4 (D), $p=0,90$). Neben der geringeren Inzidenz der akuten Graft-versus-Host Erkrankung in Gruppe C zeigte sich hier klinisch aber ein ausgeprägter Schweregrad (27,9% milde aGvHD, 72,1% schwere aGvHD) im Vergleich zu Gruppe D (50% milde aGvHD, 50% schwere aGvHD) ($p=0,15$). Auch bei der cGvHD wies die Gruppe D eine höhere Inzidenz auf (31,3% vs. 56,3%, $p=0,056$). Wie bei der akuten Graft-versus-Host Reaktion kam es auch hier in der Gruppe mit niedrigerer GvHD-Inzidenz (Gruppe C) zu einem ausgeprägteren Schweregrad bei den aufgetretenen Erkrankungen. Von den 25 Patienten mit einer cGvHD in Gruppe C hatten 15 (60%) eine schwere Verlaufsform, wohingegen es in Gruppe D nur bei 3 von 9 (33,3%) Patienten mit cGvHD zu einem klinisch schweren Verlauf kam ($p=0,17$).

3.3.3. Patienten ohne DC Chimärismus beim Engraftment

Bei 3 Patienten ergab die DC Chimärismusanalyse beim Engraftment keinen Chimärismus, d.h. es wurden nach Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen nur eigenen Merkmale (STR-PCR) bzw. eigene Interphasekerne (FISH) in den dendritischen Zellen des peripheren Blutes gefunden.

Ein Patient (CLL, 4 Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT) wurden am Tag +21 in der STR-PCR Untersuchung aus 16000 CD123⁺ Zellen nur eigene Merkmale gefunden. Das Knochenmark zeigte am Tag +80 ebenso wie das periphere Blut am Tag +148 einen gemischten Chimärismus. Auch die zweimalig untersuchten CD3⁺ T-Zellen waren jeweils gemischt chimär (Tag +92 und +250). Klinisch traten innerhalb des Beobachtungszeitraumes weder eine akute noch eine chronische GvHD auf. Sechs Wochen nach PBSCT waren im peripheren Blut weiterhin CLL-Zellen detektierbar. Aktuell ist der Patient in kompletter Remission.

Die zweite Patientin (AML, 12 Gy TBI-Cyclo-ATG, Fremdspender mit HLA-DRQ-1 Mismatch, KMT) ohne Chimärismus beim Engraftment zeigte in der FISH Untersuchung am Tag +21 in beiden Subpopulationen (DC1 und DC2) je 100 weibliche Kerne. In der am gleichen Tag durchgeführten Chimärismusuntersuchung des peripheren Blutes zeigten sich 100 männliche Spenderkerne. Am Tag +18 trat eine aGvHD Grad III der Haut auf, die Patientin verstarb am Tag +58 an einer generalisierten cerebralen Thrombosierung bei V.a. Mikroangiopathie. Sie war bis zu ihrem Tod in kompletter hämatologischer Remission.

Die dritte Patientin (ALL, Flu-AraC-Amsa · 4 Gy TBI-Cyclo-ATG, HLA-identer Familienspender, PBSCT) erhielt am Tag +29 wegen einer persistierenden Panzytopenie erneut periphere Blutstammzellen des HLA-identen Familienspenders. Am Tag +41 (nach 1. PBSCT) waren in 18000 CD123⁺ Zellen nur eigene Merkmale nachweisbar (STR-PCR). Das Knochenmark und die CD3⁺ T-Zellen waren am Tag +64 komplett chimär. In einer Kontrolluntersuchung am Tag +99 waren nun auch die CD123⁺ DC2 komplett chimär. Klinisch trat weder eine akute noch eine chronische Graft-versus-Host Reaktion auf, ein Rezidiv der ALL wurde am Tag +173 diagnostiziert, am dem die Patientin am Tag +195 verstarb.

3.3.4. DC Chimärismus 6 und 12 Monate nach Transplantation

Von den 18 Patienten mit komplettem DC1 Chimärismus 6 Monate nach Transplantation hatten 13 Patienten zum Zeitpunkt der Chimärismusuntersuchung keine cGvHD, 2 Patienten eine milde und 3 eine schwere chronische Graft-versus-Host Reaktion. Alle 18 Patienten waren in Vollremission. Bei den 48 Patienten mit komplettem DC2 Chimärismus nach 6 Monaten zeigten 37 zum Zeitpunkt der Chimärismusuntersuchung keine Zeichen einer chronischen Graft-versus-Host Erkrankung, 7 Patienten litten an einer milden cGvHD und bei 4 kam es zu einem schweren klinischen Verlauf der cGvHD. Auch hier waren alle der 48 untersuchten Patienten 6 Monate nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation in kompletter Remission.

Von 15 Patienten mit komplettem DC1 Chimärismus, die 12 Monate nach Transplantation nochmals nachuntersucht wurden, waren bei 10 Patienten keine cGvHD-Zeichen erkennbar, 2 hatten zum Zeitpunkt der Chimärismusuntersuchung eine milde und 3 eine schwere chronische Graft-versus-Host Reaktion. Alle 15 waren in kompletter Remission. 21 der 22 Patienten mit kompletten DC2 Chimärismus waren 12 Monate nach Transplantation in kompletter Remission, bei einer Patientin war zum Zeitpunkt der Chimärismusanalyse ein Rezidiv ihres Plasmozytoms bereits bekannt. 14 der Patienten mit kompletten DC2 Chimärismus zeigten keine cGvHD, bei 4 Patienten wurde eine milde und bei den 4 anderen eine schwere cGvHD diagnostiziert.

In der Gruppe der Patienten, die 6 und 12 Monate nach ihrer Transplantation nochmals untersucht wurden, waren 3 Patienten mit einem gemischten Dendritenchimärismus. Eine Patientin (CML, 8 Gy TBI-Flu-Cyclo-ATG) zeigte am Tag +286 in der FISH Untersuchung einen kompletten DC2 Chimärismus (120 Spenderkerne) und einen gemischten DC1 Chimärismus (1 Empfängerinnenkern unter 100 Spenderkernen). Das periphere Blut wies am selben Tag einen kompletten Spenderchimärismus auf. In der Nachuntersuchung am Tag +340 waren alle Chimärismen komplett (DC1, DC2, peripheres Blut). Die Patientin zeigte in den Chimärismusuntersuchungen beim Engraftment bereits einen gemischten Chimärismus (DC2: 5 eigene/150 fremde Zellen, peripheres Blut: 4 eigene/96 fremde

Zellen). Klinisch war die Patientin immer in kompletter Remission, es trat im gesamten Beobachtungszeitraum weder eine akute noch eine chronische Graft-versus-Host Erkrankung auf.

Ein weiterer Patient (MDS, Flu-AraC-Amsa · 4 Gy TBI-Cyclo-ATG) war am Tag +153 in den DC1 komplett chimär, in den DC2 hingegen wurden in einer STR-PCR aus 10000 Zellen 7% eigene Merkmale detektiert. Knochenmark (Tag +96 und +356) und T-Zellen (Tag +177) waren immer komplett chimär. Am Tag +11 trat eine aGvHD II der Haut auf, zum Zeitpunkt der Chimärismusanalyse am Tag +153 litt der Patient an einer milden cGvHD von Haut und Leber. Er war immer in kompletter Remission.

Bei einer anderen Patientin (AML, Flu-AraC-Amsa · 4 Gy TBI-Cyclo-ATG) konnten selbst mehr als ein Jahr nach Knochenmarktransplantation noch eigene dendritische Zellen im peripheren Blut gefunden werden. Am Tag +412 waren die DC2 komplett chimär, jedoch wurden unter 602 ausgezählten DC1 in der FISH-Untersuchung auch 2 eigene weibliche Kerne nachgewiesen. Am selben Tag war das periphere Blut komplett chimär. Die vorangegangenen Chimärismusanalysen beim Engraftment (Tag +28) und 6 Monate nach Transplantation (Tag +196) ergaben jeweils einen kompletten DC2 Chimärismus. Klinisch trat nach Transplantation eine akute Haut-GvHD Grad II auf, die in eine milde chronische GvHD der Haut überging. Die Patientin war innerhalb des Beobachtungszeitraumes immer in Vollremission.

Zudem gab es eine Patientin (ALL, 12 Gy TBI-VP) bei der in der Chimärismusuntersuchung dendritischer Zellen des peripheren Blutes am Tag +189 nur eigene Zellen gefunden wurden. Sowohl die DC1 (50 eigen/0 fremd) als auch die DC2 (20 eigen/0 fremd) wiesen keinen Chimärismus auf. Eine Chimärismusbestimmung des peripheren Blutes am Tag +152 ergab einen kompletten Chimärismus. Die Ergebnisse der Chimärismusanalysen, die beim Engraftment durchgeführt wurden, waren wie folgt: DC2 komplett chimär (Tag +15), T-Zellen gemischt chimär (Tag +34) mit 22 eigenen von 100 ausgezählten Kernen, Knochenmark gemischt chimär am Tag +29 (5 eigen/110 fremd). Klinisch trat am Tag +11 eine akute GvHD der Haut (Grad III) auf. Innerhalb des gesamten

Beobachtungszeitraumes von 7 Monaten ergab sich kein Hinweis für eine chronische Graft-versus-Host Reaktion oder für ein Rezidiv der ALL.

3.3.5. Patienten mit Unterschieden im DC1 und DC2 Chimärismus

Unter den Chimärismusbestimmungen beim Engraftment gab es 5 von 36 Patienten (13,9 %), die Unterschiede zwischen den Subpopulationen DC1 und DC2 zeigten.

In der Chimärismusanalyse eines Patienten mit Multiplem Myelom fanden sich an Tag +19 in den DC1 zwei Empfänger- bei 300 Spenderzellen, in den DC2 hingegen lag ein kompletter Chimärismus vor. Als Komplikation der Transplantation trat eine drittgradige aGvHD von Haut und Darm auf, zudem entwickelte der Patient eine schwere chronische Graft-versus-Host Erkrankung von Leber und Darm, an der er am Tag +129 verstarb.

Bei der zweiten Patientin (AML) zeigte sich ebenfalls ein gemischter DC1 Chimärismus (5 eigen/500 fremd) bei komplettem DC2 Chimärismus (am Tag +23). Auch hier kam es zu einer akuten Graft-versus-Host Reaktion Grad III der Haut (ab Tag +16).

Der umgekehrte Fall wurde bei einer ALL-Patientin diagnostiziert. Die FISH-Analyse am Tag +18 zeigte neben einem kompletten DC1 Chimärismus (0 eigen/500 fremd) einen gemischten DC2 Chimärismus (1 eigen/500 fremd). Auch der T-Zellchimärismus war bei dieser Patientin gemischt chimär (Tag +29: 13 eigen/88 fremd). Am Tag +16 trat eine akute Haut-GvHD (Grad II) auf, und im Verlauf entwickelte die Patientin eine milde chronische GvHD von Leber und Darm.

Eine vierte Patientin (AML) zeigte ebenfalls Unterschiede im Chimärismus der Subpopulationen DC1 und DC2, bei ihr kam es jedoch zu keiner Graft-versus-Host Erkrankung. Bereits am Tag +12 wurde ein gemischter DC1 Chimärismus (1 eigen/500 fremd) bei komplettem DC2 Chimärismus im peripheren Blut festgestellt. Die Patientin verstarb am Tag + 168 an einer Sepsis.

Bei einer anderen AML-Patientin kam es weder zu einer akuten noch zu einer chronischen GvHD. Die Chimärismusbestimmung am Tag +14 ergab bei ihr einen

kompletten DC1 Chimärismus und einen gemischten DC2 Chimärismus (1 eigen/200 fremd). Knochenmark und T-Zellen waren am Tag +29 beide komplett chimär.

Alle 5 Patienten mit unterschiedlichen Ergebnissen im DC1 und DC2 Chimärismus waren innerhalb des Beobachtungszeitraumes im kompletter Remission. Auch bei den Chimärismusanalysen 6 und 12 Monate nach Transplantation fanden sich gemischt chimäre Patienten, die jeweils in der anderen Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut komplett chimär waren. Diese 3 Patienten wurden bereits ausführlich unter 3.3.4. beschrieben.

4. Diskussion

Über den Chimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation existieren in der Literatur nur äußerst limitierte Daten. In der bisher einzigen Publikation zu diesem Thema zeigten Auffermann-Gretzinger et al. (2002) die rasche Etablierung eines Dendritenchimärismus nach Transplantation bei 19 Patienten, konnten aber, vor allem aufgrund der geringen Fallzahl und einer niedrigen GvHD-Inzidenz im untersuchten Patientenkollektiv, keine Aussage zum Einfluß des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf nach Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen treffen.

Schwerpunkte unserer Studie waren zum einen die Kinetik des Chimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut, sowie der Einfluß des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf und das Gesamtüberleben nach Transplantation.

4.1. Kinetik des Dendritenchimärismus

Unsere Daten zeigen, daß bei der überwiegenden Anzahl der Patienten beim Engraftment (im Mittel um Tag +23) sowohl in der Subpopulation DC1 (n=38) als auch in der Subpopulation DC2 (n=112) bereits ein kompletter Spenderchimärismus etabliert ist. Bei den restlichen Patienten wurde ein gemischter Chimärismus im peripheren Blut gefunden, und nur ein geringer Anteil der untersuchten Patienten wies keinen Chimärismus auf (*DC1*: 2,7%, *DC2*: 2,6%). Bei den quantitativen Chimärismusbestimmungen hingegen zeigte sich ein inhomogenes Bild. Die Anteile eigener Merkmale (STR-PCR) bzw. eigener Zellen (FISH) in den Chimärismusanalysen variierten von 0,2% bis hin zu 50,0%.

In der Verlaufsbeobachtung der Patienten war zu erkennen, daß sich, bis auf wenige Ausnahmen, bei fast allen Patienten im Laufe des ersten Jahres nach Transplantation im peripheren Blut ein stabiler kompletter Dendritenchimärismus einstellte. Hier waren, wie zum Zeitpunkt des Engraftments, keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen DC1 und DC2 erkennbar (vergleiche dazu auch Tafel 14). Von den Patienten, die am Engraftment in den DC2 gemischt chimär waren (n=20) wurde bei allen 7 Patienten, die 6 Monaten nach Transplantation nochmals nachuntersucht wurden, ein nun stabiler kompletter DC2 Chimärismus detektiert. Bei diesen Patienten verschwanden folglich in den ersten 6 Monaten im Posttransplantationsverlauf die beim Engraftment detektierten Empfänger-DC2 aus dem peripheren Blut. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, daß es sich bei diesen Zellen noch um residuale Dendriten des Empfängers handelte, die im Rahmen des natürlichen Turnovers aus dem peripheren Blut verschwanden. Denkbar wäre aber auch, daß diese Empfänger-DC im Rahmen einer Graft-versus-Host bzw. Graft-versus-Leukämie Reaktion (*Horowitz et al. 1990*) durch alloreaktive T-Zellen des Spenders eliminiert wurden.

Aus unseren Untersuchungen zur Kinetik des Dendritenchimärismus läßt sich schließen, daß sich in-vivo bereits ab ca. 2-3 Wochen nach Transplantation dendritische Zellen de novo aus Vorläuferzellen des Spenders entwickeln können. Diese Beobachtungen korrelieren mit in-vitro Daten, die zeigen, daß die Generierung von DC aus CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen unter optimalen Bedingungen ungefähr 14 Tage benötigt (*Caux et al. 1992*). Somit kommt es nicht nur nach autologer Stammzelltransplantation (*Galy et al. 2000, Damiani et al. 2002*) zu einer raschen Rekonstitution von Subpopulationen dendritischen Zellen im peripheren Blut, sondern auch nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation zeigt sich beim Engraftment eine schnelle Rekonstitution dendritischer Zellen (siehe Tafel 12) und bei der Mehrzahl der Patienten besteht bereits wenige Wochen nach Transplantation ein kompletter Spenderchimärismus im peripheren Blut.

4.2. Einfluß des Dendritenchimärismus auf den klinischen Verlauf

Die klinische Bedeutung des Dendritenchimärismus nach Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen wird vor allem vor dem Hintergrund der immunologischen Funktion dendritischer Zellen interessant. Als potente Antigen-präsentierende Zellen sind sie maßgeblich in die Aktivierung von T-Zell Antworten involviert (*Gueromonprez et al. 2002*), die als Effektorzellen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Graft-versus-Host Erkrankung einnehmen und zudem auch an der therapeutisch erwünschten Graft-versus-Leukämie Reaktion beteiligt sind.

4.2.1. DC1 Chimärismus

Einen Überblick zum Vergleich von Gruppe A (CC DC1) mit Gruppe B (MC DC1) gibt Tafel 15. Auffällig war, daß bei den zugrundeliegenden Erkrankungen in Gruppe B ausschließlich Patienten mit AML vertreten waren. Alle Patienten mit einem vorangegangenen myeloablativen Konditionierungsschema zeigten nach Transplantation einen kompletten DC1 Chimärismus, bei den nicht-myeloablativen Protokollen zeigte die Mehrheit der Patienten (71,4%) einen kompletten DC1 Chimärismus, 28,6% wiesen einem gemischten DC1 Chimärismus im peripheren Blut auf. Unsere Daten zeigen eine ähnliche Tendenz wie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Frassoni et al. (1990) berichten, daß Patienten mit persistierender Empfängerhämatopoese nach Transplantation signifikant geringere Dosen an TBI erhielten, Leuween et al. (1994) berichteten über ähnliche Beobachtungen bei 53 pädiatrischen Leukämiepatienten. Beim Transplantationsoutcome (Beobachtungszeitraum 1 Jahr) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit komplettem und gemischtem DC1 Chimärismus zum Zeitpunkt des Engraftments, wobei in Gruppe B die Tendenz zu einer erhöhten Mortalität besteht. Offensichtlich bestätigen sich auch beim Dendritenchimärismus die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (*Schattenberg et al. 1989, Berthas et al. 1991, Choi et al. 2000*), wonach ein gemischter hämatopoetischer Chimärismus nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Inzidenz von Rezidiven vergesellschaftet ist.

In unsere Studie hatten Patienten in Gruppe B (MC DC1) eine höhere aGvHD-Inzidenz bei zugleich etwas ausgeprägterem Schweregrad im Vergleich zur Gruppe A. Auch beim Zusammenhang GvHD und Chimärismus gibt es, ähnlich wie beim Einfluß des Chimärismus auf die Rezidivinzidenz, keine eindeutige Datenlage. In der Studie von Frassoni et al. (1990) fand sich in der Gruppe mit komplettem hämatopoetischen Gesamtchimärismus sowohl eine signifikant höhere Inzidenz als auch ein ausgeprägter Schweregrad von akuter und chronischer GvHD im Vergleich zu Patienten mit gemischtem Gesamtchimärismus. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre, daß im Rahmen einer ablaufenden Graft-versus-Host Reaktion auch immunologische Reaktionen der alloreaktiven Spender T-Zellen gegen hämatopoetische Zellen des Empfängers und damit auch gegen die hämatologische Neoplasie auftreten (GvL-Effekte), die zu einer Eliminierung der persistierenden Empfängerzellen beitragen und somit zu einem kompletten Spenderchimärismus führen. Die Chimärismusanalysen wurden hier aber nicht wie in unserer Studie prospektiv bereits zum Zeitpunkt des Engraftments, sondern zu variablen Zeitpunkten nach Knochenmarktransplantation durchgeführt. Leuween et al. (1994) wiederum fanden in ihren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit komplettem und gemischtem Gesamtchimärismus bezüglich des Auftretens einer Graft-versus-Host Erkrankung.

Bei der chronischen Graft-versus-Host Erkrankung ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sowohl bezüglich Inzidenz als auch Schweregrad der cGvHD. Der DC1 Chimärismus beim Engraftment scheint also, anhand unserer Daten, keinen Einfluß auf die spätere Entwicklung einer cGvHD zu haben. In der Literatur existieren Berichte, wonach eine chronische Graft-versus-Host Erkrankung möglicherweise mit einem kompletten Spenderchimärismus in beiden Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut assoziiert sein soll (*Clark et al. 2001*), wobei in dieser Studie an 17 Patienten die Chimärismusbestimmungen nicht am Engraftment, sondern erst bei bestehender cGvHD durchgeführt wurden.

4.2.2. DC2 Chimärismus

Wie in Tafel 16 aufgeführt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppe C (CC DC2) und Gruppe D (MC DC2) was die Stammzellquelle und die Spenderdaten betrifft. Ebenso scheint die Grunderkrankung keinen Einfluß auf das Ergebnis des DC2 Chimärismus nach Transplantation zu nehmen. Bei den Konditionierungsregimen zeigt sich eine ähnliche Tendenz wie bereits beim DC1 Chimärismus. In der Gruppe mit gemischtem DC2 Chimärismus fanden sich deutlich mehr Patienten mit nicht-myeloablativer Konditionierung als in der Gruppe mit komplettem DC2 Chimärismus (61,8% vs. 80,0%, $p=0,12$). Der Tag des Engraftments (Leukozyten $> 1000/\mu\text{l}$) lag in Gruppe D etwas mehr als 2 Tage früher als in Gruppe C. Auch der DC2 Chimärismus am Engraftment scheint nicht mit dem Transplantationsoutcome (Rezidiv und Tod, Beobachtungszeitraum 1 Jahr) assoziiert zu sein.

Die akute Graft-versus-Host Erkrankung war in Gruppe D häufiger als in Gruppe C, wobei bei Patienten mit aGvHD und komplettem DC2 Chimärismus klinisch häufiger schwerere Verläufe auftraten als bei aGvHD Patienten, die beim Engraftment im peripheren Blut einen gemischten DC2 Chimärismus aufwiesen (schwere aGvHD: 72,1% (C) vs. 50,0% (D), $p=0,15$). Ähnliche Ergebnisse brachten die Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Graft-versus-Host Erkrankung. Auch hier zeigte sich eine höhere Inzidenz in Gruppe D ($p=0,056$) bei zugleich schwereren Verläufen von cGvHD Patienten in Gruppe C ($p=0,17$). Ebenso wie unsere Ergebnisse beim DC1 Chimärismus stimmen auch die des DC2 Chimärismus nicht mit den Beobachtungen von Clark et al. (2001) überein, die über eine mögliche Assoziation von chronischer Graft-versus-Host Erkrankung mit einem kompletten Chimärismus in Subpopulationen dendritischer Zellen berichtet haben. Eine mögliche Ursache für diese Differenzen liegt eventuell im Analysezeitpunkt, an dem die jeweiligen Chimärismusuntersuchungen durchgeführt wurden. In der Studie von Clark et al. (2001) wurden die Chimärismusbestimmungen erst bei bestehender cGvHD und nicht, wie in unserer Studie, bereits zum Zeitpunkt des Engraftments durchgeführt.

4.2.3. Einzelkasuistiken

Drei Patienten wiesen bei der Bestimmung des Dendritenchimärismus am Engraftment keinen Chimärismus auf (Details siehe 3.3.3.) Die Regeneration dendritischer Zellen erfolgte nach Transplantation ausschließlich aus Zellen des Empfängers. Zwei dieser Patienten unterzogen sich im Vorfeld der Transplantation einer nicht-myeloablativen Konditionierung, bei beiden trat im Beobachtungszeitraum weder eine akute noch eine chronische GvHD auf. Trotz eines fehlenden DC Chimärismus beim Engraftment waren zwei der drei Patienten während des gesamten Beobachtungszeitraumes in kompletter Remission. Bei einer Patientin zeigte eine Kontrolluntersuchung einen kompletten DC2 Chimärismus am Tag +99, sie verstarb am Tag +173 an einem Rezidiv ihrer ALL. Bei ihr wandelte sich innerhalb von 58 Tagen der Chimärismus von ausschließlich eigenen Merkmalen in den DC2 hin zu einem kompletten Spenderchimärismus. Eine theoretische Erklärung für diese Chimärismusergebnisse ist schwierig. Am ehesten denkbar wäre, daß es in diesem Zeitraum im Rahmen eines Turnovers möglich war, alle Empfängerzellen durch Spenderzellen zu ersetzen, zumindest was die von uns detektierten DC im peripheren Blut betrifft. Ob dies nun auch auf die dendritischen Zellen in den einzelnen Geweben übertragbar ist bleibt unklar. Eine GvH/GvL-Reaktion als Erklärung für diese Beobachtungen ist eher unwahrscheinlich, zum einen ist der Zeitrahmen relativ kurz, zum anderen trat klinisch weder eine akute noch eine chronische Graft-versus-Host Erkrankung auf und die Patientin verstarb an einem Rezidiv ihrer Grunderkrankung.

Interessanterweise zeigen diese Patienten ohne DC Chimärismus im peripheren Blut nicht nur verschiedenste klinische Verläufe, auch in den einzelnen Chimärismusanalysen hämatopoetischer Zellen gab es deutliche Unterschiede. So war bei einer Patientin hinsichtlich ihrer DC2 kein Chimärismus detektierbar, die im Verlauf durchgeführten Untersuchungen von Knochenmark, peripherem Blut und CD3⁺ T-Zellen zeigten jedoch immer einen stabilen gemischten Chimärismus. Bei einer anderen Patientin stand dem fehlenden Chimärismus in den Subpopulationen DC1 und DC2 ein kompletter Chimärismus in der am gleichen Tag durchgeführten Chimärismusbestimmung des peripheren Blutes gegenüber. Diese Beobachtungen

sind wahrscheinlich nur dadurch erklärbar, daß dendritischen Zellen einen so geringen Anteil an den mononukleären Zellen des peripheren Blutes einnehmen (in der Regel <1% der Leukozyten), daß diese gravierenden Unterschiede bei der Auszählung von nur je 100 Kernen in der FISH-Untersuchung peripherer Leukozyten auftreten können.

Zudem wird anhand unserer Studie deutlich, daß es durchaus auch möglich ist, daß sich die Ergebnisse der Chimärismusanalysen in den beiden Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut unterscheiden können (vergleiche 3.3.5.). Bei fünf Patienten war dies zum Zeitpunkt des Engraftments der Fall, es war jedoch keine eindeutige Tendenz erkennbar, daß diese Beobachtung mit dem klinischen Verlauf korrelierte, vor allem in Hinblick auf die Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung.

4.2.4. Dendritische Zellen und GvH / GvL Reaktionen

DC-Chimärismus und aGvHD

An unseren Daten zeigt sich, daß ein gemischter Dendritenchimärismus im peripheren Blut womöglich mit einer erhöhten Inzidenz von Graft-versus-Host Erkrankungen assoziiert ist. Beim DC1 Chimärismus hat Gruppe B (MC DC1) eine höhere aGvHD-Inzidenz bei zugleich etwas ausgeprägterem Schweregrad der Erkrankung. Beim DC2 Chimärismus hat ebenfalls die Gruppe mit gemischtem Chimärismus eine erhöhte aGvHD-Inzidenz, wobei hier der ausgeprägtere Schweregrad der aGvHD in Gruppe C (CC DC2) zu finden ist.

Die theoretischen Grundlagen für diese klinischen Beobachtungen sind komplex. Als entscheidend erweist sich hier die Frage, welche dendritische Zellen, ob nun die des Empfängers oder die des Spenders, an der Initiierung einer Graft-versus-Host Erkrankung maßgeblich beteiligt sind. Aufgrund der aktuellen Literaturlage ist davon auszugehen, daß den Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers eine wichtige Rolle bei der GvHD Induktion zukommt (*Shlomchik et al. 1999, Teshima et al. 2002*). Dies stimmt mit unseren Daten überein, da bei Patienten mit residualen Empfänger-DC im peripheren Blut (und damit gemischtem DC Chimärismus) eine

erhöhte Inzidenz der aGvHD zu beobachten ist. Aber auch Patienten mit komplettem Spenderchimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut zeigen ein Auftreten akuter Graft-versus-Host Reaktionen. Dies könnte dadurch begründet sein, daß sich der Dendritenchimärismus in den einzelnen Geweben, dort wo die GvH-Reaktionen letztendlich ablaufen, möglicherweise von dem im peripheren Blut unterscheidet.

Jedoch existieren auch Studien, die indirekt eine Rolle der Spender-DC aufzeigen. Beruhend auf der Beobachtung, daß bei der allogenen Stammzelltransplantation im Vergleich zur Knochenmarktransplantation eine ca. 10-fache Anzahl an T-Zellen übertragen wird, es aber trotzdem weder zu einer erhöhten Inzidenz noch zu einem ausgeprägteren Schweregrad der aGvHD kommt, zeigten Pan et al. (1996), daß die G-CSF-Vorbehandlung von Spendermäusen zu einer Polarisierung der Spender T-Lymphozyten hin zu einer Typ-2-Zytokinproduktion und zu einem verminderten Schweregrad der experimentell ausgelösten aGvHD führt. Da T-Zellen keine G-CSF Rezeptoren exprimieren, war zunächst unklar, wie dieser Einfluß zu erklären ist. Aprinati et al. (1999) konnten schließlich nachweisen, daß die G-CSF-Behandlung des Spenders zur Mobilisierung peripherer Blutstammzellen zu einem selektiven Anstieg der DC2 im Spender führt und somit zur Induktion eines T2-Profiles in den Spender T-Lymphozyten beiträgt. Ähnliche Hinweise liefern die Beobachtungen von Tzolas et al. (2001), in deren Studie Patienten mit aGvHD signifikant mehr Spender-DC1 mit ihrem Stammzelltransplantat übertragen bekamen als Patienten ohne aGvHD. Daraus folgernd ist anzunehmen, daß auch die Spender-DC einen Einfluß auf die Entwicklung und Ausprägung einer Graft-versus-Host Reaktion nehmen können, wahrscheinlich am ehesten im Sinne einer immunmodulierenden Funktion.

Chimärismus in den DC-Subpopulationen

Ein weiterer Aspekt unserer Studie war die Untersuchung des Chimärismus der beiden Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut. Aufgrund ihrer funktionell unterschiedlichen Eigenschaften könnten DC1 und DC2 Chimärismus womöglich auch einen Einfluß auf die Entwicklung von Graft-versus-Host Reaktionen nehmen. DC1 induzieren in Interaktion mit T-Zellen eine T1-Differenzierung, DC2 hingegen eine T2-Differenzierung (*Rissoan et al. 1999*). Man

geht heute davon aus, daß die akute Graft-versus-Host Erkrankung wesentlich von T1-Zellen vermittelt wird, die über Zytokine wie IL-2 und INF- γ eine zytotoxische Reaktion stimulieren (*Krenger et al. 1997*). T2-Antworten hingegen scheinen eine eher protektive Rolle in der GvHD Pathogenese einzunehmen. Theoretisch wäre daraus ableitbar, daß die in Gruppe B (MC DC1) beobachtete erhöhte Inzidenz und Schwere von akuten Graft-versus-Host Erkrankungen teilweise durch Empfänger-DC1 vermittelt wird, da Patienten mit komplettem Spenderchimärismus sowohl eine geringere Inzidenz als auch eine etwas geringere Ausprägung der aGvHD zeigen. Beim DC2 Chimärismus hingegen stellt sich die Situation etwas anders dar. Hier hat Gruppe D (MC DC2) die höhere aGvHD-Inzidenz, folglich könnten hier Spender-DC2 zumindest zum Teil für eine antiinflammatorische und damit aGvHD-protective Funktion verantwortlich sein, die dann bei den gemischt chimären Patienten nicht so stark ausgeprägt wäre wie bei den komplett chimären. Dies wiederum stünde aber im Widerspruch zu dem beobachteten erhöhten Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit komplettem DC2 Chimärismus.

DC-Chimärismus und cGvHD

Bei der chronischen GvHD stellen sich, zumindest was den DC2 Chimärismus betrifft, die Verhältnisse ähnlich dar wie bei der aGvHD. Auch hier zeigt Gruppe D (MC DC2) eine erhöhte cGvHD-Inzidenz bei ausgeprägterem Schweregrad der cGvHD in Gruppe C (CC DC2). Der Zusammenhang zwischen DC2 und chronischer Graft-versus-Host Erkrankung ist vor allem deswegen interessant, da es Daten gibt, die eine Hyperaktivierung von Th2-Zellen bei cGvHD Patienten vermuten lassen (*De Wit et al. 1993*). Zudem zeigten Waller et al. (2001) in einer Studie an 113 Patienten, daß eine hohe Anzahl an CD3⁻ CD4^{bright} DC im Spenderknochenmark (entsprechen den von uns untersuchten CD123⁺ DC2 im peripheren Blut) beim Empfänger mit einer geringeren cGvHD-Inzidenz bei zugleich erhöhter Rezidivinzidenz einhergeht. Diese Daten würden in das theoretische Konstrukt passen, in dem die Spender-DC2 bei alloreaktiven Spender T-Zellen zu einer T2-Polarisierung führen, die über negative Feedbackmechanismen (zytokinvermittelt via IL-4 und IL-10) die zytotoxischen Reaktionen hemmt und somit zur verminderten cGvHD-Inzidenz führt.

Als Folge dieser abgeschwächten Graft-versus-Host Reaktion ist auch die erhöhte Rezidivinzidenz zu betrachten, da bei abgeschwächten GvH-Reaktionen auch gleichzeitig die GvL-Effekte vermindert sind.

Unsere Daten zur cGvHD-Inzidenz zeigen dasselbe. Ein kompletter Spenderchimärismus in den DC2 ist, aufgrund einer möglichen GvHD-protektiven Funktion der Spender DC2, mit einer geringeren cGvHD-Inzidenz in Gruppe C verknüpft. Nicht erklärt werden kann dadurch aber der ausgeprägtere Schweregrad der cGvHD in Gruppe C. Hier würde man, vor dem oben beschriebenen theoretischen Hintergrund, das umgekehrte Bild erwarten. Durch den kompletten Spenderchimärismus in den DC2 wäre in Gruppe C ein geringerer Schweregrad der cGvHD zu erwarten als in Gruppe D.

DC und GvL-Reaktionen

Dendritische Zellen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Induktion von Graft-versus-Leukämie Reaktionen, die wahrscheinlich ebenfalls einem T-Zell-vermitteltem Mechanismus unterliegen. Diese GvL Reaktion ist Grundlage der Rezidivtherapie mit Spender-Lymphozyten (DLI) bei Patienten nach einer Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen (Kolb et al. 1995). Auch bei der adoptiven Immuntherapie mittels DLI rücken mittlerweile Antigen-präsentierende Zellen in das wissenschaftliche Interesse. Mapara et al. (2002) zeigten im Mausmodell, daß die DLI Gabe bei Mäusen mit gemischtem hämatopoetischen Chimärismus zu einem deutlich verbesserten Leukämie-freiem Überleben führt als bei Mäusen mit komplettem hämatopoetischem Chimärismus. Durch die DLI 8 Wochen nach Knochenmarktransplantation kam es zudem zu einer Umwandlung des gemischten in einen kompletten Chimärismus, ohne das Auftreten einer GvHD. Ähnliche Ergebnisse lieferten bereits Kolb et al. (1997) im Hundemodell. Die Autoren dieser Studie folgerten daraus, daß der deutlich bessere GvL Effekt bei Mäusen mit gemischtem hämatopoetischen Chimärismus womöglich auf die Anwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers zurückzuführen ist, die durch Präsentation von Empfängerantigenen an Spender-Lymphozyten diesen Effekt bewirken.

Es ist durchaus denkbar, daß hier den dendritischen Zellen des Empfängers bei der Antigen-Präsentation eine entscheidene Rolle zukommt. Wie Kolb et al. (1995) verdeutlichten, ist das Ansprechen von DLI bei der CML am besten. Ansprechraten gab es auch bei der AML, bei ALL Patienten hingegen waren keine Erfolge dieser Therapie zu verzeichnen. Bereits damals wurde gemutmaß, daß möglicherweise bei den myeloischen Leukämien allogene Antigen-präsentierende Zellen leukämischen Ursprungs eine GvL Reaktion stimulieren und aufrechterhalten. Passend dazu sind auch die Daten einer Studie, in der nachgewiesen wurde, daß dendritische Zellen, die aus Vorläuferzellen von CML Patienten generiert wurden zu über 95% das Philadelphia-Chromosom (t 9;22) tragen und in-vitro in der Lage sind CML-spezifische zytotoxische T-Zell Antworten zu induzieren (*Eibl et al. 1997*). Es ist also durchaus denkbar, daß bei bestimmten Leukämieformen Antigen-präsentierende Zellen des Empfängers leukämischen Ursprungs in der Lage sind, spezifisch alloreaktive Spender T-Zellen zu aktivieren und somit einen wesentlichen Beitrag zur Induktion und Aufrechterhaltung einer GvL Reaktion leisten.

Unsere Daten zeigen weder beim DC1 noch beim DC2 Chimärismus einen Unterschied zwischen den Gruppen mit gemischtem und komplettem Chimärismus was die Rezidivinzidenz betrifft. Für die Rezidivrate, und damit auch indirekt für den GvL Effekt, spielt es also scheinbar keine Rolle, ob beim Engraftment noch dendritische Zellen des Empfängers im peripheren Blut vorhanden sind, oder ob bereits ein kompletter Spenderchimärismus etabliert ist. Interessant wäre aber sicherlich die Frage, ob der Chimärismus dendritischer Zellen im peripheren Blut, unmittelbar vor einer DLI bestimmt, einen Einfluß auf die Ansprechraten hat.

4.3. Ausblick

Die allogene Knochenmarktransplantation entwickelt sich weg von der reinen hochdosierten zytotoxischen Therapie hin zur Zell - und Immuntherapie. Die Toxizität der Konditionierung wird sich weiter reduzieren und der Graft-versus-Tumor Effekt wird in den Vordergrund treten (*Ferinstein et al. 2001*). Welche Rolle in diesem Kontext die nicht-myeloablative allogene Stammzelltransplantation spielen wird bleibt abzuwarten (*Spitzer 2000, Maris et al. 2001*).

Vor allem die spezifische Zell - und Immuntherapie und die Trennung von Graft-versus-Host Erkrankung und Graft-versus-Leukämie Reaktion werden große Herausforderungen der Zukunft sein. Hier gibt es bereits vielversprechende Ansätze. Die spezifische Immuntherapie basierend auf Minor-Histokompatibilitätsantigenen ist einer davon. Mit der Identifikation von mHAg, die nur auf hämatopoietischen Zelllinien inklusive leukämischer Zellen exprimiert werden (HA-1 und HA-2, *De Buerger et al. 1992*), gelang es schließlich auch ex-vivo zytotoxische T-Lymphozyten zu generieren, die spezifisch gegen diese mHAg gerichtet sind und somit eine Option für eine Immuntherapie für rezidivierte Leukämien darstellen (*Mutis et al. 1999*). Diese mHAg eröffnen in Zukunft vielleicht auch Möglichkeiten wie eine mHAg-basierte Spenderauswahl, eine Toleranzinduktion mittels mHAg und eine adoptive Immuntherapie mit der Möglichkeit der Separierung des GvL Effekts von der GvHD (*Gloumy et al. 1997*).

Weitere Ansätze für diese Trennung von GvHD und GvL sind immuntherapeutische Methoden, die an tumorspezifischen Antigenen (zum Beispiel bcr/abl bei der CML oder PML/RAR α bei der AML M3) sowie an überexprimierten Proteinen in leukämischen Vorläuferzellen (zum Beispiel Proteinase 3 oder das Wilms Tumor Supressor Protein) ansetzen (*Appelbaum 2001*). Hier können dendritische Zellen als Stimulatoren von zum Beispiel bcr/abl-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden, um eine spezifische zytotoxische Aktivität gegen die CML-Zellen zu erreichen (*Nieda et al. 1998*). Weitere untersuchte Optionen für die GvHD/GvL-Trennung sind zum einen die adoptive Immuntherapie mit DLI nachdem sich eine GvHD-Toleranz etabliert hat (*Johnson et al. 1995, Kolb et al. 1997, Wu et al. 2000*) und zum anderen eine Therapie mit Suizidgenen. Durch diese Form der Gentherapie

wird versucht, Effektorzellen auszuschalten, sobald sie andere Gewebe als die neoplastischen angreifen (*Kolb et al. 2001*). Auch hier gibt es bereits Studien, in denen es gelang, die GvHD auf diese Art zu kontrollieren bei gleichzeitig erhaltenen GvL Effekten (*Litvinova et al. 2002*).

Therapien mit dendritische Zellen rücken in Zukunft zunehmend in den Mittelpunkt therapeutischer Optionen, sei es nun als eine direkte Form der Zelltherapie oder aber auch als Angriffspunkt für therapeutische Manipulationen. Fujii et al. (2001) berichten über eine zelltherapeutische Behandlung mit allogenen dendritischen Zellen des Knochenmarkspenders bei Patienten, die nach Knochenmarktransplantation ein Rediziv ihrer hämatologischen Grunderkrankung erlitten. Diese wurden ex-vivo mit bestrahlten Tumorzellen des Spenders versetzt und dann zusammen mit geprimten T-Zellen des selben Spenders 4 Patienten infundiert. Klinisch zeigte sich, zumindest vorübergehend, ein objektives Ansprechen der Therapie ohne GvHD-Zeichen. Zudem gibt es Überlegungen, DC2 für immuntherapeutische Zwecke zu nutzen, wie zum Beispiel bei der Behandlung der Graft-versus-Host Erkrankung oder von Autoimmunerkrankungen (*Liu et al. 2000*). Hier könnte deren Th2-induzierende und damit möglicherweise antiinflammatorische Wirkung ebenso wie ihre Fähigkeit in der Interaktion mit T-Zellen Toleranz zu induzieren genutzt werden.

Neben dieser Zelltherapie mit DC kommen aber auch Optionen in Betracht, durch die versucht wird, das System der dendritischen Zellen therapeutisch zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, daß Campath (ein monoklonaler anti-CD52 Antikörper) vor Transplantation verabreicht, zu einer raschen in-vivo Depletion von dendritischen Zellen im peripheren Blut des Empfängers führt (*Klanginsirikul et al. 2002*). Möglicherweise ist dieser Einfluß auf die DC des Empfängers, neben den Effekten von Campath auf T-Zellen, ein weiterer therapeutischer Faktor der eine effektive aGvHD-Prophylaxe ermöglicht.

Auch ein weiteres Medikament, das ebenfalls zur GvHD-Prophylaxe eingesetzt wird, hat potentiell Einfluß auf die Entwicklung dendritischer Zellen. DC, die in Gegenwart von Tacrolimus (FK 506) aus CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen generiert werden, induzieren eine IL-4 produzierende CD4⁺ T-Zelllinie (*Shimizu et al. 2000*). Somit hat Tacrolimus möglicherweise nicht nur einen immunsuppressiven Effekt indem

es in die T-Zellfunktion eingreift, denkbar wäre auch, daß es über eine DC2-induzierende Wirkung einen antiinflammatorischen Effekt über T2-Zellen ausübt und dies zur GvHD-protectiven Wirkung beiträgt.

Vor dem Hintergrund dieser vielfältigen neuen therapeutischen Ansätze werden sicherlich auch die diagnostischen Chimärismusuntersuchungen an Bedeutung gewinnen. Hierbei stellt sich aber oft, wie auch bei unserer Studie, das Problem, daß die Untersuchungen nur die Verhältnisse im Blut, nicht aber den Chimärismus im Gewebe erfassen. Hier sind neue Ansätze und Techniken wünschenswert, um auch direkt im Gewebe Chimärismusbestimmungen durchführen zu können und somit Aufschluß über die Chimärismen in den betroffenen Geweben, wie zum Beispiel Haut, Leber oder Darm zu erhalten. Hessel et al. (1996) berichten in ihrer Studie über einen solchen Ansatz, der es erlaubt, mittels einer Kombination von Immunphänotypisierung und FISH den Chimärismus von Langerhans Zellen der Haut zu bestimmen. Hier zeigte sich bei jedem der 9 untersuchten Leukämiepatienten ein gemischter Chimärismus in den Langerhans Zellen, die quantitativen Chimärismusergebnisse variierten von 7%-92% Empfänger-Langerhans Zellen in den Chimärismusuntersuchungen unabhängig vom Analysezeitpunkt im Posttransplantationsverlauf (Tag +36 bis +1395).

In der Diagnostik werden vor allem die linienspezifischen Chimärismusanalysen von Leukozyten vermehrt zum Einsatz kommen, schwerpunktmäßig sicherlich an den Zellen, die eine wichtige Rolle im entsprechenden Pathomechanismus einer Erkrankung spielen (wie zum Beispiel T-Zellen und DC bei GvH-Reaktionen). Trotzdem gibt es bei Chimärismusbestimmungen immer noch das Problem einer einheitlichen Standardisierung, vor allem was Technik, Frequenz der Analysen nach Transplantation und die klinische Interpretation der Ergebnisse betrifft. Hier gibt es in letzter Zeit aber vermehrt Bemühungen internationale Leitlinien zu erarbeiten (*Antin et al. 2001, Lion et al. 2001*), um Standards zu kreieren, die eine Vergleichbarkeit der erhobenen Befunde erlauben.

5. Zusammenfassung

Für viele hämatologische Erkrankungen stellt die Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen den einzig kurativen Therapieansatz dar. Eine Vielzahl verschiedener Faktoren führen aber zu einer relativ hohen Morbidität und Mortalität bei dieser Behandlungsoption. Für die Diagnostik dieser Komplikationen im Posttransplantationsverlauf können unter anderem Chimärismusuntersuchungen eingesetzt werden. Vor allem die linienspezifischen Chimärismusbestimmungen an Leukozytensubpopulationen sind im Einzelnen noch nicht umfassend untersucht.

Wir konnten in unserer vorliegenden Studie zeigen, daß es bereits wenige Wochen nach der Transplantation allogener hämatopoetischer Zellen zu einer raschen Rekonstitution dendritischer Zellen im peripheren Blut kommt, und daß beim Großteil der Patienten bereits am Engraftment ein kompletter Spenderchimärismus in beiden Subpopulationen dendritischer Zellen etabliert ist.

Desweiteren konnten wir erstmals an dem bisher größten Patientenkollektiv den Einfluß des Chimärismus dendritischer Zellen des peripheren Blutes auf den klinischen Verlauf nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigten die Tendenz, daß ein gemischter Chimärismus dendritischer Zellen möglicherweise mit einer erhöhten GvHD-Inzidenz vergesellschaftet ist.

Vor allem deren fundamentale immunologische Funktionen rücken dendritische Zellen und deren Chimärismus in ein bedeutendes wissenschaftliches, aber auch klinisches Interesse. Weitere Studien über die funktionelle Biologie dendritischer Zellen, vor allem im Verlauf nach einer allogenen hämatopoetischen Zelltransplantation, werden helfen deren Funktion besser verstehen zu lernen. Bei den Chimärismusbestimmungen versprechen vor allem in-situ Untersuchungen von dendritischen Zellen in Empfängergewebe neue wissenschaftliche Erkenntnisse.

Auf dieser Grundlage bilden dendritische Zellen sicherlich auch einen bedeutenden Ansatzpunkt für immuntherapeutische Optionen, wo sich bereits heute vielversprechende Ansätze zeigen.

6. Literaturverzeichnis

- Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG, Pardoll DM (1998)** CD4⁺ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 187 (10): 1555-1564
- Anslinger K, Rolf B, Keil W (2001)** Evaluation and application of the AmpF/STR profiler plus PCR amplification kit in a Bavarian population sample. *Int J Legal Med* 114 (4-5): 278-280
- Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D (2001)** Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 tandem meeting. *Biol Blood Marrow Transplant* 7 (9): 473-485
- Appelbaum FR (2001)** Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 411: 385-389
- Aprinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C (2000)** Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95 (8): 2484-2490
- Auffermann-Gretzinger S, Lossos IS, Vayntrub TA, Leong W, Grumet FC, Blume KG, Stockerl-Goldstein KE, Levy R, Shizuru JA (2002)** Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 99 (4): 1442-1448
- Banchereau J, Steinman RM (1998)** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252
- Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D (1991)** Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 78 (11): 3103-3106
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J (1992)** GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261
- Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee SJ, Kim SH, Park CJ, Chi HS, Kim WK (2000)** Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia

after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 26: 327-332

Clark FJ, Freeman L, McMullan D, Simpson P, Mason J, McDonald F, Fews G, Mahendra P, Craddock C, Moss PA, Griffiths M, Chakraverty R (2001) Chronic graft versus host disease is associated with full donor chimerism in peripheral blood dendritic progenitor subsets. *Blood* 98 (11): 653a (Abstract #2741)

Damiani D, Stocchi R, Masolini P, Michelutti A, Sperotto A, Geromin A, Skert C, Cerno M, Michieli M, Baccarani M, Fanin R (2002) Dendritic cell recovery after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 30 (5): 261-266

De Bueger M, Bakker A, van Rood JJ, van der Woude F, Gloumy E (1992) Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. *J Immunol* 149 (5): 1788-1794

De Wit D, van Mechelen M, Zanin C, Doutrelepont JM, Velu T, Gerard C, Abramowicz D, Scheerlinck JP, De Baetselier P, Urbain J, et al. (1993) Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol* 150 (2): 361-366

Dreger P, Schmitz N (2001) Allogeneic transplantation of blood stem cells: Coming of age? *Ann Hematol* 80: 127-136

Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gadner H, Lion T (1999) Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 13: 2060-2069

Durnam DM, Anders KR, Fisher L, O'Quigley J, Bryant EM, Thomas ED (1989) Analysis of the origin of marrow cell in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in-situ hybridization assay. *Blood* 74 (6): 2220-2226

Eibl B, Ebner S, Duba C, Bock G, Romani N, Erdel M, Gachter A, Niederwieser D, Schuler G (1997) Dendritic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry the Philadelphia translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T-cell response. *Genes Chromosomes Cancer* 20 (3): 215-223

Fearnley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DNJ (1997) Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: Implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood* 89 (19): 3708-3716

- Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ (1999)** Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 93 (2): 728-736
- Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, Kruger W, Zabelina T, Dudina O, Finckenstein FG, Kroger N, Kabisch H, Hochhaus H, Zander AR (2001)** Real-time quantitative y chromosome-specific pcr (qycs-pcr) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 10 (3): 419-425
- Feinstein L, Sandmaier B, Maloney D, McSweeney PA, Maris M, Flowers C, Radich J, Little MT, Nash RA, Chauncey T, Woolfrey A, Georges G, Keim HP, Zaucha JM, Blume KG, Shizuru J, Niederwieser D, Storb R (2001)** Nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation: Replacing high-dose cytotoxic therapy by the graft-versus-tumor effect. *Ann N Y Acad Sci* 938: 328-337
- Ferrara JLM, Deeg HJ (1991)** Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324 (10): 667-674
- Frassoni F, Strada P, Sessarego M, Miceli S, Corvò R, Scarpati D, Vitale V, Piaggio G, Raffo MR, Songo G, Figari O, Bacigalupo A, Clavio M, Gualandi F, Soldá A, Marmont A, Reali G (1990)** Mixed chimerism after allogeneic marrow transplantation for leukemia: correlation with dose of total body irradiation and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 5: 235-240
- Fujii SI, Shimizu K, Fujimoto K, Kiyokawa T, Tsukamoto A, Sanada I, Kawano F (2001)** Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* 42 (3): 357-369
- Galy A, Rudraraju S, Baynes R, Klein J (2000)** Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets after autologous CD34⁺ cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25: 1249-1255
- Gloumy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JHF, Voosen J, Grathwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ (1996)** Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 334 (5): 281-285

- Gloumy E (1997)** Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 157: 125-140
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974)** Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 18: 295-304
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ (2001)** Acute graft-versus-host disease: Pathobiology and management. *Exp Hematol* 29 (3): 259-277
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002)** Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20: 621-667
- Gyger M, Baron C, Forest L, Lussier P, Lagacé F, Bissonnette I, Bélanger R, Bonny Y, Busque L, Roy DC, Perreault C (1998)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease. *Exp Hematol* 26: 426-434
- Hessel H, Mittermüller J, Zitzelsberger H, Weier HU, Bauchinger M (1996)** Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Histochem Cell Biol* 106: 481-485
- Hock BD, Starling GC, Daniel PB, Hart DNJ (1994)** Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. *Immunology* 83: 573-58
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM (1990)** Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75 (3): 555-562
- Johnson BD, Truitt RL (1995)** Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. *Blood* 85 (11): 3302-3312
- Keil W, Anslinger K, Wipper S, Rolf B (1999)** Evaluation of chimeric status following allogeneic bone marrow transplantation using short tandem repeats. *Progress in Forensic Genetics* 8: 567-569
- Klanginsirikul P, Carter GI, Byrne JL, Hale G, Russell NH (2002)** Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood* 99 (7): 2586-2591

- Kohrgruber N, Halanek N, Gröger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, Stingl G, Maurer D (1999)** Survival, maturation, and function of CD11c⁻ and CD11c⁺ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol* 163: 3250-3259
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermüller J, de Witte T, Holler E, Ansari H (1995)** Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86 (5): 2041-2050
- Kolb HJ, Günther W, Schumm M, Holler E, Wilmanns W, Thierfelder S (1997)** Adoptive immunotherapy in canine chimeras. *Transplantation* 63 (3): 430-436
- Kolb HJ, Mischak-Weissinger E (2001)** Zelltherapie hämatologischer Neoplasien. *Der Internist* 42: 1347-1385
- Krenger W, Snyder KM, Byon JCH, Falzarano G, Ferrara JLM (1995)** Polarized type 2 alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 155: 585-593
- Krenger W, Hill GF, Ferrara JLM (1997)** Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 64 (4): 553-558
- Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR (1984)** Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol* 56: 431-443
- van Leuween JEM, van Tol MJD, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJM, Khan PM, Vossen JM (1994)** Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 83 (10): 3059-3067
- Lion T (2001)** Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia* 15: 292
- Lion T (2001)** Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 15: 307-310

- Litvinova E, Maury S, Boyer O, Bruel S, Benard L, Boisserie G, Klatzmann D, Chohen JL (2002)** Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood* 100 (6): 2020-2025
- Liu J, Anderson BE, Robert ME, McNiff JM, Emerson SG, Shlomchik WD, Shlomchik MJ (2002)** Selective T-cell subset ablation demonstrates a role for T1 and T2 cells in ongoing acute graft-versus-host disease: a model for the reversal of disease. *Blood* 98 (12): 3367-3375
- Liu YJ, Blom B (2000)** Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy. *Blood* 95 (8): 2482-2483
- Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M (2002)** Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen presenting cells. *Blood* 100 (5): 1903-1909
- Maris M, Woolfrey A, McSweeney PA, Sandmaier BM, Nash RA, Georges G, Maloney DG, Molina A, Chauncey T, Yu C, Zaucha JM, Blume KG, Shizuru J, Niederwieser D, Storb R (2001)** Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation: transplantation for the 21st century. *Front Biosci* 6: G 13-16
- Mattson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O (2001)** T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 71 (3): 433-439
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DNJ (1995)** Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol* 25: 2064-2068
- Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Gloumy E (1999)** Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* 93 (7): 2336-2341
- Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, Kashiwase K, Taylor K, Suzuki K, Tadokoro K, Juji T (1998)** Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 91 (3): 977-983

- O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM (1997)** Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82: 487-493
- Olweus J, Bitmansour A, Warnke R, Thomson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F (1997)** Dendritic cell ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci* 94: 12551-12556
- Pan L, Delmonte J, Jalonon CK, Ferrara JLM (1996)** Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 86: 4422-4429
- Pihusch M, Böck S, Heller T, Schoch C, Haferlach T, Rolf B, Diem H, Pihusch R, Hiller E, Hiddemann W, Kolb HJ (2001)** Peripheral blood dendritic cells in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 98 (11): 204a (Abstract #851)
- Porter DL, Leonard D, Duffy KM, Shlomchik W, McDaid K, Laport GG, Luger S, Stadtmauer EA, Schuster S, Demuth W, Moore J, Emerson SG (2000)** Dendritic cell chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 96: 585a (Abstract #2511)
- Reddy V, Hill GR, Pan L, Gerbitz A, Teshima T, Brinson Y, Ferrara JLM (2000)** G-CSF modulates cytokine profile of dendritic cells and decreases acute graft-versus-host disease through effects on the donor rather than the recipient. *Transplantation* 69 (4): 691-693
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ (1999)** Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283: 1183-1186
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CDL (1997)** Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29: 2769-2778
- Schattenberg A, De Witte T, Salden M, Vet J, van Dijk B, Smeets D, Hoogenhout J, Haanen C (1989)** Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 73 (5): 1367-1372

- Shimizu K, Fujii S, Fujimoto K, Kawa K, Yamada A, Kawano F (2000)** Tacrolimus (FK506) treatment of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4⁺ T cells toward Th2 responses. *J Leukoc Biol* 68: 633-640
- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG (1999)** Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285: 412-415
- Spitzer TR (2000)** Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and the role of mixed chimerism. *The Oncologist* 5 (3): 215-223
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K (2000)** The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191 (3): 411-416
- Steinman RM, Nussenzweig MC (2002)** Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 99 (1): 351-358
- Stephoe RJ, Thomson AW (1996)** Dendritic cells and tolerance induction. *Clin Exp Immunol* 105: 397-402
- Tzolas AC, Devidas M, Iturrapse J, Boyette R, Sugrue M, Wingard JR, Reddy V (2001)** Type 1 dendritic cells (DC1) in allogeneic donor peripheral blood stem cell product are associated with an increase in acute graft-versus-host disease. *Blood* 98 (11): 203a (Abstract #849)
- Teshima T, Reddy P, Lowler KP, KuKuruga MA, Liu C, Cooke KR, Ferrara JLM (2002)** Ftl3 ligand therapy for recipients of allogeneic bone marrow transplants expands host CD8_α⁺ dendritic cells and reduces experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 99 (5): 1825-1832
- Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A (1999)** Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 23: 1055-1060
- Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G (2001)** Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 15: 293-302

Walker H, Singer CJR, Patterson J, Goldstone AH, Prentice HG (1986) The significance of host haematopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 62: 385-391

Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, Peel J, Lonial S, Langston A, Redei I, Jurickova I, Boyer MW (2001) Large number of CD4^{bright} dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 97 (10): 2948-2956

Wessman M, Ruutu T, Volin L, Knuutila S (1989) In situ hybridization using a Y-specific probe – a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 4 (3): 283-286

Wu BY, Guo KY, Song CY, Yang DA, Li D (2000) Mixed chimera converted into full donor chimera with powerful graft-versus-leukemia effects but no graft-versus-host disease after non T cell-depleted HLA-mismatched peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26: 691-693

7. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Dr. med. Markus Pihusch** (Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern) für die Überlassung des Themas und die langjährige hervorragende kompetente und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft war für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar.

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

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

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

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

8. Lebenslauf

- 7. Juni 1977** geboren in Landsberg am Lech als Sohn des Ehepaars Hubert und Elisabeth Böck
- 1983** Grundschule in Klosterlechfeld
- 1987** Leonhard-Wagner-Gymnasium Schwabmünchen
- Juni 1996** Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
- August 1996** Zivildienst im Städtischen Krankenhaus Schwabmünchen
- November 1997** Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- August 1999** Ärztliche Vorprüfung
- August 2000** Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- September 2000** Beginn der Dissertation im Cellsorting Labor (Dr. med. M. Pihusch) der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München - Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann)
- März 2003** Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- April 2004** Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- ab Mai 2004** Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München - Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann)
- seit Oktober 2004** Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München - Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann)

Famulaturen

Chirurgische Abteilung, Klinikum Landsberg am Lech
(Chefarzt: Dr. med. F. Ulrich)

Internistische Nothilfe, Klinikum der Universität München -
Großhadern (Leiter: Prof. Dr. med. U. Beuers)

Radiologische Gemeinschaftspraxis Dres. med. H. Schlösser,
C. Kiebach, G. M. Trenchel, Augsburg

II. Medizinische Klinik (Hämatologie, Onkologie und
Nephrologie) Zentralklinikum Augsburg (Chefarzt: Prof. Dr.
med. G. Schlimok)

Praktisches Jahr

Chirurgie:

Department of Surgery, Memorial Sloan-Kettering Cancer
Center, New York, USA (Chairman: M.F. Brennan, MD)

I. Chirurgische Klinik (Chefarzt: Prof. Dr. med. H.
Loeprecht), II. Chirurgische Klinik (Chefarzt: Prof. Dr. med.
J. Witte) und Herzchirurgische Klinik (Chefarzt: Prof. Dr.
med. M. Beyer), Zentralklinikum Augsburg

Innere Medizin:

Medizinische Klinik II (Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke)
und Medizinische Klinik III (Direktor: Prof. Dr. med. W.
Hiddemann), Klinikum der Universität München -
Großhadern

Anästhesie:

Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
(Chefarzt: Prof. Dr. med. H. Forst), Zentralklinikum
Augsburg