

3.3. Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung

3.3.1. Vorversuche zur Optimierung der intrazellulären Zytokinfärbung

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurde eine Titrationsreihe durchgeführt. Dabei wurden die Zellansätze mit den Mitogenen PMA und Ionomycin für 4, 6, 8 und 10 Stunden inkubiert. Danach wurden die Aktivierung mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD69 und die intrazelluläre Produktion der TH1-Zytokine (IL-2, IFN- γ), und der TH2-Zytokine (IL-4, IL-10) gemessen.

Die Aktivierung sowie die Produktion von IL-2 und IFN- γ waren bereits nach 4 Stunden am höchsten, während IL10 und IL4 nach 6 Stunden ihr Maximum erreichten.

Tabelle 9: Kinetik der Zytokinproduktion bei Kontrollzellen. Gate: CD3⁺, n = 2

<i>Inkubationszeit</i>	<i>4 h</i>	<i>6 h</i>	<i>8 h</i>	<i>10 h</i>
<i>CD 69 in %</i>	77,2	68,3	47,2	52,5
<i>IL-2 in %</i>	15,2	10,6	10,4	7,3
<i>IFN-γ in %</i>	12,0	9,2	6,6	15,7
<i>IL-10 in %</i>	0,6	1,4	1,0	1,2
<i>IL-4 in %</i>	0,5	1,3	1,1	1,3

Aufgrund der Vorversuche wurde eine Inkubationszeit von 6 Stunden gewählt unter Berücksichtigung eines maximalen Anteils der TH2-Zytokine IL-4 und IL-10 nach 6 Stunden (s. Tabelle 9).

3.3.2. Gruppeneinteilung

Die folgenden Auswertungen der Ergebnisse basieren auf der unter 3.2.2. beschriebenen Gruppeneinteilung. So umfasst die Gruppe 1 Patienten mit einen Anteil von 0-15 %, die Gruppe 2 mit 15-30 %, die Gruppe 3 mit über 30 % an CD45RA⁺ Zellen der CD4⁺ T-Lymphozyten in der begleitenden FACS-Analyse des Vollbluts. Mit jeder Versuchsreihe wurden zusätzlich Lymphozyten eines gesunden Spenders unter

identischen Bedingungen stimuliert. Die Anzahl n der stimulierten Patientenproben betrug in Gruppe 1 $n = 9$, in Gruppe 2 $n = 5$ und in Gruppe 3 $n = 12$.

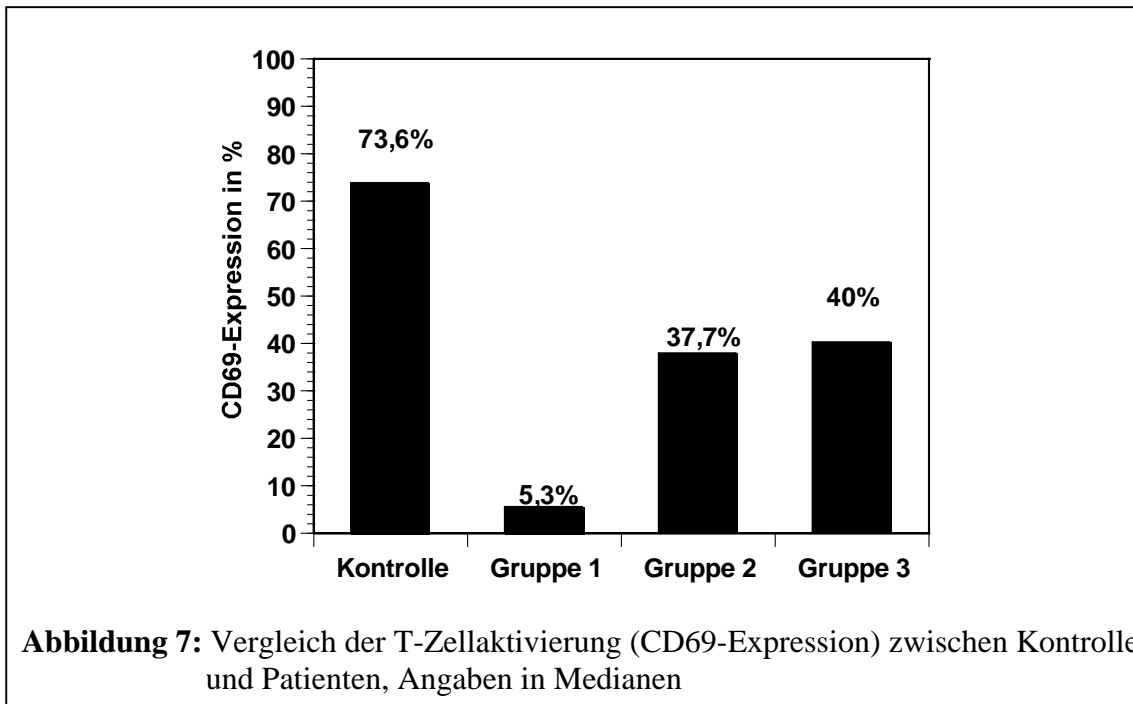
3.3.3. Zellaktivierung

Zum Nachweis der Zellaktivierung wurden monoklonale Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD69 verwendet, welches als frühestes Glykoprotein nach Aktivierung auf der Zelloberfläche von T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen exprimiert wird. Die nachfolgenden Angaben sind alle im Median mit dem dazugehörigen Streubereich in Klammern.

Von den Kontrollzellen eines gesunden Probanden exprimierten im Median 73,6 % (Streubereich 39,3 - 93,4 %, $n = 23$) CD69 auf der Zelloberfläche.

Im Verlauf der Regeneration, d. h. bei zunehmendem $CD4^+CD45RA^+$ -Anteil stieg die CD69-Expression der stimulierten Zellen kontinuierlich an. In der Gruppe 1 ließen sich nur 5,3 % (2,5-9,5 %; $n = 9$) der $CD3^+$ Zellen aktivieren. Innerhalb der Gruppe 2 exprimierten 37,7 % (10,5-65,0 %; $n = 5$) der T-Zellen CD69. Zur Gruppe 3 hin stieg der Anteil der $CD69^+$ Zellen auf 40,0 % (13,4-64,4 %; $n = 12$) und lag damit immer noch deutlich unter der Zellaktivierung der Kontrollzellen (s. Abb. 7).

Im Folgenden wurde anhand der CD69-Expression die Aktivierungsfähigkeit der $CD45RA^+$ und $CD45RO^+$ Subpopulationen betrachtet. Hier wurde deutlich, dass sich 83,2 % der $CD45RA^+$ T-Zellen des Kontrollbluts ($n = 15$) aktivieren ließen im Vergleich zu 38,9 % der $CD45RO^+$. Im Verlauf der Regeneration stieg der Anteil der $CD69^+$ Zellen aus den $CD45RA^+$ Zellen von 4,6 % in Gruppe 1 über 36,3 % in Gruppe 2 auf 55,9 % in Gruppe 3. Parallel dazu nahm auch die Aktivierungsfähigkeit der $CD45RO^+$ Zellen zu. Von den $CD45RO^+$ Zellen waren in Gruppe 1 1,7 % aktiviert, in Gruppe 2 14,8 %. In Gruppe 3 vergrößerte sich dieser Anteil auf 19,9 %.



Zur statistischen Beurteilung der Abhängigkeit der CD69-Expression vom Anteil $CD4^+CD45RA^+$ Zellen wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Nach logit-Transformation zur Homogenisierung der Varianzen erreichte man ein Bestimmtheitsmaß als Maß für die Güte der Anpassung der Funktion an die Messwerte von $r^2 = 0,52$ bei 27 Messwerten.

Der Schätzwert der Steigung betrug $\beta = 0,057$, 95%-Konfidenzintervall $[0,034; 0,079]$, und war im statistischen Test signifikant von Null verschieden. In Abhängigkeit vom Anteil $CD4^+CD45RA^+$ Zellen stieg der Anteil aktivierter Zellen (s. Abb. 8).

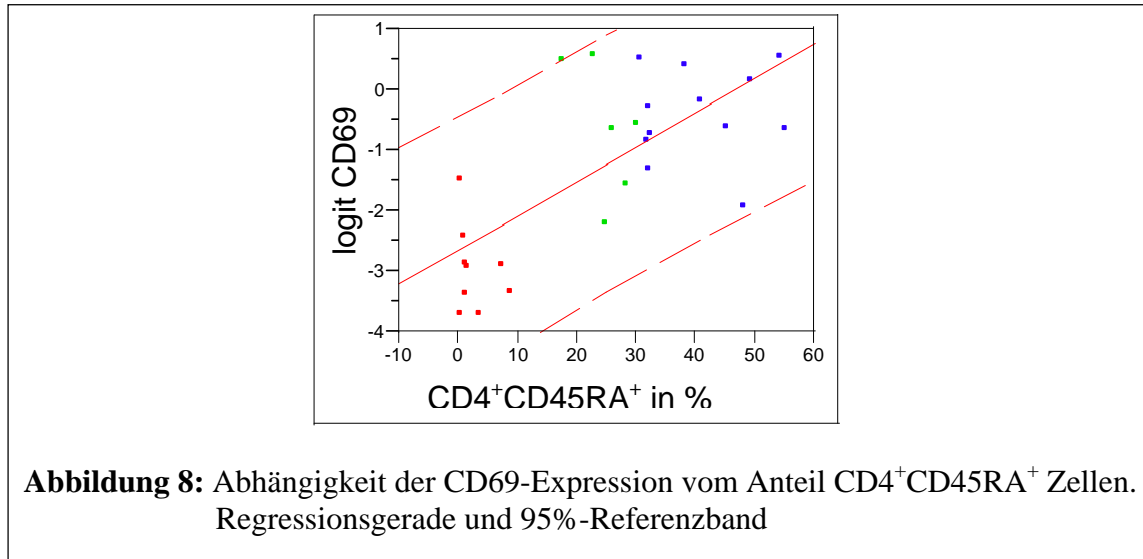
Tabelle 10 a), b) Regressionsanalyse für die Abhängigkeit der CD69-Expression vom Anteil $CD4^+CD45RA^+$ Zellen

a) Varianzanalyse

	<i>Freiheitsgrade</i>	<i>Summe der Abweichungsquadrate</i>	<i>Mittleres Abweichungsquadrat</i>	<i>F</i>
<i>Modell</i>	1	27.79	27.79	27.17
<i>Residuen</i>	25	25.57	1.023	P
<i>Gesamt</i>	26	53.35		<.0001

b) Schätzwerte der Parameter

	Schätz- wert	Standard- fehler	t Ratio	Prob> t	95%-Konfidenzintervall von	bis
Achsenabschnitt	-2.65	0.33	-8.05	<.0001	-3.33	-1.97
CD45RA	0.057	0.011	5.21	<.0001	0.034	0.079



3.3.4. Intrazelluläre Färbung der PMNZ

3.3.4.1. Zytokinprofil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten

Wie in Tabelle 11 ersichtlich, produzierten im Median 15,3 % der CD4⁺ Kontrollzellen IL-2. Mit steigendem CD45RA-Anteil im Verlauf der T-Zell-Regeneration nahm auch der Anteil an IL-2-bildenden CD4⁺ Lymphozyten zu, erreichte jedoch mit 9,7% IL-2⁺CD4⁺ Zellen im Median nicht den Anteil der Kontrolle. Von den CD4⁺ T-Zellen der Kontrolle produzierten 6,6 % IFN- γ . Früh nach Transplantation waren im Median 2,2 % der Zellen IFN γ ⁺. Der Anteil nahm im weiteren Verlauf auf 2,9 % zu. Die TH2-Zytokine wurden von den CD4⁺ Zellen der Kontrolle und aller 3 Gruppen in geringem Ausmaß produziert. Im Verlauf der Regeneration war ein Anstieg von 0,4 % IL-4 und 0,3 % IL-10 in Gruppe 1 auf 0,6 % IL-4 und 0,5 % IL-10 feststellbar.

Die CD8⁺ Zellen waren in geringerem Ausmaß IL-2-positiv als die CD4⁺ Zellen. Unter den Kontrollzellen betrug dieser Anteil im Median 11,3 %. Nach Transplantation stieg er kontinuierlich auf 3,7 % in Gruppe 3 an, und betrug damit ca. ein Drittel der

IL2⁺/CD4⁺ Zellen. Dagegen wurde IFN- γ von 14,5 % der CD8⁺ Kontrollzellen produziert. Im Verlauf der Regeneration waren in Gruppe 1 2,6 % der CD8⁺ Zellen IFN- γ ⁺. Dieser Anteil stieg sukzessive zu Gruppe 3 hin auf 6,4 %. Unter den CD8⁺ T-Zellen überwog also kontinuierlich die IFN- γ -Synthese im Vergleich zu den anderen Zytokinen. Auch hier wurden die TC2-Zytokine in sehr geringem Ausmaß (0,1 % IL-4 und 0,2 % IL-10 in Gruppe 1) produziert. Früh nach Transplantation war IL-10 bei 0,9 % der CD8⁺ T-Zellen nachweisbar und nahm im weiteren Verlauf wieder ab. Die IL-4-Synthese der CD8⁺ Lymphozyten nahm zu Gruppe 2 hin zu und lag damit, wie auch bei IL-10 ersichtlich, kontinuierlich über der TC2-Zytokinproduktion der Kontrollzellen.

Tabelle 11: Zytokinproduktion der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten, Angaben in Prozent und als Median

	<i>Kontrolle</i>	<i>Gruppe 1</i>	<i>Gruppe 2</i>	<i>Gruppe 3</i>
<i>Anzahl n</i>	23	7	5	12
<i>CD4⁺ Zellen</i>				
IL-2 in %	15,3	1,8	8,9	9,7
IFN-γ in %	6,6	2,2	2,2	2,9
IL-4 in %	0,6	0,4	0,5	0,6
IL-10 in %	0,7	0,3	0,6	0,5
<i>CD8⁺ Zellen</i>				
IL-2 in %	11,3	1,3	2,2	3,7
IFN-γ in %	14,5	2,6	3,2	6,4
IL-4 in %	0,1	0,5	0,8	0,7
IL-10 in %	0,2	0,9	0,4	0,3

Bezogen auf die Gesamtheit der CD3⁺ Zellen war, wie in Abbildung 9 a) ersichtlich, IL-2 mit 14 % (2,7-43,7 %) das am meisten produzierte Zytokin der Kontrolle. Der überwiegende Anteil der T-Zellen bestand dabei aus CD4⁺ Zellen (10,5 %), 3,5 % waren CD8⁺.

In der frühen Regenerationsphase (Gruppe 1) produzierte nur 1 % (0,5 % CD4⁺; 0,5 % CD8⁺) der T-Zellen **IL-2**. Zur Gruppe 2 hin stieg die IL-2-bildende Zellzahl auf 6,1 % (5,3 % CD4⁺; 0,8 % CD8⁺). Von Gruppe 2 zu 3 erhöhte sich der Anteil der IL-2 produzierenden Zellen auf 8,3 %, mit 6,8 % CD4⁺ T-Zellen und 1,5 % CD8⁺ Zellen. Der Prozentsatz der Kontrolle wurde auch in Gruppe 3 nicht erreicht.

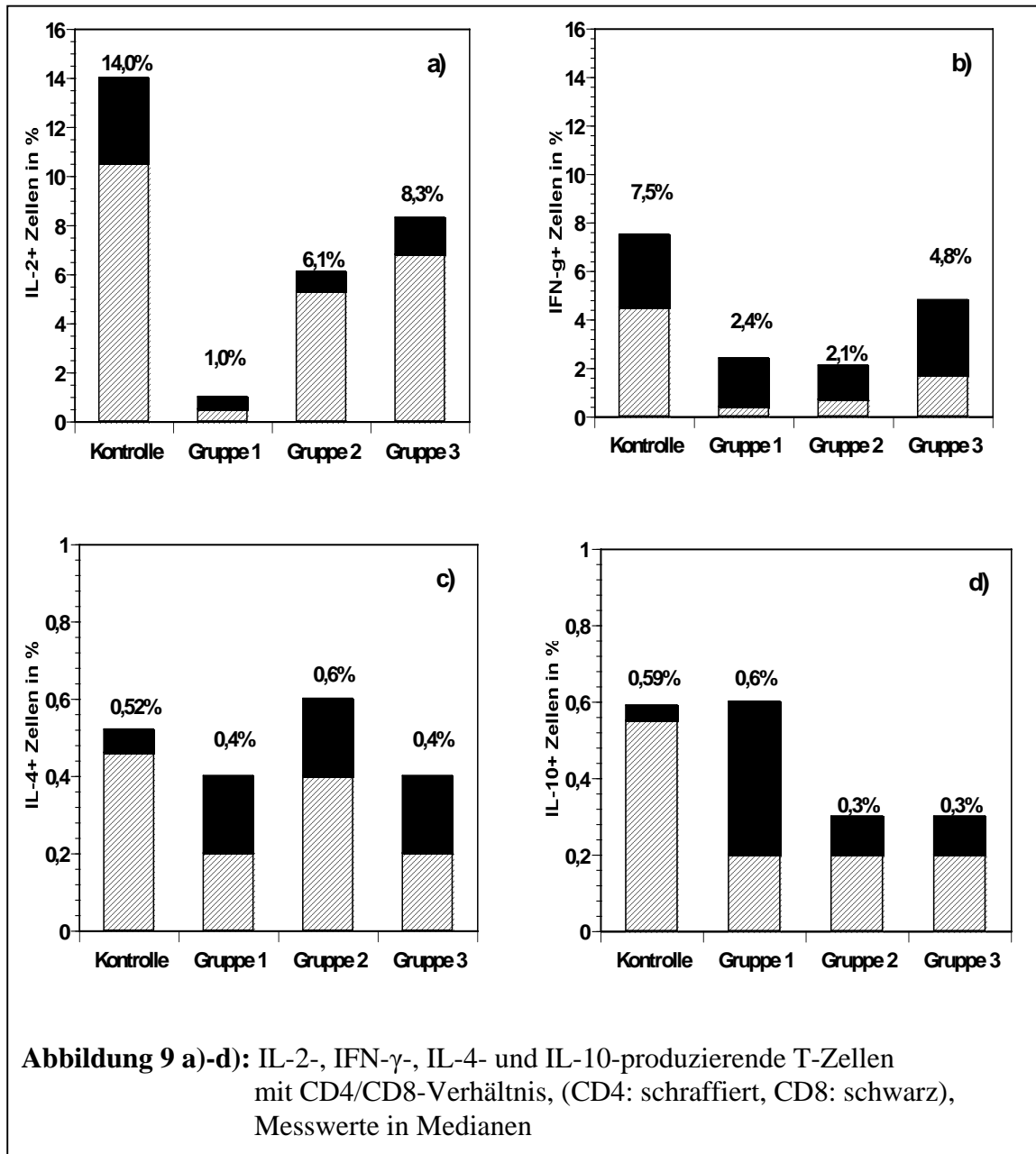
IFN- γ (Abbildung 9 b) wurde von den T-Zellen der Kontrolle mit 7,5 % (2,1-15,9) nur ca. halb so häufig produziert wie IL-2. Dabei überwogen die CD4⁺ Zellen mit 4,5 % im Vergleich zu 3 % CD8⁺ Lymphozyten. In der Gruppe 1 erreichte die IFN- γ -Produktion 2,4 % (0,4 % CD4⁺; 2 % CD8⁺) und war damit das am häufigsten produzierte Zytokin. In Gruppe 2 lag der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen bei 2,1 % (0,7 % CD4⁺; 1,4 % CD8⁺), in Gruppe 3 stieg er auf 4,8 % (1,7 % CD4⁺; 3,1 % CD8⁺) an. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen überwogen in der IFN- γ ⁺ Subpopulation bei den Patienten die CD8⁺ Zellen deutlich.

Um die Frage zu klären, ob es sich bei den IL-2⁺ und den IFN- γ ⁺ Zellen um dieselbe Zellpopulation handelte, wurden die Lymphozyten doppelt angefärbt. Die Kontrollzellen waren nur zu 2,1 % (0,3-4,4 %) für beide TH1 Zytokine positiv.

Die beiden untersuchten TH2-Zytokine wurden von den Kontrollzellen in ähnlich geringem Ausmaß produziert.

IL-4⁺ (Abb. 9 c) waren 0,52 % (0,1-1,2 %) der Kontrollzellen. Dabei handelte es sich bei dem überwiegenden Anteil (0,46 %) um CD4⁺ Zellen und nur zu 0,06 % um CD8⁺ Zellen. Nach Transplantation schwankte der IL-4⁺ Anteil an T-Zellen zwischen 0,4 und 0,6 % mit einem ungefähr ausgeglichenen Verhältnis zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen.

IL-10 (Abb. 9 d) wurde von 0,59 % (0,18-1,3 %) der Kontrollzellen produziert (0,55 % CD4⁺; 0,04 % CD8⁺). Dieser Prozentsatz wurde nach Transplantation schon in der Gruppe 1 (0,6 % IL-10⁺) erreicht, wobei die CD8⁺ Zellen (0,4 %) überwogen. Im Verlauf der Regeneration sank der Anteil IL-10-produzierender Zellen auf 0,3 %. Hierbei handelte es sich mit 0,2 % vor allem um CD4⁺ Zellen.



3.3.4.2. Zusammenfassung

Die Relation von CD4 zu CD8 unter den Zytokin-bildenden Zellen war bei IFN- γ in der frühen Regenerationsphase zugunsten der CD8 $^{+}$ Zellen verschoben. Unter den IFN- γ $^{+}$ Zellen überwogen weiterhin die CD8 $^{+}$ Lymphozyten.

Bezüglich der TH2-Zytokine war eine gegenläufige Entwicklung festzustellen.

Die Anzahl der IL-4 und IL-10 produzierenden Zellen lag schon in der Gruppe 1 in

Höhe der Kontrolle, und sank im weiteren Verlauf wieder ab (siehe Abb. 9).

Bei Kontrolle und Patienten produzierten nicht alle aktivierten Zellen Zytokine.

3.3.4.3. Weitere phänotypische Charakterisierung der Zytokin-positiven Zellen

Um naive und Gedächtnis-T-Zellen unter den Zytokin-produzierenden Zellen zu unterscheiden, wurden diese zusätzlich mit Antikörpern gegen CD45RA und CD45RO angefärbt.

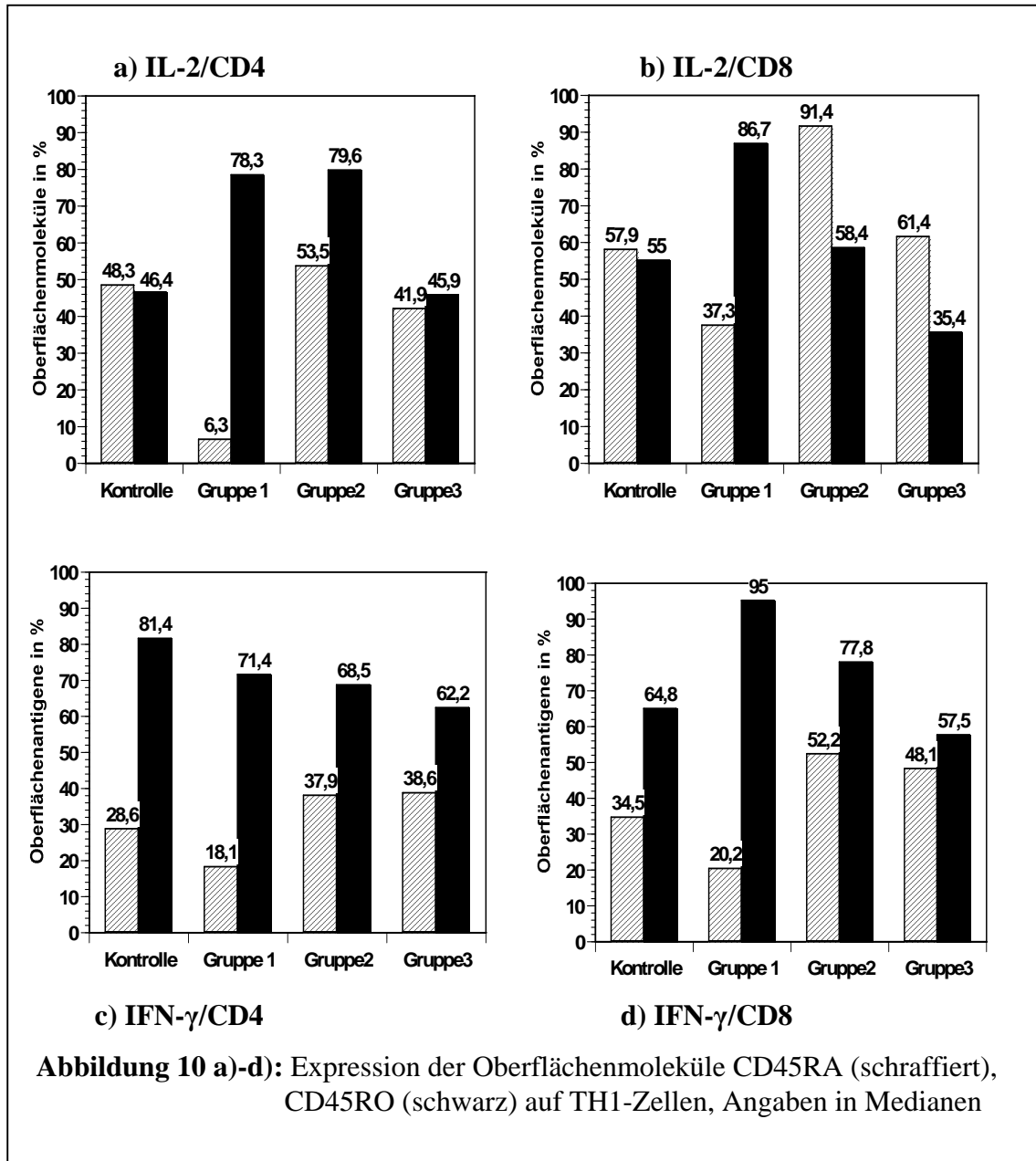
3.3.4.3.1. Zytokinproduktion der naiven und Gedächtnis-Zellen

IL-2 wurde von den Kontrollzellen, wie auf Abb. 10 a) ersichtlich, fast zu gleichen Teilen von $CD4^+CD45RA^+$ (48,3 %) und $CD4^+CD45RO^+$ (46,4 %) T-Zellen produziert. Im Vergleich dazu überwogen in der Gruppe 1 mit 78,3 % die $CD4^+CD45RO^+$ T-Zellen in der IL-2-Produktion, während die $CD45RA^+$ nur mit 6,3 % zur IL-2-Produktion beitrugen. Im weiteren Verlauf der Regeneration sank der Anteil der $CD45RO^+$ Zellen deutlich ab, die IL-2-produzierenden $CD45RA^+$ Zellen stiegen zur Gruppe 3 hin an, so dass hier ein der Kontrolle ähnliches Verhältnis von $CD4^+CD45RA^+$ zu $CD4^+CD45RO^+$ Zellen vorlag. Auch unter den $IL-2^+ CD8^+$ Zellen (Abb. 10 b) der Kontrolle war das Verhältnis von $CD45RA^+$ zu $CD45RO^+$ ausgeglichen (57,9% : 55%). Hier war in der Gruppe 1 ebenfalls ein Überwiegen des $CD45RO^+$ Anteils (86,7%) zu beobachten, der kontinuierlich auf 35,4 % in der Gruppe 3 sank.

IFN- γ (Abb. 10 c) wurde von den $CD4^+$ Kontrollzellen zu 81,4 % von $CD45RO^+$ Zellen und von $CD45RA^+$ zu 28,6% produziert. Auch hier nahm nach Transplantation der Anteil der $CD45RO^+$ Zellen kontinuierlich von 71,4 % in Gruppe 1 auf 62,2 % in Gruppe 3 ab, während der Prozentsatz an $CD45RA^+$ von 18,1 % in Gruppe 1 auf 38,6 % in Gruppe 3 sukzessiv anstieg. Es überwogen, wie auch in der Kontrolle, dauerhaft die $CD45RO^+$ Zellen bei der IFN- γ -Produktion unter den $CD4^+$ Zellen.

Unter den $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 10 d) war das Verhältnis von $CD45RA^+$ zu $CD45RO^+$ unter den Kontrollzellen 34,5 % zu 64,8 %. Im Verlauf der Regeneration überwogen in Gruppe 1 die $CD45RO^+$ Zellen mit 95 % in Gruppe 1 deutlich, nahmen aber auf 57,5 % in Gruppe 3 ab. Der Anteil der $CD45RA^+$ Zellen war anfänglich sehr gering (20,2 % in

Gruppe 1), stieg kontinuierlich auf 48,1 % in Gruppe 3 an.



Aufgrund des sehr geringen Anteils an IL-4 und IL10-produzierenden T-Zellen war die exakte Zuordnung zu CD45RA⁺ und CD45RO⁺ an der Grenze der Nachweisbarkeit (Abb. 9 c, d). Für beide Zytokine ließ sich jedoch bei den Kontrollzellen ein Trend hin zu CD45RO⁺ feststellen.

Auch im Verlauf der Regeneration nach Transplantation überwogen die CD45RO⁺ T-

Zellen bei beiden Zytokinen dauerhaft, während der Anteil der CD45RA⁺ T-Zellen gering blieb (Daten nicht dargestellt).

3.3.4.3.2. Statistische Analyse

Zum Vergleich der Abhängigkeit der betrachteten Zytokine vom Anteil CD4⁺CD45RA⁺ Zellen wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt.

Der Test der Einflussgrößen erbrachte einen signifikanten Effekt des Anteils CD4⁺CD45RA⁺ Zellen auf den Prozentsatz Zytokin-positiver Zellen. Die Einflussgröße „Zytokin“ und die Wechselwirkung zwischen den beiden Einflussgrößen „Zytokin*CD4⁺CD45RA⁺“ zeigten keine signifikanten Effekte. Der Schätzwert der Steigung der Geraden bei mittlerem CD4⁺CD45RA⁺ Anteil betrug für **IL-2** 0,042, 95%-Konfidenzintervall [0,028; 0,056], und war damit deutlich von Null verschieden. Ein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen konnte hergestellt werden. Für **IFN- γ** wurde die mittlere Steigung auf 0,016, 95%-Konfidenzintervall [0,002; 0,031], geschätzt, und unterschied sich damit nur geringfügig von Null.

Nach Interpolation der Geraden war bis zu einem CD4⁺CD45RA⁺ Anteil von ca. 10 % ein Überwiegen des Anteils IFN- γ ⁺ Zellen zu erkennen, bei einem weiteren Anstieg des Anteils naiver Zellen überwog bei deutlich höherer Steigung der Anteil IL-2⁺ Zellen (s. Abb. 11).

Für die beiden **TH-2-Zytokine IL-10 und IL-4** wurden nach logit-Transformation mit $r^2 = 0,14$ für IL-4 und $r^2 = 0,207$ für IL-10 niedrige Bestimmtheitsmaße zur Beurteilung der Güte der Anpassung erhalten. Die Schätzwerte für die Steigungen waren mit $-0,018$ für IL-4 und $-0,021$ für IL-10 negativ. In der Prüfung unterschieden sie sich nicht sicher von Null, die in beiden entsprechenden Konfidenzintervallen enthalten war.

Tab. 12 a)-c): Kovarianzanalyse der relativen Zytokinkonzentration in Abhängigkeit vom Anteil CD4⁺CD45RA⁺ Zellen

a) Varianzanalyse

	<i>Freiheits- grade</i>	<i>Summe der Abweichungsquadrate</i>	<i>Mittleres Abweichungsquadrat</i>	<i>F</i>
<i>Modell</i>	3	19	6,33	7,38
<i>Residuen</i>	49	42	0,86	P
<i>Gesamt</i>	52	61		0,0004

b) Test der Einflussgrößen

	<i>N parm</i>	<i>Freiheits- grade</i>	<i>Summe der Abweichungsquadrate</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Zytokin</i>	1	1	2	2,42	0,13
<i>CD4⁺CD45RA⁺</i> ¹	1	1	14	16,67	0,0002
<i>Zytokin*CD4⁺CD45RA⁺</i> ²	1	1	2	3,21	0,080

c) Erweiterte Schätzwerte

	<i>Schätzwert</i>	<i>95%-Konfidenzintervall von bis</i>	
<i>Achsenabschnitt</i>	-4.08	-4.51	-3.65
<i>Zytokin [logit IFN-γ]</i>	-0.20	-0.45	0.058
<i>Zytokin [logit IL-2]</i>	0,20	-0.058	0.45
<i>CD4⁺CD45RA⁺</i>	0.029	0.015	0.043
<i>Zytokin [logit IFN-γ]* (CD4⁺CD45RA⁺ -24.2)</i> ³	-0.013	-0.027	0.0015
<i>Zytokin [logit IL-2]* (CD4⁺CD45RA⁺ -24.2)</i> ⁴	0.013	-0.0015	0.027

¹ Anteil an CD4⁺CD45RA⁺ Zellen

² Wechselwirkung zwischen Zytokin und Anteil an CD4⁺CD45RA⁺ Zellen

^{3 4} Steigung zur mittleren Zeit in Abhängigkeit vom Anteil an CD4⁺CD45RA⁺ Zellen

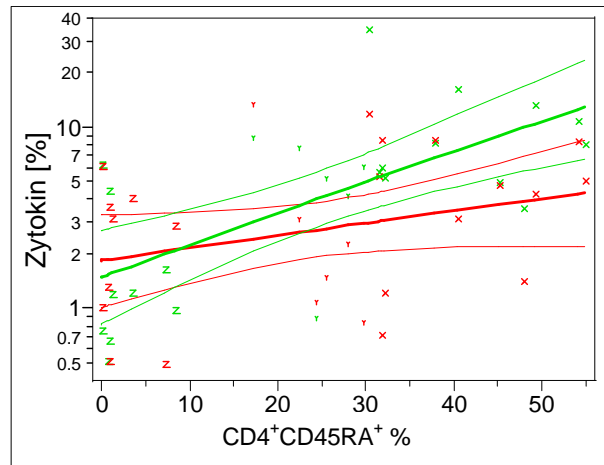


Abbildung 11: Relative Zytokinkonzentration (IL-2 grün, IFN- γ rot) in Abhängigkeit vom Anteil CD4⁺CD45RA⁺ Zellen. Interpolierte Geraden mit 95%-Konfidenzbändern

3.3.4.3.3. Zusammenfassung

Bezüglich der betrachteten Zellen fiel auf, dass der CD45RO⁺ Anteil im Verlauf der Regeneration absank, während der Anteil CD45RA⁺ Zellen anstieg. Bei den IFN- γ ⁺ Zellen überwogen dauerhaft die CD45RO⁺ Zellen, bei den IL-2⁺ CD4⁺ Zellen glichen sich die Anteile an, bei den IL-2⁺ CD8⁺ Zellen überwog am Ende des Beobachtungszeitraums CD45RA.

Die statistische Analyse erbrachte eine eindeutige Abhängigkeit der relativen IL-2-Konzentration vom Anteil CD4⁺CD45RA⁺ Zellen. Für IFN- γ und die TH-2-Zytokine ließ sich dies nicht sicher feststellen.

3.4. Zytokinproduktion am Beispiel eines Patienten

3.4.1. Patientendaten

Zur exemplarischen Darstellung des Verlaufs der Zytokinproduktion wurde ein Patient (UPN 40150) mit Blackfan Diamond Anämie als nichtmaligne Grunderkrankung ausgewählt, der eine CD34⁺ angereicherte, T-Zell-depletierte, idente PBSZT eines Fremdspenders erhielt. Nach Transplantation konnte die fortschreitende Regeneration anhand der folgenden Ergebnisse am Tag 89 und 220 charakterisiert werden.

Während die Anzahl an Leukozyten und Lymphozyten sich in diesem Beobachtungszeitraum kaum änderte, stieg der Anteil der CD4⁺CD45RA⁺ Zellen um den Faktor 10 an.

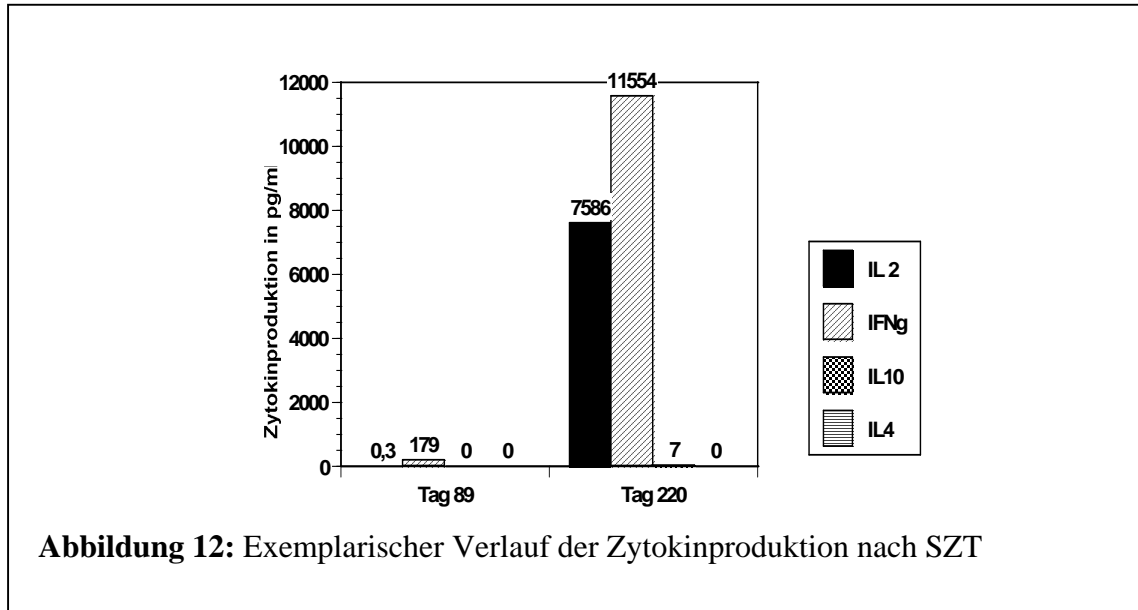
Tabelle 13: Zellzahlen des Patienten im Verlauf der Immunrekonstitution

<i>Tag</i>	<i>89</i>	<i>220</i>
<i>Leukozyten/μl</i>	4800	5040
<i>Lymphozyten in %</i>	27,7	31,9
<i>Lymphozyten/μl</i>	1330	1608
<i>CD3⁺ in %</i>	42,4	51,3
<i>CD3⁺/μl</i>	564	825
<i>CD4⁺CD45RA⁺ in %</i>	3,4	31,8

3.4.2. Zytokinproduktion des Patienten – Ergebnisse aus ELISA

Wie auch zu Beginn der Regeneration (Tag 0-60, Abb. 6, Kapitel 3.2.4.) beobachtet wurde, überwog am Tag 89 die IFN-γ-Produktion.

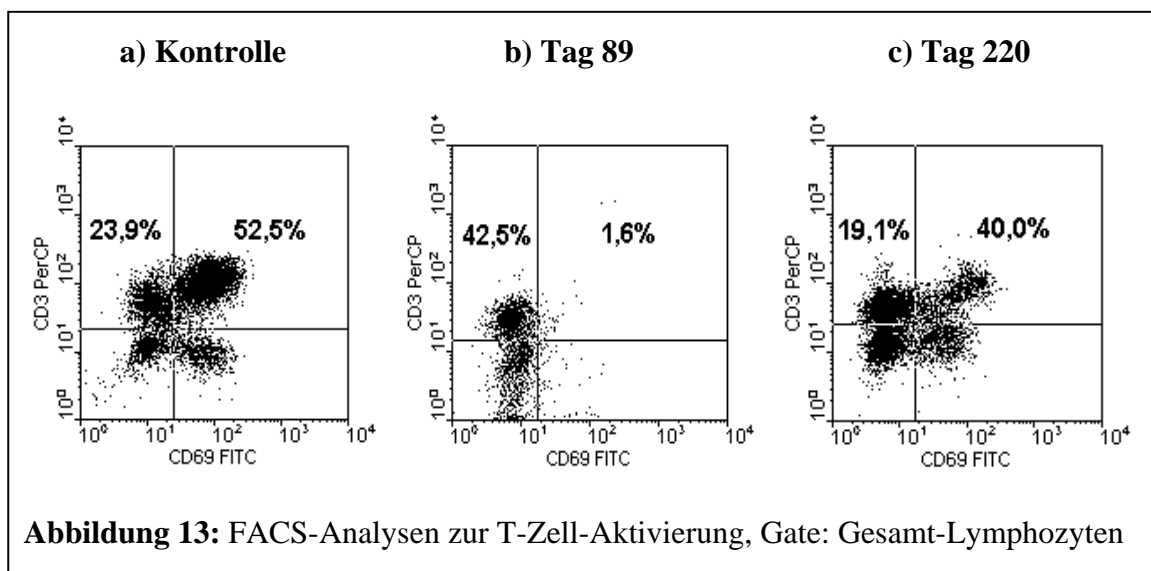
Neben dem Anteil der CD4⁺CD45RA⁺ Zellen stiegen IL-2- und IFN-γ-Produktion im Beobachtungszeitraum deutlich an. Bei einem Vergleich mit Kapitel 3.2.4. lässt sich die Patientenprobe mit einem Überwiegen der IFN-γ-Produktion zwischen die beiden letzten Beobachtungszeiträume des zeitlichen Verlaufs der Zytokinproduktion einordnen.



3.4.3. Zytokinproduktion des Patienten - Ergebnisse aus IZF

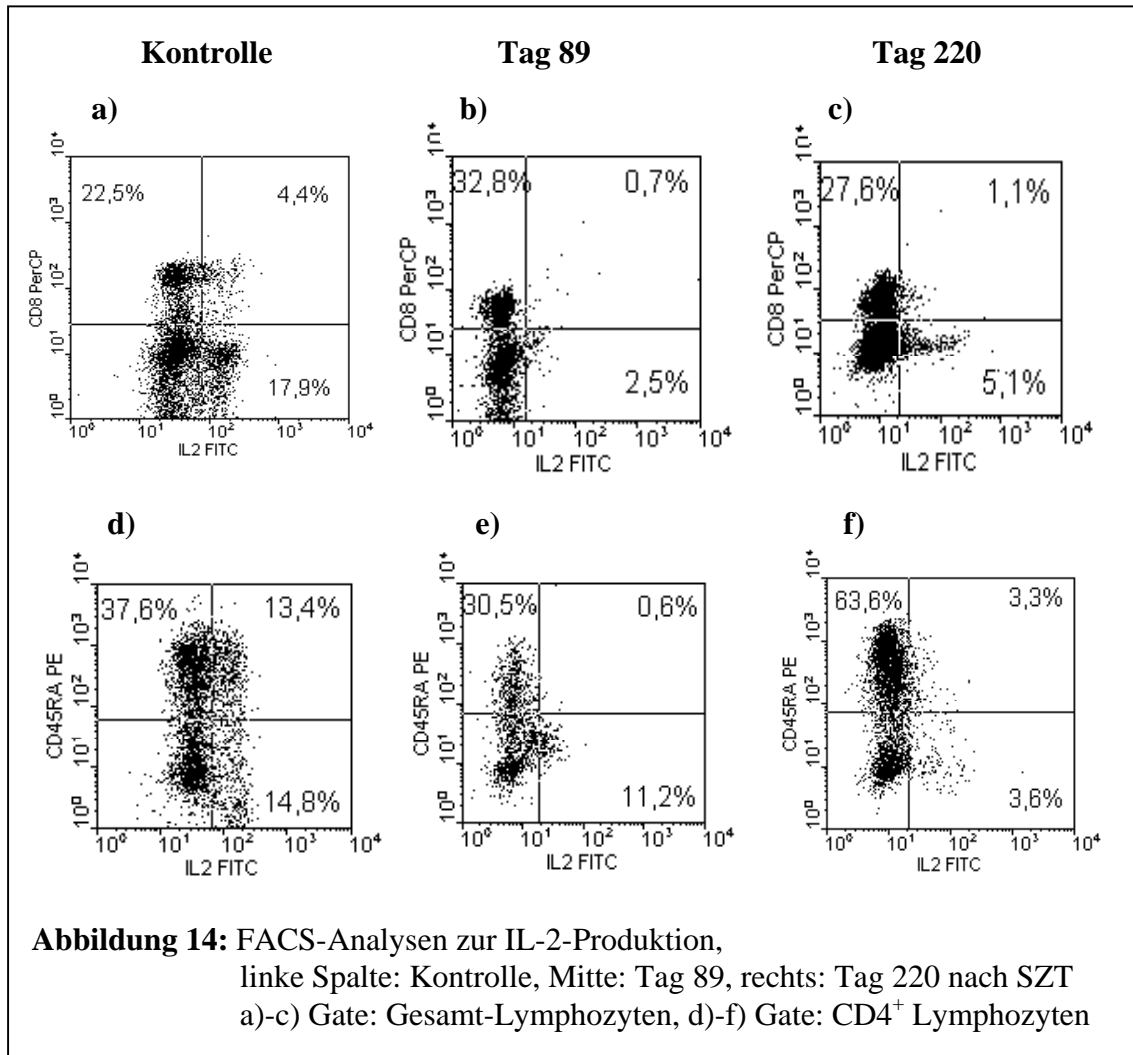
3.4.3.1. Zellaktivierung

Von Tag 89 zu Tag 220 nahm die T-Zell-Aktivierung deutlich zu. Die Aktivierbarkeit der Kontrollzellen wurde jedoch nicht erreicht (siehe Abb. 13). Am Tag 89 waren 63,6% der aktivierten Zellen CD45RO⁺ und 27,8% CD45RA⁺, während am Tag 220 ein Verhältnis von 21,7% CD45RO⁺ zu 78% CD45RA⁺ aktivierten Zellen vorlag.



3.4.3.2. Nähere Charakterisierung der zytokinproduzierenden T-Zellen

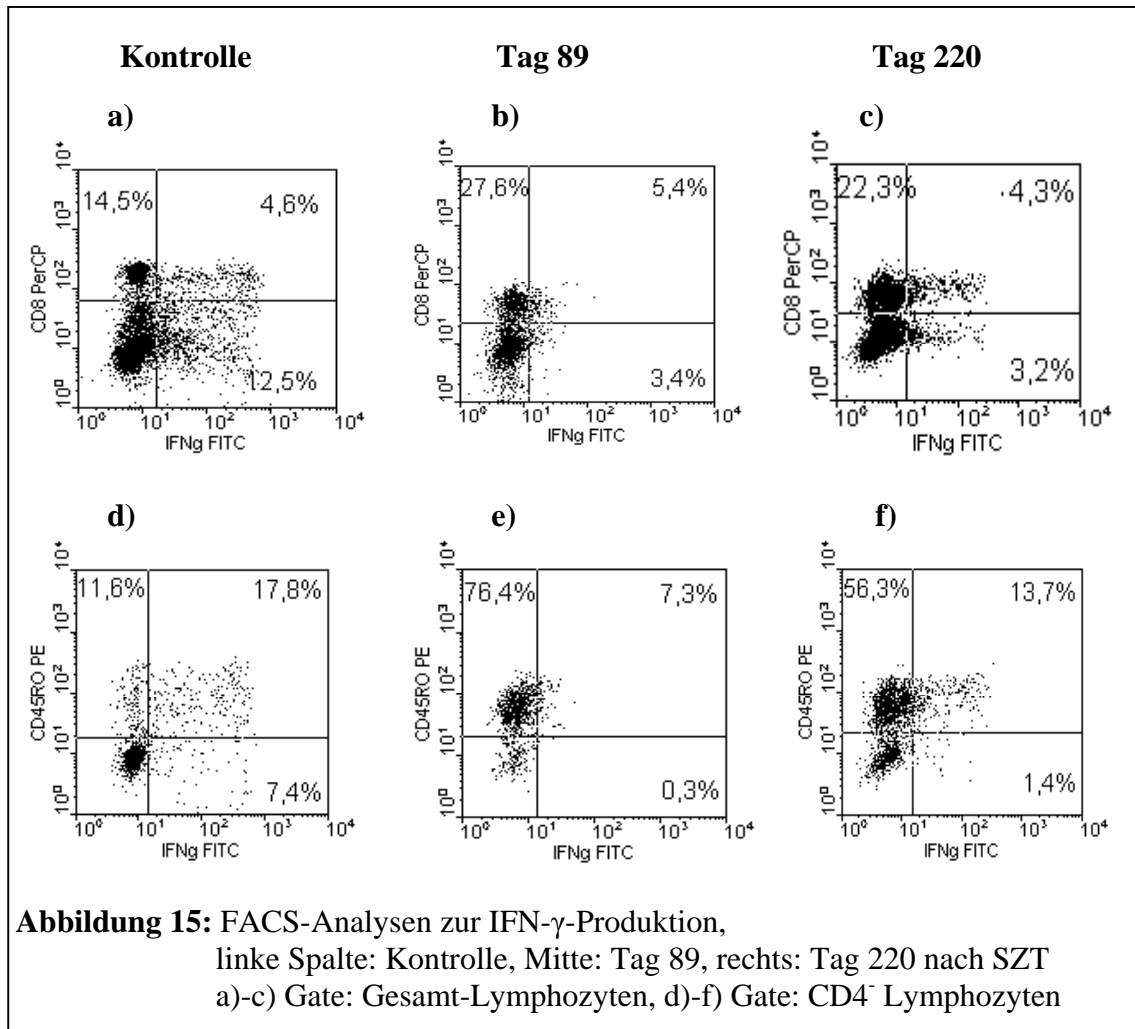
IL-2 wurde, wie auf Abbildung 14 a)-c) ersichtlich, überwiegend von $CD8^+$, d. h. $CD4^+$ T-Zellen produziert. Im Vergleich zur Kontrolle lag bei dem hier dargestellten Patienten noch am Tag 220 nach SZT eine reduzierte IL-2-Produktion vor.



Die IL-2-produzierenden Zellen des Kontrollbluts waren $CD45RA^-$ und $CD45RO^+$ positiv. Am Tag 89 nach SZT produzierten vor allem $CD45RA^-$ $CD4^+$ Zellen IL-2. Am Tag 220 entsprach das Verhältnis von $CD45RA^+$ und $CD45RA^-$ dem der Kontrollzellen (siehe Abb. 14).

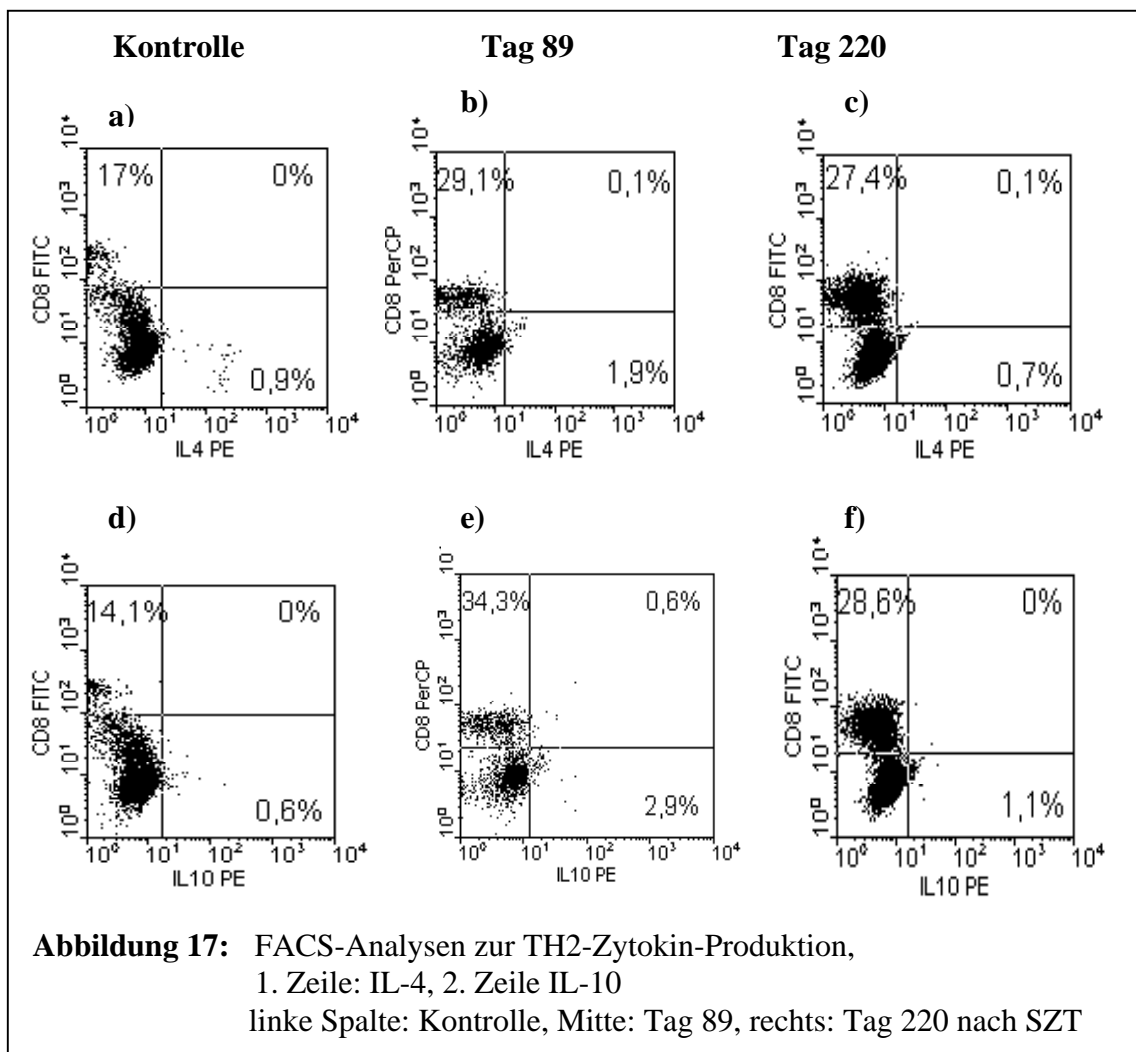
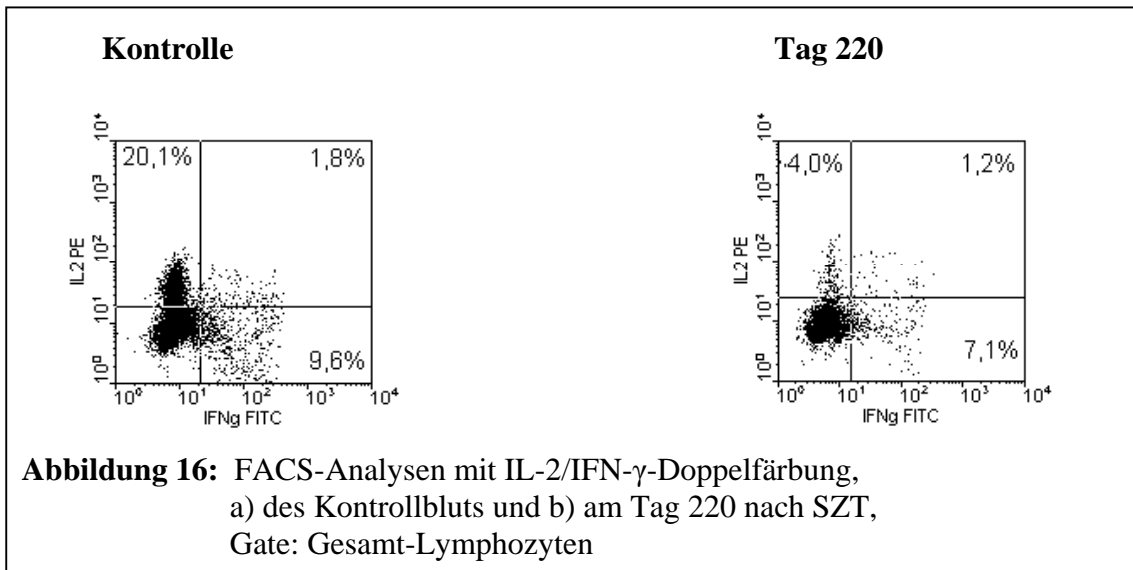
IFN- γ (siehe Abb. 15) wurde zu beiden Zeitpunkten nach SZT überwiegend von $CD8^+$

Zellen produziert. Dabei waren die IFN- γ -produzierenden Zellen der Kontrolle als auch nach SZT vornehmlich CD45RO-positiv.



Bei gleichzeitiger Anfärbung von IL-2 und IFN- γ (siehe Abb. 16) fiel bei den Kontrollzellen und bei der Patientenprobe am Tag 220 nach SZT auf, dass die Lymphozyten überwiegend einfach positiv waren. Klassische TH1/TC1-Subpopulationen, die typischerweise IL-2 und IFN- γ gleichzeitig produzieren, fanden sich nur zu geringem Anteil.

IL-4 und IL-10 als charakteristische Zytokine für TH2/TC2-Subpopulationen wurden nur gering produziert (s. Abb. 17). Die Zytokin-positiven Lymphozyten waren hauptsächlich CD8⁻, d. h. CD4⁺ T-Zellen.



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.