

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und  
Onkologie

**Vergleich der Immunrekonstitution nach CD3/CD19-depletierter  
und TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19-depletierter Stammzelltransplantation in  
pädiatrischen Patienten**

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

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

**vorgelegt von**

**Grimminger, Patricia**

**2017**

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der Disputation

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. R. Handgretinger

Professor Dr. G. Klein

05.10.2017

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
1 Einleitung .....	10
1.1 Stammzelltransplantation .....	10
1.2 Prinzip der allogenen Stammzelltransplantation.....	10
1.3 Spenderauswahl und HLA-System.....	13
1.4 Haploidente allogene Stammzelltransplantation.....	14
1.5 T-Zelldepletion (CD3/CD19 versus TCR $\alpha\beta^+$ /CD19).....	15
1.6 Immunrekonstitution nach haploidenter Stammzelltransplantation....	17
1.6.1 T-Zellrekonstitution .....	18
1.6.2 TRECs als Marker für Entstehung neuer T-Zellen.....	18
1.7 Fragestellung.....	21
2 Material .....	22
2.1 DNA-Isolation .....	22
2.2 QRT-PCR .....	22
2.3 Laborzubehör und Geräte.....	23
3 Methoden .....	25
3.1 Patientenkollektiv.....	25
3.2 Patientenproben .....	26
3.3 DNA-Isolation .....	27
3.4 Konzentrationsbestimmung und Konzentrierung des DNA-Gehalts ..	28
3.5 Quantitative Real time-PCR.....	28
3.5.1 Prinzip der quantitativen Real time-PCR (QRT-PCR).....	29

3.5.2	Verwendete Primer und Sonden.....	33
3.5.3	Versuchsprotokoll .....	33
4	Ergebnisse .....	36
4.1	TREC-Analyse der Patientenproben nach Transplantation .....	37
4.1.1	Verlauf der TREC-Werte in den Patienten.....	37
4.1.2	T <sub>min</sub> .....	57
4.1.3	Analyse T <sub>min</sub> in Abhängigkeit der Spenderprobe.....	58
4.2	Rekonstitution der einzelnen Zellreihen in Kombination .....	
	mit den gemessenen TREC-Ereignissen.....	59
4.2.1	Zeitlicher Verlauf der Rekonstitution der Zellreihen und .....	
	des TREC-Gehalts im Peripherblut der einzelnen Patienten .....	59
4.2.2	Leukozytenzahlen der zwei Untersuchungsgruppen .....	
	im Vergleich.....	73
4.2.3	CD3 <sup>+</sup> -Zellzahlen der zwei Untersuchungsgruppen im Vergleich ..	79
4.3	Betrachtung der TCRαβ <sup>+</sup> - und TCRγδ <sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf in .....	
	Gruppe B .....	84
5	Diskussion.....	85
6	Zusammenfassung.....	95
7	Literaturverzeichnis .....	97
8	Erklärung zum Eigenanteil .....	104

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CD-Antigene im Laufe der Lymphozytenreifung .....	11
Abbildung 2: TREC-Entstehung während des Gene Rearrangement .....	20
Abbildung 3: Funktionsprinzip der quantitativen Real-time PCR .....	30
Abbildung 4: Beispiel der graphischen Darstellung von Ct-Kurven .....	31
Abbildung 5: Standardkurve .....	32
Abbildung 6: TREC-Verlauf Patient 1A.....	38
Abbildung 7: TREC-Verlauf Patient 2A.....	39
Abbildung 8: TREC-Verlauf Patient 3A.....	40
Abbildung 9: TREC-Verlauf Patient 4A.....	41
Abbildung 10: TREC-Verlauf Patient 5A.....	42
Abbildung 11: TREC-Verlauf Patient 6A.....	43
Abbildung 12: TREC-Verlauf Patient 7A.....	44
Abbildung 13: TREC-Verlauf Patient 8A.....	45
Abbildung 14: TREC-Verlauf Patient 9A.....	46
Abbildung 15: TREC-Verlauf Patient 10A.....	47
Abbildung 16: TREC-Verlauf Patient 1B.....	48
Abbildung 17: TREC-Verlauf Patient 2B.....	48
Abbildung 18: TREC-Verlauf Patient 3B.....	49
Abbildung 19: TREC-Verlauf Patient 4B.....	50
Abbildung 20: TREC-Verlauf Patient 5B.....	51
Abbildung 21: TREC-Verlauf Patient 6B.....	52
Abbildung 22: TREC-Verlauf Patient 7B.....	53
Abbildung 23: TREC-Verlauf Patient 8B.....	54
Abbildung 24: TREC-Verlauf Patient 9B.....	55
Abbildung 25: TREC-Werte der Kontrollpatienten .....	56
Abbildung 26: Darstellung des $T_{\min}$ -Zeitpunktes im Vergleich .....	57
Abbildung 27: Analyse $T_{\min}$ in Abhängigkeit der Spenderprobe .....	58
Abbildung 28: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 1A .....	60
Abbildung 29: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 2A .....	60
Abbildung 30: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 3A .....	61

Abbildung 31: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 4A .....	61
Abbildung 32: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 5A .....	62
Abbildung 33: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 6A .....	62
Abbildung 34: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 7A .....	63
Abbildung 35: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 8A .....	63
Abbildung 36: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 9A .....	64
Abbildung 37: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 10A .....	64
Abbildung 38: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 1B .....	66
Abbildung 39: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 2B .....	66
Abbildung 40: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 3B .....	67
Abbildung 41: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 4B .....	67
Abbildung 42: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 5B .....	68
Abbildung 43: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 6B .....	68
Abbildung 44: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 7B .....	69
Abbildung 45: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 8B .....	69
Abbildung 46: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 9B .....	70
Abbildung 47: Zeitpunkt an dem >200 CD3 <sup>+</sup> -Zellen/ $\mu$ l überschritten werden ...	71
Abbildung 48: Zeitpunkt an dem >4000 Leukozyten/ $\mu$ l absolut überschritten werden .....	72
Abbildung 49: Verlauf der Leukozytenzahl der beiden Untersuchungsgruppen im Vergleich.....	73
Abbildung 50: Leukozytenzahl an Tag 25 im Vergleich.....	74
Abbildung 51: Leukozytenzahl an Tag 50 im Vergleich.....	75
Abbildung 52: Leukozytenzahl an Tag 100 im Vergleich.....	75
Abbildung 53: Leukozytenzahl an Tag 150 im Vergleich.....	76
Abbildung 54: Leukozytenzahl an Tag 200 im Vergleich.....	77
Abbildung 55: Leukozytenzahl an Tag 250 im Vergleich.....	78
Abbildung 56: Verlauf CD3 <sup>+</sup> -Zellen der zwei Untersuchungsgruppen im Vergleich .....	79
Abbildung 57: CD3 <sup>+</sup> -Zellen an Tag 25 im Vergleich .....	80
Abbildung 58: CD3 <sup>+</sup> -Zellen an Tag 50 im Vergleich .....	80
Abbildung 59: CD3 <sup>+</sup> -Zellen an Tag 100 im Vergleich .....	81

Abbildung 60: CD3 <sup>+</sup> -Zellen an Tag 150 im Vergleich .....	82
Abbildung 61: CD3 <sup>+</sup> -Zellen an Tag 200 im Vergleich .....	82
Abbildung 62: CD3 <sup>+</sup> -Zellen an Tag 250 im Vergleich .....	83
Abbildung 63: Verlauf TCRαβ <sup>+</sup> -Zellen und TCRγδ <sup>+</sup> -Zellen nach Transplantation .....	84

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenkollektiv.....	26
Tabelle 2: Primer-Sequenzen.....	33
Tabelle 3: TREC-Mastermix (in µl) .....	34
Tabelle 4: Cα-Mastermix (in µl) .....	34
Tabelle 5: CT-Werte und TREC-Werte Patient 1A .....	38
Tabelle 6: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 2A .....	39
Tabelle 7: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 3A .....	40
Tabelle 8: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 4A .....	41
Tabelle 9: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 5A .....	42
Tabelle 10: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 6A .....	43
Tabelle 11: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 7A .....	45
Tabelle 12: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 9A .....	46
Tabelle 13: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 10A .....	47
Tabelle 14: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 3B .....	49
Tabelle 15: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 4B .....	50
Tabelle 16: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 5B .....	51
Tabelle 17: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 6B .....	52
Tabelle 18: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 7B .....	53
Tabelle 19: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 8B .....	54
Tabelle 20: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 9B .....	55
Tabelle 21: Ct-Werte und TREC-Werte der Kontrollpatienten .....	56
Tabelle 22: T <sub>min</sub> der einzelnen Patienten in Tage post Tx .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
CD	cluster of differentiation
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
Ct	Cycle Threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
FACS	fluorescence-activated cell sorting
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GvH-Reaktion	Graft versus Host Reaktion
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HSZT	Haploidente Stammzelltransplantation
HvG-Reaktion	Host versus Graft Reaktion
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
KMT	Knochenmarkstransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
MUD	matched unrelated donor
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
post Tx	Post Transplantation
RNA	Ribonukleinsäure
QRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
SAA	Schwere aplastische Anämie
SCID	severe combined immunodeficiency = schwerer kombinierter Immundefekt
TCR	T-Zell-Rezeptor
TREC	T-Cell receptor excision circles
WBC	white blood cells = Leukozyten

# 1 Einleitung

## 1.1 Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation hat sich seit den ersten Versuchen zu Stammzelltransplantationen in den 1950er Jahren von einem experimentellen Therapieversuch zu einem Standardtherapieverfahren für viele maligne, aber auch nicht maligne Erkrankungen entwickelt.<sup>1</sup> Die Übertragung von Progenitor- und Stammzellen der Hämatopoese von einem ausgewählten Spender auf den erkrankten Empfänger hat die Behandlungsmöglichkeiten schwerer Krankheiten der Hämatopoese, des Immunsystems sowie von einigen soliden Tumoren wesentlich verändert.<sup>2</sup>

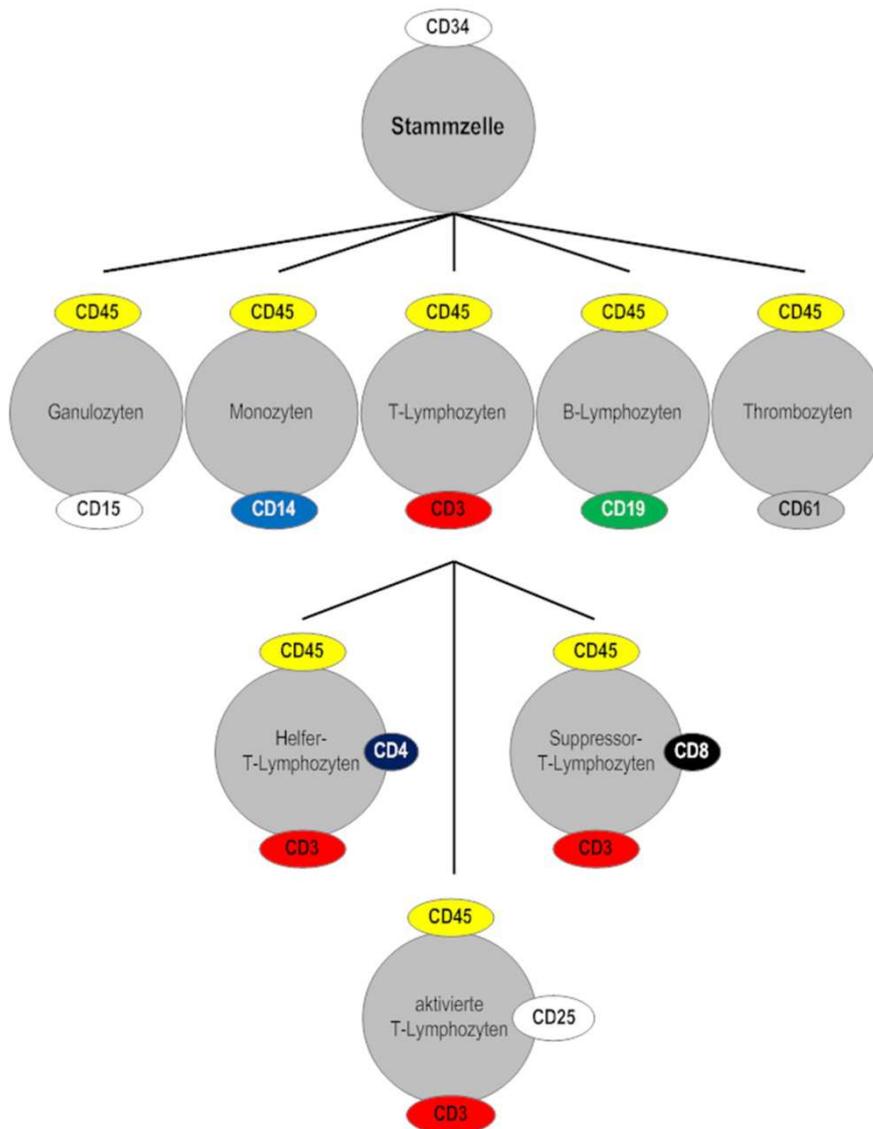
Je nach Herkunft der Stammzellen wird zwischen einer autologen (eigene Stammzellen), einer syngenen (Zwilling) und einer allogenen (Fremdspender) Transplantation unterschieden.

Zur Behandlung von malignen Erkrankungen wie akuten und chronischen Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren (Neuroblastom) spielt v.a. die allogene Stammzelltransplantation (SZT) eine große Rolle. Aber auch bei nichtmalignen erworbenen Störungen der Hämatopoese und des Immunsystems (z.B. Schwere aplastische Anämie = SAA) sowie bei kongenitalen genetischen Defekten wie beispielsweise der Sichelzellanämie und der Thalassämie stellt eine allogene SZT oftmals die einzige kurative Therapiemöglichkeit dar.<sup>3,4,5,6</sup>

## 1.2 Prinzip der allogenen Stammzelltransplantation

Bei der allogenen Stammzelltransplantation wird das erkrankte blutbildende System des Empfängers durch Stammzellen eines ausgewählten Spenders ersetzt. Diese siedeln sich dann im Knochenmark des Empfängers an und rekonstituieren ein komplettes, gesundes und neues Immunsystem.

Je nachdem zu welchen Zellen sie sich entwickeln haben sie gemeinsame Oberflächenmerkmale, sogenannte CD-Oberflächenantigene (cluster of differentiation = CD). Diese spielen unter anderem in der Lymphozytenreifung eine große Rolle und können zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken gebraucht werden.<sup>7</sup>



**Abbildung 1: CD-Antigene im Laufe der Lymphozytenreifung**

Für das Gelingen der Transplantation ist zuerst eine Konditionierung notwendig. Unter Konditionierung versteht man die der SZT vorausgehende

Chemotherapie, bzw. in seltenen Fällen eine Kombination aus Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung.

Sie soll folgende Ziele erfüllen:

- Schädigung und Reduktion der im Körper vorhandenen Tumorzellen
- Induktion einer Immunsuppression beim Empfänger, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern
- Ggf. Induktion einer Myeloablation um für die neuen Stammzellen Platz zu schaffen

Bei der Wahl des Konditionierungsregimes ist die Art der Grunderkrankung und die Beschaffenheit des Transplantats entscheidend.<sup>1</sup>

Es stehen drei Möglichkeiten als Quelle hämatopoetischer Stammzellen zur Verfügung: Stammzellen aus dem Knochenmark, mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut oder aus kryokonserviertem Nabelschnurblut. Heute besteht eindeutig die Tendenz zur Stammzellgewinnung aus dem peripheren Blut mobilisierter Spender. Nicht nur, weil die aufwändige Gewinnung von Knochenmark unter Anästhesiebedingungen aus dem Beckenkamm entfällt, sondern auch weil die Rekonstitution bei Verwendung von Stammzellen aus dem peripherem Blut schneller verläuft.<sup>3,1,8</sup>

Hämatopoetische Stammzellen kommen unter Normalbedingungen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz im peripheren Blut vor (ca. 0,05%). Durch die Verabreichung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie z.B. G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) werden die Stammzellen aus dem Knochenmark ins Peripherblut geschwemmt. Die Anzahl der Stammzellen im Peripherblut steigt damit um den Faktor 100 an. Zwischen Tag 4 und 6 nach Stimulation werden die Stammzellen mittels Leukaphrese gewonnen. Bei der allogenen SZT werden die Stammzellpräparate nach Aufarbeitung innerhalb von 24-36 h dem Empfänger intravenös verabreicht.<sup>3,1,9</sup>

### 1.3 Spenderauswahl und HLA-System

Für die Spenderauswahl spielt das HLA-System eine bedeutende Rolle. Das HLA-System, auch Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) genannt, besteht aus einer Vielzahl von Genen und befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Die Allele verschiedener HLA-Loci werden, auf den einzelnen Chromosomen 6 gekoppelt, in sog. Haplotypen vererbt. Jedes Individuum erbt somit von Vater und Mutter je einen, das heißt insgesamt zwei HLA-Haplotypen.<sup>10</sup>

Die HLA-Gene kodieren für HLA-Antigene, unter anderem für die MHC-I- und MHC-II-Moleküle, welche eine entscheidende Rolle im menschlichen Immunsystem spielen. Nur durch sie ist eine adaptive spezifische Immunantwort möglich, da durch die von ihnen präsentierten Moleküle T-Zellen anhand ihrer Struktur zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen unterscheiden können. Im Thymus haben die T-Zellen während ihrer Entwicklung diese Unterscheidung zwischen eigenen und fremden HLA-Molekülen erlernt. Bei körperfremden Proteinen oder Organismen wird eine Immunantwort ausgelöst, wodurch im Fall einer Infektion eine Vernichtung der Eindringlinge im Organismus erzielt werden soll. Sie wird vor allem durch T-Zellen gewährleistet. Demnach ist die Präsentation über die HLA-Antigene hauptsächlich dafür verantwortlich, ob ein Transplantat vom körpereigenen Immunsystem angenommen oder abgestoßen wird.<sup>1,11,10</sup>

Die zwei wichtigsten Immunologischen Reaktionen sind hierbei:

- **HvG-Reaktion** (Host versus Graft): Immunkompetente Zellen des Empfängers erkennen das Transplantat als fremd und stoßen es ab.
- **GvH-Reaktion** (Graft versus Host): T-Lymphozyten im Transplantat erkennen HLA-Antigene des Empfängers als fremd und initiieren eine Immunantwort.<sup>12</sup> Hauptsächlich betroffene Organe sind Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Es kommt zu Exanthenen, Erythrodermie, Diarrhoe und Hepatitis.<sup>13</sup>

Höchste Priorität bei der Spenderauswahl haben somit HLA-identische Geschwisterspender. Die Wahrscheinlichkeit einen HLA-identischen Geschwisterspender oder ein anders HLA-identisches Familienmitglied zu finden liegt bei ca. 25%.<sup>14</sup> Steht kein HLA-identisches Familienmitglied als Spender zur Verfügung, wird in weltweiten Datenbanken nach einem HLA-identischen Fremdspender gesucht.

#### **1.4 Haploidente allogene Stammzelltransplantation**

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Kriterien steht nur für ca. 25% der Patienten ein passender HLA-identischer Familienspender und für ca. 30% (10-60% je nach ethnischer Zugehörigkeit) ein HLA-identischer Fremdspender zur Verfügung.<sup>14</sup> Bei ethnischen Minderheiten mit seltenen HLA-Merkmalen ist die Wahrscheinlichkeit, einen HLA-identischen Fremdspender zu finden deutlich geringer als bei Patienten, die der kaukasischen Rasse angehören. In speziellen Situationen wie z.B. bei Rezidivkrankungen oder rascher Progression der Erkrankung ist eine zeitnahe Transplantation jedoch oft die einzige Therapieoption und die Suche nach einem HLA-identischen Spender zu langwierig. Hier stellt eine haploidente Stammzelltransplantation oft die einzige Heilungs- bzw. Überlebenschance dar.<sup>15</sup> Jeder Patient hat theoretisch einen potentiell passenden haploidenten verwandten Spender, nämlich seine Eltern, eines seiner Kinder oder evtl. Geschwister. Diese Spender sind innerhalb weniger Tage zu erreichen, hoch motiviert und stehen auch während der Therapie zu weiteren Spenden zur Verfügung.<sup>16,17,18</sup>

Allerdings bringt die Transplantation von einem haploidenten Spender erhebliche immunologische Risiken mit sich. Mit zunehmender HLA-Disparität steigt das Risiko für Transplantatabstoßungen und GvH-Reaktionen deutlich an.<sup>19</sup>

Als positiver Effekt sei hier noch der „Graft versus Leukemia/Tumor“-Effekt (GvL/GvT-Effekt) genannt. Verbliebene Tumorzellen im Empfänger werden dabei durch immunkompetente Zellen im Transplantat, v.a. NK-Zellen und

T-Zellen, vernichtet.<sup>20,21</sup> Dieser Effekt nimmt mit zunehmender HLA-Disparität zu und damit die Rezidivrate ab.

### **1.5 T-Zelldepletion (CD3/CD19 versus TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19)**

Da Transplantatabstoßung und GvH-Reaktionen hauptsächlich durch T-Zellen vermittelt werden, brachte die Einführung der T-Zell-Depletion große Fortschritte in der haploidenten Stammzelltransplantation. Hierdurch erreichte man eine Senkung der Zahl der Transplantatabstoßungen und des Auftretens schwerer GvH-Reaktionen trotz erhöhter HLA-Barriere.<sup>17,22,23</sup> Auch die B-Zelldepletion zeigt Vorteile, um durch EBV verursachten lymphoproliferativen Komplikationen nach Transplantation vorzubeugen.<sup>23,24</sup> Auch bei einer HLA-identen Transplantation wird eine T-Zelldepletion durchgeführt, da eine alloreaktive Abstoßungsreaktion vermieden werden soll. Allen Transplantationen mit T-Zell-depletierten Stammzellen ist jedoch eine verzögerte Immunrekonstitution und dadurch eine erhöhte Infektanfälligkeit und Rückfallrate gemeinsam.<sup>25,26</sup>

#### CD34<sup>+</sup>-Positiv-Selektion

Das erste bedeutende System zur Stammzellanreicherung war das CliniMACs System (Miltenyi Biotec, Deutschland) zur immunomagnetischen Positivselektion von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen.<sup>27</sup> Durch dieses System ist es möglich, einerseits Stammzellen hoch anzureichern und andererseits T-Zellen massiv zu depletieren, was eine erfolgreiche haploidente HSZT mit deutlich reduziertem Risiko einer GvH-Reaktion möglich macht.<sup>23</sup> Mittels magnetischer Antikörper, sogenannte Mikrobeads, gegen das CD34-Antigen, werden die Stammzellen markiert und in einem Magnetfeld von den übrigen Zellen getrennt. Hierdurch erhält man ein hochaufgereinigtes Transplantat mit bis zu 97% CD34 positiven Zellen.<sup>23,28</sup>

Jedoch war in Studien eine deutlich verzögerte Immunrekonstitution zu sehen und damit ein vermehrtes Vorkommen von tödlichen Infektionen,<sup>24,29,30</sup> da durch

diese Methode nicht nur T-Zellen und B-Zellen depletiert werden, sondern auch alle anderen CD34<sup>-</sup>-Zellen, z.B. des unspezifischen Immunsystems.

### CD3/CD19-Depletion

Um ein möglichst unberührtes Transplantat zu erhalten und möglichst viele immunkompetente Zellen zu transplantieren, wurde die CliniMACs CD3/CD19-Depletionsmethode entwickelt.<sup>31,32</sup> Dabei werden durch Mikrobeads markierte T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19) aus dem Transplantat entfernt, der Rest des Transplantates bleibt unberührt und wird übertragen. So enthält das Transplantat außer den CD34<sup>+</sup>-Stammzellen auch noch eine große Anzahl an weiteren wichtigen Zellen, wie z.B. CD34<sup>-</sup>-Progenitorzellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, weitere mobilisierte myeloische Zellen und für das Engraftment mitverantwortliche Zellen, sogenannte „Facilitating Cells“.<sup>33,34</sup> Hierdurch erhofft man sich einen stärkeren GvL/GvT-Effekt durch die mittransplantierten NK-Zellen und ein schnelleres Engraftment.

Nach den ersten vielversprechenden Ergebnissen wurden verschiedene Studien durchgeführt, die auf einer CD3/CD19-Depletion zusammen mit einem nichtmyeloablativen Konditionierungsregime beruhten. Es zeigte sich ein schnelles Engraftment, eine niedrige tumorassoziierte Mortalität und eine schnellere Immunrekonstitution.<sup>35,36</sup>

### TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-Depletion

Verglichen mit der CD34<sup>+</sup>-Positiv-Selektion hat das Transplantat nach einer CD3/CD19-Depletion noch einen 10mal höheren Gehalt an unerwünschte T-Zellen. Eine effektivere Methode der Negativdepletion ist die kürzlich beschriebene Methode der TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-Depletion aus peripheren Stammzellen.<sup>37</sup> Mit dieser Methode kann eine ebenso effektive T-Zelldepletion erreicht werden wie durch eine CD34<sup>+</sup>-Positiv-Selektion.<sup>33</sup> Hierbei findet wieder eine Negativdepletion statt, bei der immunomagnetische Microbeads an den T-Zell-Rezeptor (TCR) von TCRαβ<sup>+</sup>-T-Zellen und an das CD19-Antigen von B-Zellen binden und durch ein starkes Magnetfeld aus dem Transplantat

entfernt werden. Alle anderen Zellen, die im Transplantat enthalten sind, bleiben unberührt und werden dem Empfänger übertragen. Dadurch werden CD34<sup>+</sup>-Stammzellen, CD34<sup>-</sup>-Progenitorzellen, myeloische Zellen, Monozyten, Facilitating Cells, viele NK-Zellen, aber vor allem TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-T-Zellen transplantiert.<sup>37</sup>

TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-T-Zellen sind nicht-alloreaktive T-Lymphozyten, die zum adaptiven Teil des Immunsystems gehören.<sup>38</sup> Einige Studien deuten auf wichtige antiinfektiöse und antitumoröse Eigenschaften im Rahmen der Tumorbekämpfung hin.<sup>33,39,40,41</sup> Hierzu gehören unter anderem Abwehr von intra- und extrazellulären Pathogenen und die Beeinflussung der Immunantwort durch Cytokine, was einen Einfluss auf das klinische Ergebnis einer haploidenten Transplantation haben kann.<sup>38,42</sup> Die ersten klinischen Studien mit TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-depletierten Stammzelltransplantaten wurde am Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen und am Bambino Gesù Hospital in Rom, Italien durchgeführt.<sup>38,43,44</sup> Es zeigte sich ein frühes Engraftment und eine frühe Expansion mittransplantierte TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-T-Zellen sowie eine frühe Expansion von TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-T-Zellen. Somit erfolgte eine schnelle Immunrekonstitution und eine niedrige Rate an transplantationsassoziierten Todesfällen war die Folge.<sup>15,42,43</sup>

In einem retrospektiven Vergleich zweier Tübinger Patientenkohorten, die CD3/CD19-depletierte oder TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19-depletierte periphere Stammzellen erhalten hatten, wobei das gleiche nichtmyeloablative Konditionierungsregime benutzt wurde, zeigte sich eine deutlich schnellere Rekonstitution der CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Gruppe der Empfänger der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19-depletierten Transplantate.<sup>15</sup>

## **1.6 Immunrekonstitution nach haploidenter Stammzelltransplantation**

Nach Konditionierung und Transplantation erfolgt bei unkompliziertem Verlauf die rasche Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems sowie der unspezifischen zellulären Immunität, repräsentiert durch natürliche Killer (NK)-Zellen, Monozyten und Makrophagen.<sup>25</sup> Bei Transplantation von

CD3/CD19-oder TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletierten Transplantaten werden Zellen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr bereits mittransplantiert und können erste Abwehrfunktionen übernehmen.<sup>15,42,44</sup>

Die Entwicklung der komplizierter strukturierten spezifischen, zellulären Immunität (B- und T-Zellen) benötigt speziell bei haploidenten Transplantationen jedoch wesentlich mehr Zeit. Vor allem das Fehlen von T-Zellen verursacht eine erhöhte Rate an opportunistischen Infektionen, wie zum Beispiel schwere Virusinfektionen durch CMV oder Pilzinfektionen, welche eine häufige Todesursache nach Transplantation darstellen.<sup>15,45</sup>

### **1.6.1 T-Zellrekonstitution**

Prinzipiell bestehen nach einer Stammzelltransplantation zwei Wege der T-Zellrekonstitution: eine antigengetriggerte, periphere Expansion reifer, mittransplantierte T-Zellen sowie die "de novo"-Generierung naiver Zellen im Thymus aus den transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen.<sup>46,47</sup> Ersteres führt zur Wiederherstellung von Gedächtnis-T-Zellen, deren Diversität von der Art und Anzahl der T-Zellen im Transplantat abhängt. Der zweite Weg entspricht eher der regulären Ontogenese der T-Zellen und führt zur kompletten Rekonstitution eines voll ausgereiften T-Zellkompartimentes. Die Diversität und Komplexität des T-Zellrezeptorrepertoires nimmt erst zu, wenn naive T-Zellen im peripheren Blut wieder auftauchen. Bei Kindern schreitet dieser Regenerationsprozess deutlich schneller voran, so dass sich das T-Zellrezeptorrepertoire bis Tag 200 deutlich erholt hat.<sup>48</sup> Bei Erwachsenen dagegen kann dieser Regenerationsprozess allerdings Monate bis Jahre dauern, da die entscheidende Thymusleistung im Gegensatz zu Kindern reduziert ist.<sup>48,49,50</sup>

### **1.6.2 TRECs als Marker für Entstehung neuer T-Zellen**

Wie alle anderen hämatopoetischen Zellen werden die Vorstufen der T-Lymphozyten im Knochenmark gebildet, wandern dann aber über die Blutbahn in den Thymus ein um dort auszureifen. Hier durchlaufen sie

verschiedene Phasen der Proliferation, Differenzierung und Selektion und erlangen auf diesem Wege ihre immunologische Kompetenz. Am wichtigsten ist hierbei die positive und negative Selektion, die nur T-Zellen bestehen, die zwischen körpereigenen und körperfremden Proteinen unterscheiden können und nicht gegen körpereigene Zellen eine Immunantwort initiieren.<sup>10</sup>

T-Zellrezeptoren werden aus zwei Proteinketten gebildet. Hierbei können zwei Typen von T-Zellrezeptoren unterschieden werden. Der eine Typ setzt sich zusammen aus einer TCR $\alpha$ - und einer TCR $\beta$ - Kette (TCR $\alpha\beta$ ), der andere aus einer TCR $\gamma$ - und einer TCR $\delta$ - Kette (TCR $\gamma\delta$ ). Über 95% der T-Lymphozyten exprimieren TCR $\alpha\beta$ .<sup>50</sup> Jede der vier Ketten besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Die konstante Domäne wird von C-Gensegmenten kodiert. Die variable Domäne wird im Fall der TCR $\alpha$ - und TCR $\gamma$ -Kette von einer Kombination aus V- und J-Gensegmenten kodiert, oder von einer Kombination von V-, D- und J-Gensegmenten im Fall der TCR $\beta$ - und TCR $\delta$ -Ketten.<sup>10</sup> Um eine möglichst große Vielfalt an immunkompetenten T-Zellen zu erreichen, findet während des Reifungsprozesses eine Rekombination der V-, D- und J-Gensegmenten statt (gene rearrangement). Dabei werden nicht benötigte Genabschnitte ausgeschnitten.

Für die vorliegende Arbeit ist die Umlagerung des  $\alpha$ -Lokus, d.h. die Region, in der die TCR $\alpha$ -Kette kodiert ist, besonders wichtig, da hierbei sogenannte 'T-Cell receptor excision circles' (TRECs) entstehen.<sup>10</sup> Bevor eine erfolgreiche Umlagerung des  $\alpha$ -Lokus stattfinden kann, muss der in den  $\alpha$ -Lokus eingestreute  $\delta$ -Lokus deletiert werden. Dieser ausgeschnittene Genabschnitt lagert sich dann zu einem extrachromosomalen Ring aus DNA zusammen und es entsteht ein sjTREC (signal joint) (siehe Abbildung 2).<sup>51,52,53</sup> Weitere Rearrangementprozesse können zu einem weiteren TRECs führen, z.B. einem cjTREC (coding joint).<sup>49,54</sup>

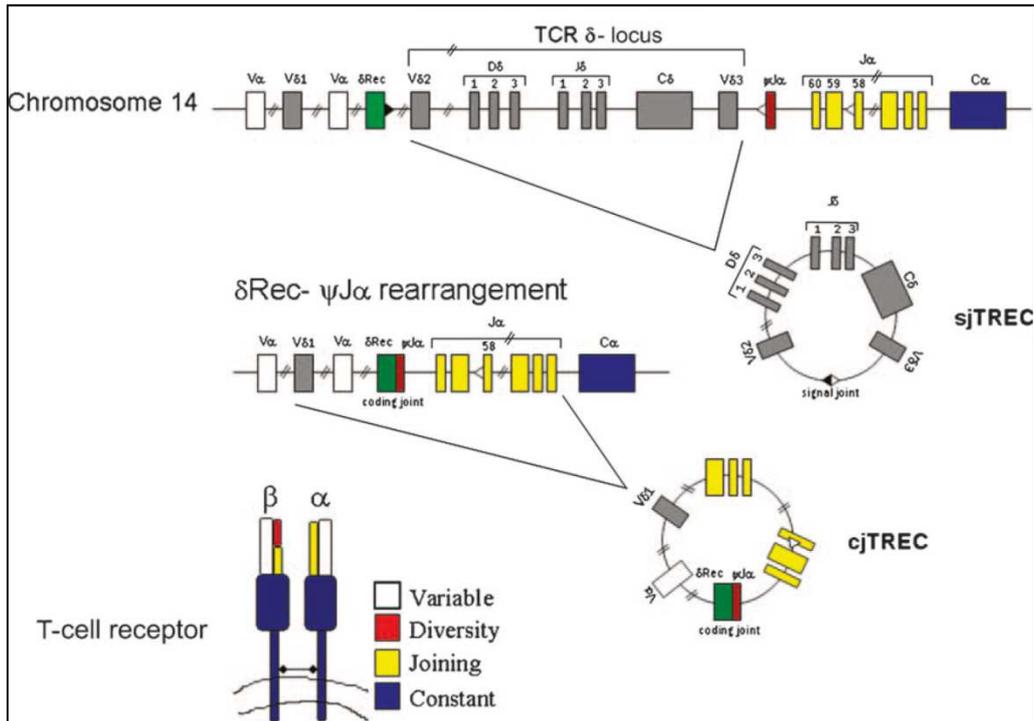


Abbildung 2: TREC-Entstehung während des Gene Rearrangement; aus Ribeiro RM, Perelson AS. Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circle (TREC) data. Immunol. Rev. 2007;216:21–34

Lymphozyten, die kürzlich den Thymus verlassen haben, besitzen genau einen sjTREC pro Zelle. Die TRECs sind stabil, werden während der Mitose nicht dupliziert und somit mit jeder Zellteilung verdünnt.<sup>51,52</sup> Sie kommen nur in T-Lymphozyten vor, die vor kurzem im Thymus neu generiert wurden und sind somit ein Marker für die Auswurfleistung des Thymus und der “de novo“-Generierung von T-Zellen.<sup>49,55</sup>

Anhand dieser TRECs kann nach haploidenter Stammzelltransplantation analysiert werden, ab wann wieder neue T-Zellen gebildet werden, d.h. ab wann die Diversität des T-Zellrezeptor-Repertoires wieder zunimmt und das Immunsystem wieder voll funktionsfähig arbeiten kann.<sup>56,57,50</sup>

## 1.7 Fragestellung.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun folgende Sachverhalte analysiert werden:

- Genaue Betrachtung der Rekonstitution der einzelnen Zellreihen und des TREC-Gehalts im Peripherblut im zeitlichen Verlauf
- Kann aus den Daten zwischen einer peripheren Expansion und einer „de novo“-Generierung unterschieden werden?
- Zeigt sich in den Patientengruppen ein Unterschied in der Immunrekonstitution nach Erhalt TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletierte peripheren Stammzellen oder CD3/CD19-depletierten peripherer Stammzellen?
- Zeigen sich zwischen den zwei Patientengruppen Unterschiede beim Beginn der Thymusaktivität, d.h. gibt es Unterschiede, ab wann sich erstmals TRECs im Peripherblut nachweisen lassen?
- Können die besseren klinischen Verläufe der Patienten nach TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion durch die durchgeführten Analysen bestätigt werden?

Hierzu wurde der zeitliche Verlauf von Leukozyten, T-Zellzahlen und TREC-Gehalt der Proben nach Transplantation analysiert und verglichen. Außerdem war es wichtig, Veränderungen dieser Daten mit eventuellen supportiven Maßnahmen oder klinischen Ereignissen zu vergleichen, um deren Aussagekraft zu validieren.

## 2 Material

### 2.1 DNA-Isolation

QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
QIAamp DNA-Blood Midi-Kit (20)	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
QIAamp DNA-Blood Maxi-Kit (50)	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
Ethanol absolut	Merck (Darmstadt, Deutschland)
RNase/DNase-freies Wasser	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

### 2.2 QRT-PCR

Lightcycler	CFX96 Real-time System, C1000™ Thermal Cycler Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Taq-Polymerase (inkl. 10x Puffer, 50mM MgCl <sub>2</sub> ) Cat. No.: 18038-018	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
sjTREC FW Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
sjTREC RV Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
TRECs-Probe	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Cα Fw Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Cα Rv Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
Cα-Probe	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)

PCR-Reaktionstubes	Low Tube Strip, white, Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Tube-Deckel,	Flat Cap Strips, Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

### 2.3 Laborzubehör und Geräte

Gefrierschränke	-20°C Froster Labex 95, QSD 3500 Robert Bosch GmbH (Gerlingen, Deutschland) -80°C Model 917 ThermoQuest (Egelsbach, Deutschland)
Kühlschrank	FKU 1800 Liebherr (Kirchdorf an der Iller, Deutschland)
Vortexgerät	REAX top Heidolph (Nürnberg, Deutschland)
Waage	BP121 Sartorius (Göppingen, Deutschland)
Wasserbad	WB 14 Memmert (Schwalbach, Deutschland)
Zentrifugen	Mikro 22 R, Rotixa 50 RS, Rotanta 46 RSC Hettich (Tuttlingen, Deutschland) Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-18 Christ GmbH (Osterode, Deutschland)
Spektralphotometer	NanoDrop 2000, nanodrop productions USA
Pipetten	Gilson P2, P10, P20, P100, P200, P100 Gilson (Villers-le-Bel, Frankreich)

Pipettierhilfe	Accu-Jet® Braun (Melsungen, Deutschland)
Filterspitzen	Premium Tips, Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Glaswaren	Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder, Schott (Mainz, Deutschland)
Handschuhe	Ansell (Yarra City, Australien)
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (15 ml / 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Stabpipetten Verschiedene Größen	Corning Inc. (Corning, USA)
Spritzen (Verschiedene Größen)	Braun, Melsungen, Deutschland

## 3 Methoden

### 3.1 Patientenkollektiv

18 Patienten des Patientenkollektivs wurden in der Kinderklinik der Universität Tübingen aufgrund verschiedener hämatologischer oder onkologischer Erkrankungen einer allogenen haploidenten Stammzelltransplantation zugeführt. Ein Patient des Patientenkollektivs wurde im Universitätsklinikum Heidelberg transplantiert und kam zu den Kontrolluntersuchungen nach SZT nach Tübingen. Ein Überblick über wichtige Daten der Patienten wird in der Tabelle 1 gegeben. Je nach Art der T-Zelldepletion wurden die Patienten in zwei Untersuchungsgruppen unterteilt.

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein:

- Haploidente oder HLA-idente allogene Stammzelltransplantation
- CD3/CD19- oder TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion der T-Zellen
- Mindestüberlebensdauer von 100-Tagen
- Ausreichende Anzahl an Proben pro Patient

Aufgrund der schweren Erkrankungen und des individuell schwierigen Krankheitsverlaufes nach Transplantation war es nicht möglich eine weitere Unterteilung vorzunehmen, da jeder Patient unterschiedliche supportive Maßnahmen benötigte.

CD3/CD19	Diagnose	Alter bei Tx	HLA-ident/haploident	T-Zelldepletion	GvH akut Grad 1-4	GvH chronisch Grad 1-4
1A	SAA	16,2	haploident	CD3/CD19	0	0
2A	Neuroblastom	5,7	haploident	CD3/CD19	0	0
3A	JMML	4,4	haploident	CD3/CD19	1	1
4A	CML	8,4	haploident	CD3/CD19		
5A	AML	3,3	haploident	CD3/CD19	1	0
6A	ALL	16,0	haploident	CD3/CD19	1	1
7A	ALL	18,9	haploident	CD3/CD19	0	0
8A	AML	7,8	haploident	CD3/CD19	1	0
9A	AML	1,9	haploident	CD3/CD19	1	0
10A	MDS	9,6	haploident	CD3/CD19	0	0
TCR $\alpha\beta^+$ /CD19						
1B	ALL	14,6	haploident	alpha/beta	1	1
2B	ALL	8,7	MUD	alpha/beta	4	3
3B	ALL	13,0	MUD	alpha/beta	1	0
4B	$\beta$ -Thalassämia major	2,9	haploident	alpha/beta	0	0
5B	AML	25,1	MUD	alpha/beta	0	0
6B	AML	8,9	haploident	alpha/beta	1	0
7B	ALL	12,5	haploident	alpha/beta	2	1
8B	AML	6,0	haploident	alpha/beta	2	0
9 B	MHCII-Mangel	1,1	haploident	alpha/beta		

**Tabelle 1: Patientenkollektiv; Diagnose, Alter bei Transplantation, Transplantationsart, Depletionsmethode, GvH-Reaktion Grad 1-4 akut und chronisch**

### 3.2 Patientenproben

Die Patientenproben stammen aus Blutentnahmen nach Transplantation, die nach Behandlungsstandard routinemäßig vorgeschrieben sind und bei Nachkontrollen abgenommen werden.

Es wurde versucht aus jeder Woche nach Transplantation (Woche pTx) eine geeignete Probe zu messen. Außerdem wurde jeweils eine Probe vor Transplantation und die des Spenders analysiert, falls diese vorhanden waren.

Die DNA-Isolation erfolgte manuell im Labor der Arbeitsgruppe oder im Chimärismuslabor der Kinderklinik, wo die Proben maschinell mit den gleichen Kits verarbeitet wurden. Danach wurden die Proben in -20°C-Kühlschränken konserviert.

Es war nicht immer möglich, alle Proben für die TREC-Analyse zu verwenden, da der DNA-Gehalt nicht ausreichend war.

Die verwendeten Daten aus den FACS-Analysen der Patienten nach Transplantation stammen aus dem KMT-Labor der Kinderklinik Tübingen. Sie wurden dort nach der Methode der Durchflusszytometrie aus den Routineblutabnahmen und Nachkontrollen erhoben und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### **3.3 DNA-Isolation**

Die DNA-Isolation erfolgt mit Kits der Firma QIAGEN gemäß den Herstellerangaben. Hiermit ist es möglich, schnell und mit wenig Aufwand genomische DNA direkt aus Vollblut oder auch aus Zellsuspensionen in PBS oder Wasser zu extrahieren. Je nach zu erwartender Zellzahl stehen verschiedene Kits zur Verfügung:

QIAamp® DNA-Blood-Maxi-Kit (50)	für	> 20	Millionen	Zellen/ml
QIAamp® DNA-Blood-Midi-Kit (20)	für	max. 20	Millionen	Zellen/ml
QIAamp®. DNA-Blood-Mini-Kit (250)	für	max. 5	Millionen	Zellen/ml

Die Isolationsmethode funktioniert nach dem Prinzip der reversiblen Bindung der enthaltenen DNA an eine Silicamembran, die dann gereinigt und isoliert werden kann.

Zuerst erfolgt die Zugabe eines Lysepuffers und der Protease K zu Vollblut oder einer Zellsuspension, wodurch die Zellen zerstört werden. DNA, RNA, Proteine und andere Zellbestandteile liegen nun frei in der Flüssigkeit vor. Diese Suspension wird nun auf ein Eluatröhrchen mit einem speziellen Filter, der die Silicamembran enthält, aufpipettiert. DNA, RNA, Proteine und andere Bestandteile der Suspension binden nun an die Silicamembran, die dabei als reversibler Bindungspartner fungiert. Nun folgen mehrere Waschschriffe mit verschiedenen Waschpuffern. Durch Veränderung des pH Wertes und der Salzkonzentration der Lösung beeinflussen die Puffer die Bindungsfähigkeit der Moleküle an der Silicamembran. Während die restlichen Moleküle schrittweise

ausgewaschen werden, bleibt die DNA auf Grund ihrer molekularen Struktur gebunden.

Im letzten Schritt wird mit Hilfe eines Elutionspuffers die DNA von der Membran gelöst und liegt nun isoliert vor. Die erhaltene DNA ist sofort weiterverwendbar oder kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung konserviert werden.

### **3.4 Konzentrationsbestimmung und Konzentrierung des DNA-Gehalts**

Die DNA-Konzentration der Proben wird photometrisch am Spektralphotometer NanoDrop 2000 bestimmt. Hierfür werden nur geringe Probenmengen von  $1\mu\text{l}$  benötigt und aufwendige Messverfahren entfallen.

Je nach DNA-Konzentration war es nötig, durch einen Rotations-Vakuum-Konzentrator die DNA-Konzentration zu erhöhen, damit im vorgegebenen Volumen  $200\text{ng}$  DNA eingesetzt werden konnten.

### **3.5 Quantitative Real Time-PCR**

Die quantitative Real Time-PCR (QRT-PCR) ist eine zuverlässige und exakte Methode, um DNA Proben auf Anwesenheit definierter Zielsequenzen zu untersuchen und dabei zu quantifizieren. Bisherige PCR (Polymerasekettenreaktion) Methoden ermöglichten nur nach aufwendiger Nachbearbeitung der PCR-Produkte eine Quantifizierung. Um dies zu vereinfachen, wurden mehrere Verfahren entwickelt.

Das hier verwendete Verfahren der TaqMan-Methode beruht auf dem Prinzip von Fluoreszenzmessung, durch welche auf die DNA-Menge rückgeschlossen werden kann.<sup>58</sup> Zudem ermöglicht es die Messung der sich ansammelnden PCR-Produkte während der kompletten PCR-Reaktion, also in ‚real-time‘. Diese Methode ist somit in der Lage, einfach und in kurzer Zeit quantitative Daten innerhalb eines großen Detektionsbereiches zu liefern.

Die quantitative Real Time PCR ist nach mehreren Studien auch eine etablierte und geeignete Messmethode zur Bestimmung von sjTREC<sub>s</sub>.<sup>59,60,61,62,53</sup>

Das Versuchsprotokoll wurde von Chen et al. 2005 übernommen und leicht modifiziert.<sup>56</sup>

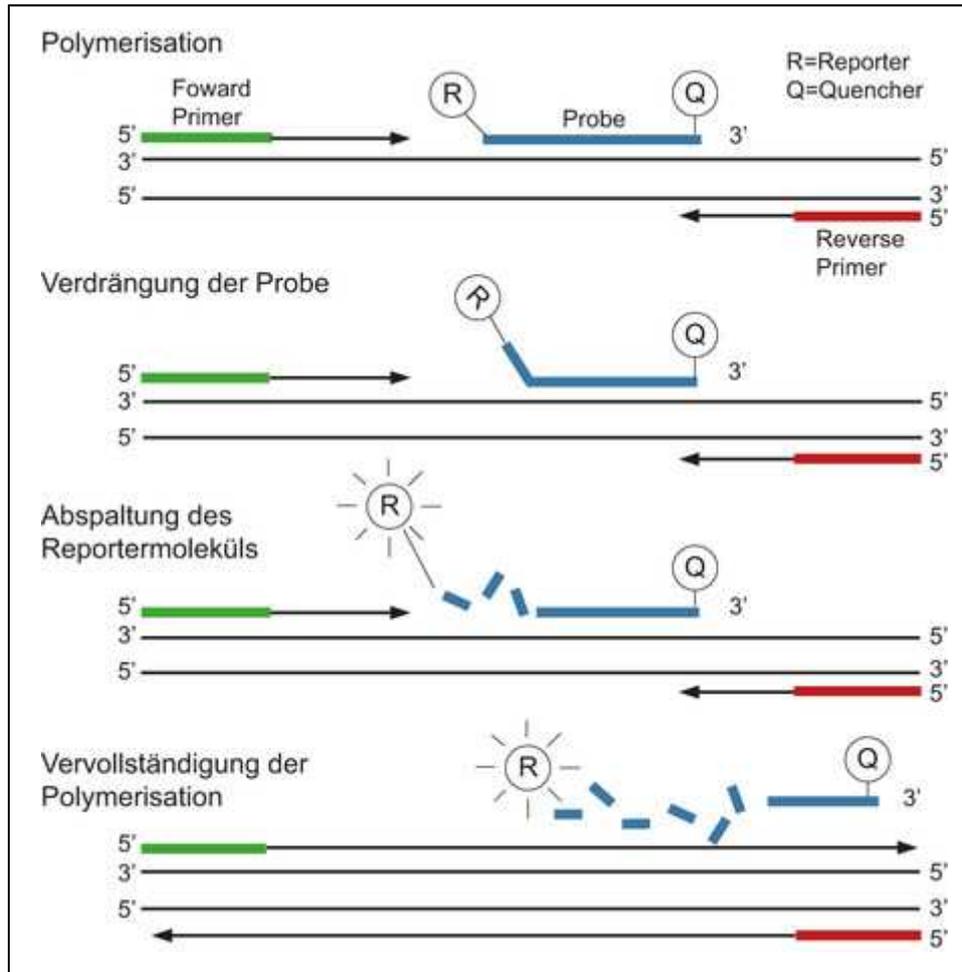
### **3.5.1 Prinzip der quantitativen Real Time-PCR (QRT-PCR)**

Die TaqMan-Methode basiert auf der 5`-3`Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in Kombination mit einer spezifischen Sonde (= engl. probe), die während der DNA-Amplifizierung gespalten wird.<sup>63</sup> Im PCR-Reaktionsmix sind die jeweils spezifischen sjTREC Forward- und Reverse-Primer und eine spezifische sjTREC Sonde enthalten. Die Sonde enthält einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff am 5`-Ende und einen Empfängerfarbstoff (Quencher) am 3`-Ende.

In der Annealing-Phase der PCR lagern sich Primer und Sonde an die komplementäre Sequenz auf der DNA an. Dabei liegt die Sonde zwischen den Primern (siehe Abbildung 3). Solange die Sonde noch intakt ist, d.h. sowohl der Reporter- als auch der Quencherfarbstoff noch an der Sonde befestigt sind, wird die Energie des Reporterfarbstoffes, die nach Anregung durch einen Argon-Laser emittiert wird, auf den Quencherfarbstoff übertragen und nur dieser emittiert Licht.

Während der Amplifizierungsphase der PCR werden die Primer durch die Taq-Polymerase von 5` nach 3` verlängert und die Sonde wird mit Hilfe der 5`-3` Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase vom DNA Strang abgespalten. Hierbei werden Reporter- und Quencherfarbstoff voneinander getrennt. Der Reporterfarbstoff ist nun in der Lage, seine eigene charakteristische Fluoreszenz zu emittieren. Die Stärke dieser Fluoreszenz ist dabei proportional zur gebildeten DNA-Menge.

Durch diese Methode ist eine spezifische Amplifizierung gewährleistet, da ein Fluoreszenzsignal nur dann detektiert wird, wenn eine zu Sonde und Primern komplementäre Sequenz auf der DNA vorhanden ist.<sup>64</sup>



**Abbildung 3: Funktionsprinzip der quantitation Real-time PCR; <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>**

Im Falle der hier vorliegenden Arbeit entsteht die Zielsequenz der Primer und Probe erst nach Entstehung der TRECs. Durch die Deletion des  $\delta$ -Lokus und dem folgenden Zusammenschluss der beiden Enden können die Primer erst nach Ringsschluss ihre Zielsequenz detektieren.<sup>65</sup>

Das gemessene Fluoreszenzsignal wird gegen die Zykluszahl aufgetragen. Der PCR-Zyklus, bei dem zuerst ein statistisch signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen wird, ist der sogenannte Cycle Threshold (Ct) und dient als Grundlage für die Quantifizierung (siehe Abbildung 4).

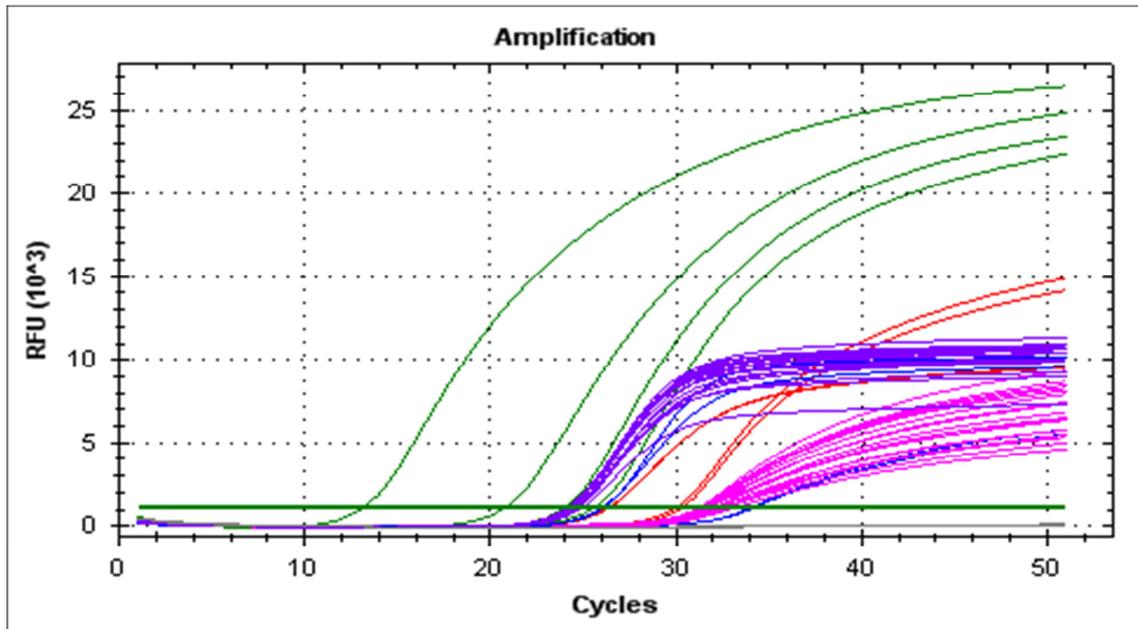
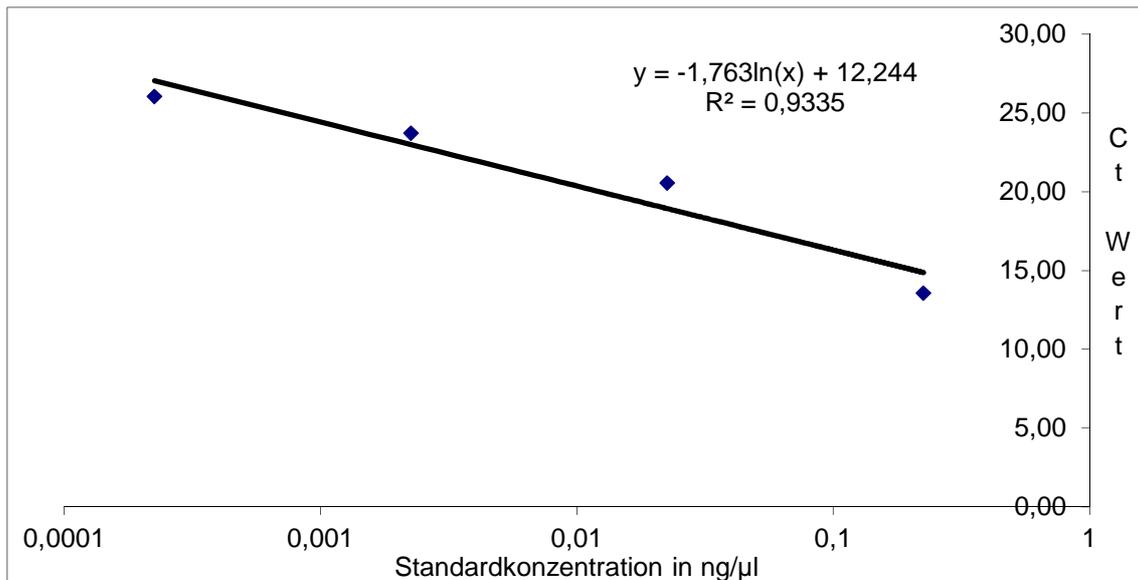


Abbildung 4: Beispiel der graphischen Darstellung von Ct-Kurven verschiedener Proben aus dem Lightcycler-Programm

Um aus einem Ct-Wert auf eine Konzentration des amplifizierten Produktes schließen zu können, wird eine Standardkurve erstellt. Hierzu wird aus einem TREC-Klon mit bekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe erstellt und in jedem Versuchsansatz mitgemessen. Trägt man die Konzentrationen der jeweiligen Verdünnungsstufe logarithmisch gegen die gemessenen Ct-Werte auf, so erhält man eine Funktion, die eine Korrelation zwischen der Konzentration und dem Ct-Wert darstellt (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Standardfunktion**

Um mögliche, vorhandene Differenzen in Menge und Qualität der DNA zu normalisieren, wurde die konstante C $\alpha$ -Region, die nach dem Rearrangement-Prozess bestehen bleibt, als Referenz für jede Patientenprobe ebenfalls bestimmt.

Leider war im Verlauf der Analysen das Erstellen einer Standardfunktion für C $\alpha$  aufgrund einer fehlenden spezifischen Standardlösung mit kloniertem C $\alpha$ -Fragment nicht möglich.

Jedoch lässt der Nachweis von C $\alpha$  in den Patientenprobe auf das ursprüngliche Vorhandensein von T-Zellen im Analysematerial schließen.

### 3.5.2 Verwendete Primer und Sonden

Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden (=Probes) sind folgende.<sup>60</sup>

sjTREC Fw Primer	5'–CCATGCTGACACCTCTGGTT–3'
sjTREC Rv Primer	5'–TCGTGAGAACGGT- GAATGAAG–3'
sjTREC Probe	5'–CACGGTGATGCATAGGCACCTGC–3
C $\alpha$ Fw Primer	5'–CCT- GATCCTCTTGTCCCACAG–3'
C $\alpha$ Rv Primer	5'–GGATTTAGAGTCTCTCA GCTGGTACA–3'
C $\alpha$ Probe	5'–ATCCAGAACCCTGACCCTGCCG–3'

Tabelle 2: Primer-Sequenzen

### 3.5.3 Versuchsprotokoll

Während der ganzen Versuchsvorbereitungen muss unter einer Sterilbank gearbeitet werden, um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Sämtliche Vorbereitungen des Mastermix sowie der Patienten-DNA bis zum Transport in den Lightcycler werden auf Eis getätigt, um eine verfrühte Interaktion der Reagenzien zu verhindern. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die TREC-Probe und die C $\alpha$ -Probe lichtempfindlich sind und vor Lichteinwirkung geschützt werden müssen. Jede Patientenprobe wird als Dublette gemessen, um mögliche Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Einfacher Ansatz des Master-Mix für die Real-Time PCR mit Taq-DNA-Polymerase:

TREC-Mastermix (in µl)

H <sub>2</sub> O	6,75
10x PCR Buffer	2
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2
sjTREC Fw Primer (20 pmol/µl)	1
sjTREC Rv Primer (20 pmol/µl)	1
TREC probe (40 pmol/µl)	0,25
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5
dNTPs (0,2 mM)	0,5

**Tabelle 3: TREC-Mastermix (in µl)**

Cα-Mastermix (in µl)

H <sub>2</sub> O	6,75
10x PCR Buffer	2
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2
Cα Fw Primer (20 pmol/µl)	1
Cα Rv Primer (20 pmol/µl)	1
Cα probe (40 pmol/µl)	0,25
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,5
dNTPs (0,2 mM)	0,5

**Tabelle 4: Cα-Mastermix (in µl)**

Pro Ansatz wird im Tube 200 ng Patienten-DNA in 6µl H<sub>2</sub>O vorgelegt und darauf dann 14 µl des Mastermix pipettiert.

Cycler-Protokoll

Denaturierung bei 95.0°C für 3:00 Minuten, danach folgen 50 Zyklen mit 95.0°C für 15 sec und 60.0°C für 1:00 Minute.

### **3.6 Darstellung und Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die Erstellung der Diagramme und Abbildungen erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistik- und Graphikprogramm GraphPad Prism 5.

Mit denselben Programmen wurde die statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt. Es erfolgte die Bildung des Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung, die Berechnung der Standardfunktion, mehrere Gruppenvergleiche sowie deren Signifikanz-Analyse.

Die Signifikanz-Analyse erfolgte mittels der Methode des ungepaarten t-Tests.<sup>66</sup>

## 4 Ergebnisse

Das zentrale Interesse dieser Arbeit galt der Analyse der Immunrekonstitution von pädiatrischen Patienten nach einer Stammzelltransplantation, bei der entweder CD3/CD19-depletierte oder TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletierte Stammzelltransplantate verwendet wurden. Hierzu wurden in der Nachbeobachtungszeit Blutproben analysiert und der Verlauf des TREC-Gehalts zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation dargestellt. Wenn vorhanden wurden ebenfalls Proben vor Transplantation (Vorprobe = V) und Spenderproben (Donor = D) analysiert.

Besonders wichtig war außerdem die Bestimmung des  $T_{\min}$ -Zeitpunktes, also der Tag nach Transplantation, an dem das erste Mal eine positive TREC-Probe gemessen wurde. Um die Immunrekonstitution genauer zu betrachten, wurden zusätzlich FACS-Daten aus demselben Zeitraum ausgewertet und der Verlauf der verschiedenen Zellreihen dargestellt. Alle Daten der beiden Patientengruppen wurden verglichen, um etwaige Unterschiede ausmachen zu können.

Um eine einheitliche und aussagekräftige Darstellung zu erreichen, wurden die Zeitpunkte im Verlauf nach Transplantation in "Wochen nach Transplantation" (Wochen post Tx) zusammengefasst. Die Bestimmung des  $T_{\min}$ -Zeitpunktes erfolgte in "Tage nach Transplantation" (Tage post Tx). Die Zellzahlen wurden in absoluten Zellzahlen/ $\mu\text{l}$  angegeben und der TREC-Gehalt der Proben in  $\text{pg}/\mu\text{l}$  gemessen.

Insgesamt wurden 397 Patientenproben mit der QRT-PCR-Methode analysiert. Durchschnittlich betrug die Nachbeobachtungsdauer 763 Tage (207-2625 Tage). Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 9 Jahre (1-25 Jahre).

Für den Vergleich der zwei Transplantationsmethoden wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Die Patienten, die ein CD3/CD19-depletiertes Transplantat erhalten hatten, sind in der Gruppe A (Patienten 1A-10A)

zusammengefasst, Patienten, die ein TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletiertes Transplantat erhalten hatten, bilden die Gruppe B (Patienten 1B-9B).

Zum Vergleich wurden in einer Kontrollgruppe Proben von nichttransplantierten Patienten und freiwilligen Spendern analysiert. Die Abnahme erfolgte zu einem beliebigen Zeitpunkt, die Spender waren zwischen 2 und 24 Jahre alt.

Die TREC-Analysen aller dargestellten Proben wurden selbstständig im Labor durchgeführt.

#### **4.1 TREC-Analyse der Patientenproben nach Transplantation**

##### **4.1.1 Verlauf der TREC-Werte in den Patienten**

Die folgenden Abbildungen zeigen die Analysen der TREC-Proben der jeweiligen Patienten im Verlauf. Auf der X-Achse sind die Wochen nach Transplantation aufgeführt, zu denen es möglich war, eine Probe zu analysieren. Ebenfalls auf der X-Achse aufgetragen sind die Vorprobe des Patienten vor Transplantation (V) und die Probe des Spenders (D). Die mit ○ markierten Proben wurden manuell von Hand isoliert, die nichtmarkierten Proben wurden maschinell im Chimärismus-Labor isoliert.

Eine zusätzliche Darstellung der Ct-Kurven für den jeweiligen Patienten war leider nicht möglich, da pro Versuchslauf Proben von mehreren Patienten gemeinsam gemessen wurden, je nachdem wie sie zu Verfügung standen.

Die Tabellen zu den jeweiligen Patienten zeigen jedoch die Ct- Werte und die zugehörigen TREC-Werte an den Tagen, an denen TRECs nachgewiesen werden konnten.

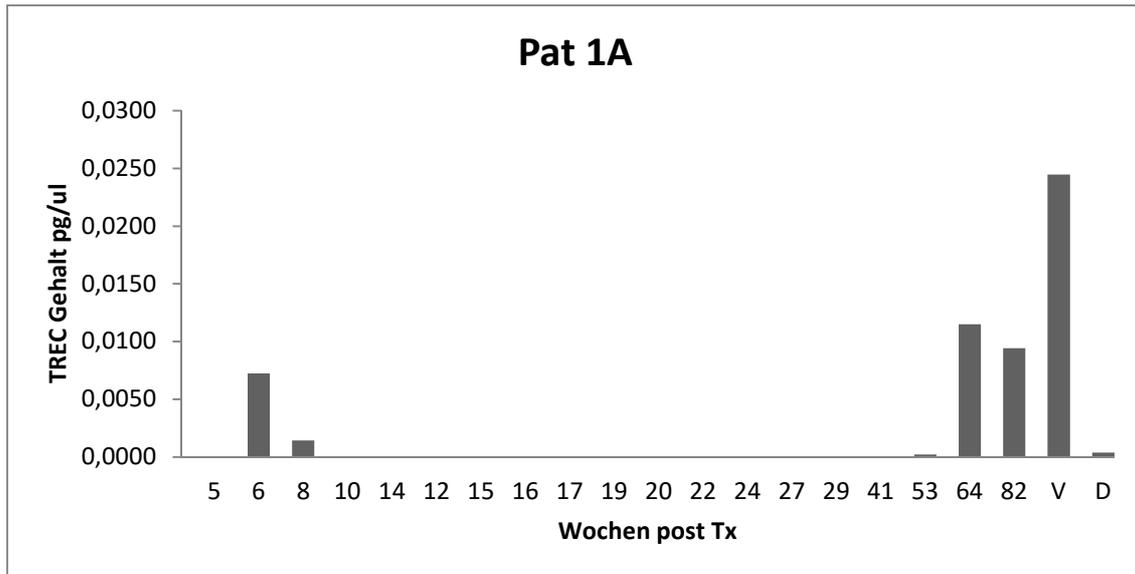


Abbildung 6: TREC-Verlauf Patient 1A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
6	33,31	0,0072
8	36,17	0,0014
53	39,63	0,0002
64	32,49	0,0115
82	32,84	0,0094
Vorprobe (V)	31,16	0,0245
Spender (D)	38,49	0,0004

Tabelle 5: CT-Werte und TREC-Werte Patient 1A

Patient 1A zeigte sehr früh erste positive TREC-Proben mit 0,0072 pg/μl in Woche 6 nach Transplantation, ebenso enthielt die folgende Probe in Woche 8 TRECs. Danach waren die Proben allerdings negativ, erst in Woche 53 ließ sich wieder ein TREC-Gehalt von 0,0002 pg/μl nachweisen. Weitere positive Proben fanden sich in den folgenden Proben von Woche 64 und 82. Die Vorprobe hatte den höchsten TREC-Gehalt, Vorprobe (V) und Spenderprobe (D) waren bei Patient 1A jeweils positiv.

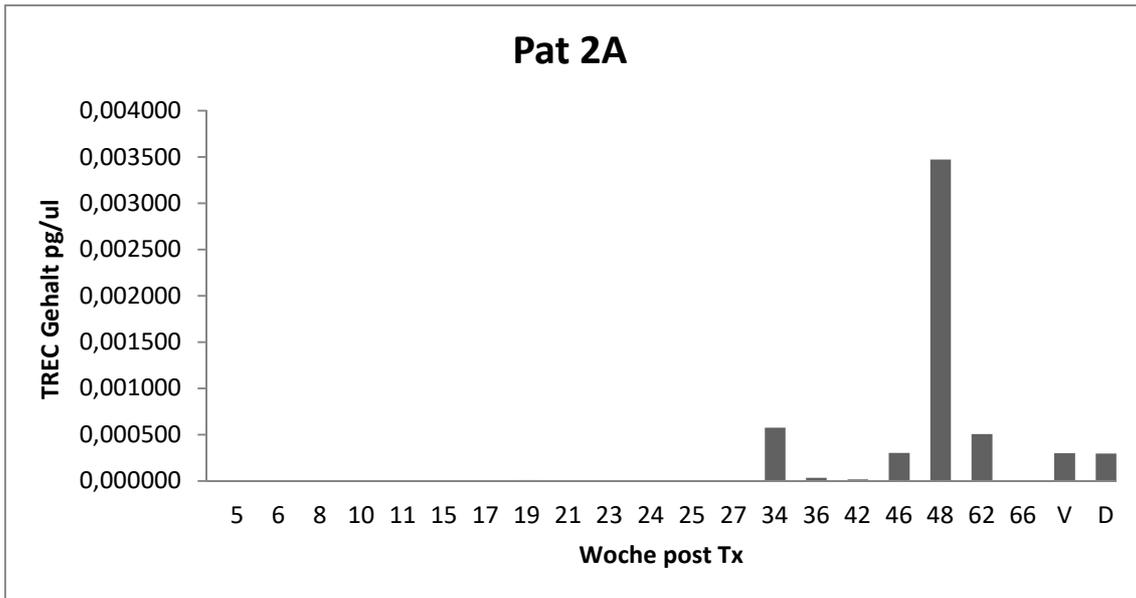


Abbildung 7: TREC-Verlauf Patient 2A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/ul
17	46,16	0,000005
19	45,49	0,000007
21	48,19	0,000002
27	45,71	0,000006
34	37,77	0,000576
36	42,77	0,000034
42	43,98	0,000017
46	38,91	0,000302
48	34,60	0,003473
62	37,99	0,000507
Vorprobe (V)	38,93	0,000298
Spender (D)	38,94	0,000297

Tabelle 6: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 2A

Bei Patient 2A fand sich die erste positive TREC-Probe mit 0,000005 pg/ul in Woche 17, weitere in Woche 19 und 21. Nach einer Lücke konnten in Woche 27 wieder positive TREC-Werte von 0,000006 pg/ul nachgewiesen werden. Vorprobe und Spenderprobe waren jeweils positiv.

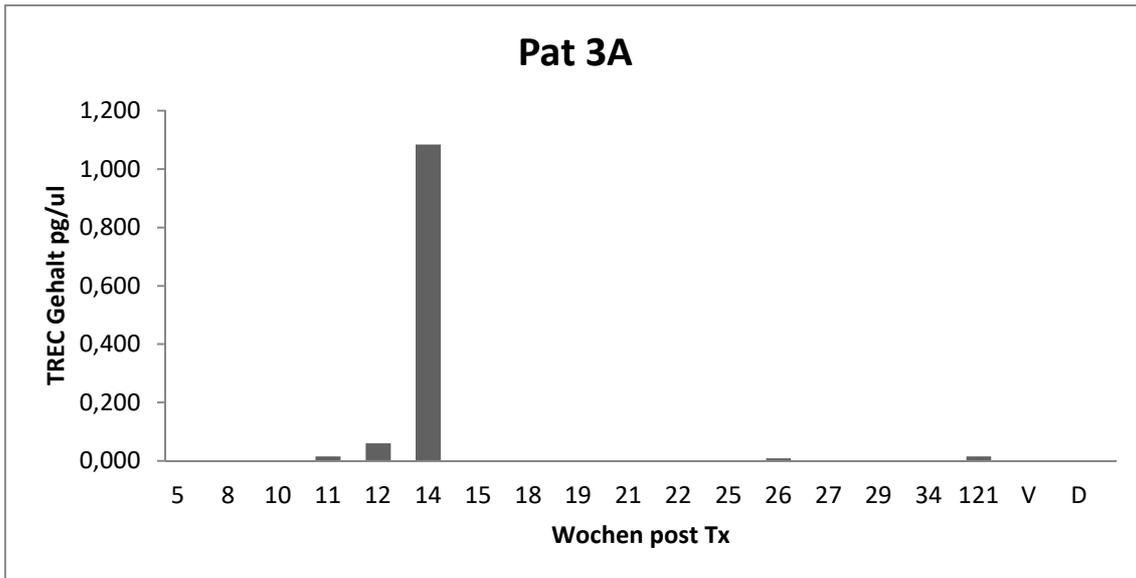


Abbildung 8: TREC-Verlauf Patient 3A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
11	34,18	0,0044
12	29,57	0,0602
14	24,48	1,0838
26	32,91	0,0091
121	37,86	0,0006
Vorprobe (V)	0	0
Spender (D)	0	0

Tabelle 7: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 3A

In Woche 11 konnte bei Patient 3A mit 0,0044 pg/μl die erste positive TREC-Probe gemessen werden. Nachfolgende Proben waren bis Woche 14 positiv, danach zeigte sich eine Lücke und erst in Woche 26 zeigte sich wieder ein vereinzelter positiver TREC-Wert mit 0,0091 pg/μl. Danach konnten erst in Woche 121 wieder TRECs nachgewiesen werden. Vorprobe und Spenderprobe waren beide negativ.

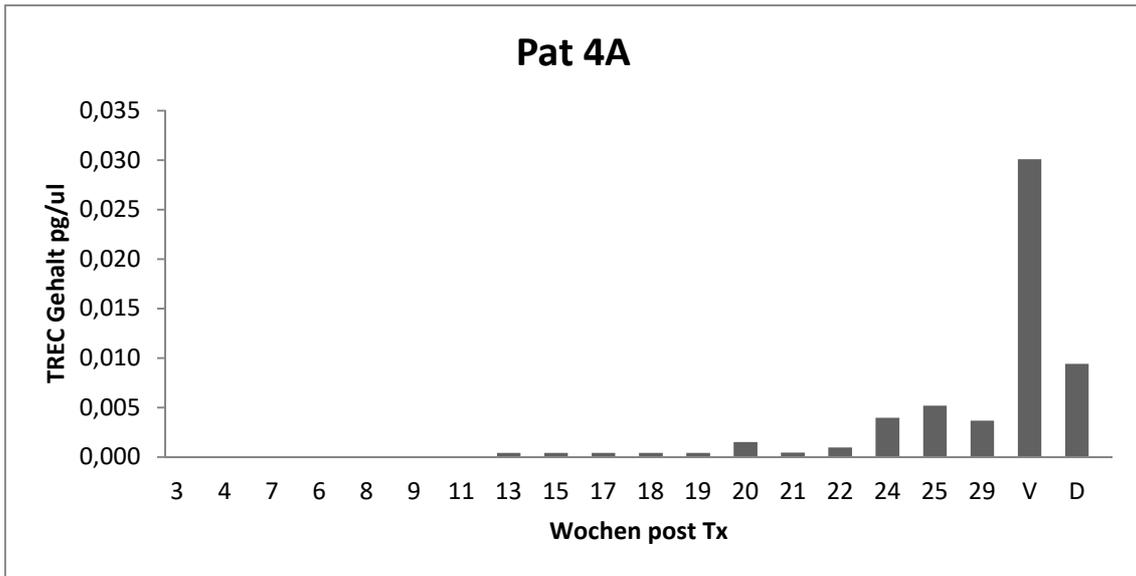


Abbildung 9: TREC-Verlauf Patient 4A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
13	42,77	0,000033
15	41,50	0,000069
17	41,92	0,000054
18	41,81	0,000058
19	49,30	0,000001
20	36,08	0,001497
21	38,27	0,000434
22	38,89	0,000948
24	34,38	0,003940
25	33,90	0,005169
29	34,51	0,003653
Vorprobe (V)	30,80	0,030093
Spender (D)	32,85	0,009403

Tabelle 8: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 4A

Patient 4A zeigte erste positive TREC-Werte in Woche 13 mit 0,000033 pg/μl. Diese blieben durchgehend positiv, schwanken etwas und steigen in Woche 25 bis auf 0,005169 pg/μl an. Vorprobe und Spenderprobe waren beide positiv.

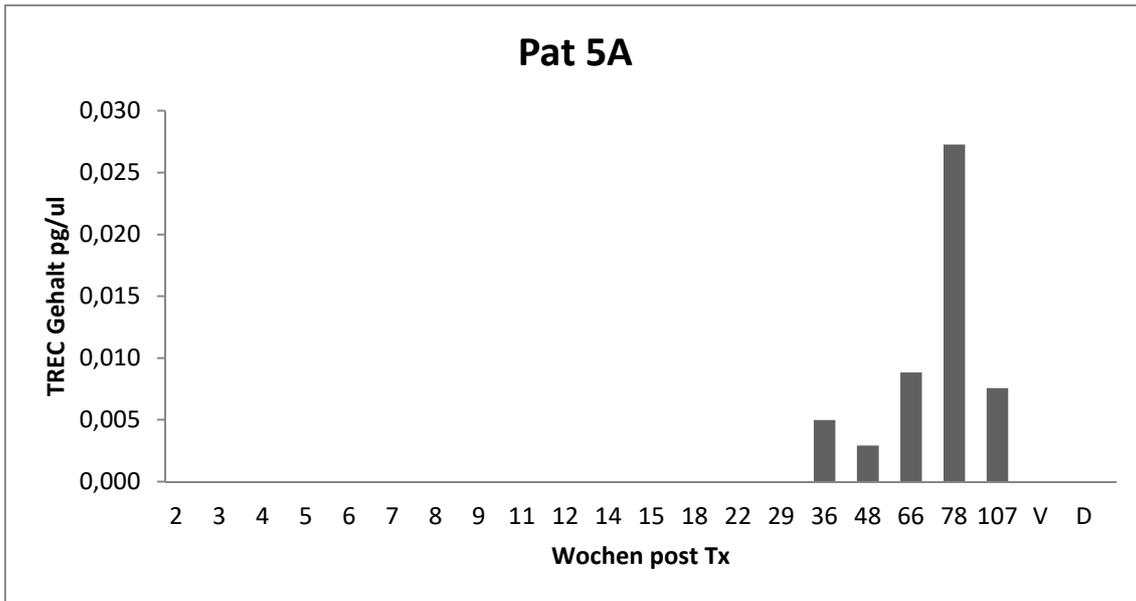


Abbildung 10: TREC-Verlauf Patient 5A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
36	33,96	0,0050
48	34,91	0,0029
66	32,96	0,0088
78	30,97	0,0273
107	33,23	0,0076
Vorprobe (V)	0	0
Spender (D)	0	0

Tabelle 9: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 5A

Bei Patient 5A konnten sehr lange keine TREC-Werte nachgewiesen werden, erst in Woche 36 konnte ein TREC-Gehalt von 0,0050 pg/μl detektiert werden. Die folgenden Proben waren ebenfalls positiv. Vorprobe und Spenderprobe enthielten keine TRECs.

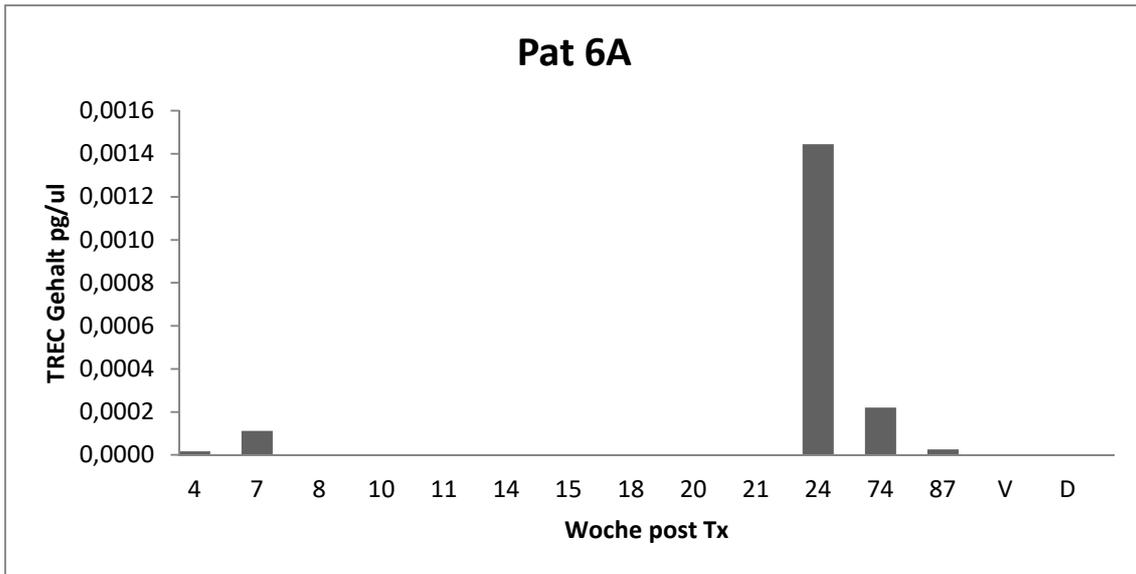
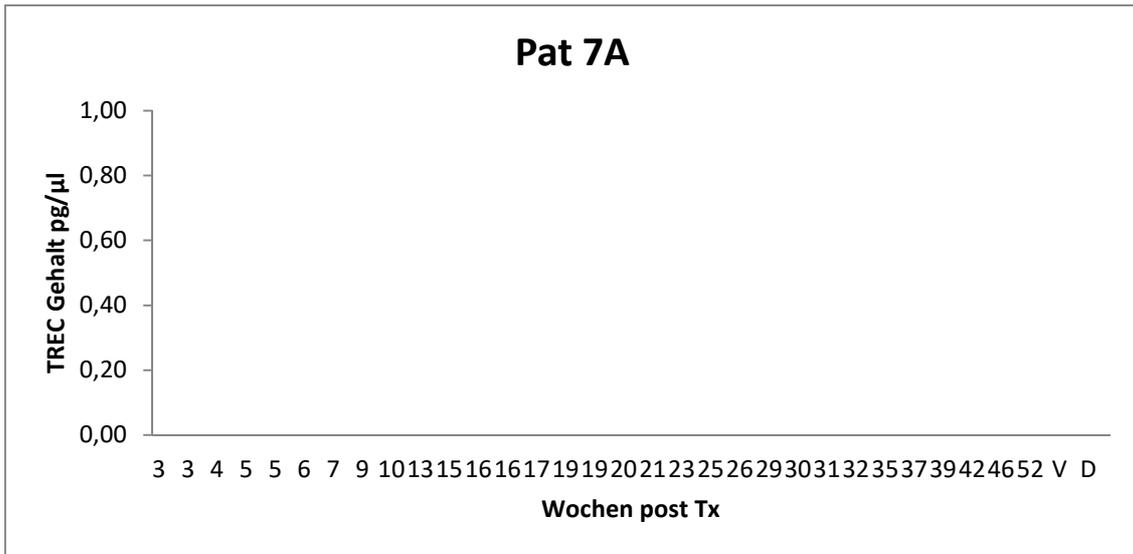


Abbildung 11: TREC-Verlauf Patient 6A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/ $\mu$ l
4	44,01	0,000017
7	40,67	0,000111
11	46,98	0,000003
24	36,15	0,001444
74	39,47	0,000220
87	43,24	0,000026
Vorprobe (V)	0	0
Spender (D)	0	0

Tabelle 10: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 6A

Bei Patient 6A fanden sich die ersten positiven TREC-Werte mit 0,000017 pg/ $\mu$ l in Woche 4. In Woche 7 steigt dieser Wert noch einmal leicht an. Zu diesem Zeitpunkt wurden dem Patient allerdings T-Zellen transfundiert, weswegen dieser Wert kritisch betrachtet werden muss. Weitere TRECs konnten in Woche 11 und dann wieder in Woche 24, 74 und 87 nachgewiesen werden. Vorprobe und Spenderprobe waren beide negativ.



**Abbildung 12: TREC-Verlauf Patient 7A**

Bei Patient 7A konnten zu keinem Zeitpunkt TRECs nachgewiesen werden. Eine Vorprobe war nicht vorhanden und die Spenderprobe war negativ.

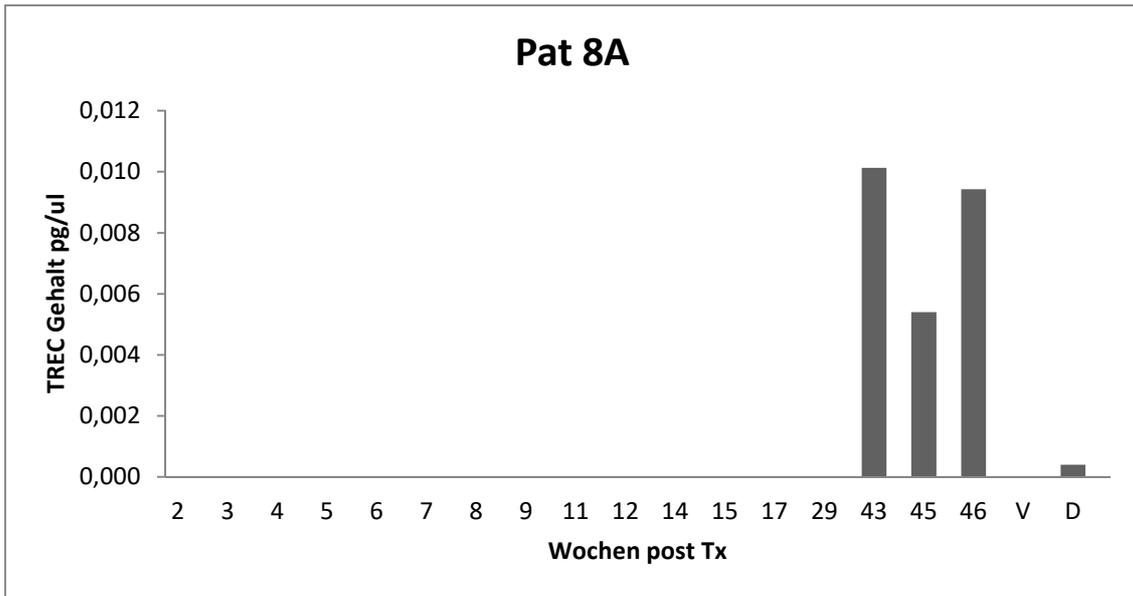


Abbildung 13: TREC-Verlauf Patient 8A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/ul
43	32,72	0,0101
45	33,83	0,0059
46	32,84	0,0094
Vorprobe (V)	0	0
Spender (D)	43,43	0,0004

Tabelle 11: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 8A

Bei Patient 8A fanden sich sehr lange keine positiven TREC-Werte in den Proben der Nachbeobachtungsdauer. Erst in Woche 43 nach Transplantation konnten TRECs nachgewiesen werden, die Probe enthielt 0,0101 pg/ul TREC-DNA. Die Vorprobe war negativ, die Spenderprobe positiv.

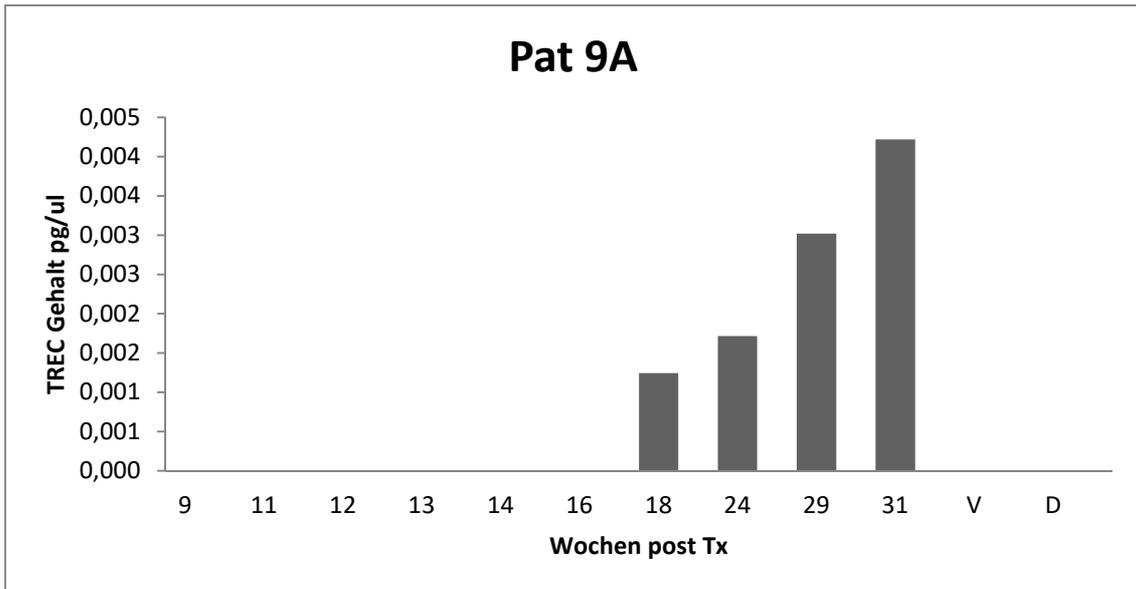


Abbildung 14: TREC-Verlauf Patient 9A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/ul
18	36,41	0,0012
24	35,85	0,0017
29	34,85	0,0030
31	34,26	0,0042
Vorprobe (V)		
Spender (D)		

Tabelle 12: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 9A

Die erste positive TREC-Probe konnte bei Patient 9A in Woche 18 mit 0,0012 pg/ul nachgewiesen werden. Alle weiteren vorhandenen Proben waren ebenfalls positiv und zeigten eine leicht ansteigende Tendenz. Vorprobe und Spenderprobe waren leider nicht vorhanden.

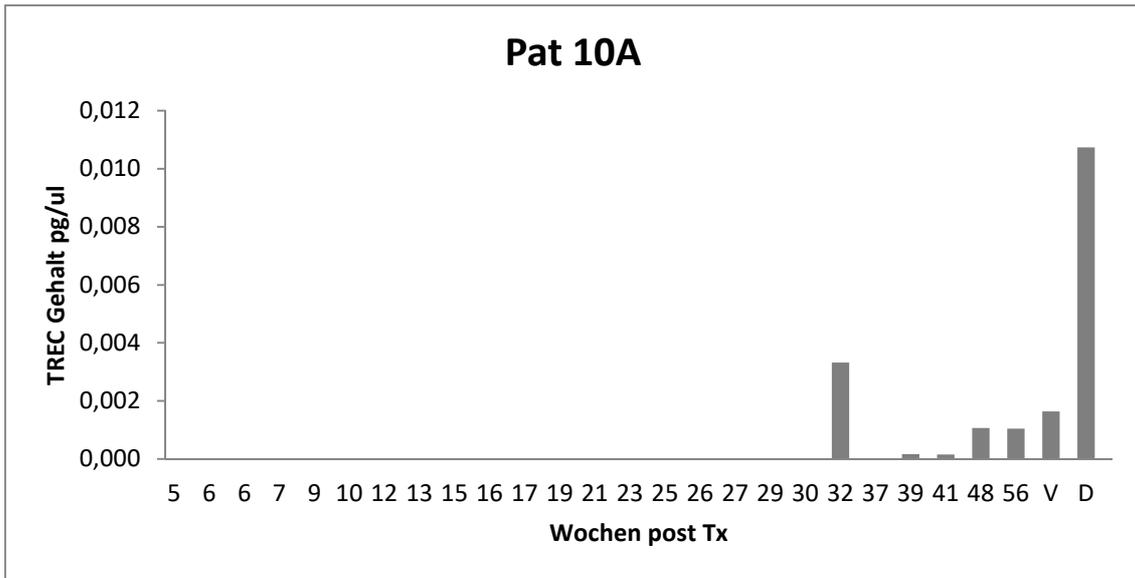


Abbildung 15: TREC-Verlauf Patient 10A

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
32	34,86	0,00332
39	40,03	0,00016
41	42,55	0,00003
48	36,68	0,00107
56	36,71	0,00105
Vorprobe (V)	35,92	0,00164
Spender (D)	32,61	0,01073

Tabelle 13: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 10A

Auch bei Patient 10A konnten erst relativ spät in Woche 32 die ersten TREC-Werte mit 0,00332 pg/μl nachgewiesen werden. In Woche 39, 41, 48 und 56 waren die Werte ebenfalls positiv. Vorprobe und Spenderprobe waren beide positiv.

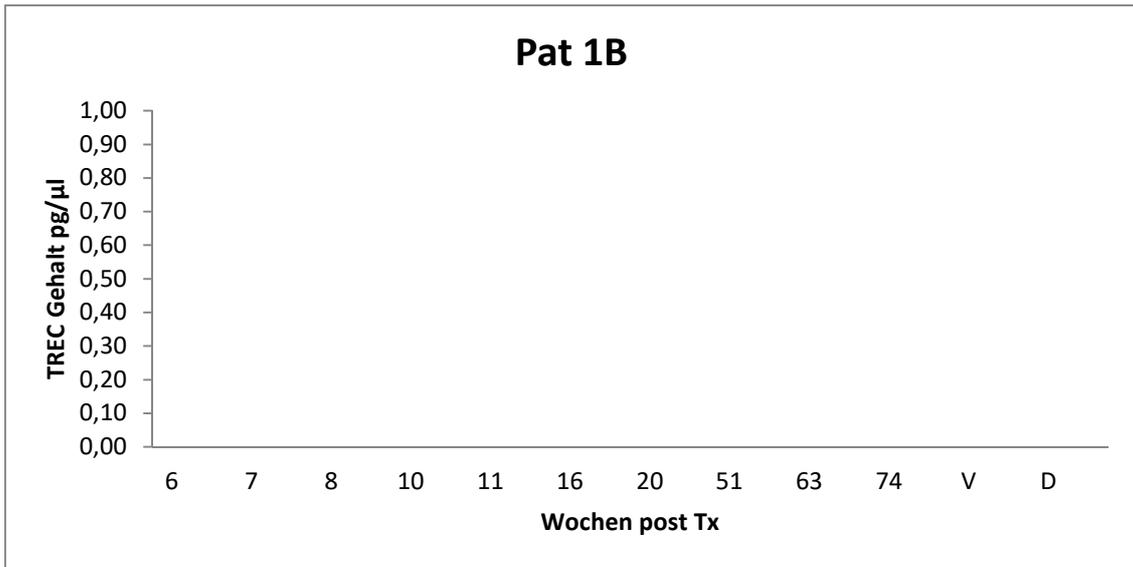


Abbildung 16: TREC-Verlauf Patient 1B

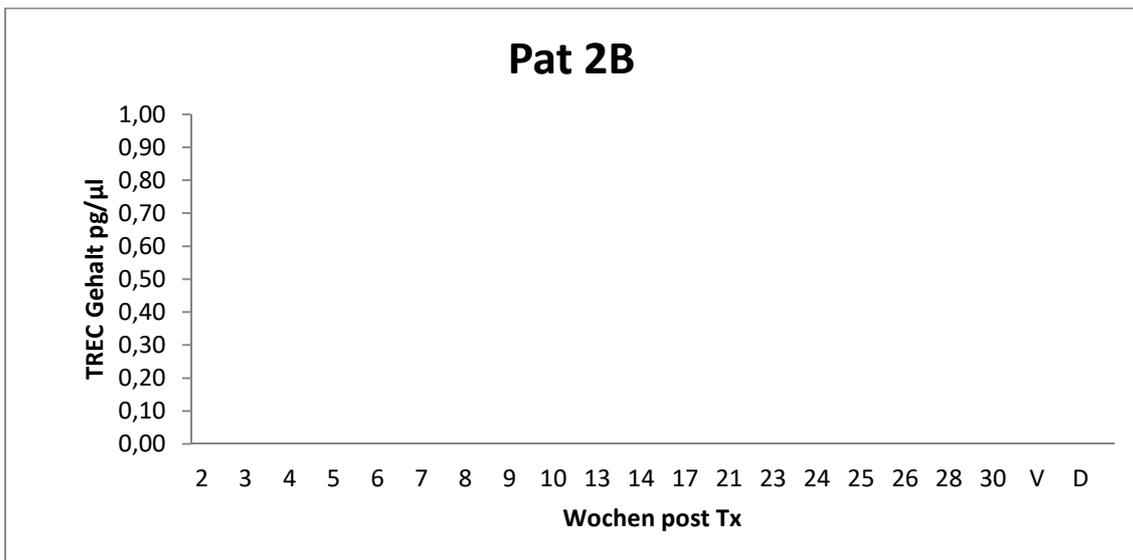


Abbildung 17: TREC-Verlauf Patient 2B

Bei den Patienten 1B und 2B konnten zu keinem Zeitpunkt positive TREC-Proben nachgewiesen werden. Vorprobe und Spenderprobe waren ebenfalls negativ.

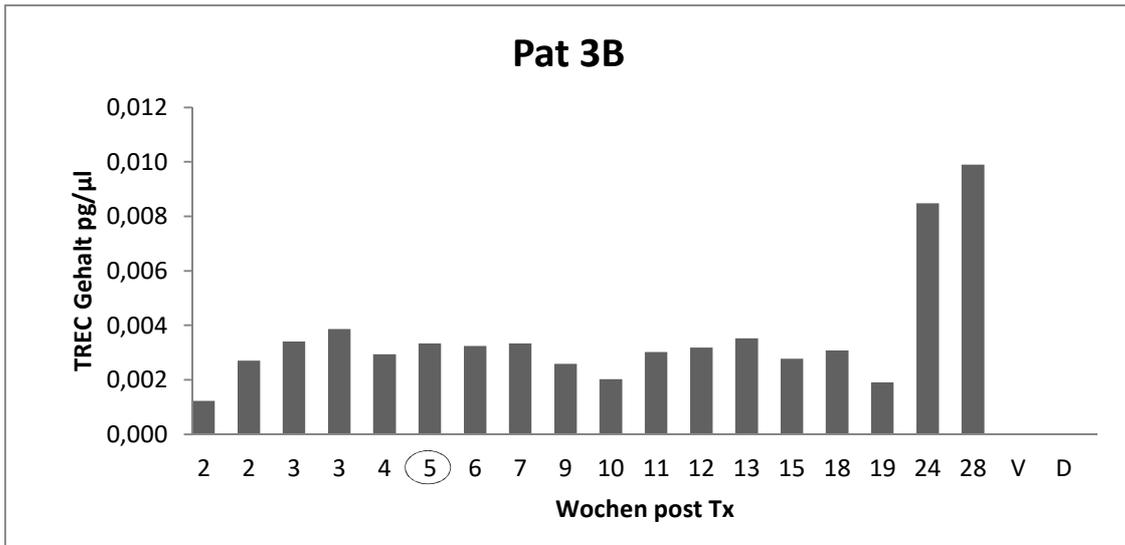


Abbildung 18: TREC-Verlauf Patient 3B, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/µl
2	36,43	0,0012
2	35,04	0,0027
3	34,64	0,0034
3	34,41	0,0039
4	34,89	0,0029
5	34,67	0,0033
6	34,72	0,0032
7	34,67	0,0033
9	35,12	0,0026
10	35,56	0,0020
11	34,85	0,0030
12	34,76	0,0032
13	34,58	0,0035
15	35,00	0,0028
18	34,81	0,0031
19	35,66	0,0019
24	33,03	0,0085
28	32,75	0,0099
Vorprobe (V)		
Spender (D)		

Tabelle 14: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 3B

Bei Patient 3B können in jeder gemessenen TREC-Probe positive Werte nachgewiesen werden. Diese schwanken zwischen 0,0012 pg/µl und 0,0099 pg/µl. Eine Spender oder Vorprobe lag nicht vor.

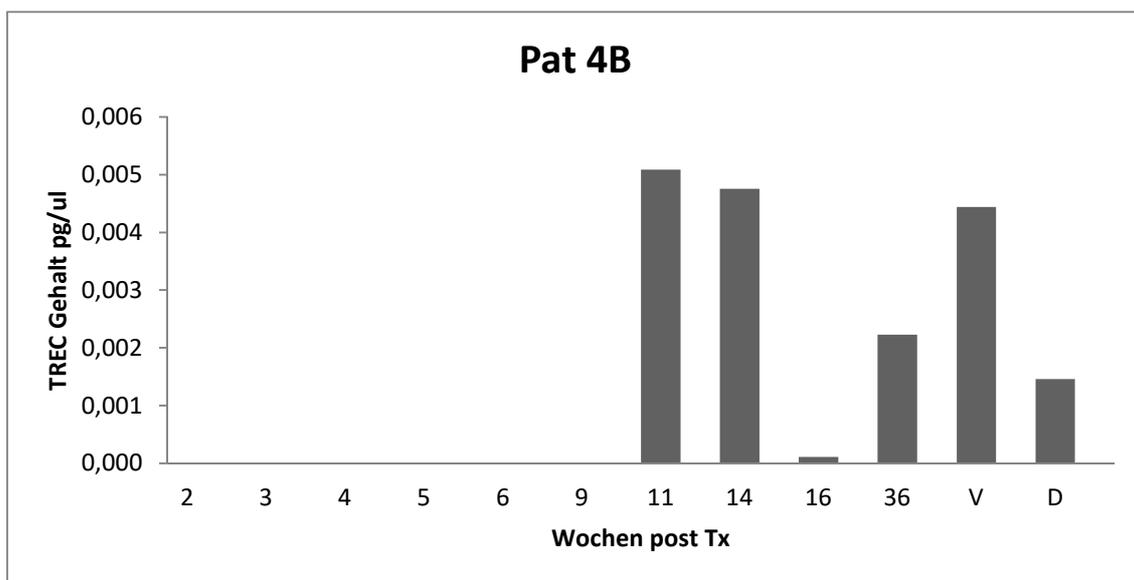


Abbildung 19: TREC-Verlauf Patient 4B

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/µl
11	33,93	0,00509
14	34,05	0,00476
16	43,77	0,00002
36	35,38	0,00223
Vorprobe (V)	34,17	0,00444
Spender (D)	36,13	0,00146

Tabelle 15: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 4B

Bereits in Woche 11 der Nachbeobachtungsdauer zeigte sich bei Patient 4B die erste positive TREC Probe mit 0,00509 pg/µl. In allen folgenden gemessenen Proben ließen sich positive Werte nachweisen. Vorprobe und Spenderprobe waren jeweils positiv.

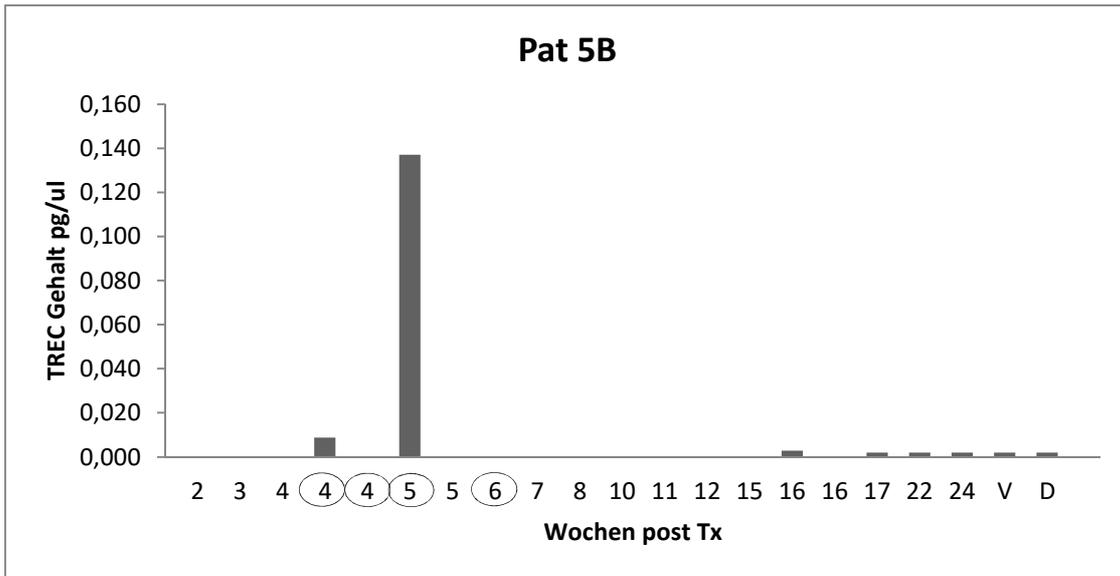


Abbildung 20: TREC-Verlauf Patient 5B, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
4	32,97	0,008739
5	28,12	0,137077
16	34,95	0,002851
17	47,97	0,000002
22	43,27	0,000025
24	47,80	0,000002
Vorprobe (V)	39,15	0,000263
Spender (D)	36,81	0,000993

Tabelle 16: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 5B

Patient 5B zeigte bereits in Woche 4 und 5 die ersten positiven TREC-Proben mit 0,008739 pg/μl und 0,137077 pg/μl. Bis Woche 16 waren alle weiteren Proben negativ. In Woche 16 konnte wieder ein Wert von 0,002851 ng/μl nachgewiesen werden, ebenso zeigten sich positive Werte in den folgenden Proben. Vorprobe und Spenderprobe waren positiv.

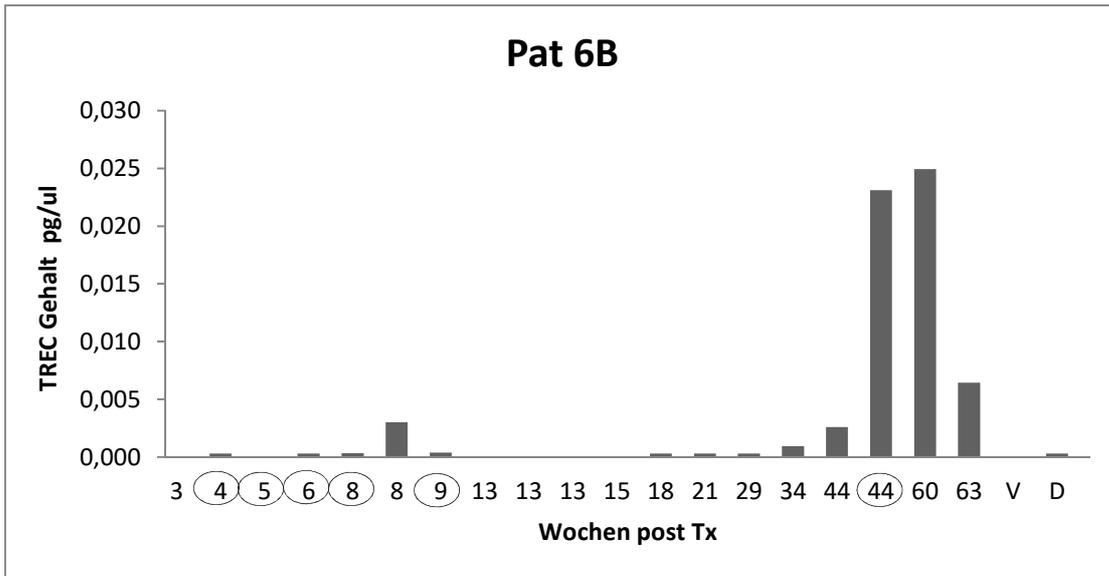


Abbildung 21: TREC-Verlauf Patient 6B, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/ul
4	50,79	0,00000004
6	48,26	0,00000015
8	38,80	0,0003202
8	50	0,00000005
9	38,57	0,0003667
18	43,16	0,0000271
21	39,63	0,0002006
29	44,35	0,0000138
34	36,91	0,0009369
44	35,13	0,0025785
44	31,26	0,0231242
60	31,13	0,0249478
63	33,51	0,0064373
Vorprobe (V)		
Spender (D)	49,09	0,0000009

Tabelle 17: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 6B

Auch Patient 6B zeigte früh positive Werte in den Wochen 4-9. Danach war allerdings erst wieder ein TREC-Nachweis in Woche 18 möglich. Alle weiteren vorhandenen Proben waren positiv. Der höchste Wert konnte in Woche 60 mit

0,0249478 pg/µl gemessen werden. Eine Vorprobe war nicht vorhanden, die Spenderprobe war positiv.

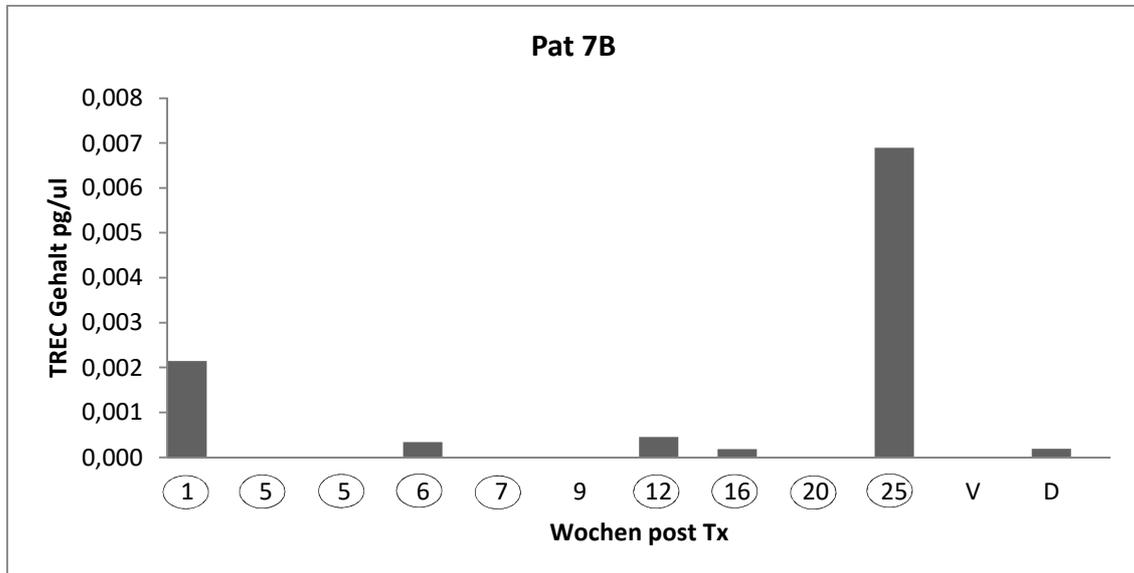


Abbildung 22: TREC-Verlauf Patient 7B, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/µl
1	32,97	0,008739
5	28,12	0,137077
16	34,95	0,002851
17	47,97	0,000002
22	43,27	0,000025
24	47,80	0,000002
Vorprobe (V)	39,15	0,000263
Spender (D)	36,81	0,000993

Tabelle 18: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 7B

Bereits in der ersten Woche nach Transplantation konnte ein positiver TREC-Wert von 0,008739 pg/µl gemessen werden, ebenso in Woche 6. Nach einigen negativen Proben waren in Woche 12 wieder positive Werte nachzuweisen. Die Vorprobe war negativ, in der Spenderprobe konnten TRECs nachgewiesen werden.

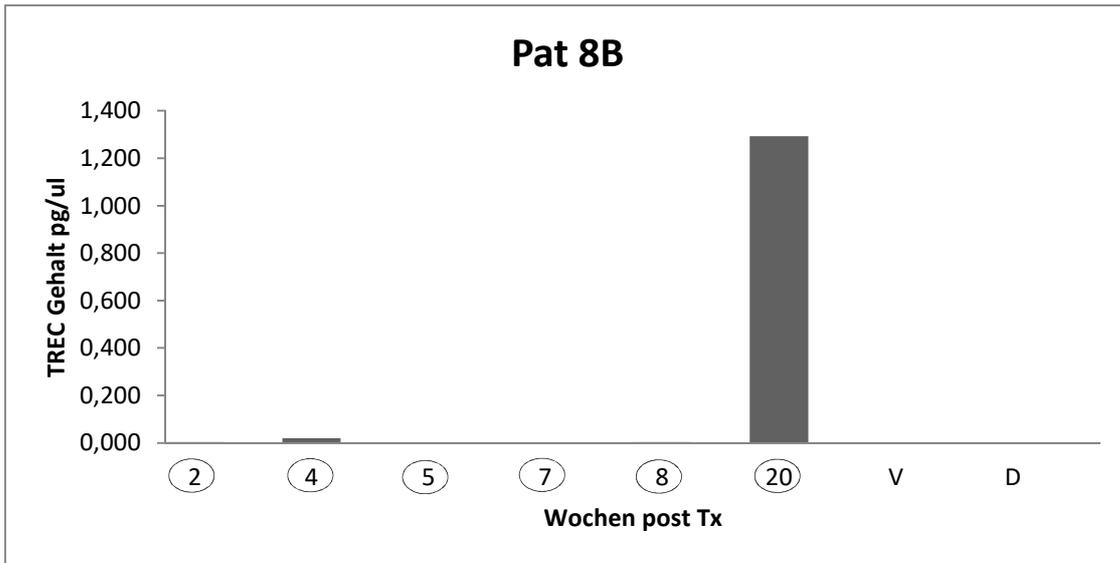


Abbildung 23: TREC-Verlauf Patient 8B, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
2	34,66	0,0034
4	31,54	0,0197
5	37,95	0,0005
7	37,82	0,0006
8	34,27	0,0042
20	24,17	1,2932
Vorprobe (V)		
Spender (D)		

Tabelle 19: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 8B

Alle vorhandenen Proben in der Nachbeobachtungszeit zeigten positive TREC-Werte, diese schwankten zwischen 0,0005 pg/μl und 1,2932 pg/μl. Eine Vorprobe oder Spenderprobe war nicht vorhanden.

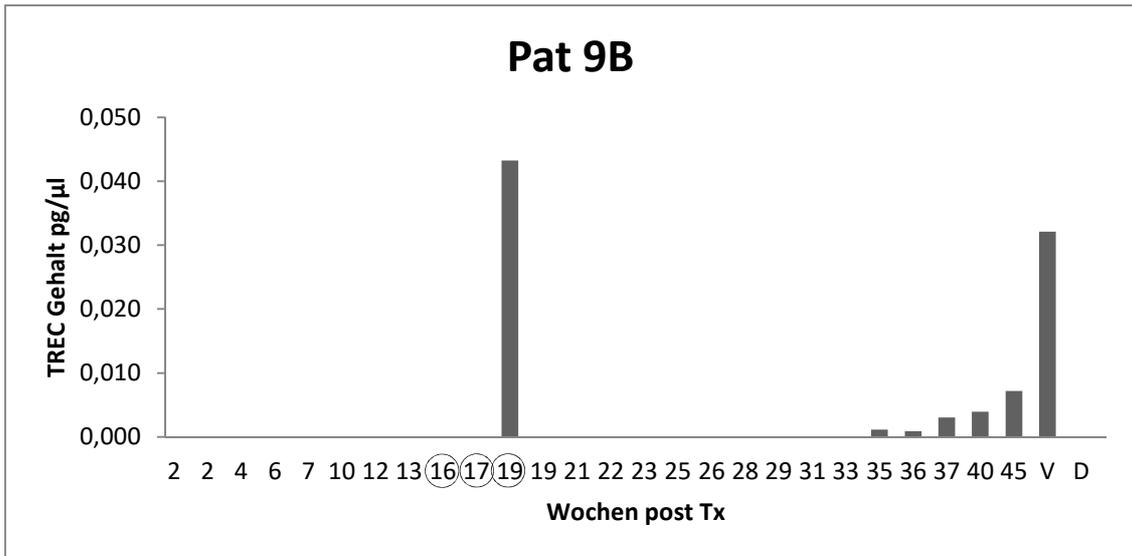


Abbildung 24: TREC-Verlauf Patient 9B, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/µl
19	30,16	0,043262
31	48,77	0,000001
33	41,35	0,000076
35	36,57	0,001134
36	37,02	0,000879
37	34,83	0,003050
40	34,37	0,003958
45	33,31	0,007210
Vorprobe (V)	30,68	0,032115
Spender (D)	0	0

Tabelle 20: Ct-Werte und TREC-Werte Patient 9B

Patient 9B zeigt lange keine positiven TREC-Werte, erst in Woche 19 nach Transplantation kann ein TREC-Wert von 0,043262 pg/µl gemessen werden. Nach weiteren negativen Proben finden sich in Woche 32-45 durchgehend positive Proben. Die Vorprobe war positiv, die Spenderprobe negativ.

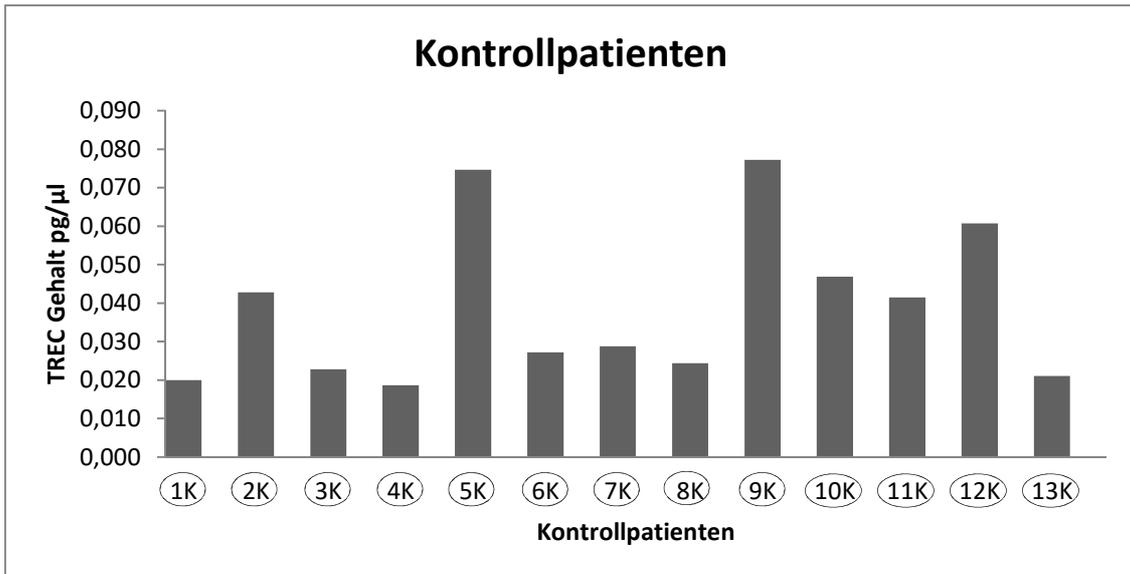


Abbildung 25: TREC-Werte der Kontrollpatienten, ○ = manuell isolierte Proben

Wochen post Tx	Ct-Werte	TREC Gehalt in pg/μl
1K	31,52	0,0200
2K	30,17	0,0428
3K	31,29	0,0227
4K	31,64	0,0186
5K	29,19	0,0746
6K	30,98	0,0271
7K	30,87	0,0287
8K	31,17	0,0244
9K	29,13	0,0772
10K	30,01	0,0470
11K	30,23	0,0415
12K	29,56	0,0607
13K	31,42	0,0211

Tabelle 21: Ct-Werte und TREC-Werte der Kontrollpatienten

Die TREC-Werte der Kontrollpatienten waren zwischen 0,0186 pg/μl - 0,0772 pg/μl zu messen. Alle Proben waren positiv.

#### 4.1.2 T<sub>min</sub>

Besonders wichtig in den durchgeführten Untersuchungen war der T<sub>min</sub>-Zeitpunkt. Dieser bezeichnet den ersten Zeitpunkt, an dem zum ersten Mal ein positiver TREC-Wert nach Transplantation nachweisbar ist.

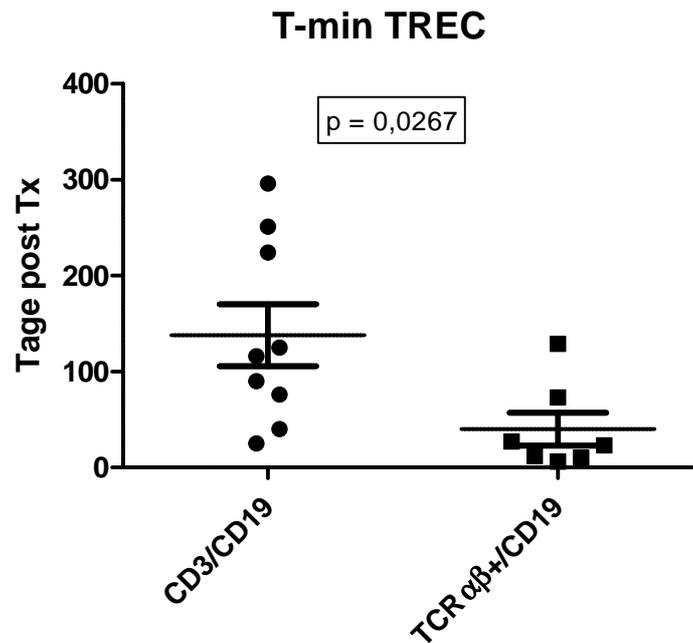


Abbildung 26: Darstellung des T<sub>min</sub>-Zeitpunktes im Vergleich der beiden Gruppen in Tagen nach Transplantation; n(CD3/CD19) = 9, n(TCRαβ+/CD19) = 7

	CD3/CD19-depletiert		TCRαβ+/CD19-depletierte
Patient 1A	40	Patient 1B	-
Patient 2A	116	Patient 2B	-
Patient 3A	76	Patient 3B	10
Patient 4A	90	Patient 4B	73
Patient 5A	251	Patient 5B	23
Patient 6A	25	Patient 6B	27
Patient 7A	-	Patient 7B	6
Patient 8A	296	Patient 8B	12
Patient 9A	125	Patient 9B	129
Patient 10A	224		
Durchschnitt	138,1 (± 32,12)		40,00 (± 17,12)

Tabelle 22: T<sub>min</sub> der einzelnen Patienten in Tage post Tx

Bei der Bestimmung des  $T_{\min}$ -Zeitpunktes zeigt sich zwischen den zwei Untersuchungsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,0267$ ). Im Durchschnitt lässt sich in Gruppe A an Tag 139 (22-296) der erste positive TREC-Wert nachweisen, in Gruppe B an Tag 40 (6-129). In Gruppe B lässt sich also deutlich früher die „de novo“-Genese von T-Zellen nachweisen.

#### 4.1.3 Analyse $T_{\min}$ in Abhängigkeit der Spenderprobe.

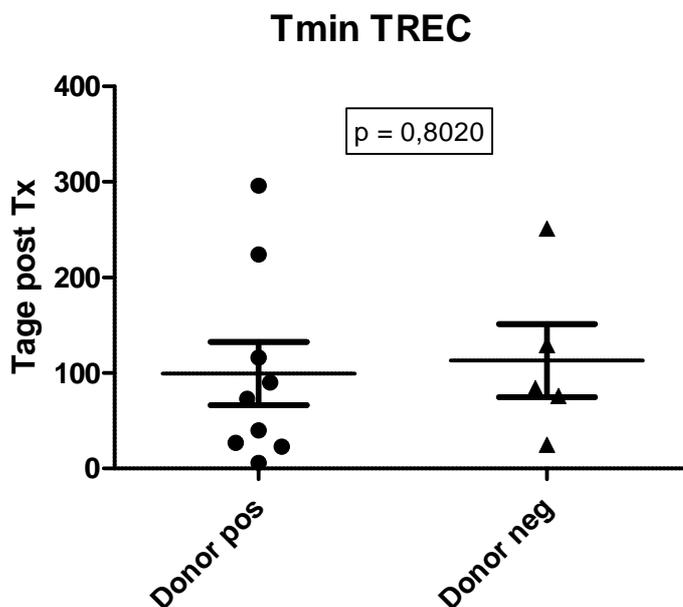


Abbildung 27: Analyse  $T_{\min}$  in Abhängigkeit der Spenderprobe;  $n(\text{Donor pos}) = 9$ ,  $n(\text{Donor neg}) = 5$

Da nicht bei allen Patienten eine Spenderprobe bzw. Vorprobe vorhanden war, konnte nur gruppenübergreifend eine Analyse des Einflusses einer positiven oder negativen Spenderprobe durchgeführt werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,802$ ) des Zeitpunktes  $T_{\min}$  in Abhängigkeit von den Spenderproben nachgewiesen werden. Bei positiven Spenderproben konnte durchschnittlich an Tag 100 die ersten positiven TREC-Werte gemessen werden, bei negativen Spenderproben an Tag 113.

## **4.2 Rekonstitution der einzelnen Zellreihen in Kombination mit den gemessenen TREC-Ereignissen**

Zuerst sind die jeweiligen Rekonstitutionsverläufe der verschiedenen Zellreihen der einzelnen Patienten aufgezeigt. In den jeweiligen Verlaufsdarstellungen sind außerdem positive TREC-Proben eingezeichnet sowie deren TREC-Gehalt. Dies bietet unter Umständen Aussagemöglichkeiten über die erhobenen Daten in Hinblick auf die Unterscheidung von peripherer Zellexpansion oder „de novo“-Generierung von T-Zellen. Um die beiden Gruppen vergleichen zu können wurden an Tag 25, 50, 100, 150, 200 und 250 die Absolutzahlen von Leukozyten (WBC) und CD3<sup>+</sup>-T-Zellen erhoben und auf eine statistische Signifikanz der Unterschiede überprüft.

### **4.2.1 Zeitlicher Verlauf der Rekonstitution der Zellreihen und des TREC-Gehalts im Peripherblut der einzelnen Patienten**

Eine einheitliche Darstellung der Verläufe der einzelnen Zellreihen gestaltete sich aufgrund der großen Varianz der Zellzahlen als schwierig. Ein genaues Beachten der Achsenbeschriftung ist daher beim Betrachten der Schaubilder wichtig.

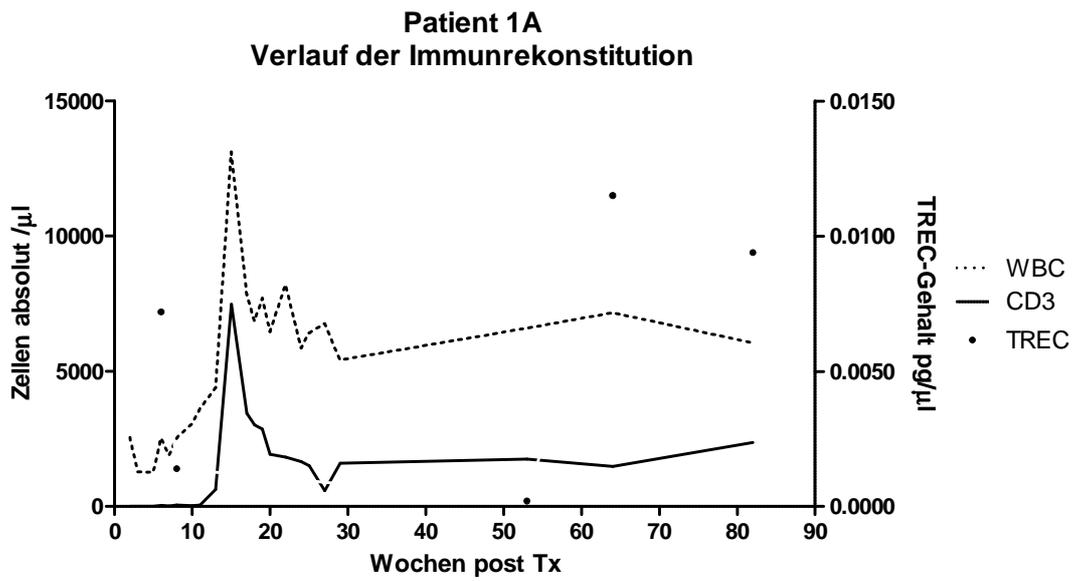


Abbildung 28: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 1A

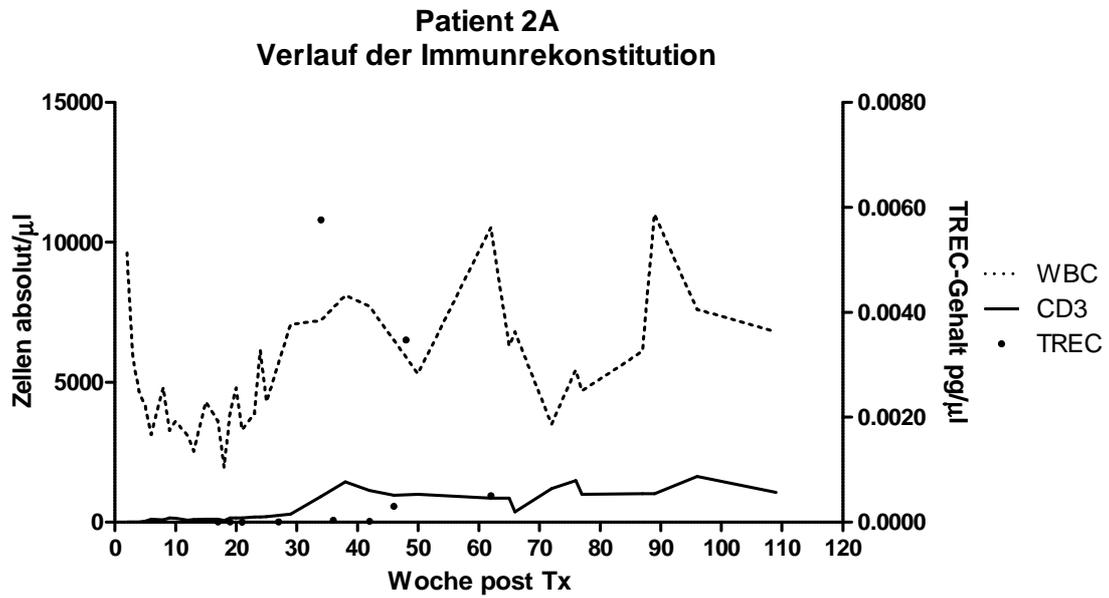


Abbildung 29: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 2A

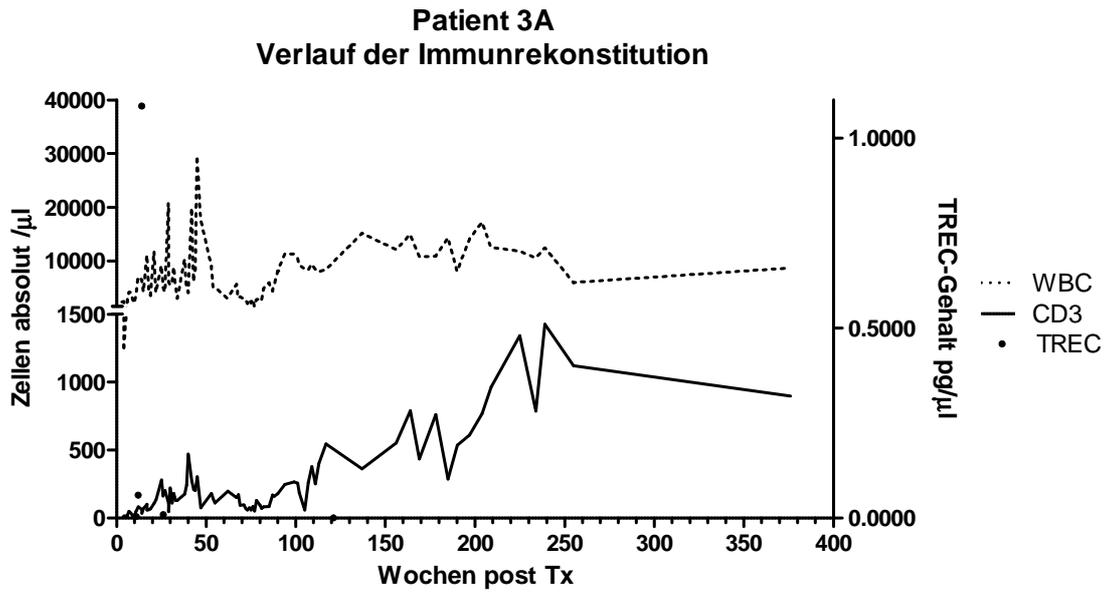


Abbildung 30: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 3A

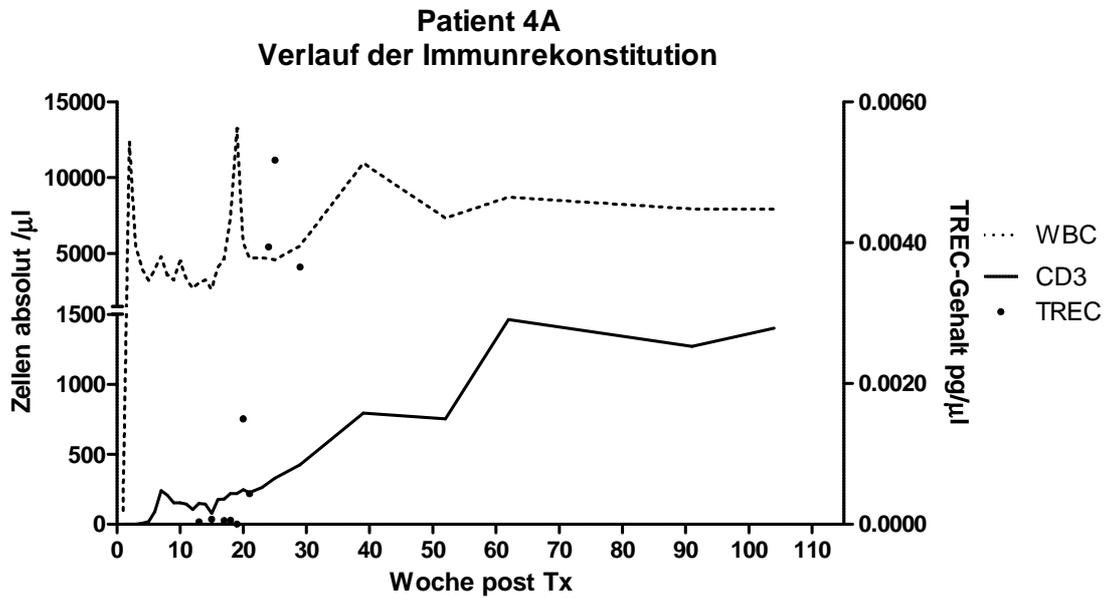


Abbildung 31: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 4A

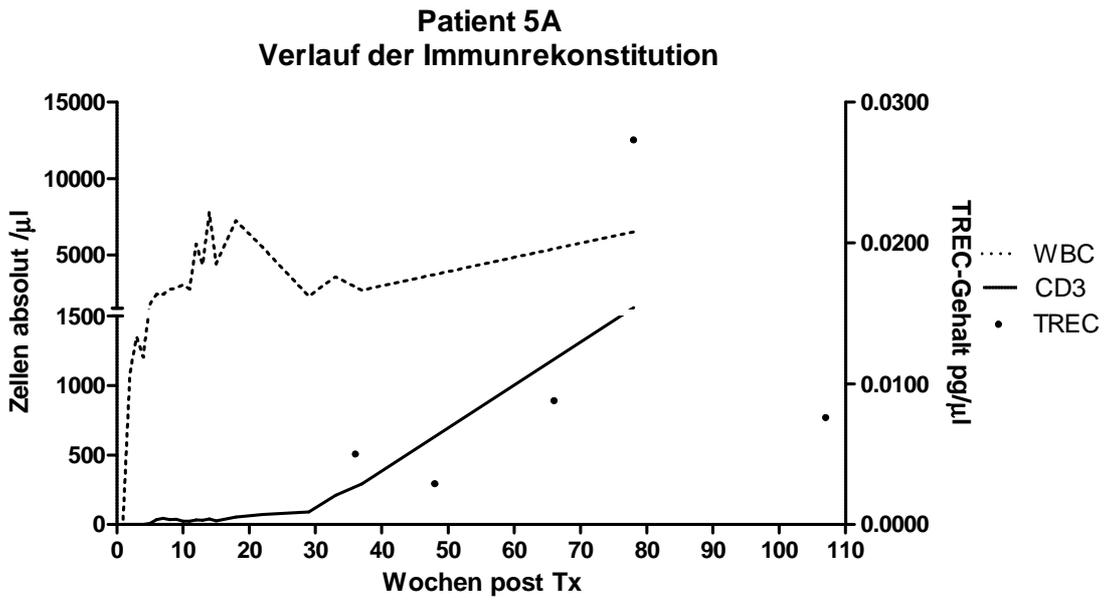


Abbildung 32: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 5A

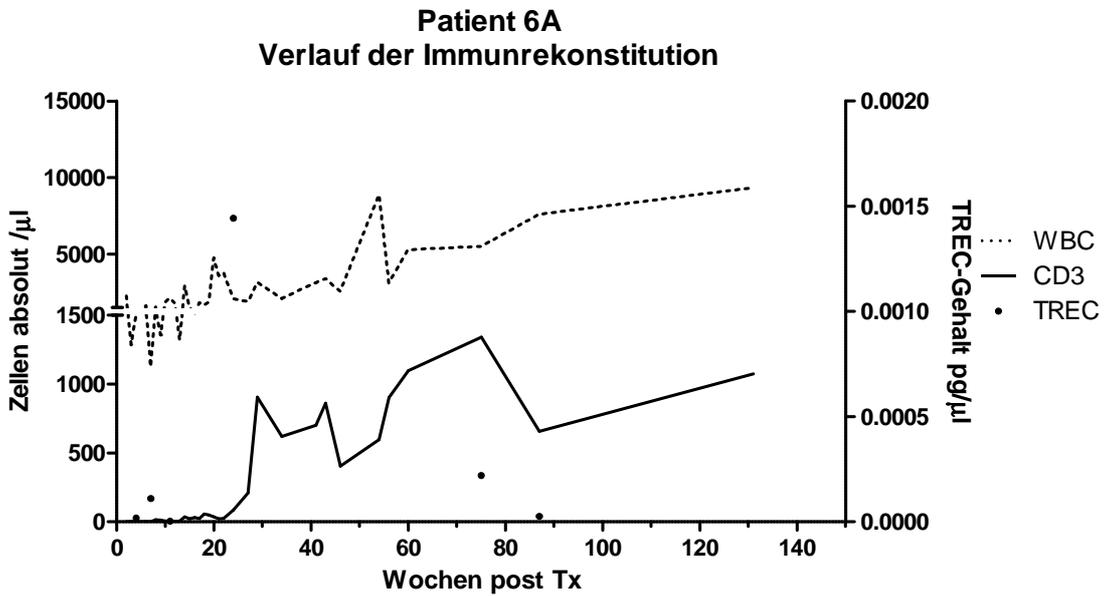


Abbildung 33: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 6A

**Patient 7A**  
**Verlauf der Immunrekonstitution**

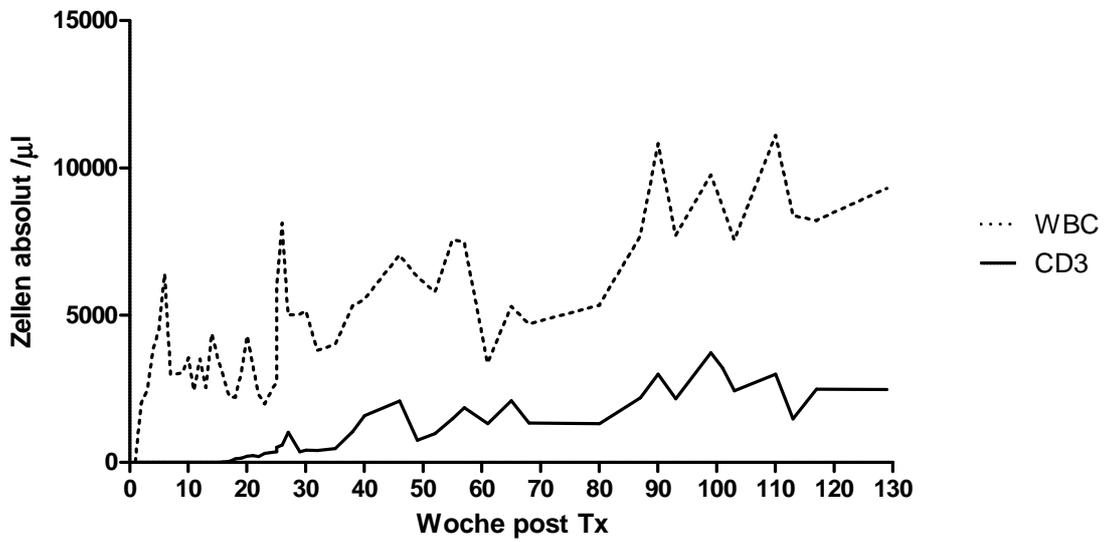


Abbildung 34: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 7A

**Patient 8A**  
**Verlauf der Immunrekonstitution**

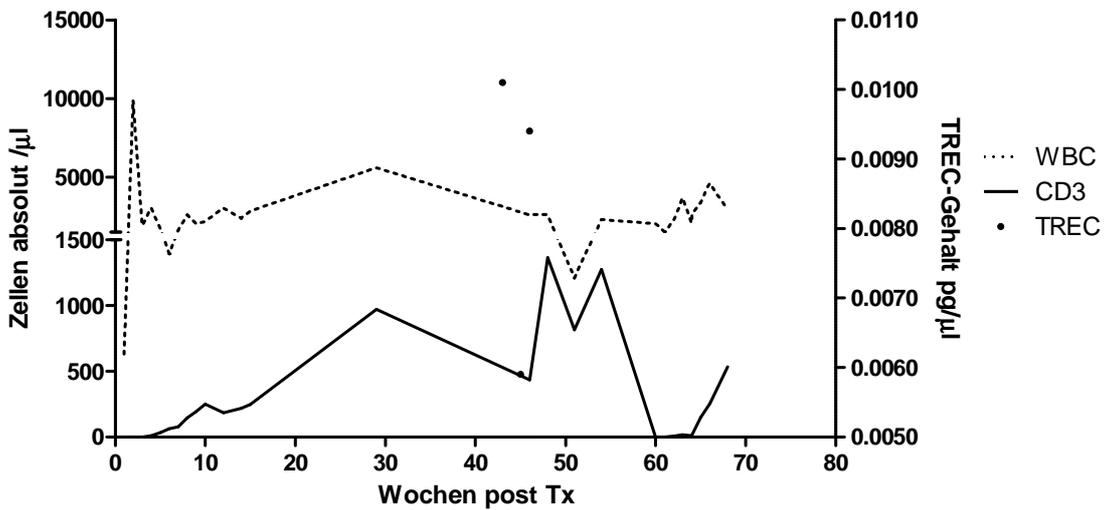


Abbildung 35: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 8A

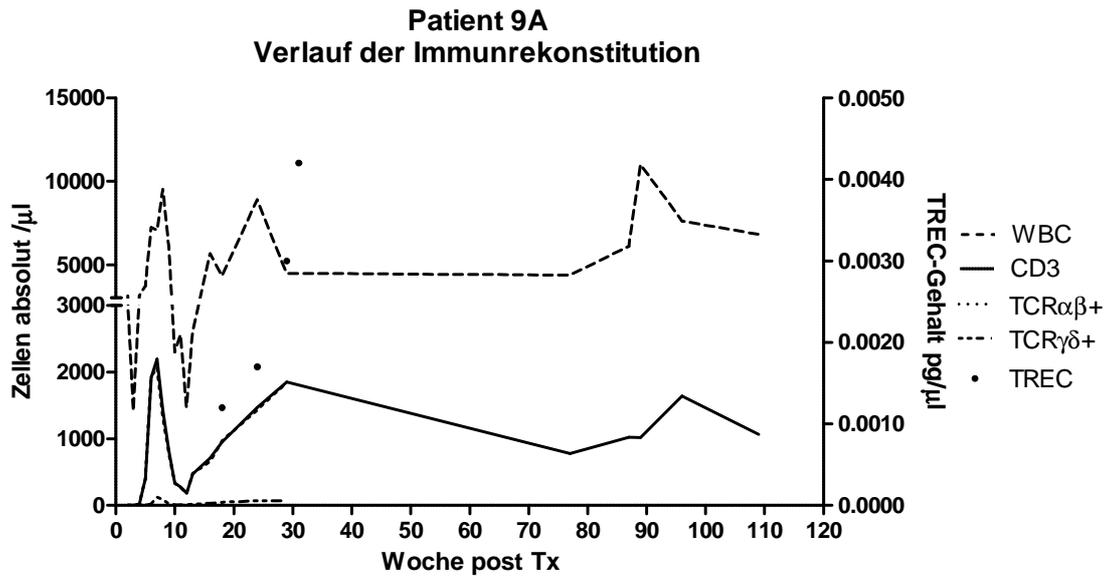


Abbildung 36: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 9A

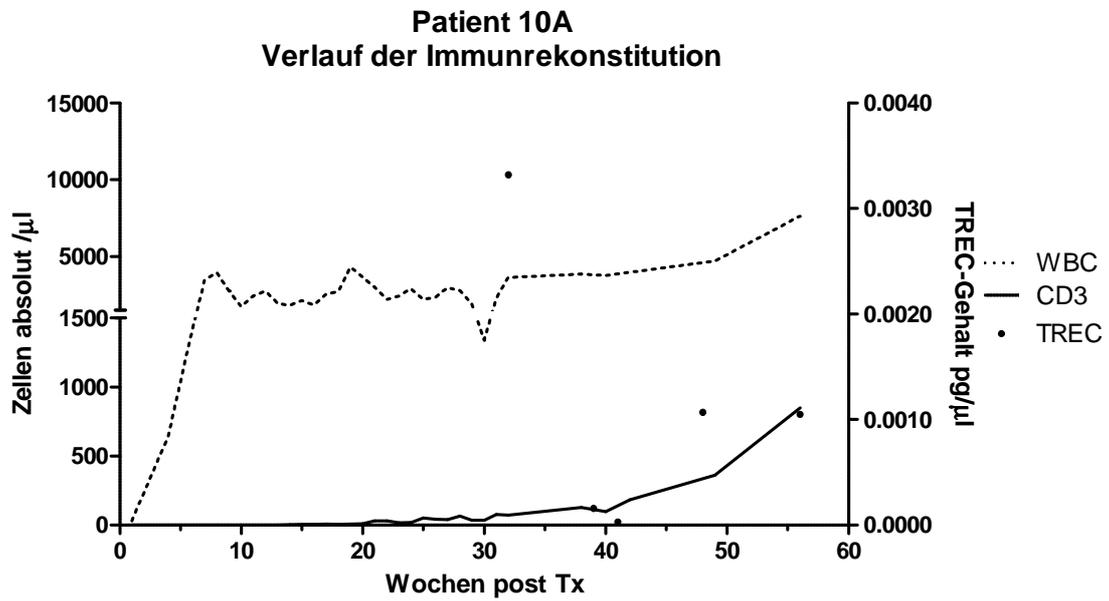


Abbildung 37: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 10A

Unter den Patienten der Gruppe A zeigen sich individuell sehr unterschiedliche Zellverläufe. Allen Patienten gemeinsam ist ein rascher Anstieg der Leukozyten (WBC) in den ersten Wochen nach Transplantation, wohingegen die Regeneration der CD3<sup>+</sup>-Zellen erst mehrere Wochen später einsetzt.

Die Marke von >200 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l wird im Durchschnitt an Tag 147 (34-340) bzw. in Woche 22 überschritten.

Die Anzahl an Leukozyten steigt durchschnittlich schon an Tag 53 (12-138) bzw. in Woche 8 über die Grenze von 4000 Leukozyten/ $\mu$ l Blut.

Beim ersten Auftreten von positiven TREC-Werten sind bei allen Patienten CD3<sup>+</sup>-Zellen nachzuweisen. Bei Pat. 6A jedoch sind zu diesem Zeitpunkt in den FACS-Analysen keine CD3<sup>+</sup>-Zellen zu detektieren, allerdings waren in den analysierten Proben C $\alpha$ -Werte nachzuweisen. Als Erklärung hierfür wäre es denkbar, dass die Anzahl der T-Zellen so gering war, dass der Nachweis nicht in der FACS-Analyse, jedoch auf molekularer Ebene möglich war.

In den Abbildungen 28-37 ist zu sehen, dass positive TREC-Werte im Zeitverlauf und von Patient zu Patient sehr inhomogen verteilt sind. Es lässt sich jedoch beobachten, dass TRECs häufig vor oder während einem deutlichen Zellzahlanstieg zu messen sind. Eine Korrelation lässt sich jedoch nicht nachweisen.

**Patient 1B**  
**Verlauf der Immunrekonstitution**

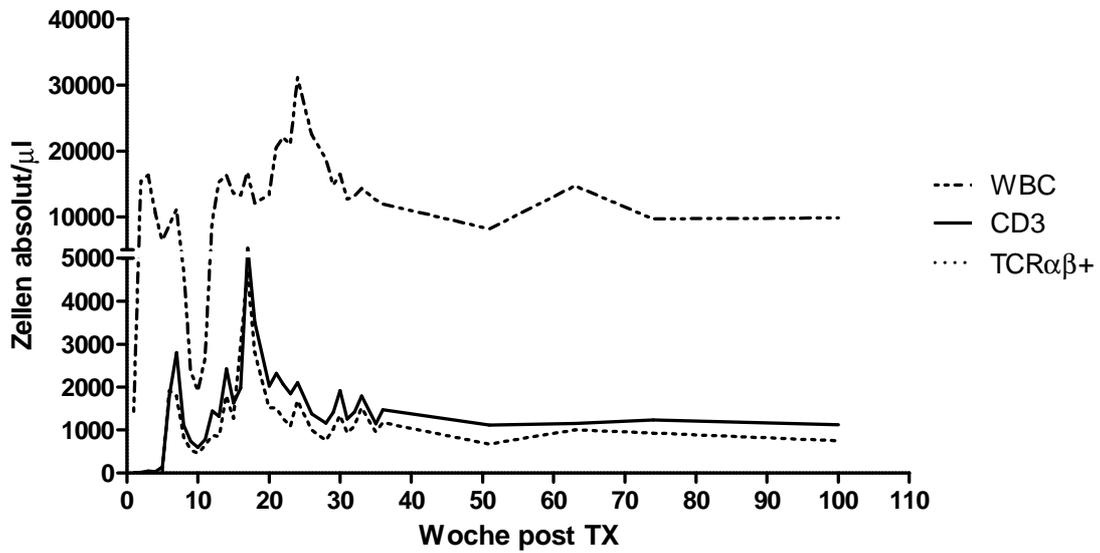


Abbildung 38: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 1B

**Patient 2B**  
**Verlauf der Immunrekonstitution**

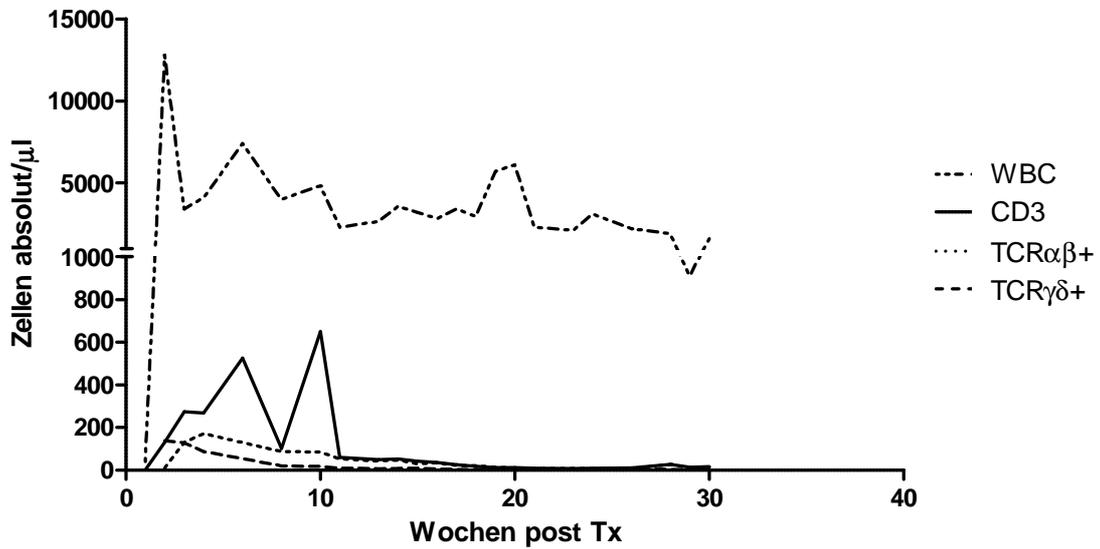


Abbildung 39: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 2B

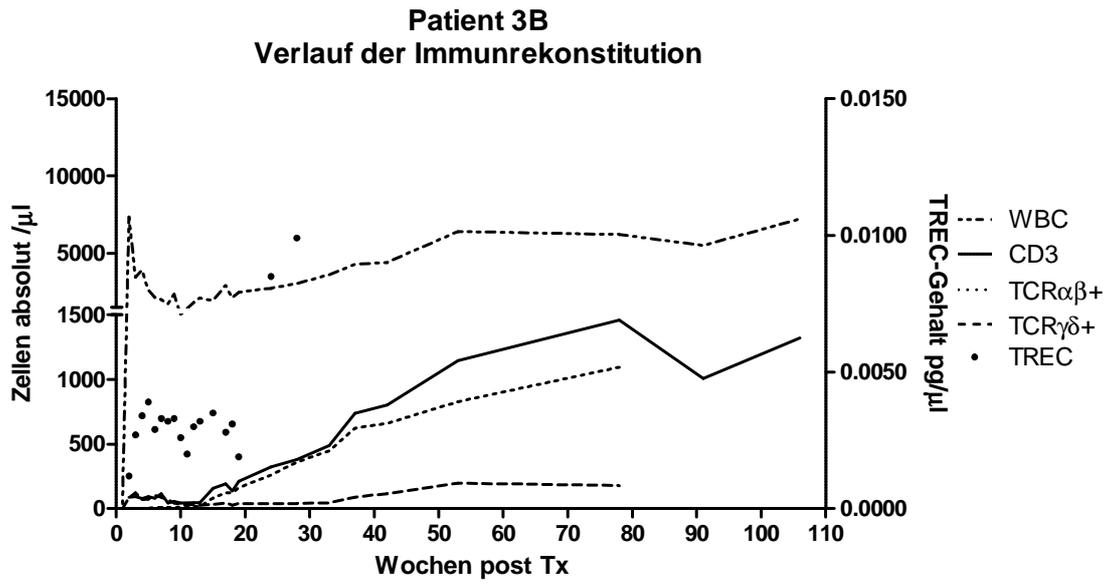


Abbildung 40: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 3B

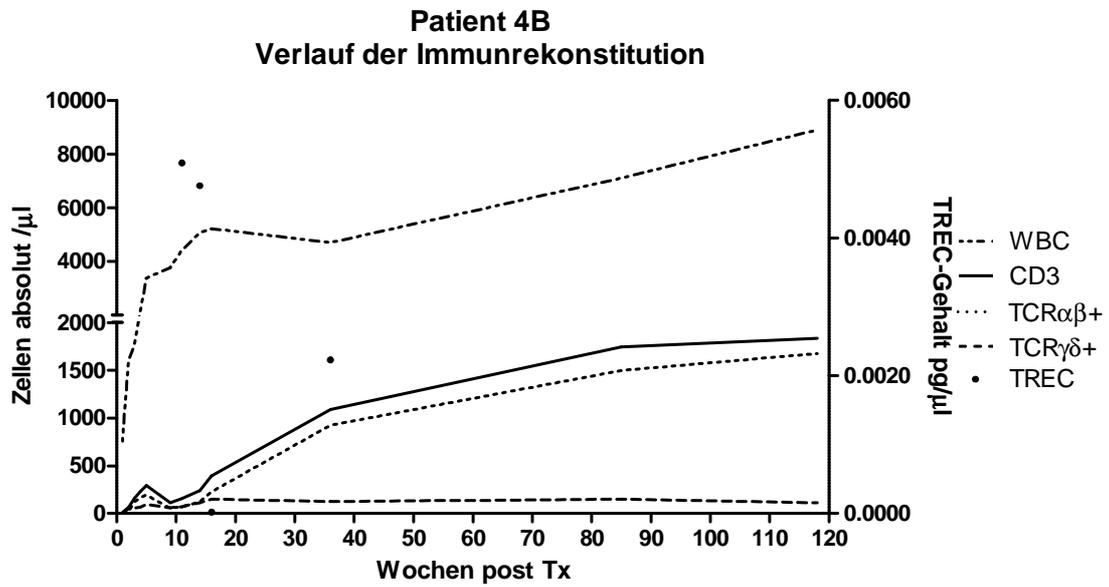


Abbildung 41: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 4B

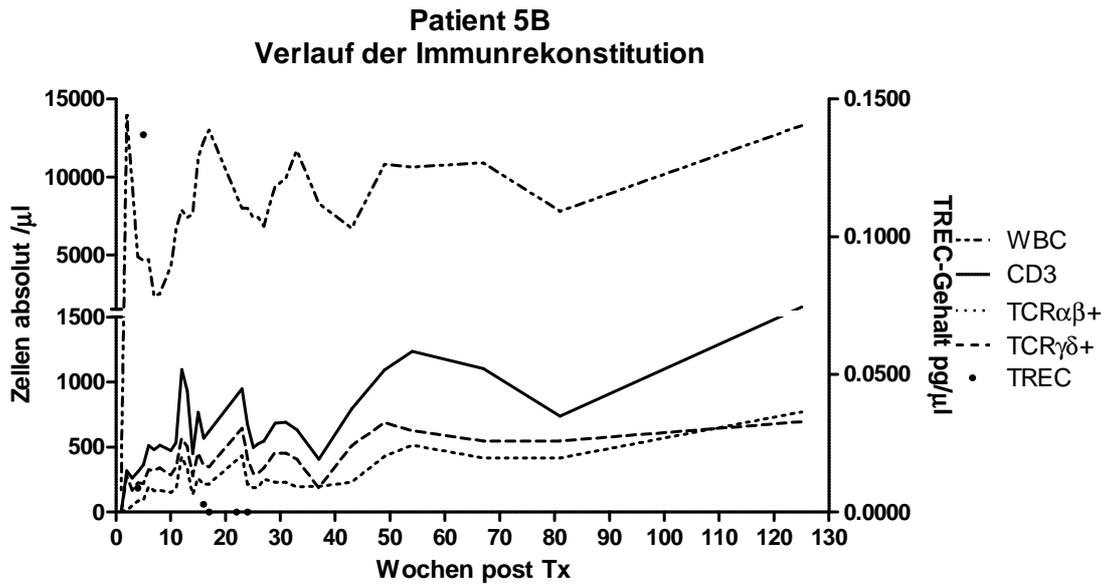


Abbildung 42: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 5B

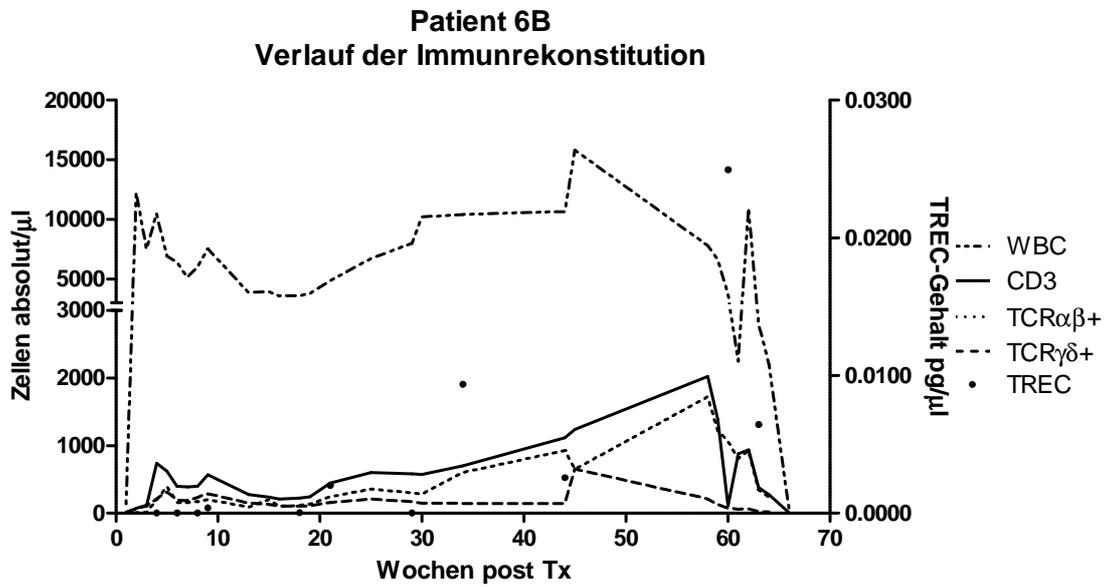


Abbildung 43: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 6B

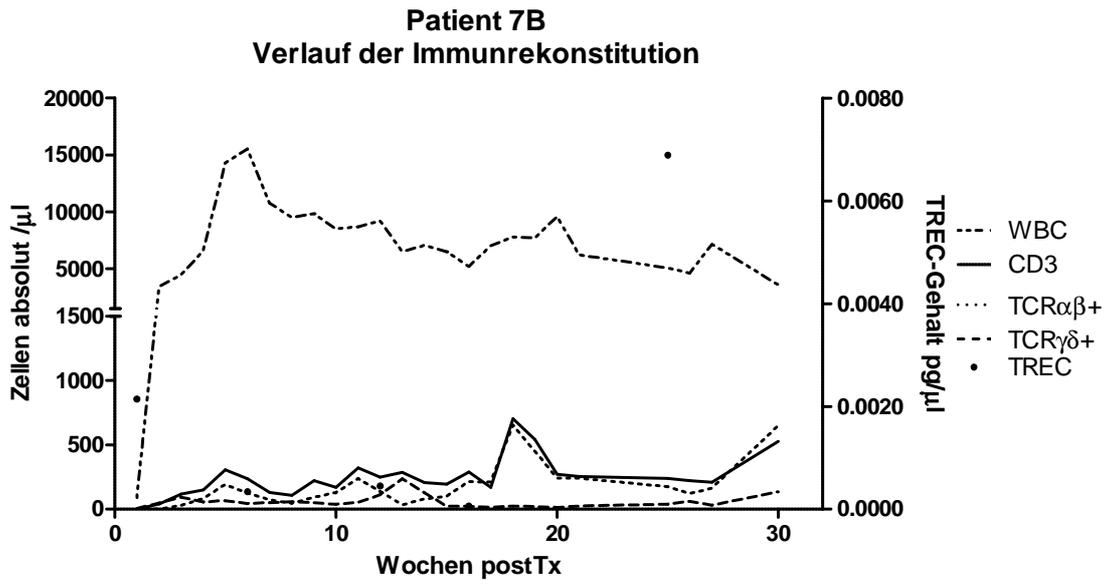


Abbildung 44: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 7B

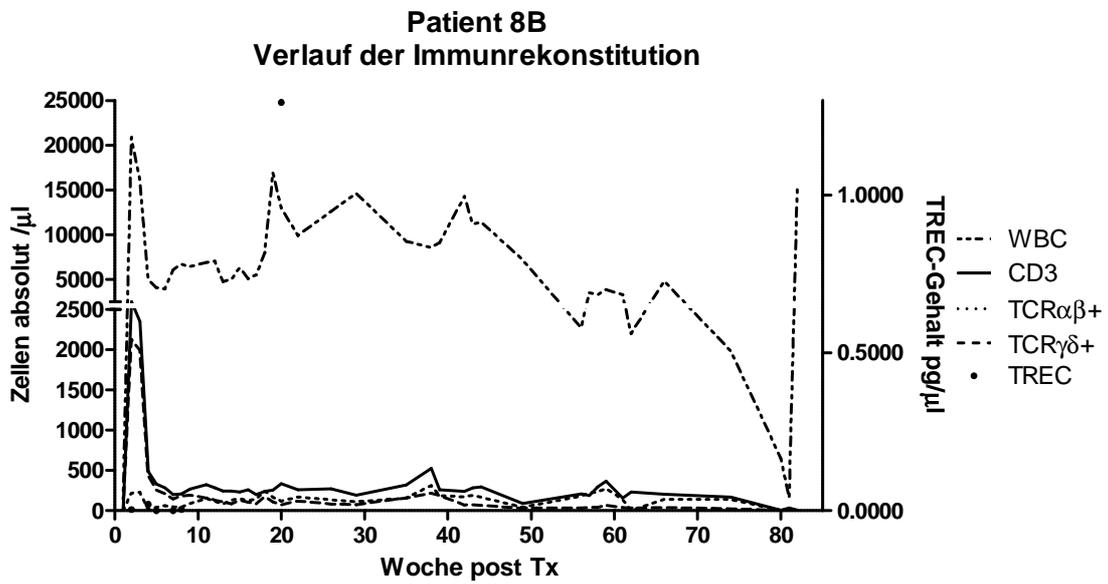


Abbildung 45: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 8B

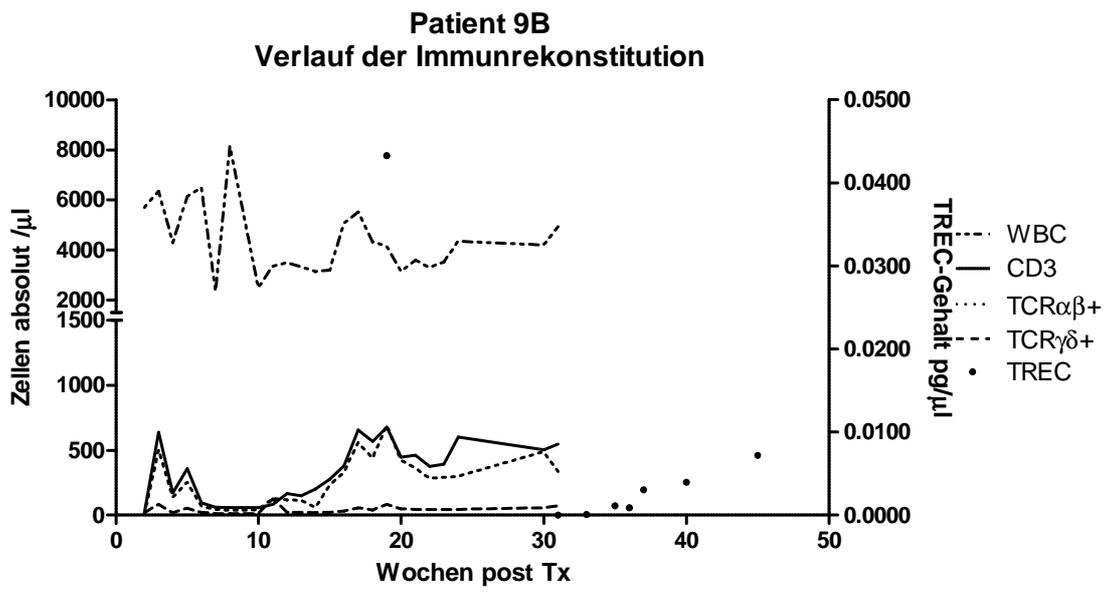


Abbildung 46: Verlauf der Immunrekonstitution Patient 9B

Unter den Patienten der Gruppe B zeigen sich ebenfalls sehr unterschiedliche Verläufe der einzelnen Zellreihen. Genau wie in Gruppe A zeigt sich ein rascher Anstieg der Leukozyten (WBC) sowie ein Abstand von mehreren Wochen bis zur Regeneration der CD3<sup>+</sup>-Zellen.

Die Marke von >200 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l wird im Durchschnitt an Tag 34 (12-131) bzw. in Woche 6 überschritten. Dies ist statistisch ein signifikanter Unterschied zu Gruppe A mit  $p = 0,0037$ .

Die Anzahl von >4000 Leukozyten/ $\mu$ l wird durchschnittlich an Tag 20 (10-76) bzw. in Woche 4 erreicht. Auch hier ist der Unterschied zu Gruppe A mit  $p = 0,0456$  als signifikant einzustufen.

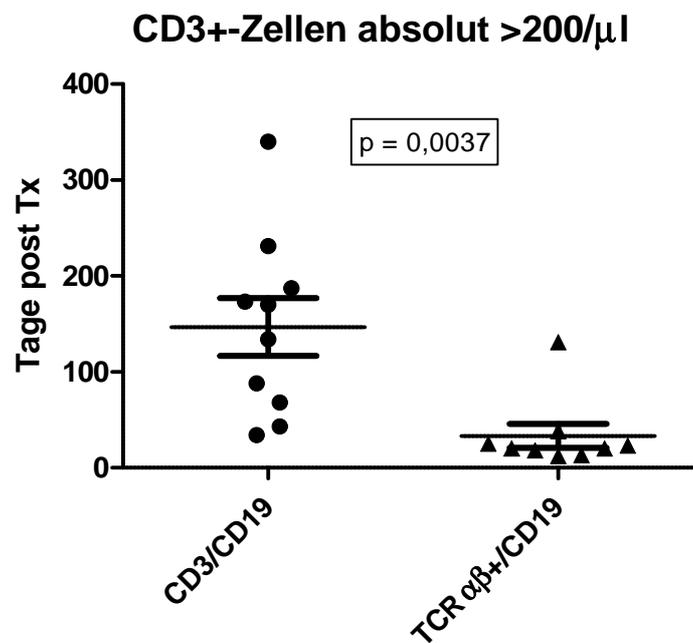


Abbildung 47: Zeitpunkt an dem >200 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l überschritten werden;  $n(\text{CD3/CD19}) = 10$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 9$

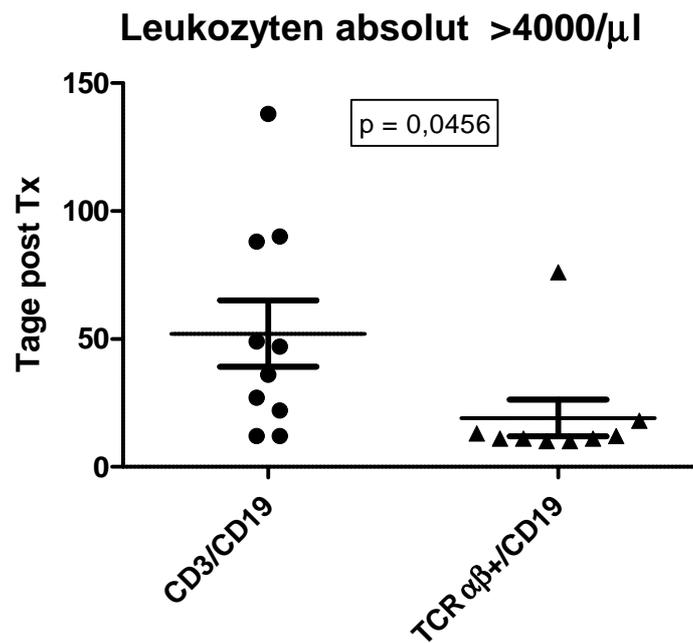
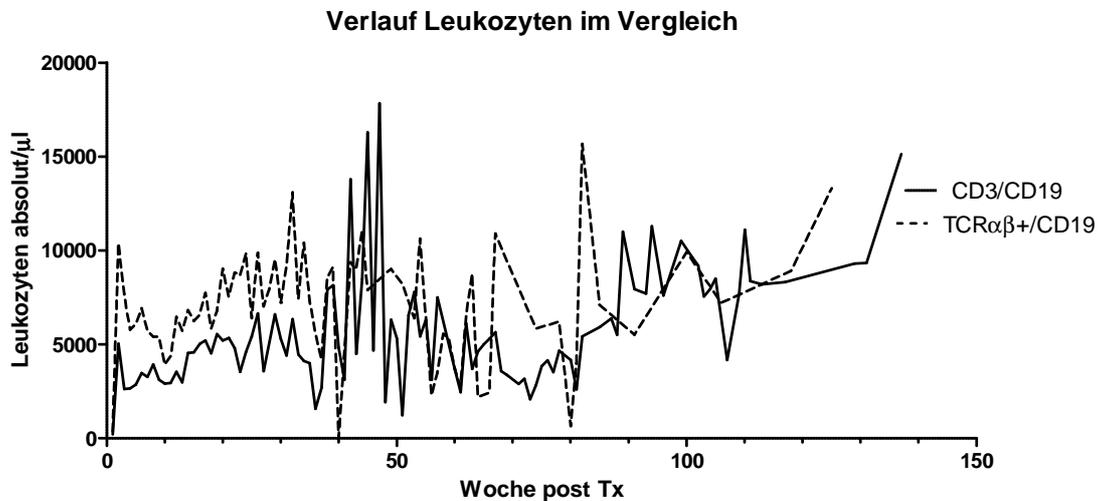


Abbildung 48: Zeitpunkt an dem >4000 Leukozyten/ $\mu$ l absolut überschritten werden;  
 $n(\text{CD3}/\text{CD19}) = 10$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 9$

Auch in Gruppe B lässt sich zwischen positiven TREC-Werten und Zellzahlanstiegen keine eindeutige Korrelation beweisen. Die TREC-Werte sind auch in Gruppe B inhomogen verteilt und können nicht über die Länge der Nachbeobachtungsdauer kontinuierlich verfolgt werden.

## 4.2.2 Leukozytenzahlen der zwei Untersuchungsgruppen im Vergleich



**Abbildung 49: Verlauf der Leukozytenzahl der beiden Untersuchungsgruppen im Vergleich; n(CD3/CD19) = 10, n(TCRαβ<sup>+</sup>/CD19) = 9**

Im direkten Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Leukozytenrekonstitution der beiden Gruppen zeigt sich vor allem in den ersten Wochen nach Transplantation ein deutlicher Unterschied. In der TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten Gruppe kann bis zu Woche 39 eine deutlich höhere Leukozytenzahl gemessen werden. Um die Signifikanz dieser Unterschiede zu bestimmen wurden an Tag 25, 50, 100, 200 und 250 die Leukozytenzahlen der beiden Patientengruppen miteinander verglichen und getestet.

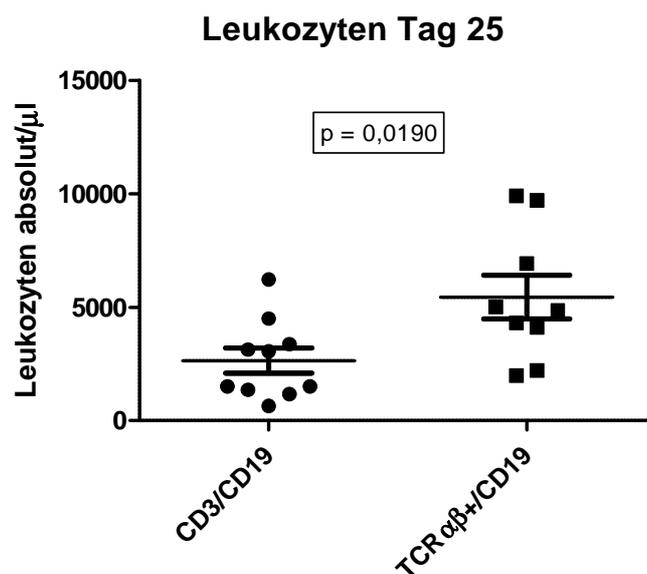


Abbildung 50: Leukozytenzahl an Tag 25 im Vergleich; n(CD3/CD19) = 10, n(TCRαβ<sup>+</sup>/CD19) = 9

An Tag 25 lassen sich in Gruppe A im Durchschnitt 2643 Leukozyten/µl nachweisen (640-6220/µl) und in Gruppe B durchschnittlich 5441 Leukozyten/µl (1980-9900/µl). Dieser Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen und deren durchschnittlicher Leukozytenanzahl ist mit  $p = 0.0190$  als signifikant einzustufen.

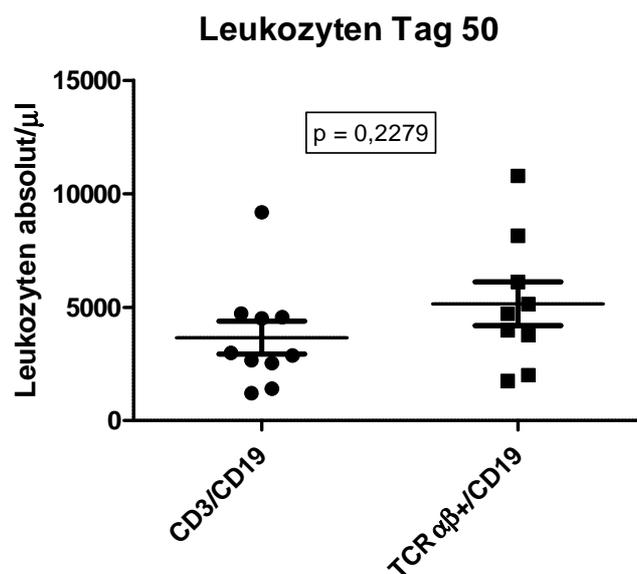


Abbildung 51: Leukozytenzahl an Tag 50 im Vergleich;  $n(\text{CD3/CD19}) = 10$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 9$

An Tag 50 zeigt Gruppe A einen durchschnittlichen Leukozytengehalt von 3659 Zellen/μl (1200-6220/μl) und Gruppe B 5149 Leukozyten/μl (1740-10780/μl). Mit  $p = 0,2279$  ist dieser Unterschied nicht signifikant.

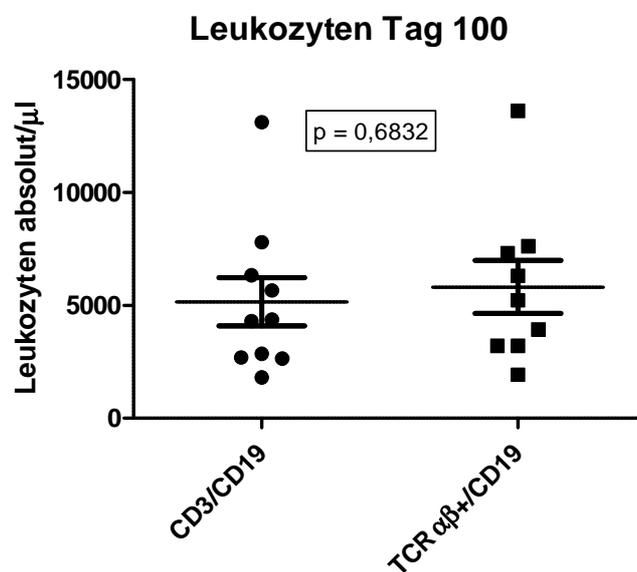


Abbildung 52: Leukozytenzahl an Tag 100 im Vergleich;  $n(\text{CD3/CD19}) = 10$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 9$

An Tag 100 hat sich der Leukozytengehalt der beiden Patientengruppen sichtbar aneinander angenähert. Mit durchschnittlich 5155 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  liegt Gruppe A noch knapp unter dem Zellgehalt der Gruppe B mit 5811 Leukozyten/ $\mu\text{l}$ . Es zeigt sich keine Signifikanz.

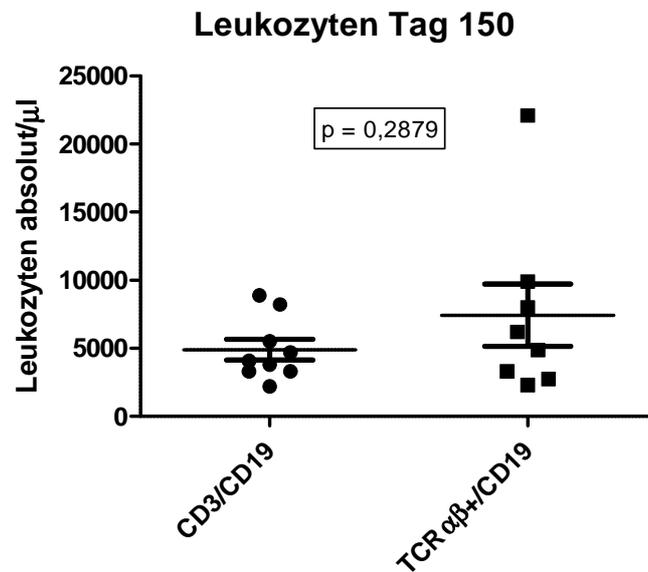


Abbildung 53: Leukozytenzahl an Tag 150 im Vergleich;  $n(\text{CD3/CD19}) = 9$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 8$

An Tag 150 ist der Unterschied der beiden Patientengruppen wieder etwas größer: Gruppe A mit 4887 Zellen/ $\mu\text{l}$  (2200 - 8890/ $\mu\text{l}$ ) und Gruppe B mit 7424 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  (2300-22100/ $\mu\text{l}$ ). Ein signifikanter Unterschied ist hier nicht festzustellen.

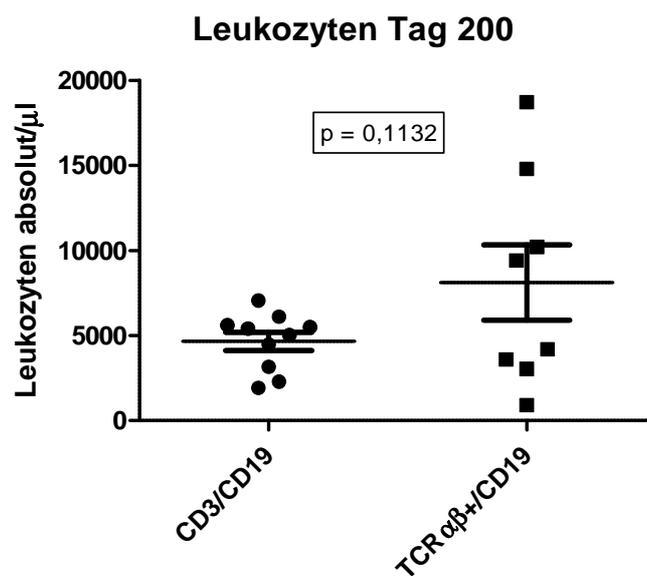


Abbildung 54: Leukozytenzahl an Tag 200 im Vergleich; n(CD3/CD19) = 10, n(TCRαβ<sup>+</sup>/CD19) = 8

An Tag 200 lassen sich in Gruppe A im Durchschnitt 4653 Leukozyten/µl nachweisen (1930-7060/µl) und in Gruppe B durchschnittlich 8104 Leukozyten/µl (910-18700/µl). Trotz fast doppelt so hoher Durchschnittsanzahl ist aufgrund der großen Streubreite der Unterschied mit  $p = 0,1132$  nicht signifikant.

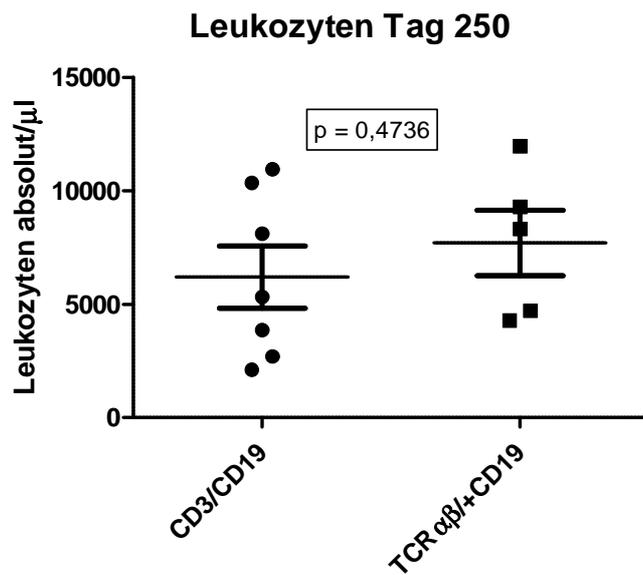
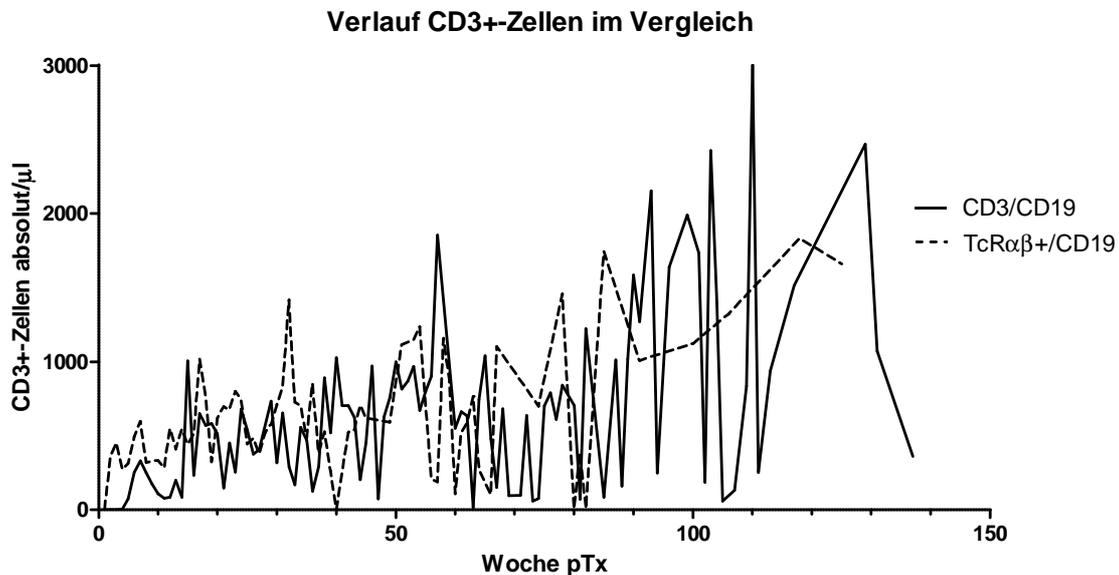


Abbildung 55: Leukozytenzahl an Tag 250 im Vergleich;  $n(\text{CD3/CD19}) = 7$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 5$

An Tag 250 haben sich die Zellzahlen wieder einander angenähert. Es findet sich ein nicht signifikanter Unterschied mit durchschnittlich 6191 Leukozyten/ $\mu$ l in Gruppe A und 7704 Leukozyten/ $\mu$ l in Gruppe B.

### 4.2.3 CD3<sup>+</sup>-Zellzahlen der zwei Untersuchungsgruppen im Vergleich



**Abbildung 56:** Verlauf CD3<sup>+</sup>-Zellen der zwei Untersuchungsgruppen im Vergleich; n(CD3/CD19) = 10, n(TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19) = 9

Auch die beiden Verläufe der CD3<sup>+</sup>-Zellen zeigen einen Unterschied in den ersten Wochen nach Transplantation. Im Durchschnitt können in der TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19-depletierten Gruppe bis zu Woche 14 höhere Werte an CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l gemessen werden. In Woche 15 übersteigen die Werte der CD3/CD19-depletierten Gruppe A das erste Mal die Werte der TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD19-depletierten Gruppe B. Im weiteren Verlauf sind die Zellzahlen in beiden Gruppen schwankend und auf einem annähernd gleich hohen Niveau. Die stark schwankenden Werte kommen dadurch zustande, dass vor allen nach Woche 50 nicht in allen Wochen nach Transplantation Werte vorhanden sind, da in der Nachbeobachtung je nach Verfügbarkeit der Patienten größere Abstände gewählt wurden oder Patienten bereits verstorben waren.

Auch in diesem Vergleich wurden zur Beurteilung der Signifikanz dieser Unterschiede an Tag 25, 50, 100, 200 und 250 die Anzahl der CD3<sup>+</sup>-Zellen der beiden Patientengruppen miteinander verglichen und getestet.



Gruppe A zeigt an Tag 50 durchschnittlich 203,3 Zellen/ $\mu\text{l}$  (0,68-1579/ $\mu\text{l}$ ) und Gruppe B 296,0  $\text{CD3}^+$ -Zellen/ $\mu\text{l}$  (57,83-1119,10/ $\mu\text{l}$ ). Mit  $p = 0,6413$  ist dieser Unterschied nicht signifikant.

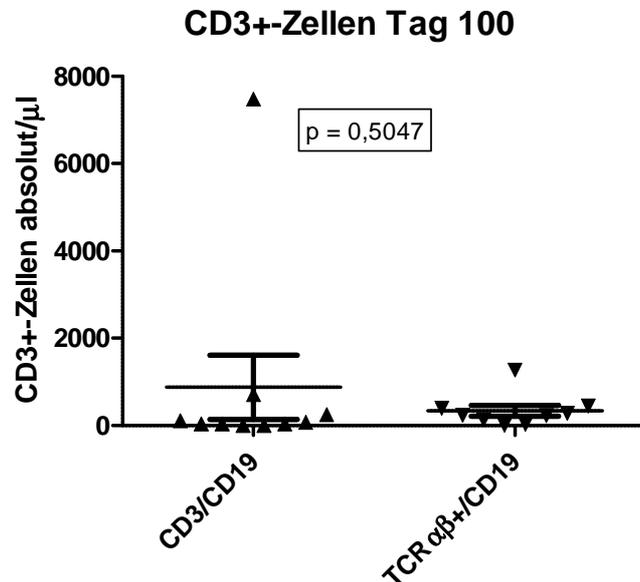


Abbildung 59:  $\text{CD3}^+$ -Zellen an Tag 100 im Vergleich;  $n(\text{CD3}/\text{CD19}) = 10$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 9$

An Tag 100 hat Gruppe A im Durchschnitt das erste Mal mit 874,4/ $\mu\text{l}$  (3,16-7478,56/ $\mu\text{l}$ ) eine höhere  $\text{CD3}^+$ -Zellenanzahl als Patientengruppe B mit 337,2  $\text{CD3}^+$ -Zellen/ $\mu\text{l}$  (8,83-1271,93/ $\mu\text{l}$ ). Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant mit  $p = 0,5047$ .

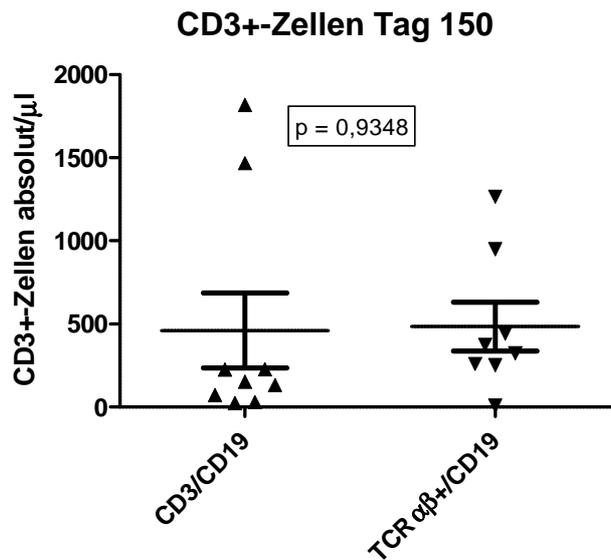


Abbildung 60: CD3<sup>+</sup>-Zellen an Tag 150 im Vergleich; n(CD3/CD19) = 9, n(TCR $\alpha\beta^+$ /CD19) = 8

An Tag 150 sind die T-Zell-Zellzahlen der beiden Patientengruppen nahezu ausgeglichen: Gruppe A mit 461,5 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu\text{l}$  (24,32-1817,62/ $\mu\text{l}$ ) und Gruppe B mit 484,6 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu\text{l}$  (8,37-1266,42/ $\mu\text{l}$ ). Wie zu erwarten zeigt  $p = 0,9348$  keine statistische Signifikanz.

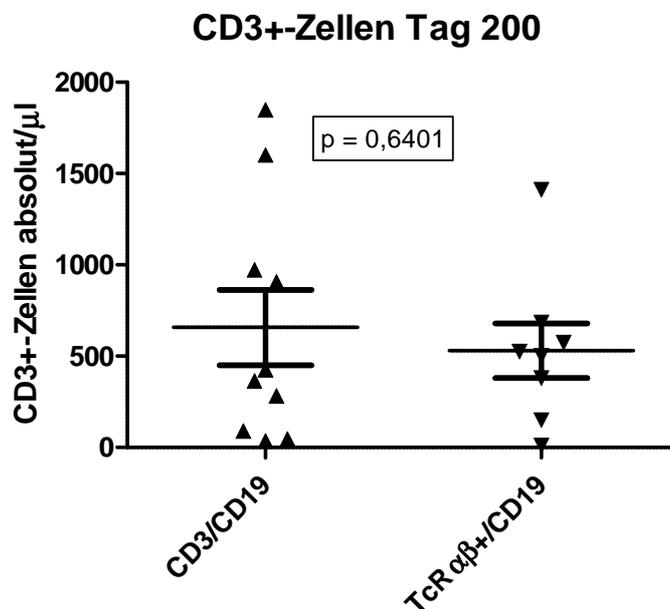


Abbildung 61: CD3<sup>+</sup>-Zellen an Tag 200 im Vergleich; n(CD3/CD19) = 10, n(TCR $\alpha\beta^+$ /CD19) = 8

An Tag 200 sind in Gruppe A im Durchschnitt 657,2 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l nachzuweisen (1930-7060/ $\mu$ l) und in Gruppe B durchschnittlich 530,0 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l (36,36-1847,34/ $\mu$ l). Keine Signifikanz mit  $p = 0,6401$ .

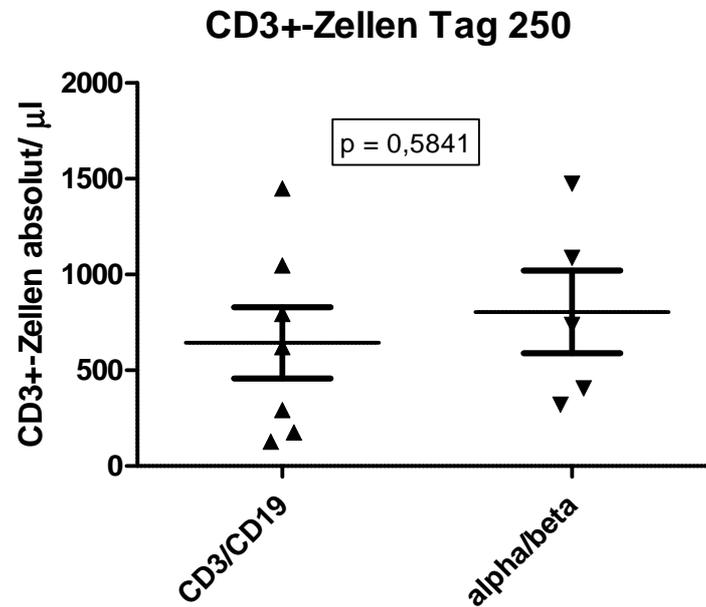


Abbildung 62: CD3<sup>+</sup>-Zellen an Tag 250 im Vergleich;  $n(\text{CD3/CD19}) = 7$ ,  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD19}) = 5$

An Tag 250 kann mit  $p = 0,5841$  ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Zellzahlen festgestellt werden. Durchschnittlich sind 643,7 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l in Gruppe A und 805,0 CD3<sup>+</sup>-Zellen/ $\mu$ l in Gruppe B zu messen.

### 4.3 Betrachtung der TCR $\alpha\beta^+$ - und TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen im Verlauf in Gruppe B

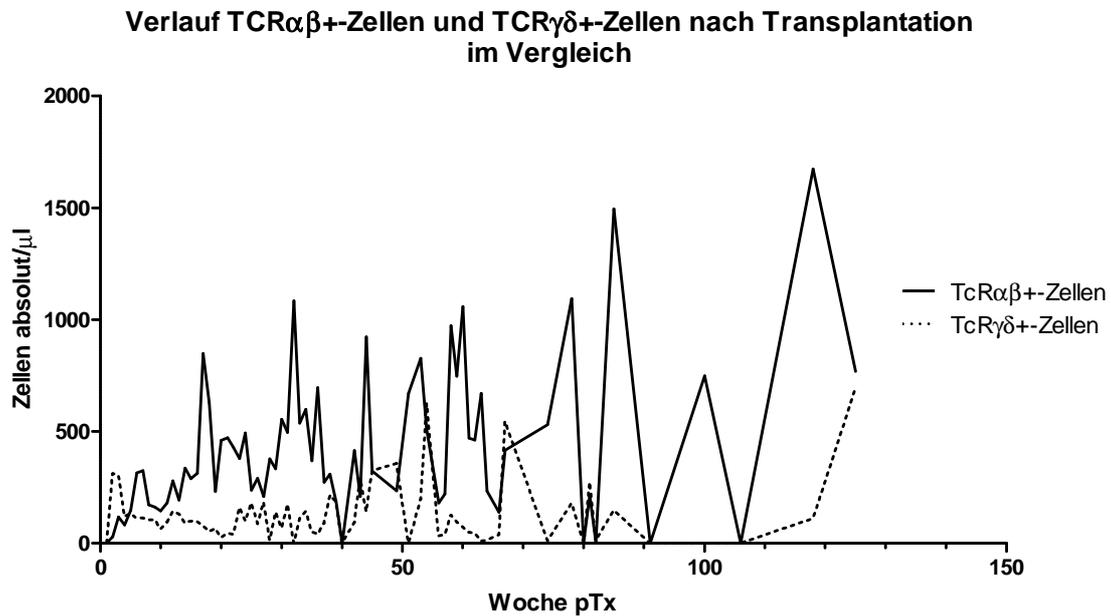


Abbildung 63: Verlauf TCR $\alpha\beta^+$ -Zellen und TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen nach Transplantation;  $n(\text{TCR}\alpha\beta^+) = 9$ ,  $n(\text{TCR}\gamma\delta^+) = 8$

Nur in der TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletierten Gruppe sind genügend Daten zu einer gruppeninternen Analyse vorhanden. Es können die Zellzahlen von 9 Patienten dargestellt werden. Bis zur Woche 5 können deutlich höhere Werte an TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen gemessen werden, ab Woche 5 überschreitet die Anzahl der TCR $\alpha\beta^+$ -Zellen die der TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen. Der höchste Wert an TCR $\alpha\beta^+$ -Zellen zeigt sich in Woche 85 mit durchschnittlich 1495,8 Zellen/ $\mu\text{l}$ .

## 5 Diskussion

Durch die ständige Weiterentwicklung und Forschung hat sich die allogene Stammzelltransplantation zu einem festen Bestandteil der Behandlungsmöglichkeiten schwerer Krankheiten der Hämatopoese, des Immunsystems sowie von einigen soliden Tumoren entwickelt.<sup>2</sup> Im Falle eines fehlenden passenden HLA-identen Spenders ermöglicht eine haploidente Stammzelltransplantation die Durchführung dieser Therapieoption.

Das Risiko für eine Abstoßung des Transplantats oder einer GvH-Reaktion steigt jedoch deutlich mit zunehmender HLA-Disparität. Somit hat eine haploidente Stammzelltransplantation deutlich höhere Risiken, was immunologische Komplikationen betrifft. Diese Komplikationen können so schwerwiegend sein und den Krankheitsverlauf erheblich negativ beeinflussen, dass sie sogar zum Tode des Patienten führen können.<sup>19,38</sup>

Mit zunehmender HLA-Disparität nimmt jedoch im Gegenzug die Rezidivrate ab. Dies geschieht durch den sogenannten „Graft versus Leukemia/Tumor“-Effekt (GvL/GvT-Effekt). Hierbei eliminieren v.a. NK-Zellen aus dem Transplantat verbliebene Tumorzellen im erkrankten Empfänger.<sup>20,21</sup>

Große Fortschritte in der haploidenten Stammzelltransplantation brachte die zunehmend effektiver werdende Methode der T-Zell-Depletion. Da vor allem CD3<sup>+</sup>TCRαβ<sup>+</sup>-T-Zellen unerwünschte Reaktionen wie Transplantatabstoßung und GvH-Reaktionen verursachen können, konnte die effektive Depletion gerade dieser Zellen eine Senkung der Zahl an Transplantatabstoßungen und schwerer GvH-Reaktionen erbringen.<sup>17,22,23</sup>

Es gibt generell zwei unterschiedliche Möglichkeiten der T-Zell Depletion. Die zuerst entwickelte Methode zielte darauf ab, nur CD34-positiven Stammzellen als Transplantat zu gewinnen und damit die Transplantation von T-Zellen zu umgehen (Positivselektion). Die später entwickelte Methode funktioniert nach dem Prinzip der Negativselektion, indem gezielt T-Zellen aus dem Transplantat entfernt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Analyse der Immunrekonstitution neben dem zeitlichen Verlauf der Rekonstitution der Leukozyten und speziell der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen auch die Thymusleistung analysiert. Dies ist durch Bestimmung sogenannter TRECs (T-cell receptor excision circles) möglich.<sup>62</sup> Es handelt sich hierbei um extrachromosomale DNA-Ringe, die bei der Rekombination von Genabschnitten im Rahmen der T-Zellrezeptor-Entstehung von TCRαβ<sup>+</sup>-T-Zellen im Thymus entstehen.<sup>10</sup>

Für die vorliegende Arbeit ist die Umlagerung des α-Lokus, d.h. die Region in der die TCRα-Kette kodiert ist, besonders wichtig. Der in den α-Lokus eingestreute δ-Lokus muss für eine erfolgreiche Umlagerung des α-Lokus deletiert werden. Dieser ausgeschnittene Genabschnitt lagert sich dann zu einem extrachromosomalen Ring aus DNA zusammen und es entsteht ein sjTREC (signal joint).<sup>51,52,53</sup> Ein TCRαβ<sup>+</sup>-T-Lymphozyt, der kürzlich den Thymus verlassen hat, enthält genau einen sjTREC pro Zelle.<sup>51,52</sup> Weitere Rearrangementprozesse können zu weiteren TRECs führen, z.B. einem cjTREC (coding joint).<sup>49,54</sup>

Mehr als 90% der T-Zellen sind TCRαβ<sup>+</sup>-T-Zellen, sjTRECs kommen nur in ihnen vor und sind damit ein Marker für die Auswurfleistung des Thymus und der "de novo"-Generierung von T-Zellen.<sup>10,49,55</sup>

TRECs können nach haploidenter Stammzelltransplantation also als Marker für die Neubildung von T-Zellen verwendet werden. Anhand ihres Auftretens kann der Zeitpunkt bestimmt werden, ab wann die Diversität des T-Zellrezeptor-Repertoires wieder zunimmt und das Immunsystem beginnt wieder voll funktionsfähig zu arbeiten.<sup>56,57,50</sup>

Nach Transplantation besitzen die Patienten ein sehr eingeschränktes Repertoire an T-Zellen. Die initiale Erholung der T-Zellen beruht auf einer peripheren Expansion von verbliebenen T-Gedächtniszellen, die durch verschiedene Stimulation zur Vermehrung angeregt werden (auch homöostatische Proliferation genannt). Das somit eingeschränkte T-Zell-Repertoire macht die Patienten sehr anfällig für opportunistische

Infektionen, die im schlimmsten Falle zum Tod führen können.<sup>14,54</sup> Die Neubildung von T-Zellen ist somit ein Zeichen für die Regeneration des Immunsystems mit neuer Vielfalt und Spezifität, die eine bessere Immunantwort und Infektabwehr ermöglichen.

Je früher die Immunrekonstitution beginnt, desto kürzer sind die Patienten gefährdet. Ein frühes Auftreten von TRECs im Peripherblut des Patienten ist somit ein Zeichen für eine frühe Regeneration und bessere Funktionsfähigkeit des adaptiven Immunsystems und des T-Zell-Kompartiments im Besonderen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppen wurden nach zwei verschiedenen Transplantationsverfahren behandelt. Beide Verfahren funktionieren nach dem Prinzip der T-Zell-Depletion, nämlich die CD3/CD19-Depletion sowie die TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion. Hierbei werden durch magnetische Antikörper gegen das CD3-Oberflächenantigen der T-Zelle bzw. gegen den TCR $\alpha\beta$ -Rezeptor der TCR $\alpha\beta^+$ -T-Zellen diese Zellen entfernt.<sup>31,32</sup>

So bleiben dem Transplantat eine große Anzahl weiterer wichtiger Zellen, die außer den CD34<sup>+</sup>-Stammzellen transplantiert werden, erhalten. Hierbei handelt es sich z.B. um CD34<sup>-</sup>-Progenitorzellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, weitere mobilisierte myeloische Zellen und für das Engraftment mit verantwortliche Zellen, sogenannte „Facilitating Cells“.<sup>33,34</sup>

Die im Sinne einer besseren Immunrekonstitution effektivere Methode der Negativdepletion ist die kürzlich beschriebene Methode der TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion aus peripheren Stammzellen.<sup>37</sup> Zusätzlich bleiben hier im Transplantat auch TCR $\gamma\delta^+$ -T-Zellen erhalten. Diese Zellen sind nicht alloreaktiv, aber effizient in der Tumorüberwachung und gegen Pathogene mit ihren antiinfektiösen und antitumorösen Eigenschaften.<sup>33,39,40,41</sup>

In ersten klinischen Studien am Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen und am Bambino Gesù Hospital in Rom, Italien zeigten sich ein frühes Engraftment und eine frühe Expansion cotransplantierte TCR $\gamma\delta^+$ -T-Zellen sowie eine frühere Expansion von TCR $\alpha\beta^+$ -T-Zellen.<sup>43,38,44</sup>

Somit erfolgte eine schnelle Immunrekonstitution und eine niedrige Rate an transplantationsassoziierten Todesfällen war die Folge.<sup>15,43,42</sup>

Oevermann et al. berichteten in einem retrospektiven Vergleich von Patientengruppen, die entweder ein CD3/CD19-depletiertes oder ein TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletiertes Transplantat erhalten hatten, über eine viel schnellere Rekonstitution der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion. Auch die Veröffentlichung von Lang et al. kann diese Ergebnisse bestätigen.<sup>67</sup>

Die vorliegende Arbeit sollte diese positiven Resultate mit weiteren Analysen erhärten. Eine zentrale Frage war, ob die schnelle Immunrekonstitution auch aufgrund einer schnellen Neubildung von T-Zellen im Thymus stattfindet. Hierfür wurden im Verlauf nach Transplantation die DNA-Proben auf das Vorhandensein von TRECs analysiert. Der Zeitpunkt des ersten Auftretens von TRECs wurde als  $T_{min}$  definiert. Außerdem stellte sich die Frage, ob die guten klinischen Daten der Studien mit TCR $\alpha\beta^+$ -depletierten Stammzelltransplantaten<sup>42,15</sup> sich durch objektive, klinische und experimentelle Daten bestätigen lassen würden und ob sich im Vergleich zu der Patientengruppe, die CD3/CD19-depletierten Stammzelltransplantate erhalten hatte, signifikante Unterschiede zeigen würden.

#### $T_{min}$

Bader et al. berichtet in einer Studie nach CD3/CD19-Depletion über eine thymusabhängige T-Zellrekonstitution ab dem 100. Tag nach Transplantation.<sup>68</sup>

In Gruppe A des untersuchten Patientenkollektivs, in der ebenfalls eine CD3/CD19-Depletion durchgeführt wurde, konnten die ersten TRECs im Durchschnitt an Tag 139 nach Transplantation nachgewiesen werden. In Gruppe B zeigten sich erfreulicher Weise die ersten TREC-Werte durchschnittlich schon an Tag 46 nach Transplantation. Somit setzt nach einer Transplantation mit TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion die thymusabhängige T-Zellrekonstitution deutlich früher ein. Dieser Unterschied ist mit  $p = 0,0267$

statistisch signifikant, des Weiteren unterstützt er die Analyse der klinischen Daten einer besseren Immunrestitution nach der Methode der TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-Depletion.<sup>15,42</sup> In Gruppe A benötigt der Beginn der thymusabhängigen T-Zellrestitution im Durchschnitt mehr als das Dreifache der Zeit und bedeutet somit ein deutlich größeres Risiko für die Patienten in Bezug auf ein Rezidiv und letal verlaufende Infektionen.

Auffällig ist, dass bei zwei Patienten der Gruppe B bereits nach einigen Tagen TRECs zu detektieren sind, s. Tabelle 22. Für die thymische T-Zellentstehung wird unter regulären Umständen ein Zeitraum von ca. 3 Wochen angenommen.<sup>10</sup> Welche Werte nach einer haploidenten Stammzelltransplantation anzunehmen sind, kann nicht eindeutig genannt werden. Es muss bedacht werden, dass es sich hier um erkrankte und durch Chemotherapie und Bestrahlung behandelte Organe und Immunsysteme handelt, in das Spenderzellen übertragen wurden. Auch die Verwendung von Stimulantien wie z.B. G-CSF, eine GvHD oder Infektionen könnten einen Einfluss auf die Lymphopoese haben. Bisherige Analysen nach Transplantation eines TCR $\alpha\beta^+$ /CD19-depletierten Transplantats sind aufgrund unterschiedlicher Konzeptionen (Erkrankung, bisherige Transplantationen, Konditionierung, Alter der Patienten, Zusammensetzung der Transplantate,...) und Messzeitpunkten schwer zu vergleichen.<sup>15,42,67</sup> Eine engmaschige Bestimmung von TRECs wie in der bisher vorliegenden Arbeit wurde bisher nicht durchgeführt. Die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse oder einer Verunreinigung oder falschen Datierung besteht ebenfalls. Allerdings konnten in den oben erwähnten, analysierten Proben der zwei Patienten, in denen sehr früh TRECs nachgewiesen werden konnten, positive C $\alpha$ -Werte nachgewiesen werden. Somit ist ein Vorliegen von TCR $\alpha\beta^+$ -T-Zellen, die auch TRECs enthalten, im Analysematerial anzunehmen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass diese vom Spender stammen und mit dem Transplantat übertragen worden sein könnten.

## T-Zellen

Zur Rekonstitution von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden bereits wiederholt Daten in Studien nach haploidenter Transplantation mit CD3/CD19-depletierten Stammzellpräparaten veröffentlicht. In einer Studie von Federmann et al. - allerdings mit erwachsenen Patienten - konnten an Tag 100 205 CD3<sup>+</sup>-T-Zellen/μl gemessen werden.<sup>25</sup>

In der hier vorliegenden Arbeit konnten an Tag 25 in der CD3/CD19-depletierten Gruppe A durchschnittlich 10,73 CD3<sup>+</sup>-Zellen/μl gemessen werden, an Tag 50 bereits durchschnittlich 203,3 CD3<sup>+</sup>-T-Zellen/μl, sowie an Tag 100 874,4 CD3<sup>+</sup>-Zellen/μl.

In einer neueren Veröffentlichung berichteten auch Handgretinger et al. über die erste Studie mit TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten Transplantaten am Universitätsklinikum Tübingen für Kinder- und Jugendheilkunde.<sup>43</sup> Hierzu erhielten 23 Patienten eine haploidente Stammzelltransplantation mit TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten Stammzellen. Im Verlauf zeigte sich hierbei eine schnelle Immunrekonstitution mit durchschnittlich 350 CD3<sup>+</sup>-T-Zellen/μl bereits an Tag 28. Hierbei handelt es sich vermutlich vor allem um cotransplantierte Zellen aus dem Transplantat, die sich dann durch periphere Expansion vermehren.<sup>43</sup> Eine Aussage über das primäre Engraftment kann somit nicht allein anhand von Zellzahlen getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden an Tag 25 bei Patienten, die TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierte Stammzellen erhalten hatten, im Durchschnitt 255 CD3<sup>+</sup>-Zellen/μl, gemessen. Im Vergleich mit den Daten aus Gruppe A zeigen sich hier also signifikant höhere Werte, nämlich mehr als der zwanzigfache Zellgehalt der Patienten, die CD3/CD19-depletierte Stammzellpräparate erhalten hatten.

An Tag 50 zeigen sich in beiden Patientengruppen ähnliche Werte mit 296,0 CD3<sup>+</sup>-Zellen/μl, an Tag 100 vergleichsweise niedrige Werte mit 337,2 CD3<sup>+</sup>-T-Zellen/μl.

Auch dieser Vergleich der CD3<sup>+</sup>-Zellen zu den genannten Zeitpunkten zeigt wieder einen signifikanten Vorteil der TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten Gruppe in den ersten wichtigen Tagen nach Transplantation, ähnlich wie bei der T<sub>min</sub>-Analyse der TREC-Werte.

Zu berücksichtigen ist bei der Interpretation dieser Werte, wie bereits erwähnt, dass die deutlich höheren CD3<sup>+</sup>-Zellzahlen in den ersten Tagen in Gruppe B von mittransplantierten Zellen aus dem Transplantat und deren Expansion stammen und nicht als primäres Engraftment gewertet werden dürfen. Vor allem handelt es sich hierbei um TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen, die nur im TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten Transplantat enthalten sind. In Abbildung 63 kann dies sehr gut nachvollzogen werden. Bis zur Woche 5 sind deutlich höhere Werte an TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen festzustellen. Da diese in dieser Zeit auch noch ansteigen, ist von einer peripheren Expansion auszugehen. Ab Woche 5 überschreitet die Anzahl der TCRαβ<sup>+</sup>-Zellen die der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen und nimmt deutlich zu. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Locatelli et al., Handgretinger und Oevermann et al. sowie Lang et al. in der Analyse der T-Zellrekonstitution nach Transplantation.<sup>15,38,66</sup>

Auch die T<sub>min</sub>-Analyse stimmt mit diesen Daten überein, hier kann wie oben erwähnt erst ab Tag 40 eine thymusabhängige T-Zellrekonstitution mit positiven TREC-Werten nachgewiesen werden.

Zur weiteren Beurteilung der immunologischen Rekonstitution wurden die Tage bestimmt, an denen die Leukozytenzahl die Neutropeniegrenze von >4000 Zellen/μl überschritt. In Gruppe B war dies signifikant früher der Fall (p = 0,0456) mit 20 Tagen im Gegensatz zu Gruppe A mit 53 Tagen. Auch die Grenze von > 200 CD3<sup>+</sup>-Zellen wurde in Gruppe B signifikant schneller überschritten (p = 0,0037), in Gruppe B durchschnittlich an Tag 34, in Gruppe A an Tag 147.

Somit kann diese Arbeit die schnellere Immunrekonstitution in Patienten mit einer TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten haploiden Stammzelltransplantation stützen. Nicht nur die schnellere periphere Vermehrung von mittransplantierten T-Zellen

führt zu diesem Vorteil, sondern auch der schnellere Beginn einer Neubildung von T-Zellen, die durch früher messbare TREC-Werte dargestellt werden kann.

Auffällig jedoch war die inhomogene Verteilung von positiven TREC-Proben. Es konnte oft kein kontinuierlicher Verlauf dargestellt werden. Nach zunächst positiven TREC-Proben wurden im Verlauf fast bei allen Patienten negative Proben gemessen. Eine Messung von TRECs pro Zelle, pro 100.000 T-Zellen oder eine Umrechnung auf Kopien pro T-Zellen wie in anderen Studien<sup>54,53,69</sup> war nicht möglich, da bei einem Großteil der Proben wie bereits erwähnt die DNA aus PBMNCs bereits isoliert war. Diese DNA wurde tiefgefroren und in großen Probensammlungen archiviert. Eine Zellzahl, aus denen die DNA gewonnen wurde, ist nicht bekannt. Auch eine Isolation z.B. von T-Zellen war nicht möglich.

Als Ursache für die inhomogene Verteilung kommen verschiedene Faktoren in Frage:

Eine Verminderung des TREC-Gehaltes bzw. das Verschwinden der TRECs kann durch einen Verdünnungseffekt verursacht werden. Da TRECs nur bei der Neubildung entstehen, werden sie durch Vermehrung, z.B. bei der Zellteilung von naiven T-Zellen oder T-Gedächtniszellen verdünnt.<sup>51,53</sup> Auch der Zelltod TREC-positiver T-Zellen sowie der Übertritt in Gedächtniszellen beeinträchtigt den TREC-Gehalt von Patientenproben.<sup>55,60</sup>

Eine weitere mögliche Ursache stellt die maschinelle DNA-Isolation im Chimärismuslabor dar. Hierbei wird die Isolation mit den gleichen Isolations-Kits wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt, allerdings automatisiert in dafür generierten Maschinen. Ein Großteil der Proben wurde in den vergangenen Jahren so isoliert und archiviert. Der andere Teil wurde manuell aus tiefgefrorenen PBMNCs isoliert. Generell handelt es sich um die gleiche Methode, es wurden die gleichen Isolations-Kits verwendet, wodurch die Ergebnisse vergleichbar sein sollten. Allerdings ist das Handling einer Probe durch eine Maschine doch unterschiedlich zu einer persönlichen Bearbeitung der Zellen. Gerade bei kleinen DNA-Fragmenten wie einem TREC-Ring kann

ein geringer Unterschied ausschlaggebend sein. Diese Vermutung stützt sich auf eine Beobachtung während der Analyse der Proben: an vereinzelt Tagen lagen maschinell isolierte Proben und manuell isolierte Proben vom gleichen Patienten vor. Bei diesen Proben war zu beobachten, dass manuell isolierte Proben positive TREC-Werte zeigten, wohingegen oft in der maschinell isolierten Probe keine TRECs nachzuweisen waren.

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Faktor zu vermeiden, müsste eine prospektive Analyse erfolgen. Hierfür wäre der Aufbau einer eigenen Sammlung und Archivierung an Proben notwendig, die dann alle manuell isoliert werden. Ebenso wäre es wichtig, die T-Zellzahl in der Probe zu kennen. Auch das Vorhandensein und die eigenständige Aufbewahrung von Spender- und Vorproben für den jeweiligen Patienten wären notwendig.

In den hier durchgeführten, teilweise retrospektiven Analysen waren von einigen Patienten Vorproben und / oder Spenderproben nicht aufzufinden. Außerdem waren in den beiden Probentypen, wenn vorhanden, oftmals keine TRECs nachzuweisen. Hierzu ist anzumerken, dass gerade diese beiden Probentypen pro Patient sehr wichtig waren und zur Chimärismus-Analysen im Verlauf nach Transplantation häufig analysiert wurden. Hierzu waren ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren sowie eine häufige Manipulation der Proben notwendig. Dies kann die Qualität der DNA und ihrer Bestandteile negativ beeinflussen. Auch ein Zugreifen von verschiedenen Parteien auf diverse Proben sowie eine dezentrale Aufbewahrung und wechselnde Lokalisationen zur Archivierung der Proben erhöhen das Risiko für Verwechslungen, Kontaminationen oder Verschwinden von Proben. Somit wären eigene, getrennt aufbewahrte und manuell isolierte Proben sicherlich sinnvoll, um weitere hochwertige Ergebnisse und Informationen sammeln und analysieren zu können.

Ein weiterer Vorteil einer prospektiven Studie wäre die Möglichkeit, detaillierte klinische Daten sammeln zu können, die für eine bessere Einschätzung der Daten wichtig wären. Durch das teilweise retrospektive Design der vorliegenden

Arbeit war es schwierig, zu jedem Patienten ausreichend Information und Details zu klinischem Verlauf, supportiven Maßnahmen oder medikamentöser Behandlung zu finden. In einer prospektiven Studie könnten gezielt hierzu Informationen gesammelt werden, die sonst im klinischen Alltag nicht gesondert notiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Die haploidente Stammzelltransplantation stellt für viele Patienten, denen ein HLA-identer Spender fehlt, oft die einzige Therapieoption und somit Überlebenschance dar. Die hierzu notwendige T-Zelldepletion bringt das Risiko einer verspäteten Immunrekonstitution und somit einer Anfälligkeit für schwere Infektionen mit sich.

In bisherigen Studien und vergleichenden Analysen konnte ein Vorteil der Methode der Negativ-Selektion der CD3/CD19-Depletion im Gegensatz zur Positiv-Selektion der Anreicherung von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen nachgewiesen werden.<sup>70,25</sup>

Oevermann et al. sowie Handgretinger et al. fanden in folgenden Analysen und Vergleichen der beiden Methoden der Negativ-Selektion, nämlich der CD3/CD19-Depletion sowie der TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-Depletion, erste Hinweise und Daten für einen Vorteil der neueren Methode der TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-Depletion.<sup>15,42,33,43</sup> Neben einer schnelleren Immunrekonstitution zeigten sich auch im klinischen Verlauf bessere Ergebnisse.

Die vorliegende Arbeit kann diese Daten bestätigen. In den ersten kritischen Tagen nach Transplantation konnte eine schnellere Immunrekonstitution in Patienten nach TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierter haploidenter Stammzelltransplantation nachgewiesen werden. Leukozytenzahlen sowie CD3<sup>+</sup>-Zellen verzeichneten in der TCRαβ<sup>+</sup>/CD19-depletierten Gruppe einen schnelleren Anstieg. Dies geschieht nicht nur durch die schnellere periphere Vermehrung von mittransplantierten T-Zellen, sondern auch durch den schnelleren Beginn der Neubildung von T-Zellen. Der T<sub>min</sub>-Zeitpunkt, also der Zeitpunkt der ersten messbaren TREC-Werte war in dieser Gruppe ebenfalls signifikant früher, in Woche sieben nach Transplantation, zu verzeichnen. In der CD3/CD19-depletierten Gruppe benötigt der Beginn der thymusabhängigen T-Zellrekonstitution im Durchschnitt mehr als das Dreifache der Zeit, für jeden

Patienten ein Zeitraum voller Risiken und Gefahren, in der schwere Infekte bis zum Tode führen können.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kröger N, Zander AR. *Allogene Stammzelltherapie- Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 1. Auflage. Bremen: UNI-MED Verlag; 2004.
2. Trigg ME. Milestones in the development of pediatric hematopoietic stem cell transplantation--50 years of progress. *Pediatric Transplantation*. 2002;6:465–474.
3. Sayer HG, Beelen DW. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Der Onkologe*. 2009;15(6):564–574.
4. Lang P, Teltschik H-M, Feuchtinger T, et al. Allogene Stammzelltransplantation bei pädiatrischen soliden Tumoren. *Der Onkologe*. 2011;17(11):1024–1031.
5. Fischer M, Oberthür A, Schweinitz D, Simon T. Das Neuroblastom. *Der Onkologe*. 2005;11(10):1054–1064.
6. Willasch A, Kreyenberg H, Beck JF. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases, *Haematologica*. 2006;91(6):788-94.
7. Zola H, Swart B, Nicholson I, et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*. 2005;106:3123–3126.
8. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Peripheral-Blood Stem Cells versus Bone Marrow from Unrelated Donors. *New England Journal of Medicine*. 2012;367:1487–1496.
9. Kolb H-J, Sayer HG, Arnold R. Immunbiologische Grundlagen der Stammzelltransplantation. *Der Onkologe*. 2002;8:66–70.
10. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*.; 2009:1119.
11. Waßmuth R. *Einführung in das HLA-System*. 2.Auflage. *Ecomed*; 2005:166.
12. Gutjahr P. *Krebs bei Kindern und Jugendlichen- Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie*. 5. Auflage. Deutscher Ärzteverlag; 2004.
13. Herold G. *Innere Medizin*.; 2016.
14. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010;115(19):3861–8.

15. Oevermann L, Lang P, Feuchtinger T, et al. Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1266(Cmv):161–70.
16. Handgretinger R, Lang P. The history and future prospective of haploidentical stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2008;10:443–451.
17. Daniele N, Scerpa MC, Caniglia M, et al. Overview of T-cell depletion in haploidentical stem cell transplantation. *Blood Transfusion*. 2012;10(3):264–72.
18. Im HJ, Koh K, Seo JJ. Recent advances in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation using ex vivo T cell-depleted graft in children and adolescents. *Blood Research*. 2016;51(1).
19. Marmont A M, Horowitz MM, Gale RP, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*. 1991;78(8):2120–30.
20. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295:2097–2100.
21. Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112:4371–4383.
22. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical “three-loci” incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*. 1994;84(11):3948–55.
23. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplantation*. 2001;27(8):777–83.
24. Peters C, Matthes-Martin S, Fritsch G, et al. Transplantation of highly purified peripheral blood CD34+ cells from HLA-mismatched parental donors in 14 children: evaluation of early monitoring of engraftment. *Leukemia*. 1999;13:2070–2078.
25. Federmann B, Hägele M, Pfeiffer M, et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia*. 2011;25(1):121–9.
26. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(17):1186–93.

27. Schumm M, Lang P, Taylor G, et al. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *Journal of Hematotherapy*. 1999;8:209–218.
28. Handgretinger R, Lang P, Ihm K, et al. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34 + progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplantation*. 2002; 29(9):731–736.
29. Ciceri F, Labopin M, Aversa F, et al. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood*. 2008;112(9):3574–81.
30. Klingebiel T, Cornish J, Labopin M, et al. Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. *Blood*. 2010;115(17):3437–46.
31. Schumm M, Handgretinger R, Pfeiffer M, et al. Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations. *Cytotherapy*. 2006;8(5):465–72.
32. Barfield RC, Otto M, Houston J, et al. A one-step large-scale method for T- and B-cell depletion of mobilized PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*. 2004;6:1–6.
33. Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcR $\alpha\beta$ (+) T cells. *Current Opinion in Hematology*. 2012;19(6):434–9.
34. Grimes HL, Schanie CL, Huang Y, et al. Graft facilitating cells are derived from hematopoietic stem cells and functionally require CD3, but are distinct from T lymphocytes. *Experimental Hematology*. 2004;32:946–954.
35. Bader P, Soerensen J, Jarisch A, et al. Rapid immune recovery and low TRM in haploidentical stem cell transplantation in children and adolescence using CD3/CD19-depleted stem cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2011;24:331–337.
36. Handgretinger R, Chen X, Pfeiffer M, et al. Feasibility and outcome of reduced-intensity conditioning in haploidentical transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1106:279–289.

37. Chaleff S, Otto M, Barfield RC, et al. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*. 2007;9:746–754.
38. Locatelli F, Bauquet A, Palumbo G, Moretta F, Bertaina A. Negative depletion of  $\alpha/\beta$ + T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology Letters*. 2013;155(1-2):21–3.
39. Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. Gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy*. 2009;1:663–678.
40. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10:467–478.
41. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*. 2003;102(1):200–206.
42. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatric Research*. 2012;71(4 Pt 2):418–26.
43. Handgretinger R, Lang P, Feuchtinger F et al. Transplantation of TcR  $\alpha/\beta$ /CD19 depleted stem cells from haploidentical donors: robust engraftment and rapid immune reconstitution in children with high risk acute leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118:1005.
44. Li Pira G, Malaspina D, Girolami E, et al. Selective Depletion of  $\alpha/\beta$  T Cells and B Cells for Human Leukocyte Antigen-Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. A Three-Year Follow-Up of Procedure Efficiency. *Biol. Blood Marrow Transplantation*. 2016;22(11):2056–2064.
45. Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, et al. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood*. 1998;91:2588–2600.
46. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood*. 1993;82:2585–2594.
47. Mackall CL, Gress RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunological Reviews*. 1997;157:61–72.

48. Eyrich M, Croner T, Leiler C, et al. Distinct contributions of CD4(+) and CD8(+) naive and memory T-cell subsets to overall T-cell-receptor repertoire complexity following transplantation of T-cell-depleted CD34-selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors. *Blood*. 2002;100(5):1915–8.
49. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998;396(6712):690–5.
50. Novitzky N, Davison GM. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Cytotherapy*. 2001;3(3):211–20.
51. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(2):609–18.
52. Takeshita S, Toda M, Yamagishi H. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO Journal*. 1989;8(1):3261–3270.
53. Hazenberg MD. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*. 2002;99(9):3449–3453.
54. Ribeiro RM, Perelson AS. Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circle (TREC) data. *Immunological Reviews*. 2007;216:21–34.
55. Kong FK, Chen CL, Six A, Hockett RD, Cooper MD. T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(4):1536–40.
56. Chen X, Barfield R, Benaim E, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood*. 2005;105(2):886–93.
57. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem- cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000;355:1875–1881.
58. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*. 1995;4(6):357-62.

59. Chen X, Barfield R, Benaim E, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood*. 2005;105(2):886–93.
60. Hazenberg MD, Otto S A, Cohen Stuart JW, et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nature Medicine*. 2000;6(9):1036–42.
61. Loeffler J, Bauer R, Hebart H, et al. Quantification of T-cell receptor excision circle DNA using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. *Journal of Immunological Methods* 2002;271(1-2):167–75.
62. Al-Harhi L, Marchetti G, Steffens CM, Poulin J, Sékaly R, Landay a. Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *Journal of Immunological Methods*. 2000;237(1-2):187–97.
63. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:7276–7280.
64. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Springerverlag. 2013;103-108.
65. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedeman F., Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. 2001;79(11):631–640.
66. Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik*. Springerverlag; 2013:180–187.
67. Lang P, Feuchtinger T, Teltschik H-M, et al. Improved immune recovery after transplantation of TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplantation*. 2015;50 Suppl 2(S2):S6–10.
68. Bader P, Willasch A., Jarisch A., et al. Transplantation CD3/CD19-depletierter Stammzellen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2010;158(3):216–222.
69. Markert ML, Sarzotti M, Ozaki D A, et al. Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome: immunologic and safety evaluations in 12 patients. *Blood*. 2003;102(3):1121–30.

70. Hägele M. Immunrekonstitution nach haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantation : Einfluss eines CD3 / CD19 depletierten gegenüber einem CD34 selektionierten Transplantat. Tübingen, Univ., Diss., 2009, <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:21-opus-44600>, [Zugriff zuletzt am 10.10.2016]

## **8 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. Rupert Handgretinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. rer. nat. Karin Schilbach.

Die PCR-Versuche wurden nach Einarbeitung von mir eigenständig durchgeführt.

Die DNA-Isolation und Konservierung erfolgte im Labor der Arbeitsgruppe durch die zuständigen Mitarbeiter und mich sowie im Chimärismuslabor im Rahmen von Routineuntersuchungen durch die zum Abnahmezeitpunkt zuständigen Mitarbeiter.

Daten zu den Patienten 3A, 3B, 5B, 8B und 9B wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Jan Haarer erhoben und mir freundlicherweise für diese Arbeit überlassen.

Die verwendeten FACS-Analysen wurden mir von Dr. med. vet. Michael Schumm zur Verfügung gestellt und dann von mir eigenständig ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Priv. Doz. Dr. rer. nat. Karin Schilbach, sowie den Labormitgliedern Marco Sterk und Christian Welker selbstständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Lorch, den 22.09.2016

Patricia Grimminger

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger möchte ich für die Überlassung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas und die Möglichkeit des experimentellen Arbeitens bedanken. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Diskussionen und ich konnte mich immer auf seine Unterstützung verlassen. Des Weiteren möchte ich mich speziell für die Unterstützung in persönlich schwierigen Zeiten sehr bedanken, in denen ich immer auf Ihn zählen konnte und in denen mir jegliche Zeit zur Fertigstellung der Arbeit gewährt wurde.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Karin Schilbach für die ausgezeichnete Betreuung und die motivierende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Zu jeder Zeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite und sie setzte sich in allen Angelegenheiten für mich ein. Vielen Dank für die anregenden Diskussionen, das unermüdliche Engagement und die tolle persönliche Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Jan, Marco, Chris, Hendrik, Frederike, Mohammed und Ulrike bedanken. Vielen Dank für die großartige Einarbeitung und herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die tolle Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank dem Stammzelllabor und Dr. med. vet. Michael Schumm für die Überlassung der verwendeten FACS-Daten und die tolle Zusammenarbeit.

Auch bei den Mitarbeitern des Chimärismuslabor möchte ich mich für die Einarbeitung und gute Zusammenarbeit bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für die Geduld und großartige Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit bedanken.