

## **2. Material & Methoden**

### **2.1. Patienten**

#### **2.1.1. Einschlusskriterien**

Es wurden 22 Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen im Alter von 0,5 bis 13,9 Jahren mit verschiedenen malignen und nicht-malignen Grunderkrankungen in die Langzeitstudie eingeschlossen. Sie wurden nach einer Hochdosischemotherapie im Zeitraum Dezember 1998 - Mai 2001 mit CD34<sup>+</sup> angereicherten, hämatopoetischen Stammzellen eines verwandten Spenders oder eines Fremdspenders bei einer variierenden Anzahl von HLA-Mismatches transplantiert. Zwei der Patienten mit SCID als Grunderkrankung erhielten keine Konditionierung vor der Transplantation.

Das Engraftment, gekennzeichnet durch eine absolute Neutrophilenzahl (ANZ) > 500/ $\mu$ l, fand im Median innerhalb von 12 Tagen [Streubereich 8-24] statt. Ab Tag + 4 nach Transplantation erhielten alle Patienten täglich 5  $\mu$ g/kgKG G-CSF.

Nur ein Patient (UPN 41472) erhielt zusätzliche Spenderlymphozytengaben im Verlauf der Regeneration.

Zwei Patienten erlitten nach Fremdspender-Transplantation eine Abstoßung und wurden im weiteren Verlauf haploident transplantiert. Am Stichtag waren beide am Leben.

8 Patienten waren bis zu zum Stichtag 31.12.01 verstorben. Davon waren 4 einer GvHD, zwei einem Rezidiv, eine Patientin einer Aspergillus-Infektion und eine weitere Patientin einer lymphoproliferativen Erkrankung durch EBV erlegen.

Weitere Einzelheiten zu den Patienten sind in Tabelle 1 ersichtlich.

#### **2.1.2. Interne Kontrolle**

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden bei den Versuchen als Kontrolle konstant Zellen einer gesunden, 25jährigen, weiblichen Erwachsenen verwendet.

**Tabelle 1:** Patientencharakteristika

UPN	Alter bei SZT in Jahren, Geschlecht		Diagnose	Spender	HLA- mismatch	Konditionierung	Transplantierte Zellen		ANZ > 500/ $\mu$ l	Überlebenszeit bis 31.12.01, in Tagen
							CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup> /kg	CD3 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /kg		
40155	3,3	W	OP	Haplo	B, DR	FTBI(12)/Cyc(120)/TT(10)/OKT3	29	1,2	9	Am Leben, 965
42184	0,8	M	SCID	Haplo	A, B, Cw, DR	Keine	32,2	13,2	-	Am Leben, 936
42970	0,5	M	SCID	Haplo	A, B, DR	Keine	13,9	7,6	-	†, GvHD, 94
40126	5,5	M	ALL	Haplo	A, B,Cw, DR	FTBI/VP-16(40)/TT(10)/OKT3	27,7	14	10	†, Rezidiv, 125
41814	12,1	W	CML	Haplo	B, DR	FTBI(12)/Cyc(60)/TT(10)/OKT3	16,5	3,9	10	†, Infektion, 182
42104	4	M	ALL	Haplo	A, B, DR	FTBI(12)/VP-16(40)/TT(10)/OKT3/MP	33,8	12,5	8	Am Leben, 917
42266	9	W	CML	Haplo	Keine	FTBI(12)/Cyc(60)/TT(10)/OKT3	6,8	6	14	†, EBV-LPD, 135
42356	5	W	SAA	Haplo, 2.SZT	A, B, Cw, DR	FTBI(1)/Cyc(60)/Fludarabin/OKT3	15,3	15	13	Am Leben, 726
41472	13,3	M	CML	Haplo	A, B, Cw, DR	Bu(16)/Cyc(50)/TT(10)/ATG(30)/OKT3	17,5	6,4	9	†, GvHD, 195
42118	5,7	W	ALL	Haplo, 2.SZT	A, B	TBI(2)/Cyc(60)/ATG(30)/Fludarabin	19	5,8	24	Am Leben, 592
40028	10,5	M	ALL	Ident	Keine	TBI(2)/Fludarabin(30)	32,9	290	12	†, Rezidiv, 232
40005	9,9	W	ALL	UD	A, Cw	FTBI(12)/VP-16(40)/ATG(30)/TT(10)	7,4	8,9	20	Am Leben, 783
42242	10,1	W	AML	UD	Cw, DR	Bu(16)/Cyc(120)/ATG(30)/Melphalan	7,3	8	14	†, GvHD, 234
42428	12,5	W	ALL	UD	Keine	FTBI(12)/VP-16(40)/ATG(30)/TT(10)	8	12,5	21	Am Leben, 832
41120	3,3	M	WAS	UD	DR	Bu(16)/Cyc(200)/ATG(24)/OKT3	15	4,5	14	Am Leben, 1108
41901	4	W	ALL	UD	Keine	FTBI(12)/VP-16(40)/TT(10)/ATG(30)	14	6	12	Am Leben, 999
42612	13,9	M	CML	UD	B, DR	FTBI(12)/Cyc(120)/ATG(30)/TT(10)	9	3	19	†, GvHD, 317
41794	6,7	W	SAA	UD	Keine	FLKI(8)/Cyc(200)/OKT3	5,1	6,1	10	Am Leben, 1012
41560	11	M	XALD	UD	Cw	FTBI(14)/Cyc(120)/ATG(30)	8,2	6,5	10	Am Leben, 1074
42356	4,9	W	SAA	UD, 1. SZT	A, C	FLKI(8)/Cyc(50)/OKT3	4,1	0,43	10	Am Leben, 766
42318	3,9	M	AML	UD	DR	Bu(16)/Cyc(120)/ATG(30)/Melphalan	21,7	4,4	19	Am Leben, 836
41059	12	M	PCV	UD	Keine	Bu(16)/Cyc(200)/ATG(30)	3,4	3,6	11	Am Leben, 1018
40150	4,4	M	BDA	UD	Keine	Bu(12,8)/Cyc(200)/ATG(30)	6,3	5,7	11	Am Leben, 599
42118	5,4	W	ALL	UD, 1. SZT	DR	FTBI(12)/VP-16(40)/TT(10)/OKT3	1,4	4	12	Am Leben, 698
<b>Median</b>	<b>5,6</b>						<b>14,0</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	
<b>Streuung</b>	<b>[0,5 - 13,9]</b>						<b>[1,4 – 33,8]</b>	<b>[0,43-15]</b>	<b>[8-24]</b>	

**Abkürzungen:** ANZ = absolute Neutrophilenzahl, ATG(30) = anti-Thymozytenglobulin [Kaninchen], BDA = Blackfan Diamond Anämie, Bu (16) = Busulfan (4 x 4 mg/kgKG), Cyc (120) = Cyclophosphamid (2 x 60 mg/kgKG), FTBI (12) = Fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (12 Gray), FLKI (8) = Fraktionierte Lymphknotenbestrahlung (8 Gray), OKT3 = anti-CD3 Antikörper, OP = Osteopetrose, PCV = Polycythaemia vera rubra, TT (10) = Thiotepa (10 mg/kgKG), SAA = Schwere aplastische Anämie, SCID = Schwerer kombinierter Immundefekt, UD = nichtverwandter Fremdspender, VP-16 (40) = Etoposid (40 mg/kgKG), WAS = Wiskott-Aldrich-Syndrom, XALD = X-linked Adrenoleukodystrophie

## 2.2. Materialien

### 2.2.1. Reagenzien, Antikörper, Lösungen

#### *Reagenzien zur Zellisolation*

- Nährmedium:  
VLE RPMI 1640 Medium (1x), Endotoxin:  $\leq 0,01$  EU/ml, W 2.0 g/l  
NaHCO<sub>3</sub>, W/o L-Glu, Biochrom KG,  
+ 45 ml H-AB-Serum + 5 ml L-Glu + 5 ml P/S  
+ 5 ml Hepes Puffer, Solution 1M, Life Technologies
- Ficoll separating solution, isoton, Dichte 1.077, Biochrom KG
- PBS spezial, Life Technologies
- Ampuwa, steriles, pyrogenfreies Aqua ad iniectabilia, Fresenius
- Dimethylsulfoxid, M- 78,13 g/mol (DMSO), Merck

#### *Zellstimulanzen*

- Phytohämagglutinin (PHA), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA),  
Staphylokokkenenterotoxin (SEA), Sigma
- Ionomycin, Calcium Salt, Streptomyces conglobatus, MW 747.1, Calbiochem
- Orthoclone<sup>®</sup> (OKT3), Cilag
- CD28, unkonjugiert, Becton Dickinson

#### *Monoklonale Antikörper*

##### *Zur Anfärbung der Oberflächenantigene*

- Simultest Control  $\gamma/\gamma$ , CD 3 (Leu-4) PerCP, -PE, -FITC, CD 4 (Leu-3a) PerCP,  
-PE, CD 8 (Leu-2a) PerCP, -PE, -FITC, CD11a FITC, CD16 FITC, CD19 (Leu-  
12) PerCP, CD23 (Leu-20) PE, CD 27 PE, CD56 (NCAM 16.2) FITC, CD62L  
FITC, CD69 FITC, WT31 (Anti-TCR- $\alpha\beta$ ) FITC, Anti-TCR- $\gamma\delta$ -1 PE, Anti-  
HLA-DR PE, Becton Dickinson
- Anti-Human CD28 FITC, Anti-Human CD40 FITC, Anti-Human CD45RA  
FITC Anti-Human CD45RO PE, -FITC, PharMingen

*Zur intrazellulären Färbung*

- Platelet Control – $\gamma$ 1PE, Anti-Human IL-4 PE, Anti-Human IL-2 FITC, Anti-Human Interferon- $\gamma$  FITC, CD69 PE, -FITC, Becton Dickinson
- Anti-Human IL-2 FITC, Diaclone
- Anti-Human IL-2 PE, -FITC, Anti-Human IL-4 PE, Anti-Human IL-10 PE, Anti-Human Interferon- $\gamma$  FITC, Hölzel Diagnostica

*Reagenzien für Durchflusszytometrie*

- FACSLyse-Lösung, FACSCFlow, Becton Dickinson
- Brefeldin A, from *Penicillium brefeldianum*, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, in PBS verdünnt, Saponin From Quillaja Bark, Paraformaldehyd, 4%, in PBS gelöst, Sigma
- Polyglobin<sup>®</sup> 10%, IgG vom Menschen, Bayer

*ELISA-Kits*

- Quantikine human IL-2, Quantikine human IL-4 , Quantikine human IL-10, Quantikine human IFN- $\gamma$ , R&D Systems

**2.2.2. Festmaterialien und Geräte***Materialien für Blutproben*

- EDTA-Röhrchen, Monovette 1ml, 3 ml, 9 ml, Sarstedt
- Einmal-Injektions-Kanüle Sterican, steril, Einmalspritze, 20 ml, B.Braun Melsungen AG
- Butterfly, Venisystems<sup>TM</sup>, Abbott Ireland
- Vetren 200, Wirkstoff: Heparin-Natrium, Byk Gulden
- Octinisept Desinfektion

*Röhrchen*

- PP-Röhrchen, steril, 15 und 50 ml, Greiner Labortechnik
- PS-Röhrchen, 4,5 ml, spitz für FACSCalibur
- Safe-Lock 1,5 und 2 ml, Eppendorf

***Pipettierhilfen***

- Pipetman 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson
- Pipetboy, Technomara
- Pipettenspitzen, Greiner Labortechnik
- Pasteur-Pipetten, Länge 150 mm, Fortuna
- Combitips plus 5 ml, 2,5 ml, Eppendorf

***Mikrotiterplatten***

- 24 Well Gewebekulturplatte und 96 Well Micro-Platte, TC, steril, Greiner
- 48 Well Gewebekulturplatte, Polystyren, steril, Costar

***Zentrifugen***

- Rotanta 46 RSC, Rotixa 50 RS, Hettich Zentrifugen

***Kühlschränke***

- Liebherr FKU1800, +4°C, Liebherr Premium, -28 °C, Liebherr
- -86°C Freezer, -79 °C, Forma Scientific

***Sonstige***

- Vortex Reax top, Titramax 100, Heidolph
- HERA safe Sicherheitswerkbank, CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank HERA cell, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Heraeus Instruments
- Platten-Autowaschgerät Wellwash 4, Denley
- Sartorius Basicplus Waage, Sartorius
- Wasserbad, Memmert
- FACSCalibur, Software Cell Quest, Becton Dickinson
- Milenia Kinetic Analyzer ELISA-Reader, Diagnostic Products Corporation, Software SOFTmax PRO, Molecular Devices Corporation
- Hardware, Macintosh, Hewlett Packard
- Advia 120 incl. Software, Bayer
- Cobas Micros, Roche Hematology

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. Isolierung der peripheren mononukleären Lymphozyten (PMNZ)**

Zur Isolierung der peripheren mononukleären Lymphozyten (PMNZ) wurde das heparinisierte Blut im Volumenverhältnis 1:1 mit PBS spezial verdünnt. In ein weiteres Röhrchen wurden 14 ml Ficoll eingefüllt. Auf den Ficoll wurde vorsichtig das verdünnte Blut geschichtet und bei 800 g, 25°C, für 15 min auf niedrigster Bremsstufe zentrifugiert. Die PMNZ erschienen als milchige Schicht an der Grenzfläche zum Ficoll, das Serum bildete den Überstand.

Die PMNZ wurden an der Grenzschicht zwischen Ficoll und Serum abgesaugt. Es erfolgten 2 Waschschrte mit je 40 ml PBS und einer Zentrifugation bei 600 g, für 7 Minuten, bei 25°C und höchster Bremsstufe. Das entstandene Pellet wurde vom Überstand befreit, mit Nährmedium (RPMI 1640 + H-AB-Serum, L-Glu, P/S, Hapes Puffer) resuspendiert und die Zellzahl in einem automatischen Blutmessgerät bestimmt. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank.

### **2.3.2. ELISA**

#### **2.3.2.1. Stimulation der PMNZ**

Die zuvor durch Ficoll separierten PMNZ wurden auf die in Vorversuchen optimierte Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Auf eine 96-Well-Platte wurden 8 x 200 µl der Zellsuspension (je  $1 \times 10^5$  Zellen/well) pipettiert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml PMA und 1 nmol/ml Ionomycin stimuliert und bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert.

Nach 48 Stunden wurde mit 125 g zwei Minuten lang bei 25°C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand eines Wells wurde unter sterilen Bedingungen abpipettiert und bei –28°C eingefroren. Die Platte mit den restlichen 7 Wells wurde kurz aufgerüttelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die restlichen Überstände abpipettiert, gepoolt und eingefroren.

### **2.3.2.2. Prinzip des ELISA**

Die hier verwendeten Sandwich-Enzym-Immunoassays bestanden aus bereits vorgefertigten Mikrotiterplatten mit einer Beschichtung aus monoklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Zytokin.

Jede Probe wurde im ELISA doppelt bestimmt. Zudem enthielt jede Versuchsreihe eine Negativkontrolle sowie Standardwerte absteigender Konzentration zur Anfertigung einer Standardkurve.

Zuerst wurden Standards, Leerwert und die Proben in die Wells pipettiert. Das jeweilige Zytokin aus den gewonnenen Überständen band an die Antikörper der beschichteten Wells. Nach zwei Stunden Inkubation folgten mehrere Waschschrte, um die nicht gebundenen Substanzen zu entfernen. Nun wurde ein an Peroxidase gebundener polyklonaler Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin zugegeben. Nach erneuter Inkubation wurde das nicht gebundene Antikörper-Enzym-Reagenz durch wiederholte Waschschrte entfernt. Als Substratlösung wurde Hydrogenperoxid mit dem gebundenen Farbstoff Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Das Substrat wurde von der Peroxidase umgesetzt und bewirkte einen Farbumschlag. Die Farbintensität war proportional zur Menge des umgesetzten Substrats, welche von der Menge des gebundenen Enzyms abhing. Diese war wiederum direkt proportional zur Menge des gebundenen Zytokins.

Die Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure gestoppt und die Intensität der Farbe photometrisch bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte bei 450 nm bei einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen.

Mit der Computer-Software softmax<sup>®</sup> wurde anhand der Standardwerte eine Standardkurve als 4-Parameter-Logistik-Kurve erstellt, die der Auswertung der Proben diente.

### **2.3.2.3. Unterschiede in der Versuchsdurchführung der ELISA**

Die ELISA-Versuchsreihen wurden gemäß der vom Hersteller optimierten und empfohlenen Versuchsanleitung durchgeführt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 2 dargestellten Unterschiede.

**Tabelle 2:** Unterschiede in der Versuchsdurchführung der ELISA

	<i>IL-2</i>	<i>IL-4</i>	<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	<i>IL-10</i>
<i>Probenverdünnung</i>	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-
<i>Zugabe der Probe</i>	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<i>1. Inkubationszeit</i>	2 h bei RT	2 h bei RT	2,5 h bei RT	2 h bei RT
<i>Waschschritte</i>	3 x	3 x	4 x	4 x
<i>Zugabe des Conjugate</i>	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<i>2. Inkubationszeit</i>	2 h bei RT	2 h bei RT	2 h bei RT	1 h bei RT
<i>Waschschritte</i>	3 x	3 x	4 x	4 x
<i>Zugabe des Substrats</i>	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<i>3. Inkubationszeit</i>	20 min bei RT	20 min bei RT	20 min bei RT	20 min bei RT
<i>Zugabe der Stopplösung</i>	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

### 2.3.3. Durchflusszytometrie

#### 2.3.3.1. Prinzip des FACSCalibur-Flowzytometers

Das Durchflusszytometer diente bei den folgenden Versuchen der Analyse von Einzelzellen in Suspension anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften. Hierbei wurde das folgende Prinzip angewendet [87].

Die Zellen wurden mit monoklonalen, fluoreszenzkonjugierten Antikörpern markiert und von einem luftgekühlten Argon-Ionenlaser auf einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die von dem Laserlicht angeregten Elektronen emittierten Photonen, die als Fluoreszenzsignal gemessen wurden. Die Fluoreszenzintensität war dabei direkt proportional zur Anzahl vorhandener Bindungsstellen für den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper, und damit ein Maß für die Quantität der Expression des jeweiligen Antigens.

Mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die in ihren Emissionsmaxima differierten, gelang es, gleichzeitig mehrere Oberflächenantigene einer Zelle zu identifizieren.

Auf diese Weise wurden fünf Parameter pro Röhrchen gemessen. Größe und Granularität der Zellen wurden aufgrund von Streulichteigenschaften bestimmt. Außerdem wurden maximal 3 verschiedene Oberflächenantigene mit Phycoerythrin, Fluorescein-Isothiozyanat und PerCP angefärbt. Die Emissionsmaxima der angeregten Farbstoffe wurden mit unterschiedlichen Detektoren gemessen.

Zur Auswertung der Daten diente das Programm Cell Quest der Firma Becton Dickinson.

### **2.3.3.2. Analyse der Oberflächenantigene**

In die Röhrchen wurden je 10 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper pipettiert.

Nach Zugabe von 100 µl Vollblut der zu untersuchenden Patientenprobe folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 4°C im Dunkeln. Zur Lyse der Erythrozyten wurden pro Röhrchen 2 ml FACS-Lyse-Lösung hinzugefügt und die Probe für weitere 6 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Danach wurden die Röhrchen bei 500 g für 5 min, Bremse R9, bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet durch Vortexen gelöst und zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde ein Minimum von  $1 \times 10^4$  Zellen durch den FACSCalibur analysiert.

Dadurch ließen sich die Anzahl der B- und NK-Zellen bestimmen und die enthaltenen T-Lymphozyten näher charakterisieren. Alle Versuchsreihen enthielten eine Negativkontrolle.

### **2.3.3.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung**

#### **2.3.3.3.1. Stimulation**

Jeweils parallel zur Patientenprobe wurde als Kontrolle die Probe eines gesunden Spenders stimuliert. Nach Isolierung der PMNZ mittels Ficoll wurde die Zellzahl durch Zugabe von Nährmedium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Pro Well wurde 1 ml auf eine 24-Well-Platte pipettiert. Die Zellstimulation erfolgte mit 750 ng/ml Ionomycin und 20 ng/ml PMA. Die pH-Wert-Einstellung (Ziel: 7,0-7,4) erreichte man durch die

Zugabe von 10 µl/ml Hepes-Puffer. Es erfolgte eine Inkubation für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 2 Stunden wurden 10 µg Brefeldin A pro Well zugegeben. Damit wurde der Transport der Zytokine aus der Zelle verhindert.

Die Versuchsreihen bestanden jeweils aus einer Negativkontrolle ohne Stimulanzen, einer Aktivierungskontrolle ohne Brefeldin, sowie der Probe mit Stimulanzen und Brefeldin von PMNZ des Patienten und PMNZ einer gesunden Kontrollperson.

#### **2.3.3.3.2. Färbung der Zellen**

Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden zu den vorpipettierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene pro Röhrchen 100 µl der Zellsuspension gegeben und die Zellen bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgten zwei Waschschriffe mit je 2 ml PBS + 2 % humanem AB-Serum. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml 4 %igem Paraformaldehyd pro Röhrchen fixiert, 15 Minuten inkubiert und danach zweimal gewaschen.

Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden nun je 20 µl Polyglobin, 1:20 mit 0,3% Saponin verdünnt, hinzugegeben und 15 min inkubiert.

Ohne weiteren Waschschriffe wurden jeweils 80 µl fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen die gewünschten Zytokine pipettiert, wobei die Antikörper der Firma Becton Dickinson 1:60, die der Firma Hölzel nur 1:6 mit 0,3 % Saponin verdünnt wurden. Das Saponin bewirkte eine erhöhte Permeabilität der Zellmembranen, so dass auch Antikörper an Zytokine im Zellinneren banden.

Die Antikörper wurden nun für 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und mit je 2 ml 0,1 % Saponin gewaschen [67,85,98].

Wie oben beschrieben erfolgte die Analyse von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Röhrchen mit dem FACSCalibur.

### **2.3.4. Statistik**

Die Residuen aller durchgeführten Analysen wurden mittels Quantil-Quantil-Plot auf Normalverteilung untersucht. Nach Logarithmieren bzw. logit-Transformation der Ausgangswerte ließ sich kein Trend mehr erkennen.

Als Software zur Durchführung der Statistik wurde JMP 5.0.1.2. 2003 verwendet.

#### **2.3.4.1. Immunregeneration**

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der *T-Zell-Regeneration*. Deshalb wurde nur für diese Population mit den CD4- und CD8-Subpopulationen eine Kovarianzanalyse durchgeführt.

Zielgröße dieser Auswertung war die Anzahl der betrachteten Zellen im Verlauf der Regeneration. Dabei wirkten die Dauer der Regeneration und der gewählte Transplantationsmodus als Einflussgrößen auf die gemessenen Zellzahlen ein. Als Störgrößen konnten die in Tabelle 1, S. 11 dargestellten Variablen „Alter“, „Geschlecht“, „Grunderkrankung“ und „Konditionierung“ identifiziert werden.

Zur Homogenisierung der Varianzen wurden die stetig verteilten Ausgangswerte logarithmiert. Dadurch wurde eine Normalverteilung erreicht und der Einfluss besonders großer Werte verringert.

Die Nullhypothese der Kovarianzanalyse wurde als Übereinstimmung der mittleren Zunahmeraten der T-Zell-Regeneration definiert. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau von 0,05 war. Damit wurde ein Unterschied in der Geschwindigkeit der Regeneration als nachgewiesen interpretiert. Außerdem wurde der relative Unterschied der mittleren Zellzahl am mittleren Tag geprüft.

#### **2.3.4.2. ELISA**

Die Messwerte wurden jeweils doppelt bestimmt und der Mittelwert errechnet.

In dieser Versuchsreihe war die Zielgröße als Konzentration des jeweiligen Zytokins im Überstand definiert. Die Einflussgröße war hierbei der prozentuale Anteil der naiven T-

Helferzellen ( $CD4^+CD45RA^+$ ) in der begleitenden FACS-Analyse des Nativbluts. Bei niedrigeren Fallzahlen wurde auf eine getrennte Auswertung bezüglich der Transplantationsform verzichtet.

Alle Variablen waren stetig verteilt. Zur Homogenisierung der Varianzen und zum Erhalt einer Normalverteilung wurden auch hier die Ausgangswerte logarithmiert. Danach erfolgte für das jeweilige Zytokin eine Regressionsanalyse zur Beurteilung der Abhängigkeit der Zytokinproduktion vom Anteil  $CD4^+CD45RA^+$  Zellen.

#### **2.3.4.3. Intrazelluläre Färbung**

Zielgrößen dieser Analyse waren der Prozentsatz zytokinpositiver Zellen und der Prozentsatz der CD69-Expression nach Zellstimulation. Die Einflussgröße war hierbei erneut der prozentuale Anteil der naiven T-Helferzellen ( $CD4^+CD45RA^+$ ) in der begleitenden FACS-Analyse des Nativbluts.

Die Ausgangswerte waren stetig verteilt. Zur Homogenisierung der Varianzen wurde eine logit-Transformation gewählt. Dadurch ergab sich eine Normalverteilung der Residuen. Daraufhin wurde für IL-2 und IFN- $\gamma$  eine Kovarianzanalyse durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Immunrekonstitution nach PBSZT

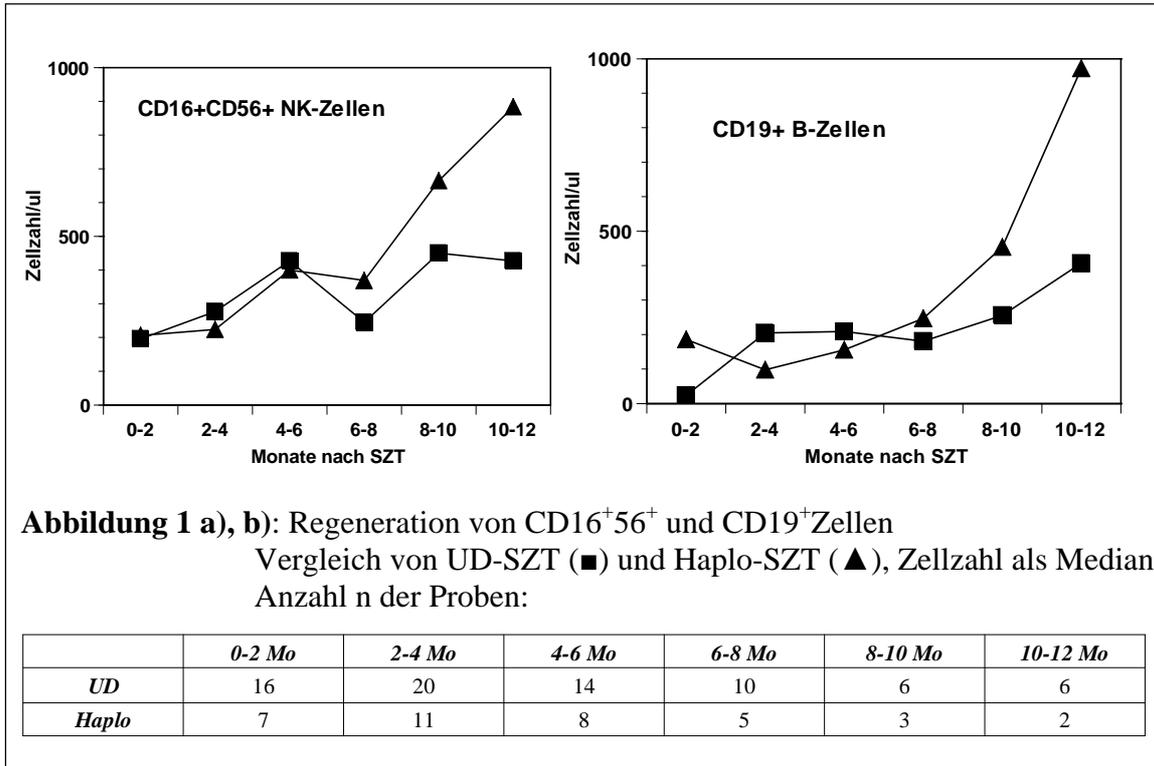
#### 3.1.1. Regeneration der Lymphozytenuntereinheiten

Die Lymphozyten der Patienten nach Stammzelltransplantation wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenepitope angefärbt und mittels Durchflusszytometrie phänotypisch identifiziert. Die hier gewonnenen Daten wurden nun in Beziehung zu den absoluten Leukozyten- und Lymphozytenzahlen des Differentialblutbildes des jeweiligen Patienten gesetzt. Die im folgenden Text aufgeführten Zellzahlen wurden für haploidente und Fremdspender-PBSZT getrennt ausgewertet und sind im Median mit dem dazugehörigen Streubereich nachfolgend in Klammern angegeben.

Wie übereinstimmend in der Literatur beschrieben, sind die Natürlichen Killerzellen ( $CD16^+CD56^+$ ), als Vertreter einer unspezifischen zellulären Immunität, die ersten Lymphozyten, die im Verlauf der Regeneration nach Transplantation von  $CD34^+$  selektierten Stammzellen auftreten.

Altersentsprechende **NK-Zellzahlen** von 120-300 Zellen/ $\mu$ l wurden sowohl nach haploidenter als auch nach Fremdspender-SZT innerhalb der ersten zwei Monate erreicht. Bis zum 6. Monat verlief die Regeneration der NK ähnlich, dann fanden sich nach Haplo-SZT konstant höhere Zellzahlen als nach UD-SZT (Maximum nach 10-12 Monaten: Haplo-SZT: 884 Zellen/ $\mu$ l, Streubereich 458-1310; UD: 427, Streubereich: 274-1336). Ab dem 8. Monat nach Haplo-SZT lagen die Werte über den altersentsprechenden Normwerten (s. Abb. 1a).

**Die B-Zellen** ( $CD19^+$ ) stiegen nach UD-SZT im Zeitraum 2. - 4. Monat mit 205/ $\mu$ l (21-857) auf Zellzahlen über 100/ $\mu$ l an. Bei den haploident transplantierten Patienten erreichten die B-Zellen schon im Zeitraum 0.-2. Monat 186/ $\mu$ l (0-1414). Ab dem 6. Monat post SZT überwogen die  $CD19^+$  Zellzahlen bei Haplo-SZT. Sie lagen nach 10-12 Monaten mit 972/ $\mu$ l (878-1064) deutlich über der altersentsprechenden Norm, während nach UD-SZT nur Zellzahlen von 407 / $\mu$ l (214-703) erreicht wurden (s. Abb. 1b).



### 3.1.2. T-Zell-Regeneration

Da der Schwerpunkt der Experimente auf der Charakterisierung der T-Zell-Regeneration lag, wurde hier zusätzlich eine statistische Analyse der Daten vorgenommen. In einer Kovarianzanalyse wurde die Regeneration der T-Zellen nach Haplo- und UD-SZT bei zusätzlicher Beurteilung der Einflussgrößen verglichen.

Zum Erhalt einer Normalverteilung wurden die Ausgangswerte logarithmiert. Danach ließ sich in allen Analysen kein Trend der Residuen mehr erkennen.

Einflussgrößen der Regeneration waren die Zeit nach Transplantation („Tag“) und die Transplantationsart („Transplant“). Der statistische Test erbrachte für CD3<sub>gesamt</sub>, CD4 und CD8 einen signifikanten Effekt beider Einflussgrößen auf die mittlere Zellzahl. Zudem wurde auf eine Wechselwirkung zwischen den beiden Einflussgrößen („Tag\*Transplantation“) getestet. Hier zeigte sich für CD3<sub>ges</sub> und CD8 keine Wechselwirkung der beiden Faktoren, wohl aber für CD4.

Bei Betrachtung der *Schätzwerte für CD3<sub>ges</sub>* war ein Unterschied der mittleren Zellzahl zur mittleren Zeit zwischen den beiden Transplantationsformen von  $2^{*0,424} = 0,85$  zu

erkennen (s. Tab. 3c). Die Zellzahl war somit nach Haplo-SZT um den Faktor  $\exp(0,85) = 2,3$ , 95%-Konfidenzintervall [1,6; 3,4], größer. Die geschätzte Regenerationsrate von 4‰ pro Tag nach Haplo-SZT, 95%-Konfidenzintervall [2; 7], war niedriger als nach UD-SZT mit 8 ‰ pro Tag, 95%-Konfidenzintervall [6; 11]. Die Konfidenzintervalle überlappten, der Unterschied war nicht signifikant. Die Verdopplungszeit der Zellzahl von  $\ln(2)/\text{Steigung}$  lag nach Haplo-SZT bei 151 Tagen, nach UD-SZT bei nur 86 Tagen. Nach Interpolation der Schätzwerte zur Darstellung beider Regenerationsgeraden mit 95% Konfidenzbändern zeigten sich in der frühen Regenerationsphase deutlich höhere Zellzahlen nach Haplo-SZT bei engen Konfidenzbändern, die sich initial nicht überschneiden. Im weiteren Verlauf näherten sich die Geraden aufgrund des Steigungsunterschieds der Funktionen an (s. Abb. 2a).

Unter Annahme der geschätzten Geraden wurden  $\text{CD3}_{\text{ges}}$  Zahlen von  $> 900/\mu\text{l}$  ca. 8 Monate nach Haplo-SZT und 9-10 Monate nach UD-SZT erreicht.

In der Analyse der **Regeneration der  $\text{CD4}^+$  Zellen** war die mittlere Zellzahl zum mittleren Tag nach Haplo-SZT um den Faktor  $\exp(2 \cdot 0,395) = 2,2$ , 95%-Konfidenzintervall [1,7; 2,9], deutlich höher. Die geschätzte Regenerationsrate betrug nach Haplo-SZT 2‰/Tag, 95%-Konfidenzintervall [0,6; 4], nach UD-SZT 8‰/Tag, 95%-Konfidenzintervall [6; 10], mit einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Raten. Die geschätzte Verdopplungszeit der Zellzahl war nach UD-SZT mit 83 Tagen deutlich kürzer als nach Haplo-SZT mit 289 Tagen (s. Tab. 3 c).

In der Darstellung beider Regenerationsgeraden (s. Abb. 2b) mit 95%-Konfidenzbändern waren die  $\text{CD4}^+$  Zellzahlen nach Haplo-SZT höher, bei geringerer Steigung dieser Geraden kam es zu einem Schnitt nach rund 8 Monaten.

$\text{CD4}^+$  Zellzahlen des altersentsprechenden Normbereichs von 560-2700 Zellen/ $\mu\text{l}$  wurden unter Annahme der geschätzten Geraden nach UD-SZT gegen Ende des Beobachtungszeitraums, nach Haplo-SZT nicht innerhalb der untersuchten 10 Monate nach Transplantation erreicht.

In der Analyse der **Regeneration der  $\text{CD8}^+$  Zellen** war die Zellzahl nach Haplo-SZT um den Faktor  $\exp(2 \cdot 0,4) = 2,3$ , 95%-Konfidenzintervall [0,5; 1,2], höher. Die Regenerationsraten nach beiden Transplantationsformen lagen bei 5 ‰/Tag bei

geringfügig differierenden 95%-Konfidenzintervallen (für Haplo-SZT [3; 7], für UD-SZT [2; 7]). Die Verdopplungszeit der Zellzahl lag bei 142 Tagen nach haploidenter, bei 143 nach UD-SZT (s. Tab. 3c).

Im Diagramm (s. Abb.2c) ließen sich nahezu parallele Geraden darstellen, deren 95%-Konfidenzbänder sich zur mittleren Zeit nicht überschneiden.

Die CD8<sup>+</sup> Zellen erreichten ca. 6 Monate nach Haplo-SZT mit Zellzahlen >330/μl den unteren Normbereich. Nach UD-SZT lagen diese Zellzahlen außerhalb des Beobachtungszeitraums.

Zusammenfassend regenerierten die T-Zell-Untereinheiten unterschiedlich. Nach UD-SZT normalisierten sich die CD4-Zellen am Ende des Beobachtungszeitraums, die CD8-Zellen blieben unterhalb der Norm. Nach Haplo-SZT normalisierten sich die CD8-Zellzahlen nach ca. 6 Monaten, die CD4-Zellen erreichten die Normwerte nicht.

**Tabelle 3, a), b), c):** Regeneration der CD3<sub>ges</sub>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen.  
Kovarianzanalyse mit Analyse der Einflussgrößen und der erweiterten Schätzwerte

**a) Varianzanalysen**

		<i>Freiheits- grade</i>	<i>Summe der Abweichungs- quadrate</i>	<i>Mittleres Abweichungs- quadrat</i>	<i>F</i>
<b>CD3</b>	<i>Modell</i>	3	35	11.7	16.7
	<i>Residuen</i>	86	60	0.70	P
	<i>Gesamt</i>	89	95		<.0001
<b>CD4</b>	<i>Modell</i>	3	33	11.0	27.4
	<i>Residuen</i>	83	33	0.40	P
	<i>Gesamt</i>	86	66		<.0001
<b>CD8</b>	<i>Modell</i>	3	21.7	7.24	12.3
	<i>Residuen</i>	78	45.7	0.59	P
	<i>Gesamt</i>	81	67.4		<.0001

**b) Analyse der Einflussgrößen**

	<i>Einflussgröße</i>	<i>N</i> <i>parm</i>	<i>Freiheits-</i> <i>grade</i>	<i>Summe der</i> <i>Abweichungsquadrate</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<b>CD3</b>	<i>Tag</i> <sup>1</sup>	1	1	18	26.0	<.0001
	<i>Transplant.</i> <sup>2</sup>	1	1	15	21.6	<.0001
	<i>Tag* Transplant</i> <sup>3</sup>	1	1	1	1.93	0.17
<b>CD4</b>	<i>Tag</i>	1	1	13	33	<.0001
	<i>Transplant.</i>	1	1	13	32	<.0001
	<i>Tag* Transplant</i>	1	1	4	10	0,0024
<b>CD8</b>	<i>Tag</i>	1	1	10	17.2	<.0001
	<i>Transplant.</i>	1	1	14	23.6	<.0001
	<i>Tag*Transplant</i>	1	1	0.00024	0.0004	0.98

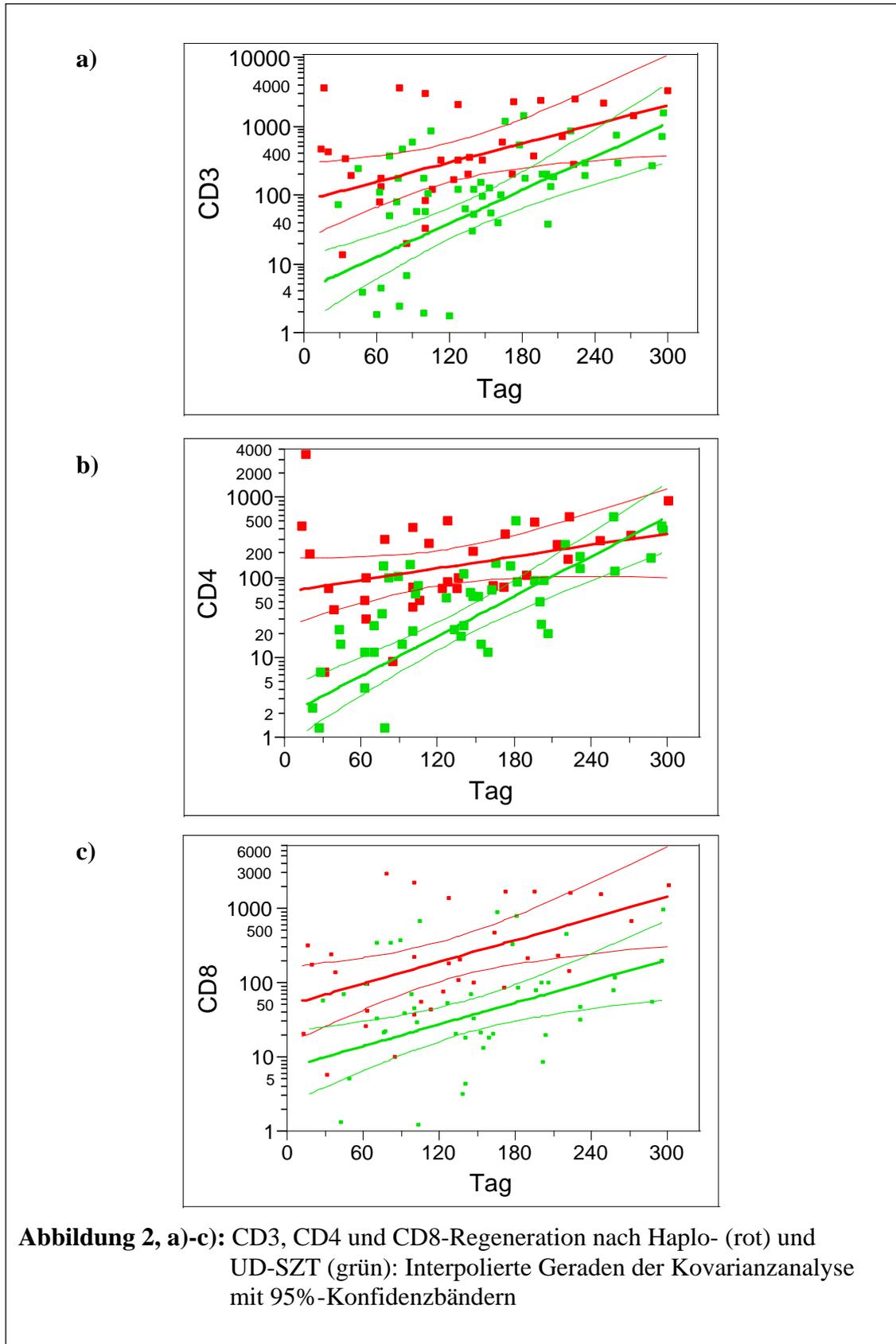
**c) Erweiterte Schätzwerte**

<b>CD3</b>	<i>Schätzwert</i>	<i>Standard-</i> <i>fehler</i>	<i>95%-Konfidenzintervall</i>	
			<i>von</i>	<i>bis</i>
<i>Achsenabschnitt</i>	1.27	0.18	0.90	1.64
<i>Tag</i>	0.0064	0.0012	0.0039	0.0088
<i>Transplant[Haplo]</i> <sup>4</sup>	0.42	0.091	0.24	0.61
<i>Transplant[u.d.]</i> <sup>5</sup>	-0.42	0.091	-0.61	-0.24
<i>Transplant[Haplo]*(Tag-131.2)</i> <sup>6</sup>	-0.0017	0.0012	-0.0042	0.0007
<i>Transplant[u.d.]*(Tag-131.2)</i> <sup>7</sup>	0.0017	0.0012	-0.0007	0.0042

<b>CD4</b>	<i>Schätzwert</i>	<i>Standard-</i> <i>fehler</i>	<i>95%-Konfidenzintervall</i>	
			<i>von</i>	<i>bis</i>
<i>Achsenabschnitt</i>	1.047	0.14	0.77	1.33
<i>Tag</i>	0.0056	0.00094	0.0035	0.0072
<i>Transplant[Haplo]</i>	0.39	0.070	0.26	0.53
<i>Transplant[u.d.]</i>	-0.39	0.070	-0.53	-0.26
<i>Transplant[Haplo]*(Tag-130.9)</i>	-0.0029	0.00094	-0.0048	-0.0011
<i>Transplant[u.d.]*(Tag-130.9)</i>	0.0029	0.00094	0.0011	0.0048

<b>CD8</b>	<i>Schätzwert</i>	<i>Standard-</i> <i>fehler</i>	<i>95%-Konfidenzintervall</i>	
			<i>von</i>	<i>bis</i>
<i>Achsenabschnitt</i>	1.28	0.18	0.92	1.64
<i>Tag</i>	0.0049	0.0012	0.0025	0.0072
<i>Transplant[Haplo]</i>	0.42	0.087	0.25	0.59
<i>Transplant[u.d.]</i>	-0.42	0.087	-0.59	-0.25
<i>Transplant[Haplo]*(Tag-136.4)</i>	0.000024	0.0012	-0.0023	0.0024
<i>Transplant[u.d.]*(Tag-136.4)</i>	-0.000024	0.0012	-0.0024	0.0023

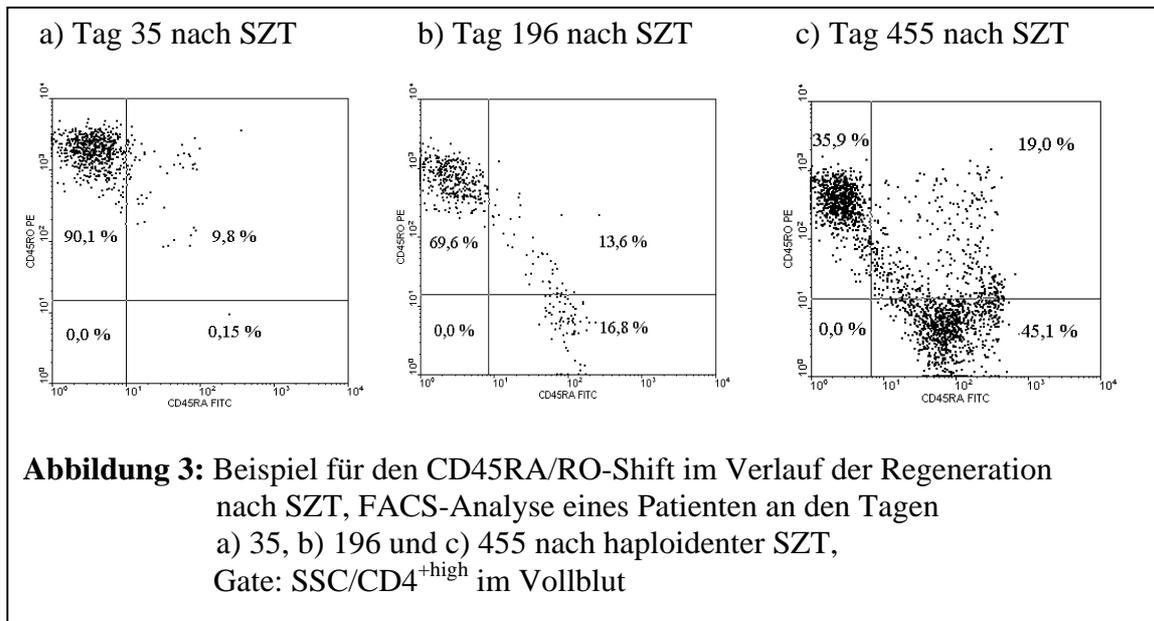
<sup>1</sup> Zeit nach Transplantation<sup>2</sup> Transplantationsart<sup>3</sup> Wechselwirkung zwischen Zeit nach Transplantation und Transplantationsart<sup>4 5</sup> Achsenabschnitte zur mittleren Zeit in Abhängigkeit von der Transplantationsart<sup>6 7</sup> Steigungen zur mittleren Zeit in Abhängigkeit von der Transplantationsart



### 3.1.3. Nähere Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Subpopulationen

Die **CD45RA/RO-Relation** der **CD4<sup>+</sup> T-Zellen** entwickelte sich bei beiden Transplantationsformen vergleichbar. Es ließ sich regelmäßig der charakteristische CD45RO/RA-Shift darstellen, wobei die reifen CD45RO<sup>+</sup>, peripher expandierten Gedächtniszellen früh nach SZT überwogen und die naiven CD45RA<sup>+</sup> Zellen im weiteren Verlauf kontinuierlich anstiegen (Abb. 3, Tabelle 4a). Ein normaler Anteil an CD45RA<sup>+</sup> Zellen von >52% wurde nach frühestens 8 Monaten erreicht.

Die Subpopulationen der **CD8<sup>+</sup> T-Zellen** regenerierten nach beiden Transplantationsformen weitgehend vergleichbar (Tabelle 4b). Der Anteil der reifen CD45RA<sup>-</sup> überwog zu Beginn des Beobachtungszeitraums, nahm nach und nach ab und erreichte nach 8-10 Monaten Normwerte gesunder Erwachsener (25 +/-11 %, pädiatrische Daten nicht vorhanden). Dagegen kam es zu einem sukzessiven Anstieg der naiven, nicht zytolytischen CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen mit einer Normalisierung des Anteils verglichen mit dem gesunder Erwachsener (55+/- 17 %). Die CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> reifen CTL im engeren Sinne nahmen insgesamt den geringsten Anteil der CD8<sup>+</sup> Zellen ein. Insgesamt lagen sie im Normbereich gesunder Erwachsener von 13 +/-13 %.



**Tabelle 4:** Regeneration der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach UD- und Haplo-SZT im Vergleich, Prozentangaben in Medianen, Gate: CD3<sup>+</sup> des Vollbluts  
 a) CD4<sup>+</sup> Zellen: Anteil von CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup>  
 b) CD8<sup>+</sup> Zellen: Anteil von CD45RA<sup>+</sup>27<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>27<sup>+</sup> und CD45RA<sup>-</sup>27<sup>+</sup>

a) CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Zellen in % SZT-Art	CD45RA <sup>+</sup>		CD45RO <sup>+</sup>	
	UD	Haplo	UD	Haplo
2-4 Monate [Streubereich] UD: n=7, Haplo: n=11	9 [0,8-19]	3 [0,4-34]	97 [87-100]	100 [79-100]
4-6 Monate [Streubereich] UD: n=8, Haplo: n=8	14 [4-36]	5 [0,8-71]	93 [85-99]	99 [44-100]
6-8 Monate [Streubereich] UD: n=8, Haplo: n=6	25 [0,7-64]	21 [1-49]	87 [67-100]	87 [59-99]
8-10 Monate [Streubereich] UD: n=5, Haplo: n=3	51 [43-72]	47 [30-55]	72 [49-95]	54 [44-76]
10-12 Monate [Streubereich] UD: n=5, Haplo: n=2	60 [18-63]	47 [41-53]	64 [52-78]	40 [34-47]

b) CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Zellen in % SZT-Art	CD45RA <sup>+</sup> 27 <sup>-</sup>		CD45RA <sup>+</sup> 27 <sup>+</sup>		CD45RA <sup>-</sup> 27 <sup>+</sup>	
	UD	Haplo	UD	Haplo	UD	Haplo
2-4 Monate [Streubereich] UD: n=3, Haplo: n=3	19 [8-29]	4 [2-7]	19 [5-32]	15 [13-17]	63 [41-86]	62 [57-68]
4-6 Monate [Streubereich] UD: n=5, Haplo: n=3	5 [2-25]	3 [2-32]	25 [5-30]	23 [8-25]	65 [36-92]	53 [21-67]
6-8 Monate [Streubereich] UD: n=7, Haplo: n=5	9 [3-34]	8 [0,5-38]	34 [16-77]	35 [3-61]	41 [18-64]	35 [13-65]
8-10 Monate [Streubereich] UD: n=5, Haplo: n=4	5 [2-7]	21 [3-35]	44 [31-75]	44 [2-63]	26 [21-67]	22 [14-57]
10-12 Monate [Streubereich] UD: n=4, Haplo: n=2	3 [2-5]	17 [4-29]	54 [22-63]	67 [51-84]	41 [30-54]	14 [12-15]

Zur weiteren Zuordnung der regenerierenden T-Zellen wurden **CD28**, **CD62L**, **HLA-DR**, **TZR $\alpha\beta$**  und **TZR $\gamma\delta$**  angefärbt (s. Tabelle 5).

Für die **CD28-Expression**, die für die Kostimulation der T-Zellen unabdingbar ist, ließ sich bei den hier erhobenen Daten (siehe Tab. 5) keine eindeutige Entwicklung feststellen. Der Anteil CD28<sup>+</sup> Zellen war im Vergleich zur Norm reduziert.

Der prozentuale Anteil des Adhäsionsmoleküls **CD62L** stieg im Beobachtungszeitraum kontinuierlich an. Der im kindlichen Vollblut normale Anteil von 80-90% wurde nicht erreicht.

Die Expression des Aktivierungsmarkers **HLA-DR** entwickelte sich bei beiden Transplantationsformen vergleichbar. Der Marker wurde im Verlauf der Regeneration herunterreguliert, lag jedoch im Untersuchungszeitraum deutlich über der altersentsprechenden Norm von 9-12,5 %.

Die Expression der T-Zell-Rezeptor-Bestandteile **TZR $\alpha\beta$**  und **TZR $\gamma\delta$**  entwickelte sich bei haploidenter und UD-SZT ähnlich und entsprach mit ca. 90% für TZR $\alpha\beta$  und ca. 5-10% für TZR $\gamma\delta$  der Norm.

**Tabelle 5:** Vergleich der Expression von CD28, CD62L, HLA-DR, TZR $\alpha\beta$ , TZR $\gamma\delta$  auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten nach SZT mit Fremd Spendern (UD) und nach haploidenter SZT (HI), Gate: CD3<sup>+</sup> des Vollbluts, Prozentangaben in Medianen, n = Anzahl der Patientenproben

<b>Marker in %</b> <b>SZT-Art</b>	<b>CD28</b>		<b>CD62L</b>		<b>HLA-DR</b>		<b>TZR<math>\alpha\beta</math></b>		<b>TZR<math>\gamma\delta</math></b>	
	<b>UD</b>	<b>HI</b>	<b>UD</b>	<b>HI</b>	<b>UD</b>	<b>HI</b>	<b>UD</b>	<b>HI</b>	<b>UD</b>	<b>HI</b>
<b>2-4 Monate</b> <i>UD: n=6, HI: n=8</i>	20	33	38	35	96	93	97	98	2	1
<b>4-6 Monate</b> <i>UD: n=8, HI: n=7</i>	46	62	37	37	93	85	77	94	14	3
<b>6-8 Monate</b> <i>UD: n=8, HI: n=5</i>	32	24	52	42	80	71	87	86	13	14
<b>8-10 Monate</b> <i>UD: n=5, HI: n=2</i>	60	27	63	36	70	64	91	90	8	2
<b>10-12 Monate</b> <i>UD: n=4, HI: n=2</i>	46	34	66	34	58	53	89	87	10	13

## 3.2. ELISA

### 3.2.1. Titration zur Optimierung der Zellstimulation für ELISA

#### 3.2.1.1. Stimulation

Um Stimulation und Zytokinproduktion der PMNZ zu optimieren, wurden Vorversuche mit den klassischen Stimulanzen PMA, Ionomycin, anti-CD3 und anti-CD28 in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

Es wurden folgende Konzentrationsstufen für die Stimulanzen festgelegt.

**Tabelle 6:** Konzentrationsstufen der Stimulanzen

<i>Konzentrationsstufen</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>PMA in ng/ml</i>	1	5	10	50
<i>Ionomycin in nmol/ml</i>	0,1	0,5	1	5
<i>anti-CD3 in µg/ml</i>	5	25	50	100
<i>anti-CD28 in µg/ml</i>	0,05	0,25	0,5	1

Die Stimulanzen wurden jeweils einzeln und in den Kombinationen PMA + Ionomycin und anti-CD3 + anti-CD28 verwendet. Zur Optimierung der Stimulationsdauer wurde 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Es wurden PMNZ eines Patienten am Tag 70 nach autologer PBSZT sowie einer gesunden Kontrolle verwendet.

Zur Differenzierung in TH1/TC1- und TH2/TC2-Antwort wurden für die TH1/TC1-Subpopulationen IL-2 und IFN- $\gamma$  und für die TH2/TC2-Subpopulationen IL-4 und IL-10 als charakteristische Zytokine gewählt.

#### 3.2.1.2. Ergebnisse

**IL-2** stieg kontinuierlich mit Dauer der Inkubation und zunehmender Konzentration der Stimulanzen an. Nach 72 Stunden Stimulation mit PMA + Ionomycin in höchster Konzentration wurde eine maximale IL-2-Konzentration von 126000 pg/ml für die Kontrollzellen und von 1441 pg/ml für die PMNZ des Patienten erreicht.

Bei den Kontrollzellen lag die maximale **IFN- $\gamma$** -Produktion bei 76218 pg/ml nach 48 h

PMA + Ionomycin, Konzentrationsstufe 3, und bei den Patientenzellen bei 97196 pg/ml nach 72 h mit gleicher Stimulanzienkombination und -konzentration.

Die TH2-Zytokine IL-4 und IL-10 wurden im Vergleich zu IL-2 und IFN- $\gamma$  in erheblich geringerem Ausmaß produziert.

**IL-4** lag meist unter der Nachweisgrenze. Das Maximum der Zytokinproduktion bei den Kontrollzellen wurde mit 11 pg/ml nach 48 Stunden PMA + Ionomycin, Konzentrationsstufe 3 erreicht.

Für **IL-10** erhielt man bei den Kontrollzellen mit PMA + Ionomycin, anti-CD3 und anti-CD3 + anti-CD28 unterschiedlicher Konzentrationsstufen maximale Messwerte von 160-202 pg/ml.

Für die PMNZ des Patienten erreichte man nach 48 Stunden Stimulation mit anti-CD3 + anti-CD28, Konzentrationsstufe 3 maximal 22 pg/ml. Für PMA + Ionomycin lagen die Messwerte unter der Nachweisgrenze.

### 3.2.1.3. Zusammenfassung

- Für die TH1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  waren PMA + Ionomycin eindeutig die wirksamsten Stimulanzien, während bei den TH2-Zytokinen PMA + Ionomycin und anti-CD3 + anti-CD28 eine ähnliche Wirkung hervorriefen.
- Die alleinige Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA hatte ohne Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration keine ausreichende Wirkung auf die Stimulation der PMNZ. Bei Zugabe von Ionomycin potenzierte sich der Aktivierungseffekt.
- Für die TH1-Antwort reichte eine Aktivierung des TZR durch anti-CD3 + anti-CD28 nicht aus, um eine schnelle Zytokinproduktion zu bewirken.
- Auffällig war der Unterschied zwischen den Messwerten der gesunden Kontrolle und des Patienten insbesondere bei IL-2 und IL-10.

Anhand der Titrationsversuche wurden für alle weiteren Versuche Konzentrationen von 10 ng/ml für PMA und 1 nmol/ml, d. h. 0,747  $\mu$ g/ml für Ionomycin gewählt.

### 3.2.2. Zytokinproduktion bei steigendem Anteil CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen

PMNZ von 22 nachbeobachteten Patienten wurden zu definierten Zeitpunkten nach SZT nach dem im Kapitel 2.3.2. beschriebenen Protokoll stimuliert und die Konzentration der produzierten Zytokine (TH1: IL-2 und IFN- $\gamma$ ; TH2: IL-4 und IL-10) mittels ELISA im Überstand bestimmt.

Da die CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen eine wichtige zytokinproduzierende T-Zell-Untereinheit darstellen und zudem nach Transplantation das Einsetzen einer Thymus-abhängigen T-Zell-Regeneration anzeigen, wurden die Proben zur Auswertung entsprechend dem Anteil der CD45RA<sup>+</sup> Zellen aus den CD4<sup>+</sup> Zellen des Vollbluts in drei Gruppen eingeteilt (s. Tabelle 7).

Aufgrund der kleinen Gruppengröße wurde auf eine weitere Unterteilung in haploident und mit Fremdspender transplantierte Patienten verzichtet.

Alle Messwerte sind im folgenden Text im Median, der dazugehörige Streubereich in Klammern angegeben.

**Tabelle 7:** Gruppeneinteilung der Patientenproben nach CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>-Anteil, T-Zellzahl (CD3<sup>+</sup>) als Median, n = Anzahl der Patientenproben

	<i>Gruppe 1</i>	<i>Gruppe 2</i>	<i>Gruppe 3</i>
<i>CD45RA<sup>+</sup> der CD4<sup>+</sup> in %</i>	< 15%	15-30%	>30%
<i>CD3<sup>+</sup>/<math>\mu</math>l</i>	193	410	683
<i>Anzahl n</i>	32	10	11

In Bezug auf die Gruppeneinteilung wurden folgende Beobachtungen (s. Abb. 4) gemacht:

Innerhalb der **Gruppe 1** produzierten die PMNZ hauptsächlich INF- $\gamma$  mit 170 pg/ml im Median (Streubereich 0-25197). IL-2 war mit 23 pg/ml (0-3817) dagegen deutlich niedriger. Die TH2-Zytokine waren nur in Ausnahmefällen nachweisbar.

Die IL-2-Produktion innerhalb der Gruppe 2 stieg im Vergleich zu Gruppe 1 an und erreichte 3307 pg/ml (260-16674). Auch IFN- $\gamma$  stieg gegenüber Gruppe 1 an, wurde aber mit 676 pg/ml (73-90891) deutlich weniger produziert als IL-2. IL-10 mit 1 pg/ml

(0-13) und IL-4 mit 0 pg/ml (0-44) waren geringfügig nachweisbar.

Die IL-2-Produktion in der **Gruppe 3** betrug 830 pg/ml (9-7987), während IFN- $\gamma$  mit 977 pg/ml (38-34517) überwog. Von den TH2-Zytokinen war IL-10 mit 1 pg/ml gering (0-13), IL-4 nicht nachweisbar.

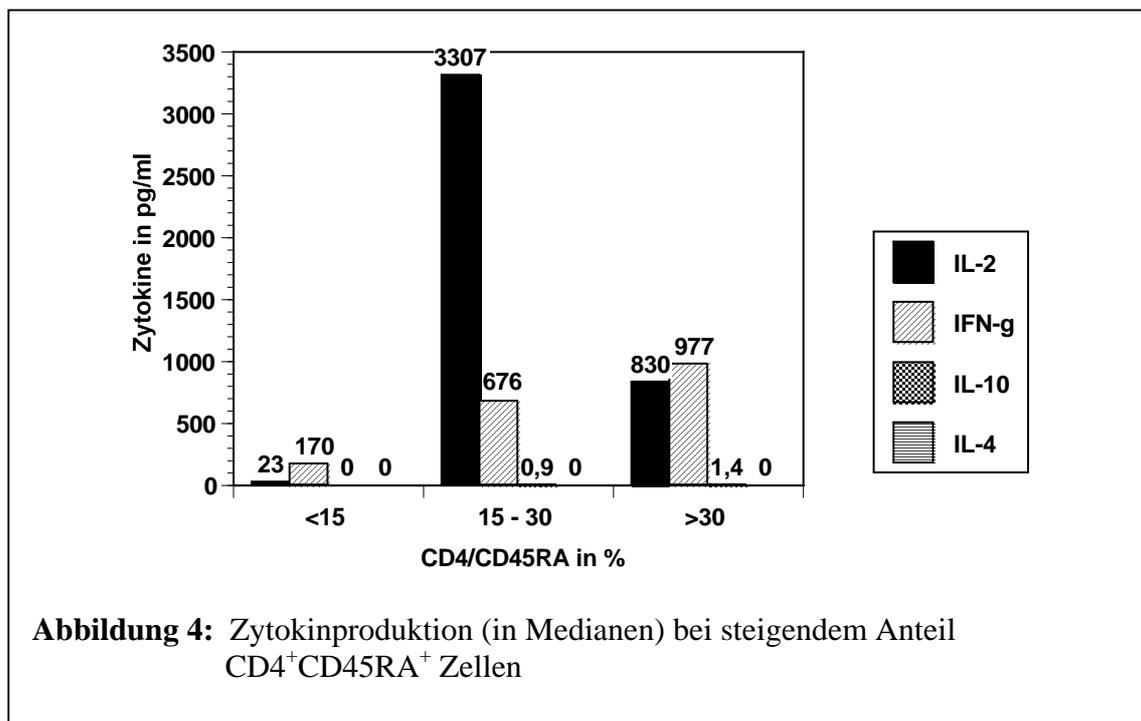
In der Gesamtschau war eindeutig ein Überwiegen der TH1-Zytokine zu erkennen. Die TH2-Zytokine wurden nur in geringen Mengen produziert.

Mit steigendem CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Anteil nahm die IL-2-Produktion mehr als 100fach zu, um im weiteren Verlauf wieder zu sinken. Die IL-2-Produktion der gesunden Kontrolle (65193 pg/ml) wurde dabei nicht erreicht.

IFN- $\gamma$  stieg im Verlauf kontinuierlich an, lag jedoch ebenfalls unter dem Messwert der gesunden Kontrolle (32298 pg/ml).

Bei IL-10, das im Verlauf kaum oberhalb der Nachweisgrenze lag, war ebenfalls eine deutliche Diskrepanz zu dem Kontrollwert von 124 pg/ml feststellbar.

IL-4 war nur in Gruppe 2 nachweisbar und erreichte dabei die Hälfte der Konzentration der Kontrollgruppe (10,6 pg/ml).



### 3.2.3. Statistische Analyse

Nach Logarithmieren der Daten wurde eine Regressionsanalyse zur Überprüfung der Abhängigkeit der Zytokinkonzentration vom Anteil naiver, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen durchgeführt.

Dabei ergab sich für die Residuen der **IL-2**-Konzentration ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,26$  zur Beurteilung der Güte der Anpassung der Funktion an die Messwerte ( $n = 46$ ). Für die Steigung der Regressionsgeraden, die sich in der statistischen Prüfung signifikant von Null unterschied, erhielt man einen Schätzwert von 0,093, 95%-Konfidenzintervall [0,046; 0,14]. Damit bestand mit einem Anstieg der IL-2-Konzentration um 24 % pro Prozentpunkt CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen ein quantifizierbarer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen (s. a. Tabelle 8).

Bei der Durchführung der Regressionsanalyse für **IFN- $\gamma$**  erhielt man mit  $r^2=0,076$  ein niedrigeres Bestimmtheitsmaß als bei IL-2.

Die geschätzte Steigung der Regressionsgeraden betrug 0,036, 95%-Konfidenzintervall [-0,0004; 0,073]. In der statistischen Prüfung war die Steigung nicht sicher von Null verschieden. Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen und der IFN- $\gamma$ -Konzentration war also nicht sicher darstellbar.

Das Diagramm (Abb. 5) zeigte bei IFN- $\gamma$  verglichen mit IL-2 die geringere Steigung und eine deutlich breitere Streuung mit weiteren Referenzbändern.

Für **IL-4** und **IL-10** ergaben sich mit 0,0099 und 0,014 sehr geringe Schätzwerte der Steigungen. In der Prüfung konnten die Steigungen nicht sicher von Null unterschieden werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen und der IL-4 bzw. IL-10-Konzentration konnte daher nicht sicher dargestellt werden.

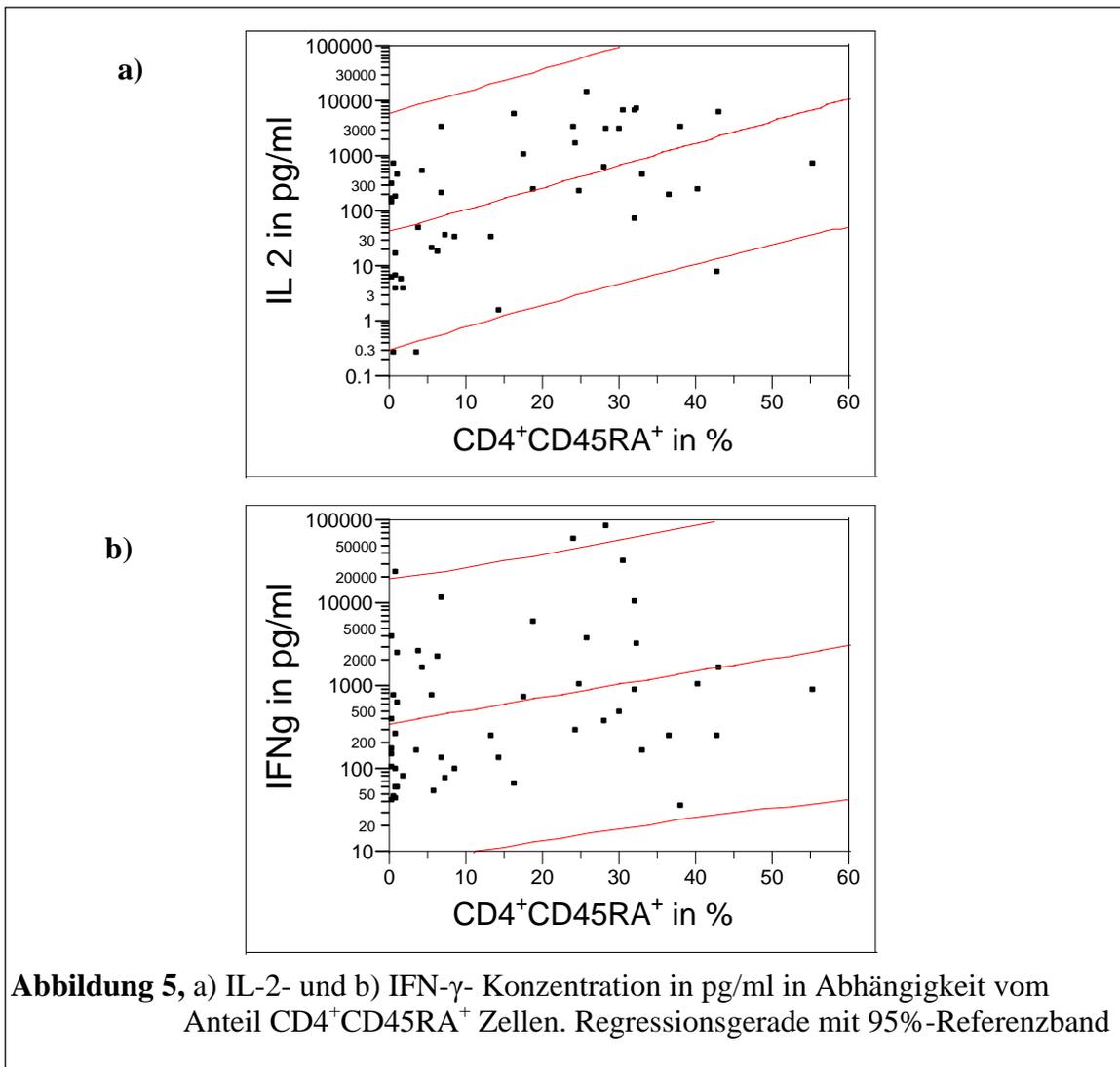
**Tabelle 8 a), b):** Regressionsanalyse für IL-2 und IFN- $\gamma$  in Abhängigkeit vom Anteil  $CD4^+CD45RA^+$  Zellen

**a) IL-2**

	Schätz- wert	Standard- fehler	t Ratio	P >  t	95%-Konfidenzintervall von	bis
Achsenabschnitt	3.77	0.51	7.32	<.0001	2.73	4.80
$CD4^+CD45RA^+$	0.093	0.023	3.98	0.0003	0.046	0.14

**b) IFN- $\gamma$**

	Schätz- wert	Standard- fehler	t Ratio	P >  t	95%-Konfidenzintervall von	bis
Achsenabschnitt	5.88	0.39	15.22	<.0001	5.10	6.65
$CD4^+CD45RA^+$	0.036	0.018	1.99	0.0524	-0.00040	0.073



### 3.2.4. Zeitlicher Verlauf der Zytokinproduktion

Im Folgenden soll die Zytokinproduktion der PMNZ im zeitlichen Verlauf ohne Berücksichtigung des  $CD4^+CD45RA^+$ -Anteils dargestellt werden (siehe auch Abb. 6).

**IL-2** wurde in den ersten 6 Monaten nur in geringen Mengen (25-40 pg/ml) produziert und stieg im weiteren Verlauf kontinuierlich an. Das Maximum lag im letzten Abschnitt des Beobachtungszeitraums mit 3744 pg/ml (Streubereich 830-3881 pg/ml).

Die **IFN- $\gamma$** -Produktion überwog in den ersten 6 Monaten gegenüber der IL-2-Produktion. Nach einem frühen Maximum von 1553 pg/ml (0-4347) zu Beginn der Regeneration nahm die Produktion stark ab, um ab dem 8. Monat wieder stark anzusteigen und mit einer maximalen Konzentration von 17744 pg/ml (38-90891) nach 10 Monaten deutlich zu überwiegen.

Die **TH2-Zytokine** waren dauerhaft nur in geringer Konzentration nachweisbar. Die maximale Produktion von IL-10 lag im Beobachtungszeitraum Tag 240-300 bei 4,2 pg/ml (0-9) und von IL-4 bei 6,8 pg/ml (0-39,2) zwischen Tag 180-240.

