

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Rolle der CD14+CD16+ Monozyten
in der autologen peripheren Stammzelltransplantation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von Anke Joeinig

aus München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Gerold Meinhardt

Mitberichtertatter: PD Dr. med. Michaela Feuring-Buske
Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. med. Farshid Dayyani

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2008

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
II. EINLEITUNG	- 3 -
II.1. Monozyten als inhomogene Population: Die CD14+CD16+ Monozyten	- 3 -
II.1.1. Unterschiede in Morphologie, Zytochemie und Funktion	- 4 -
II.1.2. Klinische Bedeutung als proinflammatorische Zellpopulation	- 6 -
II.2. Autologe Stammzelltransplantation	- 8 -
II.2.1. Therapeutisches Prinzip, Indikation und Verfahren	- 8 -
II.2.2. Immunologische Rekonstitution nach autologer Stammzelltransplantation	- 9 -
II.3. Vorbestehende Immundefekte bei malignen Lymphomen	- 10 -
III. MATERIAL UND METHODEN	- 11 -
III.1. Patienten	- 11 -
III.2. Verwendete Materialien	- 12 -
III.3. Methoden	- 15 -
III.3.1. Quantifizierung der Monozytenratio und der absoluten Zellzahl	- 15 -
III.3.2. Quantifizierung der Phagozytoseaktivität	- 18 -
III.3.3. Quantitative Bestimmung des oxidativen Bursts	- 23 -
III.3.4. Aufreinigen peripherer mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	- 26 -
III.3.5. Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mit LPS	- 27 -
III.3.6. Intrazelluläre TNF-Färbung und durchflusszytometrische Analyse	- 27 -
III.3.7. Inkubation mit Melphalan in vitro	- 29 -
III.4. Statistik	- 29 -

IV. ERGEBNISSE - 30 -

IV.1. Quantitative Subgruppenanalyse im Verlauf von autologer Stammzelltransplantation:

Umkehr der Monozytenratio und zeitlich versetzte Rekonstitution - 30 -

IV.2. Monozyteninkubation mit Melphalan *in vitro*:

Erhöhte Zytostatikatoxizität auf die CD14+CD16+ Monozyten unter klassischen Kulturbedingungen bei verbessertem Überleben in patienteneigenem Serum - 35 -

IV.3. Analyse der Phagozytoseaktivität - 38 -

IV.3.1. Physiologisch differente Phagozytoseaktivität in beiden Monozytenpopulationen - 38 -

IV.3.2. Zuvor beeinträchtigte Phagozytoseaktivität der CD14+CD16+ Monozyten erreicht nach ASZT supranormale Werte - 39 -

IV.4. Analyse des oxidativen Bursts - 41 -

IV.4.1. Physiologisch differente Burstaktivität der beiden Monozytenpopulationen - 41 -

IV.4.2. Rekonstitution der Burstaktivität nach ASZT erfolgt nur in der CD14+CD16+ Zellpopulation - 43 -

IV.5. Analyse der TNF-Produktion nach Stimulation mit LPS - 44 -

IV.5.1. Physiologisch differente TNF-Produktion der beiden Monozytenpopulationen - 44 -

IV.5.2. Bei nahezu komplett fehlender TNF-Produktion durch die CD14++ Monozyten nach ASZT bleibt die CD14+CD16+ Monozytenfunktion intakt - 45 -

IV.6. HLA-DR-Expression vor und nach ASZT:

Unbeeinträchtigte HLA-DR-Expression der CD14+CD16+ Monozyten bei stark reduzierter Expression der CD14++ Monozyten - 47 -

V. DISKUSSION

- 48 -

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 55 -

I. ZUSAMMENFASSUNG

In der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), insbesondere des malignen Myeloms und des NHL-Rezidivs, hat sich die myeloablative Hochdosischemotherapie (HDT) mit anschließender peripherer autologer Stammzelltransplantation (ASZT) als effektives Verfahren in der Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit sowie des ereignisfreien (=komplikationsfreien) Überlebens etabliert. Jedoch gerade dieses Verfahren setzt die Patienten in der Akutphase der Therapie einer kompletten Immunsuppression mit folglich erhöhter Infektanfälligkeit aus, sodass Infektionen den Hauptteil nicht nur der krankheitsbedingten, sondern auch therapieassoziierten Morbidität und Mortalität verursachen. Monozyten spielen bei der Bekämpfung von Infektionen durch die Fähigkeit zur Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion eine zentrale Rolle. Die Bedeutung der CD14+CD16+ Monozyten als „proinflammatorische Subpopulation“ legt eine wichtige Rolle dieser Zellen im heiklen Therapie- und Krankheitsverlauf nahe. In dieser Arbeit wurden die qualitativen und quantitativen Eigenschaften dieser Zellpopulation im Rahmen einer ASZT an 15 lymphomkranken Patienten untersucht, um ihre funktionelle Bedeutung unter diesen Bedingungen zu evaluieren.

Die quantitative Analyse der Monozyten erfasste das Verhältnis (= Ratio) der CD14+CD16+ Monozyten zu der Population der klassischen CD14++ Zellen. Vor ASZT lag die Ratio bei $0,28 \pm 0,12$, vergleichbar mit dem Wert gesunder Probanden. Dieses Verhältnis kehrte sich im Verlauf der Transplantation zugunsten der CD14+CD16+ Monozyten um und erreichte am Tag $3,5 \pm 0,12$ nach ASZT (Nadir) ein Maximum mit $12,4 \pm 7,8$ ($P < 0,001$). Die absolute Zellzahl der CD14++ Monozyten fiel um nahezu 100% von $121 \pm 35 /\mu\text{l}$ auf $< 1/\mu\text{l}$ am Nadir, die Zahl der CD14+CD16+ Monozyten reduzierte sich nur um 87% von $27,5 \pm 10,1/\mu\text{l}$ auf $3,8 \pm 2,7/\mu\text{l}$. Das erste Auftreten der CD14++ Zellen erfolgte im Verlauf vor dem Erscheinen neuer CD14+CD16+ Monozyten (Tag $9,1 \pm 2,2$), sodass auch am Tag der Entlassung (Tag $11,3 \pm 2,2$) das Verhältnis mit $0,11 \pm 0,07$ unter dem Wert bei Aufnahme ($P < 0,001$) lag. Die Anzahl der CD14++ Monozyten übertraf mit $197 \pm 105 /\mu\text{l}$ den Ausgangswert, die Zahl der CD14+CD16+ Zellen lag mit $22 \pm 17 /\mu\text{l}$ darunter.

Bei der Inkubation der Zellen mit $30 \mu\text{M}$ Melphalan *in vitro* zeigte sich jedoch ein umgekehrtes Verhalten: Die Ratio der beiden Monozytensubpopulationen sank um $66,5 \pm 2,9\%$ des Wertes ohne zytostatischen Zusatz ($P < 0,05$, Inkubation in RPMI, 10% FCS). Bei Inkubation der Zellen in patienteneigenem Serum zeigte sich jedoch ein deutlich

verbessertes Überleben der CD14+CD16+ Monozyten *in vitro*, was die Zytokinabhängigkeit dieser Zellpopulation unterstreicht. Weiterhin war die Monozytenratio gesunder Probanden unter Melphalanzusatz mit Abfall auf $21 \pm 7\%$ des Ausgangswertes demgegenüber weiter reduziert, sodass sich die proinflammatorischen Monozyten der zytostatisch vorbehandelten Patienten durch Selektion chemoresistenter Zellen dem toxischen Effekt einer Chemotherapie besser zu widersetzen scheinen.

Die TNF-Produktion der CD14+CD16+ Monozyten nach Stimulation mit LPS blieb nach ASZT unbeeinflusst (MFI 46 ± 13 vs. 49 ± 14 in der durchflusszytometrischen Analyse). Hingegen lag bei den CD14++ Monozyten nach ASZT ein nahezu kompletter Verlust der TNF-Produktion vor (MFI $1,6 \pm 1,2$ vs. $16,7 \pm 13,2$). Gleiches galt für die Expression von HLA-DR: Die drastische Verminderung dieses Oberflächenmoleküls in der CD14++ Zellpopulation nach ASZT (MFI $0,9 \pm 0,6$ vs. $4,2 \pm 2,2$, $P < 0,001$) stand einer unbeeinflussten, tendenziell sogar erhöhten HLA-DR Expression der CD14+CD16+ Monozyten gegenüber (MFI $16,7 \pm 13,2$ vs. $10,6 \pm 5,6$).

Die Analyse der Phagozytosefähigkeit durch Detektion FITC-markierter E. coli erbrachte eine verminderte Anzahl phagozytischer Zellen in der CD14+CD16+ Zellpopulation vor ASZT ($30 \pm 10\%$ vs. $41 \pm 7\%$ bei gesunden Kontrollen, $P < 0,05$), verdoppelte sich jedoch nach der Therapie auf $60 \pm 6\%$ und übertraf damit sogar den Wert gesunder Probanden. Auch in der CD14++ Zellpopulation erhöhte sich der Anteil phagozytischer Zellen, jedoch ohne eine derartig exorbitante Steigerung zu erfahren ($77 \pm 10\%$ nach ASZT, $P < 0,03$).

Die Fähigkeit zum oxidativen Burst war vor ASZT in beiden Zellpopulationen signifikant vermindert (CD14+CD16+ Monozyten: $32 \pm 12\%$ positive Zellen vs. $46 \pm 10\%$ bei gesunden Probanden, $P < 0,05$; CD14++ Monozyten: $52 \pm 14\%$ vs. $70 \pm 9\%$, $P < 0,05$). Nach ASZT erholte sich jedoch nur die Burstaktivität der CD14+CD16+ Monozyten ($53 \pm 24\%$) und unterschied sich damit nicht mehr von den gesunden Kontrollen. Die Fähigkeit der CD14++ Monozyten zu oxidativem Stress änderte sich nach ASZT jedoch nicht ($47 \pm 20\%$). So konnte gezeigt werden, dass die Eigenschaften der CD14+CD16+ Monozyten nach ASZT rekonstituiert werden, falls ein funktionelles Defizit vorlag, ohne dabei prätherapeutisch intakte Funktionen zu beeinflussen; die Funktion der CD14++ Monozyten ist hingegen nach ASZT deutlich beeinträchtigt. Demnach könnte der proinflammatorischen Zellpopulation in der Frühphase nach ASZT eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionen zukommen.

II. EINLEITUNG

II. 1. Monozyten als inhomogene Population: Die CD14+CD16+ Monozyten

Monozyten sind nach aktuellem Kenntnisstand Ausgangszellpopulation des mononukleären Phagozytensystems (MPS), zu dem z.B. Makrophagen, dendritische Zellen, Osteoklasten oder die Kupfer-Stern-Zellen der Leber zählen. Im Vergleich zu den übrigen zellulären Komponenten des peripheren Blutes besitzen sie die größte Potenz in der Phagozytose von Mikroorganismen oder Zelldetritus. Ihre Rolle im Immunsystem reicht jedoch über die Phagozytose, die den zentralen Teil der unspezifischen (angeborenen) Abwehr verkörpert, hinaus; über die Antigenpräsentation auf MHC-II-Molekülen, Synthese einer Reihe von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Aktivierung von B- und T-Lymphozyten spielen Monozyten eine wesentliche Rolle auch in der spezifischen (erworbenen) Infekt- und Tumorabwehr [61,69]. Unter allen Leukozyten des peripheren Blutbildes stellen sie mit einem Anteil von ca. 3 - 7% nur einen kleinen Teil dar, der jedoch selbst eine inhomogene Population verkörpert. Anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die durch die Markierung mit Antikörpern dargestellt werden können, lassen sich beim Menschen zwei Monozyten-Subtypen differenzieren: Bei gesunden Spendern zeigt der größte Anteil der Monozyten mit ca. 80 - 90 % eine hohe Expression an CD14-Molekülen [Rezeptoren für Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien] bei fehlender Expression des Oberflächenmoleküls CD16 (Fc-Rezeptor für Immunglobulin III). Der Rest der Zellen zeigt eine schwächere Expression an CD14-Molekülen, jedoch eine deutliche Expression der CD16-Moleküle. Diesem Muster folgend, lassen sich die beiden Subtypen als "CD14++ Monozyten" (hohe Expression von CD14 ohne Expression von CD16) und "CD14+CD16+ Monozyten" (geringere Expression von CD14 in der Gegenwart von CD16-Expression) beschreiben.

II.1. 1. Unterschiede in Morphologie, Zytochemie und Funktion

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass es sich bei diesen beiden Subgruppen um sowohl morphologisch, zytochemisch, immunphänotypisch als auch funktionell differente Zellen handelt.

Die Expression der Oberflächenmoleküle unterscheidet sich nicht nur in der Expression von CD14 und CD16, sondern auch in der Expression vieler anderer Marker. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die CD14+CD16+ Monozyten eine wesentlich geringere Expression von CD33 als die klassischen CD14++ Monozyten aufweisen. Die Funktion von CD33 konnte bislang nicht geklärt werden, bekannt ist jedoch, dass es sich um ein Oberflächenmolekül handelt, das vorwiegend auf myeloiden Vorläuferzellen exprimiert wird [41,68]. Die im Vergleich zu den klassischen CD14++ Monozyten geringere Expression von CD33 führt in diesem Zusammenhang zu der Annahme, dass es sich bei der CD14+CD16+ Population um eine reifere Monozytenform handelt. Diese These wurde durch einige Studien untermauert, die gezeigt haben, dass CD14+CD16+ Monozyten sowohl phänotypisch als auch funktionell Ähnlichkeit mit bestimmten Gewebemakrophagen oder reifen dendritischen Zellen haben, die sich, wie eingangs erwähnt, als Teil des MPS von den Monozyten des peripheren Blutes ableiten [4,13,70]. Ebenso wurde gezeigt, dass eine Reifung der klassischen CD14++ Monozyten *in vitro* eine Zellpopulation mit dem CD14+CD16+ Phänotyp generieren kann [70].

In diesem Zusammenhang steht auch eine deutlich höhere Expression von HLA-DR als bei den klassischen Monozyten [72]. Über HLA-DR erfolgt die Präsentation von Antigenen, sodass diese Gruppe von Monozyten potentiell über eine erhöhte Fähigkeit in der Antigenpräsentation verfügt.

Ebenso lassen sich erhebliche Unterschiede in der Expression von beispielsweise Cd11b (Teil des Cd11b/CD18- bzw. C3-Komplementrezeptorkomplexes) oder CD54 (Adhäsionsmolekül ICAM-1) zeigen [2,72], sodass die Nomenklatur dieses Monozytensubtyps anhand der Expression von CD16 ein mehr willkürlich gewählter Begriff ist und nicht bedeutet, dass sich diese Zellpopulation morphologisch oder gar funktionell durch die hohe CD16-Expression von den klassischen CD14++ Monozyten unterscheidet. Die Bedeutung von CD16 ist bisher noch weitgehend unklar; wie bereits erwähnt, handelt es sich hierbei um den Fc-Rezeptor für Immunglobulin G (IgG) III. Bei CD16 handelt es sich um einen niedrig-affinen Fc-IgG-Rezeptor. CD14+CD16+ Monozyten exprimieren im Gegensatz zur Monozytenhauptpopulation kein CD64, das in

seiner Funktion ebenfalls einen Fc-IgG-Rezeptor darstellt, jedoch vom hoch-affinen Typus. Diese Konstellation legt eine Bedeutung der CD14+CD16+ Monozyten v. a. bei Zuständen mit hoher Antigenkonzentration nahe, so z.B. in der Sepsis, bei der auch tatsächlich der Anteil der CD14+CD16+ Monozyten maximale Werte annimmt [8,17,58,59,66].

Die beiden Monozytensubpopulationen weisen in Gegenwart unterschiedlicher Chemokine unterschiedliche Migrationseigenschaften auf, was auf ihr unterschiedliches Muster an Chemokin-Rezeptoren zurückzuführen ist. Dies bedeutet, dass die Monozytensubgruppen dadurch eine Determination in ihrer bevorzugten Lokalisation bei bestimmten Entzündungsprozessen erfahren. So wurde gezeigt, dass die CD14+CD16+ Monozyten im Gegensatz zu den klassischen Monozyten eine deutlich höhere Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5 bei gleichzeitig erniedrigter Expression von CCR2 aufweisen. Dies hatte *in vitro* ein unterschiedliches Migrationsverhalten zur Folge [68].

Die Unterschiede in der Chemokin-Rezeptor-Expression waren es letztlich auch, die zu einer Identifikation einer entsprechenden Zellpopulation bei Mäusen führte. Da Tiere keine CD14+CD16+ Monozyten besitzen bzw. keine Monozytengruppe besitzen, die dieses Muster exprimieren (an dieser Stelle sei nochmals auf die willkürliche Nomenklatur dieser Subpopulation verwiesen), waren Tierexperimente zur Erforschung dieses Monozytentyps bis vor wenigen Jahren nicht möglich. Geissmann et. al zeigten jedoch, dass sich anhand der Expression des Chemokin-Rezeptors CX(3)CR1 zwei unterschiedliche Monozytentypen differenzieren lassen, die mit den beiden menschlichen Monozytensubtypen korrespondieren [23].

II.1.2. Klinische Bedeutung als proinflammatorische Zellpopulation

Seit der Beschreibung der CD14+CD16+ Monozyten sind eine Vielzahl inflammatorischer Prozesse beschrieben, bei denen es zu einem signifikanten Anstieg dieser Zellpopulation kommt. So zeigt sich eine deutliche Zunahme dieser Zellen bei Autoimmunprozessen wie der Kawasaki-Arteriitis [31] oder der rheumatoiden Arthritis [33], bei chronischen Infekten wie z.B. der Infektion mit HIV [20,40,63], Tuberkulose [38] oder auch bei malignen Neoplasien wie z.B. gastrointestinalen Tumoren [37]; auch bei der koronaren Herzkrankheit, die pathophysiologisch gesehen als entzündliche Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems interpretiert werden kann, kommt es zu einem (milden) Anstieg der CD14+CD16+ Monozyten [19,44,57,67].

Am stärksten ausgeprägt ist der Anstieg jedoch bei schweren bakteriellen Infekten, insbesondere der bakteriellen Sepsis, bei der die CD14+CD16+ Monozyten den prädominanten Anteil der Monozyten ausmachen [17,59]. Umgekehrt konnte für die Therapie der Autoimmunkrankheiten wie M. Kawasaki oder rheumatoide Arthritis, als auch für die Behandlung des septischen Schocks gezeigt werden, dass im Rahmen einer effektiven medikamentösen Therapie dieser Erkrankungen der Anteil der CD14+CD16+ Monozyten wieder abnimmt [31,33,65].

Die Expansion der CD14+CD16+ Monozyten in proinflammatorischen Zuständen legte die Vermutung nahe, dass der Anteil dieser Zellpopulation bei maximal antiinflammatorischen Konditionen abnimmt. Tatsächlich wurde auch gezeigt, dass eine hochdosierte immunsuppressive Therapie mit Glukokortikoiden zu einer selektiven Suppression der CD14+CD16+ Monozyten führt [12,18]. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der klassischen CD14++ Monozyten. Beide Veränderungen sind ca. 1 Woche nach Ende der Therapie und somit nach dem Abklingen der antiinflammatorischen Wirkung vollständig reversibel.

Aufgrund der hohen (positiven) Korrelation zum Grad der Inflammation wurde die Fähigkeit zur Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht. So wurde die Produktion von TNF-alpha nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Pam3Cys (Lipopeptid einiger grampositiver und gramnegativer Bakterien) untersucht. TNF-alpha ist ein stark proinflammatorisches Zytokin mit zentraler Bedeutung in der Pathogenese entzündlicher Syndrome, sodass inzwischen Antikörper gegen TNF-alpha bei schweren entzündlichen Erkrankungen wie der therapierefraktären rheumatoiden Arthritis oder dem M. Crohn therapeutisch eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die

CD14+CD16+ Monozyten signifikant mehr TNF-alpha pro Zelle produzieren als die klassischen Monozyten, sodass eine überproportionale Produktion proinflammatorischer Zytokine durch diese Zellen resultiert. Im Falle einer Stimulation mit Pam3Cys war der insgesamt kleine Anteil von ca. 10% an allen Monozyten für 60% des produzierten TNF-alpha verantwortlich, und somit Hauptquelle für dieses stark proinflammatorisch wirksame Zytokin [7]. Ursächlich dafür ist eine inzwischen gut untersuchte abweichende Expression der Toll-Like-Rezeptoren [7,58,66]. TNF-alpha selbst induziert nach Inkubation mit LPS *in vitro* eine Monozytendifferenzierung in die CD14+CD16+ Subpopulation [30,58], sodass es sich hierbei um einen potentiell autostimulatorischen Prozess zu handeln scheint.

Neben der Produktion von TNF-alpha sind die CD14+CD16+ Monozyten auch zur Synthese hoher Level anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder IL-1 fähig, während sie jedoch keine Fähigkeit zur Synthese des *anti*inflammatorischen Zytokins IL-10 besitzen [22].

Im Rahmen einer Entzündung kommt es am Ort des inflammatorischen Geschehens zu einer Hochregulation bestimmter Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen, um eine Diapedese durch Entzündungszellen in das betroffenen Areal zu ermöglichen. Dies betrifft z.B. Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule 1") oder ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule 1"), wobei v. a. letzteres als schnell induzierbares und stark exprimiertes Adhäsionsmolekül eine Hauptrolle in der lokalen Immunantwort spielt. CD14+CD16+ Monozyten exprimieren sowohl höhere Level von VLA-4, dem Liganden für VCAM-1, als auch von LFA-1 bzw. Cd11a und c, dem Liganden von ICAM-1 [2,72]. Diese Konstellation legt nahe, dass CD14+CD16+ Monozyten eine größere Fähigkeit zur Endothelzellinteraktion besitzen, womit auf diesem Wege eine avidere Migration in entzündliche Areale ermöglicht wird.

Die erörterten Eigenschaften der CD14+CD16+ Monozyten haben zu der mittlerweile vielerorts verwendeten Bezeichnung „proinflammatorische Monozytenpopulation“ geführt. Die Bedeutung dieser Zellen steigt nach aktuellem Kenntnisstand mit dem Schweregrad der Inflammation bzw. Infektion, sodass sie bei Zuständen mit deutlich erhöhtem Infektionsrisiko – wie z.B. bei hämatologisch-onkologischen Erkrankungen einschließlich ihrer riskanten Therapiekonzepte wie der Stammzelltransplantation – eine bedeutende Rolle spielen könnten.

II.2. Autologe Stammzelltransplantation

II.2.1. Therapeutisches Prinzip, Indikation und Verfahren

Bei der autologen Stammzelltransplantation (ASZT) werden dem Patienten hämatopoetische Stammzellen entnommen und nach einer Chemotherapie, die die myeloablative Dosis überschreiten kann, wieder reinfundiert (= transplantiert). Auf diese Weise sind erhebliche Dosissteigerungen einer zytostatischen Therapie möglich, die ohne die nachfolgende Wiederherstellung der Knochenmarksfunktion durch eine ASZT einen irreversiblen Ausfall der Knochenmarksfunktion zur Folge hätten.

Indikationen sind die Therapie von Rezidiven hämatologischer Neoplasien wie Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), der M. Hodgkin (HL) oder die akuten Leukämien; weiterhin kommt die autologe Stammzelltransplantation auch bei der Therapie solider Tumore zum Einsatz, auch wenn diese Therapieform dort von untergeordneter Bedeutung ist. Den größten Stellenwert in der Gruppe der hämatologischen Erkrankungen hat die ASZT in der Behandlung des Plasmozytoms oder des NHL-Rezidivs; in diesen Fällen hat sich dieses Verfahren zunehmend als Therapie der Wahl bei Patienten unter 65 Jahren durchgesetzt [25,26].

Die belastende Stammzellgewinnung durch multiple Punktionen des Knochenmarks in Vollnarkose ist in den letzten Jahren zunehmend durch die periphere Stammzellapherese (PBSZ-Apherese) abgelöst worden, bei der CD34+ Progenitorzellen mit Hilfe eines Stammzellseparators entnommen werden. Sie ermöglicht eine wesentlich höhere Ausbeute an geeigneten Stammzellen sowie die gleichzeitige Gewinnung immunkompetenter Leukozyten, sodass insgesamt gesehen eine schnellere hämatopoetische Rekonstitution (innerhalb von ca. 8 - 14 Tagen nach Transplantation) und Verkürzung des Krankenhausaufenthalts resultiert.

Da der Anteil der CD34+ Progenitorzellen im peripheren Blut im Normalfall sehr gering ist, erfolgt vor Stammzellsammlung eine Therapie zur Mobilisierung unreifer Zellen aus dem Knochenmark (Mobilisierungstherapie). Die Verabreichung einer konventionellen Chemotherapie, ergänzt durch die anschließende Gabe von Wachstumsfaktoren (z.B. Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor G-CSF), stellt einen Proliferationsreiz für das Knochenmark dar und führt so nachfolgend zu einer Ausschwemmung unreifer Zellen in die Peripherie.

Nach der Applikation einer Hochdosischemotherapie (= Konditionierungstherapie) erfolgt die Retransfusion der Stammzellen. Dabei muss ein zeitlicher Mindestabstand von ca. ein

bis drei Tagen eingehalten werden, um eine Toxizität der Zytostatika auf die nachfolgend verabreichten Stammzellen zu vermeiden.

II.2.2. Immunologische Rekonstitution nach autologer Stammzelltransplantation

Durch die Verabreichung der Hochdosis-Chemotherapie kommt es zur vollständigen Myelosuppression. Bis zum Anwachsen der Progenitorzellen und der Freisetzung immunkompetenter Zellen besteht eine kritische Zeit der Knochenmarksaplasie, bei der es durch fehlenden Nachschub aller drei Zelllinien sowohl zu Anämie, Blutungsneigung als auch Infektanfälligkeit kommt. Die Inzidenz febriler Komplikationen nach ASZT ist wie bei alleiniger Hochdosistherapie mit 60-100% sehr hoch, die Gesamtmortalität lässt sich jedoch durch die ASZT deutlich senken (so z.B. im Falle des Plasmozytoms von ca. 10% - 17% unter alleiniger Hochdosistherapie ohne nachfolgende ASZT auf ca. 5% mit nachfolgender ASZT [5,10,27]).

Unter den genannten Komplikationen ist die Immundefizienz der führende Faktor hinsichtlich Morbidität und Mortalität. Dies gilt sowohl für die akute Phase der Myelosuppression als auch für das erste Jahr nach Transplantation, in der sich das hämatopoetische System sukzessive erholt [52].

So kommt es nach ASZT zu einem relativ schnellen Anstieg der B-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten bis auf Normwerte innerhalb der ersten drei Monate, während die Zellzahl der CD4+ T-Helferzellen prolongiert über mehr als ein Jahr erniedrigt ist. Auch die funktionellen Eigenschaften dieser Zellpopulation ist in dieser Zeit beeinträchtigt [1,52,56]. Im Hinblick auf die prolongierte Störung der CD4+ T-Helferzellen, und damit eines Teiles des spezifischen Immunsystems, ist die Inzidenz infektiöser Komplikationen nach der Akutphase der Myelosuppression erstaunlich gering. Eine Erklärung dafür könnte eine unterstützende Funktion durch schnelle und intakte Rekonstitution des unspezifischen (angeborenen) Immunsystems, z.B. der Monozyten bieten, jedoch ist der Einfluss der ASZT auf die funktionellen Eigenschaften dieses Teils bisher wenig untersucht.

II. 3. Vorbestehende Immundefekte bei malignen Lymphomen

Infektiöse Komplikationen sind es letztlich auch, die bei malignen Lymphomen einen Großteil der Morbidität und v.a. Mortalität im Krankheitsverlauf ausmachen. Beispielsweise liegen beim multiplen Myelom Infektionen mit ca. einem Drittel an der Spitze der Todesursachen.

Die Immundefizienz spielt sich hierbei auf vielen Ebenen ab und ist in ihrer Ausprägung abhängig von der jeweiligen Erkrankung. So sind bereits einige Mechanismen bekannt: Beispielsweise beim multiplen Myelom als Erkrankung der B-Zell-Reihe ist einerseits die Verdrängung einer suffizienten Antikörperbildung durch die Expansion eines transformierten Klons ein führender Mechanismus. Auch die CLL kann als Paradebeispiel für eine Erkrankung mit Entwicklung eines Antikörpermangelsyndroms dienen, da dieses im Verlauf häufig anzutreffen ist und auch entscheidend zur Mortalität beiträgt.

Ein weiterer Pathomechanismus der Infektanfälligkeit ist auch die Infiltration des Knochenmarks durch maligne Zellen mit Verdrängung der normalen Hämatopoese und nachfolgender Abnahme der übrigen Zellreihen, hier insbesondere der Granulopoese.

Durch diese dominierenden pathogenetischen Konzepte der Infektanfälligkeit ist die Funktion der übrigen Zelltypen - wie z.B. der Monozyten - bisher wenig untersucht, und der Einfluss der ASZT auf diese Funktionen dementsprechend noch weniger.

Doch haben einige wenige Arbeiten gezeigt, dass es bei Lymphomen, also primär Erkrankungen des *lymphatischen* Systems, auch zu grundlegenden Defekten und Veränderungen der Monozytenfunktion kommt: Dammaco et. al. berichteten über einen Defekt der Monozyten-Chemotaxis bei Patienten mit multiplen Myelom [11] und Mainwaring et. al. zeigten einen Defekt in der Phagozytose und Abtötung von *Candida albicans* bei Patienten mit multiplen Myelom und M. Waldenström [36]. Flieger und Ziegler-Heitbrock zeigten bei Patienten mit CLL eine erhöhte Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wie Komplementrezeptoren, Fc-Rezeptoren und MHC-Klasse II-Moleküle und legten so durch eine Aktivierung dieser Zellen eine mögliche Involvierung der Monozyten in die Pathogenese der Immundefizienz bei CLL nahe [21].

III. MATERIAL UND METHODEN

III.1. Patienten

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Anzahl der Chemotherapie-Zyklen vor ASZT	Anzahl der reinfundierten CD34+ Stammzellen ($\times 10^6$ /kg)	Hochdosis-Therapie
1	M	22	M. Hodgkin	BEACOPP, BEAM, Gemcitabine, 6xDHAP	5.83	BuCy
2	M	54	NHL	3xCHOP	3.46	BEAM
3	W	65	NHL	NOSTE	3.76	BEAM
4	M	53	NHL	4xFCM	2.86	Cy + TBI
5	W	60	NHL	6xCHOP	3.73	BEAC
6	W	65	MM	1xCAD, 3xVAD	2.03	Mel
7	M	73	MM	1xID	7.73	Mel
8	M	66	MM	4xID	2.32	Mel
9	M	66	MM	Keine	5.46	Mel
10	M	64	MM	4xID	3.49	Mel
11	M	59	MM	3xVAD	5.10	Mel
12	W	49	MM	4xID	6.93	Mel
13	W	54	MM	4xID	2.99	Mel
14	M	58	MM	4xID	6.60	Mel
15	M	67	MM	4xID	4.99	Mel

Tabelle 1. Patientencharakteristika *M.* männlich *W.* weiblich, *NHL:* Non-Hodgkin-Lymphom, *MM:* Multiples Myelom, *BEACOPP:* Procarbazin, Prednison, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, Vincristin, Bleomycin, *DHAP:* Cisplatin, Ara-C, Dexamethason, *CHOP:* Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison, *NOSTE:* Mitoxantron, Prednimustin, *FCM:* Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron, *CAD:* Cyclophosphamid, Doxorubicin, Dexamethason, *VAD:* Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason, *ID:* Idarubicin, Dexamethason, *BEAM:* Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan, *BEAC:* Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Cyclophosphamid, *BuCy:* Busulphan, Cyclophosphamid, *Cy+TBI:* Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung, *Mel:* Melphalan.

III.2. Verwendete Materialien

III.2.1. Zellkultur

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
FCS (Fetales Kälberserum)	16170	<i>Gibco Invitrogen</i> , Karlsruhe, Deutschland (D.)
PBS (Phospat-gepufferte Salzlösung)	14040 – 091	<i>Gibco Invitrogen</i> , Karlsruhe, D.
RPMI 1640 (Zellkulturmedium)	E12 - 702F	<i>Gibco Invitrogen</i> , Karlsruhe, D.
6-Well-Plates	353.453	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, D.
24-Well-Plates	353.935	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, D.
Trypanblaulösung	15250-061	<i>Gibco Invitrogen</i> , Karlsruhe, D.

III.2.2. Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-CD14-FITC	6603511	<i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D.
Anti-CD14-RD1	6603262	<i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D.
Anti-CD16-PE	347617	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, D.
Anti-HLA-DR-PC5	IM2659	<i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D.
IgG1-PC5	IM2663	<i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D.
Anti-CD45-FITC	MHCD4505	<i>Caltag</i> , Hamburg, D.
Anti-IL-1 β -FITC	MHCIL1B01	<i>Caltag</i> , Hamburg, D.
Maus IgG1-FITC	MG101	<i>Caltag</i> , Hamburg, D.
TNF- α -FITC	RHTNFA01	<i>Caltag</i> , Hamburg, D.
Ratte IgG1-FITC	R101	<i>Caltag</i> , Hamburg, D.

III.2.3. Test-Kits

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Fix & Perm® Kit incl. Reagenz A (Formaldehyd) Reagenz B (Lyse-Puffer)	GAS-004	<i>Caltag, Hamburg, D</i>
Phagotest® Kit Incl. FITC-markierte E. coli Quenching-Lösung Lyse-Puffer Salz für Waschlösung DNA-Färbungslösung	341060	<i>BD Biosciences, Heidelberg, D.</i>
Phagoburst® Kit Incl. ospsonisierte E. coli Substratscheibe DHR123 Lyse-Puffer Waschlösung	341058	<i>BD Biosciences, Heidelberg, D.</i>

III.2.4. Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Ficoll Paque	17-1440-03	<i>Amersham Biosciences, Uppsala, S.</i>
EDTA	351-027-100	<i>Quality Biological Inc., Gaithersburg, USA.</i>
Melphalan	M2011	<i>Sigma, Taufkirchen, D.</i>
Aqua ad injectabilia Braun	370 3452	<i>Braun, Melsungen, D.</i>
NH ₄ Cl		
KHCO ₃		
NaOH		

III.2.5. Inhibitoren, Aktivatoren, Stimulantien

<i>Name</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Brefeldin A	B 6542	<i>Sigma</i> , München, D.
G-CSF (Filgrastim): Neupogen®	N5422	<i>Amgen</i> , München, D.
LPS von S. Minnesota	L 4641	<i>Sigma</i> , München, D.
M-CSF	M6518-5UG	<i>Sigma</i> , München, D.

III.2.6. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Durchflusszytometer Epics® XL/XL-MCL (Software: XL System II, Version 3.0)	6605464	<i>BeckmanCoulter Electronics</i> , Miami, USA
Neubauer Zählkammer		<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht, D.
Brutschrank	Serie II 3110	<i>Forma Scientific</i>
Zentrifuge	4K15	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, D.

III.2.7. Verbrauchsmaterial

<i>Artikel</i>	<i>Bestell-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Röhchen 50 ml	62.547.254	<i>Sarstaedt</i> , Nümbrecht, D.
15 ml	62.54.502	
05 ml	.476	
Serologische Pipette 25ml	86.1685.001	<i>Sarstaedt</i> , Nümbrecht, D.
10 ml	86.1254.001	
02 ml	86.1252.001	
Eppendorf-Tubes 1,5 ml	T 563.67	<i>Eppendorf</i> , Hamburg, D.

III.3. Methoden

III.3.1. Quantifizierung der Monozytenratio und der absoluten Zellzahl

Zelloberflächenfärbung:

In Abhängigkeit von der Gesamtzahl an Leukozyten wurde eine unterschiedliche Menge Vollblut zur Oberflächenfärbung eingesetzt. Dies gestaltete sich wie folgt:

Normale Leukozytenzahl (4000/ μ l - 10000/ μ l)	200 μ l Vollblut
Leukozytengesamtzahl \geq 2000/ μ l bis < 4000/ μ l	400 μ l Vollblut
Leukozytengesamtzahl \geq 800/ μ l bis < 2000/ μ l	800 μ l Vollblut
Leukozytengesamtzahl \geq 400/ μ l bis < 800/ μ l	1,6 ml Vollblut
Leukozytengesamtzahl \geq 100/ μ l bis < 400/ μ l	3,2 ml Vollblut
Leukozytengesamtzahl < 100/ μ l	5 ml Vollblut
Leukozytengesamtzahl 10100/ μ l – 15000/ μ l	150 μ l Vollblut

Die Bestimmung der Leukozytengesamtzahl erfolgte mit der im Klinikum üblichen Laborroutinediagnostik (Turbidimetrie bzw. Nephelometrie) im Rahmen der täglichen Blutabnahme im Verlauf des stationären Aufenthalts oder der ambulanten Nachkontrolle nach Abschluss der Stammzelltransplantation. Sie gibt die Leukozytenzahl von 0/ μ l in 100er-Schritten aufsteigend an. Die Angabe „0/ μ l“ wurde mit 50 Leukozyten/ μ l gleichgesetzt, da die Sensitivität der Zelldetektion für sehr kleine Zellzahlen durch diese in der klinischen Routine verwendeten Verfahren sehr gering ist und somit Leukozyten bei einer Gesamtzahl < 100/ μ l der Erfassung durch diese Verfahren entgehen. Durch spezifischere Verfahren wie z.B. die Durchflusszytometrie oder auch die Auszählung der Leukozyten in der Neubauer-Zählkammer lassen sich jedoch stets Leukozyten auch in diesem Bereich erfassen. Der hier gewählte Wert von 50 Leukozyten/ μ l wurde hierbei vor Beginn der Versuchsreihe willkürlich festgelegt. Die Angabe der absoluten Zellzahlen, die hierbei errechnet werden, beinhaltet somit einen in dieser Arbeit tolerierten systematischen Fehler, der angesichts der nur minimalen Gesamtzellzahl in diesem Bereich keine größere Relevanz besitzt. In dieser Arbeit liegt das Augenmerk im Bereich der ausgeprägten Leukopenie auf dem Verhältnis der Monozytenpopulationen zueinander, welches durch eine willkürliche Festlegung der Leukozytengesamtzahl unbeeinflusst bleibt, da sich die Berechnung der beiden Subpopulationen auf die gleiche Annahme der Leukozytengesamtzahl bezieht.

Herstellen des Lysepuffers:

8,3g NH₄CL (0,1mM), 1,00 g KHCO₃ (1mM) und 37,2 mg EDTA (0,1 mM) wurden in 1000 ml H₂O aufgelöst. Die Lösung wurde anschließend mit 1 N NaOH auf pH = 7,4 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Lyse:

Die Vollblutproben wurden bei Raumtemperatur (RT) mit dem o.g. Erythrozyten-Lyse-Puffer 10 Minuten lysiert (Verdünnungsverhältnis 1:16) und anschließend zentrifugiert (400 x g, RT, 5 min). Im Falle einer inkompletten Lyse wurde diese in analoger Weise ein zweites Mal wiederholt.

Waschen (2 x):

Hierzu wurden die Zellen in 1ml PBS, 2% FCS resuspendiert, zentrifugiert (400 x g, RT, 5 min) und der Überstand verworfen.

Oberflächenfärbung:

Nach Resuspendieren der Zellen in 50 µl PBS, 2% FCS wurden diese mit anti-CD14-FITC, anti-CD16-PE und ggf. anti-HLA-DR-PC5 in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20 auf Eis im Dunkeln 20 Minuten inkubiert.

Waschen und Resuspendieren:

Es folgte ein Waschvorgang in oben beschriebener Weise. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS, 2% FCS resuspendiert und der FACS-Analyse unterzogen.

Durchflusszytometrische Analyse:

Zur genauen Detektion der Monozyten-Subpopulationen waren drei Gating-Schritte nötig, insbesondere um eine Verunreinigung des CD14+CD16+ Gates durch die ebenfalls CD16+ NK-Zellen weitgehend auszuschließen.

Zuerst wurde ein Gate mit Hilfe der Forward – und Sideward-Scatter-Eigenschaften der Zellen um die Gesamtheit der Leukozyten gesetzt, um einerseits tote Zellen und Artefakte aus Zellaggregaten auszuschließen, und um andererseits die Anzahl an Monozyten/µl berechnen zu können (s. u.). Ein zweites Gate innerhalb des ersten diente der Detektion der Monozyten als Gesamtpopulation innerhalb der Leukozyten, basierend auf deren Sideward-Scatter-Eigenschaften und deren HLA-DR-Expression (Abb.1).

Schließlich wurden die beiden Monozyten-Subpopulationen in diesem Gate hinsichtlich ihrer CD14- und CD16-Expression unterschieden: einerseits die „klassischen“ Monozyten, die eine starke Expression von CD14 (CD14⁺⁺), jedoch keine CD16-Expression (CD16⁻) aufweisen, andererseits die CD14⁺CD16⁺ Monozyten mit einer schwächeren Expression von CD14 und einer starken Coexpression von CD16.

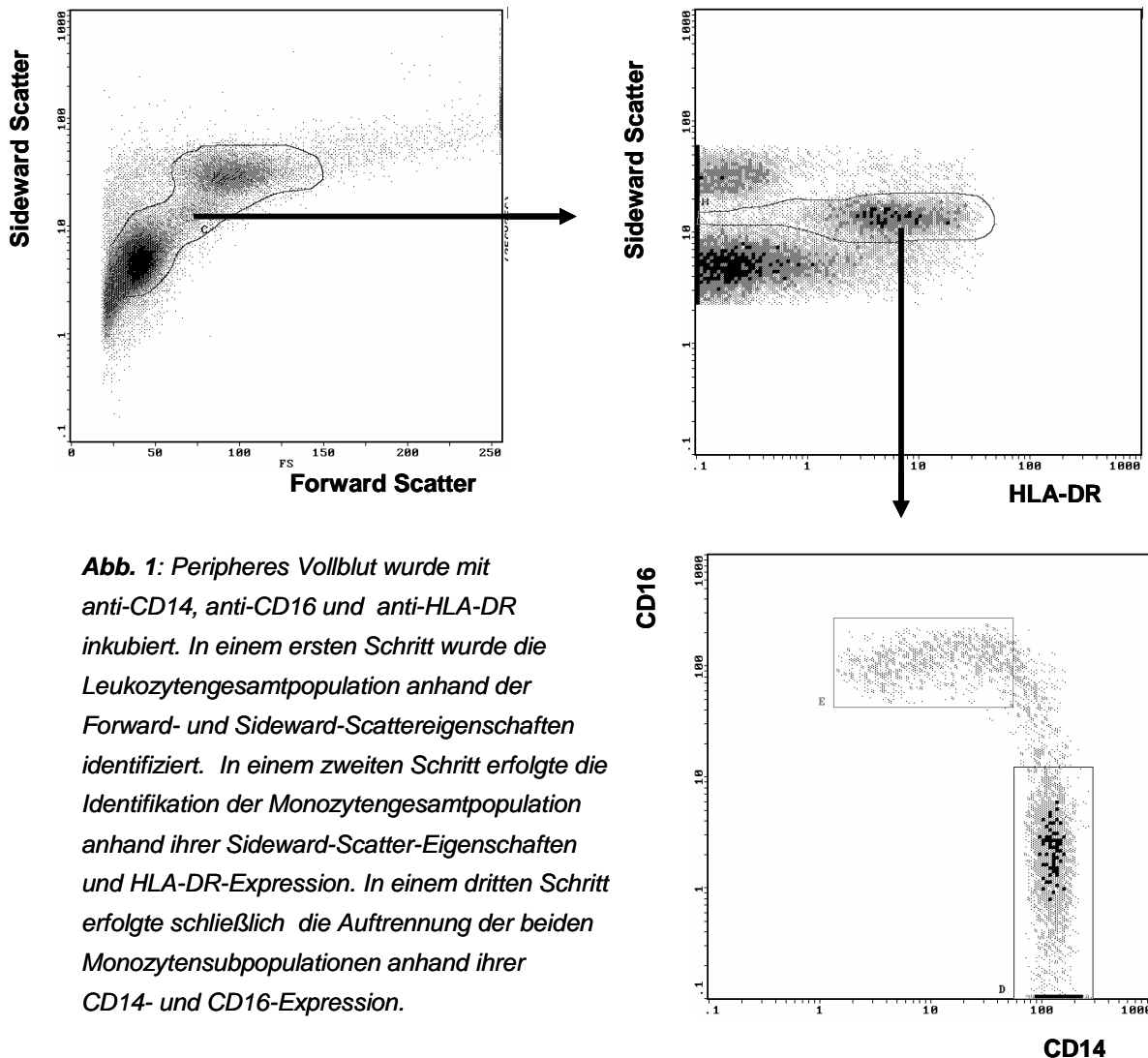


Abb. 1: Peripheres Vollblut wurde mit anti-CD14, anti-CD16 und anti-HLA-DR inkubiert. In einem ersten Schritt wurde die Leukozytengesamtpopulation anhand der Forward- und Sideward-Scattereigenschaften identifiziert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Identifikation der Monozytengesamtpopulation anhand ihrer Sideward-Scatter-Eigenschaften und HLA-DR-Expression. In einem dritten Schritt erfolgte schließlich die Auftrennung der beiden Monozytensubpopulationen anhand ihrer CD14- und CD16-Expression.

Berechnung der Monozytenratio und der absoluten Monozytenzahl:

Die Monozytenratio ergab sich aus der Division der Eventzahl im CD14⁺CD16⁺ Gate durch die Anzahl der Events im CD14⁺⁺ Gate. Die absolute Monozytenzahl ergab sich durch Division der Eventzahl im Monozytengate durch die Zahl im Leukozytengate und

anschließende Multiplikation mit der Leukozytengesamtzahl.

III.3.2. Quantifizierung der Phagozytoseaktivität

Testprinzip:

Der Test erfasste die Phagozytoseaktivität von Leukozyten mit Hilfe der FACS-gestützten Detektion der Fluoreszenz FITC-markierter E. coli, die zuvor von den Leukozyten einer Blutprobe phagozytiert wurden. Die Ingestion von einem oder mehreren Bakterien pro Zelle diente als Maß für die Phagozytoseaktivität.

Die Phagozytoseaktivität der Monozyten wurde mit einer für diese Zwecke modifizierten Version des Protokolls bestimmt, das im Phagotest®-Kit beschrieben ist.

Das Original-Protokoll von Phagotest® unterscheidet die Leukozyten-Hauptpopulationen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) durch ihre Scatter-Eigenschaften im Rahmen der FACS-Analyse, und sieht keine weitere Differenzierung hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker-Expression vor. Durch eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit anti-CD14-PC5 und anti-CD16-PE wurde eine weitere Differenzierung der Monozyten in ihre beiden Untergruppen ermöglicht. Im Original-Protokoll des Phagotest®-Kits wird darauf verwiesen, dass es häufig zu schwer vermeidbaren Aggregaten von FITC-markierten E. coli kommt, die dann aufgrund ihrer so erreichten Partikelgröße vom Durchflusszytometer fälschlicherweise als humane Zellen erkannt werden. Da diese Partikel aus einer Aggregation von FITC-positivem Material entstehen, täuschen sie erwartungsgemäß Zellen mit sehr hoher Phagozytoseaktivität vor. Das Original-Protokoll sieht zur Lösung dieses Problems eine DNA-Färbung zur Abgrenzung humaner Zellen von E. coli-Aggregationsartefakten vor. Dies ist im Original-Protokoll ausreichend, da dort keinerlei weitere Färbung zur Leukozytendifferenzierung vorgesehen ist. Durch die hier verwendete 3-fach-Färbung zur Monozytendifferenzierung hätte dies jedoch zu einer Überlagerung des Fluoreszenzmusters mit den Oberflächen-Antikörpern geführt, sodass auf diesen Schritt verzichtet werden musste. Das Problem des Auftretens von Aggregationsartefakten wurde dann über ein spezielles Gating gelöst (s.u.).

Testvorbereitung:

Vor Beginn der ersten Messung wurden die im Testkit vorhandenen Salze für die

Waschlösung („Salts for Washing Solution“) in 1000 ml Aqua bidest aufgelöst.

Die im Testkit beigefügten opsonisierten, FITC-markierten E. coli wurden in 40 Aliquots aufgeteilt und bei – 20 °C für den Zeitraum der Studie tiefgefroren. Vor jeder Messreihe wurde eine entsprechende Anzahl Proben aufgetaut (2 x 40 µl je Patient) und anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt.

Heparinisierte Vollblutproben wurden vor Beginn des Tests zusammen mit der im Testkit beigefügten „Quenching-Solution“ ebenfalls 10 Minuten auf Eis gekühlt, um eine Temperatur von 0 °C zu erreichen, bei der der Zellmetabolismus zum Stillstand kommen soll. Parallel dazu wurde ein Wasserbad unter präziser Temperaturkontrolle auf 37 °C erwärmt.

Eine der Anzahl der Vollblutproben entsprechende Menge Lysepuffer (2 x 2 ml je Patient) wurde vor jeder Messreihe neu hergestellt. Hierzu wurde der im Testkit enthaltene Lysepuffer mit Aqua bidest im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Testdurchführung:

a. Aktivierung der Monozyten:

Der Testansatz bestand aus einer Testprobe und einer Negativkontrolle. Beide Ansätze enthielten 200 µl vorgekühltes, heparinisiertes Vollblut und wurden zur Aktivierung mit 40 µl opsonisierter, FITC-markierter E. coli gemischt.

b. Inkubation:

Die Testprobe wurde 10 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Negativkontrolle verblieb in dieser Zeit auf Eis. Bei einer Temperatur von 0 °C ist keine Phagozytoseaktivität der Zellen zu erwarten, sodass eine später gemessene Fluoreszenz der Negativkontrolle als Autofluoreszenz zu werten ist. Hingegen ist bei 37 °C ein Phagozytoseoptimum zu erwarten.

c. Abstoppen:

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Probe zurück in das Eisbad überführt. Testprobe und Negativkontrolle wurden sogleich mit jeweils 200 µl der im Testkit enthaltenen vorgekühlten „Quenching-Lösung“ gemischt. Diese Lösung diente dazu, alle an der Zelloberfläche schon gebundenen, jedoch noch nicht phagozytierten E. coli zu bedecken und deren FITC-Fluoreszenz auszulöschen, ohne die Fluoreszenz der bereits phagozytierten Bakterien zu beeinflussen, sodass bei der späteren Fluoreszenzmessung nur die Fluoreszenz der internalisierten Bakterien gemessen wird.

d. Waschen (2 x):

Dazu wurden die Proben mit jeweils 3 ml der Phagotest[®]-Waschlösung gemischt, zentrifugiert (250 x g, 4 °C, 5 min) und der Überstand wieder verworfen.

e. Lyse:

Die Proben wurden mit jeweils 2 ml des Phagotest[®]-Lysepuffers 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert, 5 Minuten bei 4 °C und 250 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

f. Oberflächenfärbung:

Nach Resuspendieren der Zellen in jeweils 50 µl PBS, 2% FCS wurden anti-CD14-PC5 und anti-CD16-PE in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20 hinzugefügt. Es folgte eine 20-minütige Inkubationszeit auf Eis im Dunkeln.

g. Waschen und Resuspendieren:

Die Proben wurden erneut in o. g. Weise gewaschen und anschließend in 500 µl PBS, 2% FCS resuspendiert und schließlich der FACS-Analyse unterzogen.

Durchflusszytometrische Analyse:

Zuerst wurde ein Gate um die Gesamtpopulation der Monozyten gesetzt, basierend auf deren Eigenschaften im Forward- und Sideward-Scatter-Diagramm. Traten keine Artefakte von aggregierten E. coli auf, wurden die beiden Monozytensubpopulationen innerhalb des ersten Gates aufgrund ihrer CD14- bzw. CD16-Expression unterschieden (s.III.3.1.). In einem letzten Schritt wurde das Maß an Phagozytoseaktivität bestimmt, gemessen an dem Prozentsatz FITC-positiver Zellen innerhalb der beiden Populationen.

Ergaben sich Aggregationsartefakte, war ein weiterer Gatingsschritt notwendig. FITC-markierte aggregierte E. coli, die eine bestimmte Partikelgröße erreichen, um vom Durchflusszytometer als einzelnes Event erkannt zu werden, stellten sich, wie es sich zeigte, im CD14-PC5 –CD16-PE Diagramm als stark CD16-positiv und als nur schwach CD14-positiv dar, sodass die Verunreinigung im CD14+CD16+ Gate auftrat. Das Gate der „klassischen“ CD14++ Monozyten, die nicht CD16-positiv sind, wies somit keine Verunreinigung auf und benötigte deshalb keinen zusätzlichen Gatingsschritt.

In diesem Fall ergab die Analyse des CD14+CD16+ Gates im Gegensatz zu der nicht verunreinigten Population der klassischen Monozyten keine singuläre homogene FITC-positive Population (= Anteil der Zellen, die FITC-positive E. coli phagozytiert hatten),

sondern einen zweiten Peak mit wesentlich höherer medianer FITC-Fluoreszenz. Diese zweite Population entsprach den E. coli-FITC-Aggregaten, die als Zusammenlagerung ausschließlich FITC-positiven Materials eine extrem hohe mediane FITC-Fluoreszenz im Bereich > 200 (MFI) aufwiesen. Eine Einbeziehung dieser Partikel in die Analyse der Phagozytosefähigkeit der CD14+CD16+ Monozyten hätte zu der falschen Annahme geführt, dass es innerhalb dieser ohnehin kleinen Zellpopulation noch eine zweite gibt, deren Phagozytoseaktivität, gemessen an der medianen Fluoreszenz pro Zelle, um ein Vielfaches höher liegt. Auch bei der Analyse der Negativkontrolle, deren Versuchbedingungen keinerlei Möglichkeit zur Phagozytose zulassen, trat diese Zellpopulation in demselben Bereich auf und bewies so, dass es sich nicht etwa um phagozytierende Zellen handelt, sondern um eine eigenständige Population mit hoher FITC-Fluoreszenz (= Aggregationsartefakte von FITC-markierten E. coli). Um die E. coli-Aggregationspopulation von der Analyse der Phagozytoseaktivität auszuschließen, wurde daher in einem eingefügten Zwischenschritt ein Gate gesetzt, das nur die Erfassung aller FITC-positiven Zellen bis zu einem bestimmten Schwellenwert an medianer Fluoreszenz zuließ. Dieser Schwellenwert orientierte sich an der Fluoreszenz des zweiten FITC-positiven Peaks (siehe Abb. 2a-c).

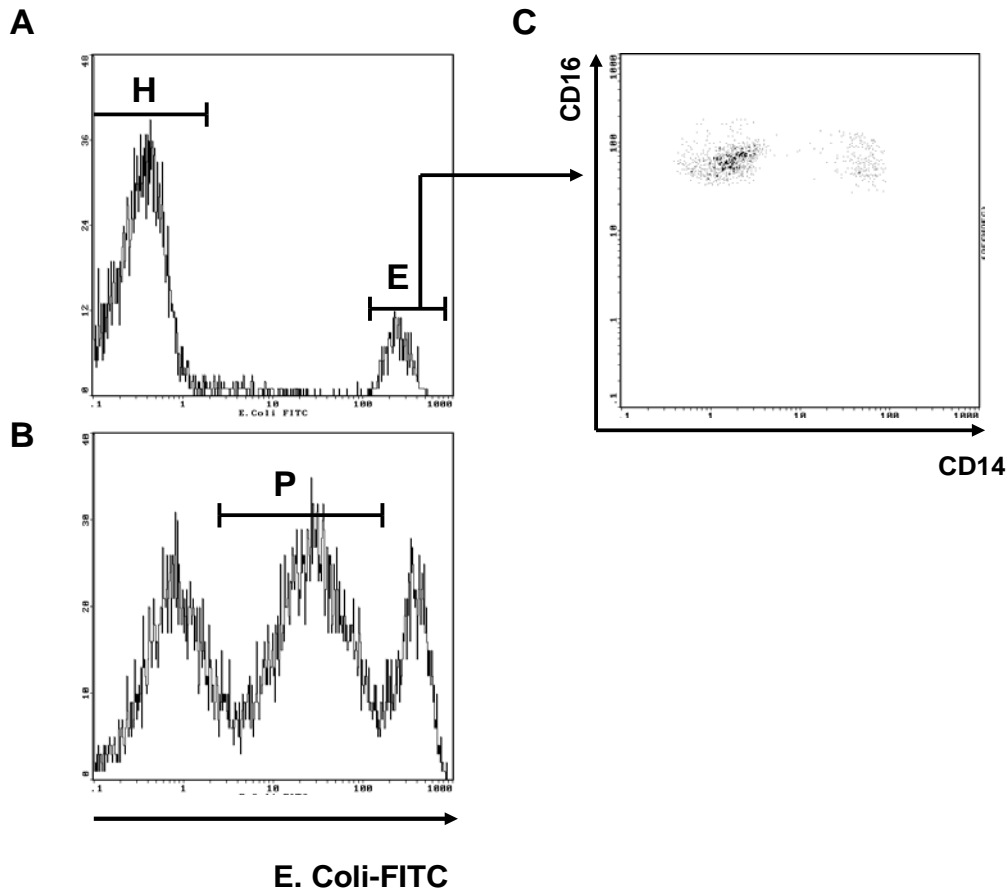


Abb.2: Peripheres Vollblut wurde mit FITC-markierten *E. coli* bei 37 °C (Abb.B) und auf Eis (Abb. A, Negativkontrolle) inkubiert und anschließend mit anti-CD14 und anti-CD16 gefärbt. Nach Setzen eines ersten Gates um die Monozytengesamtpopulation wurde der Anteil FITC-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **A).** Negativkontrolle eines repräsentativen Patienten. Peak rechts im Bild (E) als vermeintlich phagozytierende Zellpopulation im stark positiven Fluoreszenzbereich. H: Hintergrundfluoreszenz; E: *E. coli*-FITC-Aggregate. **B).** Inkubation bei 37 °C. Der mittlere Peak (P) markiert den Anteil tatsächlich phagozytierender Zellen; links davon Hintergrundfluoreszenz, rechts davon *E. coli*-FITC-Aggregate. **C).** Nach Setzen eines Gates um den Peak der *E. coli*-Aggregate (E) wurde dessen Fluoreszenzmuster im CD14+CD16+ Dot-Plot bestimmt. Die Aggregate stellen sich nur im CD14+CD16+ Monozytengate dar, sodass ausschließlich dort die Verunreinigung auftritt.

III.3.3. Quantitative Bestimmung des oxidativen Bursts

Testprinzip:

Die intrazelluläre Vernichtung phagozytierter Partikel, in diesem Fall phagozytierter unmarkierter *E. coli*, durch Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite wie Wasserstoffperoxid oder Superoxid-Anion wird als oxidativer Burst bezeichnet. Die Erfassung des oxidativen Bursts erfolgte in diesem Test über die indirekte Quantifizierung der gebildeten Sauerstoffradikale. Die Bildung der reaktiven Sauerstoffradikale wurde über die Oxidation des fluorogenen Substrats Dihydrorhodamin (DHR) 123 zu Rhodamin (R) 123 (grüner Fluoreszenzfarbstoff) gemessen, welches in der FACS-Analyse erfasst wurde. Somit konnte der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt werden, der eine oxidative Burstaktivität zeigt (Umwandlung von DHR 123 zu R 123). Die Burstaktivität der Monozyten wurde mit Hilfe einer für diese Zwecke modifizierten Version des Protokolls bestimmt, das im Phagoburst®-Testkit beschrieben ist.

Das Original-Protokoll von Phagoburst® unterscheidet die Leukozyten-Hauptpopulationen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) durch ihre Scatter-Eigenschaften im Rahmen der FACS-Analyse, und sieht keine weitere Differenzierung hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker-Expression vor. Durch eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit anti-CD14-PC5 und anti-CD16-PE nach Durchführung aller für die Bestimmung des oxidativen Bursts notwendigen Schritte des Original-Protokolls wurde eine weitere Differenzierung der Monozyten in ihre beiden Untergruppen ermöglicht.

Die im Original-Protokoll durchgeführte DNA-Färbung zur Abgrenzung von *E. coli*-Aggregations-Artefakten hätte zu einer Überlagerung des Fluoreszenzmusters mit den Oberflächen-Antikörpern geführt, sodass auf diesen Schritt verzichtet wurde. Das Gating der Monozyten über ihre CD14 – bzw. CD16-Expression reichte in diesem Test aus, um *E. coli*-Aggregationsartefakte auszuschließen (im Gegensatz zu den im Phagotest® eingesetzten FITC-markierten *E. coli* handelte es sich bei den hierbei eingesetzten Bakterien um unmarkierte *E. coli*, die somit ein anderes Fluoreszenzmuster aufwiesen).

Testvorbereitung:

Vor Beginn der ersten Messung wurden die im Testkit vorhandenen Salze für die Waschlösung („Salts f. Washing Solution“) in 1000 ml Aqua bidest aufgelöst.

Die im Testkit beigefügten opsonierten, unmarkierten *E. coli* wurden in 40 Aliquots aufgeteilt und bei – 20 °C für den Zeitraum der Studie tiefgefroren. Vor jeder Messreihe

wurde eine entsprechende Anzahl Proben aufgetaut (40 µl je Patient) und anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt.

Heparinisierte Vollblutproben wurden vor Beginn des Tests ebenfalls 10 Minuten auf Eis gekühlt, um eine Temperatur von 0 °C zu erreichen, bei der der Zellmetabolismus weitgehend zum Stillstand kommen soll. Parallel dazu wurde ein Wasserbad unter präziser Temperaturkontrolle auf 37 °C erwärmt.

Zusätzlich wurde eine Substratlösung des DHR 123 hergestellt, indem eine im Testkit beigefügte Substratscheibe („Substrate Disc“) mit 1 ml der im Kit enthaltenen Waschlösung 40 Minuten inkubiert wurde. Der in der aktuellen Testreihe nicht zur Verwendung gekommene Rest der Substratlösung wurde in 8 Aliquots aufgeteilt, bei – 20 °C tiefgefroren und konnte für bis zu zwei Wochen gelagert werden. Erfolgte eine Messung innerhalb dieses Zeitraums, wurde eine entsprechende Anzahl tiefgefrorener Aliquots vor Beginn des Tests aufgetaut und bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Messungen nach dieser Zeit wurden mit einer neu rekonstituierten Substratlösung durchgeführt.

Eine der Anzahl der Vollblutproben entsprechende Menge Lysepuffer (2 x 2 ml je Patient) wurde vor jeder Messreihe neu hergestellt. Hierzu wurde der im Testkit enthaltene Lysepuffer mit Aqua bidest im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Testdurchführung:

a. Aktivierung der Monozyten:

Hierzu wurden 200 µl vorgekühltes heparinisiertes Vollblut mit 40 µl opsonisierter unmarkierter E. coli gemischt und 10 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Eine Negativkontrolle, bestehend aus einem Gemisch von 200 µl heparinisiertem Vollblut und 40 µl der im Testkit enthaltenen Waschlösung, wurde ebenfalls bei 37 °C 10 Minuten inkubiert.

b. Oxidation:

Nach der 10-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Oxidation der Zellen, indem jeweils 40 µl der Substratlösung (DHR 123) zu Positivprobe und Negativkontrolle hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Proben erneut 10 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert.

c. Abstoppen (Lyse):

Zum Beenden des Oxidationsvorganges wurden die Proben nach Ende der

Inkubationszeit gleichzeitig aus dem Wasserbad entnommen und mit jeweils 2 ml des Phagoburst®-Lysepuffers gemischt. Es folgte eine 20-minütige Lyse der Proben bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (5 min, 250 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

d. Waschen:

Die Proben wurden einmal mit der Phagoburst®- Waschlösung gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 250 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

e. Oberflächenfärbung:

Nach Resuspendieren der Zellen in jeweils 50 µl PBS, 2% FCS wurden anti-CD14-PC5 und anti-CD16-PE in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20 hinzugefügt. Es folgte eine 20-minütige Inkubationszeit auf Eis im Dunkeln.

f. Waschen und Resuspendieren:

Die Proben wurden erneut mit der Phagoburst®- Waschlösung gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 250 x g, 4 °C), der Überstand verworfen, in 500 µl PBS, 2% FCS resuspendiert und anschließend der FACS-Analyse unterzogen.

Durchflusszytometrische Analyse:

In einem ersten Schritt wurden die Monozyten als Gesamtpopulation aufgrund ihrer Scatter-Eigenschaften definiert. Innerhalb dieses Monozyten-Gates wurden schließlich die beiden Subpopulationen anhand ihrer CD14- und CD16-Expression unterschieden (s.III.3.2, letzter Absatz).

Schließlich wurde durch die Detektion FITC-positiver Zellen innerhalb dieser Gates der Prozentsatz der Zellen ermittelt, der oxidativen Burst betrieben hatte.

III.3.4. Aufreinigen peripherer mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Für die in III.3.5. – III.3.7. beschriebenen Testverfahren, bei denen ausschließlich mit mononukleären Zellen gearbeitet wurde, erfolgte in einem ersten Schritt eine Isolation dieser Zellen nach dem Ficoll-Isopaque-Prinzip.

Verfahrensprinzip:

Periphere mononukleäre Zellen (PBMZ) können mittels eines Ficoll-Gradienten von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Ficoll ist ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, dessen Dichte so beschaffen ist, dass Granulozyten in die Ficollschicht eindringen, während Erythrozyten und tote Zellen diese Phase passieren. Periphere mononukleäre Zellen hingegen sammeln sich in einer Interphase zwischen Ficollschicht und Serum, sodass sie aus dieser abpipettiert werden können.

Procedere:

In einem ersten Röhrchen wurde eine für den jeweiligen Test erforderliche Gesamtmenge Vollblut mit der gleichen Menge PBS (einfach konzentriert) gemischt. In ein zweites Röhrchen wurde eine der eingesetzten Vollblutmenge entsprechende Menge Ficoll-Isopaque-Lösung (Lymphoprep®) pipettiert.

Anschließend wurde das Vollblut-PBS-Gemisch aus dem ersten Röhrchen langsam auf die Lymphoprep®-Lösung pipettiert und dann zentrifugiert (30 min, 400 x g, 4 °C).

Schließlich wurde die Interphase des entstandenen Zentrifugationsproduktes abpipettiert und damit der Bestand an mononukleären Zellen isoliert.

Die Proben wurden nun zweimal mit 10 ml PBS, 2% FCS gewaschen, die Zellen abzentrifugiert (10 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

III.3.5. Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mit LPS

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. Ein gut untersuchter Effekt von LPS ist die Induktion der TNF-alpha-Produktion. TNF-alpha ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in lokalen wie systemischen Entzündungsreaktionen eine tragende Rolle spielt, z. B. beim septischen Schock. Der molekulare Weg von der Freisetzung des LPS beim Untergang gramnegativer Bakterien bis zur Produktion von TNF-alpha erfolgt über die Bindung von LPS an das monozytäre Oberflächenmolekül CD14, wodurch eine Signalübertragung in das Zellinnere ausgelöst wird, die letztlich in der Produktion von TNF-alpha mündet.

Zur Untersuchung der LPS-induzierten TNF-alpha-Produktion beider Monozyten-subpopulationen wurden periphere mononukleäre Zellen durch das in III.3.4. beschriebene Dichtezentrifugationsverfahren gewonnen und bei einer Zellkonzentration von $10^6/\text{ml}$ in 3 ml RPMI 1640, 10% FCS resuspendiert. Anschließend wurde der Proteintransportinhibitor Brefeldin A (BFA) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{l/ml}$ und LPS in einer Konzentration von 500 ng/ml hinzugefügt und 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt die gleiche Konzentration BFA, jedoch kein LPS. Die zeitgleiche Inkubation mit dem Proteintransportinhibitor BFA verhindert dabei die Sekretion des nach Stimulation der Zellen intrazellulär produzierten Zytokins (TNF) und ermöglicht somit eine vollständige Erfassung der tatsächlich produzierten, durch intrazelluläre Färbung nachweisbaren Zytokinmenge.

III.3.6. Intrazelluläre TNF-Färbung und durchflusszytometrische Analyse

Vorbereitung:

Die wie in III.3.5. beschrieben stimulierten peripheren mononukleären Zellen wurden nach der Inkubationszeit abzentrifugiert (10 min, 400 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und anschließend mit 1 ml PBS, 2% FCS gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

Die intrazelluläre Färbung wurde entsprechend einer für diese Zwecke leicht modifizierten Version des Protokolls durchgeführt, das im Caltag Fix & Perm[®] - Kit beschrieben ist. Um jedoch eine Differenzierung der Monozyten in ihre beiden Subpopulationen zu ermöglichen, wurde vor der intrazellulären Färbung eine Oberflächenfärbung der Zellen

durchgeführt. Nach Resuspendieren der Zellen in 50 µl PBS, 2% FCS wurden anti-CD14-RD1 und anti-HLA-DR-PC5 in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 hinzugefügt und für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Wie eingangs beschrieben, lässt sich die Population der C14+CD16+ Monozyten auch durch ihre HLA-Expression definieren. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS, 2% FCS gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

Färbung:

Zunächst wurden die oberflächenmarkierten Zellen fixiert. Dies erfolgte durch das Hinzufügen von 100 µl Caltag Fix & Perm[®]- Reagenz A, welches Formaldehyd enthält. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit 1,5 ml PBS, 2% FCS gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Permeabilisation der Zellen mittels Caltag Fix & Perm[®]-Reagenz B. Das Permeabilisations-Reagenz des Testkits ermöglicht den Übertritt von markierten Antikörpern in das Zellinnere, um dort entsprechende Antigenstrukturen zu färben. Hierzu erfolgte die zeitgleiche Gabe der Antikörper für das zu färbende intrazelluläre Zytokin (anti-TNF-FITC) und des Antikörpers für die Isotyp-Kontrolle (IgG1-FITC) in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10. Die Zellen wurden anschließend bei Raumtemperatur für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS, 2% FCS gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen.

Durchflusszytometrische Analyse:

Nach Resuspendieren der Zellen in 500 µl PBS, 2% FCS wurden diese der FACS-Analyse unterzogen (Software: XL System II, Version 3.0). Zunächst erfolgte die Identifikation der Monozyten anhand ihrer Eigenschaften im Forward- und Sideward-Scatter-Diagramm. Anschließend wurden die Monozyten innerhalb dieses ersten Gates anhand ihrer CD14- bzw. HLA-DR-Expression in die beiden Subpopulationen unterschieden. Innerhalb dieser Gates wurde die mediane FITC-Fluoreszenz-Intensität (MFI) der beiden Subpopulationen bestimmt. Die intrazelluläre Produktion von TNF errechnete sich damit aus der Differenz aus medianer Fluoreszenz-Intensität des spezifischen Antikörpers (anti-TNF-FITC) und der Isotyp-Kontrolle (unspezifischer Antikörper IgG1-FITC).

III.3.7. Inkubation mit Melphalan in vitro

Zur Untersuchung des Überlebens der CD14+CD16+ Monozyten in der Anwesenheit des Zytostatikums Melphalan wurden periphere mononukleäre Zellen durch das in III.3.4. beschriebene Dichtezentrifugationsverfahren gewonnen und bei einer Zellkonzentration von 10^6 /ml in 3 ml RPMI 1640, 10% FCS bzw. 3 ml humanes Serum je Ansatz resuspendiert.

Anschließend wurde die entsprechende Melphalanmenge zu jedem Ansatz (à 3 ml) hinzugefügt, sodass sich folgende Melphalankonzentrationen ergaben: Für die Untersuchung der PBMZ gesunder Probanden 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M (nur in RPMI, 10% FCS), und für die Untersuchung der Patienten-PBMZ eine Konzentration von 30 μ M (sowohl in RPMI, 10% FCS als auch in patienteneigenem Serum). Es folgte eine Inkubation über 24 Stunden bei 37 °C. Eine Probe ohne Zusatz von Melphalan diente als Negativkontrolle.

In zwei weiteren Ansätzen der RPMI 1640, 10% FCS-Reihe gesunder Probanden erfolgte ein Zusatz von 200 ng/ml M-CSF bzw. 100 ng/ml G-CSF.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben abzentrifugiert (10 min, 400 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und anschließend mit 1 ml PBS, 2% FCS gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Nach Resuspendieren der Zellen in 50 μ l PBS, 2% FCS erfolgte eine wie in III.3.1. beschriebene Oberflächenfärbung mit entsprechender durchflusszytometrischer Analyse.

III.4. Statistik

Für die statistische Analyse wurde der Student-T-Test (Software: Microsoft Office Excel 2003) für paarige und unpaarige Stichproben durchgeführt. Als statistisch signifikant galt $P < 0,05$.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Quantitative Subgruppenanalyse im Verlauf von autologer Stammzelltransplantation: Umkehr der Monozytenratio und zeitlich versetzte Rekonstitution

Untersucht wurden die Proben von 12 gesunden Probanden sowie von fünfzehn Patienten, die eine Therapiesequenz aus myeloablativer Hochdosis-Chemotherapie und nachfolgender autologer Stammzelltransplantation unterliefen. Die Diagnose war bei zehn Patienten das multiple Myelom, bei einem Patient ein Hodgkin-Lymphom und bei vier Patienten ein niedrig-malignes NHL. Der Tag der Stammzelltransplantation wird im Folgenden als Tag 0 bezeichnet, die restlichen Tage des assoziierten Krankenhausaufenthalts beziehen sich auf diesen Tag (so sind in diesem Schema z.B. der Tag vor und nach Transplantation Tag -1 bzw. Tag +1).

Bei allen Patienten erfolgte die Stammzellentnahme über die periphere Stammzellapherese nach Applikation einer Mobilisierungstherapie (siehe Einleitung, II.2.1). Die mediane Zeit zwischen der letzten Gabe einer konventionellen Chemotherapie im Rahmen der Induktionstherapie (= Therapie zur Verkleinerung der Tumormasse) und der Mobilisierungstherapie betrug drei Monate, wobei insgesamt eine zeitliche Spanne von 1-34 Monaten bestand. Die mediane Zeit zwischen der Durchführung der Mobilisierungstherapie und der Durchführung der autologen Stammzelltransplantation betrug zwei Monate, und hierbei lag die zeitliche Spanne bei 1-14 Monaten. Die Daten der Patienten bezüglich Grunderkrankung, Hochdosistherapie, konventioneller Chemotherapie und Anzahl der reinfundierten CD34+ Stammzellen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Zur schnelleren hämatopoetischen Rekonstitution im Rahmen der ASZT erhielten alle Patienten täglich eine subkutane Gabe von G-CSF in einer Dosierung von 5 µg/kg KG. Die erste Gabe erfolgte am Tag vor der Stammzell-Retransfusion (Tag -1), was im Rahmen einer klinischen Studie des Instituts erfolgte. Ermittelt wurde hierbei der prognostische Wert des Ansprechens auf G-CSF vor Stammzelltransplantation, um das individuelle Potential in der Abwehr von Infektionen in der folgenden Neutropeniephase zu ermitteln [60]. Die nächste Gabe erfolgte am Tag +1. Ab einer Leukozytenzahl > 5000/µl wurde die G-CSF Gabe eingestellt.

Die Anzahl der CD14+CD16+ Monozyten im peripheren Blut wurde über eine Zwei- oder Dreifarben-Durchflusszytometrie bestimmt. Die Durchführung einer Dreifachfärbung mit Darstellung von HLA-DR zusätzlich zur CD14- und CD16-Färbung erfolgte am Tag der

Aufnahme und der Entlassung, um gleichzeitig die mediane HLA-DR-Fluoreszenz als Parameter für die absolute Höhe der HLA-DR-Expression zu erfassen (siehe unten). Weiterhin erfolgte eine HLA-DR-Färbung zur genaueren Detektion der CD14+CD16+ Monozyten v.a. an Tagen mit insgesamt niedriger Monozytenzahl, um eine Kontamination der Ergebnisse durch andere Zellgruppen wie z.B. Granulozyten zu vermeiden, die ebenfalls CD16 exprimieren. Die erste Messung wurde am Tag der Krankenhausaufnahme durchgeführt (vor ASZT, Tag -4), die letzte Messung erfolgte am Tag der Entlassung (nach ASZT, Tag $11,3 \pm 2,2$).

Vor der Stammzelltransplantation lag das Verhältnis der CD14+CD16+ Monozyten zu den CD14++ Monozyten [(CD14+CD16+/CD14++)-Ratio] bei $0,28 \pm 0,11$ (n=11), vergleichbar mit der Ratio gesunder Kontrollen ($0,26 \pm 0,18$, n = 18). Auch die absolute Zellzahl der CD14+CD16+ Monozyten unterschied sich mit $29,7 \pm 9,8/\mu\text{l}$ nicht von der Zellzahl gesunder Probanden. Demnach besteht im Rahmen der Grunderkrankung keine Expansion der CD14+CD16+ Monozyten, wie sie bei einigen anderen (soliden) Neoplasien beschrieben worden ist (siehe Einleitung).

Das Ratio der Monozytensubpopulationen kehrte sich im Verlauf der Hochdosistherapie und ASZT zugunsten der CD14+CD16+ Monozyten um und erreichte hierbei einen Spitzenwert von $12,38 \pm 7,84$ an Tag $3,5 \pm 1,5$ ($P < 0,0001$).

Im weiteren Verlauf nahm der Anteil der CD14+CD16+ Monozyten wieder ab. Am Tag der Entlassung (Tag $11,3 \pm 2,2$) kam es zu einer erneuten Umkehr der Ratio, also schließlich erneut zugunsten der klassischen CD14++ Monozyten, mit einem Wert von $0,11 \pm 0,07$. Damit lag zu diesem Zeitpunkt eine signifikant erniedrigte (CD14+CD16+/CD14++)-Ratio im Vergleich zu der Ratio vor Stammzelltransplantation vor ($P < 0,001$).

Bei der Betrachtung der absoluten Zellzahl fiel auf, dass die Zahl der CD14++ Monozyten von $121 \pm 35/\mu\text{l}$ vor ASZT auf einen Wert $< 1/\mu\text{l}$ am Nadir fielen, die Zahl der CD14+CD16+ Monozyten jedoch von $27,5 \pm 10,1/\mu\text{l}$ auf $3,8 \pm 2,7/\mu\text{l}$. Dies könnte auf eine höhere Resistenz der proinflammatorischen Monozyten gegenüber der zytostatischen Therapie *in vivo* hinweisen. *In vitro* Experimente an Proben von einer kleinen Anzahl gesunder Probanden sowie von Patienten, deren periphere mononukleäre Zellen mit Melphalan inkubiert wurden, konnten jedoch keine Verifizierung dieser These erbringen (siehe unter IV.2 "Monozyteninkubation mit Melphalan *in vitro*"); dies ist jedoch wahrscheinlich durch die Methodik bedingt, die die komplexen *in-vivo*-Bedingungen wahrscheinlich nicht ausreichend repräsentiert hat (siehe dort).

Bei der detaillierten Analyse der Kinetik der Monozytenentwicklung nach ASZT fiel auf,

dass es im Rahmen der Monozytenrekonstitution nach Überwindung des Leukozytennadirs zuerst zu einer Erholung der CD14⁺⁺ Monozytensubpopulation kommt. So kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der CD14⁺⁺ Monozyten im peripheren Blut als Zeichen der Ausschwemmung der ersten neu produzierten Monozyten aus dem Knochenmark. Nach einer nur geringfügigen Zunahme der Zellen in der ersten Woche nach dem Leukozytennadir steigt die CD14⁺⁺ Monozytenzahl sprunghaft (Tag 9,1 ± 2,1) um das 70 ± 53-fache an. Die absolute CD14⁺⁺ Zellzahl beträgt dabei 34 ± 33/μl. Gleichzeitig bleibt die Anzahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten entweder noch konstant erniedrigt, fällt weiter ab oder steigt lediglich geringfügig an, sodass im Durchschnitt kein Anstieg, sondern ein Abfall auf 2,7 ± 2,3 Zellen/μl resultiert.

In den Folgetagen bis zur Entlassung ändert sich dieser Trend, indem der relative Anstieg der CD14⁺⁺ Monozyten auf das 11,5 ± 8,0-fache fällt, während es zu einem sprunghaften Anstieg der CD14⁺CD16⁺ Monozyten um einen ähnlichen Wert (12,2 ± 9,7-fach) kommt. Die absolute Monozytenzahl der CD14⁺⁺ Monozyten betrug am Tag der Entlassung 197,9 ± 105,4/μl, die Zahl der CD14⁺CD16⁺ Monozyten 22,2 ± 17,3/μl.

Somit setzt der erste Schub der Ausschwemmung proinflammatorischer Monozyten im Vergleich zu den klassischen Monozyten deutlich verzögert ein. Abb. 3C gibt die Monozytenkinetik graphisch wieder.

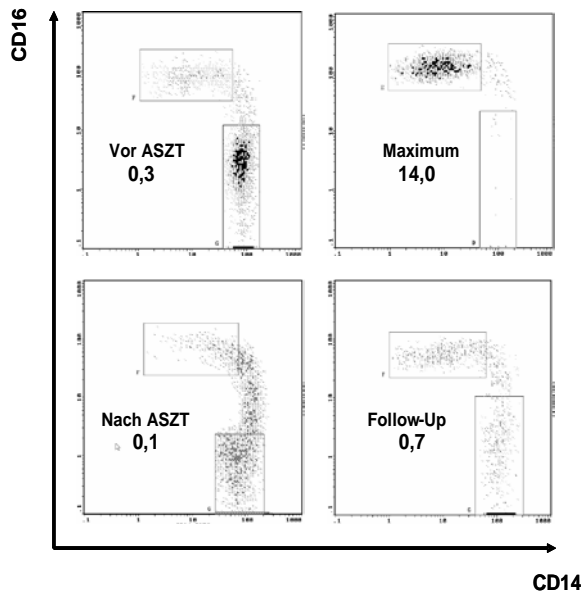
Die absolute CD14⁺CD16⁺ Zellzahl unterschied sich am Tag der Entlassung nicht mehr signifikant von der Zellzahl vor ASZT, jedoch erzeugt der beschriebene dominierende CD14⁺⁺ Teil die signifikant erniedrigte (CD14⁺CD16⁺/CD14⁺⁺)-Ratio.

Die Anzahl der CD14⁺⁺ Monozyten betrug zum Zeitpunkt der Entlassung 197 ± 105/μl und erreichte damit einen (nicht signifikant) höheren Wert als vor der Therapie. Eindrucksvoller ist diesbezüglich die Analyse der Patienten, deren Gesamtleukozytenzahl bei Entlassung auch bereits im normalen Bereich lag (definiert als Leukozytenzahl > 4500/μl) bzw. deren Gesamtleukozytenzahl mindestens den Ausgangswert bei Aufnahme erreicht hatte, falls diese mit erniedrigten Leukozytenzahlen stationär aufgenommen worden waren. Hier lag die Zahl der CD14⁺⁺ Monozyten noch höher mit 227 ± 94/μl, was einer signifikanten Zunahme der CD14⁺⁺ Monozyten entspricht (P < 0,05). Die Ratio der beiden Monozytensubpopulationen war hingegen in beiden Gruppen identisch (0,11 ± 0,08).

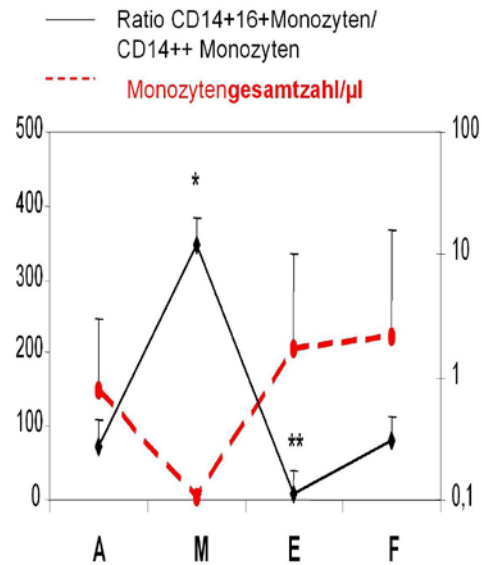
Wie eingangs erwähnt, gibt es zahlreiche Hinweise, dass es sich bei den CD14⁺CD16⁺ Monozyten um eine im Vergleich zu den klassischen Monozyten reifere bzw. differenziertere Zellpopulation handelt (siehe Einleitung). Unter der Annahme, dass dieser Zelltyp mehr Zeit benötigt, um sich zu entwickeln als die CD14⁺⁺ Monozyten, vermuteten

wir, dass die erniedrigte Ratio der CD14+CD16+ Monozyten zum Zeitpunkt der Entlassung im weiteren Verlauf zunehmen würde. Bereits die oben genannten Unterschiede in der Kinetik der Subpopulationen in der Zeit bis zur Entlassung waren diesbezüglich wegweisend. Daher führten wir bei sieben Patienten eine erneute Untersuchung einige Wochen nach Entlassung durch. Die Ratio dieser sieben Patienten betrug bei Aufnahme $0,32 \pm 0,11$ und bei Entlassung $0,08 \pm 0,04$. Tatsächlich nahm die Zahl und der Anteil der CD14+CD16+ Monozyten weiter zu, sodass nun ein Monozyten-Verhältnis ähnlich der Ratio vor ASZT festgestellt werden konnte ($0,30 \pm 0,18$). Die Zellzahl der proinflammatorischen Monozyten betrug hierbei $37,5 \pm 23,3/\mu\text{l}$. Die Zahl der CD14+CD16+ Monozyten in diesem Patientenkollektiv hatte bei Aufnahme $33,1 \pm 9,4/\mu\text{l}$ betragen, sodass dies keinen signifikanten Unterschied bedeutete.

A



B



C

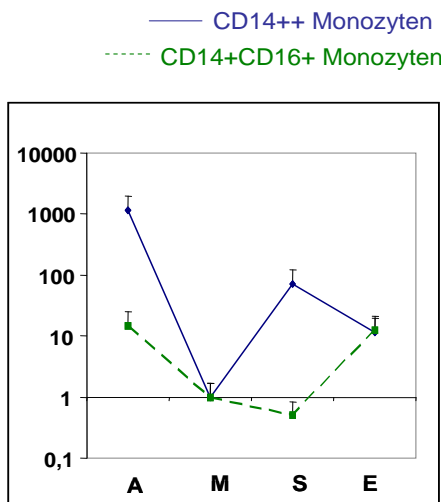


Abb. 3: Peripheres Blut von Lymphompatienten wurde im Verlauf von HDT und ASZT mit anti-CD14 und anti-CD16 gefärbt. **A)** In der FACS-Analyse wurden Gates um die CD14++ Monozyten (unten rechts innerhalb der Dot-Plots) und die CD14+CD16+ Monozyten (oben in den Dot-Plots) gesetzt und die Ratio zwischen der Anzahl der Events innerhalb der beiden Gates bestimmt (CD14+CD16+ : CD14++). Gezeigt werden die Dot-Plots eines Patienten vor ASZT (oben links), am Tag der maximalen Ratio (oben rechts), am Tag der Entlassung (unten links) und des Follow-Ups nach einigen Wochen (unten rechts). **B)** Gezeigt wird der zeitliche Verlauf der CD14+CD16+ : CD14++ - Ratio

von $n = 13$ Patienten auf einer logarithmischen Skala (rechte Skala, durchgezogene schwarze Linie) und die Monozytengesamtzahl / μ l (linke Skala, gestrichelte rote Linie). A: vor ASZT, Tag -4; M: Maximale Ratio, Tag $3,5 \pm 1,6$; E: Entlassung, Tag $11,3 \pm 2,2$; F: Follow-Up, Tag 174 ± 111 . * und **, $P < 0,01$ vs. Vorwert. **C)** Gezeigt wird die Kinetik beider Monozytensubpopulationen von $n=13$ Patienten im zeitlichen Verlauf von HDT und ASZT. Die Y-Achse gibt den Wert der Vervielfachung der Monozytenzahl wieder. M: Maximale Ratio (Tag $3,5 \pm 1,6$); S: Schub der CD14++ Monozyten (Tag $9,1 \pm 2,1$); E: Entlassung (Tag $11,3 \pm 2,2$). Durchgezogene blaue Linie: CD14++ Monozyten; gestrichelte grüne Linie: CD14+CD16+ Monozyten.

IV.2. Monozyteninkubation mit Melphalan *in vitro*: Erhöhte Zytostatikatoxizität auf die CD14+CD16+ Monozyten unter klassischen Kulturbedingungen bei verbessertem Überleben in patienteneigenem Serum

Wie in IV.1. gezeigt, kommt es unter der Hochdosistherapie mit Melphalan *in vivo* und nachfolgender Stammzelltransplantation zu einer Umkehr der Monozytenratio zugunsten der CD14+CD16+ Monozyten. Dies könnte durch eine höhere Resistenz der proinflammatorischen Monozyten gegenüber der Chemotherapie bedingt sein. Aus diesem Grund wurde eine Inkubation mit Melphalan *in vitro* an einer kleinen Anzahl gesunder Probanden und Patienten durchgeführt.

Gesunde Probanden:

PBMZ wurden nach Resuspension in RPMI 1640, 10% FCS zusammen mit Melphalan 24 Stunden inkubiert. Die Melphalandosierung lag hierbei in 6 verschiedenen Ansätzen bei 0 μ M (Negativkontrolle), 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 60 μ M.

Hierbei zeigte sich jedoch, dass es unter steigender Melphalandosierung zu einem überproportionalen Abfall der CD14+CD16+ Monozyten mit entsprechender Verringerung der (CD14+CD16+/CD14++)-Ratio kommt. Ohne Zusatz von Melphalan (Negativkontrolle) lag eine (CD14+CD16+/CD14++)-Ratio von $0,20 \pm 0,08$ vor. Bei der maximalen Konzentration von 60 μ M war die Ratio auf $0,01 \pm 0,005$ abgesunken. Dieses Ergebnis ist somit nicht durch eine höhere Resistenz, sondern durch eine höhere Empfindlichkeit der CD14+CD16+ Monozyten gegenüber der Melphalantherapie erklärbar, zumindest unter diesen Inkubationsbedingungen.

In früheren Arbeiten wurde der Einfluss der Wachstumsfaktoren M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor) und G-CSF auf die Induktion der CD14+CD16+ Monozyten gezeigt [34,35,55], sodass eine Wiederholung des Experimentes unter dem Zusatz dieser Wachstumsfaktoren durchgeführt wurde. Die erste Reihe enthielt M-CSF in einer Dosierung von 200 ng/ml, die zweite Reihe G-CSF in einer Dosierung von 100 ng/ml. Es ergaben sich nur schwache Hinweise auf ein verbessertes Überleben der CD14+CD16+ Monozyten unter diesen Kulturbedingungen. Es kam insgesamt gesehen ebenfalls zu einem drastischen, überproportionalen Abfall dieser Zellpopulation unter steigender Melphalandosierung. Li et. al hatten jedoch bereits postuliert, dass der Induktionseffekt von G-CSF auf die CD14+CD16+ Monozyten *in vivo* wahrscheinlich einen indirekten Effekt darstellt, da sich auch dort keine Expansion durch G-CSF *in vitro* induzieren ließ

[34].

Patienten:

Der in IV.1. geschilderte Abfall der CD14+CD16+ Monozyten steht im Kontrast zu den Ergebnissen der in-vivo-Experimente und gab daher Anlass zur Vermutung, dass es sich bei der Versuchsdurchführung um einen Ansatz gehandelt haben könnte, der die Bedingungen *in vivo* wahrscheinlich nicht ausreichend repräsentiert hat. Dies könnte v.a. auf das komplexe Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren oder Zytokine im Krankheits- bzw. Therapieprozess zurückzuführen sein (s.o.). Da sich Zytokine und Wachstumsfaktoren im Serum befinden, erfolgte der nachgeschaltete Versuchsansatz der Patientenproben mit einer parallelen Inkubation der PBMZ in RPMI, 10% FCS und patienteneigenem Serum. Aufgrund der Ergebnisse der gesunden Probanden, die zeigten hatten, dass ab einer Melphalankonzentration von 40 µM fast kein Überleben der Monozyten zu beobachten ist, wurde eine Melphalankonzentration von 30 µM gewählt.

Ohne Zusatz zytotoxischer Agentien zeigte sich eine den gesunden Kontrollen vergleichbare (CD14+CD16+/CD14++)-Ratio mit $0,19 \pm 0,05$, wenn man die Zellen in RPMI, 10% FCS 24 Stunden inkubiert. Inkubiert man die Zellen jedoch in dem patienteneigenen Serum, so zeigt sich eine Erhöhung der Ratio auf das 2,4-fache von $0,45 \pm 0,06$. Der Zusatz von 30 µM Melphalan bewirkte jedoch in beiden Fällen erneut eine Abnahme der Ratio. Diese fiel auf $0,06 \pm 0,01$ bei Inkubation in RPMI, 10% FCS und auf $0,31 \pm 0,07$ bei Inkubation in patienteneigenem Serum. Der Abfall der Ratio betrug damit in der RPMI/FCS-Reihe $66,47 \pm 2,9$ % des Ausgangswertes und lag damit deutlich höher als der Abfall in der Patientenserum-Versuchsreihe mit $33,1 \pm 9,1$ % des Vorwertes ($P < 0,05$). Interessanterweise war auch der Abfall der Ratio unter Zusatz von Melphalan tendenziell geringer als bei den gesunden Probanden, bei denen bereits eine niedrigere Konzentration von nur 20 µM einen Abfall der Ratio um $77,9 \pm 8$ % bewirkte. Die zytostatische Vorbehandlung der Patienten könnte so insgesamt gesehen eine höhere Resistenz der CD14+CD16+ Monozyten durch Selektion chemoresistenter Zellen fördern, wobei unbekannte humorale Faktoren eine überlebensfördernde Wirkung auf die CD14+CD16+ Monozyten zu haben scheinen.

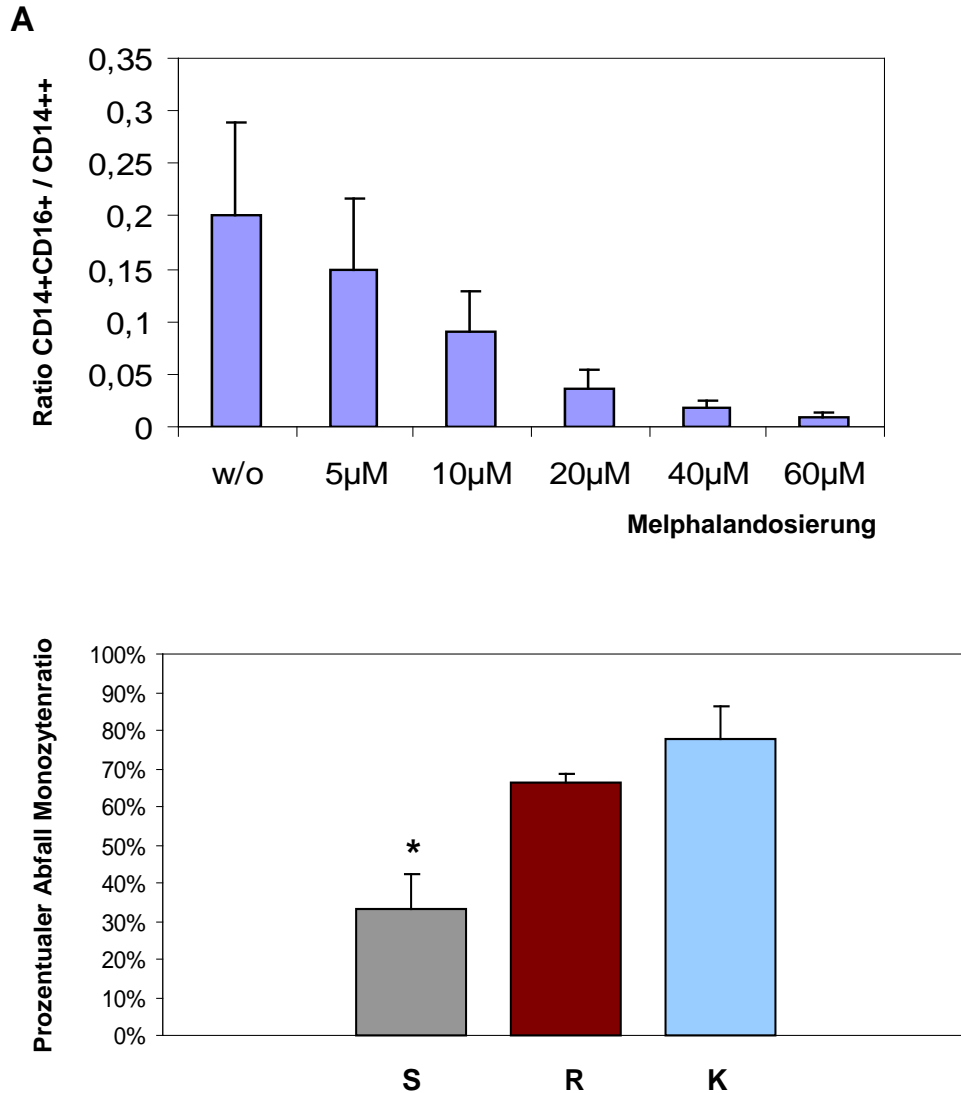


Abb.4: PBMZ wurden 24 h mit Melphalan inkubiert. Nach Oberflächenfärbung wurde der Anteil der überlebenden Monozytensubpopulationen mit der FACS-Analyse ermittelt. **A)** Ratio der Monozytenpopulationen unter steigender Melphalandosierung bei gesunden Kontrollen, Inkubation in RPMI, 10% FCS. **B)** Prozentualer Abfall der Ratio \pm STABW unter 30 μ M Melphalan (Patienten, $n = 3$) bzw. 20 μ M Melphalan (gesunde Probanden, $n = 3$). S: Patienten, Inkubation in patienteneigenem Serum; R: Patienten, Inkubation in RPMI, 10% FCS; K: gesunde Kontrollen, Inkubation in RPMI, 10% FCS. *, $P < 0,05$ vs. Inkubation in RPMI, 10% FCS.

IV.3. Analyse der Phagozytoseaktivität

IV.3.1. Physiologisch differente Phagozytoseaktivität in beiden Monozytenpopulationen

Zur Analyse der funktionellen Eigenschaften der Monozyten wurde die Phagozytoseaktivität mit Hilfe einer für diese Zwecke modifizierten Version des Protokolls bestimmt, das im Phagotest[®]-Kit beschrieben ist. Prinzip des Tests ist die Phagozytose FITC-markierter *E. coli* mit Bestimmung des Anteils FITC-positiver Zellen in der Durchflusszytometrie. Zunächst wurde die Phagozytoseaktivität von Proben sieben gesunder Probanden ermittelt. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität der klassischen CD14⁺⁺ Monozyten gegenüber der Subpopulation der CD14⁺CD16⁺ Monozyten ($P < 0,001$). $64 \pm 7\%$ der CD14⁺⁺ Monozyten hatten FITC-markierte *E. coli* phagozytiert, und $41 \pm 7\%$ der CD14⁺CD16⁺ Monozyten. Dieses Verhältnis entspricht weitgehend dem Ergebnis einer Studie von Skrzeczynska et. al., wo ebenfalls eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität gesunder Kontrollen gezeigt worden war [59], wobei anzumerken ist, dass es sich dort um eine Studie an Säuglingen gehandelt hat und dass derzeit noch wenig über etwaige altersgebundene Unterschiede der CD14⁺CD16⁺ Monozyten bekannt ist.

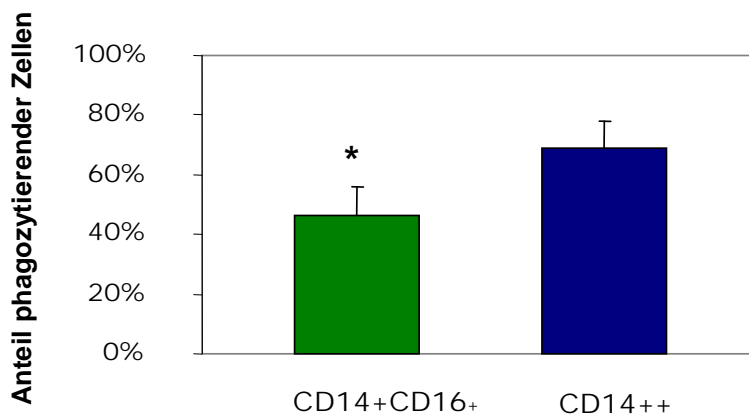


Abb.5: Peripheres Blut wurde mit FITC-markierten *E. coli* inkubiert. Die durchflusszytometrische Bestimmung der FITC-positiven Zellen für beide Monozytenpopulationen diente als Maß für den Anteil phagozytierender Monozyten. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm STABW von $n = 7$ gesunden Probanden. *, $P < 0,05$ vs. CD14⁺⁺.

IV.3.2. Zuvor beeinträchtigte Phagozytoseaktivität der CD14+CD16+ Monozyten erreicht nach ASZT supranormale Werte

Die Phagozytoseaktivität der Patientenproben (n=6) wurde am Tag der Krankenhausaufnahme (vor ASZT, Tag - 4) und am Tag der Entlassung (nach ASZT, Tag $11,3 \pm 2,2$) bestimmt. Die Notwendigkeit der Verarbeitung von Heparinblut für diese Testreihe bedingt die insgesamt niedrigere Patientenzahl, da für die meisten Patienten aus organisatorischen Gründen lediglich EDTA-Blut zur Verfügung gestellt wurde.

Dabei zeigte sich ebenfalls eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität der klassischen CD14++ Monozyten ($P < 0,02$), wobei insgesamt gesehen eine im Vergleich zu den gesunden Kontrollen herabgesetzte Phagozytoseaktivität auffiel: Eine nicht signifikante Verminderung auf $51 \pm 18\%$ im Falle der CD14++ Monozyten, und eine signifikante Verminderung auf $30 \pm 10\%$ im Falle der CD14+CD16+ Monozyten ($P < 0,05$).

Nach Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation erhöhte sich der Anteil FITC-positiver Zellen bei beiden Subpopulationen. Der Prozentsatz unter den CD14++ Monozyten stieg auf $77 \pm 10\%$ ($P < 0,05$ vs. vor ASZT). Damit kam es nicht nur zu einer signifikanten Zunahme im Vergleich zum Vorwert, sondern auch zu einer Steigerung, die die Phagozytoseaktivität gesunder Probanden signifikant übertraf ($77 \pm 10\%$ vs. $64 \pm 7\%$, $P < 0,03$). Unter dem Anteil FITC-positiver CD14+CD16+ Monozyten kam es sogar fast zu einer Verdoppelung auf $60 \pm 6\%$ ($P < 0,001$ vs. vor ASZT), womit ebenfalls ein höherer Wert als bei den gesunden Kontrollen erreicht wurde.

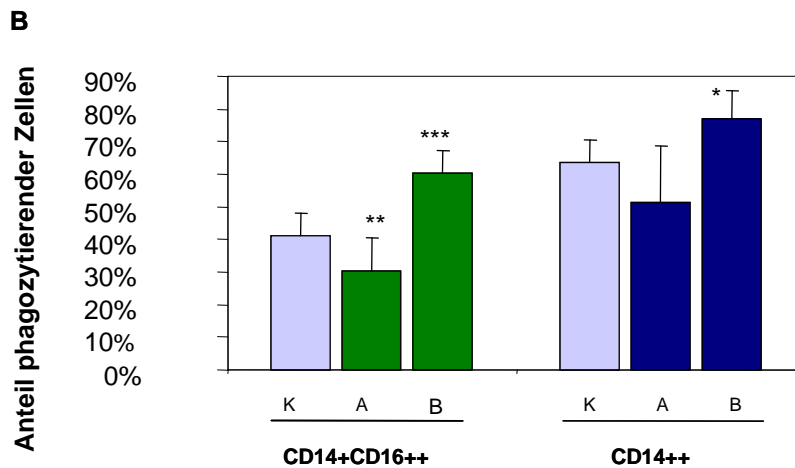
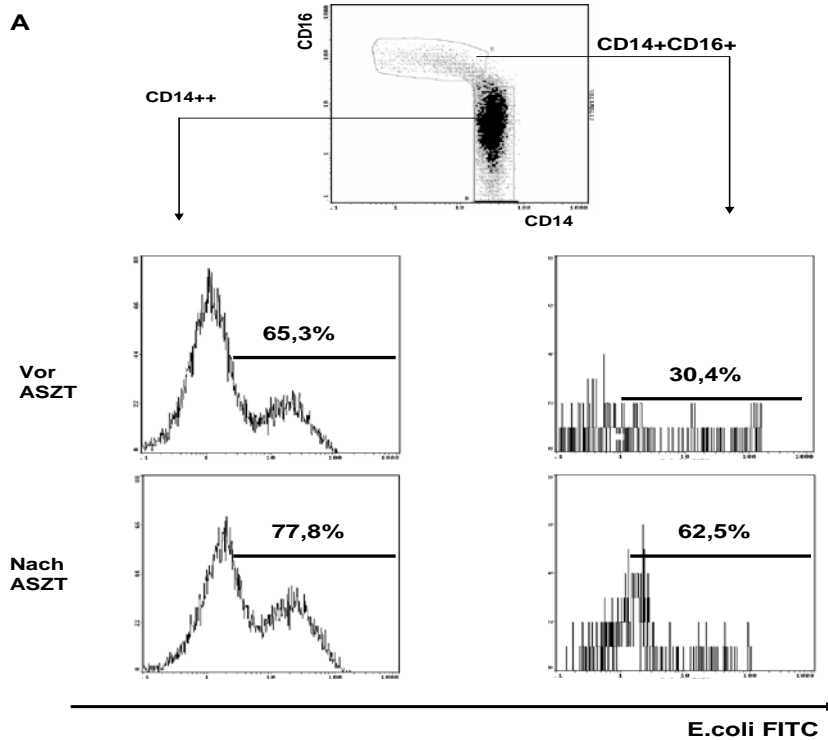


Abb.6: Peripheres Blut wurde mit FITC-markierten *E. coli* inkubiert. Nach Oberflächenfärbung mit anti-CD14 und anti-CD16 wurden die Monozytenpopulationen in der FACS-Analyse unterschieden und anschließend der Anteil FITC-positiver Zellen innerhalb der Monozytengates bestimmt (gerade Linien innerhalb der Gates). Eine Probe verblieb als Negativkontrolle auf Eis. **A)** Repräsentatives Histogramm eines Patienten vor und nach ASZT. **B)** Mittelwerte \pm STABW von $n = 6$ Patienten. K: gesunde Kontrollen, A: Patienten vor ASZT, B: Patienten nach ASZT. *, $P < 0,05$ vs. CD14++ gesunder Kontrollen, **, $P < 0,01$ vs. CD14+CD16+ gesunder Kontr.; ***, $P < 0,01$ vs. vor ASZT.

IV.4. Analyse des oxidativen Bursts

IV.4.1. Physiologisch differente Burstaktivität der beiden Monozytenpopulationen

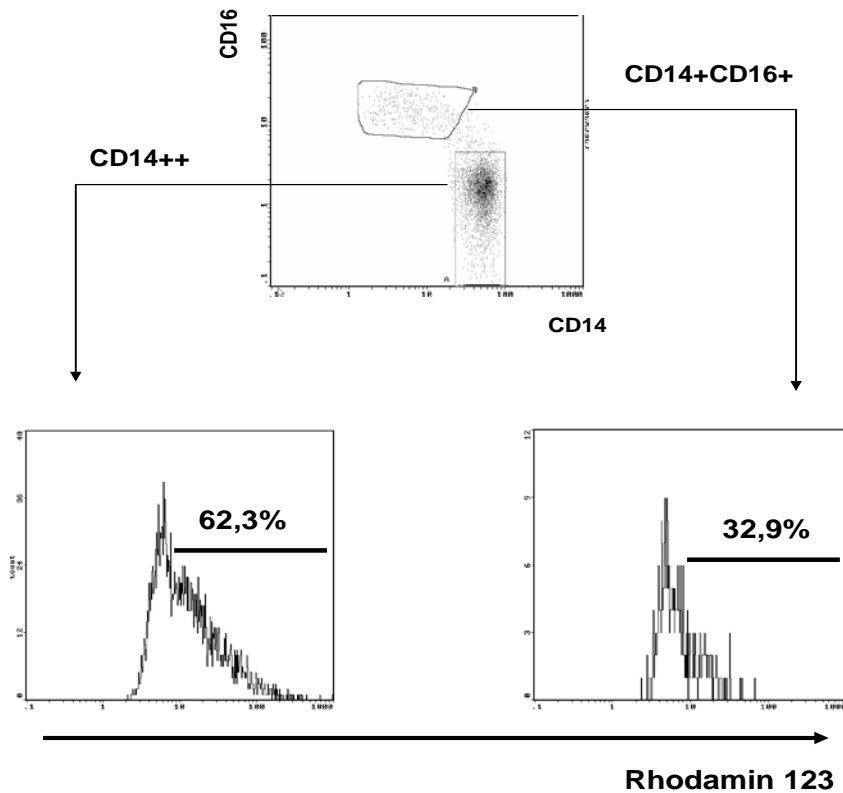
Nach Phagozytose von Fremdmaterial durch die Monozyten erfolgt in einem nächsten Schritt die Vernichtung des internalisierten Materials durch Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (= oxidativer Burst). Bei defektem oxidativem Burst wird eine intakte Phagozytose auf Dauer funktionell wirkungslos. Somit ist der oxidative Burst unverzichtbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektabwehr.

Der oxidative Burst wurde mit Hilfe einer modifizierten Version des Phagoburst® -Testkits erfasst. Zellen mit Produktion reaktiver Sauerstoffradikale oxidieren Dihydrorhodamin (DHR) 123 zu dem fluorogenen Substrat Rhodamin (R) 123, welches in der Durchflusszytometrie erfasst werden kann. Der Anteil Rhodamin-positiver Zellen markiert dabei den Anteil der Zellen, die erfolgreich reaktive Sauerstoffradikale produziert haben.

Um das physiologische Verhalten der Monozytenpopulationen zu ermitteln, wurden in einem ersten Schritt Vollblutproben gesunder Probanden untersucht. Als gesunde Kontrollen dienten hierbei fünf Probanden des Klinikpersonals. Die Messung erfolgte zeitgleich mit der Bestimmung der Phagozytoseaktivität derselben Probanden.

Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer Anteil Rhodamin-positiver Zellen in der CD14⁺⁺ Zellpopulation. So hatten insgesamt $70 \pm 9\%$ der CD14⁺⁺ und $46 \pm 10\%$ der CD14⁺CD16⁺ Monozyten oxidativen Burst betrieben ($P < 0,05$, Abb.7).

A



B

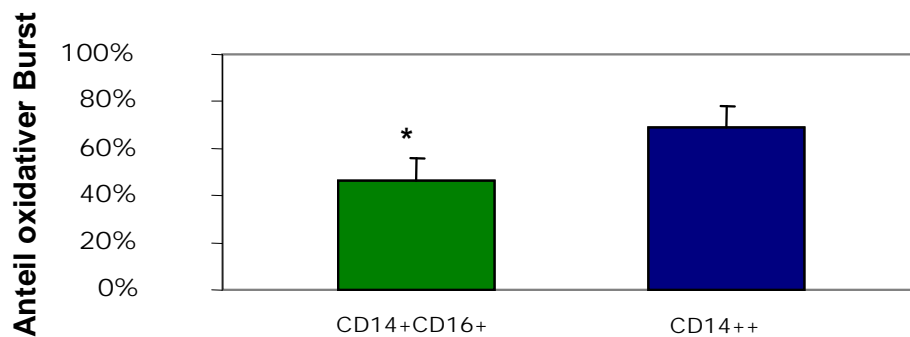


Abb. 7. Peripheres Blut wurde mit opsonisierten *E. coli* inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit dem fluorogenen Substrat DHR 123, das in Gegenwart oxidativer Stoffwechselprodukte zu R 123 konvertiert wird. Der Anteil Rhodamin-positiver Zellen wurde anschließend in der FACS-Analyse erfasst. **A)** Repräsentatives Histogramm eines gesunden Probanden. Die gerade Linie innerhalb jedes Histogramms entspricht dem Gate R 123+ Zellen. **B)** Mittelwerte \pm STABW von $n = 5$ gesunden Probanden. *, $P < 0,05$, vs. CD14⁺⁺.

IV.4.2. Rekonstitution der Burstaktivität nach ASZT erfolgt nur in der CD14+CD16+ Zellpopulation

Die Analyse lymphom- u. myelomkranker Patienten vor Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation erfolgte am Tag der Krankenhausaufnahme (vor ASZT, Tag -4) und am Tag der Entlassung (nach ASZT, Tag $11,3 \pm 2,2$).

Hierbei zeigte sich, dass der Burst-positive Anteil unter den klassischen CD14++ Monozyten wie bei den gesunden Kontrollen signifikant über dem der CD14+CD16+ Monozyten liegt. Die absoluten Werte lagen jedoch wie bei der Analyse der Phagozytoseaktivität bei beiden Subpopulationen unter den Werten der gesunden Kontrollen, und in diesem Fall sogar für beide Zellpopulationen in einem signifikanten Ausmaß ($P < 0,05$). Innerhalb der CD14++ Population hatten $52 \pm 14\%$ oxidativen Burst betrieben, während der Anteil unter den CD14+CD16+ Monozyten auf insgesamt $32 \pm 12\%$ reduziert war. Im Gegensatz zu den Werten vor Stammzelltransplantation waren nach Hochdosistherapie und ASZT $53 \pm 24\%$ der CD14+CD16+ Monozyten positiv für oxidativen Burst und unterschieden sich damit nicht mehr signifikant von den Werten der gesunden Kontrollen. Der Anteil der CD14++ Monozyten, der nach ASZT oxidativen Burst betrieben hatte, unterschied sich mit $47 \pm 20\%$ nicht von den Werten vor ASZT und lag damit weiterhin signifikant unter den Werten der gesunden Probanden.

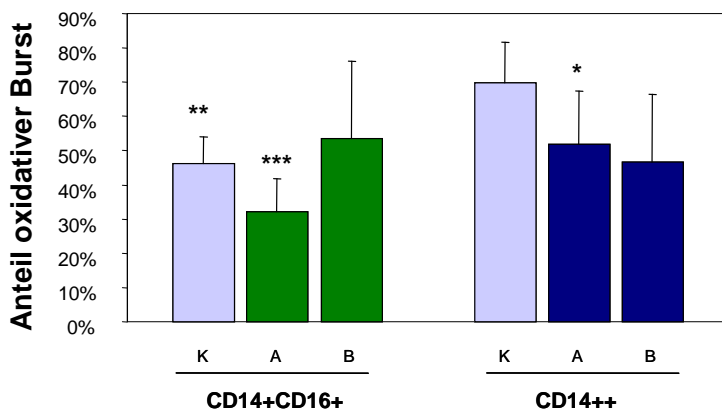


Abb.8: Peripheres Vollblut wurde mit *E. coli* inkubiert. Daraufhin wurde der Anteil Rhodamin-positiver Zellen als Indikator für den Anteil Burst-positiver Zellen mit der Durchflusszytometrie detektiert. Gezeigt werden Durchschnittswerte \pm STABW von $n = 6$ Patienten K: Gesunde Kontrollen, A: Patienten vor ASZT, B Patienten nach ASZT. * und **, $P < 0,05$, vs. CD14++ gesunder Kontrollen, *** $P < 0,05$ vs. CD14+CD16+ gesunder Kontrollen und vs. Patienten nach ASZT.

IV.5. Analyse der TNF-Produktion nach Stimulation mit LPS

IV.5.1. Physiologisch differente TNF-Produktion der beiden Monozytenpopulationen

Die Analyse der TNF-alpha-Produktion durch die Monozyten erfolgte durch die intrazelluläre TNF-alpha-Färbung nach Stimulation und 6-stündiger Inkubation mit 500 mg/ml Lipopolysaccharid (LPS), welches als Bestandteil gramnegativer Bakterien in der Pathogenese bakterieller Komplikationen (v.a. der bakteriellen Sepsis) eine zentrale Rolle spielt.

Zur intrazellulären TNF-Färbung wurde eine für diese Zwecke modifizierte Version des Caltag-Fix & Perm®-Testkits verwendet, bei der nach Oberflächenfärbung, Fixation und Permeabilisation eine intrazelluläre Färbung des Zytokins mit einem fluorogenen Substrat erfolgt. Die Fluoreszenzintensität des FITC-markierten Zytokins wird nach Abgrenzung der Zellpopulationen über die Oberflächenmarker getrennt in der Durchflusszytometrie erfasst. Frühere Studien haben gezeigt, dass der kleine Anteil der CD14+CD16+ Monozyten eine Hauptquelle der TNF-alpha-Produktion darstellt (siehe Einleitung).

Die Detektion der CD14+CD16+ Monozyten erfolgte in Analogie zu früheren Studien nicht über eine Färbung von CD14 und CD16, sondern von CD14 und HLA-DR. Die Wahl der Oberflächen-Antikörper ergibt sich aus der nachgewiesenen Herabregulation von CD16 nach Stimulation mit LPS, sodass die proinflammatorischen Monozyten unter diesen Bedingungen nicht mehr über die Färbung von CD16 detektiert werden können [7], wohl aber durch ihre (bekannt höhere) HLA-DR-Expression (siehe Einleitung), die auch in vorliegender Arbeit an den Patientenproben gezeigt wurde (s.u.). Als gesunde Kontrollen dienten Proben gesunder Mitarbeiter des Klinikpersonals (n=5). Die Ergebnisse der Analyse gesunder Probanden bestätigten die Ergebnisse früherer Studien. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) als Parameter der medianen TNF-alpha-Produktion pro Zelle war unter den CD14+CD16+ Monozyten mit $45,7 \pm 13,2$ signifikant höher als die MFI der CD14++ Monozyten ($14,7 \pm 5,5$, $P < 0,01$).

IV.5.2. Bei nahezu komplett fehlender TNF-Produktion durch die CD14++ Monozyten nach ASZT bleibt die CD14+CD16+ Monozytenfunktion intakt

Die Analyse der Patientenproben erfolgte am Tag der Krankenhausaufnahme (vor ASZT, Tag -4) und erneut am Tag der Entlassung (nach ASZT, Tag $11,3 \pm 2,2$). Das Maß an TNF-Produktion der Patientenproben unterschied sich vor ASZT nicht von den Werten der gesunden Probanden. Die MFI des FITC-gefärbten TNF-alpha lag unter den CD14+CD16+ Monozyten bei $61,3 \pm 31,9$, und unter den CD14++ Monozyten bei $16,7 \pm 13,2$. Jedoch kam es nach Hochdosistherapie und ASZT zu einer drastischen Verminderung der TNF-Produktion durch die CD14++ Monozyten um fast 90%, während die TNF-Produktion der CD14+CD16+ Monozyten durch die Therapie unbeeinflusst blieb. Die MFI der klassischen Monozyten betrug hierbei $1,6 \pm 1,2$, die MFI der CD14+ CD16+ Monozyten $49,0 \pm 13,6$. Die MFI der CD14+CD16+ Monozyten war demnach in ihrem absoluten Wert zwar vermindert, jedoch im Vergleich zum Vorwert nicht in einem signifikanten Ausmaß. Der absolute Wert näherte sich hierbei dem Wert gesunder Kontrollen. Die MFI des FITC-markierten TNF- alpha in der CD14+CD16+ Population lag demnach 30-fach über der MFI der CD14++ Monozytenhauptpopulation. Damit ergibt sich bei einem durchschnittlichen Anteil von ca. 11% CD14+CD16+ Monozyten nach Stammzelltransplantation rechnerisch, dass diese Population für ca. 80% der TNF-alpha-Produktion verantwortlich ist. Diese Berechnung stützt sich auf die Ergebnisse von Belge et. al., die gezeigt haben, dass die intrazellulär gemessene TNF-alpha-MFI mit zeitgleich gemessenen Serum-TNF-alpha-Spiegeln linear korreliert. Das Produkt aus MFI und jeweiligem Monozytenprozentsatz steht dabei in linearem Zusammenhang mit der tatsächlich ins Serum ausgeschütteten Zytokinmenge [7].

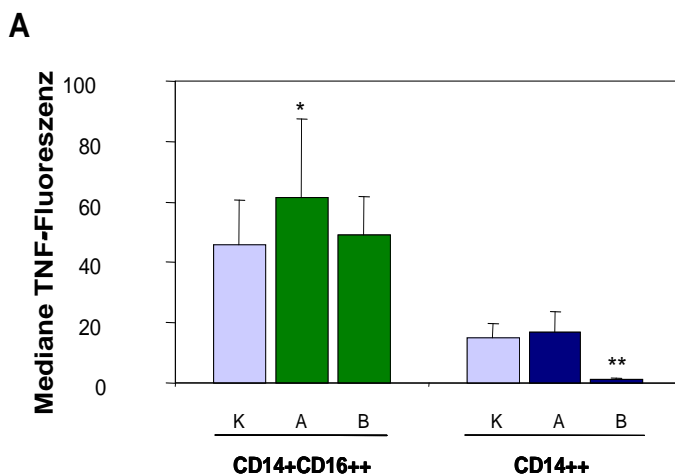


Abb.9 A Mediane intrazelluläre TNF-Fluoreszenz der Monozyten-subgruppen nach Stimulation mit LPS. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm STABW von $n = 6$ Patienten. K: gesunde Kontrollen, A: Patienten vor ASZT, B: Patienten nach ASZT. *, $P < 0,02$ vs. CD14++ vor ASZT; **, $P < 0,01$ vs. vor ASZT.

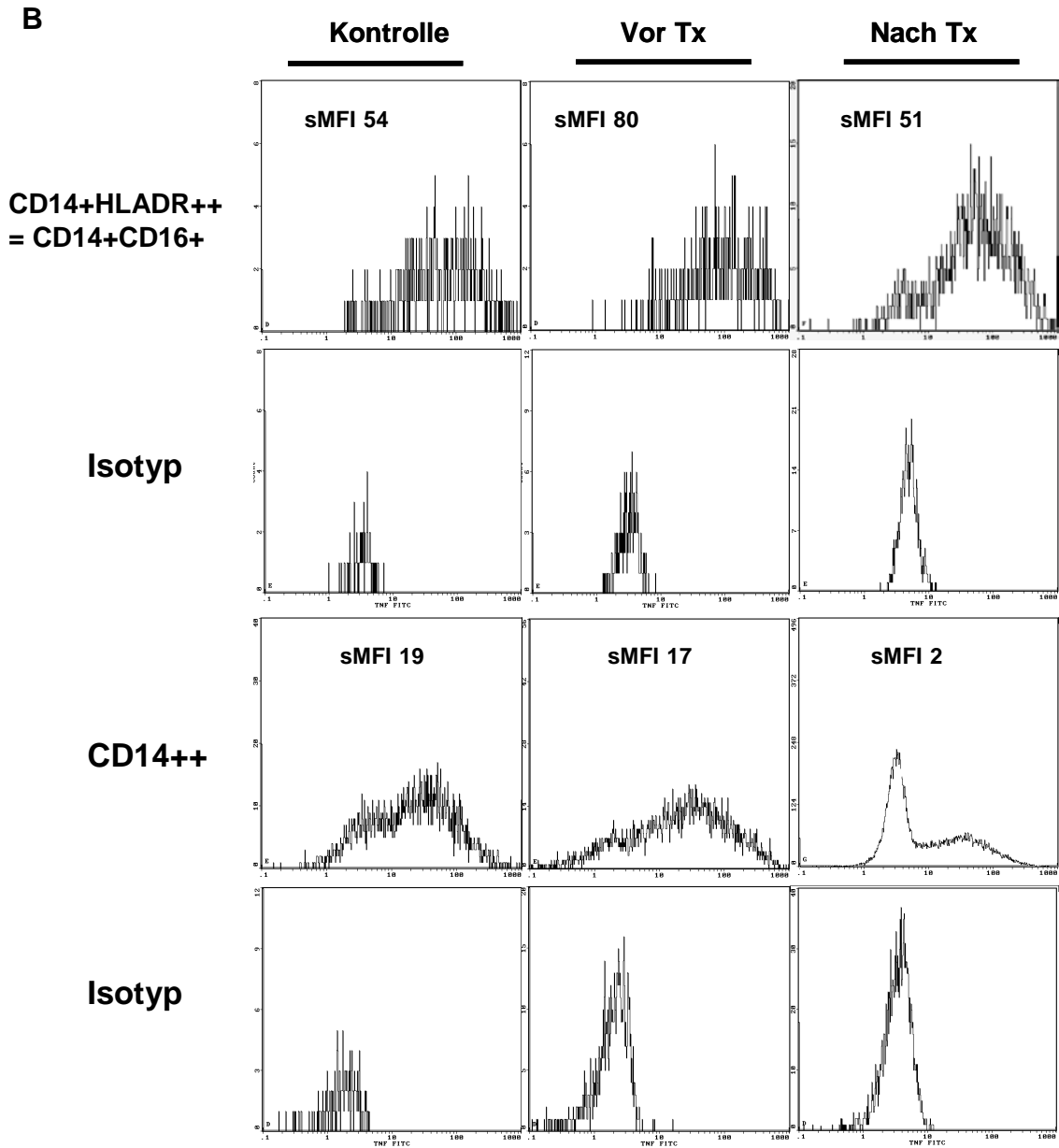


Abb.9 B: PBMZ wurden 6 h mit 500 ng/ml LPS stimuliert. Nach Oberflächenfärbung mit anti-CD14-RD1 und anti-HLA-DR-PC5 wurden die Zellen permeabilisiert, intrazellulär mit anti-TNF-FITC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Detektion der Monozytensubgruppen wurde die mediane FITC-Fluoreszenz (sMFI) innerhalb dieser Populationen zur Erfassung der intrazellulären TNF-Konzentration gemessen. Die linke Säule zeigt das Ergebnis eines gesunden Probanden, die mittlere und rechte Säule das Ergebnis eines Patienten vor und nach ASZT.

IV.6. HLA-DR-Expression vor und nach ASZT: Unbeeinträchtigte HLA-DR-Expression der CD14+CD16+ Monozyten bei stark reduzierter Expression der CD14++ Monozyten

Wie eingangs erwähnt, weisen die CD14+CD16+ Monozyten eine höhere Expression von Oberflächenmolekülen auf, die in die Antigenexpression involviert sind, so z.B. HLA-DR. Um den Effekt der Stammzelltransplantation auf die Expression von HLA-DR zu untersuchen, wurde die HLA-DR-Expression vor und nach ASZT in der Durchflusszytometrie bestimmt. Als Maß für die HLA-DR-Expression diente hier wieder die MFI der jeweiligen Monozytensubpopulation. Bestimmt wurde die MFI am Tag der Krankenhausaufnahme (vor ASZT, Tag -4) und am Tag der Entlassung (nach ASZT, Tag $11,3 \pm 2,2$) bei acht Patienten.

Hierbei zeigte sich ein ähnlicher Trend wie bei der Produktion von TNF. Vor der Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation bestand bei den CD14+CD16+ Monozyten eine höhere HLA-DR-Expression als bei den CD14++ Monozyten (MFI $10,6 \pm 5,6$ vs. $4,2 \pm 2,2$, $P < 0,01$). Dieser Trend entspricht damit dem in früheren Studien gezeigten HLA-DR-Expressionsmuster gesunder Probanden. Auf dieser Basis konnte auch die auf der höheren HLA-DR-Expression basierende Monozytendifferenzierung der in IV.5. beschriebenen Versuchsreihe erfolgen.

Es zeigte sich bei der Analyse nach Transplantation, dass - vergleichbar mit dem Ergebnis der TNF-Produktion - ein drastischer Abfall der MFI $> 80\%$ in der CD14++ Population zu verzeichnen ist ($P < 0,02$). Die HLA-DR-MFI der CD14++ Monozyten betrug $0,9 \pm 0,6$, während die HLA-DR-MFI der CD14+CD16+ Monozyten auf $17,0 \pm 10,5$ zunahm.

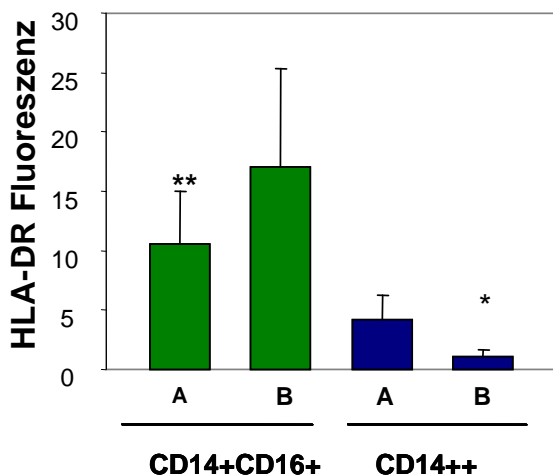


Abb.10: Peripheres Vollblut wurde mit anti-CD14, anti-CD16 und anti-HLA-DR gefärbt und die mediane Fluoreszenz (MFI) bestimmt. Mittlere MFI der HLA-DR-Expression \pm STABW von $n = 8$ Pat. A: Pat. vor ASZT, B: Pat. nach ASZT. *: $P < 0,02$; **: $P < 0,01$ vs. CD14++ vor ASZT.

V. DISKUSSION

Die myeloablative Hochdosis-Chemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation wird mittlerweile bei einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen, vereinzelt auch bei soliden Tumoren therapeutisch eingesetzt. Insbesondere in der Therapie des multiplen Myeloms und des NHL-Rezidivs hat diese Therapieform bei jüngeren Patienten eine große Bedeutung, da hier eine Verbesserung der Mortalität und des ereignisfreien Überlebens gezeigt werden konnte. Allerdings stellen Infektionen sowohl als Folge der Grunderkrankung als auch der Therapie den Hauptteil der Komplikationen im Krankheitsverlauf dar. In diesem Zusammenhang ist eine Reihe von Immundefekten bei lymphomkranken Patienten beschrieben. Diese beinhalten z.B. das Auftreten von Antikörpermangelsyndromen oder Dysfunktionen der Leukozyten selbst [45,51]. Dementsprechend haben sich einige Arbeitsgruppen der letzten Jahre damit beschäftigt, den Einfluss der autologen Stammzelltransplantation auf die Rekonstitution und Verbesserung des Immunsystems durch diese Therapie zu erfassen. Bisher haben sich die meisten Arbeiten mit der Funktion des spezifischen (erworbenen) Immunsystems beschäftigt, insbesondere mit der Funktion der Lymphozyten [1,52,56].

Diese Arbeit konzentrierte sich auf die funktionellen Eigenschaften der Monozyten myelom- und lymphomkranker Patienten im Vergleich zur Zellfunktion gesunder Probanden, und untersuchte in einem nächsten Schritt den Effekt der ASZT auf diese Funktionen.

In Anbetracht der eingangs erörterten Erkenntnisse über die relevante Inhomogenität der Monozytensubpopulationen erfolgte die Aufarbeitung dieser Fragestellung als differenzierte Analyse durch getrennte Betrachtung der beiden Monozytensubtypen.

Zunächst wurde gezeigt, dass es im Rahmen einer Lymphom- oder Myelomerkrankung nicht zu einer Expansion der CD14+CD16+ Monozyten kommt. In einer Reihe von Studien ist eine Zunahme der CD14+CD16+ Monozyten bei verschiedenen soliden Tumoren beschrieben, wie z.B. bei gastrointestinalen Neoplasien [37,55]; dies scheint für Lymphom- und Myelompatienten jedoch nicht zuzutreffen. Möglicherweise ist dieses Ergebnis jedoch Folge der zuvor applizierten Zytostatikatherapie im Rahmen der Induktions- und Mobilisierungstherapie, die alle hier untersuchten Patienten erhalten hatten.

Weiterhin wurde gezeigt, dass es im Rahmen der ASZT zu einer drastischen Abnahme des CD14⁺⁺ Monozytenanteils und einer korrespondierenden Zunahme des CD14⁺CD16⁺ Anteils kommt, um mit einem CD14⁺CD16⁺ Anteil von 98% am 3. - 4. Tag nach ASZT einen Spitzenwert zu erreichen. Der Abfall der CD14⁺⁺ Monozyten im Vergleich zur CD14⁺CD16⁺ Subpopulation auf unter 1/ μ l war dabei überproportional hoch. Die starke Zunahme des CD14⁺CD16⁺ Anteils könnte auf eine im Vergleich zu den CD14⁺⁺ Monozyten höhere Resistenzfähigkeit gegenüber Zytostatika zurückzuführen sein. Jedoch konnte keine höhere Resistenzfähigkeit der CD14⁺CD16⁺ Population *in vitro* nachgewiesen werden. Tatsächlich nahm die Anzahl dieser Zellen im Verhältnis zu den CD14⁺⁺ Monozyten überproportional ab, was demnach eine höhere Empfindlichkeit der CD14⁺CD16⁺ Zellen im Vergleich zu den klassischen Monozyten *in vitro* bedeutet. Dieses Missverhältnis zwischen den *in vivo* und *in vitro* Experimenten lässt auf eine nicht ausreichend an die *in vivo* Verhältnisse adaptierte Versuchsanordnung schließen. Möglicherweise sind bislang unbekannte Faktoren im Patientenserum für das Überleben der CD14⁺CD16⁺ Monozyten verantwortlich, wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren. In diesen Zusammenhang passt auch, dass das Screening peripherer mononukleärer Zellen an lymphomkranken Patienten ein deutlich verbessertes Überleben der proinflammatorischen Monozyten bereits ohne Zusatz von Melphalan im patienteneigenen Serum bewirkte, was die Abhängigkeit dieser Zellpopulation von humoralen Faktoren unterstreicht. Hervorzuheben ist auch, dass der Zusatz von Melphalan zu den Proben gesunder Probanden einen höheren Abfall der CD14⁺CD16⁺ Monozyten bewirkte als der Zusatz von Melphalan zu den Patientenproben. Da es sich bei den Patienten um bereits zytostatisch vorbehandelte Individuen handelte, könnte somit eine Selektion resistenter CD14⁺CD16⁺ Zellen erfolgt sein.

Eine andere Erklärung für den erhöhten Prozentsatz an CD14⁺CD16⁺ Monozyten könnte die tägliche G-CSF-Gabe im Rahmen der ASZT ergeben. Obwohl G-CSF zelllinienspezifisch vorwiegend auf die Proliferation und Differenzierung von neutrophilen Vorläuferzellen zu neutrophilen Granulozyten wirken soll, wurde gezeigt, dass die Gabe von G-CSF eine Induktion des CD14⁺CD16⁺ Phänotyps bewirkt [34,41]. Die hier durchgeführten *in vitro* Experimente mit dem Zusatz von G-CSF konnten diese These zwar nicht bestätigen, jedoch wiesen Li et. al. bereits früher darauf hin, dass der Effekt von G-CSF auf die Monozytendifferenzierung in einen CD14⁺CD16⁺ Phänotyp wahrscheinlich ein indirekter Effekt ist [34].

Letztlich könnte eine Kontamination der Stammzellpräparate mit einer hohen Anzahl

CD14+CD16+ Monozyten für den erhöhten Anteil dieses Zelltyps verantwortlich sein. In einer Studie von Tanaka et. al. wurde ein erhöhter Prozentsatz von CD14+CD16+ Monozyten in Stammzellpräparaten nachgewiesen [62]. Hierzu sei aber bemerkt, dass bei den meisten Patienten bereits hohe Prozentsätze der CD14+CD16+ Monozyten am Tag vor oder am Tag der Stammzelltransplantation selbst zu verzeichnen waren. Die Bestimmung der Zellen erfolge am Tag der Transplantation noch vor Reinfusion der Stammzellen, sodass in diesen Fällen sicherlich nicht auf eine Kontamination geschlossen werden kann.

Weiterhin wurde hier gezeigt, dass es nach dem Anwachsen des Transplantats zu einer erneuten Umkehr der (CD14+CD16+/CD14++)-Ratio kommt, sodass ca. am 9.-10. Tag nach Transplantation eine Ratio festgestellt werden kann, deren Wert deutlich unter dem Ausgangswert vor ASZT liegt. Dieses Ergebnis passt zu der Vermutung, dass es sich bei der proinflammatorischen Monozytenpopulation um eine reifere Monozytenform handelt [72]. Die Stammzelltransplantation stellt für sich genommen einen „Nullpunkt“ in der Entwicklung der Leukozyten dar, sodass der Weg von der Stammzelle bis zur reifen peripheren Zelle zeitlich zu verfolgen ist. So kommt es zu einem Zeitpunkt, an dem kaum CD14+CD16+ Monozyten im peripheren Blut zu erfassen sind, zu einem steilen Anstieg der CD14++ Monozyten, die demnach zu diesem Zeitpunkt ihre Reifung im Knochenmark weitgehend abgeschlossen haben. Offensichtlich sind die verbliebenen CD14+CD16+ Zellen zu diesem Zeitpunkt entweder apoptotisch geworden, oder sie haben das periphere Blut zur Migration in das Gewebe verlassen, ohne dass für deren Nachreifung ausreichend Zeit vergangen ist. Tatsächlich beträgt die Halbwertszeit der Monozyten im peripheren Blut maximal 4 Tage (12 bis 100 Stunden), bevor sie aus dem Blut ins Gewebe zirkulieren. Dementsprechend wären nach 10 Tagen maximal ein Drittel der Monozyten im peripheren Blut detektierbar, gerechnet mit der maximalen Halbwertszeit. Dieser so errechnete Anteil der zu diesem Zeitpunkt verbliebenen CD14+CD16+ Monozyten passt zu den hier gemessenen Werten und unterstreicht damit die Vorstellung, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine vollständige Reifung der proinflammatorischen Monozyten erfolgt ist. Mit einer zeitlichen Verzögerung von einigen Tagen kommt es dann schließlich zu einem deutlichen Anstieg CD14+CD16+ Monozyten im peripheren Blut. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Kinetik des zu messenden Zellanstieges: So wie es zunächst zu einem abrupten Anstieg der klassischen Monozyten kommt, erfolgt zeitlich versetzt ein ebenfalls plötzlicher Anstieg der CD14+CD16+ Monozyten, während der Anstieg der klassischen Monozyten deutlich milder als zuvor ist. Dies passt zu der

Vorstellung, dass nach einer bestimmten, zelllinienspezifischen Zeit der Reifung ein konsekutiv steiler Anstieg als Zeichen der ersten Ausschwemmung in die Peripherie zu verzeichnen ist.

Zum anderen haben die Messergebnisse einige Wochen nach ASZT schließlich gezeigt, dass die CD14+CD16+ Monozyten ihren Ausgangswert wieder erreichen und sich die Ratio dann nicht mehr von dem Wert vor ASZT unterscheidet.

Die Analyse der Zahl klassischer CD14++ Monozyten ergab, dass die Therapie durch hochdosierte Zytostase mit nachfolgender ASZT zu einer Expansion dieser Zellpopulation führt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der von Ottinger et. al. beschriebenen signifikanten Expansion der Monozytengesamtpopulation in den ersten zwei Monaten nach (allogener) Stammzelltransplantation [42]. Aufgrund der Dominanz des CD14++ Phänotyps unter den Monozyten bedeutet dies sowohl eine absolute als auch eine relative Monozytenerhöhung. Es wurde gezeigt, dass zum Zeitpunkt der Krankenhausentlassung noch keine vollständige quantitative Rekonstitution der Lymphozyten vorliegt [56]. Dies bedeutet, insbesondere durch die gleichfalls vorliegende Expansion der Monozyten, eine Leukozytenverschiebung in Richtung auf das angeborene (unspezifische) Immunsystem. Demnach kommt dem unspezifischen Immunsystem nach ASZT eine größere Bedeutung zu als unter Normalbedingungen.

Nach dieser quantitativen Analyse der Monozytenpopulationen wurden funktionelle Eigenschaften untersucht, so die Fähigkeit zur Phagozytose von Bakterien, Produktion von Sauerstoffradikalen (oxidativer Burst) nach der Phagozytose von Bakterien und die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF.

Die Untersuchung der TNF-Produktion erfolgte nach Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS), welches als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien eine Schlüsselrolle in der Pathogenese gramnegativer Infektionen spielt. Die Untersuchung der Monozyten gesunder Probanden ergab eine signifikant höhere TNF-Produktion der CD14+CD16+ Monozytenpopulation. Die Menge an produziertem TNF pro Zelle lag hierbei dreimal so hoch wie in der CD14++ Hauptpopulation, was die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt [7].

Die Analyse der Monozyten lymphom- u. myelomkranker Patienten ergab einen mit den gesunden Kontrollen vergleichbaren Trend. Die TNF-Produktion der CD14+CD16+ Monozyten lag mit ca. 4-fach höheren Werten jedoch etwas höher als in der Vergleichspopulation gesunder Probanden, wenn auch nicht in einem signifikanten Ausmaß. Dieser Unterschied bestätigt die Ergebnisse von Baseggio et. al., die eine

ebenfalls nicht signifikant erhöhte TNF-Produktion bei Patienten mit NHL beschrieben hatten [6].

Einen jedoch deutlichen Unterschied zu dem bisher Untersuchten zeigte die Analyse nach ASZT. Es wurde hier gezeigt, dass es im Zuge der Hochdosischemotherapie und Stammzelltransplantation zu einem drastischen Einbruch der Fähigkeit zur TNF-Produktion durch die CD14⁺⁺ Hauptpopulation kommt, sodass fast kein intrazelluläres TNF mehr detektierbar wird. Im Gegensatz dazu kommt es zu keiner signifikanten Abnahme der Zytokinproduktion durch die proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺ Monozyten. Da die Monozytenhauptpopulation unter physiologischen Bedingungen für 70% der TNF-Produktion nach LPS-Stimulation verantwortlich ist [7], bedeutet ein fast vollständiger Verlust der TNF-Produktion dieser Zellen ein erhebliches Defizit in der Fähigkeit zur proinflammatorischen Immunantwort auf gramnegative Infekte in der frühen Zeit nach Stammzelltransplantation. Die proinflammatorischen CD14⁺CD16⁺ Monozyten stellen mit ihrem insgesamt geringen Anteil damit in dieser Zeit nicht nur den prädominanten, sondern rechnerisch mit ca. 80% den nahezu kompletten Teil der TNF-Produktion. Diese Rechnung stützt sich auf eine Arbeit von Belge et. al. Dort wurde demonstriert, dass die tatsächlich ins Serum sezernierte TNF-Menge linear mit dem Produkt aus Monozytenanteil und intrazellulär zu messendem TNF korreliert [7].

Einen sehr ähnlichen Trend zeigte die Analyse der HLA-DR-Expression. Die physiologischerweise erhöhte HLA-DR-Expression der CD14⁺CD16⁺ Monozyten [72] fand sich auch bei lymphom- u. myelomkranken Patienten. Nach myeloablativer Chemotherapie und Stammzelltransplantation erfährt die CD14⁺⁺ Hauptpopulation einen drastischen Einbruch in der HLA-DR-Expression mit nahezu komplettem Verlust dieses Oberflächenmoleküls. Dieses Ergebnis passt zu der vorbeschriebenen HLA-DR-Downregulation durch immunsuppressive Therapie [53], wobei hierbei bisher keinerlei Differenzierung der Monozyten in ihre Subpopulationen erfolgt war und somit der numerisch prädominante Anteil der klassischen Monozyten eine generelle Downregulation von HLA-DR vorgetäuscht hat. Die proinflammatorischen Monozyten weisen im Gegensatz dazu keinen signifikanten Unterschied in der HLA-DR-Expression nach ASZT auf. Tatsächlich kommt es zu einer, wenn auch nicht signifikanten geringen Zunahme der Expression dieses Moleküls. Demnach besitzen die CD14⁺CD16⁺ Monozyten in der frühen Zeit nach Stammzelltransplantation zumindest von Seiten der Oberflächenbeschaffenheit eine erhaltene Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation, während die Monozytenhauptpopulation diesbezüglich beeinträchtigt ist.

Die Analyse von Proben gesunder Probanden zeigte, dass die CD14+CD16+ Monozyten eine geringere Phagozytose - und Burstaktivität als die CD14++ Monozyten aufweisen. Skrzeczynska et. al. hatten eine höhere Phagozytoseaktivität der CD14++ Hauptpopulation bei Neugeborenen beschrieben [59], jedoch ist derzeit wenig über altersgebundene Unterschiede in der CD14+CD16+ Monozytenfunktion bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen somit auf altersunabhängige funktionelle Eigenschaften der Monozytensubpopulationen hin, zumindest im Falle der Phagozytose. Dieses Verhältnis gilt auch für die Monozyten lymphom- u. myelomkranker Patienten. Die CD14++ Monozyten der Patienten zeigten jedoch eine im Vergleich zu den CD14++ Monozyten gesunder Probanden signifikant herabgesetzte Fähigkeit zur Produktion reaktiver Sauerstoffradikale. Die Fähigkeit zur Phagozytose war zwar leicht vermindert, jedoch nicht in einem signifikanten Ausmaß. Es konnte gezeigt werden, dass die Phagozytosefähigkeit der CD14++ Monozyten durch die ASZT auf supranormale Werte gesteigert wird, die Fähigkeit zu oxidativem Stress jedoch weiterhin beeinträchtigt bleibt. Der Einfluss der ASZT auf die Rekonstitution des durch die Grunderkrankung beeinträchtigten Immunsystems ist noch eindrücklicher, wenn man die CD14+CD16+ Monozyten betrachtet. Hier zeigte sich, dass die CD14+CD16+ Monozyten der Patienten eine im Vergleich zu gesunden Spendern erheblich verminderte Fähigkeit sowohl zur Phagozytose als auch zu oxidativem Stress aufweisen. Das funktionelle Defizit der proinflammatorischen Monozyten könnte somit eine Rolle in der insgesamt multifaktoriell bedingten Immunschwäche lymphomkranker Patienten spielen, für die bereits mehrere leukozytäre Defekte vorbeschrieben sind [11,21,36]. Nach der ASZT war die Fähigkeit zur Produktion reaktiver Sauerstoffradikale jedoch derart gesteigert, dass nun kein signifikanter Unterschied zu den CD14+CD16+ Monozyten gesunder Probanden mehr festzustellen war. Noch ausgeprägter ist der Effekt, wenn man die Fähigkeit zur Phagozytose betrachtet: Hier zeigte sich fast eine Verdopplung des Ausgangswertes vor ASZT, sodass eine Phagozytoseaktivität gemessen werden konnte, die die Aktivität gesunder Spender übertrifft. Das Verhältnis zwischen den beiden Monozytensubpopulationen blieb zwar weiterhin bestehen, denn die CD14++ Hauptpopulation zeigte nach der ASZT weiterhin eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität als die CD14+CD16+ Monozyten. Der Sprung in der Phagozytosefähigkeit war jedoch in der CD14++ Population wesentlich geringer als in der CD14+CD16+ Zellpopulation.

Demnach scheint die Hochdosis-Chemotherapie und Stammzelltransplantation die

funktionellen Fähigkeiten der Monozyten nicht nur wiederherzustellen, sondern im Falle der Phagozytose auch auf supranormale Werte zu steigern. Dies könnte somit in der Frühphase nach ASZT eine erhebliche Stütze des zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig rekonstituierten Immunsystems darstellen und somit zur Verminderung der Morbidität und Mortalität in dieser Phase beitragen.

In einigen Arbeiten sind Dysfunktionen von Monozyten und dendritischen Zellen myelomkranker Patienten beschrieben [9,11,36,50], jedoch wurde in keiner der Studien zwischen den Monozyten-Subtypen unterschieden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind die Funktionseinschränkungen der Monozytensubpopulationen nicht identisch, und ebenso differieren ihre funktionellen Eigenschaften nach Therapie.

So lässt sich insgesamt sagen, dass es im Rahmen der Grunderkrankung zu einer deutlichen funktionellen Beeinträchtigung beider Monozytenpopulationen kommt, v.a. jedoch bei der CD14+CD16+ Monozytensubpopulation. Durch die Therapie mit myeloablativer Hochdosischemotherapie und ASZT werden die funktionellen Eigenschaften der CD14+CD16+ Monozyten vollständig rekonstituiert, während das funktionelle Defizit der klassischen Monozyten bestehen bleibt. Die Fähigkeit der CD14++ Monozyten bezüglich Zytokinproduktion und möglicherweise auch Antigenproduktion fehlt zu diesem Zeitpunkt fast vollständig, während die CD14+CD16+ Monozyten diesbezüglich keinerlei Einbußen erfahren. Somit scheint die kleine Gruppe der CD14+CD16+ Monozyten mit ihren erhaltenen bzw. wiederhergestellten Fähigkeiten in einem deutlich stärkeren Maße als unter Normalbedingungen zur Infektabwehr in der Frühphase nach ASZT beizutragen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Akpek G, Lenz G, Lee SM, Sanchorawala V, Wright DG, Colarusso T, Waraska K, Lerner A, Vosburgh E, Skinner M, Comenzo RL. Immunologic recovery after autologous blood stem cell transplantation in patients with AL-amyloidosis. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Dec;28(12):1105-9.
- 2) Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, Diaz-Agustin B, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Orfao A. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol.* 2001 Sep;100(3):325-38.
- 3) Ancuta P, Moses A, Gabuzda D. Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology.* 2004;209(1-2):11-20
- 4) Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol.* 2000 Jul;30(7):1872-83
- 5) Attal M, Huguet F, Schlaifer D et al (1992). Intensive combined therapy for previously untreated aggressive myeloma. *Blood* 79: 1130–1136
- 6) Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Picollet J, Felman P, Coiffier B, Salles G. Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from non-Hodgkin's lymphoma patients. *Exp Hematol.* 2001 Mar;29(3):330-8.
- 7) Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3536-42.
- 8) Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle-Rowson G. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock.* 1997 Jul;8(1):73-5.

- 9) Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):2992-8.
- 10) Cunningham D, Paz-Ares L, Milan S et al (1994). High-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation as consolidation in previously untreated myeloma. *J Clin Oncol* 12: 759–763.
- 11) Dammacco F, Miglietta A, Ventura MT, Bonomo L. Defective monocyte chemotactic responsiveness in patients with multiple myeloma and benign monoclonal gammopathy. *Clin Exp Immunol*. 1982 Feb;47(2):481-6.
- 12) Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol*. 2003 Jul;74(1):33-9.
- 13) de Baey A, Mende I, Riethmueller G, Baeuerle PA. Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *Eur J Immunol*. 2001 Jun;31(6):1646-55. DC8+ Mende Riethmueller
- 14) Draude G, von Hundelshausen P, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber C. Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+) monocyte subset. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 2):H1144-9.
- 15) Emminger W, Zlabinger GJ, Fritsch G, Urbanek R. CD14(dim)/CD16(bright) monocytes in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Immunol*. 2001 Jun;31(6):1716-9.
- 16) Fagnoni FF, Oliviero B, Zibera C, Gibelli N, Lozza L, Vescovini R, Sansoni P, Zambelli A, DaPrada G, Robustelli della Cuna G. Circulating CD33+ large mononuclear cells contain three distinct populations with phenotype of putative antigen-presenting cells including myeloid dendritic cells and CD14+ monocytes with their CD16+ subset. *Cytometry*. 2001 Oct 1;45(2):124-32.
- 17) Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993 Nov 15;82(10):3170-6.

- 18) Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jun;112(3):501-6.
- 19) Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LH. Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation.* 1998 Aug;22(4):367-79
- 20) Fischer-Smith T, Croul S, Sverstiuk AE, Capini C, L'Heureux D, Regulier EG, Richardson MW, Amini S, Morgello S, Khalili K, Rappaport J. CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *J Neurovirol.* 2001 Dec;7(6):528-41.
- 21) Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Abnormal blood monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4812-6.
- 22) Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood.* 1996 Jan 1;87(1):373-7.
- 23) Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003 Jul;19(1):71-82.
- 24) Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol.* 2001 Jan;69(1):11-20.
- 25) Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1999 Aug;24(3):231-45.
- 26) Grosbois B, Decaux O, Azais I, Facon T, Avet-Loiseau H. Current treatment strategies for multiple myeloma. *Eur J Intern Med.* 2002 Mar;13(2):85-95.
- 27) Harousseau JL, Attal M, Divine M et al (1995) Autologous stem cell transplantation after first remission induction treatment in multiple myeloma: A report of the French registry on autologous transplantation in multiple myeloma. *Blood* 85:3077–3085

- 28) Hennemann B, Kreutz M, Rehm A, Andreesen R. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor treatment on phenotype, cytokine release and cytotoxicity of circulating blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Br J Haematol.* 1998 Sep;102(5):1197-203.
- 29) Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol.* 2002 May;32(5):1319-27.
- 30) Kanaya S, Nemoto E, Ogawa T, Shimauchi H. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14+CD16+ phenotype. *Eur J Immunol.* 2004 May;34(5):1451-60.
- 31) Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S. CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2000 Sep;121(3):566-70.
- 32) Kawanaka N, Nagake Y, Yamamura M, Makino H. Expression of Fc gamma receptor III (CD16) on monocytes during hemodialysis in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 2002 Jan;90(1):64-71.
- 33) Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Oct;46(10):2578-86.
- 34) Li G, Hangoc G, Broxmeyer HE. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and impairs antigen-presenting function of peripheral blood monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 17;322(2):637-43.
- 35) Li G, Hangoc G, Broxmeyer HE. Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4 contributes to development of the rare population of CD14+CD16++ cells derived from human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 17;322(2):637-43.
- 36) Mainwaring CJ, Williams MA, Singer CR, Lush RJ, Smith JG, Haynes CL, Kelsey SM. Monocyte dysfunction in patients with multiple myeloma and lymphoplasmacytic disorders is related to serum paraprotein levels. *Br J Haematol.* 1999 Jun;105(4):948-54.

- 37) Melichar B, Touskova M, Vesely P. Effect of irinotecan on the phenotype of peripheral blood leukocyte populations in patients with metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2002 Jul-Aug;49(46):967-70.
- 38) Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2782-90.
- 39) Nockher WA, Wiemer J, Scherberich JE. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets. *Clin Exp Immunol*. 2001 Jan;123(1):49-.
- 40) Nockher, W. A., L. Bergmann, and J. E. Scherberich. 1994. Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol*. 98:369–374.
- 41) Ohsaka A, Saionji K, Kuwaki T, Takeshima T, Igari J. Granulocyte colony-stimulating factor administration modulates the surface expression of effector cell molecules on human monocytes. *Br J Haematol*. 1995 Mar;89(3):465-72.
- 42) Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2775-9.
- 43) Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2527-34.
- 44) Patino R, Ibarra J, Rodriguez A, Yague MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol*. 2000 Jun 1;85(11):1288-91.
- 45) Petersen J, Drivsholm A, Brandt M, Ambjornsen A, Dickmeiss E. B lymphocyte function in multiple myeloma: analysis of T cell- and monocyte-dependent antibody production. *Eur J Haematol*. 1989 Feb;42(2):193-201.

- 46) Pettersson A, Sabirsh A, Bristulf J, Kidd-Ljunggren K, Ljungberg B, Owman C, Karlsson U. Pro- and anti-inflammatory substances modulate expression of the leukotriene B4 receptor, BLT1, in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2005 Jun;77(6):1018-25. Epub 2005 Feb 23.
- 47) Pulliam L, Gascon R, Stubblebine M, McGuire D, McGrath MS. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet.* 1997 Mar 8;349(9053):692-5.
- 48) Rahman SH, Salter G, Holmfield JH, Larvin M, McMahon MJ. Soluble CD14 receptor expression and monocyte heterogeneity but not the C-260T CD14 genotype are associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 2004 Dec; 32(12):2457-63.
- 49) Ramirez R, Carracedo J, Berdud I, Carretero D, Merino A, Rodriguez M, Tetta C, Martin-Malo A, Aljama P. Microinflammation in hemodialysis is related to a preactivated subset of monocytes. *Hemodial Int.* 2006 Jan;10 Suppl 1:S24-7.
- 50) Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Veskovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood.* 2002 Jul 1;100(1):230-7.
- 51) Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, Jack AS, Morgan GJ. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol.* 1998 Jan;100(1):176-83.
- 52) Reimer P, Kunzmann V, Wilhelm M, Weissbrich B, Kraemer D, Berghammer H, Weissinger F. Cellular and humoral immune reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). *Ann Hematol.* 2003 May;82(5):263-70. Epub 2003 Mar 22.
- 53) Reinke P, Bevilacqua M, Tryon V, Cheronis J, Volk HD. Immune monitoring of glucocorticoid therapy. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2002;(40):25-37.
- 54) Saionji K, Ohsaka A. Expansion of CD4+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol.* 2001; 105(1):21-6.
- 55) Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH. CD16+ monocytes in patients with cancer:

spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1995 May 15;85(10):2910-7.

- 56) Schlenke P, Sheikhzadeh S, Weber K, Wagner T, Kirchner H. Immune reconstitution and production of intracellular cytokines in T lymphocyte populations following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Aug;28(3):251-7.
- 57) Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14⁺CD16⁺ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α -levels. *Thromb Haemost*. 2004 Aug; 92(2):419-24.
- 58) Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol*. 2005 Aug; 141(2):270-8.
- 59) Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14⁺CD16⁺ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol*. 2002 Jun;(6):629-38.
- 60) Straka C, Oduncu F, Hinke A, Einsele H, Drexler E, Schnabel B, Arseniev L, Walther J, Konig A, Emmerich B. Responsiveness to G-CSF before leukopenia predicts defense to infection in high-dose chemotherapy recipients. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):1989-94.
- 61) Szaflarska A, Bay-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, Zembala M. Antitumor response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation. *Exp. Hematol*. 2004 Aug; 32(8):748-.
- 62) Tanaka M, Honda J, Imamura Y, Shiraishi K, Tanaka K, Oizumi K. Surface phenotype analysis of CD16⁺ monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr;116(1):57-61.
- 63) Thieblemont, N., L. Weiss, H. M. Sadeghi, C. Estcourt, and N. Haeffner-Cavaillon. 1995. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol*. 25:3418–3424

- 64) Tomita K, Lim S, Hanazawa T, Usmani O, Stirling R, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. *Clin Immunol*. 2002 Mar; 102(3):258-66.
- 65) Tsujimoto H, Ono S, Hiraki S, Majima T, Kawarabayashi N, Sugasawa H, Kinoshita M, Hiraide H, Mochizuki H. Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16+ CD14+ monocytes in patients with septic shock. *J Endotoxin Res*. 2004;10(4):229-37.
- 66) Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Efron PA, Kinoshita M, Hiraide H, Moldawer LL, Mochizuki H. Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress. *Clin Immunol*. 2006 May; 119(2):180-7. Epub 2006 Mar 6.
- 67) Ulrich C, Heine GH., Garcia P, Reichart B., Georg T, Krause M, Koehler H, Grindt M. Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006 Jun; 21(6):1596-602.
- 68) Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):699-704.
- 69) Williams MA, Kelsey SM, Collins PW, Gutteridge CN and Newland AC. The immunotherapeutic potential of the monocyte. *The Cancer Journal* .1998 ; 11: 111-126.
- 70) Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2053-8.
- 71) Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood*. 1992 Jan 15;79(2):503-11.
- 72) Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today*. 1996 Sep;17(9):424-8.

Lebenslauf

Name Anke Joeinig
geboren 02.05.1979 in München
Staatsangehörigkeit: Österreich

Schule

1985 -1989: Grundschule in München
1989 -1998: Gymnasium in München

Studium

10/1999- 05/2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

08/2001 Ärztliche Vorprüfung
08/2002 Erstes Staatsexamen
03/2005 Zweites Staatsexamen
05/2006 Drittes Staatsexamen

Klinische Erfahrung

2001-2004: Famulaturen in den Fachgebieten Anästhesie, Hämatologie und Onkologie, allgemeine Innere Medizin, Neurologie

04/2005 – 03/2006 Praktisches Jahr, Wahlfach Neurologie

08/2006 – 8/2008 Assistenzärztin in der Kardiologie am Deutschen Herzzentrum München/ Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München

Seit 9/2008 Assistenzärztin Kardiologie Klinikum Bogenhausen, München