

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methodik

Bei den Experimenten wurden Zellen aus dem Vollblut von Patienten nach Stammzelltransplantation durch fluoreszenzmarkierte Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie phänotypisch charakterisiert. Isolierte PMNZ der Patienten wurden durch PMA und Ionomycin zur Zytokinproduktion stimuliert und die Zytokine mittels ELISA und intrazellulärer Zytokinfärbung gemessen.

In die Studie wurden *Patienten nach CD34⁺ aufgereinigter, T-Zell-depletierter allogener PBSZT* mit haploidenten oder nichtverwandten Spendern eingeschlossen. Dieses Kriterium umfasste ein bezüglich der Grunderkrankung, des Erkrankungsstatus, des Alters und der Anzahl der HLA-Mismatches heterogenes Patientenkollektiv. Im Folgenden werden diese Faktoren diskutiert. Die Geschwindigkeit der Regeneration, gemessen an den absoluten Zellzahlen, zeigte deutliche, individuelle Unterschiede. Um Patienten mit einem vergleichbaren Regenerationsstand in Gruppen zusammenzufassen, wurde als Parameter der Gruppenzuordnung anstatt der Zeit nach Transplantation der Anteil der CD4⁺CD45RA⁺-Zellen im Vollblut gewählt. Die Messwerte wurden innerhalb der einzelnen Gruppen in Medianen mit Streubereichen angegeben. Einige Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum und wurden damit nur zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation erfasst. Daher war zu späteren Zeitpunkten nach Transplantation die Anzahl der untersuchten Proben geringer.

Die Patientenblutproben wurden im Rahmen von Routinekontrollen zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation gewonnen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proben innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet wurden, um die Stimulationsversuche nicht durch eine zunehmende Anzahl apoptotischer Zellen zu verfälschen. Die hier experimentell erfassten Ergebnisse zu Immunrestitution und Zellfunktion stellen Momentaufnahmen einer individuellen Regeneration dar.

Für die Zellstimulationen wurden aus dem Vollblut mittels Ficoll separierte PMNZ von Patienten verwendet. Dagegen basieren viele Aussagen über das Verhalten von T-

Zellen auf Experimenten mit T-Zell-Klonen, wie zum Beispiel das von Mosmann et al. [70] erstmals beschriebene TH1/TH2-Paradigma. Diesem Unterschied muss in der Einordnung der Ergebnisse Rechnung getragen werden [82].

Zur *Zellaktivierung* wurden die Mitogene PMA und Ionomycin verwendet, da sie eine nichtselektive, breite Lymphozytenaktivierung bewirken [64]. Sie gelten als verlässlichste T-Zell-Stimulanzen [98] und werden für die intrazelluläre Zytokinfärbung empfohlen [64]. Jedoch ist die Wirkung von PMA und Ionomycin auf verschiedene T-Zell-Subpopulationen unterschiedlich [2], wie im weiteren näher ausgeführt wird. PMA aktiviert die zelluläre Proteinkinase C, wohingegen Ionomycin durch eine Zunahme der Membranpermeabilität einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} hervorruft. Diese beiden Mitogene interferieren damit in intrazelluläre Signaltransduktionswege und zielen letztlich auf eine Genaktivierung hin. Anti-CD3 führt zu einer direkten T-Zell-Rezeptorstimulation, anti-CD28 initiiert ein kostimulatorisches Signal über CD28 für die T-Zell-Aktivierung [9,12,66,83,113]. Das intrazelluläre Ca^{2+} steigt erst in weiteren Schritten der Signaltransduktion an. Die Titrationsversuche ergaben für anti-CD3 und anti-CD28 eine deutlich niedrigere Zytokinproduktion, insbesondere der TH1/TC1-Zytokine, weshalb die Wahl auf PMA und Ionomycin fiel. Die Konzentrationsstufen für die Titrationsversuche wurden unter Berücksichtigung der Literaturangaben [17,21,26,64,108,109] festgelegt.

Außerdem weisen T-Zellen je nach Reifungsstadium unterschiedliche Aktivierungsbedingungen auf. Naive Zellen haben verglichen mit Gedächtnis-Zellen höhere Anforderungen an die Aktivierung. Dazu zählen vor allem eine starke T-Zell-Rezeptor-Interaktion mit kostimulatorischem Signal [2], höhere Mitogenkonzentrationen [20] und eine längere Stimulationdauer, während Gedächtnis-Zellen keine Kostimulation benötigen [108].

Die naiven Zellen unterscheiden sich durch die Expression von CD45RA phänotypisch von den CD45RO^+ Gedächtniszellen. Jedoch postulieren verschiedene Autoren [34,45,75] neben der Änderung von CD45RA zu CD45RO nach lang andauernder Zellstimulation *in vitro* auch einen Shift in die entgegengesetzte Richtung. Dies wurde

insbesondere bei CD8⁺ Zellen beobachtet. Dagegen stellten Rufer et al [92] fest, dass humane CD45RO⁺ Zellen den CD45RA⁺ Phänotyp nicht wieder annehmen. Dies gilt es, insbesondere bei den im Folgenden dargestellten Stimulationsexperimenten zu berücksichtigen.

Beim Vergleich mit anderen Versuchen muss die Abhängigkeit der Zytokinproduktion von Art und Menge des Stimulanz und der Dauer der Inkubation berücksichtigt werden [64]. Ein Vorteil der kurzen Stimulationsdauer bei der intrazellulären Färbung besteht darin, dass aufgrund der geringen Anzahl apoptotischer Zellen kaum eine Selektion stattfindet.

Die Kinetik der Zytokinproduktion wurde in den Titrationsversuchen (siehe unter 3.2.1.) erfasst. Im ELISA wurden maximale Zytokinkonzentrationen nach 48 h bei IL-4 und nach 72 h bei den restlichen Zytokinen im Überstand gemessen. Dagegen beobachteten Paliard et al [78] bei T-Zell-Klonen für IL-2 und IL-4 einen Abfall der Zytokinkonzentration nach 20 h, hervorgerufen durch den Verbrauch von IL-2 und IL-4 durch die Klone. IFN- γ stieg mit Dauer der Stimulation kontinuierlich an.

Entscheidend für die Zytokinproduktion ist außerdem die Mikroumgebung der Zellen [82]. Hier spielen Zellgemisch, Zellzahl, Kulturmedium [114], technische Inkubationsbedingungen und nicht zuletzt das Zytokinmilieu eine wichtige Rolle. Durch die Titrationsversuche wurden diese Faktoren für die vorherrschenden Versuchsbedingungen optimiert.

Zur Auswertung der *Zytokinproduktion mittels ELISA* akkumulieren die Zytokine für die Dauer der Inkubation im Überstand. Die Menge errechnet sich also aus dem Integral über der Inkubationszeit. Damit sind quantitative Aussagen über die Zytokinproduktion möglich, jedoch nicht über den zytokinproduzierenden Zelltyp aus dem stimulierten PMNZ-Gemisch. Auf diese Weise können zum Beispiel IFN- γ produzierende Monozyten, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen die Ergebnisse verfälschen, zumal PMA und Ionomycin keine T-Zell-spezifischen Stimulanzen sind. Für die Versuche wurden kommerziell erworbene, standardisierte ELISA-Platten mit Reagenzien und Standardreihen verwendet. Die Experimente wurden nach dem

empfohlenen Prinzip als Doppelbestimmungen unter einheitlichen und reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt.

Bei der *intrazellulären Zytokinfärbung* handelt es sich um eine semiquantitative Methode, bei der diejenigen Zellen einzeln erfasst werden, die für das angefärbte Zytokin zu einem bestimmten Zeitpunkt positiv sind. Durch eine gleichzeitige Anfärbung der kennzeichnenden Oberflächenepitope können diese Zellen phänotypisch charakterisiert werden.

Dabei beeinflussen Färbung und Auswertungsprozedur das Endergebnis. Laut Jung et al erhöht Paraformaldehyd die Autofluoreszenz der Zellen [49]. Ähnliches wurde bei den hier durchgeführten Versuchen für Saponin in Form einer Verschiebung der Negativkontrollen beobachtet.

Nach der Färbung wurden die Zellen am FACSCalibur gemessen. Schwellenfluoreszenz-, Detektoren-, Gate- und Quadranteneinstellungen stellen bei der Auswertung zu optimierende Variablen dar, so dass die Vergleichbarkeit mit anderen Studien eingeschränkt sein könnte.

Als Aktivierungsmarker der intrazellulären Färbung wurde ein Antikörper gegen CD69 verwendet. CD69 ist das früheste Glykoprotein nach Aktivierung von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen, das auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Expression von CD69 wird durch die Aktivierung der Proteinkinase C induziert [58] und ist damit ein geeigneter Indikator für die Zellstimulation mit PMA und Ionomycin. Außerdem zeigt CD69 eine gesteigerte Zytokinproduktion an [82].

Bei der *Auswertung der Ergebnisse* aus ELISA und intrazellulärer Färbung wurde zur Gruppeneinteilung der steigende Anteil an $CD4^+CD45RA^+$ -Zellen des Vollbluts gewählt. Diese Zellpopulation zeigt eine fortschreitende, Thymus-abhängige Regeneration an und erhöht dadurch die Vergleichbarkeit der einzelnen Messwerte innerhalb einer Gruppe. Wie auch in Abbildung 9, unter 3.3.4.1. ersichtlich, produzieren diese Zellen hauptsächlich IL-2. Mit steigendem $CD4^+CD45RA^+$ -Anteil nimmt folglich die IL-2-Produktion zu. Die Gruppeneinteilung beeinflusst damit das Endergebnis.

Der rein zeitliche Verlauf der Zytokinproduktion, wie unter 3.2.4. dargestellt, ist

unabhängig von dieser Verfälschung, berücksichtigt jedoch nicht die hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs individuell sehr unterschiedliche Immunrekonstitution.

Zur *statistischen Datenauswertung* wurden die Kovarianzanalyse und die Regressionsanalyse durchgeführt.

Die Normalverteilung der Grundgesamtheit sowie die Homogenität der Varianzen waren dabei als Voraussetzungen erfüllt. In der Regressionsanalyse war zudem die einseitige Abhängigkeit der Variablen gegeben. Die Balanzierung in der Varianzanalyse war bei teilweise differierenden Stichprobenumfängen nicht immer vollständig erreicht. Die gewählten statistischen Verfahren analysierten die Ergebnisse treffend.

Mögliche Störgrößen der Experimente, wie zum Beispiel das Alter des Patienten, die Konditionierung oder die Menge der transplantierten Zellen, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Immunrekonstitution

4.2.1.1. Regeneration der NK-, B- und T-Zellen

Ein schnelles *Engraftment* nach T-Zell-depletierter, allogener PBSZT war bei den untersuchten Patienten mit einer absoluten Neutrophilenzahl (ANZ) größer als 500/ μ l nach 12 Tagen (Streubereich 8-24) trotz HLA-Disparitäten möglich. Dies bestätigen zum Beispiel auch Aversa et al. [8] für ein erwachsenes Patientenkollektiv. Im Vergleich zu KMT ist das Engraftment bei PBSZT schneller [18,53,84,89].

In der vorliegenden Studie trat eine Normalisierung der *NK-Zellzahlen* im frühesten Beobachtungszeitraum, d. h. 0-2 Monate nach SZT ein. Analog hierzu wurden nach HLA-identer allo-PBSZT [81] sowie nach Haplo-PBSZT [8] für NK-Zellen nach ca. 1 Monat Normwerte gefunden. Nach KMT verlief die NK-Regeneration vergleichbar ab [77]. Diese schnelle NK-Regeneration lässt sich eher auf eine Differenzierung

transplantiertes Vorläuferzellen zu NK-Zellen als auf eine Expansion reifer NK-Zellen des Transplantats zurückführen [93].

Für die Immunrekonstitution ist außerdem die NK-Alloreaktivität von Bedeutung. Die KIR (Killer inhibitorische Rezeptoren) der NK-Zellen erkennen körpereigene HLA-Klasse I-Moleküle. Dadurch wird eine Aktivierung der NK-Zellen verhindert. Erkennen im Rahmen der Transplantation die NK-Zellen des Spenders die „fremden“ MHC-Klasse I-Moleküle der Empfänger-Zielzellen nicht, werden die NK-Zellen aktiviert und lysieren die Zielzellen. Sind verbleibende Tumorzellen, vor allem bei myeloischen Leukämien, Targetzellen der Lyse, bezeichnet man dies als Graft-versus-tumor Effekt [13,56]. Eine GVHD wird dennoch nicht begünstigt, da die NK-Zellen hauptsächlich auf Zellen der Hämatopoese wirken und das Gewebe keine Liganden für aktivierte NK-Zellen zu haben scheint [93]. Die Entstehung einer GVHD kann über die Sezernierung von TGF- β durch NK-Zellen sogar verhindert werden [27,69,72,93,115].

Eine KIR-Liganden-Inkompatibilität kann vor allem bei der haploidenten SZT im Gegensatz zur UD-KMT die Gefahr einer GVHD und eines Rezidivs, aber auch die einer Transplantatabstoßung reduzieren, wofür wahrscheinlich die Höhe der Stammzellendosis, die ausgeprägte T-Zell-Depletion und die fehlende Immunsuppression verantwortlich sind [23,94].

Die Frage nach der Funktionsfähigkeit der regenerierten NK-Zellen bleibt in der vorliegenden Studie unberücksichtigt. Von Pavletic et al [81] wird im Gegensatz zu anderen Studien eine reduzierte Zytotoxizität der NK-Zellen beschrieben.

Die **B-Zellen** stiegen in der vorliegenden Studie im Zeitraum 0-2 Monate nach Haplo-SZT, bzw. 2-4 Monate nach UD-SZT auf über 100/ μ l an.

Für erwachsene Patienten fanden sich nach Pavletic et al [81] noch ein Jahr, nach Rondelli et al [90] bis 6 Monate nach alloPBSZT erniedrigte CD19⁺ Zellzahlen in Abhängigkeit von der Grunderkrankung. Verglichen mit KMT beschreiben Öttinger et al [77] für alloPBSZT höhere CD19⁺B-Zellzahlen.

Die Funktionalität der B-Zellen ließe sich anhand der Ig-Produktion bestimmen, worauf jedoch in der vorliegenden Arbeit verzichtet wurde. Nachbaur et al [73] beschreiben

nach autologer, CD34⁺ angereicherter PBSZT bei normalisierten B-Zell-Zahlen noch bis zum 6. Monat nach Transplantation erniedrigte IgM- und IgA-Konzentrationen. Es besteht vermutlich neben dem T-Zell-Funktionsdefekt auch eine mangelnde Funktionsfähigkeit der B-Zellen.

Die **T-Zellzahlen** regenerierten auf Werte im unteren Normbereich 8 Monate nach Haplo-SZT und 9-10 Monate nach UD-SZT. Die Anzahl der CD8⁺ Zellen erreichte nach Haplo-SZT ca. ab dem 6. Monat, nach UD-SZT nicht im Beobachtungszeitraum von 10 Monaten den unteren Normbereich. Die CD4⁺ Zellzahlen normalisierten sich nach UD-SZT gegen Ende des Beobachtungszeitraums und lagen nach Haplo-SZT auch nach einem Jahr unter der Norm.

Heitger et al [44] beobachteten bei pädiatrischen Patienten nach autologer, CD34⁺-angereicherter PBSZT eine Normalisierung der T-Zell-Zahlen nach 6-9 Monaten, der CD4⁺ Zellen nach 6 Monaten und der CD8⁺ Zellen nach 3-6 Monaten. Die Regeneration war also insgesamt schneller. Bei erwachsenen Patienten hingegen fanden sich 6 Monate nach allogener CD34⁺-angereicherter PBSZT noch deutlich reduzierte CD3, CD4 und CD8-Zellzahlen [11]. Im Vergleich dazu waren die Zellzahlen in der vorliegenden Studie 6 Monate nach Haplo-SZT deutlich höher, 6 Monate nach UD-SZT geringer.

Der Gedächtnis-Phänotyp dominierte bei den CD4⁺ Zellen bis 10, bei den CD8⁺ Zellen bis 8 Monate nach SZT. Naive CD45RA⁺ T-Zellen erreichten Normwerte von >52% für Kinder [43] frühestens ab 10 Monaten nach Transplantation. Auch hier ist also im Einklang mit anderen Studien [43,91] die erste Welle der T-Zell-Rekonstitution Thymus-unabhängig und als periphere Expansion zu interpretieren. Der in Abbildung 3 exemplarisch dargestellte CD45RA/RO-Shift repräsentiert in charakteristischer Weise die Regeneration nach Transplantation [27,45]. Früh nach Transplantation wird mit einem Überwiegen des Gedächtnistyps die Thymus-unabhängige, periphere Expansion von T-Zellen des Transplantats widerspiegelt, später sind die hauptsächlich naiven CD45RA⁺ T-Zellen Zeichen der Genese neuer T-Zellen im Thymus.

Die CTL im engeren Sinne, d.h. die CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ Zellen erreichten schon im

frühen Beobachtungszeitraum Normwerte gesunder Erwachsener ohne erkennbaren Trend im weiteren Verlauf.

Das Verhältnis von $TZR\alpha\beta$ zu $TZR\gamma\delta$ als Bestandteile des T-Zell-Rezeptors entsprach schon zu Beginn der Regeneration mit ca. 95% zu 5% dem gesunder Personen [44].

Die CD28-Expression repräsentiert T-Zellen, die durch die Interaktion mit dem CD80/CD86-Rezeptor auf APCs kostimuliert werden können [105]. Sie ist für die klonale T-Zell-Expansion unabdingbar [48]. Der hauptsächliche Anteil der T-Zellen im Vollblut Gesunder ist für CD28 positiv. Dagegen war die Expression bei den hier erhobenen Daten bezüglich beider Transplanationsformen im Vergleich zur Norm reduziert. Dies wurde auch von Storek et al [105] für die ersten 7 Monate nach alloPBSZT beobachtet.

CD62L entspricht L-Selektin, einem Adhäsionsmolekül naiver B- und T-Zellen zur Interaktion mit lymphatischem Gewebe [39]. Es wird mit CD45RA koexprimiert. Ein Verlust von L-Selektin auf der Zelloberfläche stellt bei T-Zellen jedoch auch ein Zeichen der Aktivierung dar [42]. Die früh nach SZT erniedrigte *CD62L-Expression* zeigte insbesondere nach SZT mit Fremdspendern einen allmählichen Anstieg parallel zur zunehmenden Expression von CD45RA (s. Ta-belle 4). Diese Entwicklung wurde auch von Heitger et al [43] beobachtet.

Der Aktivierungsmarker *HLA-DR* [11,42,69] war zu frühen Zeitpunkten nach beiden Transplantationsformen im Vergleich zur altersentsprechenden Norm von 9-12,5% [42] deutlich hochreguliert und nahm dann sukzessiv ab. Es zeigte sich damit eine von Nachbaur et al. [73] beschriebene Kinetik nach autologer CD34⁺-angereicherter PBSZT bei Erwachsenen. Nach Lowdell et al [60] betrifft diese Entwicklung der HLA-DR-Expression vor allem CD8⁺ Lymphozyten. Darin spiegelt sich die Wechselwirkung zwischen dem Immunsystem des Spenders und dem allogenen Empfängerorganismus beim Aufbau peripherer Toleranzmechanismen wieder.

4.2.1.2. Einflussfaktoren auf die Regeneration der Lymphozyten

Bei der Beurteilung der Immunrekonstitution müssen insbesondere Transplantationsmodi, Immunstatus des Empfängers, GVHD, zugrundeliegende

Erkrankung, Alter und Geschlecht des Empfängers und des Spenders berücksichtigt werden. Diesen Einflussfaktoren soll im Folgenden Rechnung getragen werden.

Bezüglich der *verschiedenen Transplantationsformen* ist die Lymphozyten-Rekonstitution nach *unselektionierter* alloPBSZT schneller als nach alloKMT [18,81,84,90,105]. Die CD4⁺ Zellzahlen (CD45RA⁺ und CD45RO⁺) sind bei alloPBSZT im Vergleich zu alloKMT signifikant höher. Dies deckt sich mit der stärkeren und prolongierten CD4-Depression nach KMT [31,61,112]. Die CD8⁺ Zellen regenerieren bei beiden Transplantationsformen ähnlich. Nach KMT und in der unmittelbaren Posttransplantationsphase nach PBSZT ergibt sich eine Inversion der CD4/CD8-Ratio [31,55,61,112], zu späteren Zeitpunkten nach SZT liegt die CD4/CD8-Ratio über 1 [53]. Der HLA-DR-Prozentsatz als Aktivierungsmarker ist nach KMT und alloPBSZT dauerhaft erhöht [27,31,61,69], wie auch bei den unter 3.1.3. dargestellten Ergebnissen zu beobachten war. Storek et al [105] beobachteten eine erniedrigte Infektionsrate infolge der erhöhten Zellzahlen nach SZT im Vergleich zu KMT. Der ebenfalls erhöhte GVL-Effekt bei der alloPBSZT aufgrund der höheren T- und NK-Zellzahlen im Transplantat stellt einen weiteren Vorteil dieser Transplantationsform verglichen mit der KMT dar [35]. Körbling et al [53] geben in ihrer Metaanalyse der alloPBSZT im Vergleich zur KMT mit einem längeren erkrankungsfreien Zeitraum den Vorzug.

Die T-Zell-Depletion und die Anreicherung von CD34⁺ Stammzellen gewannen als GVHD-Prophylaxe zunehmend an Bedeutung unter Rekrutierung HLA-gematchter Fremdspender oder verwandter Spender mit HLA-Mismatches [60].

Die Auswirkungen der *T-Zell-Depletion* auf die Immunrekonstitution werden kontrovers diskutiert [65]. Sie bewirkt zum einen durch die fehlende Immunsuppression nach PBSZT eine homöostatische Expansion der T-Zellen im Transplantat. Erwiesen ist auch eine Reduzierung des Schweregrades der GVHD. Diese Faktoren begünstigen eine regelrechte Immunrekonstitution. Dem gegenüber ist die Erholung des Immunsystems durch die geringe Anzahl der transplantierten T-Zellen mit dem Effekt eines reduzierten TZR-Repertoires beeinträchtigt [8,44,91,115]. Dies führt zu einer erhöhten

Infektionsrate mit letalem Ausgang [60], hervorgerufen zum Beispiel durch eine Reaktivierung persistierender Herpes- oder Adenoviren [68,59], und zu einem geringeren GVL-Effekt [3] mit potentiell höherem Rezidiv-Risiko. Bei dieser Transplantationsform erschienen bei erwachsenen Patienten nach Rufer et al [92] die ersten naiven T-Zellen nach 6 Monaten. Erst 2 Jahre nach SZT glich sich in dieser Studie das CD45RA/RO-Verhältnis des Empfängers dem des Spenders an. Im direkten Vergleich beobachteten Müller et al [71] ähnliche Regenerationsmuster für unmanipulierte und T-Zell-depletierte Transplantate.

Körbling et al [53] machen die erfolgreiche HLA-nichtidente PBSZT vom Konditionierungsregime und vom Zellgemisch des Transplantats mit einer *maximalen CD34-Zellzahl* (im Median 10×10^6 /kg) und einer *minimalen CD3-Zellzahl* (im Mittel 3×10^4 /kg) abhängig. Auch nach Reisner et al [88] bewirkt erst die Anreicherung haematopoetischer Vorläuferzellen, entsprechend dem „Mega-dose“-Konzept, eine Toleranzinduktion bei mehreren HLA-Mismatchen. Sie ist daher der Schlüssel zu einer erfolgreichen Transplantation ohne die Entwicklung einer GVHD. Martinez et al [65] stellten jedoch bei Erwachsenen für die *CD34⁺angereicherte* allo-PBSZT im Vergleich zur unmanipulierten PBSZT eine langsamere Erholung der CD3-Zellzahl mit erniedrigten CD4⁺ [31,68,73], CD4⁺CD45RA⁺ und TZRγδ⁺ Zellzahlen und einer niedrigen CD4/CD8-Ratio fest. Behringer et al [11] hingegen beobachteten bei erwachsenen Patienten zwischen CD34⁺ selektionierter und unselektionierter alloPBSZT keine wesentlichen Unterschiede in der CD3, CD4, CD8-Regeneration.

Der *Verwandtschaftsgrad des Transplantats* mit dem Empfänger wirkt sich ebenfalls auf die Regeneration aus. Nach Haplo-SZT regenerieren die Lymphozyten schneller als nach UD-SZT, was nach derzeitigen Modellvorstellungen wesentlich durch die höhere Zellzahl des Transplantats mitverursacht wird. Entsprechend beobachteten Small et al [102] bei Kindern in der Frühphase nach unverwandter T-Zell-depletierter KMT signifikant reduzierte CD3 und CD8-Zellzahlen verglichen mit HLA-gematchter verwandter KMT. Die höhere Inzidenz opportunistischer Infektionen wird dabei auf die intensivierte Immunsuppression bei Mikro- und Makro-HLA-Disparitäten zurückgeführt. Beelen et al [10] fanden bei PBSZT keine signifikanten Unterschiede in

der Regeneration zwischen HLA-identer, nicht verwandter und nicht-identer Verwandten-Spende. Mit Zunahme der HLA-Disparitäten steigt jedoch die Gefahr der GVHD und des Transplantatversagens [3,7,52,68,99]. Für letzteres sind Antikörper gegen Spenderzellen oder überlebende Lymphozyten des Empfängers mit zytolytischer Funktion verantwortlich. Bei Patienten mit SCID, bei denen aufgrund des kongenitalen Immundefekts diese Risiken weniger ausgeprägt sind, wirkten sich HLA-Disparitäten auf Rekonstitution und intrathymische Reifung der T-Zellen nicht negativ aus [16,71]. Bei einer größeren Anzahl an Mismatches stellen lymphoproliferative Störungen der B-Zellen ein weiteres Risiko dar [36]. Sie treten in Anwesenheit von EBV und einer T-Zell-Dysfunktion auf und enden häufig mit letalen Komplikationen.

Die *Grunderkrankung* beeinflusst laut Rondelli et al [90] nach unmanipulierter alloPBSZT insbesondere die CD4-Zellzahl. Hier zeigte sich eine schnellere Regeneration nach Multiplem Myelom im Vergleich zu AML oder CML. In den im unter 3.1. durchgeführten Untersuchungen war insbesondere die erhöhte Geschwindigkeit der Regeneration einzelner Patienten mit nichtmaligner gegenüber Patienten mit maligner Grunderkrankung auffallend. Das kleine Patientenkollektiv dieser Studie erlaubte jedoch keine krankheitsspezifische Untergruppenanalyse.

Ebenfalls von Bedeutung ist der *CMV-Serostatus* des Patienten. Ein positiver Befund führt zu einer höheren CD8⁺ Zahl und einer erhöhten HLA-DR-Expression [11].

Wie in der Einleitung unter 1.3. erläutert, findet die *T-Zell-Regeneration* nach Transplantation auf zwei Wegen statt [44,63,71,92] – Thymus-abhängig und Thymus-unabhängig. Daher ist die *Thymusfunktion*, die vom *Alter des Empfängers* aber auch von der Konditionierung abhängt, ein wichtiger Einflussfaktor für den Beginn und die Qualität der Regeneration [27,28,43,44].

Bei Kindern findet eine schnelle Thymus-abhängige Regeneration von naiven CD45RA⁺ CD4-Zellen statt, die zu einem raschen Erlangen von Immunkompetenz führt. Bei erwachsenen Empfängern hingegen verläuft die Rekonstitution deutlich langsamer [102]. Bei Erwachsenen dominiert bei weitgehender Thymus-Involution die *periphere Expansion* von T-Zellen. Weitere Kennzeichen der peripheren Expansion sind ein eingeschränktes T-Zell-Rezeptor-Repertoire [63,102], eine reduzierte CD4-

Zellzahl mit erhöhter Gefahr lebensbedrohlicher Infekte, ein Überwiegen von CD4-Zellen des Gedächtnis-Typs sowie eine verzögerte CD4⁺CD45RA⁺-Rekonstitution [81]. Die CD8-Zellzahl wird meist wiederhergestellt, da die CD8⁺CD45RA⁺-Zellen auch Thymus-unabhängig regenerieren können [44,62]. Die Zusammensetzung der CD8-Untereinheiten ist jedoch verändert [63]. Diese Unterschiede in der CD4 und der CD8-Regeneration münden in eine prolongierte Imbalance des Immunsystems transplantierter Erwachsener. Die Normalisierung der T-Zell-Funktion ist von der quantitativen Regeneration unabhängig, aber ebenfalls verzögert [63].

Auch das *Alter des Stammzell-Spenders* ist nach Hirayama [47] am Gelingen der Transplantation beteiligt. Diese Arbeitsgruppe beobachtete am murinen Modell mit Abnahme des Spenderalters signifikant erhöhte Überlebensraten und eine stärkere Antwort der Zellen auf Mitogenstimulation.

Das *Konditionierungsregime* beeinträchtigt durch Gewebedefekte das T-Zell-Homing in peripheren lymphatischen Geweben und damit die periphere Expansion [115] und bewirkt zusätzlich durch Beeinträchtigung des Thymus eine langsamere Langzeiterholung [69] der CD4⁺CD45RA⁺-Zellzahl [71].

Der Einfluss von *G-CSF* nach Transplantation auf die Regeneration wird unterschiedlich beurteilt. Nach Volpi et al [115] waren die CD4-Zellzahlen bei Verzicht auf G-CSF nach Transplantation signifikant höher. Heitger et al [44] beschreiben hingegen einen Anstieg der T-Zellzahlen nach Gabe von G-CSF. Die Patienten der vorliegenden Studie wurden alle mit G-CSF nachbehandelt (s. 2.1.1).

Die *GVHD-Prophylaxe* übt ebenfalls einen Einfluss auf die Immunrekonstitution aus [11]. So bewirken Steroide eine Hemmung der TH1-Zytokin-Produktion. Prednison kann außerdem Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten induzieren [65]. Aufgrund der ausgedehnten T-Zell-Depletion wurde bei den Patienten dieser Studie auf eine medikamentöse Immunsuppression verzichtet.

Die *GVHD* führt zu einer Immundefizienz [61,102,106]. Manche Autoren stellen im Verlauf eine reduzierte CD3-Zellzahl [31,90] fest, andere konstatieren keine signifikanten Unterschiede in der Regeneration der T-Zellen [102]. Teilweise wird eine reduzierte CD4/CD8-Ratio geschildert [31,55,63].

Für die Entstehung der GVHD ist eine bestimmte T-Zell-Schwellendosis [7,103] im Transplantat nötig. Diese ist bei Fremdspendern und dem Vorliegen von HLA-Mismatches [8] wesentlich niedriger. Deshalb wurde hier als GVHD-Prophylaxe eine ausgeprägte T-Zell-Depletion durchgeführt. Bei unselektionierter PBSZT sind im Vergleich zur KMT mehr T-Zellen im Inoculum enthalten. Die Inzidenz der aGVHD ist nach Aussage vieler Autoren dennoch nicht erhöht [18,25,35,54,84,86], wohl aber die Rate an cGVHD [25,111]. Hier spielen GVHD-Risikofaktoren wie Intensität der Konditionierung, GVHD-Prophylaxe, Grunderkrankung, Viren-Serologie, Alter und Geschlecht des Patienten und HLA-Mismatches eine große Rolle [22,29,38,61,86,106]. G-CSF, das bei der PBSZT für die Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark verwendet wird, bewirkt über eine Interaktion mit Monozyten und dendritischen Zellen, aber auch direkt über den G-CSF-Rezeptor auf T-Zellen eine TH2-Antwort und führt im Rahmen seines immunregulatorischen Effekts zu einer niedrigen Inzidenz von akuter GVHD [33,53].

4.2.2. Zytokinsynthese und Messung mit ELISA

Statistisch zeigte sich für IL-2 im Gegensatz zu IFN- γ eine eindeutige Abhängigkeit der Zytokinsynthese vom Anteil naiver CD4⁺ Zellen.

Insgesamt fiel bei der Auswertung der Messwerte die noch deutlich reduzierte Zytokinsynthese ein Jahr nach Transplantation auf. Sie betraf alle erfassten Zytokine. IFN- γ wurde kurz nach Transplantation am stärksten synthetisiert, fiel wieder ab und näherte sich dann am stärksten den Kontrollwerten an. Dieser frühe IFN- γ -Peak ist nach Hanen-berg et al. die Folge einer Immunaktivierung nach Konditionierung und Engraftment [41].

Eine reduzierte IL-2 und IL-10-Synthese wurde auch nach allogener KMT beschrieben, wobei IL-4 hier keine Unterschiede zur Kontrolle zeigte [54]. Ähnliche Beobachtungen machten Guillaume et al [37] sowohl nach KMT als auch nach unselektionierter autologer PBSZT. Hier traten eine defiziente IL-2-Produktion bis zu 6 Monate nach Transplantation, eine reduzierte IL-10-Konzentration und eine IL-4-Produktion im Normbereich auf. Auch Proliferationsassays mit Mitogenen deuteten auf eine reduzierte

B- und T-Zell-Funktion bis mindestens $\frac{1}{2}$ Jahr nach Transplantation hin. Dieser Effekt war nach $CD34^+$ angereicherter SZT ausgeprägter als nach unselektionierter PBSZT [73].

Dies wirft die folgenden Fragen auf:

Welche Zellen sind für die Zytokinsynthese verantwortlich?

Wie groß ist der Anteil der Gedächtnis-Zellen und der naiven, wie die Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen bei der Zytokinproduktion?

Um dies zu klären, wurde den Experimenten die intrazelluläre Färbung der zytokinproduzierenden Zellen angeschlossen, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.2.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Wie unter 3.3.4.1. und Abbildung 9 näher erläutert, produzierten sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ Lymphozyten die hier untersuchten Zytokine. Dabei überwogen immer die $CD4^+$ Zellen in der Zytokinsynthese.

Von den $CD4^+$ Zellen wurde hauptsächlich IL-2 synthetisiert. Im Vergleich dazu produzierten nur halb so viele $CD4^+$ Lymphozyten IFN- γ .

Dagegen synthetisierte der größte Anteil $CD8^+$ Zellen IFN- γ^+ . Geringfügig weniger $CD8^+$ Lymphozyten produzierten IL-2.

Ein nur sehr geringer Anteil beider T-Zell-Subpopulationen war für die TH2/TC2-Zytokine positiv.

Während die IL-2⁺ Lymphozyten zu ungefähr gleichem Anteil aus $CD45RA^+$ und $CD45RO^+$ Zellen bestanden, dominierten bei den IFN- γ -Lymphozyten die $CD45RO^+$ Zellen. Auch für die TH2-Zytokine war ein Überwiegen der $CD45RO^+$ Lymphozyten in der Zytokinproduktion festzustellen. Statistisch fiel eine eindeutige Abhängigkeit der IL-2-Produktion vom Anteil $CD4^+CD45RA^+$ Zellen auf.

Andere Arbeitsgruppen [19,57,82,98,116] stellten ebenfalls ein deutliches Vorherrschen der TH1-Zytokine fest, während die TH2-Zytokine nur von einem geringen Anteil der Zellen produziert wurden [19,49,57,80,114].

In den Prozentangaben für zytokinpositive Zellen divergieren andere Studienergebnisse

deutlich. $CD4^+$ T-Zellen des peripheren Bluts gesunder Kontrollpersonen waren zu ca. 15 % [57] bis hin zu über 40 % [19,116] IL-2-positiv. Der Anteil der $CD4^+$ unter den IL-2⁺ Lymphozyten war bei Chalmers et al [17] mit 75 % vergleichbar mit den unter 3.3.4.1. beobachteten Ergebnissen. Unterschiedliche Aussagen finden sich in der Literatur bezüglich des Verhältnisses von $CD45RA^+$ zu $CD45RO^+$ Zellen unter den IL-2⁺ Lymphozyten. Während Akbar et al [2] ein Überwiegen von $CD45RA^+$ Zellen konstatieren, findet sich bei Zhang et al [116] und Chipeta et al [19] keine Korrelation zu $CD45RA$. Mascher et al [67] und Chalmers et al [17] beschreiben sogar ein Überwiegen von $CD45RO$ unter den IL-2-produzierenden Zellen.

In allen Studien war in der $CD4^+$ Population der Anteil der $IFN-\gamma^+$ Zellen gegenüber IL-2 teils geringfügig [57], meist deutlich [19,116] niedriger.

Auch unter den $CD8^+$ Zellen ließ sich eine Diskrepanz der Prozentangaben feststellen. $IFN-\gamma$ wird übereinstimmend mit dem größten Anteil von $CD8^+$ Zellen synthetisiert und dominiert meist deutlich über die IL-2-Produktion [19,50,58,82].

Das Überwiegen der $CD45RO^+$ Zellen in der $IFN-\gamma$ -Synthese war analog zu anderen Studien [2,17,19,67].

Die *TH2-Zytokine* werden laut Schauer et al. [98] hauptsächlich von Gedächtniszellen synthetisiert. In der Produktion des TH2-Zytokins *IL-4* dominierten in weiteren Studien [2,17] wie auch in den unter 3.3.3.4.2. geschilderten Ergebnissen die $CD45RO^+$ Zellen.

Die Zytokinproduktion durch naive $CD45RA^+$ Zellen erfordert eine Stimulation mit hohen Mitogenkonzentrationen, eine starke Kostimulation und eine lange Stimulationsdauer. So synthetisieren die $CD4^+CD45RA^+$ Zellen nach Stimulation primär hauptsächlich IL-2 [2,67,98]. Dies steht im Einklang zu der hier beobachteten eindeutigen Abhängigkeit der IL-2-Synthese vom Anteil naiver $CD4^+$ Zellen (s.a. 3.3.4.3.2). Erst nach längerer Inkubationsdauer kommt es laut Schauer et al [97] zur sequentiellen Produktion von $IFN-\gamma$ mit einem Maximum nach 72 Stunden. Dadurch lässt sich die Beobachtung (3.3.4.3.1.) einer nur geringen Beteiligung $CD45RA$ -positiver T-Zellen an der $IFN-\gamma$ -Synthese unterstützen. Dagegen kann bei den ELISA-Experimenten mit 72-stündiger Stimulationsdauer die $CD45RA^+$ Population zu höheren

IFN- γ -Konzentrationen im Überstand beitragen.

CD4⁺CD45RO⁺ Zellen sind zur TH1- und TH2-Zytokinsynthese befähigt, wenn auch der Schwerpunkt auf der IFN- γ und IL-4-Produktion liegt [82]. Dies ist kongruent mit den Beobachtungen unter 3.3.4.3.1.. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen und zu den obigen Aussagen bezeichnen Mascher et al [67] diese T-Zell-Untereinheit als Hauptproduzenten für IL-2.

Vergleichbar mit der CD4⁺ Subpopulation produzieren nach Hamann et al. [39] die naiven CD8⁺ Zellen hauptsächlich IL-2, während die CD8⁺ Gedächtniszellen sowohl TC1- als auch TC2-Zytokine entsprechend dem TH1/TH2-Zytokinmuster sezernieren.

Nach der Transplantation war die Zytokinproduktion deutlich verändert.

Primär fiel die eingeschränkte Aktivierungsfähigkeit der PMNZ, charakterisiert durch eine reduzierte Anzahl CD69-exprimierender Zellen, auf. Außerdem wurde der Anteil der zytokinproduzierenden Zellen, verglichen mit der gesunden Kontrolle für die TH1-Zytokine, auch in Gruppe 3 (im Median über 300 Tage nach Transplantation) nicht erreicht. Diese Beobachtungen weisen auf eine funktionelle Defizienz der regenerierenden Zellen unabhängig von der quantitativen Immunrestitution hin. Auch von Heitger et al. [46] wurde eine reduzierte Aktivierbarkeit anhand eines geringen Anteils CD69-exprimierender Zellen beobachtet. Diese mangelnde Funktionsfähigkeit betraf in der zitierten Studie sowohl die aktivierten Gedächtniszellen als auch die frisch generierten naiven T-Zellen. Mögliche Ursachen für die Defizienz werden unter 4.2.4. der Diskussion näher beleuchtet. Heitger et al [46] fanden außerdem einen erhöhten Hang der Lymphozyten zur Apoptose, insbesondere die CD4⁺CD45RA⁺ T-Zell-Untereinheit betreffend. Zusätzlich wird eine mangelnde Aktivierung der MAP(Mitogen-aktivierte-Proteine)-Kinasen diskutiert. Der erniedrigte Anteil CD69-exprimierender Lymphozyten legt zudem einen Defekt in der Signaltransduktion bei der Stimulation der Zellen nahe. Mackall, C. L. et al [63] untermauern diese Hypothese mit der Beobachtung eines Defektes in der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion nach KMT. Wahrscheinlich ist, dass es sich um ein Zusammenspiel von Faktoren handelt, die die

funktionelle Defizienz der regenerierenden Zellen verursachen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse unter 3.3.4.1. war ein hoher Anteil an IFN- γ^+ Zellen in der frühen Phase nach Transplantation, insbesondere unter den CD4 $^+$ Zellen, bemerkenswert.

Bei den zytokinproduzierenden Zellen überwog der CD8 $^+$ Anteil, verglichen mit CD4 $^+$ zu Beginn der Regeneration (Gruppe 1). Im weiteren Verlauf der Rekonstitution nahm der Anteil der CD4 $^+$ Zellen an der Zytokinsynthese zu. Zu Beginn prädominierten CD45RO $^+$ Zellen in der Produktion aller untersuchten Zytokine, während die CD45RA $^+$ Zellen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz zur Zytokinsynthese beitrugen. Dies lässt sich durch die Gruppeneinteilung anhand des steigenden CD4 $^+$ CD45RA $^+$ -Anteils im Vollblut teilweise erklären. Schon in der Gruppe 2 überwogen die CD45RA $^+$ Zellen unter den aktivierten Zellen stärker als bei den Kontrollzellen. Deshalb spiegeln diese Beobachtungen wahrscheinlich die periphere Expansion der reifen T-Zellen früh nach Transplantation wider, die außerdem für die Prädominanz von IFN- γ in Gruppe 1 verantwortlich sein könnten.

Die TH2/TC2-Zytokine erreichten schon früh nach Transplantation höhere Werte als bei der Kontrolle, nahmen aber mit Fortschreiten der Regeneration wieder ab. Dies könnte auf ein frühes TH1/TH2, bzw. TC1/TC2-Ungleichgewicht hinweisen. Für die Toleranzinduktion nach T-Zell-depletierter Stammzelltransplantation über HLA-Grenzen hinweg scheint eine TH1 \rightarrow TH2-Verschiebung keine wesentliche Rolle zu spielen. Statt dessen müssen hierbei andere Faktoren wie transplantierte T-Zelldosis, periphere Toleranzmechanismen und negative Selektion bei der Generierung naiver T-Zellen im Thymus verantwortlich gemacht werden.

Über die Charakterisierung der zytokinproduzierenden Zellen nach Transplantation mittels intrazellulärer Färbung konnten wenige Daten in der Literatur gefunden werden. Für die Immunrekonstitution nach autologer Transplantation wurde eine defiziente IFN- γ -Synthese beschrieben, die sich nach einem Jahr normalisiert hatte. Die Synthese der TH2-Zytokine IL-4 und IL-10 blieb dabei unter 2% [100].

CD4 $^+$ CD45RA $^+$ T-Zellen des Nabelschnurbluts zeigen, verglichen mit derselben Subpopulation im Blut Erwachsener, trotz gleichen Phänotyps funktionelle

Unterschiede hinsichtlich des Zytokinprofils aber auch der zytotoxischen Aktivität [19]. Laut Delespesse et al zeigen neonatale $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen eine größere Unreife als die adulten mit anderen Aktivierungsbedingungen. Die TH1-Zytokinproduktion nach erstem Antigenkontakt ist jedoch vergleichbar hoch [24].

Unter der Vorstellung einer Rekapitulation der Ontogenese, zumindest im Rahmen der Thymus-abhängigen Regeneration nach Transplantation, könnte man sich analog hierzu die Unreife der regenerierenden T-Zellen vorstellen.

4.2.4. Ursachen der defizienten Zytokinproduktion

Für die defiziente Zytokinproduktion kommen mehrere Gründe in Betracht. Neben der *Methodik der Stimulation* haben *klinische Faktoren* einen Einfluss auf die regenerierenden Zellen.

Als Beispiel für die komplexen Auswirkungen der Therapie auf die Zellen sei *die G-CSF-Gabe* zur Mobilisierung der PBSZ vor und zur Beschleunigung der hämatologischen Regeneration nach Transplantation genannt. G-CSF übt einen direkten immunregulatorischen Effekt auf T-Zellen aus [99,115]. Durch eine Imbalance zwischen TH1 und TH2-Untereinheiten kommt es in vivo und in vitro zu einem Anstieg des TH2-Zytokins IL-4 und einer Abnahme von IFN- γ [101]. Eine TH1/TH2-Imbalance wird zusätzlich durch die Inhibition der jeweils anderen Subpopulation verstärkt [12].

Im Rahmen der T-Zell-Depletion des Transplantats können laut Heitger et al [46] Faktoren aus der PBSZ-Fraktion mit suppressiver Wirkung eine Dysfunktion von naiven und Gedächtnis-T-Zellen bewirken.

Nach Transplantation beeinflusst das Vorliegen einer *GVHD* das Zytokinmuster entscheidend [5,32,54,55,101], zumal die initiale Phase der aGVHD einer TH1-Antwort der $CD4^+$ Zellen mit erhöhtem IL-2 und reduziertem IL-10 entspricht [32,54]. Eine cGVHD geht mit stark erhöhtem IFN- γ und erniedrigtem IL-10 einher [55]. Dies ließe sich am ehestem mit den erhobenen Daten vereinbaren, zumal IFN- γ dasjenige Zytokin ist, welches sich nach Transplantation den Kontrollwerten am stärksten annähert, während IL-10 kaum nachweisbar ist. Die cGVHD war bei Patienten mit $CD34^+$ angereicherten Transplantaten jedoch selten.

Hinzukommend wirkt sich eine *therapeutische Immunsuppression* auf die Funktionsfähigkeit der T-Zellen aus. Darauf wurde jedoch bei dem vorliegenden Patientenkollektiv weitgehend verzichtet.

Da es sich bei den Zytokinen um Mediatoren des Immunsystems handelt, hängt deren Produktion ganz entscheidend vom Gesundheitszustand des Patienten ab. Beim Vorliegen einer *Infektion* ist ein verändertes Zytokinprofil nicht auszuschließen.

Eine defiziente Zytokinsynthese kann außerdem auf *zellulärer Ebene* begründet liegen. Störungen im Zellkontakt, wie zum Beispiel eine *CD28-B7-Ligandendysfunktion* mit der Folge einer *mangelnden Kostimulation*, können verursachende Faktoren sein. Die nachgewiesene Herabregulation von CD28 auf T-Zellen, wie sie auch bei den hier untersuchten Patienten in der frühen Regenerationsphase (3.1.3.) beobachtet wurde, unterstützt diese Hypothese [37]. Für Guillaume et al [37] stellen nach SZT eine reduzierte Transkription, eine Instabilität der Zytokin-mRNA oder eine defekte Translation mit reduzierter zytoplasmatischer Halbwertszeit des Polypeptidprodukts mögliche intrazelluläre Ursachen dar.

Grundsätzlich muss nach Swain et al [108] der Tatsache Rechnung getragen werden, dass, sowohl auf Zellpopulation als auch auf einzelne Zellen bezogen, ein sehr *heterogenes Zytokinmuster* der Effektorzellen vorliegt. Zudem hängt die Zytokinproduktion entscheidend von der *Entwicklungsstufe der T-Zellen* ab. So produzieren z. B. naive T-Zellen hauptsächlich IL-2 [2,96,107,108]. IL4 und IFN- γ werden dagegen vor allem von Gedächtniszellen hergestellt. Dadurch lässt sich, wie unter 3.2.4. ersichtlich, das frühe Maximum von IFN- γ in den ersten beiden Monaten nach Transplantation erklären. Für die IFN- γ -Produktion waren vermutlich peripher expandierende Populationen von Gedächtniszellen verantwortlich, während die naiven IL-2-produzierenden Zellen später in Abhängigkeit von der thymischen Reifung auftraten.

4.2.5. Vergleich der Ergebnisse aus intrazellulärer Zytokinfärbung und ELISA

Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus intrazellulärer Zytokinfärbung (IZF) und ELISA fielen vergleichbare Tendenzen auf. Bei den Kontrollzellen überwog nach IZF und ELISA übereinstimmend die IL-2-Produktion. IFN- γ war nach beiden Methoden das zweithäufigste Zytokin, während die TH2-Zytokinproduktion gering ausgeprägt

war. In der frühen Phase der Regeneration überwog sowohl in der IZF als auch im ELISA die IFN- γ -Produktion. In der Gruppe 2 wurde dagegen unter Anwendung beider Methoden hauptsächlich IL-2 synthetisiert. In Gruppe 3 divergierten die Ergebnisse. In der quantitativen Zytokinproduktion überwog die IFN- γ -Produktion, während in der IZF mehr Zellen IL-2⁺ als IFN- γ ⁺ waren. In der statistischen Analyse ließ sich bei beiden Versuchsreihen für IL-2 im Gegensatz zu IFN- γ eine eindeutige Abhängigkeit der Zytokinproduktion vom Anteil CD4⁺CD45RA⁺-Zellen feststellen.

Die TH2-Zytokine ließen sich sowohl in der IZF als auch im ELISA nur minimal nachweisen.

Aufgrund der unterschiedlich langen Stimulationsdauer der beiden Methoden konnten die Ergebnisse nicht direkt korreliert werden.

Aus den Messungen mittels ELISA war kein Anstieg aller betrachteten TH1- oder aller TH2-Zytokine ersichtlich, wie bei typischen TH1- bzw. TH2-Zellen zu erwarten wäre. Dies weist nicht darauf hin, dass die gleichen Zellen mehrere Zytokine produzieren. Unterstützt wird dieses Erklärungsmodell durch den geringen Anteil an doppelt positiven Zellen (IL-2⁺IFN- γ ⁺, Daten nicht dargestellt) in der intrazellulären Zytokinfärbung.

Bezüglich IL-2 war feststellbar, dass sich in der IZF von Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 der Anteil IL-2 produzierender Zellen verfünffachte, während die IL-2-Konzentration, gemessen im ELISA, um den Faktor 60 anstieg. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung liegt in der deutlichen Steigerung der IL-2-Produktion d. h. der Transkription und damit der Proteinbiosynthese in der Synthesephase des Zellzyklus der einzelnen Zelle. Nach Martin et al. [66] gründet dieser Effekt auf der positiven Rückkopplung von IL-2 auf die Zelle. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor triggert den Übergang der T-Zellen von der G1- in die Synthesephase.

Auch bei IFN- γ war die oben dargestellte Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus IZF und ELISA erkenntlich. Diesem Effekt können vergleichbare Mechanismen zugrunde liegen.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von CD34⁺ aufgereinigten, haematopoetischen Progenitorzellen aus dem peripheren Blut tritt zunehmend als kurativer Therapieansatz fortgeschrittener, maligner und nicht maligner Erkrankungen in den Vordergrund.

Zur Erweiterung des Spenderpools favorisieren jüngste Entwicklungen trotz des höheren Risikos eines Transplantatversagens und einer schweren GVHD die Transplantation über HLA-Grenzen hinweg. Die myeloablative Konditionierung des Empfängers sowie die ausgeprägte T-Zell-Depletion des Transplantats dienen zur Vorbeugung dieser schweren Komplikationen. Nach Transplantation entscheidet die *Regeneration des Immunsystems* über den weiteren Verlauf.

In der vorliegenden Studie wurden Lymphozyten von Patienten nach haploidenter, verwandter oder Fremdspender-PBSZT untersucht.

In der *phänotypischen Charakterisierung der Lymphozyten* mittels FACS-Analyse erreichten die *T-Zellen* nach frühestens 8 Monaten Konzentrationen im unteren Normbereich. Dabei zeigten die Lymphozyten nach haploidenter verglichen mit der Fremdspender-Transplantation dauerhaft höhere Zellzahlen bei ähnlichen Regenerationsraten. Der Phänotyp für Gedächtniszellen CD45RO⁺ überwog bis zu 12 Monate nach Fremdspender-, und bis zu 10 Monate nach verwandter, haploidenter Transplantation bei kontinuierlich ansteigenden naiven, CD45RA⁺ T-Zellen. Dies spiegelte die erste Welle der T-Zell-Regeneration, bestehend aus Thymus-unabhängig, peripher expandierenden T-Zellen des Transplantats wider.

Um eine Aussage über die *funktionelle Regeneration* zu treffen, wurden die Lymphozyten obiger Patienten mit den Mitogenen PMA und Ionomycin stimuliert und die produzierten Zytokine mittels *ELISA* quantifiziert. Zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation überwog die Synthese von IFN- γ , zu späteren Zeitpunkten war IL-2 das am meisten produzierte Zytokin. Insgesamt wurde noch ein Jahr nach Transplantation eine reduzierte Synthese aller untersuchten Zytokine beobachtet.

Zur näheren *Charakterisierung der zytokinproduzierenden Zellen* wurden die stimulierten Lymphozyten der Patienten und die Kontrollzellen mit

fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle und gegen Zytokine gefärbt.

Sowohl bei den Gedächtniszellen, als auch bei den naiven, Thymus-abhängig regenerierten Zellen fiel bereits früh nach Transplantation eine deutlich reduzierte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf, die sich im Verlauf steigerte.

Außerdem fand sich eine reduzierte Zytokinsynthese aller untersuchten Zytokine. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen produzierten alle Zytokine, wobei die CD4⁺ Subpopulation in der Synthese überwog. Die CD4⁺ Zellen produzierten mehr IL-2 als IFN- γ , die CD8⁺ Zellen überwogen in der IFN- γ -Synthese. Die TH2, bzw. TC2-Zytokine wurden generell in geringem Ausmaß synthetisiert. Früh nach Transplantation dominierten die CD45RO⁺, zu späteren Zeitpunkten die CD45RA⁺ Zellen in der Zytokinsynthese. Dabei wurde früh vermehrt IFN- γ produziert, im weiteren Verlauf überwog der Anteil IL-2⁺ Zellen.

Ursächlich kommen für die hier beobachtete, reduzierte Immunantwort viele Faktoren in Betracht, wie z.B. das gestörte Zytokinmilieu des Empfängers oder auf *zellulärer Ebene* eine CD28-B7-Ligandendysfunktion, mit einer mangelnden Kostimulation.

Gegenstand zukünftiger Forschungsbemühungen sollte nun die Klärung der Ursachen für den Aktivierungsdefekt der reifen, wie auch der naiven, Thymus-abhängig regenerierenden Lymphozyten sein.

Im Hinblick auf eine Weiterentwicklung des Transplantationsverfahrens wird angestrebt, die Regeneration naiver T-Zellen mit komplettem TZR-Repertoire und intakter Aktivierungsfähigkeit zu beschleunigen, möglicherweise in Kombination mit der additiven Gabe ex vivo stimulierter Zellen, wie zum Beispiel zytotoxischer T-Lymphozyten oder NK-Zellen.