

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Tübingen**

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

**Untersuchungen zum Zusammenhang von Zytokinspiegeln im
Serum und der T-Zell-Regeneration nach allogener
Stammzelltransplantation**

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

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

**vorgelegt von
Guviraa Chimgee
aus Ulaanbaatar, Mongolei**

2002

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter

Professor Dr. D. Niethammer

2. Berichterstatter

Professor Dr. H. Einsele

1	EINLEITUNG	5
1.1	Die Knochenmark-/ Blutstammzelltransplantation	5
1.1.1	Knochenmarktransplantation	5
1.1.2	Transplantation von peripheren Blutstammzellen	5
1.1.3	Transplantation von Nabelschnurvenenblut	6
1.1.4	Allogene Knochenmark-/Blutstammzelltransplantation	6
1.1.5	Autologe Knochenmark-/Blutstammzelltransplantation	8
1.2	Zytokine	8
1.2.1	Interleukin 2 (IL-2)	9
1.2.2	Interleukin 4 (IL-4)	10
1.2.3	Interleukin 10 (IL-10)	10
1.2.4	Interleukin 12 (IL-12)	10
1.2.5	Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α)	11
1.2.6	Interferone gamma (IFN- γ)	12
1.3	Ziel der Arbeit	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Patienten und Proben	14
2.2	Material	15
2.2.1	Reagentien	15
2.2.2	Geräte	15
2.3	Methoden	15
2.3.1	Bestimmung von IL-2	15
2.3.2	Bestimmung von IL-4	16
2.3.3	Bestimmung von IL-10	17
2.3.4	Bestimmung von IL-12	17
2.3.5	Bestimmung von TNF- α	18
2.3.6	Bestimmung von IFN- γ	19
3.	ERGEBNISSE	20
3.1	Interleukin-10	21
3.1.2	Beispiel 1 (Pat.Nr. 7)	23
3.2	TNF- α	23
3.3	Interleukin-2	25
3.4	Interleukin- 4	27
3.5	Interleukin-12	27
3.6	Interferon- γ	28
3.2	Korrelation mit CRP	29
3.3	Korrelation mit der T-Zellregeneration	29
4.	DISKUSSION	33
4.1	Interleukin 2	34
4.2	Interleukin 4	34
4.3	Interleukin 10	35
4.4	Interleukin 12	35
4.5	Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α)	35
4.6	Interferon gamma (IFN- γ)	36

4.7 Gesamtsicht	36
5. ZUSAMMENFASSUNG	38
6. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	39
7. LITERATUR	69
8. ABKÜRZUNGEN	76
9. LEBENSLAUF	78

1 Einleitung

1.1 Die Knochenmark-/ Blutstammzelltransplantation

Das Knochenmark enthält die Stammzellen der Blutbildung und des Immunsystems. Erste Versuche Knochenmark zu transplantieren wurden an Mäusen und Hunden durchgeführt. Sie scheiterten jedoch an der Abstoßung oder an dem Auftreten einer entzündlichen Erkrankung, die später Graft-versus-Host Krankheit genannt wurde. Erst als die Bedeutung der Histokompatibilitätsantigene erkannt wurde, begann in den 70er Jahren die moderne Ära der Knochenmark-/Blutstammzelltransplantation (Schaefer 1989, Thomas 1975). Die erste erfolgreiche allogene Knochenmarktransplantation (KMT) beim Menschen wurde von E. Donnall Thomas (er wurde Nobelpreisträger für die Errungenschaften auf diesem Gebiet) durchgeführt (Armitage 1994, Gutjahr 1993, Thomas 1975). Weltweit wurden bis 1987 mehr als 22000 Knochenmarktransplantationen durchgeführt. Seit 1988 rechnet man mit einer Frequenz von ungefähr 4000 Transplantationen im Jahr (Bortin 1990, Gutjahr 1993, Schaefer 1989). Die Stammzelltransplantation wird heute weltweit an über 220 registrierten Zentren durchgeführt, jährlich finden über 5000 Transplantationen statt. Gerade bei der Stammzelltransplantation ist in den letzten Jahren die Veränderung durch den medizinischen Fortschritt am unmittelbarsten zu erleben.

Stammzelltransplantation ist ein Oberbegriff, der die Verfahren der Knochenmarktransplantation, der Transplantation von peripheren Blutstammzellen und von Nabelschnurvenenblut zusammenfasst. Er ersetzt zunehmend den Begriff Knochenmarktransplantation.

1.1.1 Knochenmarktransplantation

Knochenmark wird durch mehrfache Aspiration des blutbildenden Gewebes (am hinteren Beckenkamm) unter sterilen Bedingungen in Vollnarkose als Knochenmarksblut gewonnen. Die Entnahme von Knochenmark ist in der Regel nur einmal möglich und es werden beim Erwachsenen Spender etwa 1000 ml mit ca. 1×10^{10} MNC und einem Gehalt von ca. 0,5–1% CD34+ Stammzellen gewonnen. Dies entspricht einer Menge von etwa $50\text{--}100 \times 10^6$ CD34+ Stammzellen.

1.1.2 Transplantation von peripheren Blutstammzellen

Normalerweise finden sich im Knochenmark 10 bis 50 mal mehr pluripotente Stammzellen und Vorläuferzellen als im peripheren Blut (Gerard 1992). Durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Chemotherapie können Stammzellen im Blut angereichert werden. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch den Verlust von für die Anheftung an das Knochenmarkstroma wichtigen Adhäsionsmolekülen (To 1997). Warum allerdings eine so große Anzahl von Wachstumsfaktoren und auch Zytostatika diesen Effekt bewirken, ist bislang nicht geklärt.

Periphere Blutstammzellen (PBSC) für die Transplantation werden nach Ausschwemmung (Mobilisierung) aus dem Knochenmark mit Hilfe einer Leukapheresemaschine gewonnen. Hier ist keine Operation und Narkose nötig. Die Mobilisierung erfolgt mit Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) allein oder mit Chemotherapie in Kombination mit Wachstumsfaktoren (Handgretinger 1992, Lang 1993, Stachel 1999). Die Stammzellsammlung soll ab einem Gehalt von mehr als 10×10^6 CD34-positive Zellen pro μl Blut stattfinden (Bundesärztekammer 1997). Das Oberflächenantigen CD34 wird

als Merkmal für die Stammzelle genutzt. Es sollen mindestens 2×10^6 CD34-positive Stammzellen pro kg Empfänger Körpergewicht für ein autologes Transplantat gewonnen werden (Bundesärztekammer 1997). Bei der Apherese eines gesunden Menschen können in der Regel etwa $1-8 \times 10^{10}$ nukleäre Zellen gewonnen werden, die etwa $100-400 \times 10^6$ CD34+ Stammzellen enthalten (Schumm 1999). Bei einem gesunden Spender kann dabei in Abständen von ca. 2 Monaten jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine Apherese durchgeführt werden. Dadurch ist die Zahl an transplantierbaren Stammzellen etwa 10 mal höher als bei Verwendung von Knochenmark.

1.1.3 Transplantation von Nabelschnurvenenblut

Nabelschnurvenenblut enthält bis wenige Stunden nach der Geburt einen hohen Anteil an Stammzellen. Aus dem plazentaren Anteil bei der Geburt gewonnenes, an Stammzellen reiches Blut wird meist eingefroren und nach Testung auf verschiedene Merkmale wie Vorhandensein von infektiösen Erregern, genetischer Merkmale, HLA (Human Leukocyte Antigen)-Konstellation oder Blutgruppe freigegeben. Bei einem Gehalt von ca. 1-2% an CD34+ Zellen können etwa $5-10 \times 10^6$ CD34+ Stammzellen gewonnen werden, die sich allerdings durch ihre Unreife und damit höhere expansive Potenz von den Stammzellen Erwachsener unterscheiden (Kasai 1998).

1.1.4 Allogene Knochenmark-/Blutstammzelltransplantation

Knochenmark wird einem anderen Menschen (einem Familienmitglied oder Fremdspender) entnommen und auf den Empfänger übertragen. Die Transplantation erfolgt dabei vorzugsweise von einem HLA-identischen verwandten Spender, steht ein solcher nicht zur Verfügung, so wird versucht, einen HLA-identischen Fremdspender zu finden. Durch den Aufbau von nationalen und internationalen Spenderdatenbanken ist die Wahrscheinlichkeit einen HLA-identischen Fremdspender zu finden mittlerweile sehr gut. Für einen Patienten europäisch-kaukasischer Abstammung liegt die Wahrscheinlichkeit bei etwa 70%. Der Spender ist nicht vollständig identisch mit dem Empfänger, aber die wichtigsten Gewebsmerkmale sind für Spender und Empfänger die gleichen. In den Fremdspenderregistern sind weltweit z. Zt. mehr als 5 Millionen Spender registriert. Die Dauer der Spendersuche ist mit ca. 3-6 Monaten relativ lang und die Kosten der Spendersuche mit durchschnittlich etwa 25000 DM erheblich (Stachel 1999). Kann kein Fremdspender innerhalb einer bestimmten Frist gefunden werden, so kann in bestimmten Fällen auch ein nicht-HLA-identischer Spender Verwendung finden. Hier sind jedoch besondere Maßnahmen wie CD34-Anreicherung notwendig.

Die allogene Transplantation wird in der Regel bei malignen Erkrankungen: akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), chronische myeloische Leukämie (CML) und bei nicht-malignen Erkrankungen: (Erworben: Schwere Aplastische Anämie (SAA) und Autoimmunerkrankungen; Angeboren: Schwerer Immundefekt, Hämatologische Defekte: Thalassämie und Fanconi Anämie, Stoffwechseldefekt) durchgeführt (Ehninger 1993, Klingebiel 1998, Niethammer 1988, Pinkel 1993, Stachel 1999).

Die allogene Stammzelltransplantation kann zahlreiche Komplikationen mit sich bringen. In Abhängigkeit von der HLA-Differenz können Spender-Lymphozyten gegen Empfänger-Gewebe aktiviert werden und eine akute oder chronische Entzündungsreaktion auslösen. Dies wird Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion oder Graft-versus-Host Reaktion (GvHR) genannt. Die GvH

Krankheit äußert sich durch typische Entzündungen der Haut, des Gastrointestinaltrakts und der Leber (Roitt 1991) und kann als akute oder chronische Form das Leben des Patienten gefährden. Die GvHR kann durch die Entfernung der reifen T-Zellen aus dem Transplantat (T-Zelldepletion) vollständig verhindert werden; allerdings hat sich gezeigt, daß dann die Häufigkeit von Leukämierezidiven und Abstoßungsreaktionen deutlich erhöht ist (Buturini und Gale, 1988). Die Reaktion der T-Zellen des Spenders gegen Leukämiezellen des Empfängers wird dabei als Graft-versus-Leukämie Effekt bezeichnet und korreliert bei der CML mit der Graft-versus-Host Reaktion. Die Graft-versus-Host Krankheit wird deshalb bei vielen Transplantationsformen in Kauf genommen. Eine Abstoßung des Transplantates ist mit der Höhe der Konditionierung und der Zahl an übertragenen Stamm- und T-Zellen verbunden, und wird durch Spender-spezifische T-Zellen des Empfängers verursacht.

1.1.4.1 HLA-identische Transplantation

Die Gewebemerkmale (MHC: Major Histokompatibility Complex) des Menschen werden Humane Leukozyten Antigene (HLA: Human Leukocyte Antigen) bezeichnet und bestehen aus den Antigenen der MHC Klasse I (A, B, C) und MHC Klasse II (DR, DP, DQ). Sie liegen auf Chromosom 6 und werden auf die Nachkommen vererbt (Roitt et al, 1991). Die für die allogene Transplantation relevanten Antigene sind HLA-A, HLA-B und HLA-DR. Bei Übereinstimmung dieser drei Antigene spricht man von HLA-identischer Transplantation. Bei der Vererbung wird meist ein kompletter Haplotyp auf das Kind übertragen, deshalb stimmen bei verwandten, identischen Spendern meist alle Antigene überein und der Spender ist genotypisch identisch. Bei Fremdspendern ist dies nicht der Fall, man spricht von phänotypischer Identität.

1.1.4.2 Haploidentische Transplantation

Seit längerem werden Säuglinge mit schweren angeborenen kombinierten Immundefekten erfolgreich von den Eltern haploidentisch mit Knochenmark transplantiert (Friedrich 1985). In vielen Fällen war dieses Verfahren allerdings mit schweren Komplikationen behaftet. Hauptprobleme waren Abstoßungen und schwere GvHR.

Eine bahnbrechende Modifikation ist die haploidentische Transplantation von peripheren Blutstammzellen und Knochenmark, wie sie von einer italienischen Gruppe (Aversa 1994) erstmals beschrieben wurde. Hierbei ist ein Familienmitglied, bei Kindern meist ein Elternteil, der Spender. Periphere Blutstammzellen werden nach Stimulation mit G-CSF gewonnen und T-Zell-depletieret bzw. die CD34+ Stammzellen werden hochgradig angereichert, so daß sich dadurch eine passive Depletion der T-Zellen ergibt. Die Anzahl der CD34-positiven Stammzellen beträgt 10 Millionen CD34+ Zellen pro kg Körpergewicht, die Anzahl der T-Lymphozyten bei T-Zell-depletierter Stammzelltransplantation sollte ca. 20-25000 CD3+-Lymphozyten/kg Körpergewicht nicht überschreiten. Eine Abstoßungsprophylaxe mit Anti-T-Zell-Antikörpern scheint wichtig zu sein, eine zusätzliche Immunsuppression zur GvH-Prophylaxe jedoch nicht. Der Unterschied zu dem damaligen Verfahren der Knochenmarktransplantation mit T-Zelldepletion scheint in der vielfach höheren Anzahl von Stammzellen in Kombination mit der fast totalen T-Zellen Depletion zu liegen. Vorteile der Methode sind die große Anzahl an verfügbaren Spendern, der Verzicht auf Immunsuppressiva und eine relativ kurze Periode der Leukozytopenie. Nachteil ist eine deutlich längere Immundefizienz als bei identischer Stammzelltransplantation (Handgretinger 2001). Dies ist besonders deutlich bei

Erwachsenen Patienten; offensichtlich weil hier die Thymusfunktion nur noch eingeschränkt vorhanden ist.

1.1.4.3 Syngene Transplantation

Eine KMT zwischen eineiigen Zwillingen ist sehr selten und wird als *syngen* bezeichnet.

1.1.5 Autologe Knochenmark-/Blutstammzelltransplantation

Dieses Verfahren ist im eigentlichen Wortsinne keine Transplantation. Oft spricht man auch von einer Hochdosischemotherapie mit Stammzellrescue. Dazu werden dem Patienten in der Remissionsphase nach einer Chemotherapie entweder direkt das Knochenmark oder die Blutstammzellen entnommen und gegebenenfalls angereichert. Diese Zellen werden vorübergehend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und nach einer erneuten Chemotherapie in einer deutlich höheren Dosierung (Hochdosis-Chemotherapie) zur Verbesserung der Leukozytenerholung reinfundiert (Handgretinger 1994, Stachel 1999). Die autologe Stammzelltherapie wird bei Kindern häufig bei Lymphomen und soliden Tumoren; bei Erwachsenen auch bei hochgradig malignen Lymphomen eingesetzt (Klingebiel 1998, Niethammer 1988, Ostendorf 1986, Stachel 1999). Seit mehreren Jahren findet die autologe KMT auch vermehrt Anwendung beim Neuroblastom Stadium IV, da sie sich bei dieser Diagnose gegenüber der alleinigen Chemotherapie überlegen gezeigt hat (Dopfer 1989, Kremens 1992). Bei der autologen Stammzell-Therapie kann naturgemäß keine Abstoßungsreaktion und keine Transplantat-gegen-Wirt oder Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion auftreten.

1.2 Zytokine

Als Zytokine werden Botenstoffe bezeichnet, die die Interaktion zwischen Zellen vermitteln. Zytokine sind freigesetzte Proteine, welche entweder andere Zellen oder auch die sekretierende Zelle selbst in ihrem Verhalten beeinflussen. Im Rahmen der natürlichen Immunität werden die Effektorzytokine hauptsächlich von den mononukleären Phagozyten produziert, weshalb man sie meistens als *Monokine* bezeichnete. Die meisten Zytokine werden während der spezifischen Immuninteraktion von aktivierten T-Lymphozyten produziert, weshalb man diese Moleküle gemeinhin *Lymphokine* nannte (Burmester 1998). Die Bezeichnung Interleukine umfasst von Leukozyten gebildete Zytokine, die in erster Linie auf andere Leukozyten wirken. Ganz entscheidend hat die Interleukin-Forschung seit Mitte der 80er Jahre zum Verständnis der Zellinteraktionen während einer Immunantwort beigetragen (Allavena 1994, Bonnema 1994, Warren 1995). Chemokine, schließlich, spielen wegen ihrer chemotaktischen Aktivitäten vor allem eine Rolle bei der Auslösung einer Entzündungsreaktion (Abbas 1996, Stains 1997). Die gleichen Zytokine werden oft von verschiedenen Zelltypen gebildet, und ein einzelnes Zytokine wirkt oft auf verschiedene Zelltypen. Die Wirkungen der Zytokine sind häufig redundant und beeinflussen die Wirkung anderer Zytokine. Meistens werden Zytokine als Reaktion auf eine entzündliche oder antigene Stimulation gebildet und wirken lokal in einer autokrinen oder parakrinen Art, indem sie an hoch-affine Rezeptoren auf den Zielzellen binden. Gewisse Zytokine können in genügend hohen Konzentrationen gebildet werden, dass man sie in der Zirkulation findet und sie eine endokrine Wirkung entfalten können. Für viele Zelltypen dienen die Zytokine als Wachstumsfaktoren (Abbas 1996). Gegenwärtig sind mehr als 50 Zytokine bekannt (Niederle 1996).

Ganz allgemein kann man die Funktionen von Zytokinen folgendermaßen zusammenfassen (Oethinger 2000):

1. Förderung der Leukozytenontogenese (Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF): G-CSF, M-CSF, GM-CSF, Interleukin 3, Interleukin 7);
2. Mediatoren unspezifischer Abwehr (Produktion meist durch Makropagen als Folge einer Infektion) (Tumor Nekrose Faktor Alpha, Interleukin 1, Interleukin 6, Typ-1-Interferone);
3. Mediatoren von Entzündungsvorgängen (durch nicht-lymphozytäre Entzündungszellen) als Folge einer Aktivierung von T-Lymphozyten (Interferon γ , Interleukin 5, Interleukin 10, Interleukin 12)
4. Mediatoren von Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten als Antwort auf antigenspezifische Aktivierung von T-Lymphozyten (Interleukin 2, Interleukin 4, Transforming Growth Factor β : (TGF- β)).

1.2.1 Interleukin 2 (IL-2)

Synonyme: T-Zell-Wachstumsfaktor; Co-stimulator

IL-2 ist ein 14-17 kD schweres, 133 Aminosäuren langes Glykoprotein, das beim Menschen von einem einzelnen Gen auf Chromosom 4q26-27 kodiert ist.

IL-2, das vor allem von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, in etwas geringeren Mengen von CD8⁺ T-Zellen produziert wird, ist das wichtigste die Proliferation von T-Zellen fördernde Zytokin, es begünstigt den Eintritt der T-Zelle in den Zellzyklus. IL-2 wirkt auf die gleichen Zellen, die es produzieren; d. h. es fungiert als autokriner Wachstumsfaktor. IL-2 wirkt ebenfalls auf T-Lymphozyten (CD4⁺ und CD8⁺ Zellen), die in der Nähe liegen, und ist daher auch ein parakriner Wachstumsfaktor (Abbas 1996, Ibelgaufts 1992, Keller 1994). Ruhende Zellen produzieren kein IL-2. In vitro kann die Synthese durch Dexamethason und Cyclosporin A gehemmt werden. Normalerweise wird IL-2 nur nach einer Antigenaktivierung der T-Zellen transkribiert, synthetisiert und sezerniert. IL-2 wird üblicherweise nur über eine kurze Zeit synthetisiert, mit einem Maximum bereits vier Stunden nach der Aktivierung.

Die im Verlauf einer Immunreaktion produzierte Menge an IL-2 bestimmt weitgehend das Ausmaß seiner Wirkung auf die Immunantwort. IL-2 stimuliert auch die Synthese anderer von T-Zellen produzierter Zytokine, wie IFN- γ und Lymphotoxin (Abbas 1996). Die Wirkung von IL-2 auf T-Zellen wird über die Bindung an den IL-2 Rezeptor vermittelt. Zwei verschiedene Zelloberflächenproteine auf den T-Zellen binden IL-2. Das erste, das man fand, nannte man IL-2R α . Es ist ein 55 kD schweres Polypeptid (p55). Das zweite IL-2-Bindungsprotein, genannt IL-2R β , ist ca. 70- bis 75 kD (p70, oder p75 genannt) groß (Abbas 1996, Keller 1994).

IL-2 stimuliert auch das Wachstum der NK-Zellen (Robertson 1990) und erhöht ihre zytotoxische Fähigkeit, so daß sogenannte Lymphokin-aktivierte Killer-(LAK-) Zellen entstehen (Grimm 1982).

IL-2 wirkt ebenfalls auf menschliche B-Zellen, sowohl als Wachstumsfaktor als auch Stimulus für die Antikörpersynthese. IL-2 zeigt in klinischen Versuchen eine signifikante Antitumoraktivität bei verschiedenen Tumorzelltypen, da es die Proliferation und klonale Expansion von T-Zellen stimuliert, die spezifisch bestimmte Tumor-Zellen angreifen. Derartige Lymphokinaktivierte Killer-Zellen und tumorinfiltrierende Lymphozyten wurden bereits in klinischen Studien zur Tumorthherapie eingesetzt (Keller 1994). Klinisch ist ein erhöhter Spiegel von ausgeschiedenem IL-2R α im Serum ein Hinweis für eine starke antigene Stimulation, z.B. die akute Abstoßung eines transplantierten Organs.

1.2.2 Interleukin 4 (IL-4)

Synonyme: B-cell stimulating factor 1 (BSF-1); B-cell growth factor 1 (BGF-1)

IL-4 ist ein 18-20 kD großes, 129 Aminosäuren langes Glykoprotein, das beim Menschen auf Chromosom 5q31 kodiert ist.

IL-4 wurde aus Helfer T-Zellen isoliert. Es stimuliert die Proliferation von B-Zellen der Maus in Gegenwart von anti-Ig-Antikörpern induziert eine vermehrte Expression von Klasse II MHC-Molekülen. Heute weiß man, dass die wichtigste physiologische Funktion von IL-4 darin besteht, allergische Reaktionen zu regulieren. IL-4 wird aber auch von aktivierten Mastzellen sezerniert. Die Zahl der Rezeptoren für IL-4 nimmt bei der Zellaktivierung zu. Unter dem Einfluss von IL-4 binden Endothelzellen Lymphozyten, Monozyten und Eosinophile. IL-4 wird für die Produktion von IgE benötigt und ist das wichtigste Zytokin, das den Switch der B-Zellen zu diesem Isotyp der schweren Kette stimuliert. IgE ist der wichtigste Mediator der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp, und eine erhöhte Produktion von IL-4 könnte den Grund für die Entwicklung von Allergien darstellen. IL-4 wirkt nicht nur auf B-Zellen, sondern ist auch ein Wachstumsfaktor für Thymuszellen, hat eine synergische Wirkung mit IL-2, stimuliert das Wachstum von Mastzellen, aktiviert Makrophagen und fördert die Proliferation von hämatopoietischen Stammzellen (Ibelgaufts 1992, Keller 1994). IL-4 spielt eine wichtige Rolle bei einer Entzündungsreaktion, die durch IgE und Eosinophile bedingt ist.

1.2.3 Interleukin 10 (IL-10)

Synonyme: cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF); mast cell growth factor (MCGF)

IL-10 ist ein 35-40kD großes, 160 Aminosäuren langes Protein, das im menschlichen Körper als nicht glykosiertes, nicht kovalentes Homodimer vorkommt. Es wird durch die TH2 Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen nach ihrer Aktivierung durch Antigene oder Bakterien produziert. Seine Produktion wird durch das IL-4 und Interferon- γ inhibiert. IL-10 unterdrückt die Expression von MHC-II-Molekülen und inhibiert die Interleukin-Produktion durch die aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen. Durch die IL-10 Wirkung kann die allergische Reaktion vom verzögerten Typ in eine Antikörper Reaktion konvertiert werden. IL-10 inhibiert die Interleukin-Produktion durch die T-Lymphozyten indirekt durch die Beeinträchtigung der Makrophagen. Diese Inhibierung findet auf Transkriptionsebene statt und betrifft selektiv die Interleukine, die durch aktivierte TH1-Zellen produziert werden. Die Umwandlung der TH1 zu TH2- Immunantwort deutet darauf hin, dass IL-10 eine Rolle bei der Konvertierung der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ in eine Antikörper-Immunantwort spielt. Das IL-10 inhibiert weiterhin die Interleukin-Synthese der durch IL-2 stimulierten NK-Zellen (IFN- γ , TNF- α).

1.2.4 Interleukin 12 (IL-12)

Synonyme: natural killer cell stimulatory factor (NKCSF); cytotoxic lymphocyte maturation factor (CLMF); T cell stimulator factor (TSF)

IL-12 ist ein 70 kD-Heterodimerer, 306 Aminosäuren langes Glykoprotein, das aus 2 Ketten zusammengesetzt ist. Eine 35 kD (p35) und eine 40 kD (p40) Kette. Das Vorhandensein von beiden Ketten ist für die biologische Aktivität des IL-12 notwendig. IL-12 wurde ursprünglich von der B-Zell-Reihe geklont aber die hauptsächliche Produktion wird durch stimulierte Monozyten induziert. IL-12

besitzt eine Schlüsselposition in der Differenzierung der TH1-Zellen von den Progenitorzellen und in der Unterdrückung der IgE-Synthese.

IL-12 ist aufgrund seiner Wirkung auf NK-Zellen und T-Lymphozyten ein wichtiger Regulator der zellvermittelten Immunantwort:

1. IL-12 ist der stärkste Stimulator der NK-Zellen. Es induziert die Transkription von IFN- γ durch die NK-Zellen und wirkt stark synergistisch mit IL-2.
2. IL-12 stimuliert die Differenzierung der naiven CD4+ T-Zellen zum TH1-Subset.
3. IL-12 stimuliert die Differenzierung der CD8+ T-Zellen in reife, funktionell aktive CTL. Aufgrund dieser Wirkung hat IL-12 ein gewisses Potential für die Behandlung von disseminierten Krebsarten.
4. IL-12 ist ein wichtiger Regulator der Effektorphase der zellvermittelten Immunreaktionen (Abbas 1996).

1.2.5 Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α)

Synonyme: Cachectin; nekrosin; haemorrhagic factor; endogenous pyrogen

Es handelt sich um zwei molekulare Spezies, die als TNF- α (Cachectin) und TNF- β (Lymphotoxin) bezeichnet werden. Das Gen für TNF- α findet sich innerhalb des MHC, das beim Menschen auf Chromosom 6p21 kodiert ist. Humanes TNF- α ist ein nicht glycosyliertes, 17kD großes Protein mit einer Länge von 157 Aminosäuren. TNF- α wird vor allem von Monozyten und Makropagen, in geringerer Masse auch von T-Lymphozyten, NK-Zellen, und Mastzellen produziert.

Normalerweise bildet TNF- α Trimere aus drei identischen Untereinheiten aus, was für Rezeptorbindung und Rezeptorvernetzung und damit für die Signalübertragung von Bedeutung ist. Zwei unterschiedliche Rezeptoren sind für TNF- α bekannt: zum einen der 55kD große TNFR1 und zum anderen der 75kD große TNFR2, werden in der Membran der meisten Zellen, außer auf Erythrozyten und ruhenden T-Zellen, exprimiert (Stewart 1995).

Der TNF ist der hauptsächlichste Mediator der Wirtabwehr gegen gramnegative Bakterien und spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Antwort auf andere infektiöse Organismen. Die aktive Komponente der gramnegativen Bakterien sind die Lipopolysaccharide (LPS) (auch Endotoxine genannt), die aus der bakteriellen Zellwand stammen (Abbas 1996). Carswell stellte fest, daß Mäuse, denen bakterielle LPS injiziert worden waren, reaktiv große Mengen antitumoraler Substanzen produzierten, die daraufhin Tumor-Nekrose-Faktor genannt wurden (Carswell 1975). Gleichzeitig hatten Beutler et al. auf der Suche nach einer für Kachexie und Gewichtverlust bei chronischen Krankheitszuständen verantwortlichen Substanz, ein von Makrophagen synthetisiertes Zytokin isoliert, das sie Kachektin nannten (Beutler 1985, Carswell 1975).

Die wichtigsten biologischen Wirkungen von TNF bei niedriger Konzentration sind die folgenden (Abbas 1996):

1. TNF bringt die Endothelzellen dazu, neue Oberflächenrezeptoren (Adhäsionsmoleküle) zu exprimieren, die dazu führen dass die Oberflächen der Endothelzellen für die Leukozyten klebrig werden, anfänglich für Neutrophile und später für Monozyten und Lymphozyten.
2. TNF aktiviert Leukozyten, damit diese Mikroorganismen besser abtöten können.
3. TNF stimuliert die mononukleären Phagozyten und andere Zelltypen, so dass diese Zytokine und Chemokine produzieren.

4. TNF hat einen schützenden Effekt gegen Viren, ähnlich wie Interferone.

Mittlere Mengen können bereits systemische Wirkungen zeigen. B Lymphozyten und T Lymphozyten werden stimuliert, im Gehirn wird Fieber induziert, in Adipozyten kommt es zur Hemmung der Lipoproteinlipase (klinisches Bild: Kachexie), und in der Leber wird die Bildung von Akutes-Phase-Proteinen (bei einer bakteriellen Infektion) induziert. Fibroblasten, Monozyten und Osteoklasten bilden Zielzellen für die Wirkung von TNF bei Rheumatoider Arthritis. Zytokine wie TNF- α steuern mit spezifischen Wirkungen die komplizierten Interaktionen zwischen verschiedenen Zellpopulationen (Menard 1993). Beide oben erwähnten Rezeptoren sind gemeinsam zur Auslösung der TNF- α vermittelten Apoptose, dem genetisch programmierten Zelltod, erforderlich (Boldin 1995).

In hohen Konzentrationen führen diese Zytokine zum Bild des septischen Schocks. Erhöhte TNF- α Serumkonzentrationen konnten bei Patienten mit Meningokokkenmeningitis bzw. Sepsis (Waage 1987) und nach Infusion von E.coli Endotoxin (Michie 1988) nachgewiesen werden. Auch bei Malaria tropica (Grau 1990), rheumatoider Arthritis, AIDS und HIV-Infektionen (Mintz 1989) sind erhöhte TNF- α Serumspiegel nachweisbar. Erhöhte TNF- α Serumkonzentrationen wurden bei Ischämie und Reperfusionsschäden, bei schweren Infektionen und Abstoßungsreaktionen des Transplantates beobachtet. Die derzeitigen Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass erhöhte Zytokinkonzentrationen zu einem frühen Zeitpunkt während und nach Transplantation ein möglicher Prognosefaktor für das Überleben des Spenderorgans sein könnten (Kita 1996, Nishimura 1993). Weiterhin wird kontrovers diskutiert, ob die Höhe der TNF- α - Konzentration im Serum eine Differenzierung zwischen einer Infektion oder einer Abstoßung zulassen (Staeher 1997).

1.2.6 Interferone gamma (IFN- γ)

Synonyme: Immuninterferon; Typ-II-Interferon; T-Zell-Interferon

Interferon sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 25 kD. Man unterscheidet drei Hauptklassen der humanen Interferone. Interferon alpha wird von Leukozyten produziert, Interferon beta hauptsächlich von Fibroblasten. Beide werden als Antwort auf Virusinfekte synthetisiert und werden auch als Typ I-Interferone (Virusinterferone) bezeichnet. Interferon gamma wird von T-Zellen und auch von NK-Zellen produziert und ist somit ein Lymphokin. Es wird auch als Typ II-Interferon (Immuninterferon) bezeichnet und hat verschiedene immunregulatorische Eigenschaften (Begmann 1993, Weinmann 1991).

IFN- γ induziert einen antiviralen Zustand und ist auch anti-proliferativ. IFN- γ bindet aber an einen eigenen Zelloberflächen-Rezeptor, der vom Typ I IFN- Rezeptor verschieden, mit ihm aber strukturell verwandt ist. Wichtiger ist hingegen, dass IFN- γ bei der Immunregulation einige Eigenschaften aufweist, die es funktionell vom Typ I IFN unterscheiden lassen (Abbas 1996):

1. Interferon- γ ist ein starker Aktivator der mononuklearen Phagozyten. Es induziert direkt die Synthese eines Enzyms, das für den „respiratory burst“ verantwortlich ist und den Makrophagen die Fähigkeit verleiht, phagozytierte Mikroben abzutöten. Zusammen mit einem zweiten Signal erlaubt es den Makrophagen sogar, Krebszellen abzutöten. Die Zytokine, die solche funktionelle Veränderungen in den mononuklearen Phagozyten bewirken, wurden Makrophagen-aktivierende Faktoren (MAF)

genannt. $\text{INF-}\gamma$ ist der wichtigste MAF und stellt die wichtigste Art und Weise dar, wie T-Zellen die Makrophagen aktivierten.

2. $\text{INF-}\gamma$ erhöht die Expression von Klasse I MHC-Molekülen, und im Gegensatz zu Typ I IFN bringt es eine ganze Reihe von Zellen dazu, ebenfalls Klasse II MHC-Moleküle zu exprimieren.

3. $\text{INF-}\gamma$ wirkt direkt auf T- und B-Lymphozyten und fördert ihre Differenzierung.

4. $\text{INF-}\gamma$ aktiviert die Neutrophilen und führt zum „respiratory burst“. Es ist aber ein schwächerer Aktivator der Neutrophilen als T Lymphotoxin.

5. $\text{INF-}\gamma$ stimuliert die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen besser als Typ I IFN.

6. $\text{INF-}\gamma$ ist ein Aktivator der vaskulären Endothelzellen und fördert die Adhäsion der CD4+ T-Lymphozyten und die morphologischen Veränderungen, durch die Extravasation der Lymphozyten möglich wird.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Zytokinpiegel und deren Verläufe nach Transplantation mit hochangereicherten CD34+ Stammzellen von HLA-identischen Fremdspendern und HLA-nicht-identischen Familienspendern bei Kindern zu untersuchen. Für diese spezielle Transplantationsform liegen derzeit keine derartigen Untersuchungen vor und es stellen sich vor allem folgende Fragen:

1. Lassen sich Zytokinmuster mit einem Transplantatversagen korrelieren; d.h. lassen sich erhöhte oder erniedrigte Zytokinwerte bei einem Non-engraftment (Nicht-Angehen) oder einer Abstoßung nachweisen?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Zytokinwerten nach Ausbildung einer GvHReaktion oder einer Infektion?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Zytokinwerten und dem Überleben der Patienten?
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der T-Zellregeneration und Zytokinpiegeln in der ersten Phase nach Transplantation?
5. Welchen Zusammenhang zwischen NK Zellen und IL 2 nach KMT gibt es?
6. Gibt es Unterschiede in den Zytokinwerten zwischen Patienten mit haploidentischen Familienspendern und HLA-identischen Fremdspender?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Proben

Proben (115 Serumproben) wurden von 24 pädiatrischen Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen gewonnen, die zwischen 1995 und 1998 wegen unterschiedlichen Erkrankungen eine allogene Blutstammzelltransplantation mit CD34+ Stammzellen erhielten. Jeweils eine Probe wurde zu einem Zeitpunkt vor der Transplantation gewonnen, alle anderen Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation gewonnen. Zur Probengewinnung wurden 5 ml Vollblut in Serum - Monovetten entnommen und nach vollständiger Gerinnung für 30 min bei 2000 x g zentrifugiert. Das Serum wurde dann in Portionen von jeweils 1 ml in Eppendorf Probengefäßen bei -20°C gelagert. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wurden die Proben aufgetaut und sofort verwendet, bzw. maximal bis zu 3 Tagen bei 4°C gelagert.

Das Alter der Patienten variierte von 4 Monaten bis 18 Jahren. Von den Patienten waren 58,4 % (n=14) Jungen und 41,6% (n=10) Mädchen. Die Daten der 24 Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab.1 Patientenmerkmale

Patienten	Gesch.	Alter	Diagnose	Konditionierung	Transplantations-Form
Nr. 1	m	4Mon.	Osteopetrose	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 2	w	5	c.ALL (KM-Rez)	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 3	m	9	T-ALL (KM-Rez)	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 4	w	3,5	Prä B-ALL (KM-Rez)	BU, TT, CYC, ALG	Haploident. (Vater)
Nr. 5	m	8	ALL t-12;21(KM-Rez)	BU, TT, CYC, ALG	Haploident. (Vater)
Nr. 6	m	8	AML-M1 (KM-Rez)	BU, Thio, CYC, ALG	Haploident. (Mutter)
Nr. 7	w	3,5	CML Ph.+	BU, TT, CYC	Haploident. (Vater)
Nr. 8	m	12	CML	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Mutter)
Nr. 9	w	10	MDS	BU, TT, CYC, ALG	Haploident. (Vater)
Nr. 10	w	10	CML Ph. +	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 11	m	10	AML-M2	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 12	m	12	T-NHL (KM-Rez)	TBI, VP 16, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 13	m	14	SAA	TBI, TT, CYC, ALG	Haploident. (Vater)
Nr. 14	w	3,5	Prä B-ALL (KM-Rez)	BU, TT, CYC, ATG	Haploident. (Vater)
Nr. 15	m	4,5	c ALL (KM-Rez)	TBI, TT, CYC, ALG	Haploident. (Mutter)
Nr. 16	m	8	T-ALL (KM-Rez)	BU, TT, CYC, ALG	HLA ident. (Bruder)
Nr. 17	w	15	c ALL (KM-Rez) Ph.	TBI,VP 16, CYC, ALG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 18	m	15	CML Ph.+	TBI, TT, CYC, ALG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 19	m	7Mon.	Wiskott-Aldrich Syn.	BU, CYC, ALG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 20	m	10	AML-M4	BU, CYC Melpha, ATG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 21	m	14	Prä B-ALL (KM-Rez)	TBI, VP 16, CYC, ALG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 22	w	3	Wiskott-Aldrich Syn.	BU, CYC, ATG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 23	w	18	AML-M2	BU, CYC, Melpha, ATG	HLA ident. (Fremdsp.)
Nr. 24	w	4	c ALL (KM Rez)	TBI, TT, VP 16, ATG	HLA ident. (Fremdsp.)

TT: Thiotepa, CYC: Cyclophosphamid, BU: Busulfan, ATG/ALG: Anti Thymozyten/Lymphozyten Globulin, TBI: Ganzkörperbestrahlung

2.2 Material

2.2.1 Reagentien

Quantikine® Human IL-2-Immunoassay Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA

Quantikine® HS Human IL-4-Immunoassay Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA

Quantikine® HS Human IL-10-Immunoassay Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA

Quantikine® HS Human IL-12-Immunoassay Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA

Quantikine® HS Human TNF- α -Immunoassay Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA

Quantikine® Human IFN- γ -Immunoassay Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA

Reagentien:

96 Loch Polystyrol-Mikrotiterplatten beschichtet mit einem murinem monoklonaler Antikörper gegen (IL 2, IL 4, IL 10, IL 12, TNF- α , IFN- γ)

Konjugate: 21 ml polyklonaler Antikörper gegen (IL 2, IL 4, IL 10, IL 12, TNF- α , IFN- γ) mit Meerrettichperoxidase

Standard(st.) (IL 2 st. - 10 ng, IL 4 st. - 80 pg, IL10 st. – 100 pg, IL 12 st. – 200 pg, TNF- α st. - 32 pg, IFN- γ st. – 1 vial) mit recombinantem humanem Zytokine lyophilisiert.

Assay Verdünnung RD1 und HD (1-11) – 6 ml gepufferte Protein Base

Eichverdünnung RD6 und HD6 – 21 ml tierisches Serum

Waschpuffer Konzentrat - (21-100 ml) gepufferte Detergenzlösung.

Farbreagenz A (7-12,5 ml) stabilisierte Wasserstoffperoxid lösung

Farbreagenz B (7-12,5 ml) stablisiertes chomogenes Substrat (Tetramethylbenzidin)

Stopplösung – 6ml 2N Schwefelsäure

2.2.2 Geräte

ELISA - Reader MR 700, der Fa. Dynatech product, Guensey, Großbritannien mit Auswerteprogramm

Tiefkühlschrank Fa. Kirsch, Offenburg, eingestellt auf -80° C

Pipetten (Transferpette 10-200 μ l, Fa. Eppendorf)

Schüttler Fa. Vortex

2.3 Methoden

2.3.1 Bestimmung von IL-2

IL-2 wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine®-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die tiefgefrorenen Seren wurden bei Raumtemperatur vorsichtig erwärmt und vor dem Pipettieren leicht durchmischt. In den meisten Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde eine Eichlösung hergestellt. Dazu wurde IL-2 (10 ng rekombinantes humanes IL-2), in einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator mit 5 ml Verdünnungslösung (Fötale Kälberserum mit Stabilisator) aufgefüllt. Die Eichlösung entspricht somit einer IL-2-Konzentration von 2000 pg/ml. Als nächster Schiritt wurde eine Verdünnungsreihe der Eichlösung hergestellt (mit je

2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.2; 0 pg/ml). Auf eine bereits mit anti-IL-2 Antikörpern beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte (12 x 8 Löcher), wurden zuerst 100µl gepufferte Proteinbase pipettiert. Dann wurden jeweils 50µl Standard (2x8 Löcher) und Serum (2x40 Löcher) hinzugefügt. Als nächstes wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt verworfen. Um die haftenden Antikörper vollständig von Serum bzw. Eichlösung zu befreien, wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit je 400µl Waschpufferkonzentrat gespült. Anschließend wurden je 200µl IL-2-Konjugat in die einzelnen Löcher pipettiert und die Platte mit einer neuen Folie abgedeckt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde der Spülvorgang wie oben beschrieben wiederholt und 200µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jedes Loch pipettiert. Danach folgte eine Inkubation über 20 Minuten bei Raumtemperatur. Das entstandene Reaktionsprodukt, durch Meerrettichperoxidase oxidiertes Tetramethylbenzidin, war hellblau. Um die Reaktion zu beenden, wurden 50µl 1 molare Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion der dann entstandenen gelblichen Lösung photometrisch gemessen (Absorptionsmaximum bei 540 nm). Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte automatisch. Davon ausgehend wurden dann die jeweiligen IL-2-Konzentrationen bestimmt. Bei den Doppelbestimmungen wurden die jeweiligen Mittelwerte dokumentiert.

2.3.2 Bestimmung von IL-4

IL-4 wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine®-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die Tiefgefrorenen Seren wurden zunächst bei Raumtemperatur erwärmt und vor dem Pipettieren leicht durchmischt. In der Regel wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, soweit genügend Material zur Verfügung stand. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde eine Eichlösung hergestellt. Dazu wurde IL-4 (80 pg rekombinantes humanes IL-4, in einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator mit 5 ml Verdünnungslösung (Kälberserum mit Stabilisator) aufgefüllt. Die Eichlösung hatte somit eine IL-4 Konzentration von 16pg/ml. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Eichlösung hergestellt (mit je 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 pg/ml sowie eine Kontrolle ohne IL-4 (0pg/ml)). In eine bereits mit anti-IL-4 Antikörpern beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8 Löcher), wurden zuerst 50µl gepufferte Proteinbase pipettiert. Dann wurden jeweils 50µl Standard (2x8 Löcher) bzw. Serum hinzugefügt. Als nächstes wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt verworfen. Um die haftenden Antikörper vollständig von Serum bzw. Eichlösung zu befreien, wurde die Mikrotiterplatte viermal mit je 400µl Waschpufferkonzentrat gespült. Anschließend wurden je 200µl IL-4-Konjugat in die einzelnen Löcher pipettiert und die Mikrotiterplatte mit einer neuen Folie abgedeckt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde der Spülvorgang wie oben beschrieben wiederholt und 50µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jedes Loch pipettiert. Danach folgte eine Inkubation eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach eine Stunde Inkubationszeit wurde 50µl der Amplifierlösung in jedes Loch pipettiert. Dann folgte 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das entstandene Reaktionsprodukt, durch Meerrettichperoxidase oxidiertes Tetramethylbenzidin, war hellblau. Um die

Reaktion zu beenden, wurden 50µl 1-Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion der dann entstandenen gelblichen Lösung photometrisch gemessen (Absorptionsmaximum 690nm). Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte automatisch in der ELISA-Reader Software. Davon ausgehend wurden dann die jeweiligen IL-4-Konzentrationen bestimmt. Bei den Doppelbestimmungen wurden die jeweiligen Mittelwerte dokumentiert.

2.3.3 Bestimmung von IL-10

IL-10 wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine®-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA). Die Tiefgefrorenen Seren wurden zunächst bei Raumtemperatur erwärmt und vor dem Pipettieren leicht durchmischt. Meistens Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde eine Eichlösung hergestellt. Dazu wurde IL-10 (100pg/vial) rekombinantes humanes IL-10 (rh-IL-10), in einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator mit 2 ml Verdünnungslösung (Kälberserum mit Stabilisator) aufgefüllt. Die Eichlösung entspricht somit eine IL-10-Konzentration von 50 pg/ml. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Eichlösung hergestellt (mit je 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 pg/ml sowie eine Kontrolle ohne IL-10 (0pg/ml). Auf eine bereits mit anti-IL-10 Antikörpern beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8 Löcher), wurden zuerst 50µl gepufferte Proteinbase pipettiert. Dann wurden jeweils 50µl Standard (2x8 Löcher) bzw. Serum hinzugefügt. Als nächstes wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt verworfen. Um die haftenden Antikörper vollständig von Serum bzw. Eichlösung zu befreien, wurde die Mikrotiterplatte sechsmal mit je 400µl Waschpufferkonzentrat abgespült. Anschließend wurden je 200µl IL-10-Konjugat in die einzelnen Löcher pipettiert und die Platte mit einer neuen Folie abgedeckt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde der Spülvorgang wie oben beschrieben wiederholt und 50µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jedes Loch pipettiert. Danach folgte eine Inkubation eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach eine Stunde Inkubationszeit wurde der Amplifizierlösung 50 µl in die einzelnen Löcher pipettiert und die Mikrotiterplatte mit einer neuen Folie abgedeckt. Das entstandene Reaktionsprodukt, durch Meerrettichperoxidase oxidiertes Tetramethylbenzidin, war hellblau. Um die Reaktion zu beenden, wurden 50µl 1-molare Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion der dann entstandenen gelblichen Lösung photometrisch gemessen (Absorptionsmaximum 690 nm). Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte automatisch. Davon ausgehend wurden dann die jeweiligen IL-10-Konzentrationen bestimmt. Von den Doppelbestimmungen wurden die jeweiligen Mittelwerte dokumentiert.

2.3.4 Bestimmung von IL-12

IL-12 wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine®-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die Tiefgefrorenen Seren wurden zunächst bei Raumtemperatur erwärmt und vor dem Pipettieren leicht durchmischt. In der Regel wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde eine Eichlösung hergestellt. Dazu wurde IL-12 (200pg rekombinantes humanes

IL-12 (rh-IL-12), in einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator mit 4 ml Verdünnungslösung (Kälberserum mit Stabilisator) aufgefüllt. Die Eichlösung entspricht somit einer IL-12-Konzentration von 50 pg/ml. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Eichlösung hergestellt (mit je 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 pg/ml sowie eine Kontrolle ohne IL-12 (0 pg/ml)). Auf eine bereits mit anti-IL-12 Antikörpern beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8 Löcher), wurden zuerst 50µl gepufferte Proteinbase pipettiert. Dann wurden jeweils 50µl Standard (2x8 Löcher) bzw. Serum hinzugefügt. Als nächstes wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt verworfen. Um die haftenden Antikörper vollständig von Serum bzw. Eichlösung zu befreien, wurde insgesamt sechsmal mit je 400µl Waschpufferkonzentrat abgespült. Anschließend wurden je 200µl IL-12-Konjugat in die einzelnen Löcher pipettiert und die Platte mit einer neuen Folie abgedeckt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde der Spülvorgang wie oben beschrieben wiederholt und 50µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jedes Loch pipettiert. Danach folgte eine Inkubation eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde 50µl Amplifizierungslösung in jedes Loch pipettiert. Dann folgte eine Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das entstandene Reaktionsprodukt, durch Meerrettichperoxidase oxidiertes Tetramethylbenzidin, war hellblau. Um die Reaktion zu beenden, wurden 50µl 1-molare Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion der dann entstandenen gelblichen Lösung photometrisch gemessen (Absorptionsmaximum 690 nm). Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte automatisch. Davon ausgehend wurden dann die jeweiligen IL-12-Konzentrationen bestimmt. Bei den Doppelbestimmungen wurden die jeweiligen Mittelwerte dokumentiert.

2.3.5 Bestimmung von TNF- α

TNF- α wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine®-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die tiefgefrorenen Seren wurden zunächst bei Raumtemperatur erwärmt und vor dem Pipettieren leicht durchmischt. In der Regel wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde eine Eichlösung hergestellt. Dazu wurde TNF- α (32pg/vial) rekombinantes humanes TNF- α (rh-TNF- α), in einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator mit 1 ml Verdünnungslösung (Kälberserum mit Stabilisator) aufgefüllt. Die Eichlösung entspricht somit einer TNF- α Konzentration von 32 pg /ml. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Eichlösung hergestellt (mit je 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, pg/ml sowie eine Kontrolle ohne TNF- α (0 pg /ml)). Auf eine bereits mit anti-TNF- α Antikörpern beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8 Löcher), wurden zuerst 50µl gepufferte Proteinbase pipettiert. Dann wurden jeweils 50µl Standard (2x8 Löcher) bzw. Serum hinzugefügt. Als nächstes wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und 14 - 20 Stunden bei +2 - 8° C. Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt verworfen. Um die haftenden Antikörper vollständig von Serum bzw. Eichlösung zu befreien, wurde insgesamt viermal mit je 400µl Waschpufferkonzentrat abgespült. Dann wurden je 200µl IL-12-Konjugat in die einzelnen Löcher pipettiert und die Platte mit einer neuen Folie abgedeckt. Nach drei Stunden Inkubationszeit wurde der Spülvorgang wie oben beschrieben wiederholt und 50µl Substratlösung

(Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jedes Loch pipettiert. Danach folgte eine Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde 50µl der Amplifizierungslösung in jedes Loch pipettiert. Dann folgte eine Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das entstandene Reaktionsprodukt, durch Meerrettichperoxidase oxidiertes Tetramethylbenzidin, war hellblau. Um die Reaktion zu beenden, wurden 50µl 1 molare Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion der dann entstandenen gelblichen Lösung photometrisch gemessen (Absorptionsmaximum 690 nm). Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte automatisch. Davon ausgehend wurden dann die jeweiligen TNF- α -Konzentrationen bestimmt. Bei den Doppelbestimmungen wurden die jeweiligen Mittelwerte dokumentiert.

2.3.6 Bestimmung von IFN- γ

IFN- γ wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt (Quantikine®-Reagentien der Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die Tiefgefrorenen Seren wurden zunächst bei Raumtemperatur erwärmt und vor dem Pipettieren leicht durchmischt. In der Regel wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Erstellen einer Standardkurve wurde eine Eichlösung hergestellt. Dazu wurde IFN- γ (1 vial rekombinantes humanes IFN- γ (rh-IFN- γ), in einer gepufferten Proteinbase als Stabilisator mit 4 ml Verdünnungslösung (Kälberserum mit Stabilisator) aufgefüllt. Die Eichlösung entspricht somit einer IFN- γ -Konzentration von 1000 pg/ml. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Eichlösung hergestellt (mit je 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 pg/ml sowie eine Kontrolle ohne IFN- γ (0 pg/ml)). Auf eine bereits mit anti-IFN- γ Antikörpern beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte (12 x 8 Löcher), wurden zuerst 50µl gepufferte Proteinbase pipettiert. Danach wurden jeweils 50µl Standard (2x8 Löcher) bzw. Serum hinzugefügt. Als nächstes wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedeckt und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt verworfen. Um die haftenden Antikörper vollständig von Serum bzw. Eichlösung zu befreien, wurde insgesamt viermal mit je 400µl Waschpufferkonzentrat gespült. Danach wurden je 200µl IFN- γ Konjugat in die einzelnen Löcher pipettiert und die Platte mit einer neuen Folie abgedeckt. Nach zwei weiteren Stunden Inkubationszeit wurde der Spülvorgang wie oben beschrieben wiederholt und 200µl Substratlösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) in jedes Loch pipettiert. Es folgte eine Inkubation über 20 Minuten bei Raumtemperatur. Das entstandene Reaktionsprodukt, durch Meerrettichperoxidase oxidiertes Tetramethylbenzidin, war hellblau. Um die Reaktion zu beenden, wurden 50µl 1-molare Schwefelsäure zugegeben und die Extinktion der dann entstandenen gelblichen Lösung photometrisch gemessen (Absorptionsmaximum 570 nm). Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte automatisch. Davon ausgehend wurden dann die jeweiligen IFN- γ Konzentrationen bestimmt. Bei den Doppelbestimmungen wurden die jeweiligen Mittelwerte dokumentiert.

3. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 108 Serumproben von 24 Patienten untersucht. Davon wurden 16 (67%) Patienten von Haploidentischen Familienspendern (Haplo) und 8 (33%) Patienten von HLA-identische Fremdspender (MUD=matched unrelated donor) transplantiert. Untersucht wurde, ob die Verläufe der Zytokinpiegel-Konzentrationen von Interleukin 2, 4, 10, 12, TNF- α und IFN- γ im Serum der Empfänger den klinischen Parametern (CMV-Infektionen, GvHD und Abstoßung) korrelierten. Weiterhin wurden die Zytokinpiegel der beiden Patientengruppen verglichen sowie eine mögliche Korrelation mit der Erholung von T- und NK-Zellen untersucht.

Verlaufskurven der einzelnen Patienten

Nachfolgend ist der klinische Verlauf nach Stammzelltransplantation (SZT) für den jeweiligen Patienten dargestellt. Aufgetragen sind die absolute Zahl an Leukozyten und Lymphozyten, berechnet pro Mikroliter, sowie der Grad der GvHD und der Wert für das C-reaktive Protein. In der oberen Grafik sind jeweils die gemessenen Werte für Interleukin 2 (IL 2), Interferon gamma (IFN- γ) Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) eingetragen. In der unteren Grafik sind die Werte für Interleukin 4 (IL 4), Interleukin 10 (IL 10) und Interleukin 12 (IL 12) eingetragen. Die Achsen sind zur besseren Darstellung logarithmisch eingeteilt; Zytokinwerte von 0 wurden zur besseren Darstellung bei 0,1 eingetragen.

Die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen sowie die klinischen Parameter der einzelnen Patienten sind in Tabelle 17 und 18 aufgeführt. In den Tabellen 5 bis 16 wurden die Zytokinpiegel der beiden Patientengruppen wochenweise als Median mit Minimum und Maximum sowie als Mittelwert und Standardabweichung aufgeführt.

Einteilung der Patienten in Gruppen

Bei jeweils 2 Patienten wurde eine Abstoßung des Transplantates charakterisiert durch ein vorübergehenden Leukozytenanstieg und nachfolgendem Abfall mit einem Anstieg der Lymphozyten beobachtet. Bei 3 Patienten wurde ein Non-engraftment, charakterisiert durch das Fehlen eines Leukozytenanstieges und eine deutliche Lymphozytenpopulation diagnostiziert:

Tabelle 2: Patienten mit Abstoßung bzw. Non-engraftment:

Patienten	Gesch.	Alter	Diagnose	Abstoßung/ Non-engraftment	Transplantations-Form
Pat.Nr.6	m	8	AML-M1(KMRez.)	Abstoßung am Tag 15	Haploident. (Mutter)
Pat.Nr.7	w	3,5	CML Ph.+	Abstoßung am Tag 19	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.9	w	10	MDS	Non-eng. am Tag 18 TP2	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.13	m	14	SAA	Non-eng. am Tag 27 TP2,3,4	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.15	m	4,5	C ALL(KM-Rez.)	Non-eng. am Tag 22	Haploident. (Mutter)

Bei 9 Patienten wurde eine GvHD beobachtet; diese beschränkte sich auf Grad 1 und wurde in verschiedene Stadien eingeteilt.

Tabelle 3: Patienten mit GvHD

Patienten	Gesch.	Alter	Diagnose	GvHD	Transplantations-Form
Pat.Nr2.	w	5	C ALL (KM-Rez.)	Tag 11-18, Haut S1 Grad1,	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.4	w	3,5	Prä-B-ALL (KM-Rez.)	Tag 15-22, Haut S1 Grad1,	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.7	w	3,5	CML Ph +	Tag 17-21, Haut S1 Grad1,	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.8	m	12	CML	Tag 18-21, Haut S2 Grad1	Haploident. (Mutter)
Pat.Nr.10	w	10	CML Ph +	Tag 19-24, Haut S1 Grad1	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.16	m	8	T-ALL (KM-Rez.)	Tag 18-29 Haut S2 G1, Darm St2 Grad1	HLA ident. (Fremd)
Pat.Nr.19	m	7Mon	Wiskott-Aldrich Syndrom	Tag 23-26 Leber S2, Haut S1 Grad1	HLA ident. (Fremd)
Pat.Nr.23	w	18	AML-M2	Tag 15-30 Haut, St2 Grad1	HLA ident. (Fremd)
Pat.Nr24.	w	4	C ALL (KM-Rez.)	Tag17-22, Haut St2 Grad1	HLA ident. (Fremd)

Bei 7 Patienten wurde durch einen positiven PCR-Befund eine CMV-Infektion diagnostiziert.

Tabelle 4: Patienten mit dokumentierter CMV positiv

Patienten	Gesch.	Alter	Diagnose	CMV (PCR+)	Transplantations-Form
Pat.Nr.1	m	4Mon	Osteopetrose	Ab Tag 22	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.5	m	8	ALL t-12;21(KM-Rez.)	Ab Tag 0	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.7	w	3,5	CML Ph.+	Ab Tag 17	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.16	w	10	CML	Ab Tag 0	Haploident. (Vater)
Pat.Nr.20	m	10	AML-M4	Ab Tag 0	HLA ident. (Fremd.)
Pat.Nr.23	w	18	AML-M2	Ab Tag 0	HLA ident. (Fremd.)
Pat.Nr.24	w	4	C ALL (KM-Rez.)	Ab Tag 13	HLA ident. (Fremd.)

3.1 Interleukin-10

Vor der Transplantation wurden 22 Patienten untersucht. Bei insgesamt 7 von ihnen konnten IL10 Spiegel zwischen 0,87 und 2,3 pg/ml gemessen werden (Tab.5 und 6). Der Normbereich IL 10 liegt zwischen 0 und 4,114 pg/ml. Bei 15 von 22 Patienten lagen die IL10 Serumspiegel unter der Nachweisgrenze. Bei 2 von 24 Patienten war keine Serum vor SZT verfügbar. Bei Fremdspendern Patienten wurden bei allen Proben IL 10 Spiegel von 0 pg/ml gemessen (Tab 6).

Nach der SZT konnte bei insgesamt 15 von 24 Patienten (Haplo 11, MUD 4) ein IL 10 Anstieg mit Werten zwischen 0,25 und 41,1 pg/ml festgestellt werden. Bei 12 Patienten (Haplo 9, MUD 3) lag der Wert über dem Normbereich von maximal 4,114 pg/ml (Tab.5 und 6). Die höchsten Werte wurden in Woche 3 bei Familienspender Patienten von $7,95 \pm 11,53$ pg/ml und in Woche 4 bei Fremdspender Patienten von $2,63 \pm 3,72$ pg/ml gefunden. Bei 9 (Haplo 5, MUD 4) Patienten konnte kein IL10 nachgewiesen werden (Tab 5 und Tab. 6).

Tab. 5: IL 10 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit Haploidentischen Familienspendern

Abnahme	Vor SZT	Nach SZT Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	15	13	16	16	8	4
Median	0	0	0	2,9	3,9	1,25
Min - Max	0 - 2,3	0 - 4,5	0 - 7,03	0 - 41,1	0 - 24,05	0 - 3,6
MW \pm SD	0,95 \pm 1,23	0,94 \pm 1,68	1,24 \pm 2,13	7,95 \pm 11,53	5,82 \pm 8,03	1,53 \pm 1,82

Tab. 6: IL 10 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit HLA-ident. Fremdspendern

Abnahme	Vor SZT	Nach SZT Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	7	4	6	6	2	4
Median	0	0	0	0	2,63	0
Min - Max	0	0	0 - 14,6	0 - 6,41	0 - 5,26	0 - 3,22
MW \pm SD	0	0	2,92 \pm 6,56	1,93 \pm 0,95	2,63 \pm 3,72	0,81 \pm 1,61

Bei 7 Patienten (Haplo 4, MUD 3) hatten nach SZT eine CMV Infektion. Bei ihnen war der IL 10 Wert nur minimal erhöht (Tab.5 und 6).

Bei 9 Patienten (Haplo 6, MUD 3) mit akuter Haut GvHD Stadium 1-2 Grad 1 waren die IL 10 Spiegel nicht erhöht.

Bei 4 Patienten (Haplo 4) war der IL10 Spiegel zum Zeitpunkt der Abstoßung signifikant erhöht (Abb.1, $p < 0,001$).

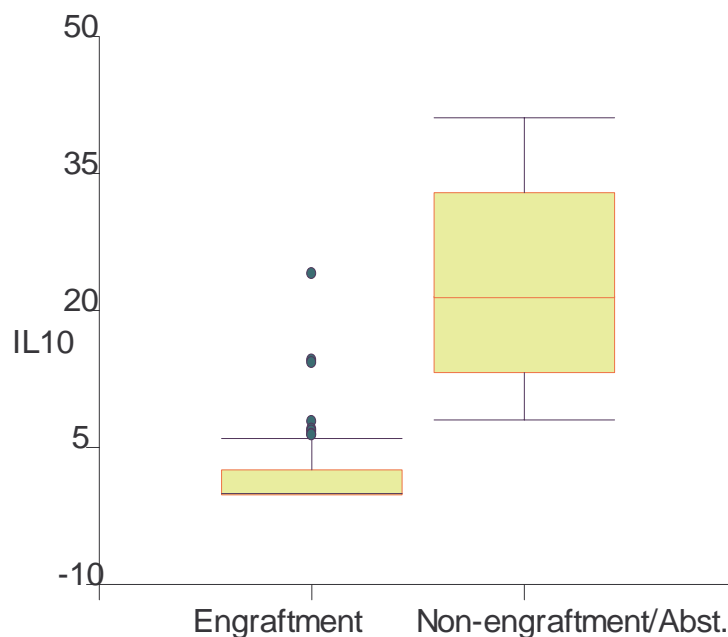


Abbildung 1: IL10 Spiegel bei Patienten ohne Abstoßung bzw. zum Zeitpunkt der Abstoßung/Non-engraftment

3.1.2 Beispiel 1 (Pat.Nr. 7)

Bei einem 3,5 jährigen Mädchen mit Chronischer myeloischer Leukämie und CMV-Infektion wurde ab dem 18 Tag ein starker Leukozytenabfall und nachfolgende Aplasie beobachtet. Die IL10 Werte stiegen im gleichen Zeitraum zusammen mit den Werten für TNF α , IL12, INF γ rapide an (Abb. 2).

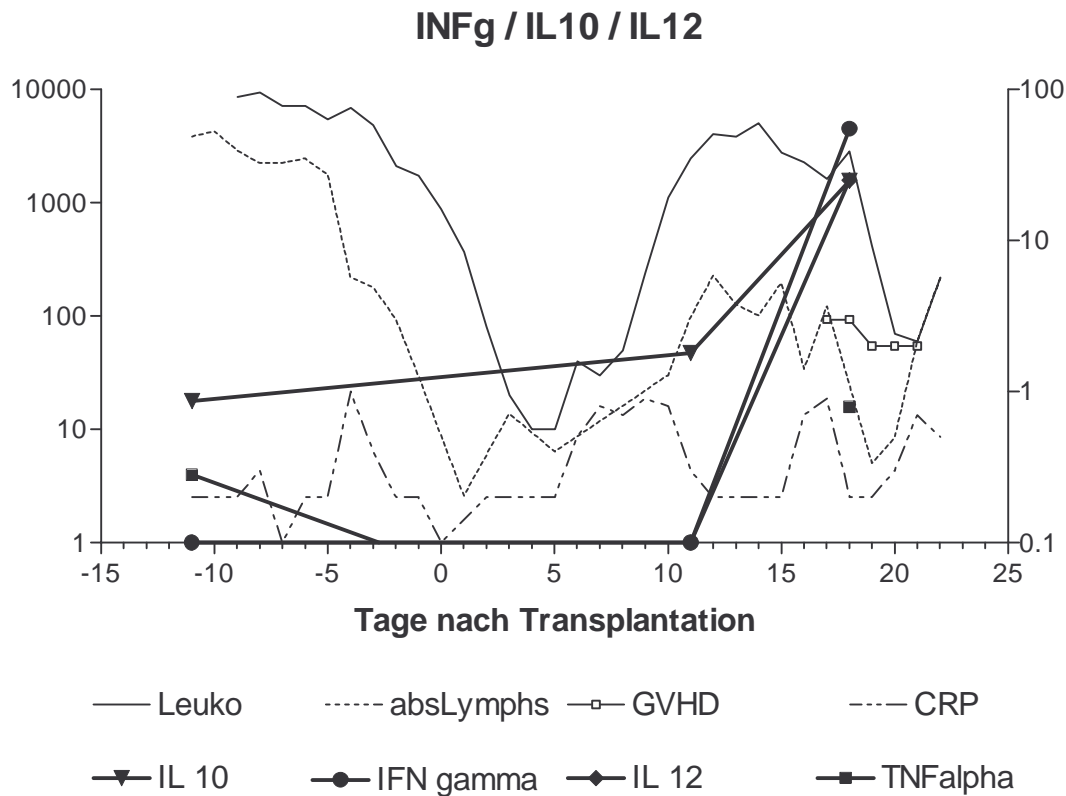


Abbildung 2: Patient Nr. 7

3.2 TNF- α

Vor der Transplantation waren bei 22 (Haplo 15, MUD 7) von 22 Patienten bereits TNF- α Spiegel nachweisbar. Die TNF- α Spiegel bei Familienspender Patienten lag im durchschnitt bei $23,2 \pm 35,1$ pg/ml und bei Fremdspender Patienten zwischen $22,4 \pm 19,7$ pg/ml.

Nach Transplantation zeigten bei 23 (Haplo 16, MUD 7) von 24 Patienten messbar TNF- α Spiegel. Der Maximalwert im Serum lag bei $153,2$ pg/ml, das Minimum unter der Nachweisgrenze. Sowohl bei Familienspender als auch bei Fremdspender-Patienten waren die TNF- α Spiegel im Serum aller Patienten über den Normbereich von $0-3,62$ pg/ml erhöht. Die höchsten Werte wurden in Woche 4 gemessen. Bei Familienspender Patienten lag der Wert im Durchschnitt bei $20,1 \pm 18,1$ pg/ml und bei Fremdspender Patienten bei $78,1 \pm 65,5$ pg/ml (Tab.7b und Tab. 8).

7 Patienten mit CMV-Infektionen hatten zum Zeitpunkt des positiven Antigennachweises hohe TNF- α (Median: $21,7$ pg/ml) Konzentrationen im Serum.(Abb.7, Tab.7 und Tab. 8)

Bei 4 Patienten mit Abstoßungen/Non-engraftment wurden ebenfalls hohe TNF- α -Konzentrationen gefunden (Abb. 1), sowie bei 9 Patienten mit Haut GvHD Stadium 1-2 Grad 1.

Tab. 7: TNF- α Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit Haploidentischen Familienspendern

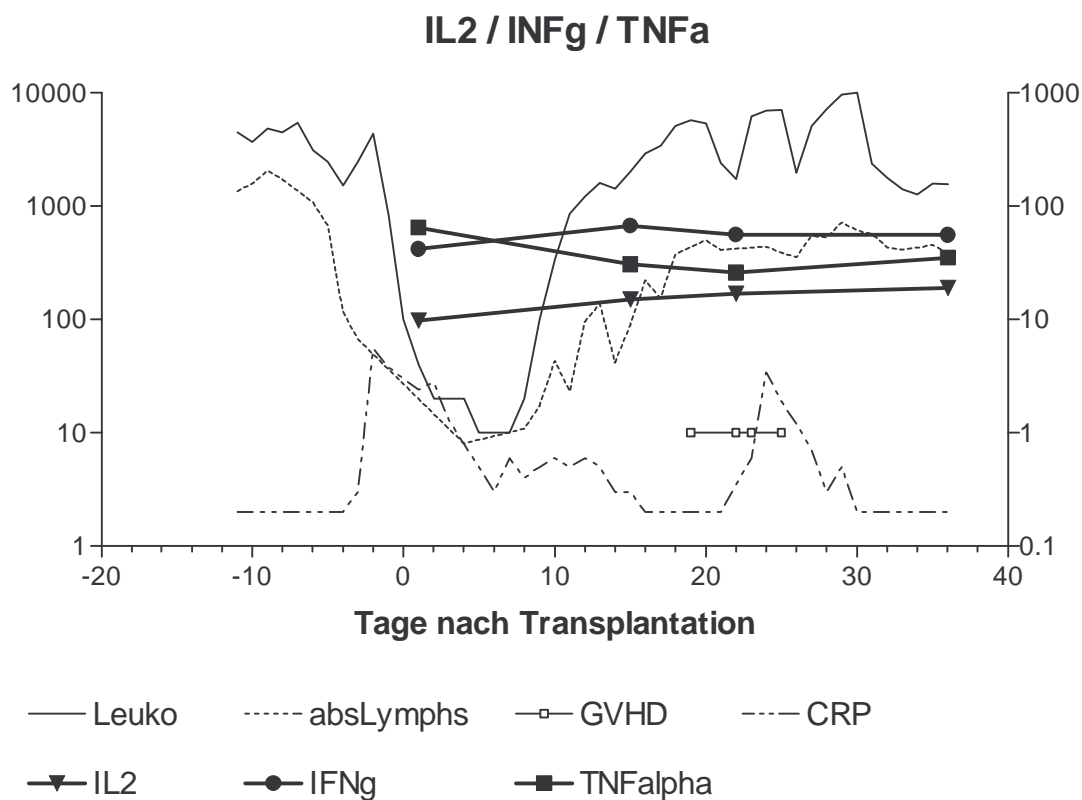
Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	15	13	16	16	8	4
Median	11,74	9,87	9,441	16,6	14,86	2,87
Min - Max	0 - 135,4	0 - 19,1	0 - 58,29	0 - 40,03	1,38 - 47,68	0 - 62,17
MW \pm SD	23,2 \pm 35,1	8,83 \pm 6,62	14,3 \pm 15,0	17,2 \pm 12,3	20,1 \pm 18,1	16,9 \pm 30,3

Tab. 8: TNF- α Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit unverwandten Fremdspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	7	4	6	6	2	4
Median	15,3	5,564	13,44	24,39	78,09	26,77
Min - Max	2,38 \pm 56,27	3,74 \pm 14,3	2,32 \pm 55,9	1,16 \pm 55,04	31,8 \pm 124,4	9,74 \pm 153,2
MW \pm SD	22,4 \pm 19,7	7,29 \pm 4,79	17,8 \pm 22,1	22,55 \pm 5,72	78,10 \pm 65,5	54,1 \pm 67,89

3.2.1 Beispiel 3 (Pat.10)

Es handelt sich um ein 10 Jahre altes Mädchen mit CML und CMV-Infektion. Nach SZT hatte sie eine akute GvHD Grad 1. Vor der SZT lag der TNF- α Spiegel bei 64,61 pg/ml. Nach der SZT lag der TNF- α Spiegel in Woche 2 bei 30,68 pg/ml, in Woche 3 bei 25,86 pg/ml, in Woche 4 wieder stieg 34,95 pg/ml an (Abb.4,Tab.17).



Beispiel

Abbildung 4: (Pat.10)

3.2.2 Beispiel 4 (Pat.Nr.19)

Es handelt sich um einen 7 Monate alten Jungen mit Wiskott-Aldrich-Syndrom. Nach SZT trat eine GvHD Grad 1 auf. Vor der SZT lag der TNF- α Spiegel bei 56,27 pg/ml, nach der SZT fiel der TNF- α Spiegel in Woche 2 auf 13,44 pg/ml ab. In der dritten Woche stieg er auf 25,75 pg/ml an und in der vierten Woche zum Zeitpunkt der GvHD rapide auf 124,4 pg/ml an (Abb.5, Tab.18).

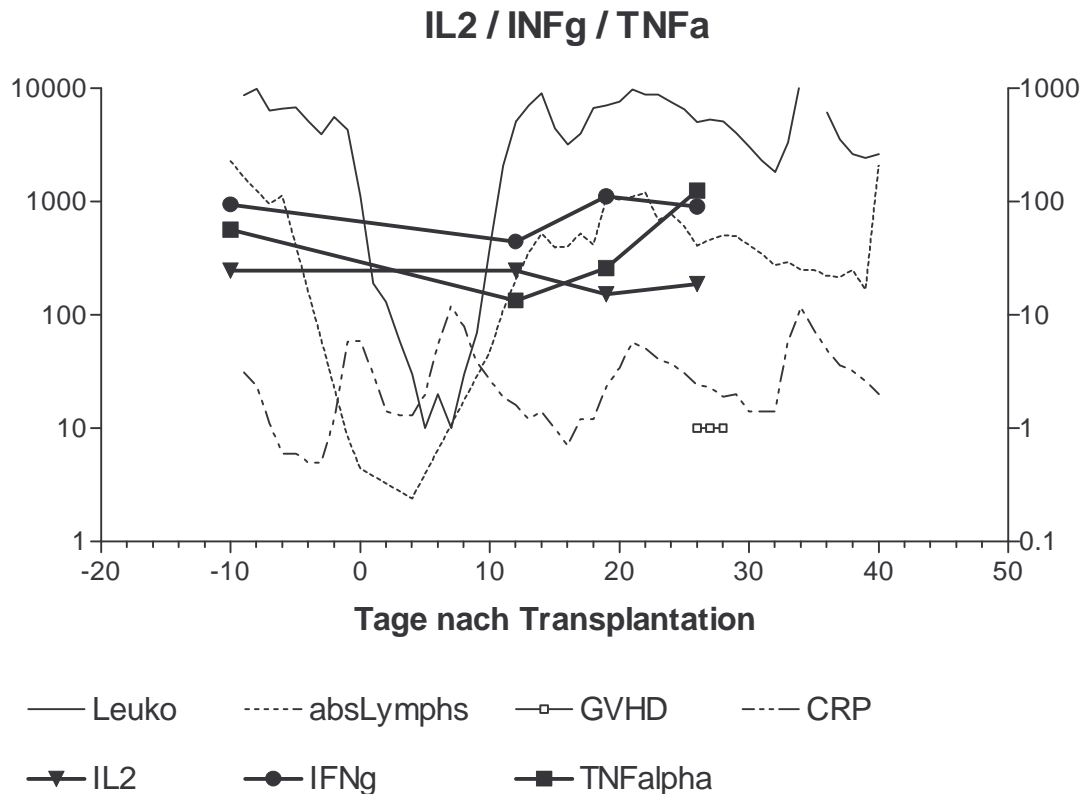


Abbildung 5 (Pat.Nr.19)

3.3 Interleukin-2

Vor Transplantation waren bei 13 von 22 Patienten IL 2 Spiegel zwischen 4,94 und 37,82 pg/ml nachweisbar. Nur 2 Patienten lagen dabei über dem Normbereich von 31,2 pg/ml (Tab 17 und 18). Die IL 2 Spiegel bei Familienspender Patienten lagen im Durchschnitt bei $9,25 \pm 14,7$ pg/ml und bei Fremdspender Patienten zwischen $15,0 \pm 6,42$ pg/ml. (Tab.9 und 10).

Nach der Transplantation waren bei 20 von 24 Patienten (Haplo 12, MUD 8) IL 2 Spiegel messbar. Der Maximalwert im Serum lag bei 131,6 pg/ml, das Minimum unter der Nachweisgrenze. Die höchsten Werte wurden in Woche 4 bei Haplo-Patienten von $26,8 \pm 23,6$ pg/ml und in Woche 2 bei MUD von $20,01 \pm 11,95$ pg/ml gefunden (Tab.9, 10, 17 18). Bei 12 Patienten (11 Haplo, MUD 1) lagen die Werte über dem Normbereich. Bei 12 Patienten, bei denen gleichzeitig ein Immunstatus verfügbar war, korrelierte der Interleukin 2 Spiegel signifikant mit der Anzahl an CD56+ NK-Zellen ($p=0.03$; $r^2=0.36$; Abb. 6).

Bei 4 Patienten der Haplo-Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Abstoßung höhere IL2 Spiegel festgestellt (Abb. 3, Tab 17). IL 2 Spiegel waren bei Patienten mit CMV Infektion und Patienten mit GvHD nicht erhöht.

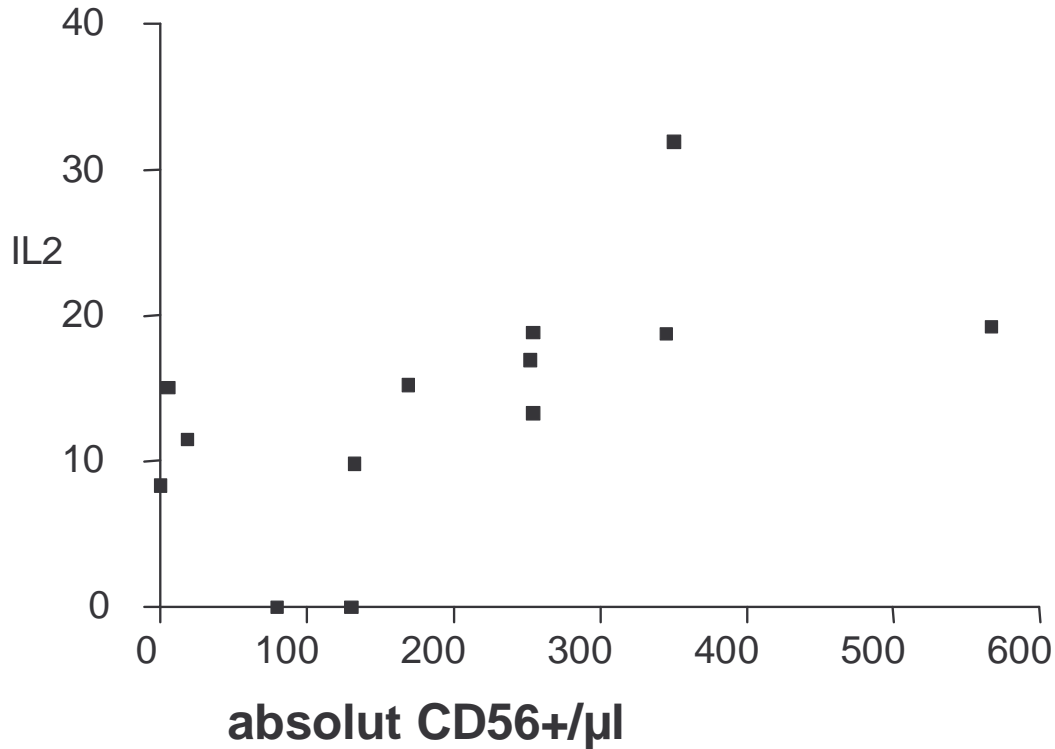


Abbildung 6 Zusammenhang zwischen der absoluten Anzahl an CD 56+/ μ l und Interleukin 2

Tab. 9: IL 2 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit Haploidentischen Familienspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	15	13	16	16	8	4
Median	0	8,04	3,63	9,5	25,58	8,84
Min - Max	0 - 44,38	0 - 82,78	0 - 74,51	0 - 131,6	0 - 64,37	0 - 42,34
MW \pm SD	9,25 \pm 14,7	20,3 \pm 29,5	13,9 \pm 20,4	24,1 \pm 36,3	26,8 \pm 23,6	15,0 \pm 20,0

Tab. 10: IL 2 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit unverwandten Fremdspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	7	4	6	6	2	4
Median	13,58	8,16	15,23	12,59	16,06	16,07
Min - Max	4,94 - 24,7	8,16 - 28,46	9,89 - 38,81	4,95 - 24,95	13,4 - 18,77	7,05 - 19,28
MW \pm SD	15,09 \pm 6,42	16,70 \pm 8,49	20,01 \pm 11,95	10,57 \pm 4,42	16,06 \pm 3,83	14,62 \pm 5,31

3.4 Interleukin- 4

Die Messung von IL4 ergab folgende Ergebnisse. Vor der Transplantation waren bei insgesamt 13 von 22 Patienten zwischen 0,28 und 2,66 pg/ml gemessen werden. Die IL 4 Spiegel bei Familienspender Patienten lag im Durchschnitt bei $0,74 \pm 0,99$ und bei Fremdspender Patienten zwischen $0,98 \pm 0,89$ pg/ml (Tab. 11 und 12).

Nach der Transplantation konnte bei 20 (Haplo 12, Fremd 8) von 24 Patienten IL4 zwischen 0 und maximal 12,4 pg/ml gemessen werden (Tab. 11 und 12). Dabei lagen die weitaus meisten Werte (62 von 108 Proben) über dem Normbereich von $0 \pm 0,25$ pg/ml. Ein Zusammenhang mit GvH, Abstoßung, CMV-Infektionen und Lymphozytenzahl konnte nicht gefunden werden.

Bei 13 Patienten, bei denen ein Immunstatus vorlag korrelierte der IL4 Spiegel mit der Anzahl an Leukozyten ($p=0.03$; $r^2=0,33$).

Tab. 11: IL4 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit Haploidentischen Familienspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	15	13	16	16	8	4
Median	0	0,69	1,11	2,431	0,266	1,215
Min - Max	0 - 2,669	0 - 3,912	0 - 5,493	0 - 12,4	0 - 3,736	0 - 4,947
MW \pm SD	$0,74 \pm 0,99$	$1,19 \pm 1,164$	$1,64 \pm 1,56$	$2,58 \pm 2,91$	$0,89 \pm 1,39$	$1,84 \pm 2,36$

Tab. 12: IL 4 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit unverwandten Fremdspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	7	4	6	6	2	4
Median	0,489	0,368	0,972	0,245	7,99	0,801
Min - Max	0,29 - 2,661	0,17 - 0,574	0,31 - 2,91	0,24 - 6,17	0,94 - 15,04	0,06 - 7,247
MW \pm SD	$0,98 \pm 0,89$	$0,37 \pm 0,18$	$1,33 \pm 1,08$	$2,27 \pm 3,38$	$7,99 \pm 9,97$	$2,23 \pm 3,40$

3.5 Interleukin-12

Vor der SZT war IL12 bei 8 von 22 Patienten nachweisbar. Der Maximalwert im Serum lag bei 6,72 pg/ml, das Minimum unter der Nachweisgrenze. Bei Haplo waren IL 12 Spiegel zwischen $0,06 \pm 0,25$ pg/ml und bei MUD lag bei $2,78 \pm 2,68$ pg/ml (Tab. 13 und 14).

Nach der SZT konnte bei 16 von 24 Patienten IL12 bis maximal 73,9 pg/ml nachgewiesen werden. Bei Haploidentischen Empfängern konnten nur vereinzelt IL12 nachgewiesen werden, die Werte waren dann stets über dem Normbereich; bei Fremdspendern konnte bei fast allen Proben regelmäßig niedere bis mittlere IL12 Werte gemessen werden. Nur bei 11 von 108 Proben wurden Werte über dem Normbereich von $0-3,58$ pg/ml gemessen (Tab. 13 und 14). Ein Zusammenhang mit GvH, Abstoßung, CMV-Infektionen oder der Leukozyten und Lymphozytenzahl konnte nicht gefunden werden.

Tab. 13: IL 12 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit Haploidentischen Familienspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	15	13	16	16	8	4
Median	0	0	0	0	0	0
Min - Max	0 - 0,949	0 - 51,55	0 - 40,67	0 - 25,14	0 - 52,17	0 - 73,9
MW \pm SD	0,06 \pm 0,25	4,06 \pm 14,27	4,29 \pm 12,62	1,99 \pm 6,35	6,52 \pm 18,44	18,47 \pm 36,9

Tab14: IL 12 Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit unverwandten Fremdspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	7	4	6	6	2	4
Median	1,93	1,08	1,7	0,698	1,97	1,68
Min - Max	0,51 - 6,72	0,86 - 6,54	0 - 4,79	0 - 8,81	1,72 - 2,22	0,76 - 10,04
MW \pm SD	2,78 \pm 2,68	2,39 \pm 2,77	2,07 \pm 1,88	0,58 \pm 0,70	1,97 \pm 0,35	3,54 \pm 4,36

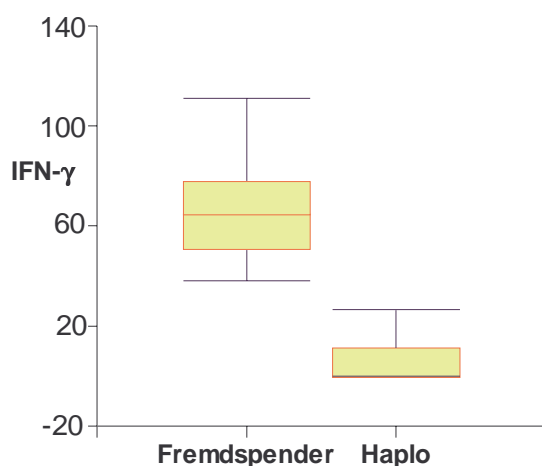
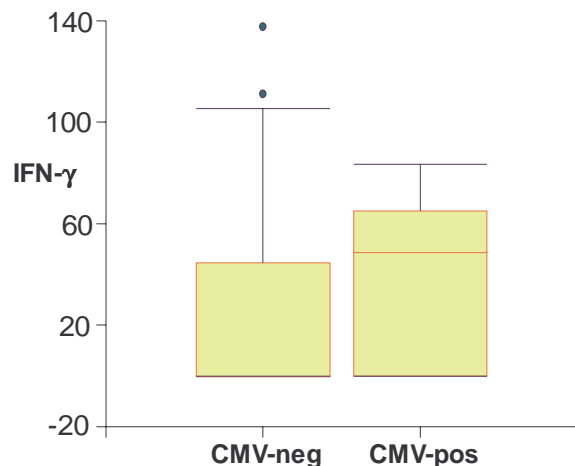
3.6 Interferon- γ

Bei 11 von 22 Patienten konnte bereits vor Transplantation IFN- γ über dem Normbereich von 0-15,6 pg/ml gemessen werden. Die IFN- γ Spiegel lag bei Haplo im durchschnitt bei $17,7 \pm 37,79$ pg/ml und bei MUD im durchschnitt bei $66,83 \pm 34,9$ pg/ml.

Nach Transplantation war bei 16 von 24 Patienten IFN- γ messbar. Der Maximalwert im Serum lag bei 137,6 pg/ml, das Minimum unter der Nachweisgrenze. Die höchsten Werte wurden in Woche 3 bei Haplo von $18,02 \pm 25,1$ pg/ml (Tab. 15 und 16).

Fremdspender hatten dabei signifikant höhere IFN- γ Werte als Empfänger haplo-identischer Stammzellen (Abb. 7a; $p < 0.001$).

Ebenfalls signifikant höherer IFN- γ Spiegel wurden im Serum von 7 Patienten mit CMV-Nachweis gemessen (Abb. 7b, $p = 0.02$). Die IFN- γ Spiegel waren bei Patienten mit akuter GvHD und Abstoßung nur minimal erhöht.

Abb. 7a Zusammenhang IFN- γ und Spender-TypAbb. 7b Zusammenhang IFN- γ und CMV

Tab. 15: IFN- γ Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit Haploidentischen Familienspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	15	13	16	16	8	4
Median	0	0	0	2,33	0	0
Min - Max	0 - 135,9	0 - 83,3	0 - 67,07	0 - 64,86	0 - 55,49	0
MW \pm SD	17,7 \pm 37,79	16,1 \pm 28,35	9,90 \pm 20,3	18,02 \pm 25,1	9,733 \pm 19,1	0

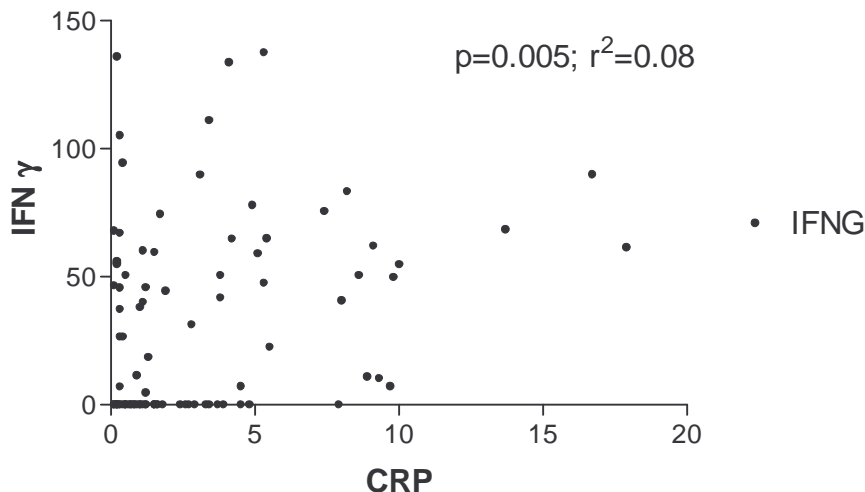
Tab 16: IFN- γ Konzentrationen (pg/ml) von Patienten mit unverwandten Fremdspendern

Abnahme	Vor KMT	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Anzahl	7	4	6	6	2	4
Median	50,61	62,49	64,98	68,54	70,20	64,96
Min - Max	37,3 - 133,7	47,59 - 89,9	44,4 - 137,6	38,1 - 111,1	50,6 - 89,8	59,6 - 67,88
MW \pm SD	66,83 \pm 34,9	65,63 \pm 20,1	73,8 \pm 37,93	76,36 \pm 35,5	70,21 \pm 27,7	64,35 \pm 4,20

3.2 Korrelation mit CRP

Eine schwache Korrelation zu den CRP-Werten konnte für IFN- γ gefunden werden (Pearson Koeffizient $r^2 = 0,08$, $p=0,005$, Abb. 8) sowie für TNFa ($p=0,011$; $r^2=0,067$).

Für die anderen Interleukine konnte keine Korrelation mit dem CRP gefunden werden.

Abbildung 8: Vergleich der IFN- γ (pg/ml) mit CRP

3.3 Korrelation mit der T-Zellregeneration

Die Patienten wurden nach der Dauer der T-Zell-Regeneration in zwei Gruppen eingeteilt. Patienten die innerhalb von 100 Tagen nach Stammzellgabe mehr als 100 CD3+ T-Zellen/ μ l erreichten wurden der Gruppe „gute Regeneration“ zugeteilt; Patienten die nicht oder später als 100 Tage nach

Stammzellgabe mit T-Zellen regenerierten wurden der Gruppe „schlechte Regeneration“ zugeteilt. Die Mittelwerte der Zytokinspiegel der einzelnen Wochen wurden in Abbildung 1 und 10 aufgetragen. In der Gruppe der haploidenten Empfänger waren die Interleukin 2 Spiegel der Patienten mit guter T-Zellregeneration in der Woche 4 und 5 (Werte zusammengefaßt) signifikant höher ($p= 0,02$; Abb.9) als die Spiegel der Patienten mit schlechter T-Zellregeneration. Signifikant höher ($p=0,03$, Abb.10) war auch der Interleukin 10 Spiegel in Woche 2 bei den haploidenten Empfängern in Patienten mit schlechter T-Zellregeneration sowie der IL12 Spiegel in Woche 2 bei haploidenten Empfängern mit guter T-Zellregeneration.

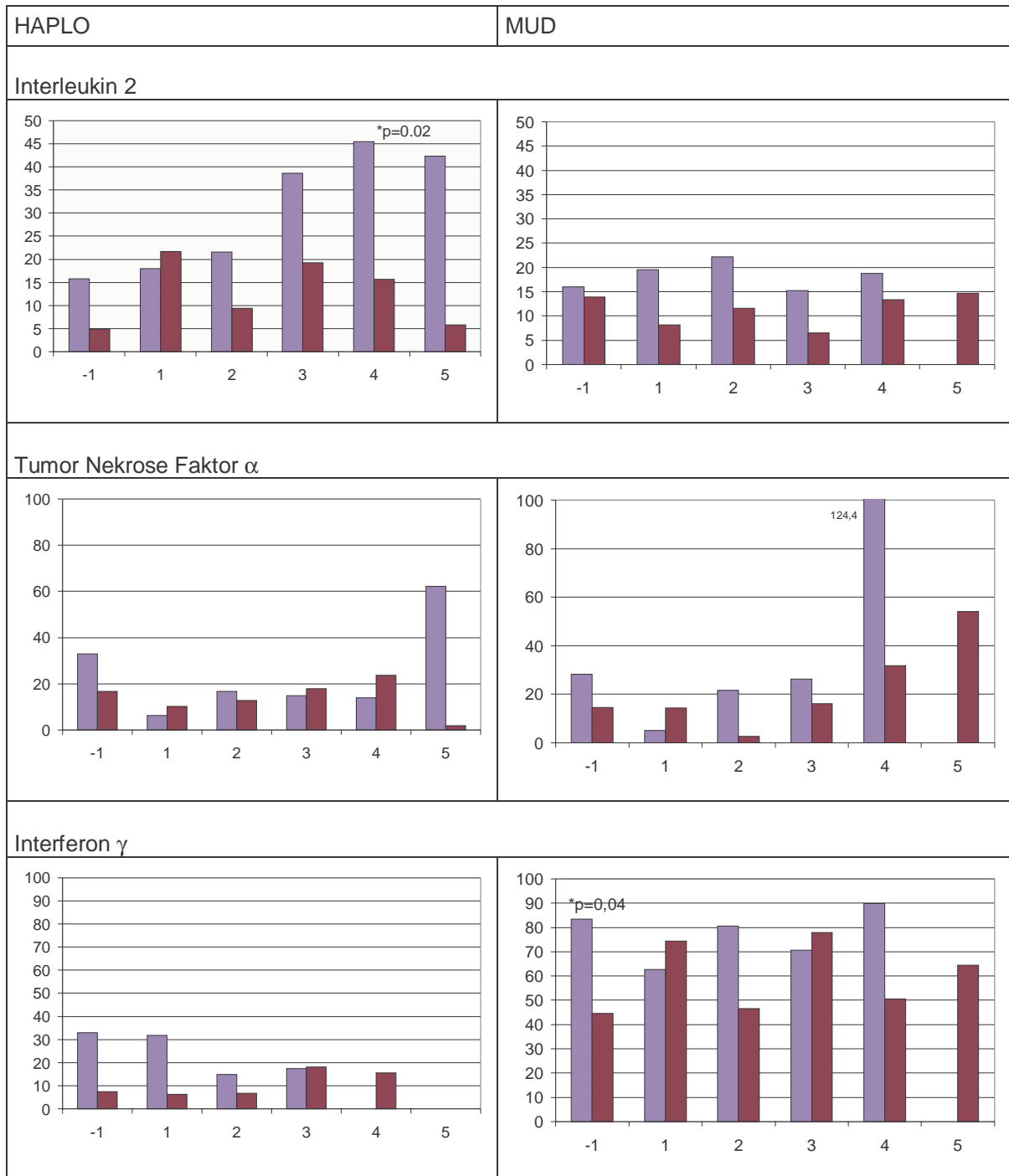


Abbildung 9: Vergleich der Zytokinspiegel von Patienten mit „guter“ T-Zellregeneration (>100 CD3 $^{+}/\mu$ l innerhalb von 100 Tagen, helle Balken) und „schlechter“ T-Zellregeneration (<100 CD3 $^{+}/\mu$ l innerhalb von 100 Tagen post TP, dunkle Balken) nach SZT

Abbildung 10

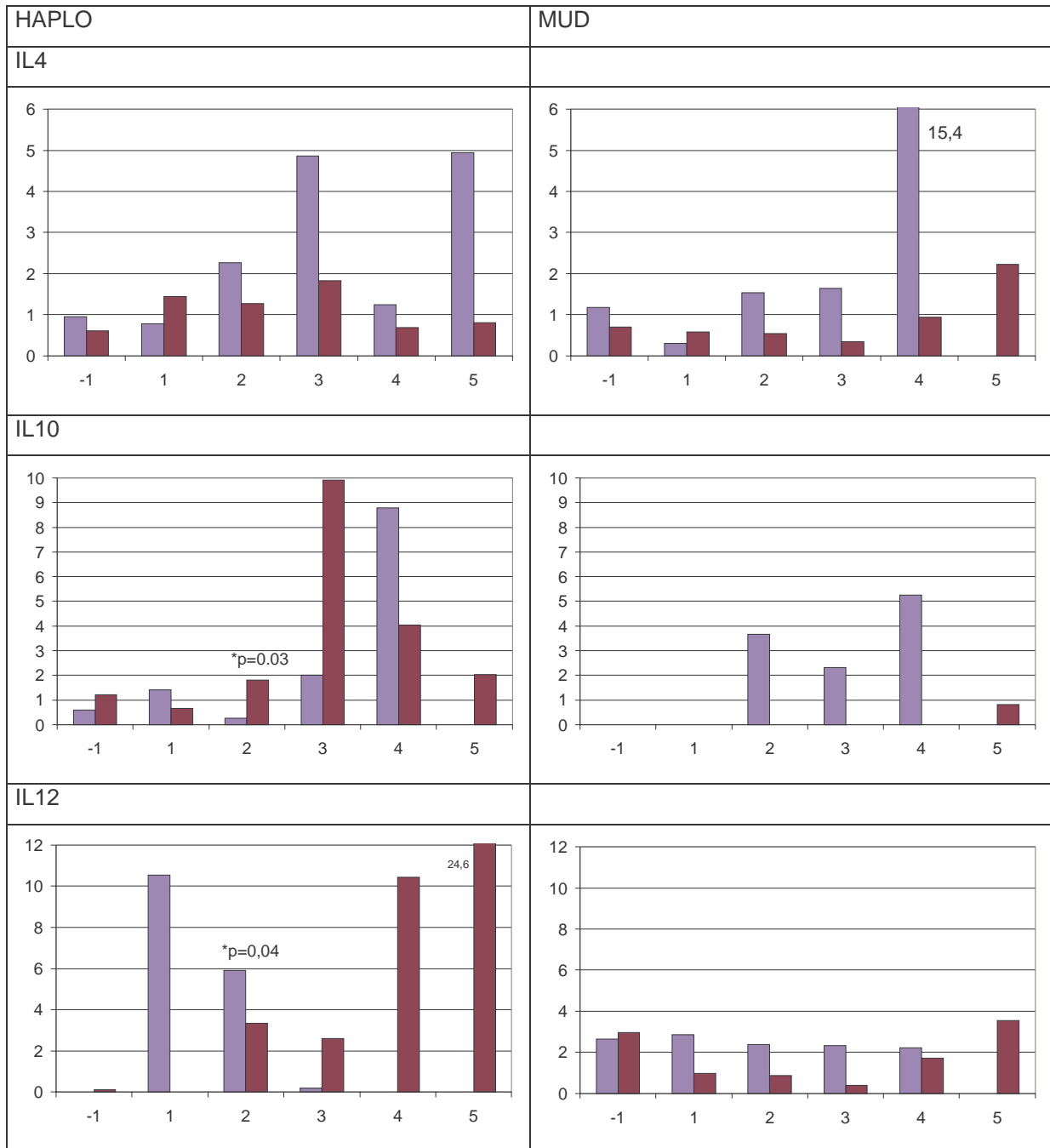


Abbildung 10: Vergleich der Zytokinspiegel von Patienten mit „guter“ T-Zellregeneration (>100 CD3 $^{+}/\mu\text{l}$ innerhalb von 100 Tagen, helle Balken) und „schlechter“ T-Zellregeneration (<100 CD3 $^{+}/\mu\text{l}$ innerhalb von 100 Tagen, dunkle Balken) nach SZT

4. Diskussion

Die Steuerung und das Zusammenspiel hämatopoetischer Zellen erfolgt durch Zytokine, die von unterschiedlichsten Zellen freigesetzt werden und ebenso die unterschiedlichsten Wirkungen zeigen. Die gleichen Zytokine können auf unterschiedliche Zielzellen sowohl synergistische als auch antagonistische Wirkung haben. Das Zusammenspiel der Zytokine ist dabei sehr komplex und von vielerlei Faktoren abhängig. Im Rahmen der allogenen SZT finden tiefgreifende Veränderungen statt, die die Freisetzung von Zytokinen hemmen und auch fördern. Durch die Konditionierung durch myeloablative und immunsuppressive Substanzen und Antisera wie Anti Lymphozyten Globulin (ALG), Anti Thymozyten Globulin (ATG) oder monoklonale Antikörper (OKT3) sowie durch die Ganzkörperbestrahlung werden nahezu alle Leukozyten zerstört und damit ein großer Teil der zytokinproduzierenden Zellen aus dem Körper entfernt. Auf der anderen Seite werden andere Gewebe, insbesondere durch die Bestrahlung geschädigt und damit zur Produktion von Zytokinen stimuliert. So konnten Holler et al., zeigen, dass die Graft-versus-Host Reaktion bei Patienten mit einem hohem TNF- α Spiegel während der Konditionierung deutlich stärker ausgeprägt ist (Holler 1991). Die Erholung der Leukozyten nach SZT ist ebenfalls abhängig von der Anwesenheit bestimmter Zytokine; so ist die Gabe von G-CSF nach autologer und auch allogener SZT mittlerweile Standard und bewirkt eine deutlich schneller Erholung der Granulozyten. In Bezug auf die Erholung der Lymphozyten nach allogener SZT hochangereicherter CD34+ Zellen war eine signifikant schnellere Erholung der T-Zellen bei nicht HLA-identischen Empfängern beobachtet worden, im Vergleich zu Patienten mit HLA-identischen Fremd Spendern (Handgretinger 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Verläufe der Zytokinspiegel nach Transplantation mit allogenen, hochangereicherten CD34+ Stammzellen untersucht. Hierzu existieren bisher nur sehr wenig Daten. Diese Transplantationsform unterscheidet sich von der konventionellen Transplantation mit kompletten, unmanipuliertem Knochenmark dadurch, dass nur CD34+ Progenitorzellen verabreicht werden und keinerlei weitere, potentiell Zytokine produzierenden Zellen im Transplantat enthalten sind.

Es stellt sich daher die Frage: besteht nach der Transplantation ein extrem zytokinarmes Milieu? Wirkt sich das auf das Angehen des Transplantates aus oder werden auch hier Zytokine in genügender Menge von Empfängerzellen produziert? Nach Erhebung der Zytokinwerte wurden diese mit dem Auftreten von CMV-Positivität in der PCR, Abstoßung und (milder) GvH-Erkrankung korreliert. Ferner wurden verschiedene Patientengruppen gebildet:

- Patienten mit guter und schlechter T-Zellregeneration
- Patienten mit hoher und niederer NK-Aktivität
- Patienten mit haplo-identischen Familienspendern und identischen Fremd Spendern

Letztendlich zielt diese Untersuchung darauf hin, erhöhte Zytokinspiegel eventuell als Diagnostikum verwenden zu können sowie fehlende Zytokine klinisch zu ersetzen, wobei hier momentan allerdings nur das Interleukin 2 zur Verfügung steht. Im folgenden werden die Zytokine im Einzelnen diskutiert und anschließend die Patientengruppen miteinander verglichen.

4.1 Interleukin 2

Interleukin 2 ist als Wachstumsfaktor für T-Zellen von entscheidender Bedeutung für die Erholung der T-Zellen nach der Transplantation. Bei reifen T-Zellen ist er ebenfalls von Wichtigkeit für die klonale Expansion und die Ausbildung eines normalen T-Zellpools. Interleukin 2 verstärkt die Zytotoxizität von T-Zellen und auch NK-Zellen und ist damit für deren anti-leukämische Wirkung von Belang (Grimm 1982). Da es von T-Zellen, von NK-Zellen und auch von B-Zellen gebildet werden kann, ist die Quelle bei Patienten kurz nach Transplantation unklar. In der Gruppe der haploidenten Empfänger waren die Interleukin 2 Spiegel der Patienten mit guter T-Zellregeneration in der Woche 4 und 5 (Werte zusammengefaßt) signifikant höher ($p=0,02$; Abb.9) als die Spiegel der Patienten mit schlechter T-Zellregeneration. Da die beobachteten IL2-Spiegel der T-Zellerholung vorangehen, scheint die Quelle des IL2 wohl bei anderen Zellen zu liegen. Bei 12 Patienten (11 Haplo, MUD 1) lagen die Werte über dem Normbereich. Bei 12 Patienten, bei denen gleichzeitig ein Immunstatus verfügbar war, korrelierte der Interleukin 2 Spiegel signifikant mit der Anzahl an CD56+ NK-Zellen ($p=0,03$; $r^2=0,36$; Abb. 6). Dies legt die Vermutung nahe, daß das in der frühen Phase nach der Transplantation beobachtete IL2 von NK-Zellen produziert wird, die damit die Erholung der T-Zellen fördern. In einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung (Handgretinger 2001) wurde die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nach Transplantation dokumentiert. Bei 8 Patienten wurde ebenfalls IL2 Spiegel gemessen. Alle Patienten mit guter Aktivität zeigten auch erhöhte IL 2 Spiegel zu dieser Zeit, während Patienten mit schlechter Aktivität keine messbaren IL 2 Spiegel hatten. Vermutlich dürfte es sich hier um ein Autostimulationsphänomen der NK-Zellen selbst handeln. Wodurch allerdings der Anreiz für die NKs gesetzt wird, IL 2 zu produzieren, konnte hier nicht geklärt werden. Eine klinische Pilotstudie zur Gabe von IL 2 nach Transplantation wurde zwischenzeitlich begonnen. Zielsetzungen sind hierbei: Verbesserung der T-Zellregeneration (basierend auf der oben geschilderten Beobachtung) sowie Erhöhung der zytotoxischen, potentiell antileukämischen NK-Aktivität.

4.2 Interleukin 4

Interleukin 4 wird als Wachstumsfaktor für B-Zellen von CD4+TH2-Zellen gebildet und fördert die humorale Immunität. Dagegen hemmt es die zellvermittelte Immunität wie z.B. die Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen und die Bildung von Lymphokine Activated Killer Cells (LAK) (Han 1988). Nach der Transplantation konnte bei 20 (Haplo 12, Fremd 8) von 24 Patienten IL4 zwischen 0 und maximal 12,4 pg/ml gemessen werden. Dabei lagen die weitaus meisten Werte (62 von 108 Proben) über dem Normbereich von 0 - 0,25 pg/ml. Ein Zusammenhang mit GvH, Abstoßung, CMV-Infektionen und Lymphozytenzahl konnte jedoch nicht gefunden werden. Auch ein hemmender Einfluß auf die Erholung der T-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die Untersuchung auf mögliche Korrelationen mit verschiedenen Faktoren ergab lediglich bei 13 Patienten, bei denen ein Immunstatus vorlag, die Korrelation mit der Anzahl an Leukozyten ($p=0,03$; $r^2=0,33$, Abb 6). Somit konnten für IL 4 weder klinisch positive Effekte noch ein diagnostisches Potential festgestellt werden.

4.3 Interleukin 10

IL 10 ist ein starker Suppressor der T-Zellfunktion (Tage 1992, De Waal Malefyt 1991) und wird von aktivierten Monozyten, Suppressor-T-Zellen und B-Zellen sezerniert.

Hempel 1997 fanden hohe IL 10 Spiegel bei Patienten mit hoher transplantationsassoziierter Mortalität (TAM) wie septischem Schock und GvH>Grad II. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang mit erhöhter TAM gefunden werden, allerdings war bei Patienten mit haploidentischen Spendern der IL10 Spiegel zum Zeitpunkt der Abstoßung bzw während des Nonengraftments signifikant erhöht (Abb.1, $p < 0,001$). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Abstoßung in der Regel durch aktivierte CD8+ T-Zellen erfolgt, welche dieses Zytokin produzieren können.. Einschränkend muss gesagt werden, dass bei den dokumentierten Abstossungen auch die anderen Zytokine erhöht waren, so dass der IL 10 Anstieg im Rahmen eines „cytokine storm“ gesehen werden könnte. In allen Fällen ging es dabei mit erhöhter Körpertemperatur einher, so das auch ein Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen vermutet werden kann. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die diagnostische Relevanz von IL10 zu klären.

Signifikant höher ($p=0,03$, Abb.10) war auch der Interleukin 10 Spiegel in Woche 2 bei den haploidenten Patienten mit schlechter T-Zellregeneration. Auch hier ist ein ursächlicher Zusammenhang zu vermuten.

Die höchsten Werte wurden in Woche 3 und 4 bei Familienspender Patienten von $7,95 \pm 11,53$ pg/ml und in Woche 4 bei Fremdspender Patienten von $2,63 \pm 3,72$ pg/ml gefunden. Bei 9 (Haplo 5, MUD 4) Patienten konnte kein IL10 nachgewiesen werden (Tab 7a und 7b).

Für IL 10 könnte somit ein eher hemmender Effekt vermutet werden. Diagnostische Möglichkeiten ergeben sich momentan nicht sicher.

4.4 Interleukin 12

Nach der SZT konnte bei 16 von 24 Patienten IL12 bis maximal 73,9 pg/ml nachgewiesen werden. Bei Haploidentischen Empfängern konnten nur vereinzelt IL12 nachgewiesen werden, die Werte waren dann stets über dem Normbereich; bei Fremdspendern konnte bei fast allen Proben regelmäßig niedere bis mittlere IL12 Werte gemessen werden. Nur bei 11 von 108 Proben wurden Werte über dem Normbereich von 0-3,58 pg/ml gemessen. Ein Zusammenhang mit GvH, Abstoßung, CMV-Infektionen oder der Leukozyten und Lymphozytenzahl konnte nicht gefunden werden. IL12 aktiviert und verstärkt die Zytotoxizität von NK-Zellen und erhöht die Proliferation aktivierter T-Zellen (Allavena et al, 1994). Es wurde deshalb ein Zusammenhang mit der Anzahl an NK-Zellen und T-Zellen vermutet, der sich jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigte.

4.5 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α)

TNF- α wird von Monozyten/ Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und NK-Zellen sezerniert und hat eine Vielzahl biologischer Effekte (Bonavida B and Granger, 1990). Als nekrotisierender Faktor für bestimmte Tumoren beschrieben, erhöht er die Phagozytose und

Zytotoxizität von Granulozyten und beeinflusst die Produktion von IL 1 und IL 6. Zusammen mit IL 2 erhöht es die Proliferation von T Zellen.

Patienten mit CMV-positivität in der PCR hatten zum Zeitpunkt positiven Antigennachweises sowie eine hohe TNF- α (Median:21,7 pg/ml) Konzentrationen im Serum.(Abb.4, Tab.5 und 6). Wegen der Vielzahl von Zellen, die in der Lage sind TNF- α zu produzieren kann die Quelle nicht bestimmt werden; wahrscheinlich ist aber, dass die gemessenen Werte mit der anti-viralen Aktivität in Zusammenhang stehen.

Bei Patienten mit Abstoßungen wurden ebenfalls hohe TNF- α -Konzentrationen gefunden (Abb. 3), sowie bei 9 Patienten mit Haut GvHD Stadium 1-2 Grad 1 (Abb.5). Dies kann ebenfalls als Ausdruck des aktivierten Immunsystems gesehen werden, die Quelle bleibt ebenfalls unbekannt.

Auch hier ergeben sich wegen der Unspezifität der Erhöhungen keine diagnostischen Möglichkeiten.

4.6 Interferon gamma (IFN- γ)

IFN- γ wird hauptsächlich von T-Zellen und NK-Zellen gebildet (de Maeyer E and De Maeyer-Guignard J, 1992) und hat antivirale und antiparasitische Aktivität. Es wirkt synergistisch mit TNF- α in der Hemmung bestimmter Zelltypen durch ist ein wachstumsförderndes Agens für T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit zeigen Fremdspender dabei signifikant höhere IFN- γ Werte als Empfänger haplo-identischer Stammzellen (Abb. 7a; $p < 0.001$). Dies steht im Widerspruch zu der deutlich schneller T-Zellerholung bei den Patienten mit haplo-identischen Spendern.

Ebenfalls signifikant höherer IFN- γ Spiegel wurden im Serum von 7 Patienten mit CMV-Positivität in der PCR gemessen (Abb. 7b, $p = 0.02$), was als Ausdruck der antiviralen Aktivität gesehen werden kann.

Die IFN- γ Spiegel waren bei Patienten mit akuter GvHD und Abstoßung nur minimal erhöht. Dies lässt sich zum einen mit dem geringen Grad an GvHD erklären, die Erhöhung bei der Abstoßung ist ebenfalls durch seine Wirkung als T-Zell Wachstumsfaktor erklärbar. In der Literatur wurde eine Erhöhung von IFN- γ während der Abstoßung allerdings bislang nicht gezeigt.

Eine schwache Korrelation zu den CRP-Werten konnte für IFN- γ gefunden werden (Pearson Koeffizient $r^2 = 0,08$, $p = 0.005$, Abb. 8) sowie für TNF- α ($p = 0,011$; $r^2 = 0,067$) und ist wohl Ausdruck erhöhter Immunantwort.

4.7 Gesamtsicht

Sämtliche Zytokine konnten bei der überwiegenden Zahl von Patienten nachgewiesen werden. Somit kann auch durch die alleinige Gabe von hochreinen Stammzellen ein Zytokinmilieu etabliert werden. Weitere hämatopoetische Zelltypen des Spenders, wie sie bei der konventionellen Knochenmarktransplantation in großer Menge verabreicht werden, scheinen hierfür nicht notwendig zu sein. Die Produktion von Zytokinen darf sicherlich als Zeichen eines funktionierenden Immunsystems gewertet werden, insbesondere trat dies bei IL2 zu Tage, welches sowohl mit einer besseren T-

Zellregeneration in Verbindung gebracht werden konnte, als auch mit Zahl und Funktion der NK-Zellen korrelierte.

Andererseits kann eine Überproduktion von Zytokinen auch äußert nachteilige Effekte haben, so spielt IL2 sicherlich in der Genese einer GvHD eine Rolle, TNF und INF sind bekanntermaßen bei schweren Infektionen erhöht und können zum Vollbild eines septischen Schocks beitragen.

Somit könnte die extrem niedrige GvH-Rate nach Transplantation mit angereicherten CD34 Stammzellen und die niedrige Rate früher Komplikationen auch als Ausdruck eines vorhandenen, aber nicht gesteigerten Zytokinmilieus gesehen werden, das zudem nicht in unkontrollierbarem Masse aktiviert werden kann, wie zum Beispiel in der GvH-Situation (maximale Stimulation des T-Zellkompartiments) der Fall sein kann.

Hinsichtlich der untersuchten Faktoren ließen sich letztendlich keine eindeutigen Zytokinmuster identifizieren. IL 10 konnte in Zusammenhang mit Abstossung bzw Nonengraftment gebracht werden. INF war hauptsächlich bei CMV-Positivität nachweisbar. IL 2 wurde bereits erwähnt.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, die beschriebenen Zytokinmuster über einen längeren Zeitraum zu verfolgen.

Eine klinische Pilotstudie zur Gabe von IL 2 nach Transplantation wurde zwischenzeitlich begonnen. Zielsetzungen sind hierbei: Verbesserung der T-Zellregeneration (basierend auf der oben geschilderten Beobachtung) sowie Erhöhung der zytotoxischen, potentiell antileukämischen NK-Aktivität.

5. Zusammenfassung

Die Zytokinspiegel von IL2, IL4, IL 6, IL10, TNF- α und IFN- γ wurden im Serum von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit CD34+ angereicherten Stammzellen von verwandten, HLA-nicht-identischen Familienspendern und HLA-identischen Fremdspendern im zeitlichen Verlauf untersucht. Es wurde überprüft, ob Zytokinmuster erkennbar sind, die mit einem günstigen klinischen Verlauf, schneller Regeneration von T-Zellen, dem Auftreten einer GvH oder einem Non-engraftment oder einer Abstoßung korreliert werden können. Ferner wurden die beiden Patientengruppen miteinander verglichen.

Sämtliche Zytokine konnten bei der überwiegenden Zahl von Patienten nachgewiesen werden. Somit kann auch durch die alleinige Gabe von hochreinen Stammzellen ein Zytokinmilieu etabliert werden. Weitere hämatopoetische Zelltypen des Spenders, wie sie bei der konventionellen Knochenmarktransplantation in großer Menge verabreicht werden, scheinen hierfür nicht notwendig zu sein.

Die Werte von Interleukin 2 lagen dabei in der Gruppe der Patienten mit haploidentischen Spendern mit schneller T-Zellerholung deutlich höher als bei Patienten mit schlechter T-Zellerholung. Darüber hinaus korrelierte der Wert signifikant mit der Anzahl an CD56+ NK-Zellen. Für Interleukin 4 konnte kein Zusammenhang mit einem der untersuchten Parameter gefunden werden. Interleukin 10 wurde in erhöhter Konzentration bei Patienten mit Non-engraftment und Abstoßung gefunden. In allen Fällen ging es dabei mit erhöhter Körpertemperatur einher, so dass auch ein Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen vermutet werden kann. Das Auftreten hoher IL10 Spiegel bei 2 Patienten mit Abstoßungsreaktion kann dabei durch die Freisetzung durch die abstoßenden T-Zellen bedingt sein. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die diagnostische Relevanz von IL10 zu klären. Interleukin 12 konnte bei allen Patienten regelmäßig nachgewiesen werden, ein Zusammenhang mit den untersuchten Parametern ergab sich jedoch nicht. TNF- α wurde in erhöhter Konzentration bei Patienten während der Abstoßung als auch bei den Patienten mit leichter GvH beobachtet werden. IFN- γ wurde besonders bei Patienten mit CMV-Nachweis in der PCR gesehen und kann eventuell daher zur Unterscheidung viraler Infektionen von Abstoßung und Graft-versus-Host Krankheit verwendet werden. Weitere Untersuchungen könnten diese Frage klären.

Somit dürfte insbesondere Interleukin 2 eine Substanz sein, die für den klinischen Einsatz interessant ist und vor allem bei eventuell vorhandenen Mangelzuständen bei bestimmten Patienten eingesetzt werden könnte.

6. Tabellen und Abbildungen

Die Einzelergebnisse zeigt folgende Tabellen

Tab. 17 Patienten mit HLA-haploidentische Spendern

Pat. Nr.	Woche	IL-10	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-12	IFN- γ	Leuko.	Lymph.	Temp.	CRP	GvHD Grad	CMV
1	2	0	0	0	0,28	0	0	1880	274,5	37,2	0,7	0	Neg.
1	4	24,05	1,38	64,37	0	0	0	2000	182	37,6	1,2	0	Pos.
2	-(Vor)	1,8	0	0	0	0	0	2290	709,9	37,4	0,8		Neg.
2	1	0,16	5,32	0	0	0	0	30	12,72	37,9	1,0	0	Neg.
2	2	0	7,18	0	1,11	0	0	1200	100,8	38,6	2,7	1 (4 Tage)	Neg.
2	3	1,5	8	131,60	12,4	0	0	3260	645,5	37,5	0,2	1 (4 Tage)	Neg.
3	-(Vor)	0	23,2	0	0	0	0	4450	357	37,9	3,4	-	Neg.
3	1	2,4	5	0	0,69	51,55	7,2	80	8,6	38,9	4,5	0	Neg.
3	2	0	9,6	74,51	3,7	0	26,54	1311	2	36,8	0,4	0	Neg.
3	3	0,87	14,4	42,64	1,1	0	7,06	3410	12,7	36,7	0,3	0	Neg.
4	-(Vor)	1,67	3,2	0	0	0	26,6	1140	551,76	36,5	0,3	-	Neg.
4	2	5,9	8	51,98	1,1	0	80,09	210	22,68	38,0	2,1	0	Neg.
4	3	14,3	12,4	0	0,29	0	49,87	3380	128,44	39,6	9,8	1 (8 Tage)	Neg.
4	4	7,9	6,4	0	0	52,17	11,44	1160	84,68	37,3	0,9	1	Neg.
4	Über 5	2,5	0	0	0	73,9	0	-	-	-	-	0	Neg.
5	-(Vor)	1,67	4,6	0	0	0	135,9	6000	1272	37,3	0,2	-	Pos.
5	1	4,5	0	8,36	0,29	0	83,3	30	49,78	39,1	8,2	0	Pos.
5	2	1,8	0	0	0	40,67	22,6	60	5,94	38,7	5,5	0	Pos.
5	3	6,5	3,6	0	0	0	4,66	3000	96	38,6	1,2	0	Pos.
5	4	2,3	2,8	31,96	0	0	0	2920	408,8	37,4	0,5	0	Pos.
6	-(Vor)	2,3	1,76	0	0	0	0	700	79,2	37,0	0,4	-	Neg.
6	2	2,56	9,2	0	1,94	39,52	7,2	3010	21,07	40,4	9,7	0	Neg.
6	3	8	5,4	10	3,25	0	40,67	20	5,76	38,7	8,0	Abstoßung	Neg.
6	TP2:1	4,3	0	0	1,52	0	18,54	20	9,1	37,4	1,3	0	Neg.
6	2	3,7	4	0	0,67	0	0	6750	54	37,3	2,9	0	Neg.
6	3	1,8	1,76	0	1,11	0	0	2360	51,6	36,9	1,0	0	Neg.

Tab. 17: 2. Teil

Name	Woche	IL-10	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-12	IFN- γ	Leuko.	Lymph.	Temp.	CRP	GvHD Grad	CMV
7	- (Vor)	0,87	3,98	0	0	0	0	1587	3824	37,3	0,2	-	Neg.
7	2	1,8	0	0	0	0	0	2450	98	39,0	0,3	2 (5 Tage)	Neg.
7	3	24,7	15,8	0	0	25,14	54,77	420	5,040	40,2	0,2	Abstoßung	Pos.
7	TP2:2	4	6,11	0	0	0	0	3310	111,7	38,0	1,2	0	Pos.
7	4	6,8	7,6	0	0	0	0	1980	128,7	36,3	0,2	0	Pos.
8	- (Vor)	2	4,2	0	0	0	0	8450	498,5	37,5	0,1	-	Neg.
8	1	0,9	0	0	0	0	31,35	1480	242,7	38,6	2,8	0	Neg.
8	2	0,5	0	0	0	0	0	3420	150,4	37,7	0,1	2 (4 Tage)	Neg.
8	Üb. 5	3,6	0	0	2,43	0	0	4630	324,1	37,1	0,1	1	Neg.
9	- (Vor)	0	27,04	23,87	0	0	0	1450	1129	37,3	0,6	-	Neg.
9	1	0	15,79	28,78	1,791	0	0	20	10,5	38,0	7,9	0	Neg.
9	2	0	9,441	12,51	1,642	0	0	10	4,13	37,9	1,6	0	Neg.
9	3	41,1	40,03	75,04	2,668	5,953	10,34	10	5,64	39,1	9,3	Non-engraftment	Neg.
9	TP2:1	0	9,87	0	2,322	0	0	10	3,91	37,0	0,8	0	Neg.
9	2	7,03	18,5	12,53	4,226	0	0	320	26,24	38,5	2,6	0	Neg.
9	3	5,98	17,41	0	2,541	0	0	3150	81,9	38,0	0,5	0	Neg.
10	- (Vor)	0	64,61	9,806	1,549	0,949	41,85	4460	1351	39,9	3,8	-	Pos.
10	2	0	30,68	15,09	0,863	0,762	67,07	2020	88,88	38,2	0,3	0	Pos.
10	3	4	25,86	16,97	0,414	0	56,09	1750	409,3	38,4	0,2	1 (6 Tage)	Pos.
10	4	0	34,95	18,89	0,537	0	55,49	1550	381,3	37,8	0,2	0	Pos.
11	- (Vor)	0	22,64	12,53	2,669	0	0	19820	4558	36,8	0,7	-	Neg.
11	2	0	58,29	33,05	5,493	0	0	15220	2009	38,4	1,1	0	Neg.
12	- (Vor)	0	18,34	10,28	1,809	0	0	3170	34,87	38,6	3,9	-	Neg.
12	1	0	14,33	53,98	0,616	0	0	20	35	38,7	3,7	0	Neg.
12	2	0	31,31	0	2,026	0	0	710	0,9	38,0	4,8	0	Neg.
12	3	0	38,57	0	2,193	0	0	2020	4,7	39,8	4,5	0	Neg.
12	4	0	47,68	10,33	2,333	0	10,93	1640	1,1	38,7	8,9	0	Neg.

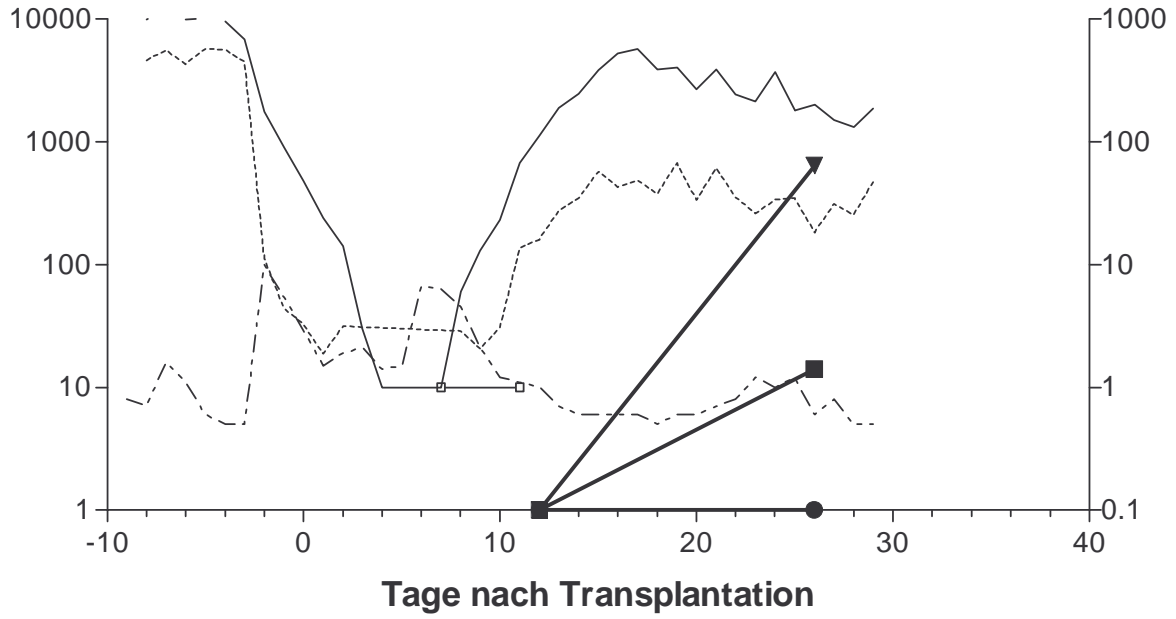
Tab 17: 3.Teil

Name	Woche	IL-10	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-12	IFN- γ	Leuko.	Lymph.	Temp.	CRP	GvHD Grad	CMV
13	- (Vor)	0	21,71	0	2,069	0	0	2860	2153	37,6	1,5	-	Neg.
13	1	0	19,08	0	3,912	0	0	20	0	38,0	2,4	0	Neg.
13	2	0	19,97	0	2,11	0	0	20	0,52	37,7	1,5	0	Neg.
13	3	0	23,71	0	2,321	0	0	40	0	38,0	1,5	Non-engraftment	Neg.
13	TP2:1	0	27,27	0	4,325	0	0	20	1,780	37,5	4,7	0	Neg.
13	2	0,62	35,55	0	1,645	0	0	10	0	39,0	4,1	0	Neg.
13	TP3:1	6,04	53,65	0	1,815	0	0	50	32,3	39,1	3,3	0	Neg.
13	2	6,14	95,35	0	1,191	0	0	90	80,64	39,8	3,0	0	Neg.
13	TP4:2	3,93	31,19	28,47	0,941	0	0	10	1,62	38,4	1,7	0	Neg.
14	- (Vor)	0	135,4	44,38	1,954	0	61,41	4170	375,3	39,4	17,9	-	Neg.
14	1	0	16,01	11,54	0,658	1,2	68,41	50	-	38,3	13,7	0	Neg.
14	2	0	15,95	16,96	2,661	0,64	54,8	1440	87,84	38,5	10,0	0	Neg.
14	3	0	17,4	19,0	3,644	0,74	64,86	7180	251,3	38,7	4,2	0	Neg.
15	1	0	10,45	82,78	0	0	0	3290	11	38,2	-	-	Neg.
15	2	0,25	22,13	17,09	0	0	0	5590	2	39,0	-	0	Neg.
15	3	18,4	20,43	23,87	2,887	0	0	9	5	40,0	-	Non-engraftment	Neg.
15	TP2:1	0	13,03	8,038	1,391	0	0	11	4	39,4	-	-	Neg.
15	2	0	0	3,625	0,66	0	0	5850	4,1	37,4	-	0	Neg.
15	3	0	0	53,94	3,118	0	0	3380	5	37,7	-	0	Neg.
15	4	5,5	22,12	49,4	0,531	0	0	1950	26	39,0	-	0	Neg.
15	Über 5	0	5,73	17,68	0	0	0	3080	11	38,6	-	0	Neg.
16	- (Vor)	0	11,74	37,82	1,072	0	0	1240	176,1	37,4	1,6	-	Neg.
16	1	0	5,92	70,33	2,256	0	0	20	0	38,0	3,3	0	Neg.
16	2	0	26,71	26,16	2,623	0	0	240	79,2	37,4	1,8	0	Neg.
16	3	0	30,6	3,625	3,423	0	0	270	89,1	38,2	0,9	1 (6 Tage)	Neg.
16	4	0	38,17	40	3,736	0	0	1500	346,5	38,3	0,5	1 (3 Tage)	Neg.
16	5	0	62,17	42,34	4,947	0	0	1750	304,5	37,0	0,2	2 (2 Tage.)	Neg.

Tab. 18 Patienten mit HLA-identische Fremdspendern

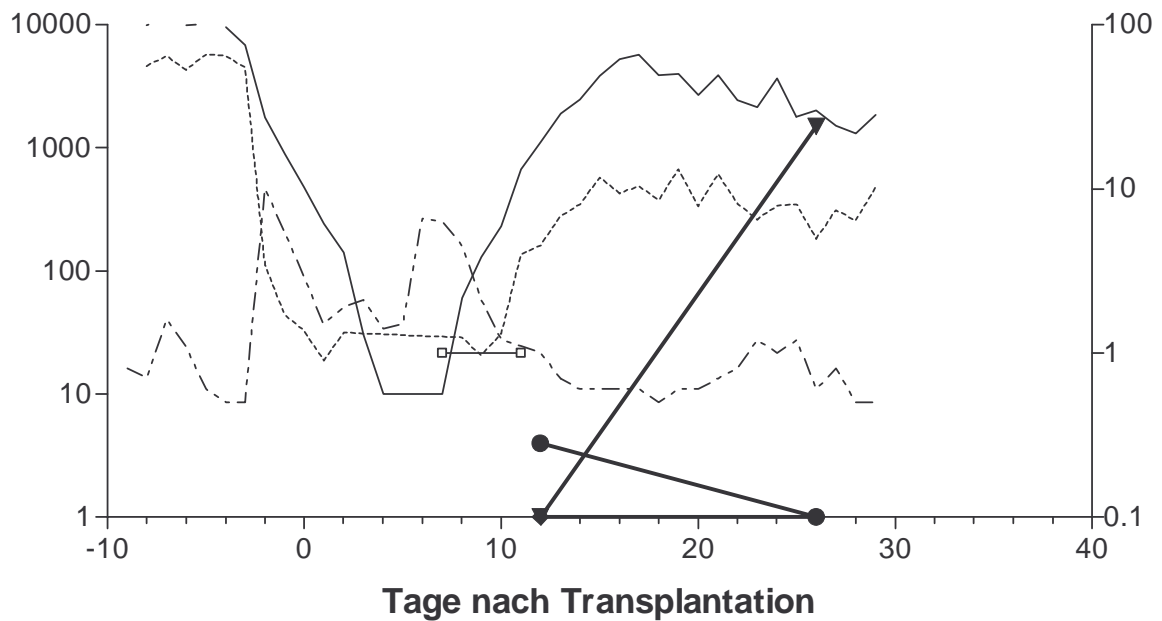
Name	Woche	IL-10	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-12	IFN- γ	Leuko.	Lymph.	Temp.	CRP	GvHD	CMV
17	- (Vor)	0	2,384	13,35	0,285	6,45	50,61	1470	515,9	36,7	0,5	-	Neg.
17	1	0	3,74	15,09	0,28	6,54	50,61	40	8,32	38,1	8,6	0	Neg.
17	2	0	2,328	15,23	0,314	4,79	75,57	20	9,04	38,3	7,4	0	Neg.
17	3	5,172	55,04	24,95	0,836	8,81	59,11	3760	560,2	38,0	5,1	0	Neg.
18	- (Vor)	0	12,13	20,65	0,489	0,51	45,86	1113,0	33,39	37,0	1,2	0	Neg.
18	1	0	6,353	28,46	0,167	0,86	89,92	30	5,43	38,4	16,70	0	Neg.
18	2	14,6	55,9	38,81	2,909	3,02	137,6	4050	162	38,9	5,3	0	Neg.
18	3	6,41	23,02	20,87	0,612	0,74	105,2	1350	122,85	36,8	0,3	0	Neg.
19	- (Vor)	0	56,27	24,7	2,661	6,72	94,45	11250	2272	36,4	0,4	-	Neg.
19	2	0	13,44	24,55	1,938	0	44,38	5060	202,4	37,5	1,9	0	Neg.
19	3	0	25,75	15,28	6,173	1,36	111,1	7000	1050	38,7	3,4	0	Neg.
19	4	5,26	124,4	18,77	15,04	2,22	89,8	5030	407,4	37,6	3,1	1(3Tage)	Neg.
20	1	0	14,3	8,162	0,574	0,97	74,38	30	0	38,4	1,7	0	Pos.
20	4	0	31,79	13,35	0,939	1,72	50,61	3720	855,6	37,6	3,8	0	Pos.
20	5	0	43,3	19,28	1,41	1,73	59,6	4550	714,3	37,7	1,5	0	Pos.
21	- (Vor)	0	39,98	13,58	0,388	1,41	133,7	1240	136,4	38,5	4,1	-	Neg.
21	1	0	4,774	15,09	0,455	1,19	47,59	30	15,78	38,1	5,3	0	Neg.
21	3	0	25,95	9,898	0,313	0	40	2360	212,4	37,6	1,1	0	Neg.
22	-(Vor)	0	15,3	11,54	0,296	0,39	37,28	7690	1086	36,3	0,3	-	Neg.
22	2	0	2,525	11,54	0,537	0,86	46,62	470	99,6	36,8	0,1	0	Neg.
22	5	0	10,25	16,9	0,192	1,63	62,04	1000	587	36,9	9,1	0	Neg.
22	Über 5	0	9,743	7,055	0,064	0,76	67,88	3160	293,8	36,3	0,1	0	Neg.
23	-(Vor)	0	25,86	16,9	1,528	2,03	45,67	7100	2080	37,3	0,3	-	Pos.
23	3	0	15,95	6,517	0,335	0,39	77,98	4350	495,9	37,5	4,9	2(4Tage)	Pos.
23	Über 5	3,221	153,2	15,23	7,247	10,04	67,88	-	-	-	-	1(5Tage)	Pos.
24	-(Vor)	0	4,677	4,94	1,185	1,93	60,22	550	241	37,8	1,1	-	Neg..
24	2	1,2	14,87	9,898	0,972	1,7	64,98	3050	85,4	39,5	5,4	1 (8 Tage)	Pos.
24	3	0	1,164	4,949	0,245	0,655	38,09	2320	215,7	36,8	1,0	1	Pos.

IL2 / INFg / TNFa



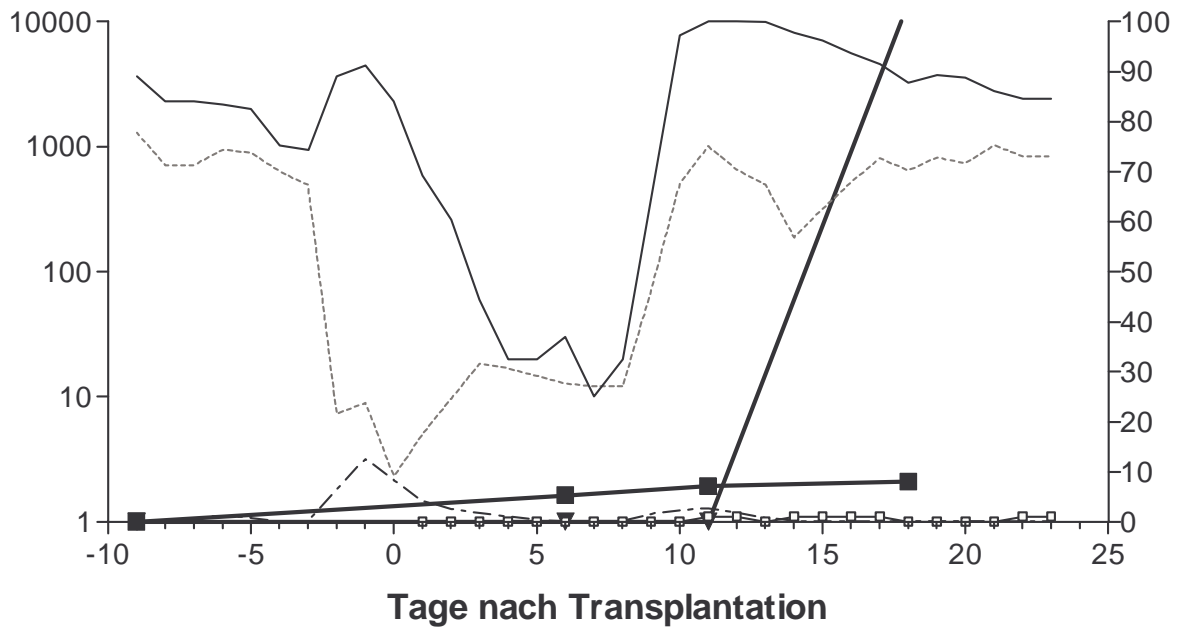
- Leuko
- - - absLymphs
- GVHD
- - - CRP
- ▼— IL2
- INFg
- TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



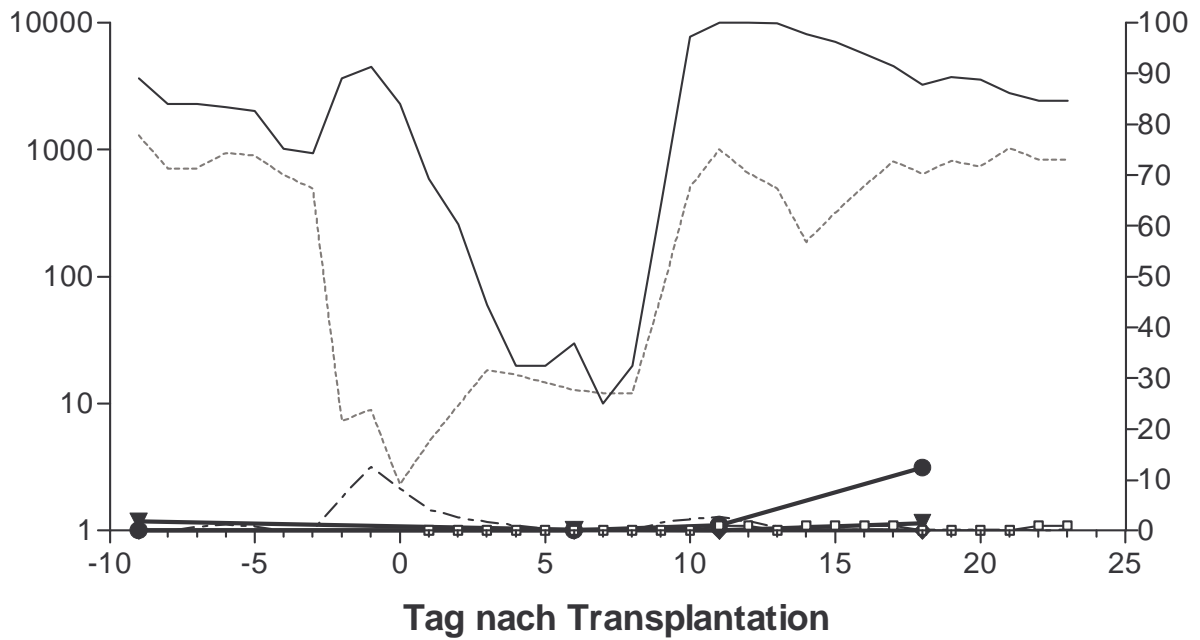
- Leuko
- - - absLymphs
- GVHD
- - - CRP
- ▼— IL10
- IL4
- ◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



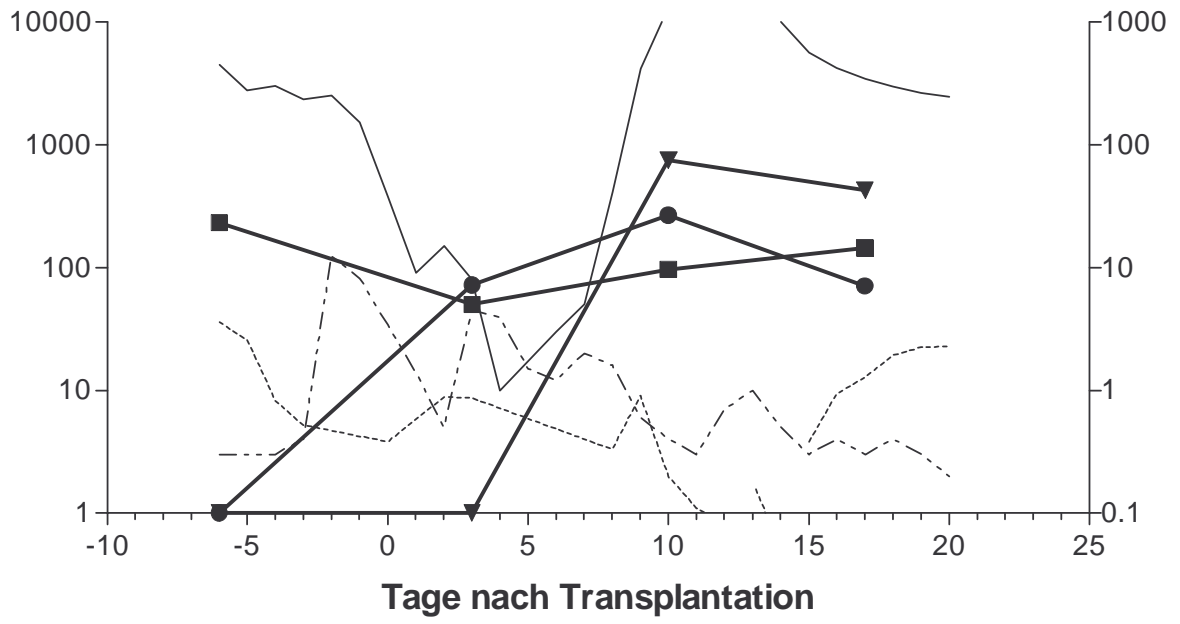
— Leuko - - - absLymphs -□- GVHD - - - CRP
 —▼- IL 2 —●- INF gamma —■- TNF alpha

IL4 / IL10 / IL12



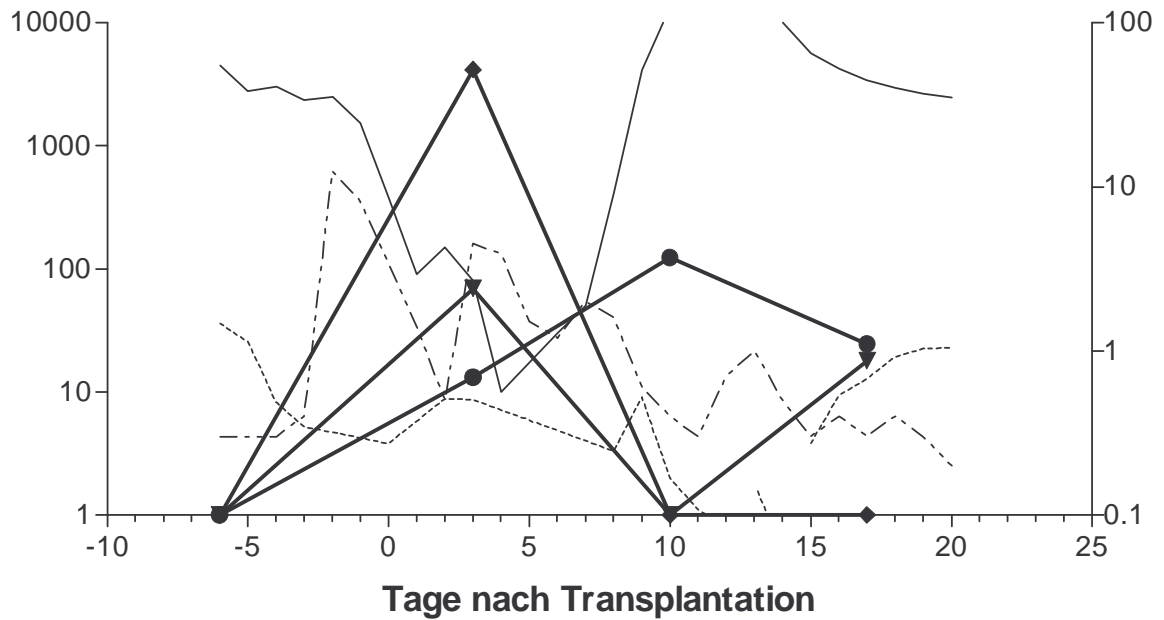
— Leuko - - - absLymphs -□- GVHD - - - CRP
 —▼- IL 2 —●- INF gamma —■- TNF alpha

IL2 / INFg / TNFa



- Leuko absLymphs —□— GVHD ---- CRP
- ▼— IL 2 —●— INF gamma —■— TNF alpha

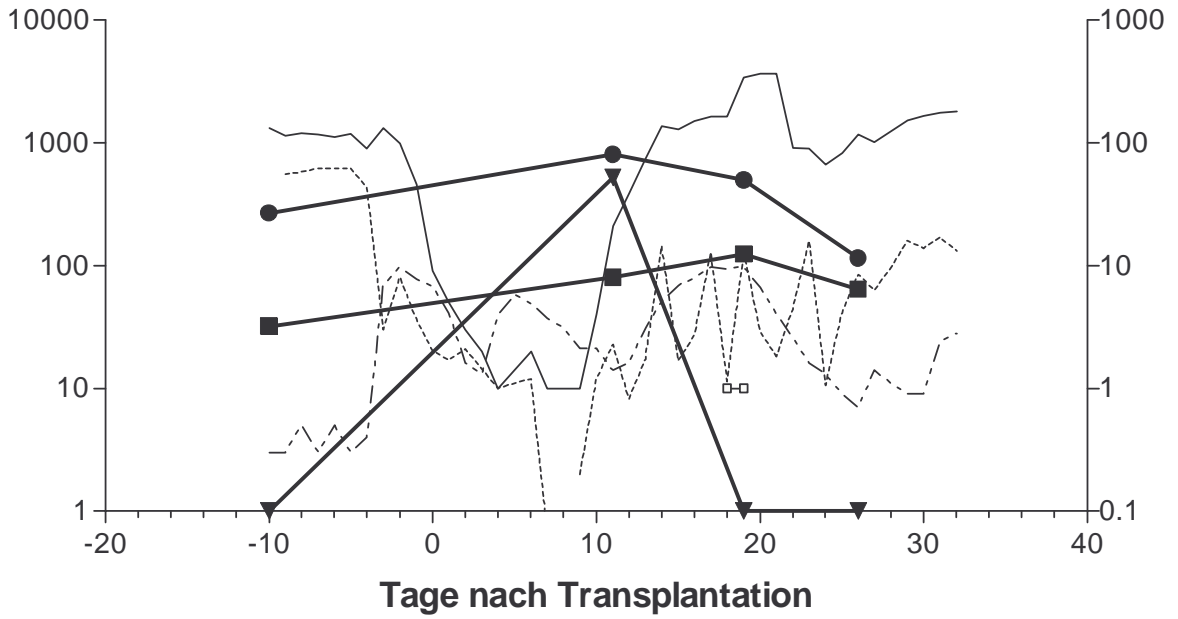
IL4 / IL10 / IL12



- Leuko absLymphs —□— GVHD ---- CRP
- ▼— IL 10 —●— IL 4 —◆— IL12

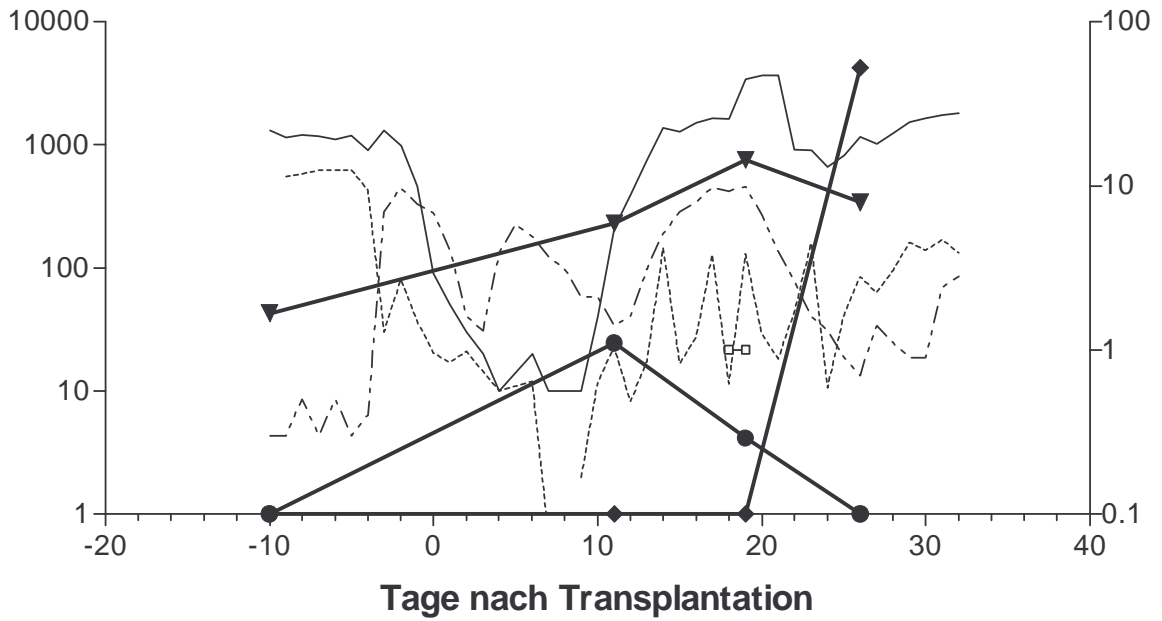
Patient 3

IL2 / INFg / TNFa



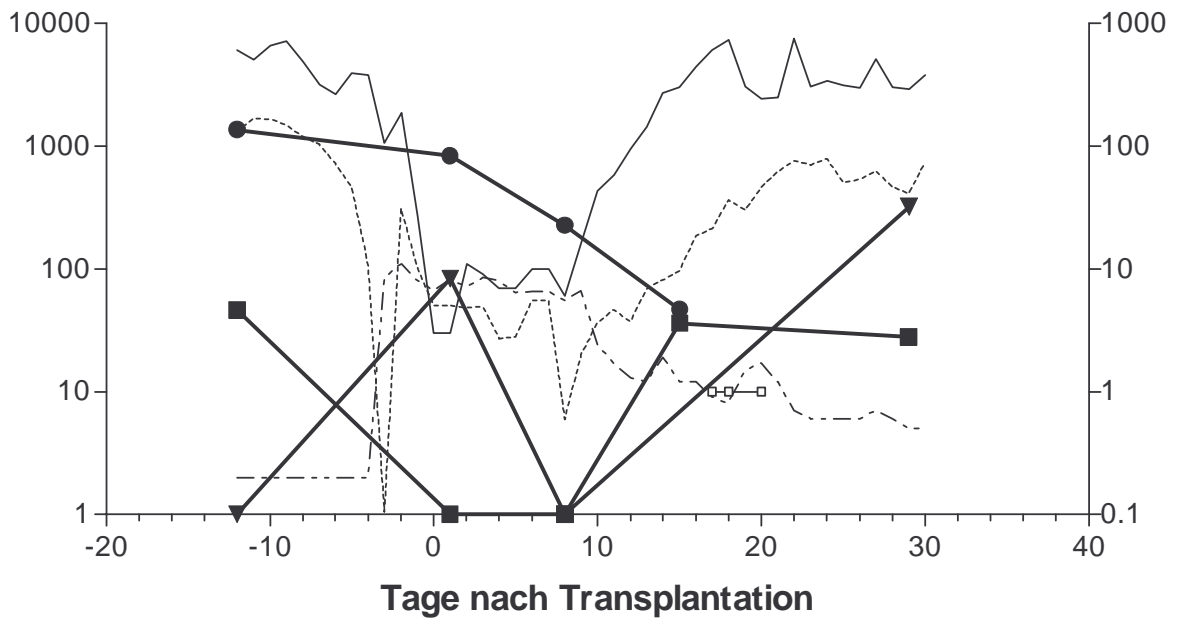
- Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - - CRP
- ▼— IL 2 ●— INF gamma —■— TNF alpha

IL4 / IL10 / IL12



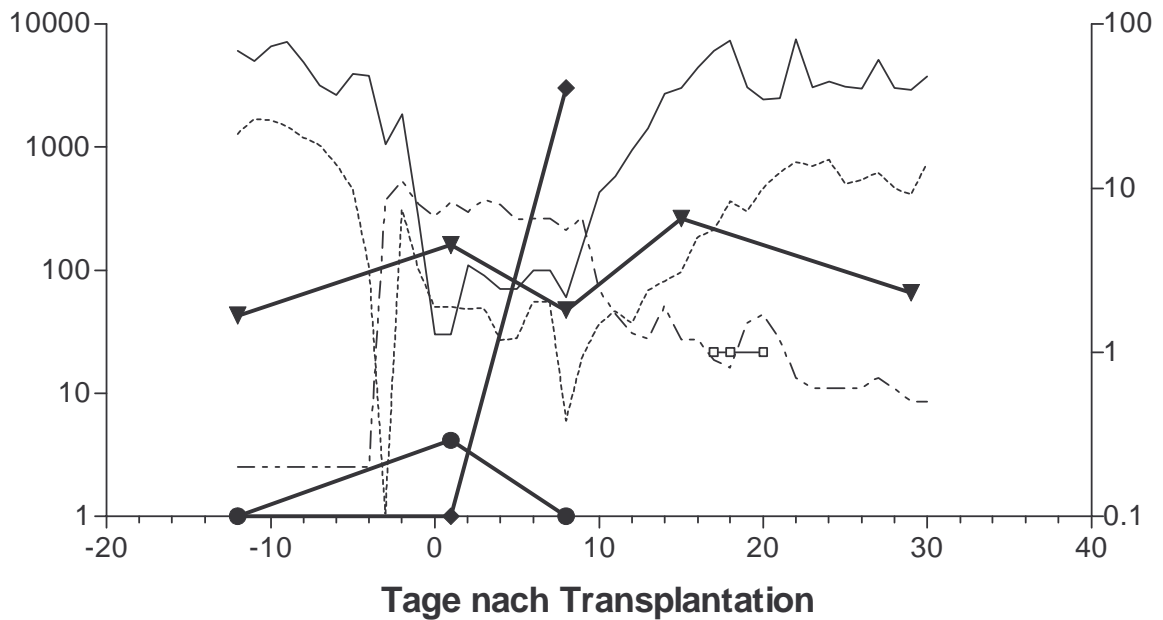
- Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - - CRP
- ▼— IL 10 ●— IL 4 —◆— IL 12

IL2 / INFg / TNFa



- Leuko - - - - absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
- ▼ IL 2 —● IFN gamma —■ TNFalpha

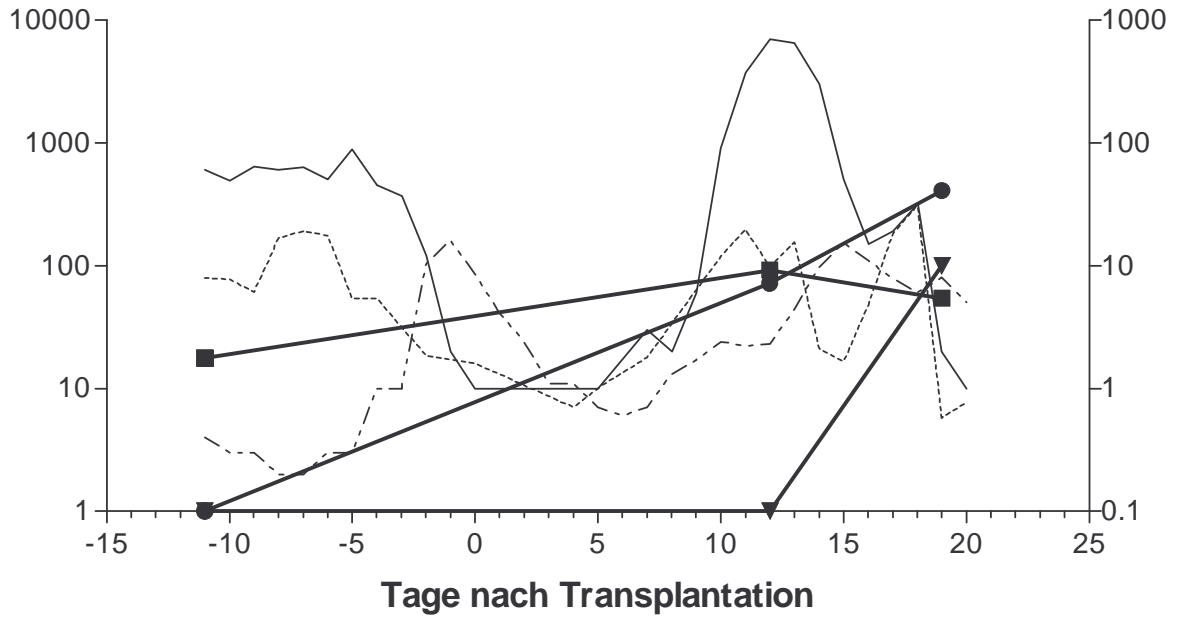
IL4 / IL10 / IL12



- Leuko - - - - absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
- ▼ IL 10 —● IL 4 —◆ IL 12

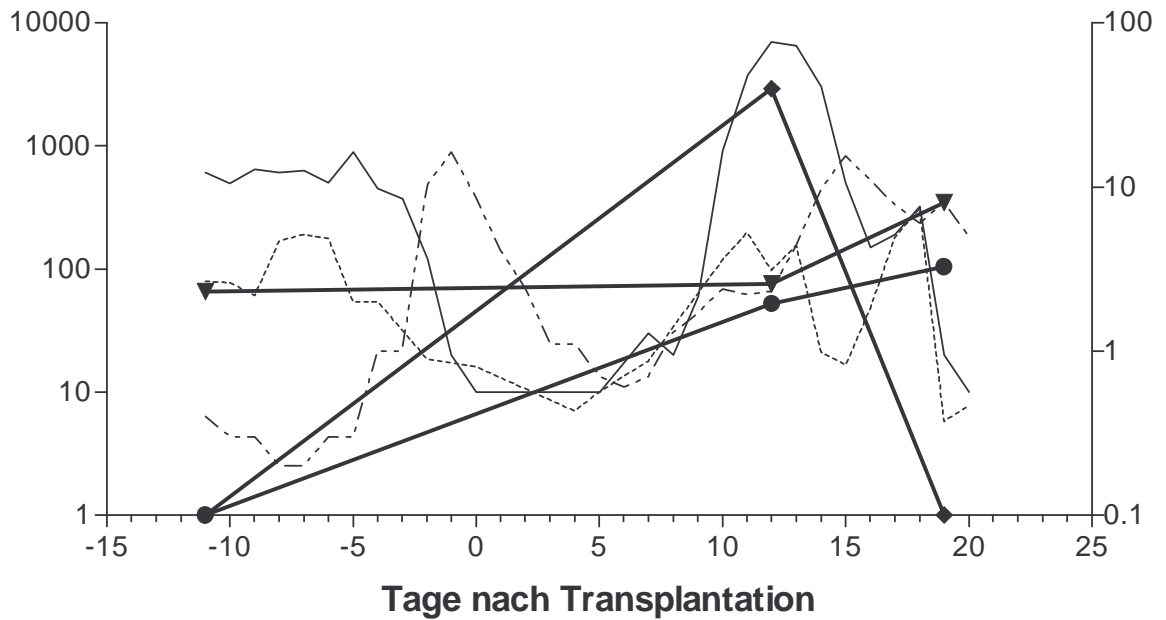
Patient 5

IL2 / INFg / TNFa



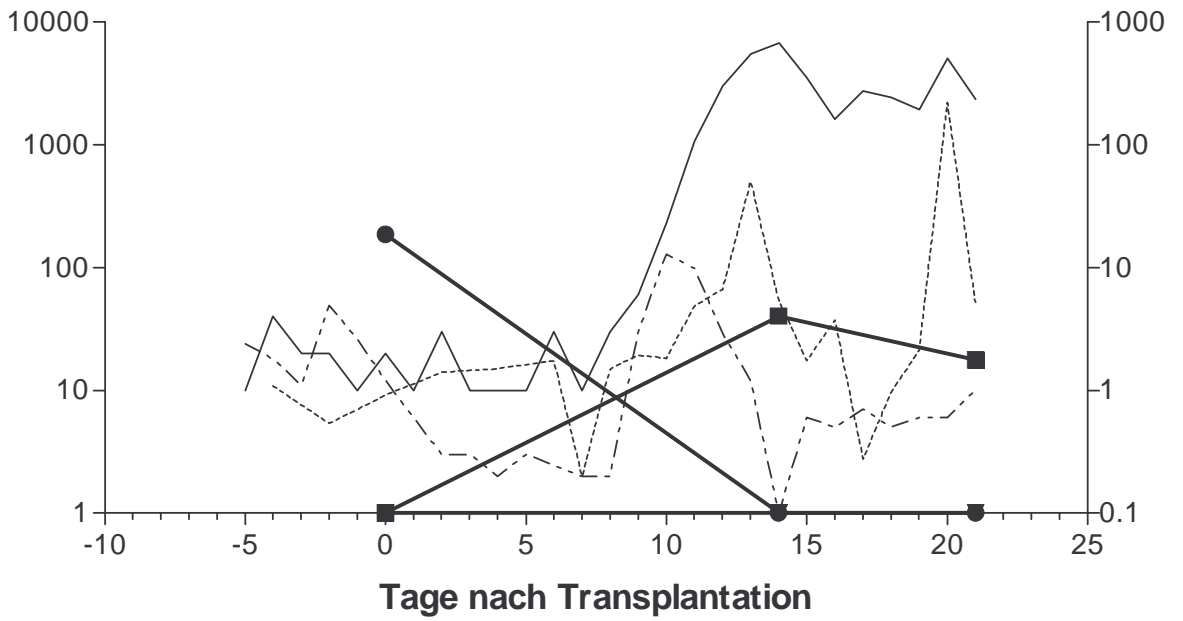
— Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 -▼- IL2 ●- INFg -■- TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



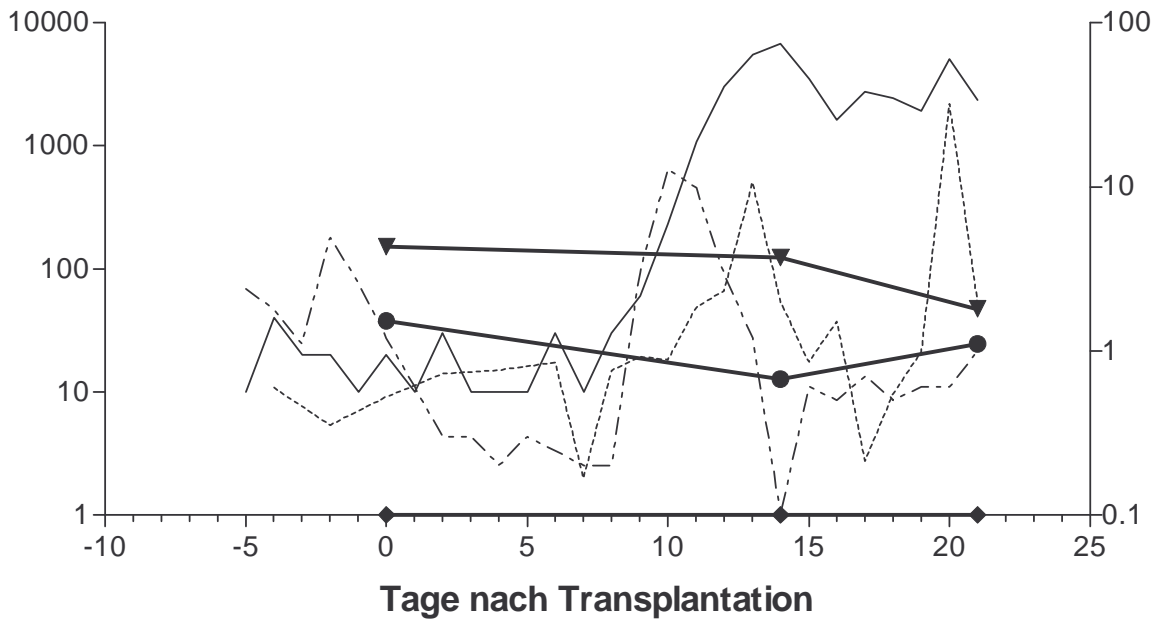
— Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 -▼- IL10 ●- IL4 -◆- IL12

IL2 / INFg / TNFa



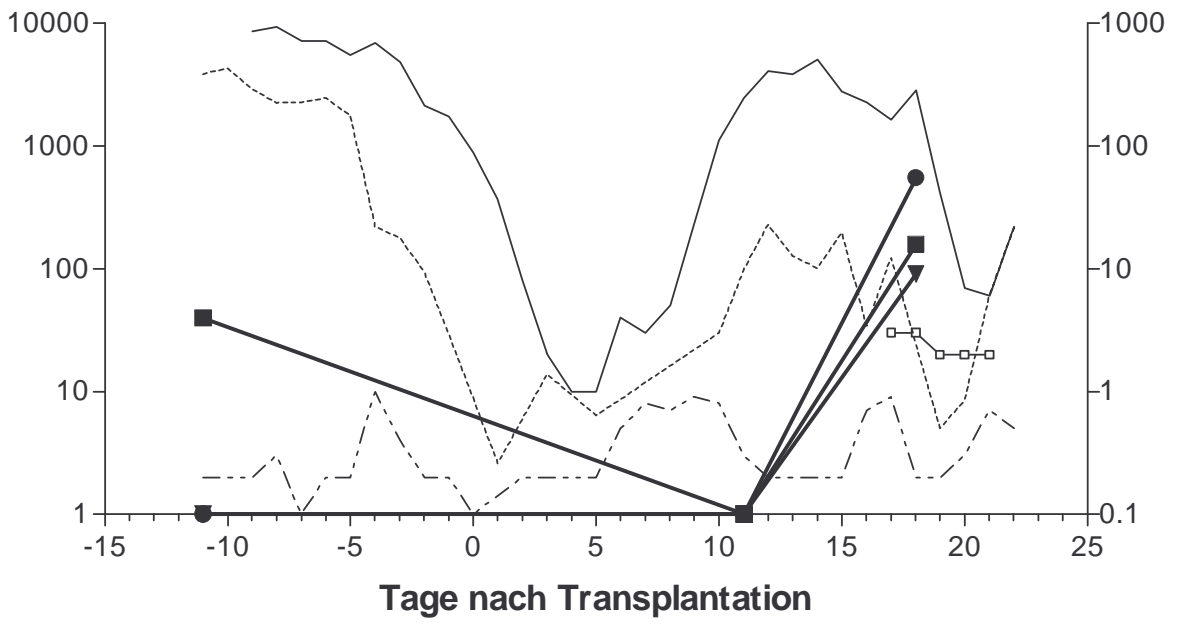
- Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
- ▼- IL 2 ●- IFN gamma ■- TNF alpha

IL4 / IL10 / IL12



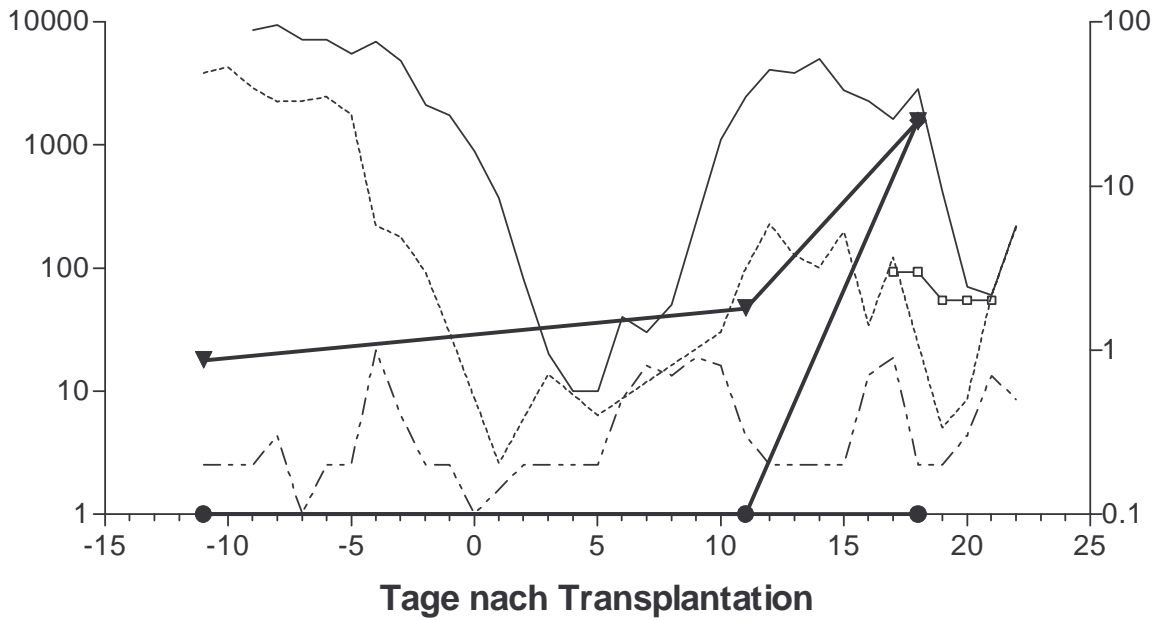
- Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
- ▼- IL 10 ●- IL 4 ◆- IL 12

IL2 / INFg / TNFa



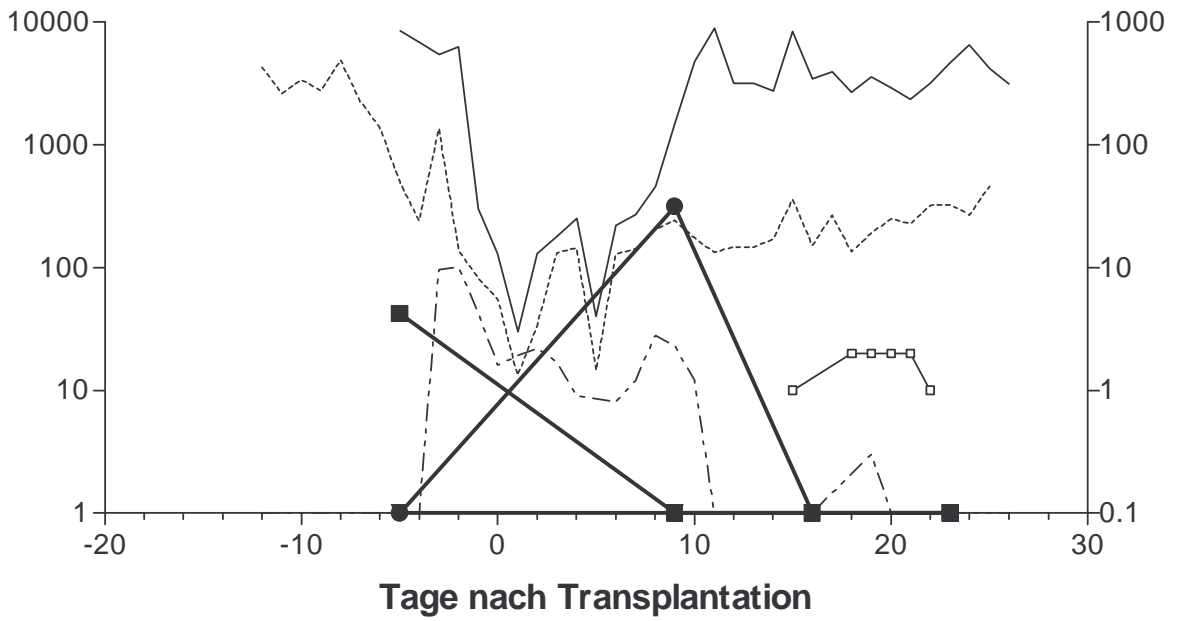
- Leuko
- absLymphs
- GVHD
- CRP
- ▼— IL 2
- IFN gamma
- TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



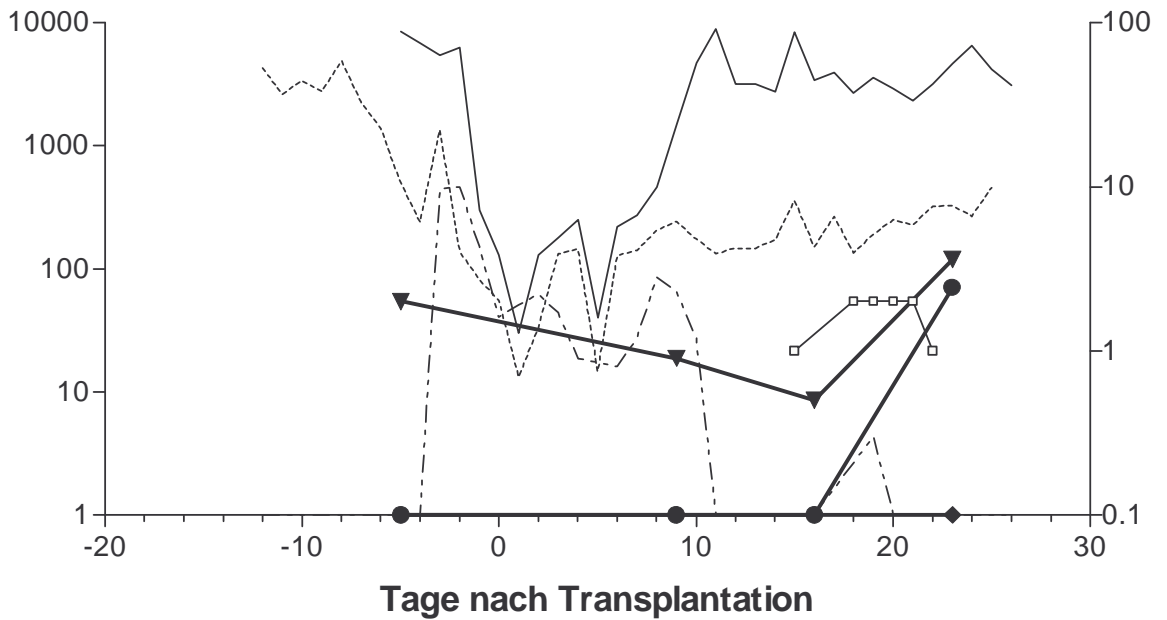
- Leuko
- absLymphs
- GVHD
- CRP
- ▼— IL 10
- IL 4
- ◆— IL 12

IL2 / INFg / TNFa



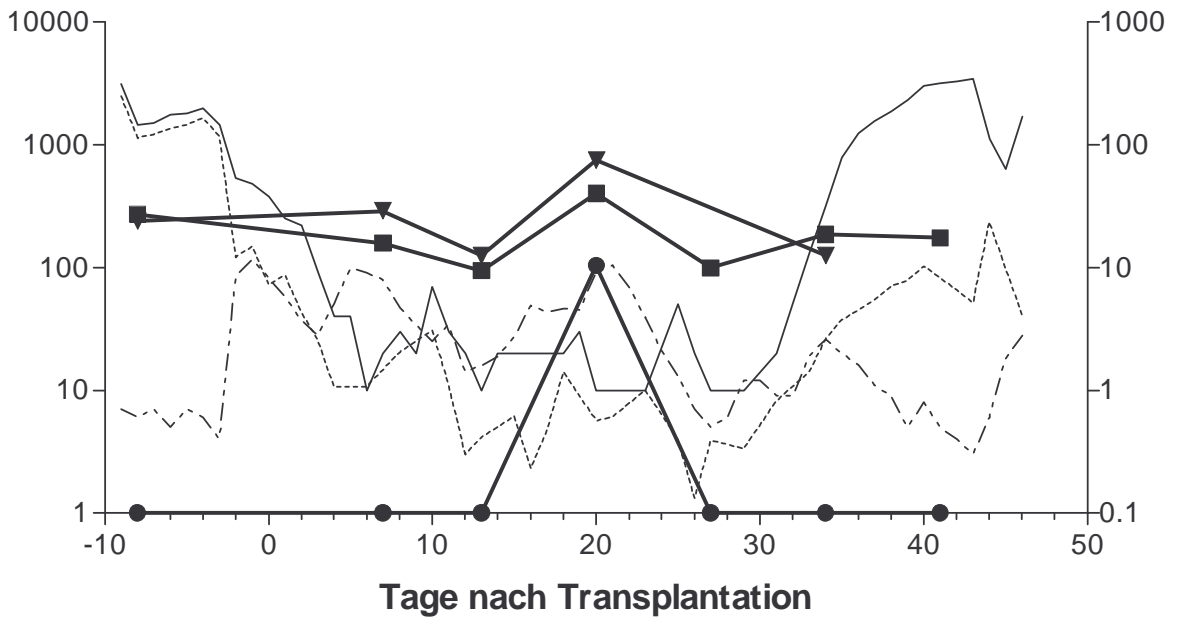
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL 2 ●— IFN gamma ■— TNF alpha

IL4 / IL10 / IL12



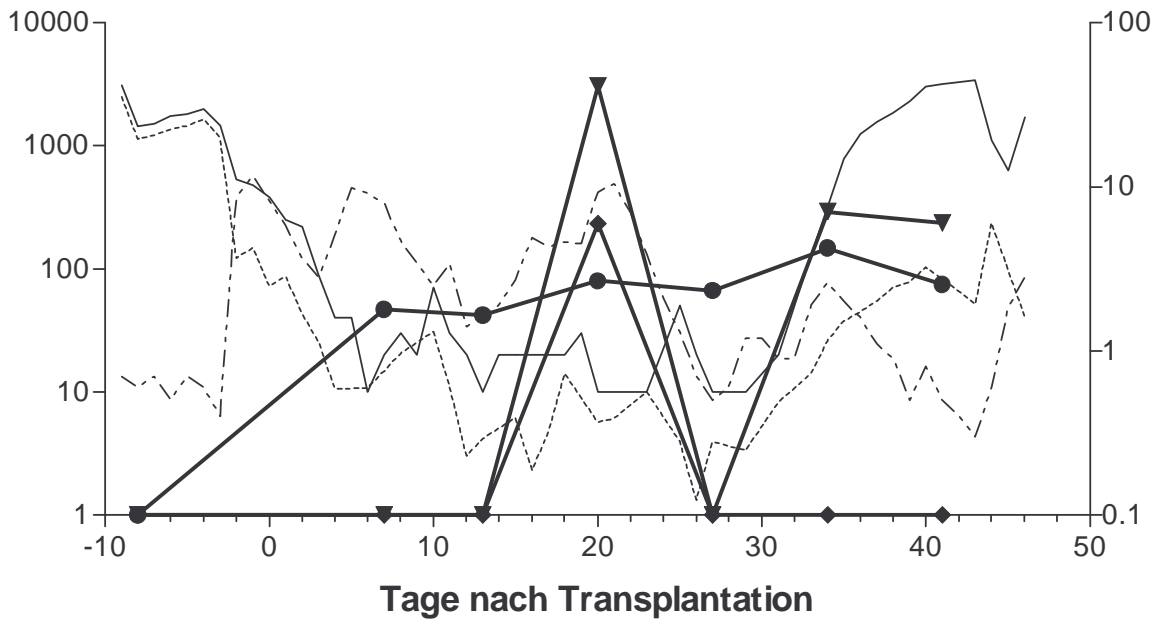
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL 10 ●— IL 4 ◆— IL 12

IL2 / INFg / TNFa



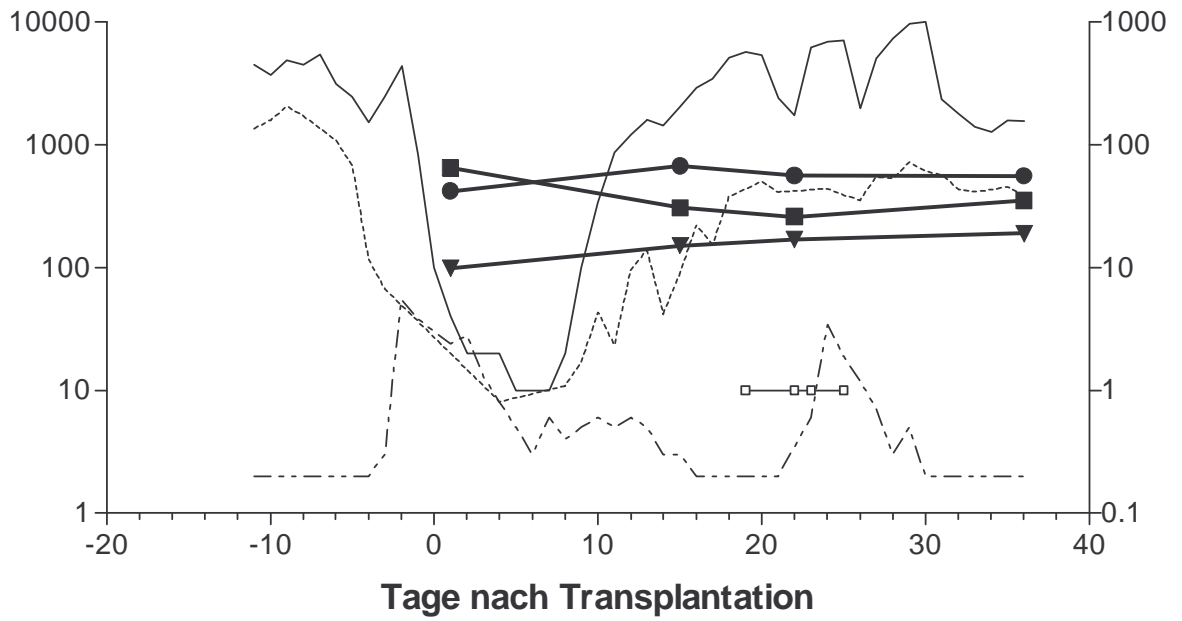
— Leuko - - - - absLymphs - □ - GVHD - - - - CRP
 - ▼ - IL2 - ● - INFg - ■ - TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



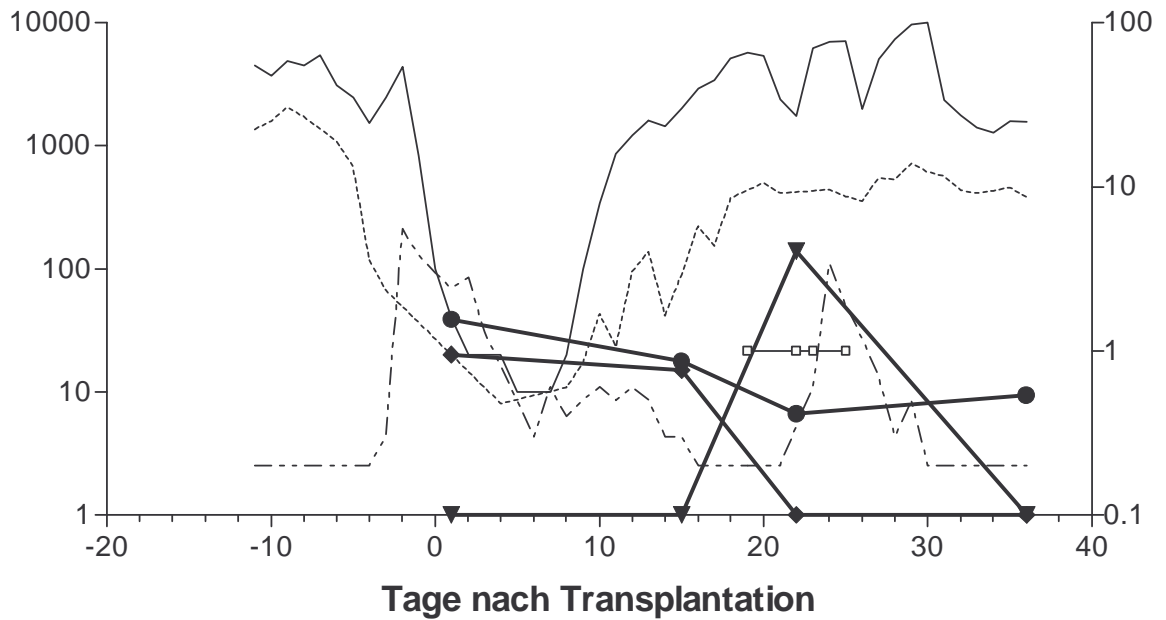
— Leuko - - - - absLymphs - □ - GVHD - - - - CRP
 - ▼ - IL10 - ● - IL4 - ◆ - IL12

IL2 / INFg / TNFa



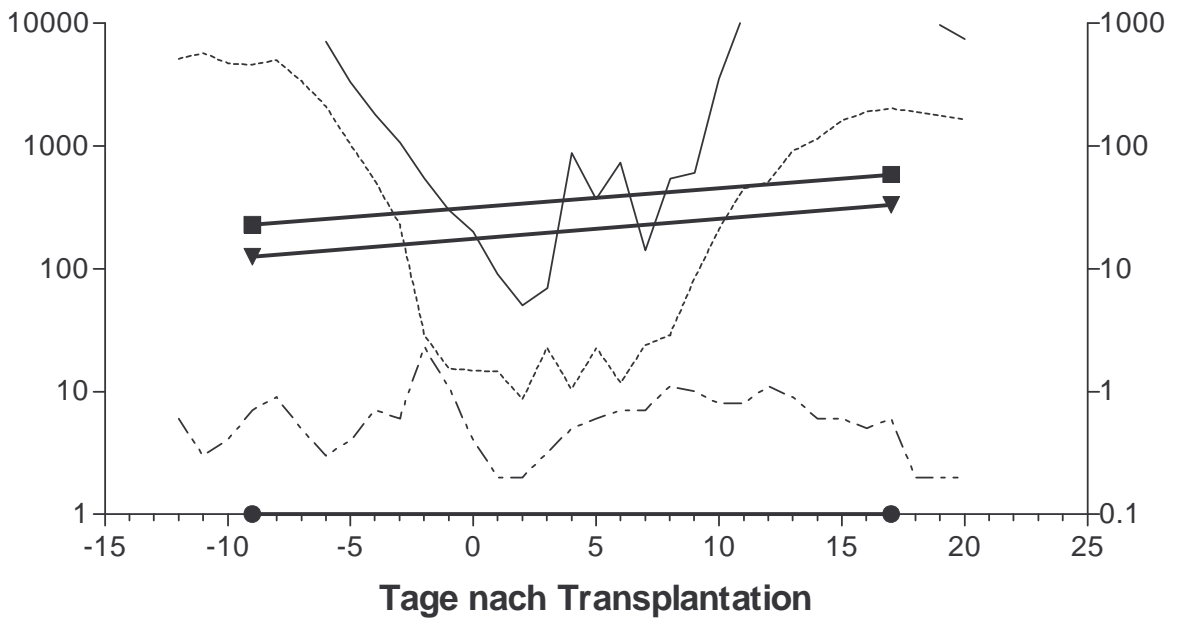
— Leuko absLymphs —□— GVHD CRP
 —▼— IL2 —●— INFg —■— TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



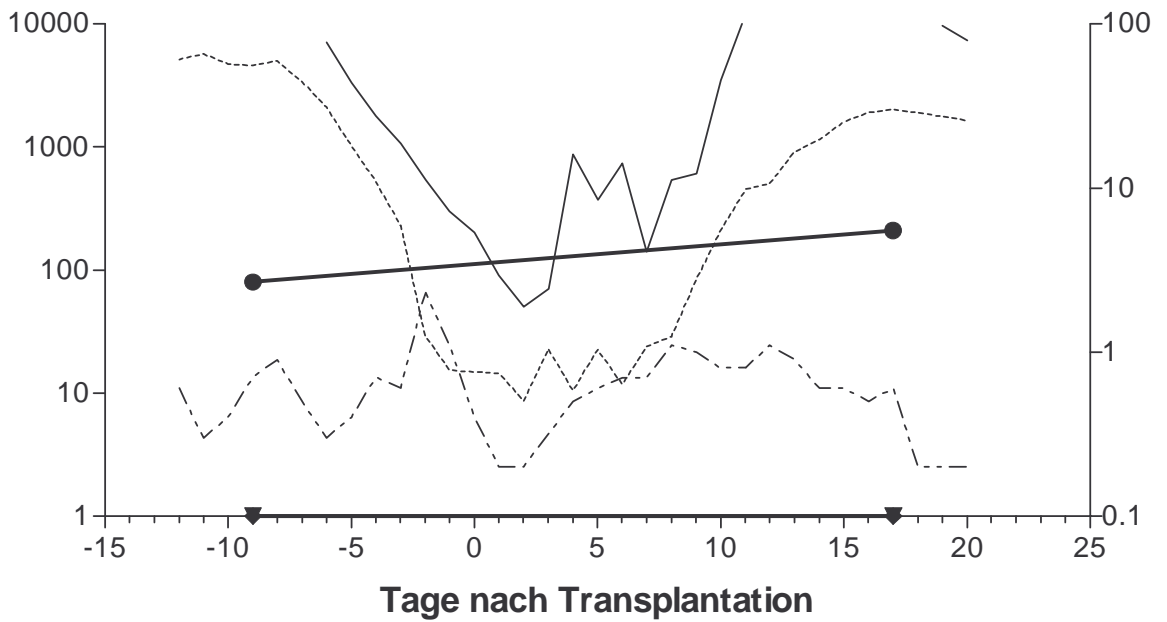
— Leuko absLymphs —□— GVHD CRP
 —▼— IL10 —●— IL4 —◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



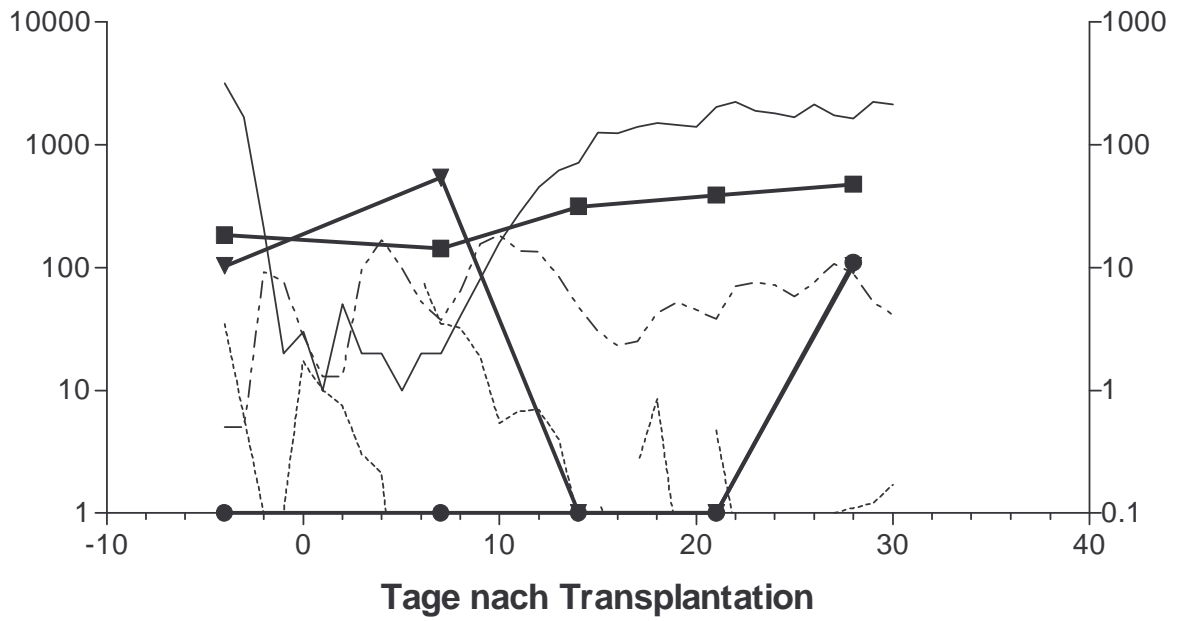
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL2 —●— INFg —■— TNF-alpha

IL4 / IL10 / IL12



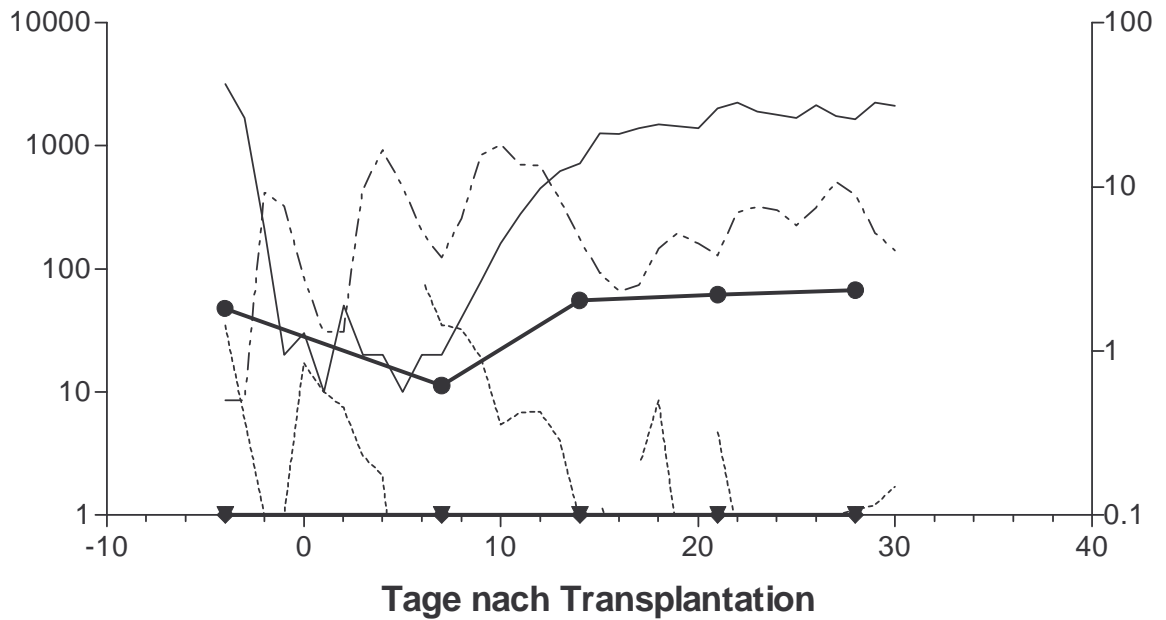
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL10 —●— IL4 —◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



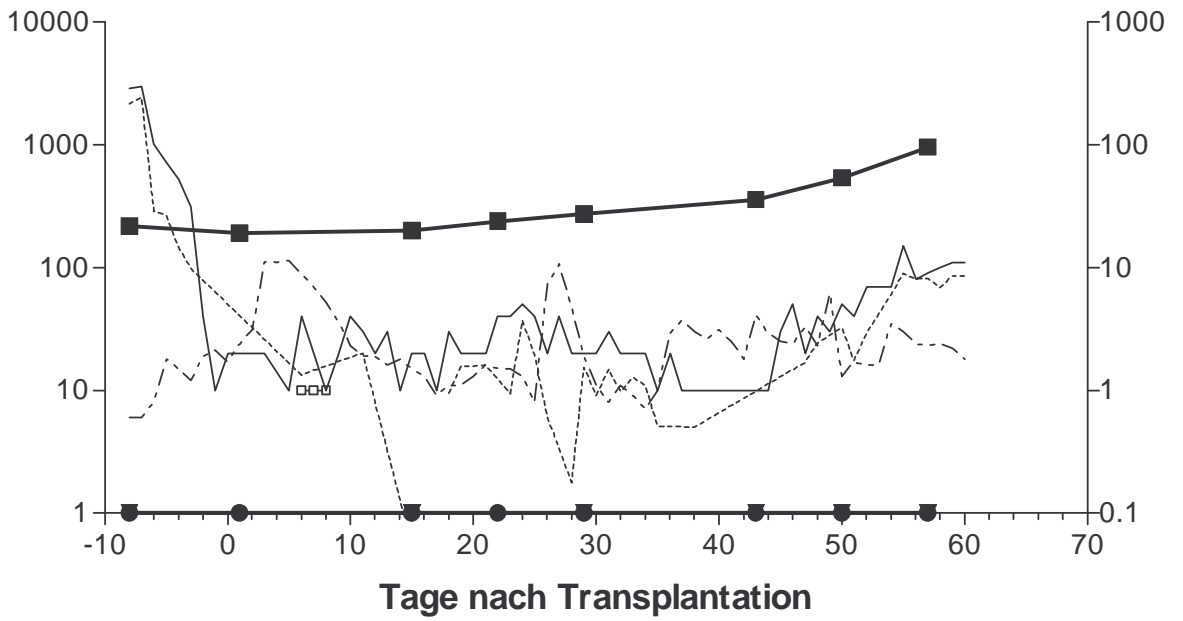
— Leuko - - - - absLymphs - □ - GVHD - - - - CRP
 - ▾ - IL2 - ● - INFg - ■ - TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



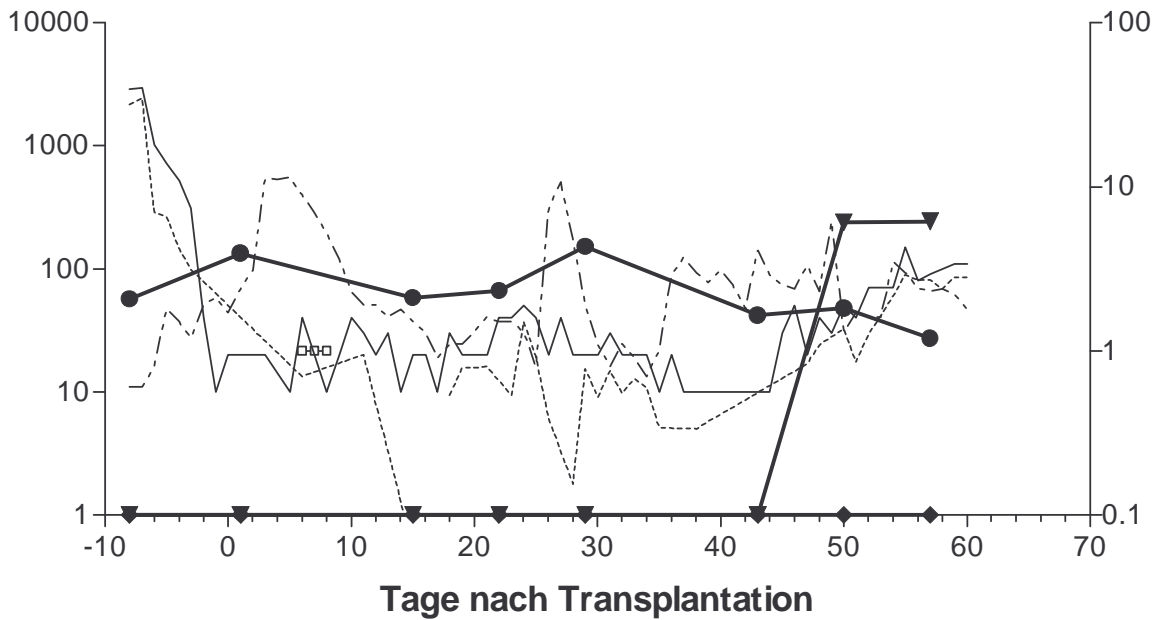
— Leuko - - - - absLymphs - □ - GVHD - - - - CRP
 - ▾ - IL10 - ● - IL4 - ◆ - IL12

IL2 / INFg / TNFa



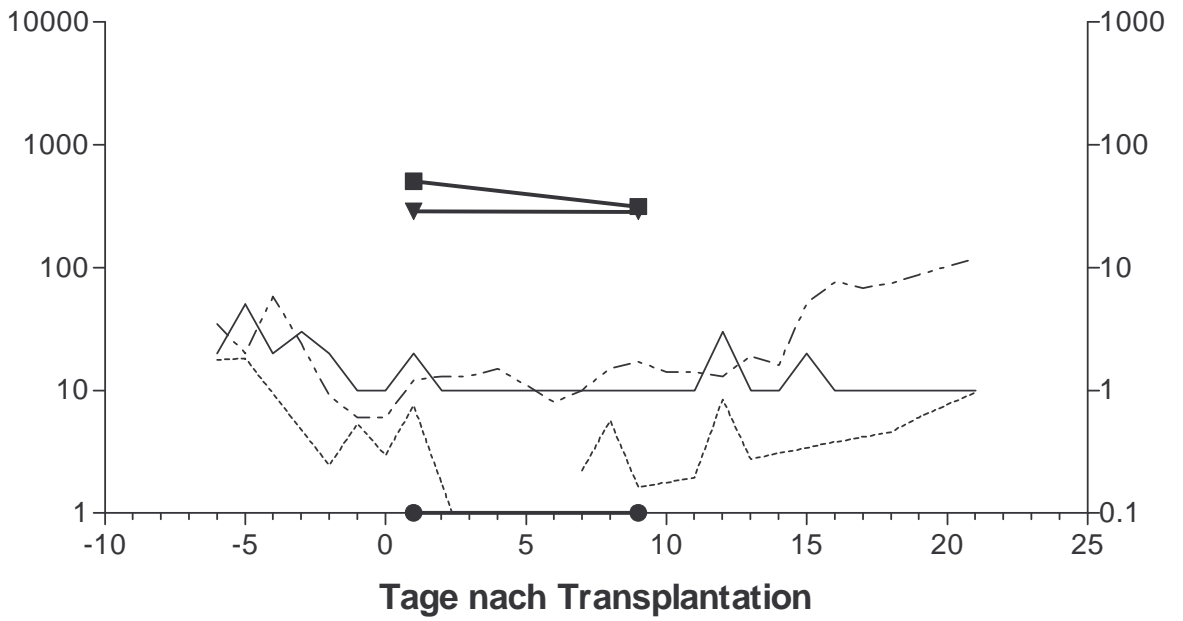
— Leuko - - - - - absLymphs -□- GVHD - - - - - CRP
 —▼ IL2 ● IFNg ■ TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



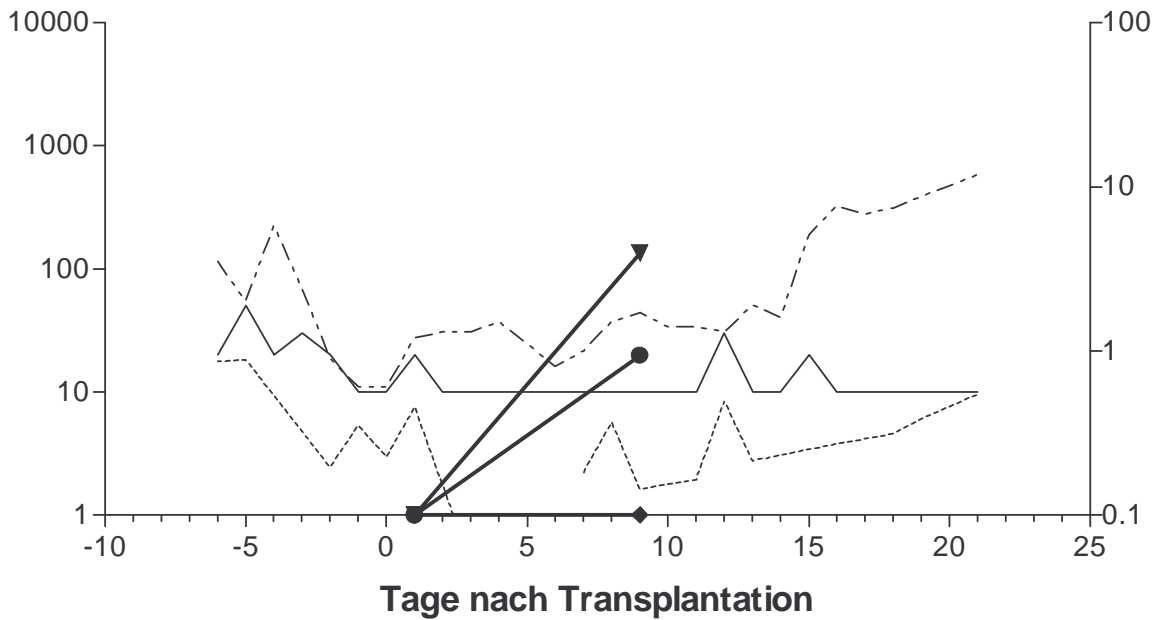
— Leuko - - - - - absLymphs -□- GVHD - - - - - CRP
 —▼ IL10 ● IL4 ◆ IL12

IL2 / INFg / TNFa



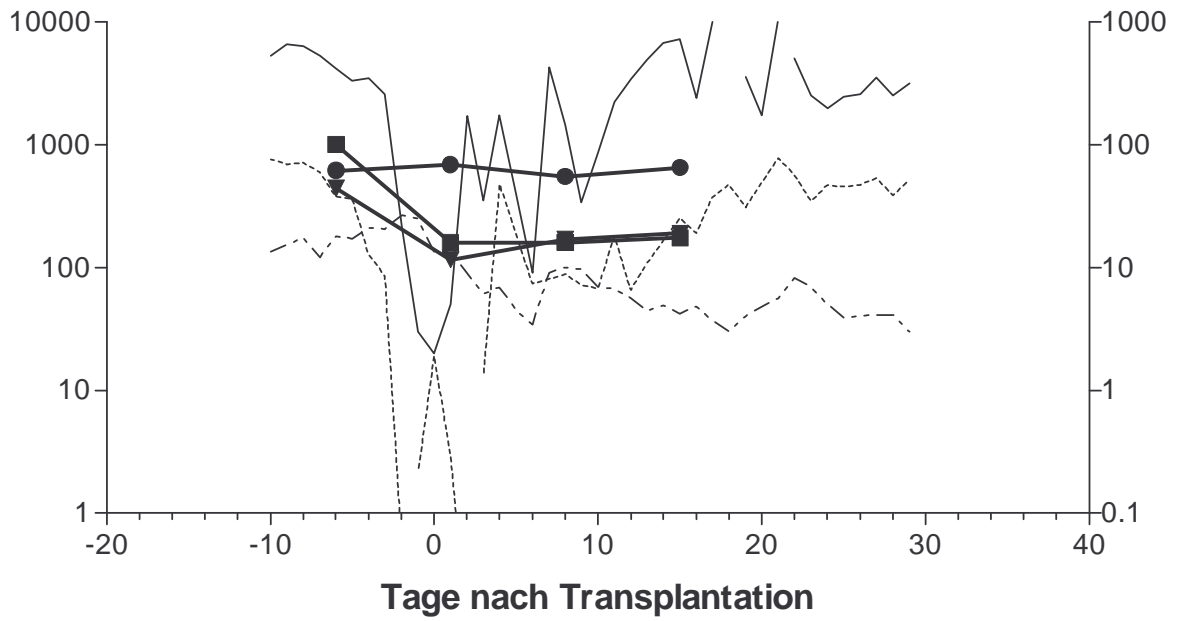
- Leuko - - - - - absLymphs - □ - GVHD - - - - - CRP
- ▼ - IL2 — ● - INFg — ■ - TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



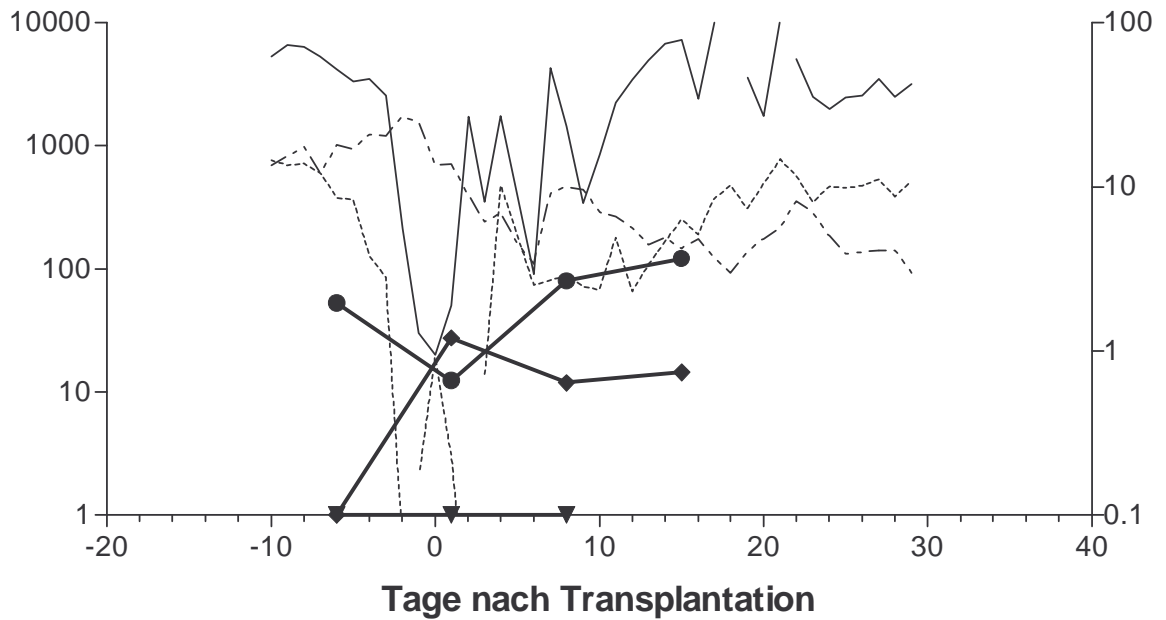
- Leuko - - - - - absLymphs - □ - GVHD - - - - - CRP
- ▼ - IL10 — ● - IL4 — ◆ - IL12

IL2 / INFg / TNFa



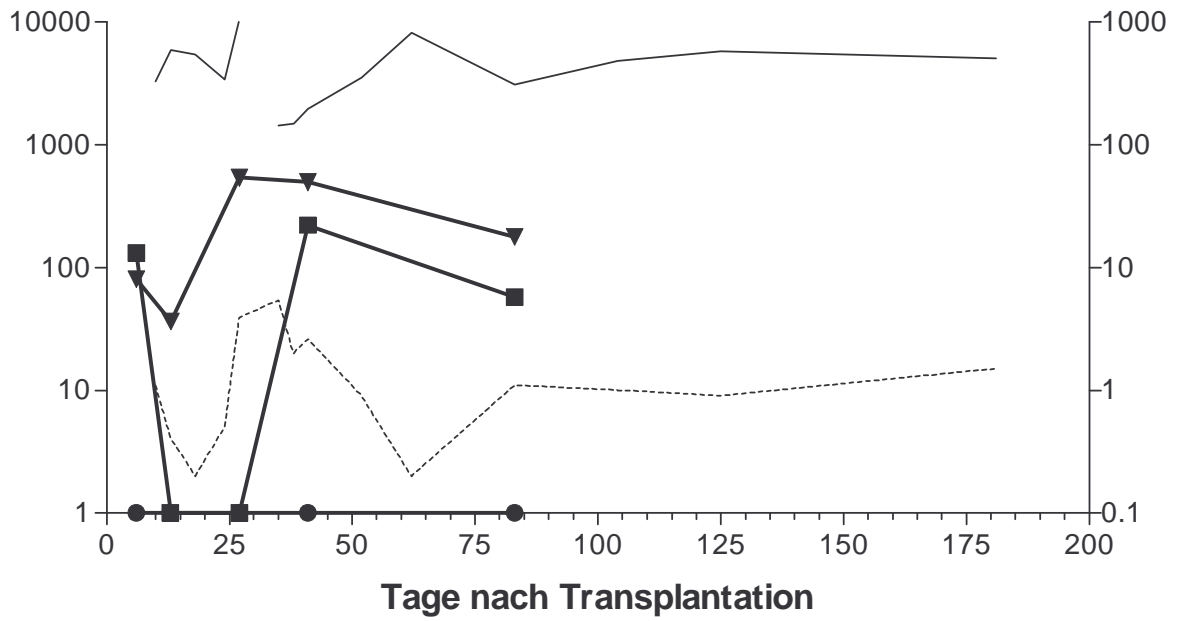
— Leuko abs Lymph —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL2 —●— INFg —■— TNFa

IL4 / IL10 / IL12



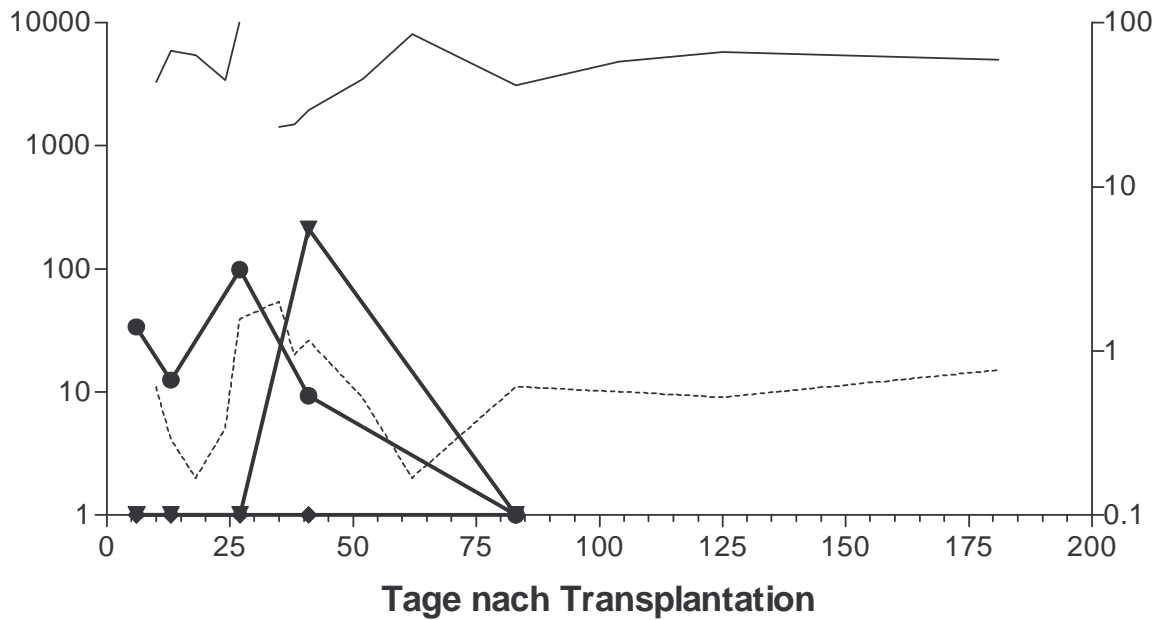
— Leuko abs Lymph —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL 10 —●— IL4 —◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



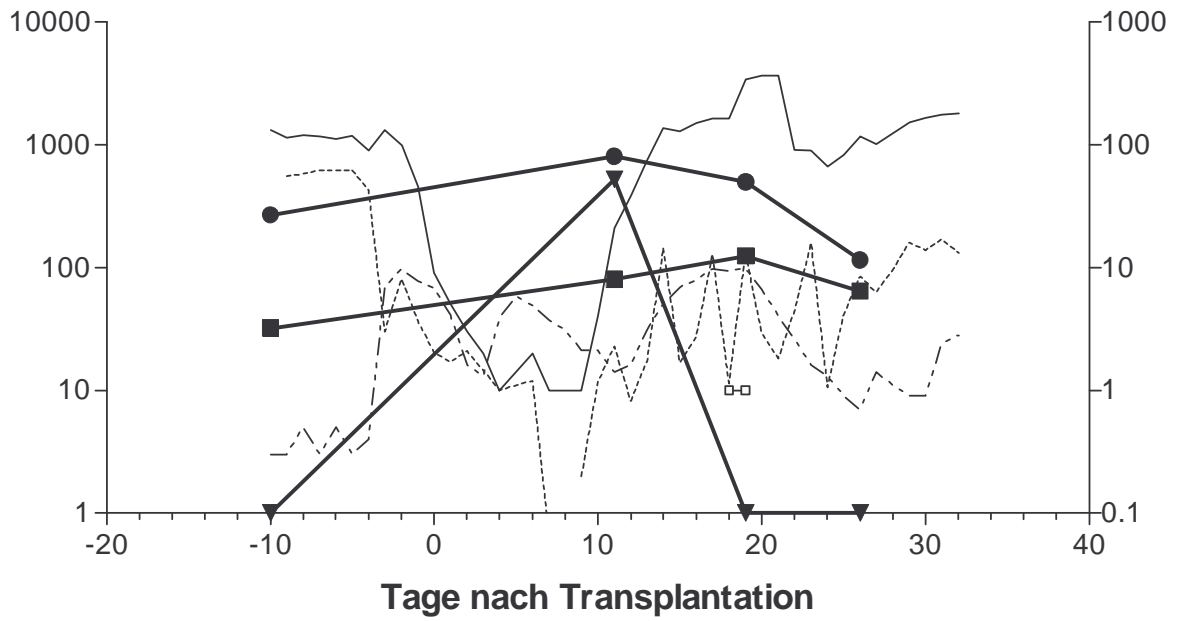
- Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
- ▼— IL2 —●— INFg —■— TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



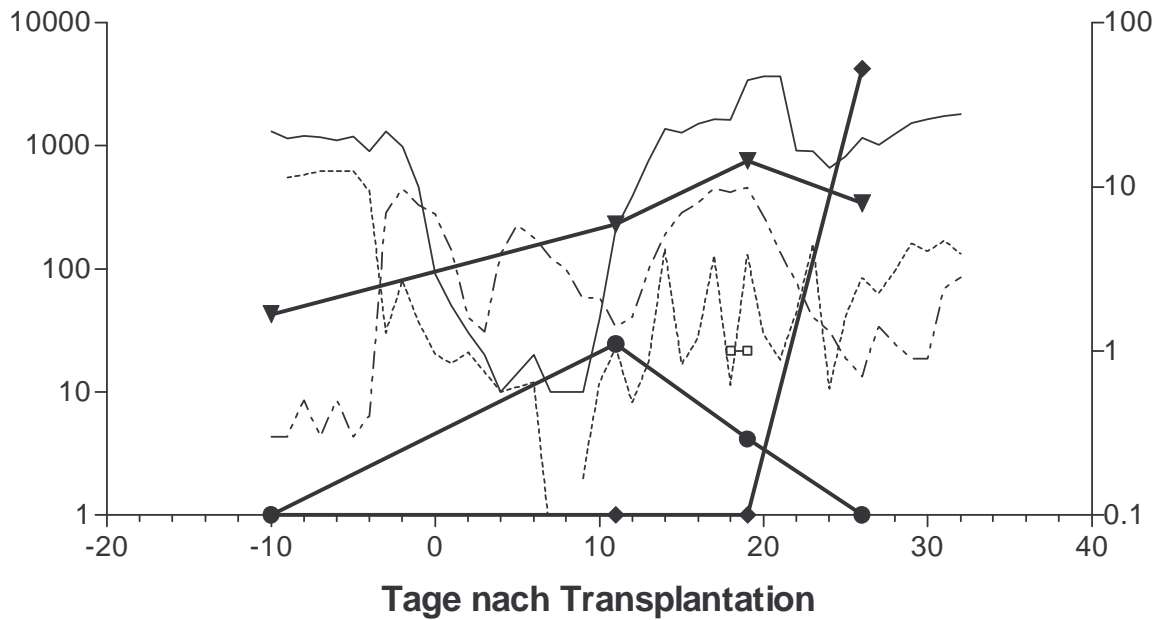
- Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
- ▼— IL10 —●— IL4 —◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



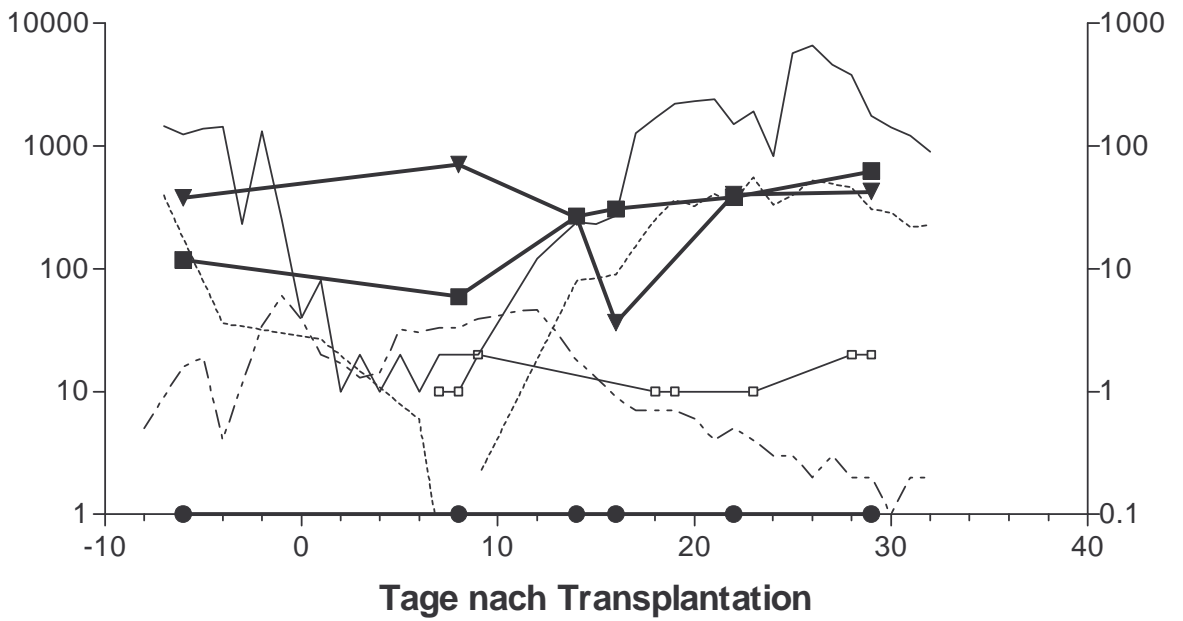
- Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
- ▼— IL 2 —●— INF gamma —■— TNF alpha

IL4 / IL10 / IL12



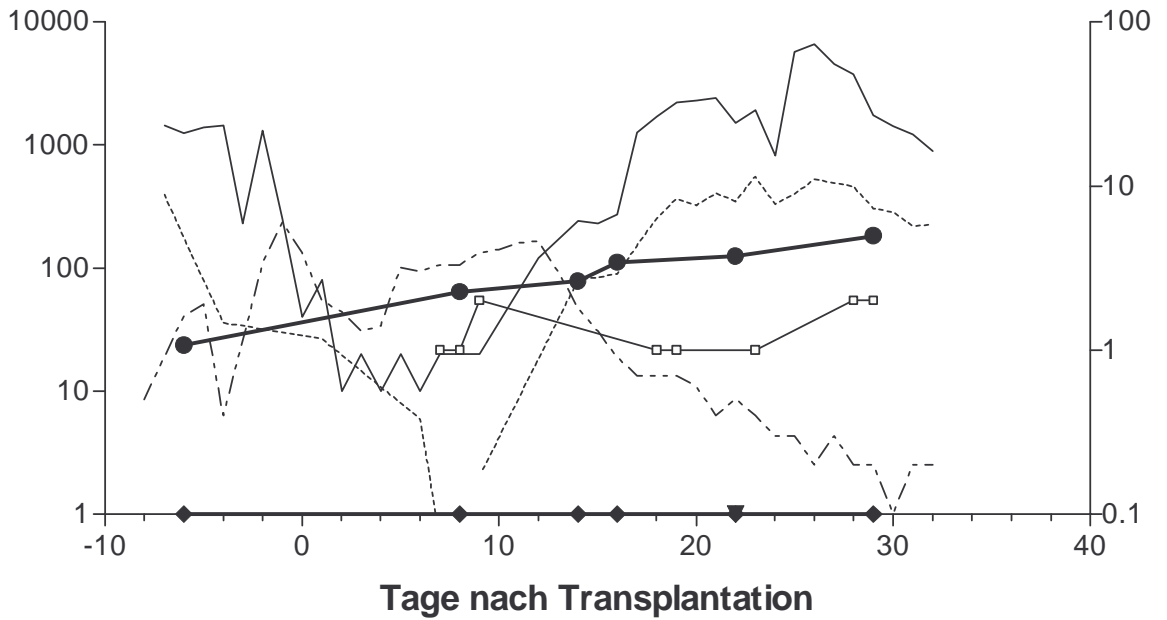
- Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
- ▼— IL 10 —●— IL 4 —◆— IL 12

IL2 / INFg / TNFa



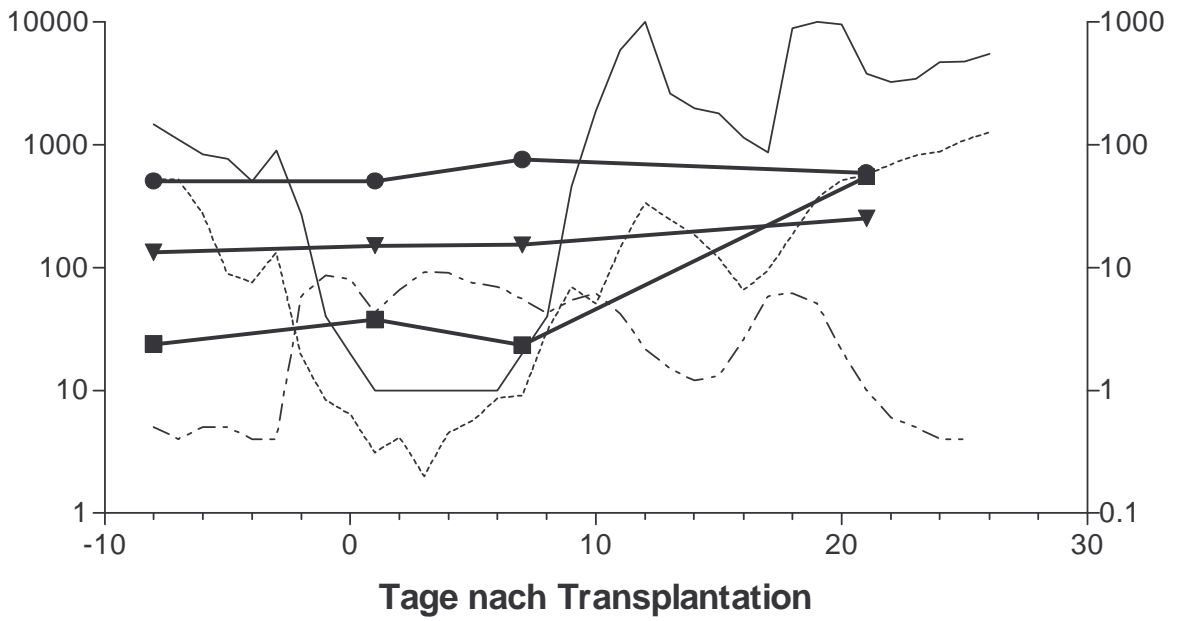
— Leuko absLymphs -□- GVHD -.-.- CRP
 -▼- IL2 -●- INFg -■- TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



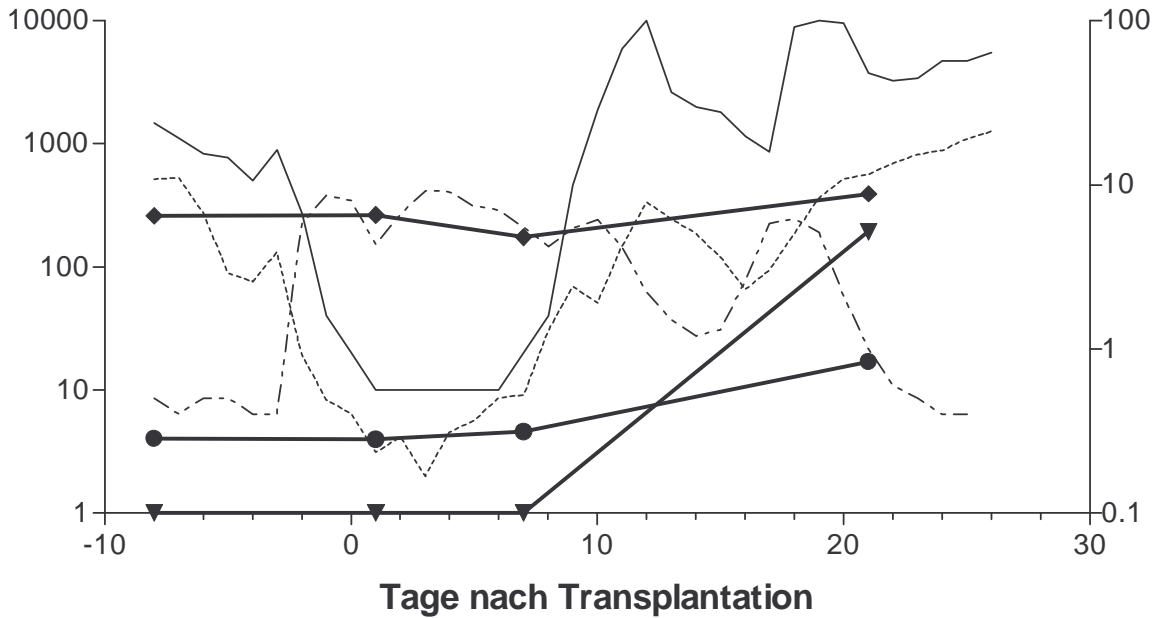
— Leuko absLymphs -□- GVHD -.-.- CRP
 -▼- IL10 -●- IL4 -◆- IL12

IL2 / INFg / TNFa



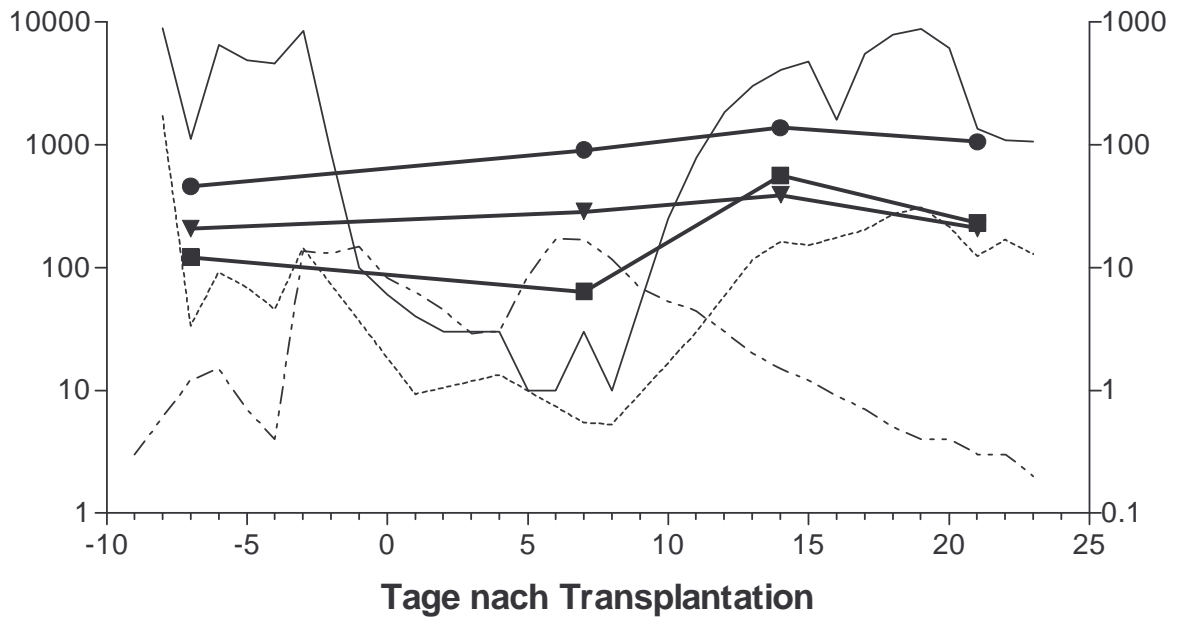
— Leuko - - - - absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 ▼ IL2 ● INFg ■ TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



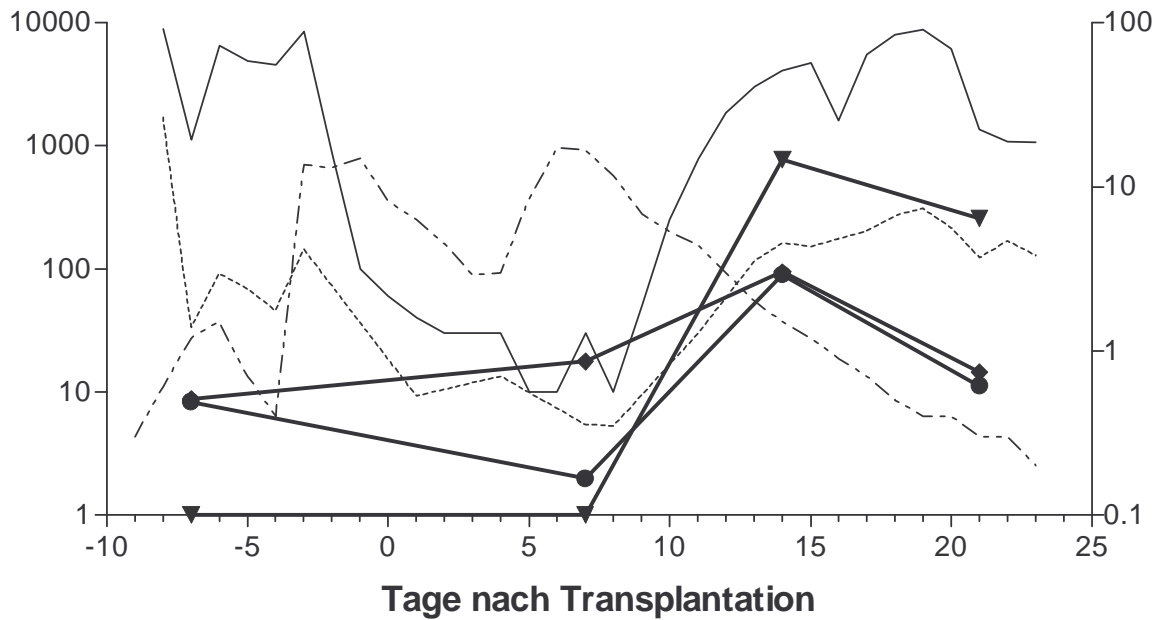
— Leuko - - - - absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 ▼ IL10 ● IL4 ◆ IL12

IL2 / INFg / TNFa



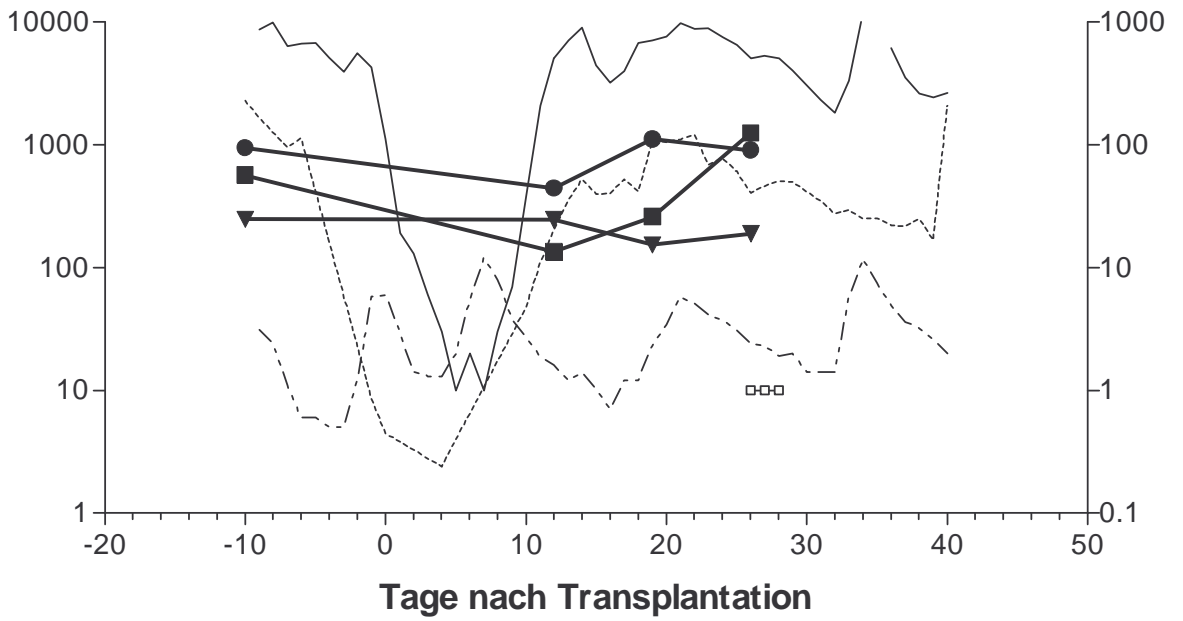
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL2 —●— INFg —■— TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



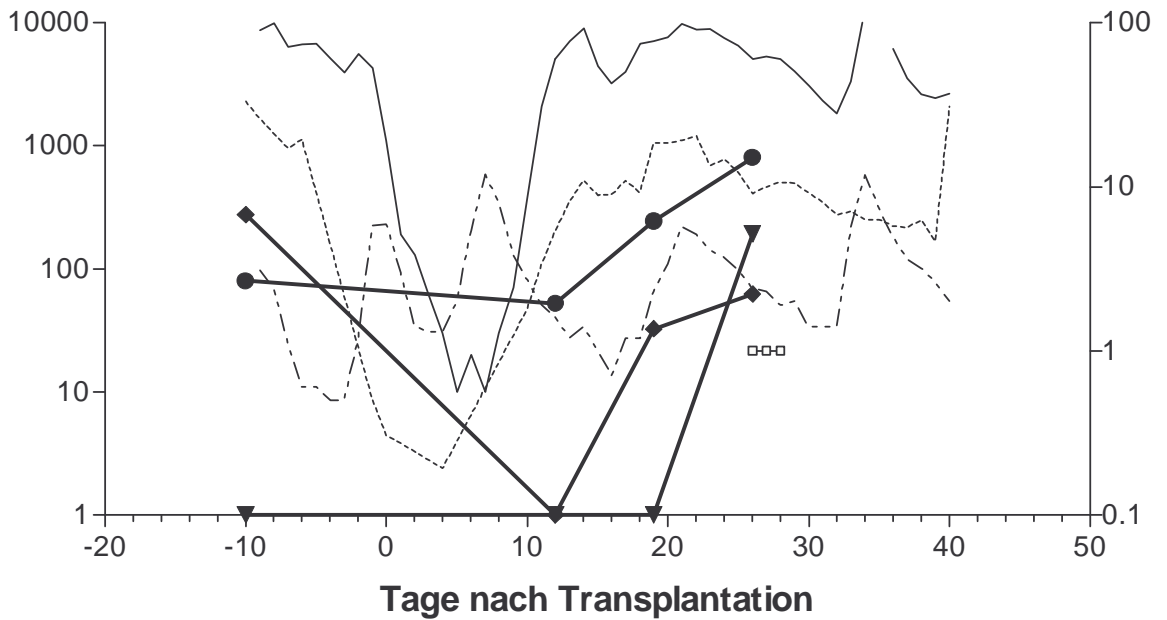
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL10 —●— IL4 —◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



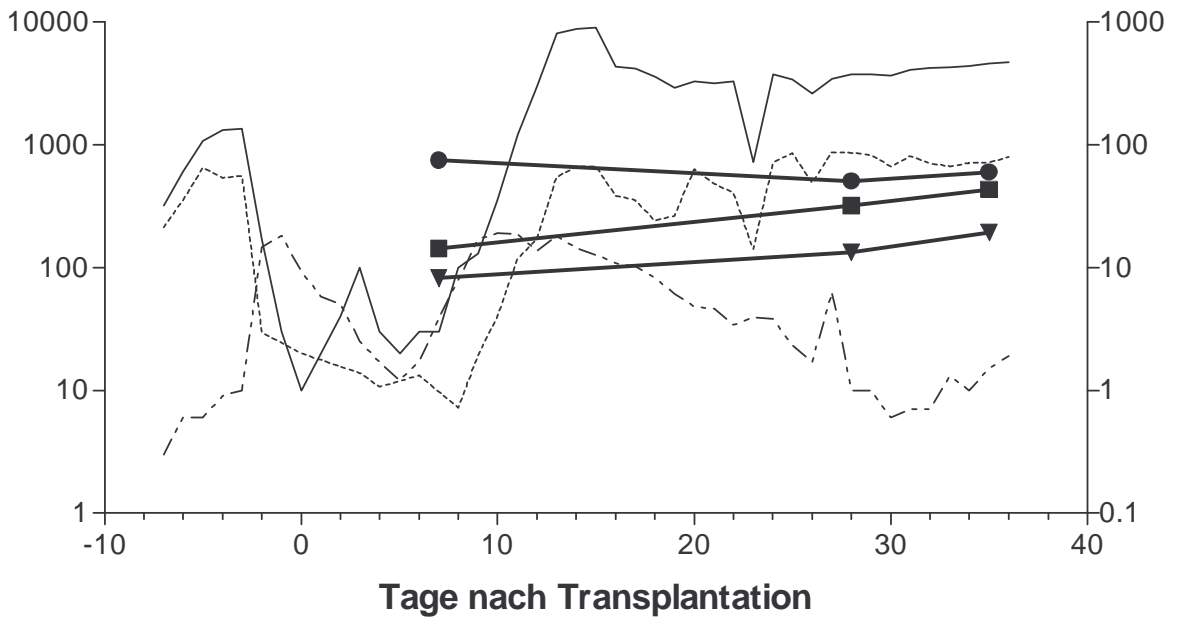
— Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 -▼- IL2 ●- INFg -■- TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



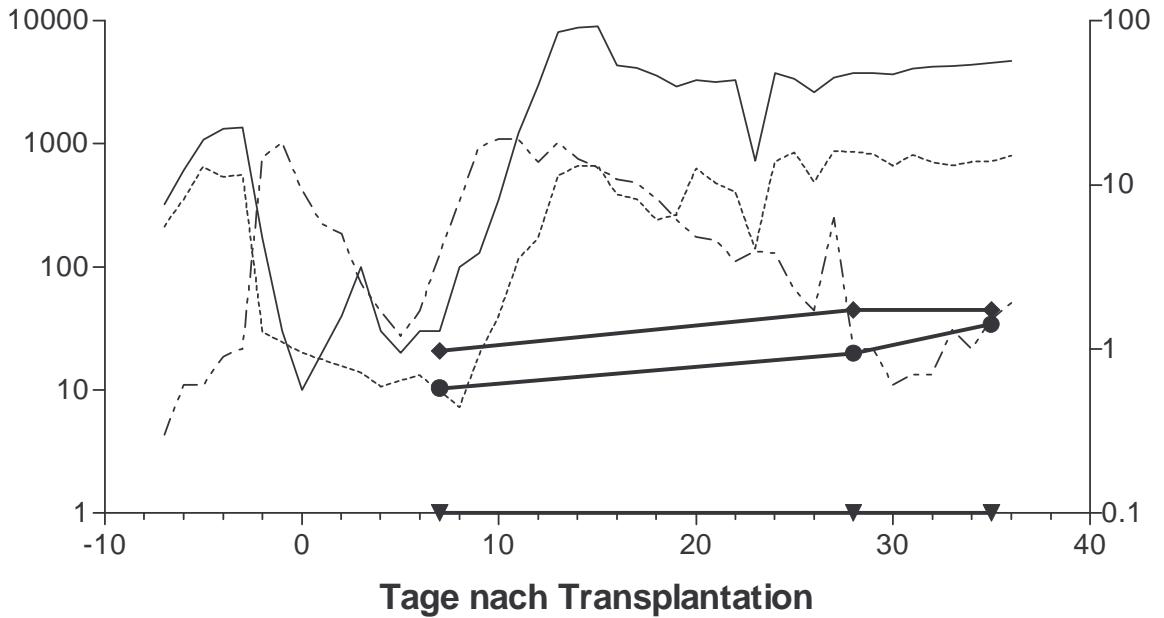
— Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 -▼- IL10 ●- IL4 -◆- IL12

IL2 / INFg / TNFa



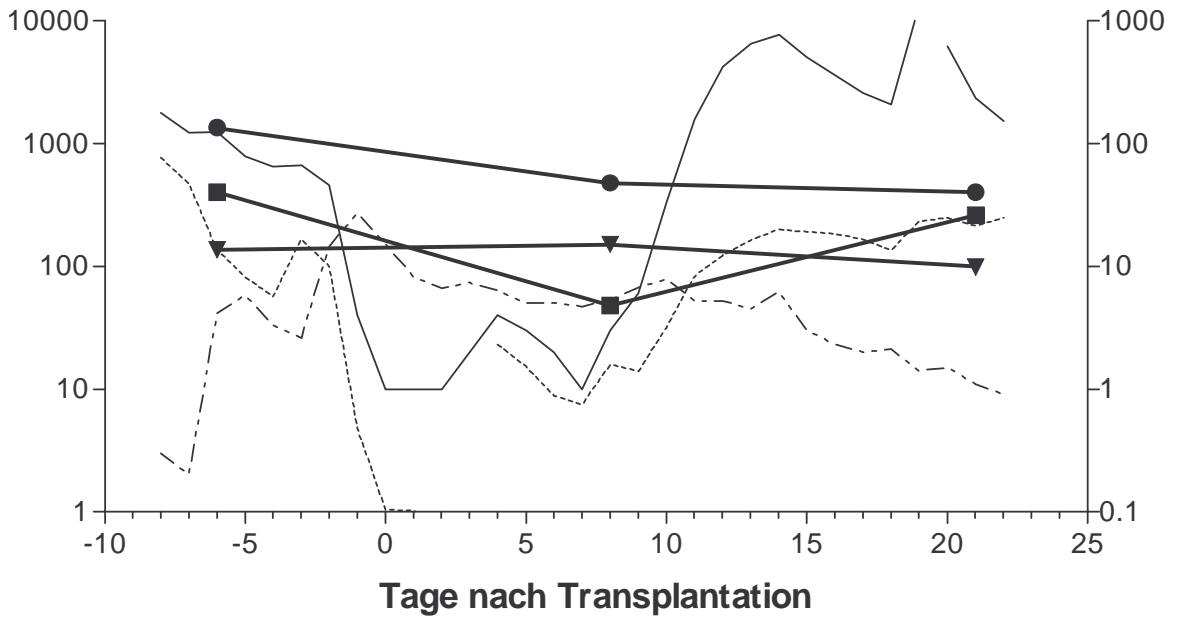
— Leuko absLymphs —□— GvHD - - - - CRP
—▼— IL 2 —●— INF gamma —■— TNF al

IL4 / IL10 / IL12



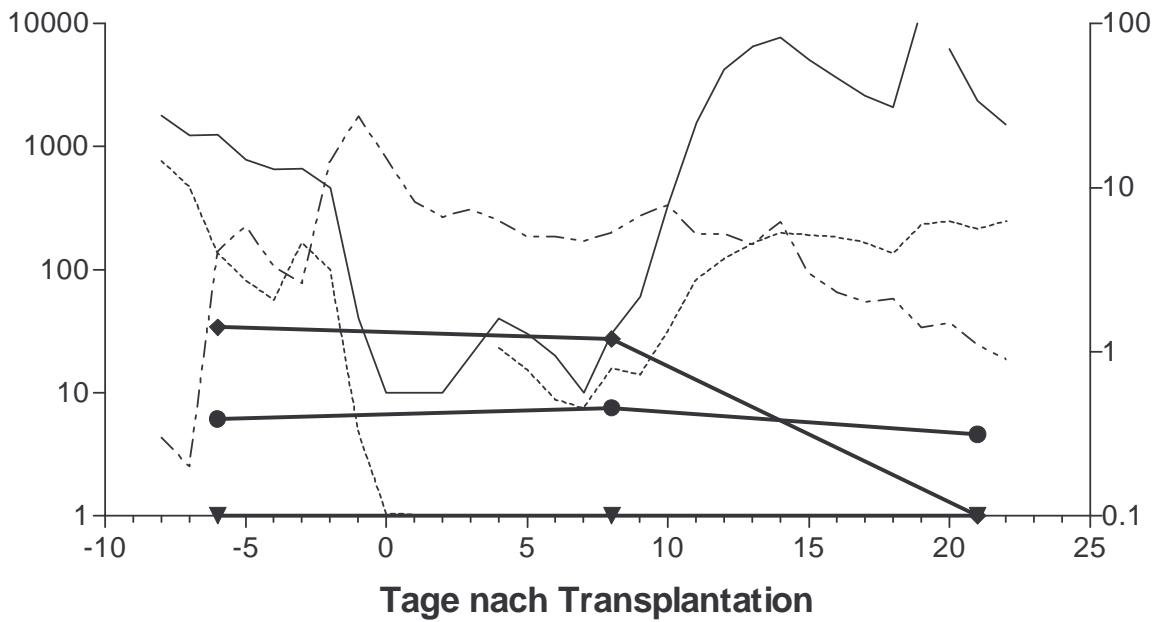
— Leuko absLymphs —□— GvHD - - - - CRP
—▼— IL 10 —●— IL 4 —◆— IFN g

IL2 / INFg / TNFa



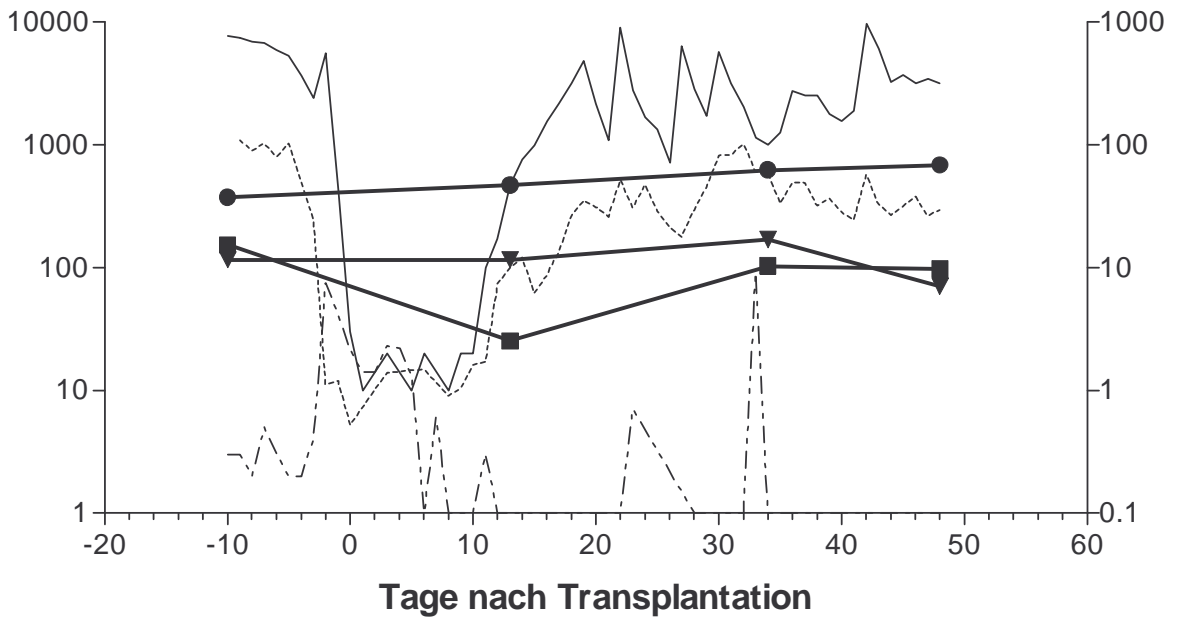
— Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 -▼- IL2 ●- INFg -■- TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



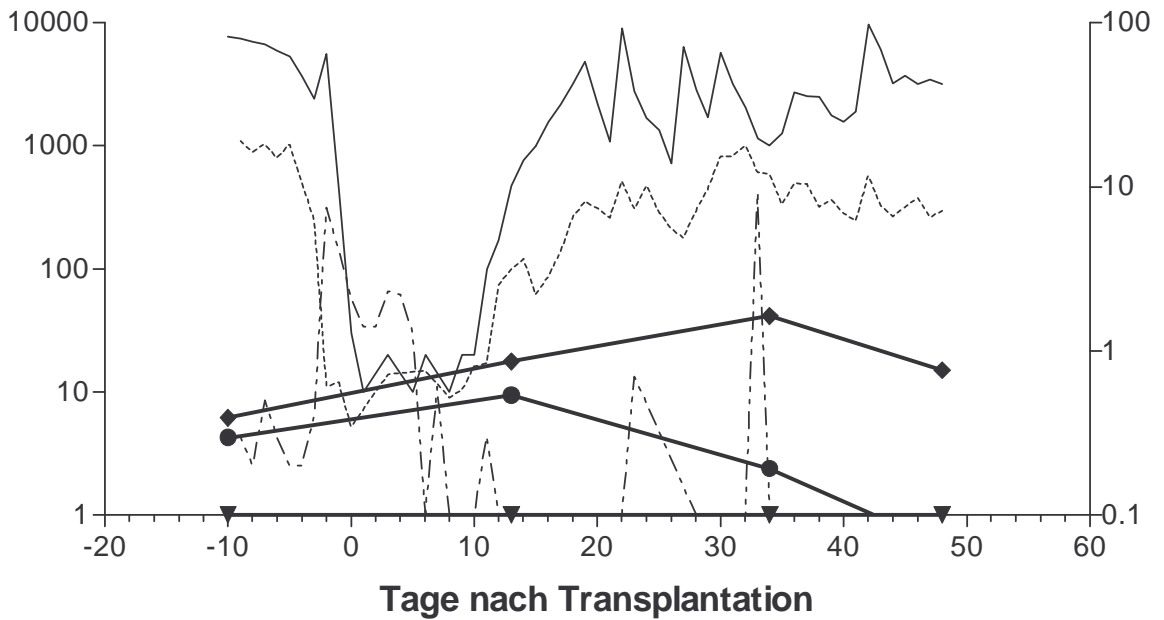
— Leuko absLymphs -□- GVHD - - - - CRP
 -▼- IL10 ●- IL4 -◆- IL12

IL2 / INFg / TNFa



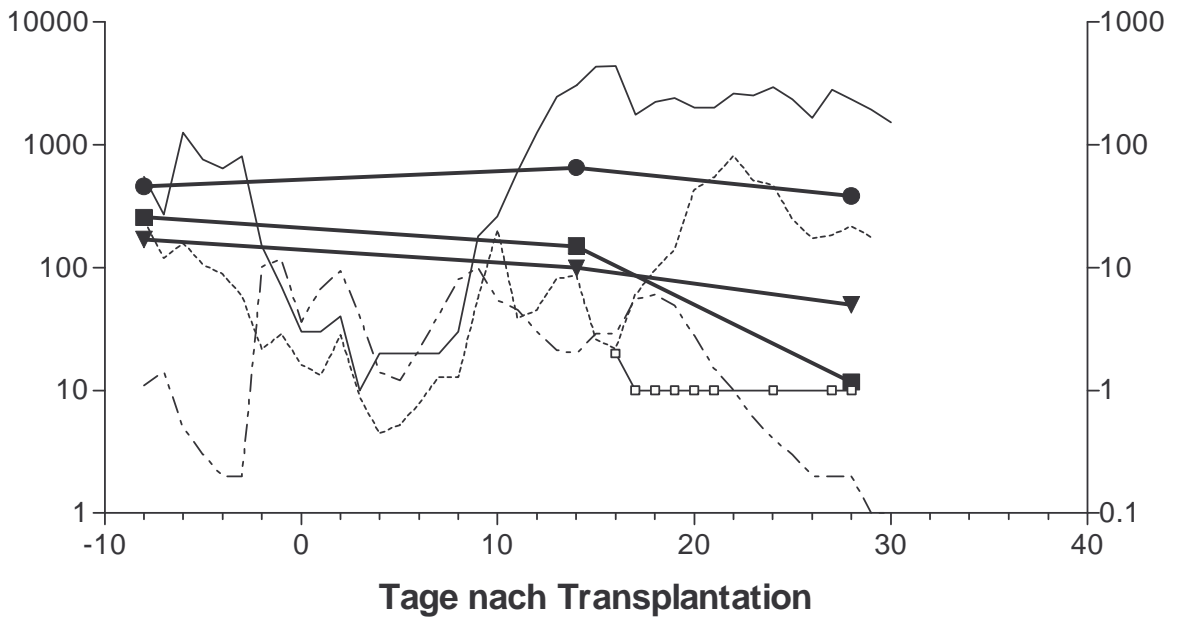
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL2 —●— INFg —■— TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



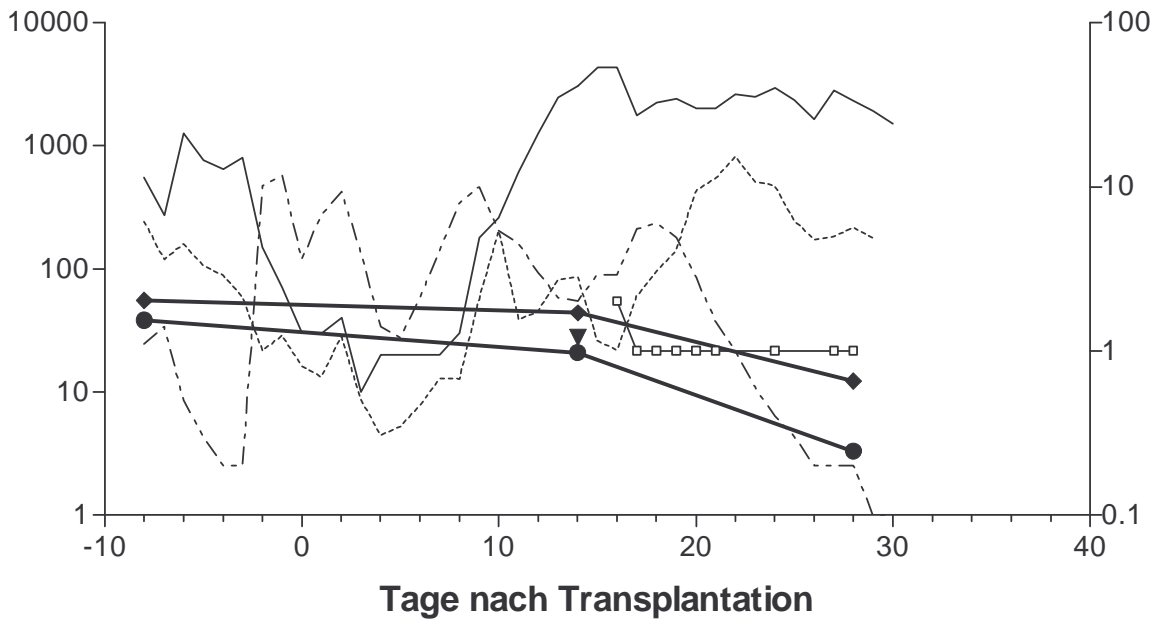
— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL10 —●— IL4 —◆— IL12

IL2 / INFg / TNFa



— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL2 —●— INFg —■— TNFalpha

IL4 / IL10 / IL12



— Leuko absLymphs —□— GVHD - - - - CRP
 —▼— IL10 —●— IL4 —◆— IL12

7. Literatur

Abbas Abul K., Lichtmann Andrew H., Poher Jordan S.: 1996

Immunologie

Hans Huber Verlag: 289-315

Allavena P., Paganin C., Zhou D.: 1994

Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium.

Blood 84: 2261-2268

Armitage James O.: 1994

Bone marrow transplantation.

New Engl. J. Med. 330: 827-835

Aversa F., Tabilio A., Terenzi A. : 1994

Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical tree-loci incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inculum.

Blood 84: 3948-3955

Begmann M., Begmann H., Raststter J.: 1993

Zytokine und ihre therapeutische Bedeutung.

Klinische Hämatologie

Thieme Verlag Stuttgart: 167-178

Beutler B., Mahoney J., Le Trang N., Pekala P., Cerami A.: 1985

Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells.

Exp.Med. 161: 984-985

Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., Wallach D.: 1995

A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain.

J. Biol. Chem. 270: 7795-7798

Bonnema J.D., Rivlin K.A., Ting A. T: 1994

Cytokine-enhanced NK Cell-Mediated Cytotoxicity.

J. Immunology 152: 2098-2104

Bonavida, B. 1991

Immunomodulatory effect of tumor necrosis factor
Biotherapy 127 - 133

Bortin M.B., Horowitz M.M., Gali R.P.: 1990

International bone marrow transplantation registry.
Statistical Center Milwaukee: 90-116

Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes: 1997

Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen.
Deutsches Ärzteblatt 94, 23: A1584-1592

Burmester G R., Pezzutto A.: 1998

Taschenatlas der Immunologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

Butturini, A. and Gale, R. P. 1988

T cell depletion in bone marrow transplantation for leukemia: current results and future directions
Bone Marrow Transplant 185 - 192

Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B.: 1975

An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc. Natl. Acad. Science USA 72: 3666-3670

De Maeyer E and De Maeyer-Guignard J : 1992

Interferon-gamma.
Current Opinion in Immunology 4: 321-6

Dopfer R., Berthold F., Einsele H. : 1989

Bone marrow transplantation in children with neuroblastoma.
Folia Haematology 111: 427-436

Ehninger G., Klingebiel T., Schuler.U. et al.: 1993

Bone marrow transplantation from unrelated donors in chronic myelogenous leukemia.
Seminars in Hematology Vol. 30, Suppl.3: 49-50

Friedrich W., Goldmann S F., Ebell W. et al.: 1985

Sereve combined immunodeficiency: treatment by bone marrow transplantation in 15 infants using
HLA-haploidentical donors.
Eur. J. Pediatr. 144: 125-130

Gerard L., Ferry J.A., Amrein P.C., Harmon D.C., McKinsty R.C., Hoppel B.E., Rosen B.R.:1992
 Compositional changes in the vertebral bone marrow during treatment for acute leukemia assessment
 with quantitative chemical shift imaging.
 Radiology 183: 39-46

Grau G. E.:1990
 Implications of cytokines in immunopathology: experimental and clinical data.
 Eur. Cytokine Netw. 1: 203-210

Grimm E.A., Mazumder A., Zhang H.Z., Rosenberg S.A.: 1982
 Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2 activated autologous human
 peripheral blood lymphocytes.
 J. of experimental Med. 155: 1823-1841

Gutjahr Peter: 1993
 Krebs bei Kindern und Jugendlichen.
 Deutscher Ärzte-Verlag

Han, X., Itoh, K., Balch, C. M., and Pellis, N. R. 1988
 Recombinant interleukin 4 (RIL4) inhibits interleukin 2-induced activation of peripheral blood
 lymphocytes
 Lymphokine Res. 227 - 235

Handgretinger R., Klingebiel T., Bader B., Faleyras C., Siedner R., Wendt S., Dopfer R., Niethammer
 D.: 1992
 Stem cell mobilisation, collection and transplantation in patients with pediatric tumors.
 Cancer Research Therapy and Control 3: 43-48

Handgretinger R., Klingebiel, T., Niethammer D. et al.: 1994
 Technische Aspekte der autologen Knochenmarkstransplantation.
 Infusionsther.-Transsfusionsmed. 21 Suppl 3: 39-42

Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel,
 P. G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R. J., and Niethammer, D. 2001
 Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched
 parental donors in children
 Bone Marrow Transplant 777 – 783

Handgretinger, R., Lang, P., Schumm, M., Pfeiffer, M., Gottschling, S., Demirdelen, B., Bader, P.,
 Kuci, S., Klingebiel, T., and Niethammer, D. 2001
 Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children
 Ann.N.Y.Acad.Sci. 340 - 357

Holler E., Hintermeier-Knabe R., Ertl B., Hültner L. Kolb H.J., Wilmanns W.: 1993

TNF- α und interagierende Zytokine als Mediatoren transplantationsassoziiierter Komplikationen nach Knochenmarktransplantation.

Zytokine Georg Thieme Verlag 106-111

Ibelgaufts Horst: 1992

Lexikon Zytokine

Medikon Verlag München

Kasai M, Masauzi N. 1998

The characteristics of umbilical cord blood (UCB) and UCB transplantation.

Semin Thromb Hemost. 491-495.

Keller Robert: 1994

Immunologie und Immunpathologie

Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York

Kita Y., Iwaki Y., Noguchi K., Tzakis A.G., Todo S., Fung J., Starzl T.E.: 1996

Daily serum inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6) monitoring in livertransplantation focusing on allograft rejection:

A five-case report Transplant. Proc., 28 (3): 1237-1240

Klingebiel T., Bader B., Siebert I., Kochendörfer S., Gleis U.: 1998

Informationen zur Knochenmarktransplantation an der Universitätskinderklinik Tübingen

Gulde-Druck

Kremens B., Klingebiel T., Berthold F, et al.:1992

The German experience in high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation.

Bone Marrow transplantation Vol. 10,Supl.2: 2

Lang P., Klingebiel T., Handgretinger R., Herter M., Dopfer R., Niethammer D: 1993

Einsatz von G-CSF bei der Stammzellmobilisation für die autologe KMT bei Kindern.

Monatszeitschrift für Kinderheilkunde 141: 192-196

Menard O., Martinet N., Martinet Y: 1993

Zytokine und die Lunge.

Pneumologie 47: 427-438

Michie H.R., Manogue K.R., Spriggs D.R., Revhaug A., Dinarello C.A., Wolff S.M., Wilmore D.W.: 1988

Detection of tumor necrosis factor after endotoxin administration.

N.Engl. J. Med. 318: 1481-1486

Mintz M., Rapaport R., Oleske J.M., Connor E.M., Königsberger M.R., Denny T., Epstein L.G.: 1989
Elevated serum levels of tumor necrosis factor are associated with progressive encephalopathy in children with acquired immunodeficiency syndrome.
Am. J. Diss. Child. 143: 771-774

Niederle N., Ganser A., Bergmann L.: 1996
Zytokine
Gustav Fischer Verlag 15-20

Niethammer D.: 1988
Knochenmarktransplantation bei Kindern und Jugendliche.
Monatszeitschrift für Kinderheilkunde 136:297-304

Nishimura Y., Takei Y., Kawano S., Yoshihara M., Goto M., Hijioaka T., Fukui H., Oshita M., Fusamoto H., Kamada T.: 1993
Long term storage of liver grafts is associated with a postoperative elevation of Tumor necrosis factor: A possible role in the pathogenesis of primary nonfunction of the grafts and pulmonary complications.
Transplant. Proc., 25: 130-131

Oethinger Margret (Hrsg.): 2000
Mikrobiologie und Immunologie.
Gustav Fischer Verlag 235-238

Ostendorf P., Ehninger G., Dopfer R., et al: 1986
Knochenmarktransplantation bei akuter Leukämie, chronisch myeloischer Leukämie, schwerer aplastischer Anämie und Neuroblastom Stadium IV. Einfluß antiviraler Prophylaxe mit Anti-CMV-Hyperimmunglobulin und Acyklovir.
Klinische Wochenschrift 64: 452-466

Pinkel Donald: 1993
Bone marrow transplantation in children.
The journal of pediatrics Vol.122: 331-320

Robertson M.J., Ritz J.:1990
Biology and clinical relevance of human natural killer cells.
Blood 76: 2421-2438

Roitt I. M., Brostoff J., Male D.K.: 1991
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York

Schaefer U.W., Beelen D.W.: 1989

Knochenmarktransplantation

Karger Basel Verlag

Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuci S, Klingebiel T, Bühring H, Geiselhart A, Niethammer D ,
Handgretinger R: 1999

Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS
Device.

J. Hematotherapy 8: 209-218

Stachel Daniel: 1999

Stammzelltransplantation.

Monatsschrift für Kinderheilkunde 147: 707-715

Staehtler M., Hammer C., Meiser B., Fürst H., Reichart B., Schildberg F.W.: 1997

Differentialdiagnostik der akuten Abstoßungsreaktion und Infektion mittels Procalcitonin und
Zytokinen. Langenbecks Arch. Chir. I, Forumband: 205-209

Stains N., Brostoff J., James K.: 1997

Immunologisches Grundwissen.

Gustav Fischer Verlag

Stewart R.J., Marsden P. A.: 1995

Biologic control of the tumor necrosis factor and Interleukin-1 signaling cascade.

Am. J. Kid. Dis., 25: 954-966

Thomas E.D., Storb R., Clift R.A., Fefer A., Johnson F.L., Neiman P.E., Lerner K.G., Glucksberg H.,
Buckner C.D.: 1975

Bone marrow transplantation.

New Engl. J. Med. 17: 832-843

To L.B., Haylock D.N., Simmons P.J., Juntter C.A.: 1997

The biology and clinical uses of blood stemm cells.

Blood 89: 2233-2258

Waage A., Halstensen A., Espevik T.: 1987

Association between TNF in serum and fatal outcome in patients with meningococcal sepsis.

Proc. Natl. Acad.Sci., 84: 8619-8622

Warren H. S., Kinnear B.F., Phillips J. H.: 1995

Production of IL-5 by Human NK Cells and Regulation of IL-5 Secretion by IL-4, IL-10 and IL-12.

J.Immunology 154: 5144-5515

Weinmann E., Kiess W.: 1991
Wachstumsfaktoren.
Schattauer Verlag Stuttgart

8. Abkürzungen

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ALG	Anti Lymphozyten Globulin
ATG	Anti Thymozyten Globulin
BGF-1	B-cell growth factor 1
BSF-1	B-cell stimulating factor 1
BU	Busulfan
CD	Cluster of differentiation
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colonie stimulierender Faktor
CYC	Cyclophosphamid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GvHD	Graft versus Host Disease
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN- γ	Interferon gamma
IgE	Immunglobulin Epsilon
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarktransplantation
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LPS	Lipopolysaccharide
MAF	Makrophagen aktivierender Faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MUD	Matched Unrelated Donor
NK	Natürliche Killerzellen
NHL	Non Hodgkin Lymphom
PBSC	Periphere Blutstammzellen (peripheral blood stem cells)
Ph	Philadelphia Chromsom
SAA	Schwere aplastische Anämie
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	total body irradiation - Ganzkörperbestrahlung
TH	T-Helferzelle
TT	Thiotepa
TNF- β	Tumornekrosefaktor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha löslich
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor Rezeptor 2

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dietrich Niethammer danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Verfügungsstellung des Arbeitsplatzes und die vielfältige Unterstützung während meines Aufenthaltes.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. med. vet. Michael Schumm und Dr. med. Peter Lang für ihre Unterstützung und Betreuung der Arbeit, die Hilfestellung am Computer und Korrektur des Manuskriptes.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des KMT-Labores Olga Bartuli, Christine Bäuerle, Gabrielle Hochwelker, Ulrike Junker, Christiane Braun, Lena Koschnik, Sieglinde Haug, Andrea Schumm und die Mitarbeiter des hämatologischen Labores Gerhard Brodbeck, Jaqueline Grimberger, Gisela Merkel, Astrid Kreutz, Regina Kusyschyn, sowie Prof. Dr. Gernot Bruchelt für ihre herzliche Aufnahme und vielfältige Unterstützungen.

Herzlichen Dank auch an alle anderen, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere Barbara Black, Erika Braun und N.Tsaribocwew, B.Fehling.

9. Lebenslauf

Familienname	Chimgee
Vorname	Guviraa
Geburtstag	22.03.1960
Geburtsort	Ulaanbaatar, Mongolei
Staatsangehörigkeit:	mongolisch
Familienstand:	verheiratet mit Chadraabal, 3 Kinder

Schulbildung

1967 – 1969	Grundschule in Ulaanbaatar
1969 – 1977	Oberschule in Ulaanbaatar
1977	Abitur

Studium

1977 – 1982	Studium der Medizin an der Medizinischen Universität Ulaanbaatar
Juni 1982	Abschlußexamen: Medizinisches Diplom für Kinderheilkunde und Erwerb des Berufstitels: Kinderärztin

Berufstätigkeit

1982 – 1984	Ärztin im Praktikum im staatlichen, wissenschaftlichen Behandlungszentrum für Mütter und Säuglinge in der Mongolei, Ulaanbaatar
1984 - 1985	Weiterbildung mit Zertifikat für Neonatologie im staatlichen, wissenschaftlichen Behandlungszentrum für Mütter und Säuglinge in der Mongolei, Ulaanbaatar
1985 – 1990	Kinderärztin im staatlichen, wissenschaftlichen Behandlungszentrum für Mütter und Säuglinge in der Mongolei, Ulaanbaatar
1990 – 1993	Hospitantin an der Städtischen Kinderklinik Chemnitz, Deutschland, Abteilung Kinderhämatologie
1993 – 1998	Kinderärztin im staatlichen, wissenschaftlichen Behandlungszentrum für Mütter und Säuglinge in der Mongolei, Ulaanbaatar
ab 1998	Hospitantin an der Kinderklinik der Universität Tübingen, Deutschland, Abteilung für Hämatologie, Onkologie