Aus der klinischen Abteilung des
Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin
Direktor:
Professor Dr. B. Fleischer

Lymphozytenkinetik und immunologisch-virologische Verlaufsbeobachtung bei asymptomatischen HIV-Patienten nach Lymphozytapherese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Kathrin Julie Dengler
aus Nürnberg
Hamburg, 2000

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 10. Juli 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg:

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. M. Dietrich

Koreferent: Prof. Dr. R. Laufs

Meiner Großmutter

Frau Gabriele Schradin, geb. Troppa

gewidmet

1. EINLEITUNG 3
1.1 Thematik 3
1.2 Stand der Forschung 6
1.2.1 Pathogenese der HIV-Infektion 6
1.2.2 Mechanismen der Depletion und Funktionsstörung von CD4+ Lymphozyten 8
1.2.3 Therapieansätze der HIV Erkrankung 12
1.2.4 Lymphozytapherese 13
1.2.5 In vitro Expansion von Lymphozyten HIV-infizierter Patienten 14
1.3 Problemstellung 16
1.4 Ziel der Arbeit 16
2. MATERIAL UND METHODEN 18
2.1 Patientenkollektiv 18
2.2 Lymphozytapherese 19
2.3 Dichtegradientenseparation von PBMC aus heparinisiertem Vollblut 20
2.4 Kryopräservation und Lagerung von humanen T-Lymphozyten 20
2.4.1 Auftauprotokoll 21
2.4.2 Messung der Viabilität und Recovery 21
2.5 Langzeit-Kultur 22
2.5.1 Bestimmung der Proliferationsrate 22
2.6 Lymphozytenstimulationstest / Proliferationsassay 23
2.7 Phänotypisierung von PBMC durch die Durchflusszytometrie 23
2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 26
3. ERGEBNISSE 28
3.1 Lymphozytapherese 28
3.1.1 Verlauf der peripheren Lymphozyten 30
3.1.2 Verlauf der CD4+ Zellen 31
3.1.3 Verlauf der CD8+ Zellen 32
3.1.4 Verlauf der CD4/CD8 Ratio 33
3.1.5 Verlauf der Thrombozyten 34
3.1.6 Verlauf der Leukozyten und Erythrozyten 35
3.1.7 Verlauf der Granulozyten und Monozyten 36
3.1.7 Verlauf anderer Laborparameter 38

3.2 Polymerasekettenreaktion vor und nach Lymphozytapherese 38
3.3 Patientenbeobachtung im Verlauf 39
3.4 Kryopräservierung von humanen T-Lymphozyten 42
3.4.1 Viabilität und Recovery 43
3.4.2 CD4+, CD8+ Zellen und CD4/CD8 Ratio in vivo, nach dem Auftauen und nach in vitro Expansion 44
3.5 Proliferationsassays der gewonnenen Zellen nach dem Auftauen 45
3.6 Langzeitkultur 48
3.6.1 Phänotypisierung der durch Lymphozytapherese gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie vor und nach Kultur 50
3.6.2 Semiquantitative PCR vor und nach Kultur 55
3.6.3 Proliferationsassay nach Kultur 56
4. DISKUSSION 57
4.1 Lymphozytapherese 57
4.2 Kryopräservierung 59
4.3 Kultur 59
4.4 Die gewonnenen Zellen durch die Lymphozytapherese und Kultur 61
5. ZUSAMMENFASSUNG 64
6. LITERATURVERZEICHNIS 66
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 73
8. LABORPARAMETER DER PATIENTEN IM VERLAUF 74
9. DANKSAGUNG 98
10. LEBENSLAUF 99

1. EINLEITUNG

1.1 Thematik

Ziel dieser Arbeit ist es, die wissenschaftlichen Grundlagen einer möglichen zellvermittelten Immuntherapie bei HIV-Infektionen zu erarbeiten. Der ursprüngliche Ansatz einer zellvermittelten Immuntherapie basiert auf der Beobachtung, daß HIV-infizierte Patienten durch eine abnehmende Anzahl und Funktionalität von T-Helferzellen sowie anderen Effektorzellen (Monozyten/Makrophagen und zytotoxische Zellen), eine schwere Immunsuppression entwickeln, die dem Auftreten von opportunistischen Infektionen und HIV-assoziierten Malignomen Vorschub leistet. Die genauen Mechanismen, die zu diesem schleichenden aber progredienten Verlust der physiologischen Funktion der Zellen führen, sind nicht abschließend geklärt. Verschiedene Pathomechanismen, wie direkte Zytopathizität des Virus, Synzytienbildung, Apoptose, zytotoxische T-Zellreaktionen oder antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität, werden als Ursache diskutiert. Der fortschreitende Verlust an funktionsfähigen T-Helferzellen stellt jedoch den herausragenden immunpathologischen Mechanismus der HIV-Erkrankung dar und bildet die Grundlage für das Konzept dieser Arbeit.

Periphere Blutlymphozyten von asymptomatischen HIV-infizierten Patienten wurden in einem Frühstadium der Erkrankung isoliert und kryopräserviert, um eine Rückgabe dieser Zellen später, bei weiter fortgeschrittener Immundefizienz, zu ermöglichen. Des weiteren wurden die Möglichkeiten einer in vitro Expansion der durch die Lymphozytapherese gewonnenen Zellen untersucht, um auch quantitativ eine ausreichende Menge immunkompetenter Zellen autolog retransfundieren zu können. Bei 13 asymptomatischen HIV-infizierten Patienten im Stadium A1 / A2 (nach der CDC/WHO Klassifikation, revidierte Fassung von 1997) und einer peripheren CD4+ Lymphozytenzahl von über 300/µl wurden 37 Zellseparationen durchgeführt. Dabei wurde die Methode der continuous flow cytapheresis (CFC) eingesetzt, um eine große Menge von peripheren Blutlymphozyten für immuntherapeutische Ansätze zu gewinnen. Während der Lymphozytapheresen wurden hämatologische, laborchemische, immunologische sowie virologische Laborparameter untersucht. Die Patienten wurden über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren weiter regelmäßig beobachtet. Eine mögliche

Progredienz der HIV-Erkrankung sollte hierdurch erfasst werden, um gegebenenfalls eine entsprechende (z.B. antiretrovirale) Therapie sowie die autologe Retransfusion der Zellen ohne weitere Vorbehandlung einleiten zu können.
Basierend auf dem verfügbaren Datenmaterial zu relativen und absoluten Lymphozytenzahlen in den einzelnen Organen eines HIV-negativen Probanden, wurden Abschätzungen zum Gesamtkörper-Lymphozyten-Defizit bei HIV-Patienten vorgenommen. Bei einer Gesamtkörperlymphozytenzahl von ca. 500 x 10^9 Lymphozyten (Westermann et al., 1990), einem relativen Anteil von 45% der Lymphozyten im peripheren Blut und 20 - 45% CD4+ Lymphozyten, verfügt ein gesunder Proband über eine Absolutzahl von ca. 150 - 225 x 10^9 CD4+ Lymphozyten (vorausgesetzt die Blutwerte spiegeln die Verhältnisse in anderen Kompartimenten wider). Bei HIV-Patienten im Stadium A1 (ca. 500 CD4+ Lymphozyten/µl oder einem relativen Anteil der CD4+ Lymphozyten von ca. 25% im peripheren Blut), ist eine Reduktion um 50% gegenüber gesunden Probanden auf ca. 75 - 112 x 10^9 CD4+ Lymphozyten zu verzeichnen. Beim ersten Auftreten einer AIDS-definierenden Erkrankung (z.B. ein HIV-Patient mit ca. 200 CD4+ Lymphozytenzahl/µl oder ca. 15% im peripheren Blut) ist die Anzahl der CD4+ Gesamtkörperlymphozyten auf ca. 30 - 45 x 10^9 Lymphozyten reduziert. Wie aus der Literatur ersichtlich, haben Patienten mit weniger als 50 CD4+ Lymphozyten/µl im peripheren Blut nur noch eine äußerst begrenzte Lebenserwartung (Phillips et al., 1991; Yarchoan et al., 1991). Um das Defizit an CD4+ Lymphozyten bei einem Patienten nach Auftreten der ersten AIDS-definierenden Erkrankung vorübergehend und zumindest teilweise auszugleichen, z.B. von 200/µl auf 500/µl CD4+ Lymphozyten, benötigt man theoretisch 45 - 67 x 10^9 CD4+ Lymphozyten. Im Mittel konnten wir bei den HIV Patienten 6,16 x 10^9 Leukozyten und anteilsmäßig 1,73 x 10^9 CD4+ Lymphozyten pro Lymphozytapherese gewinnen. Unter Berücksichtigung des Zellverlustes durch das Einfrieren (ca. 30%), müßte einem HIV Patienten mit 500 CD4+ Lymphozyten/µl im peripheren Blut, im Mittel 55 Lymphozytapheresen unterzogen werden, um die oben berechnete Zellmenge zur Substitution zu erreichen. Diese Anzahl sprengt jedoch selbst für einen gesunden Probanden den medizinisch vertretbaren Rahmen. Der Ansatz der zellvermittelten Immuntherapie bei HIV-infizierten Patienten soll demnach nicht als ein Langdauer-Ersatz von Lymphozyten bei diesen Patienten verstanden werden.

Vielmehr gilt diese als mögliche Interventionstherapie, die beim Auftreten von opportunistischen Infektionen oder anderen vom Patienten im Vollstadium AIDS schwer beherrschbaren Erkrankungen, eingesetzt werden könnte.
Herberman et al. konnten 1992 zeigen, daß 90% der retransfundierten CD8+ Lymphozyten nach 1-2 Tagen in Lunge, Leber, Milz und Knochenmark nachzuweisen sind. Wie lange die autologen Zellen nach Retransfusion überleben, wann und ob sie zirkulieren, konnte bislang aufgrund der kurzen Halbwertszeit des verwendeten radioaktiven Markierungsnuklids (Indium) nicht geklärt werden. Klinisch kam es bei den Patienten nach der Retransfusion der Zellen jedoch zu einer deutlichen Besserung der Symptomatik, was auf eine allgemeine Funktionsfähigkeit der Zellen schließen läßt (Klimas et al., 1992).
Ein weiterer Ansatz der adoptiven Zelltherapie ist die in vitro Expansion und Stimulation der autologen Zellen vor Retransfusion. Hierdurch kann eine größere Zellzahl und wie Ergebnisse in der lymphokine-activated killer (LAK) Zelltherapie zeigen, vor allem spezifische Zellen zur Immun- und Tumorabwehr für das Retransfusionsprogramm gewonnen werden. Daher beschäftigte sich ein wesentlicher Teil der Arbeit mit in vitro Untersuchungen an den gewonnenen Zellen. Ein Teil der durch die Lymphozytapherese gewonnenen Zellen wurde in Zellkulturversuchen eingesetzt, um die Möglichkeiten der polyklonalen Proliferation der CD4+ Lymphozyten zu erarbeiten. Es wurde die Methode der Langzeitkultur gewählt und ein Expansionsfaktor von 100 angestrebt. Durch durchflusszytometrische Analysen der Zellen in der Kultur, wurde die Proliferation nicht gewünschter Zellsubpopulationen (z.B. CD19+ B-Lymphozyten) erfaßt und durch subpopulationsspezifische Marker, Aktivations- und Adhäsionsmarker genauer charakterisiert. Als Vergleich dienten Zellkulturen von HIV negativen Probanden. Da man heute weiß, daß sich das HI-Virus vor allem in aktivierten CD4+ Lymphozyten vermehrt, birgt die Kultur und somit die Aktivierung dieser Zellen ein potentielles Risiko, das HI-Virus in vitro zu vermehren. Daher wurde durch die PCR-Technologie eine genaue Analyse zur Infektionsrate der Lymphozyten vor und nach Kultur durchgeführt. Um den schädigenden Einfluß durch Kryopräservierung sowie die dauernde Lagerung der Zellen in Flüssigstickstoff genauer zu charakterisieren, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetaut, quantitative Veränderungen sowie die Viabilität gemessen und miteinander verglichen.

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Pathogenese der HIV-Infektion

Die Infektion des Menschen mit dem HIV-1 (human immunodeficiency virus) geht einher mit einer progredienten Dysregulation des menschlichen Immunsystems. Es kommt dabei zu einer quantitativen und funktionellen Abnahme der zellulären und humoralen Immunantwort, die zum Auftreten lebensbedrohlicher AIDS- (acquired immune deficiency syndrome) definierender Erkrankungen führt.

Der CD4-Rezeptor, der auf T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Langerhansschen Zellen, follikulär dendritischen Zellen und auf der Mikroglia des ZNS exprimiert wird, stellt die Bindungsstelle für das HIV-1, genauer für das gp120 auf der Virusoberfläche, dar. Nach Interaktion des gp120 mit dem CD4-Rezeptor tritt eine gp41-vermittelte Membranfusion ein, welche die Einschleusung des Virus zur Folge hat. Nach Entfernung der Hülle beginnt die reverse Transkription der viralen RNA. Die daraus entstandene DNA wird schließlich in das Wirtsgenom integriert. Die Replikation von Virus-RNA wird eingeleitet, wenn die Zelle, z.B. im Rahmen einer Immunantwort, aktiviert wird. Dies führt zur sequentiellen Produktion verschiedener viraler mRNA, die zur Bildung von Strukturproteinen des Virus führen. Durch Virusknospung werden daraus freie HI-Virionen, die die Zelle verlassen und in der Lage sind, weitere, den CD4-Rezeptor exprimierende Zellen, zu infizieren.

Zu Beginn der HIV-Infektion kommt es unmittelbar nach der Inokulation infektionstüchtiger HI-Viren zu einer massiven Virusreplikation mit konsekutiver Virämie. Dabei ist bislang noch nicht abschließend geklärt, ob freies oder zellgebundenes Virus übertragen wird. Die initial exzessive Virämie ist vergleichbar mit anderen lymphotropen Virusinfekten (CMV, EBV) und wird durch die bis dahin noch fehlenden immunologischen Abwehrvorgänge ermöglicht. Begünstigt wird die rasche Virusvermehrung durch die immunologische Aktivierung infizierter T-Helferzellen im Rahmen der Entstehung einer primären Immunantwort.

Bereits in der frühen Phase der HIV-Infektion stellt das lymphatische Gewebe den Hauptort der Virusreplikation dar (Hufert et al., 1997). In den Keimzentren der lymphatischen Organe wird zellfreies Virus auf der Oberfläche follikulär dendritischer Zellen (FDC) gebunden (Racz et al, 1989) und akkumuliert. Die FDC selbst sind nicht maßgeblich produktiv infiziert (Schmitz et al., 1994), jedoch bleibt

das HIV auf ihrer Zelloberfläche, auch in Anwesenheit neutralisierender Antikörper, für T-Helferzellen, die in die Keimzentren migrieren, infektiös (Heath et al., 1995). Eine schließlich infizierte T-Zelle kann dann im Follikel verweilen oder in die Peripherie ausgeschleust werden. Bei einer Aktivierung der bereits infizierten Zelle in den Keimzentren, setzt eine schleichende kontinuierliche Vermehrung der Viruspartikel ein, die ihrerseits wieder neu einwandernde Helferzellen infizieren können.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es nach wenigen Tagen bis Wochen zur Produktion neutralisierender Antikörper und Induktion zytotoxischer T-Zellen als physiologische Reaktion auf die Virusinfektion (Reimann et al., 1994). Als Folge der humoralen und zellulären Immunantwort wird die Virusreplikation supprimiert und auf ein gewisses Level eingedämmt („set point“, Riddler et al., 1997; Vidal et al., 1998). In dieser sogenannten klinischen Latenzphase findet sich bei HIV-infizierten Patienten eine unterschiedlich hohe Virämie (viral load), die als ein wichtiger prognostischer Parameter gilt (Mellors et al., 1996). Abhängig vom jeweiligen Krankheitsstadium, ist nur ein geringer Teil der CD4+ Zellen im peripheren Blut (1:100 - 1:10000) mit dem HI-Virus tatsächlich infiziert (Hufert et al., 1989). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß in dieser Phase die Anzahl der in den Lymphknoten befindlichen infizierten T-Helferzellen zwischen 5 bis 150 mal höher als im peripheren Blut liegt (Embretson et al., 1993; Pantaleo et al., 1993; Schmitz et al., 1994). Demnach spielen sich auch in dieser Phase entscheidene immunpathologische Vorgänge im Lymphknoten ab.

Im Rahmen der HIV-Infektion liegen, neben wesentlichen Störungen in der Funktion der humoralen Immunantwort, die schwersten Defekte innerhalb des zellulären Systems. Dies ist durch die zentrale Stellung der CD4+ Lymphozyten, genauer gesagt der T-Helferzelle, im Rahmen der Immunregulation erklärt. Der CD4-Rezeptor liegt in unmittelbarer Nachbarschaft des T-Zellrezeptors (CD3) auf der Membran der T-Helferzelle und ist physiologischerweise maßgeblich an der MHC (major histocompatibility complex)-II-restringierten Antigenerkennung beteiligt. Nach Erkennung eines MHC-II-präsentierten Fremdepitops über den T-Zellrezeptor durch CD4+ Lymphozyten, kommt es durch die Ausschüttung von Zytokinen zur Differenzierung von antikörperbildenden B-Zellen, funktioneller Reifung von zytolytischen Zellen (Tc-Zellen) sowie zur Aktivierung von

Makrophagen. Die Abwehr des zellintegrierten Virus erfolgt schließlich über die Induktion HIV-spezifischer zytotoxischer Zellen, die über die Präsentation von HIV-Peptiden auf der Zellmembran der CD4+ Zellen über den klassischen MHC-Klasse-I-restringierten Weg vermittelt wird. Dabei werden auch antiviral aktive Zytokine von zytotoxischen Zellen sezerniert, die über einen nicht MHC-Klasse-I-restringierten Weg zu einer Virusinhibition führen (Garzino-Demo et al., 1998; Baier et al., 1998).

In Folge der HIV-Infektion kommt es zur quantitativen und qualitativen Störung der Zytokinsekretion aus allen Zellen des Immunsystems, sowie zu einem fortschreitenden Funktionsverlust verschiedener T-Zellpopulationen und antigenpräsentierenden Zellen (Miedema et al., 1988; Schnittman et al., 1990). Die Infektion einiger dieser wichtigen Effektorzellen (T-Helferzellen, Monozyten / Makrophagen) des Immunsystems durch das HI-Virus selbst ist ein weiteres Merkmal, das die einzigartige Immunpathologie der HIV-Infektion charakterisiert (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Schnittman et al., 1989). Im Endstadium der HIV-Infektion kommt es schließlich zu einem Zusammenbruch der zellulären Immunabwehr, in dessen Vordergrund vor allem die Verminderung und Funktionseinschränkung der CD4+ Lymphozyten steht. Es kommt zum Ausbruch AIDS-definierender Erkrankungen, die auf die unkontrollierte Vermehrung bzw. Reaktivierung vorwiegend endogener Erreger im Sinne einer klassischen opportunistischen Infektion zurückzuführen sind.

1.2.2 Mechanismen der Depletion und Funktionsstörung von CD4+ Lymphozyten

Neben der Plasmaviruslast ist die periphere CD4+ Lymphozytenzahl ein verläßlicher Parameter, der die Schwere der Erkrankung HIV-infizierter Patienten definiert und eine Aussage zur Progressionswahrscheinlichkeit dieser Patienten zum Vollbild der Erkrankung ermöglicht. Phillips et al. konnten zeigen, daß bei unbehandelten HIV-infizierten Patienten mit CD4+ Lymphozytenzahlen <500/µl die Ausbildung zum Vollbild AIDS im Durchschnitt drei Jahre dauert und dies bei CD4+ Lymphozytenzahlen unter 250/µl (<20% der Gesamtlymphozyten) zu erwarten ist. Laut Moss et al. kommt es zu einer Abnahme der CD4+ Lymphozytenzahl von 60-100/µl pro Jahr nach der Infektion. Yarchoan et al.

zeigten, daß 40 von 41 verstorbenen AIDS Patienten weniger als 50 CD4+ Lymphozyten / µl zum Todeszeitpunkt hatten. Wie es im Verlauf der HIV Infektion zu der progredienten Abnahme und Funktionsstörung der CD4+ Lymphozyten kommt, ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Im folgenden Abschnitt werden die verschiedenen postulierten Mechanismen, die zur CD4+ Depletion führen können, aufgezeigt.

- Direkte Zerstörung nicht infizierter CD4+ Lymphozyten: Viele HIV-Isolate wirken auf kultivierte Zellen letal, indem sie die sogenannte Synzytienbildung, die Fusion der Zellmembranen nach Interaktion von gp120 auf der Oberfläche infizierter Zellen mit den CD4+ Molekülen auf nicht infizierten Zellen, verursachen. Anschließend kommt es zur Lyse der nichtinfizierten Zellen (Heinkelein et al., 1995). Nardelli et al. konnten zeigen, daß allein durch die gp120-CD4 Bindung eine Triggerung zur Apoptose nicht infizierter Zellen ausgelöst werden kann, noch bevor es zur Synzytienbildung kommt. Welche Mechanismen zu diesem Zelltod führen sind noch nicht abschließend geklärt.
- Ein weiterer direkt zytopathischer Effekt stellt die Interferenz des Virus mit der Proteinsynthese dar. Zugunsten viraler Proteine wird die eigene Proteinsynthese der infizierten Zellen vernachlässigt, was schließlich zum Absterben dieser Zellen führt.
- Aktivationsabhängige Apoptose der CD4+ Lymphozyten durch HIV: CD4+ Lymphozyten von HIV positiven Patienten zeigten in der in vitro Stimulation durch Mitogene eine verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu CD4+ Zellen von gesunden Probanden. Diese mangelnde Fähigkeit zur Proliferation wurde auf Mechanismen, die für die Apoptose von Zellen von Bedeutung sind, zurückgeführt (Ameisen et al., 1991; Groux et al., 1992). Neben anderen, spielen hierbei mangelnde Bildung sekundärer Signale die zur Lymphozytenaktivierung führen, „falsche“ Antigenpräsentation von den akzessorischen Zellen, hohe lokale TNF-α Spiegel, reduzierte Bildung von IL-2 sowie falsche zelluläre Signalübertragung durch an CD4 gebundenes lösliches gp120 eine Rolle. Wie Gougeon et al. zeigen konnten, kommt es auch in vivo zu einer aktivierungsabhängigen Apoptose von CD4+ und CD8+ Zellen. 50 - 60% der apoptotischen Zellen in der Latenzphase der Erkrankung hatten auf ihrer Oberfläche aktivationstypische Moleküle exprimiert. Zudem konnte eine

Zunahme der Apoptose-Bereitschaft dieser Zellen mit der Progression der Erkrankung zum AIDS-Stadium korreliert werden. Die im Rahmen der HIV-Infektion hervorgerufene chronische Infektion und somit Aktivierung der Zellen (Benito et al., 1997) kann eine der Ursachen sein, die zu der zunehmenden Abnahme der Zellen führt.

- Zytolyse durch HIV-spezifische zytotoxische und NK-Zellen: Während der HIV-Infektion kommt es, im Rahmen der zellulären Immunantwort, zur Ausbildung spezifischer zytotoxischer T-Zellen. Diese Spezifität wird durch Antikörper vermittelt, die einerseits das virale Antigen gebunden haben und nach Kontakt zu natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) diese zur Lyse der Antigen tragenden Zelle anregen. Dies führt schließlich zur Antikörper vermittelten zellulären Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), die eine Stabilisation der Bindung zwischen Zielzelle und zytotoxischer Zelle bewirkt und den Tötungsmechanismus beschleunigt. Die spezialisierten NK-Zellen bei HIV-infizierten Patienten erkennen lösliches gp120, das auch auf nichtinfizierten CD4+ Lymphozyten gebunden sein kann. Schließlich werden diese Zellen lysiert und so kann diese Reaktion zu der zunehmenden Abnahme der CD4+ Lymphozytenzahl beitragen. Im Verlauf der HIV Erkrankung kommt es jedoch zur Abnahme dieser ADCC, so daß die massive Depletion der CD4+ Lymphozyten nicht allein durch diese Reaktion erklärt werden kann (Walker et al., 1989; Tyler et al., 1990; Schmitz et al., 1999).
- Zytokinvermittelte Abnahme und Funktionsstörungen der CD4+ Lymphozyten: Die HIV-Infektion führt zu einer massiven Immunaktivierung aller Zellen des Immunsystems. Hierdurch werden eine Vielzahl von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen sezerniert, die wiederum eine Hochregulierung von CD4+ Rezeptoren auf Lymphozyten bewirkt. Es kommt so zu einer Zunahme der für das Virus verfügbaren Rezeptoren und durch eine erneute Aktivierung dieser Zellen auch zu einer Zunahme der viralen Transkription und Replikation. Im Verlauf der HIV-Infektion verändert sich zudem die qualitative Zusammensetzung der sezernierten Zytokine. Hierbei spielen die zwei Subtypen der T-Helferzelle eine wesentliche Rolle, T_H-1 und T_H-2. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einem Wechsel der zunächst überwiegend von der T_H-1 Zelle (IFN-γ, IL-2, IL-12) zu den von T_H-2 Zellen (IL-4, IL-6, IL-10) sezernierten

Zytokinen (Clerici et al. 1993). Hieraus resultiert eine Verminderung der Expansion von zytotoxischen T-Lymphozyten und somit ein zunehmender Mangel an Zellen, die in der Lage sind, das Virus zu eliminieren.

- Molekulare Mimikry: Es wurde postuliert, daß eine gewisse antigene Ähnlichkeit zwischen gp120-Anteilen und dem humanen Leukozytenantigen (HLA)-II besteht. Diese sogenannte molekulare Mimikry kann eine Autoimmunreaktion auslösen, bei der durch diese Antigenstruktur gebildete Antikörper oder zelluläre Komponenten mit den normalen Zellen kreuzreagieren. Schließlich würde eine solche Kreuzreaktion mit normalen Zellen eine Immunantwort, die ADCC vermittelt ist, verursachen und letztlich zur Lyse der Zellen führen.
- Erhöhter T-Zellumsatz bei HIV-infizierten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden: T-Lymphozyten infizierter Patienten zeigen insgesamt eine kürzere Halbwertszeit im Vergleich zu gesunden Probanden. Zudem findet sich eine verminderte Regeneration dieser Zellen (z.B. aus dem Thymus). Auch diese Phänomene werden als Ursache für die zunehmende Verminderung der T-Zellen im Verlauf der HIV-Erkrankung diskutiert (Zhang et al., 1999).

Funktionelle Einschränkungen der T-Lymphozyten können bereits in den Frühstadien der HIV-Infektion auftreten, bevor es zur Abnahme der CD4+ Lymphozytenzahl kommt. Vor allem scheint das HI-Virus eine immunsuppressive Wirkung auf die T-Lymphozyten auszuüben. Dies äußert sich in der mangelnden Proliferationsfähigkeit dieser Zellen in vitro nach Stimulation mit Antigenen oder Mitogenen. Ob es sich dabei jedoch um einen direkten immunsuppressiven Effekt von HIV-Antigenen (g120 und gp41), um eine indirekte Reaktion von Immunkomplexen aus viralen Antigenen und Antikörpern oder um ganz andere Mechanismen handelt, bleibt bis heute nicht ausreichend geklärt.

Zusammenfassend stellt die Pathogenese des Vollbilds der AIDS-Erkrankung eine massive Störung der körpereigenen Immunantwort dar, in deren Zentrum die zunehmende Abnahme sowie eingeschränkte Funktionalität der T-Zellpopulationen, insbesondere der CD4+ Lymphozyten, steht. Hierdurch kommt es zur konsekutiven Störungen aller anderen Zellen und Systeme, die bei der Induktion einer menschlichen Immunantwort eine Rolle spielen.

1.2.3 Therapieansätze der HIV Erkrankung

Die Therapie von HIV-infizierten Patienten basiert heute auf zwei Ansätzen:

1. Medikamentöse antiretrovirale Therapie, Prophylaxe und frühe Behandlung der opportunistischen Infektionen und
2. Wiederherstellung der immunologischen Funktion.

Die Therapie der HIV-Infektion mit antiretroviralen Medikamenten hat in den letzten Jahren wesentliche Erfolge zu verzeichnen. Die Medikamente führen in erster Linie zu einem massiven Abfall der Viruslast, so daß schließlich das Virus im Plasma mit den herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist (Perelson et al., 1997). Finzi et al. konnten 1997 und 1999 zeigen, daß das Virus auch unter der medikamentösen Therapie in latent infizierten T-Zellen erhalten bleibt und es zu keiner wirklichen Eradikation kommt. Unklar bleibt zudem, warum es unter der Therapie manchmal nur zu einem zögernden Anstieg der CD4+ Zellzahlen kommt. Es ist jedoch kaum eine klinische Verschlechterung bzw. Progression zu AIDS bei einer Viruslast unter 10.000 Kopien pro ml Plasma und einer CD4+ Helferzellzahl von über 300/µl zu erwarten, so daß insgesamt von einem klinischen Erfolg ausgegangen werden darf. Noch nicht abschließend geklärt ist, wann mit der Therapie begonnen und wie lange sie fortgesetzt werden sollte. Bei einem unsachgemäßen Einsatz dieser Medikamente bei HIV-infizierten Patienten besteht das Risiko einer zunehmenden Resistenzbildung. Zudem birgt der Einsatz von Protease-Inhibitoren nicht zu unterschätzende Langzeit-Nebenwirkungen. Diese sind neben der Erhöhung der Triglyceride und LDL im Blut und somit Entstehung eines klassischen kardiovaskulären Risikofaktors, auch das Auftreten von Fettverteilungsstörungen, dem Lipodystrophie-Syndrom, welches den Patienten oft zum Absetzen der Therapie zwingt. Andere limitierende Faktoren des Therapieerfolgs durch die antiretroviralen Medikamente sind Toxizität, unzureichende Plasmawirkspiegel und intrazelluläre Phosphorylierungsdefizite. Schließlich hat der Einsatz der antiretroviralen Medikamente heute nicht mehr die Eradikation des Virus zum Ziel, sondern wird als Therapie einer chronisch-latenten Infektion verstanden. Vor diesem Hintergrund sollten auch noch adjuvante Therapieansätze der HIV-Infektion verfolgt werden.

Ziel des zweiten Therapieansatzes ist die gezielte Rekonstruktion der zellulären Immunabwehr. Neben der Substitution von gentechnisch hergestellten Zytokinen

(z.B. Interleukin-2 oder Interferon-γ), die einen wachstumsfördernden Einfluß auf bestimmte Effektorzellen des Immunsystems ausüben und zur Zeit in klinischen Studien für die Anwendung bei HIV-infizierten Patienten geprüft werden, hat die adoptive Zelltherapie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Unter der adoptiven Zelltherapie ist die Infusion von immunologischen Effektorzellen zu verstehen, die für die Behandlung oder Prävention von Krankheiten eingesetzt werden kann. Walker et al. konnten bereits 1986 zeigen, daß die HI-Virusreplikation in vitro in einem gewissen Ausmaß durch CD8+ Lymphozyten kontrolliert werden kann. Diese Beobachtung führte zu der Entwicklung der ersten zellmediierten adoptiven Immuntherapie bei HIV-infizierten Patienten. Bereits 1992 gelang es HIV-infizierten Patienten im AIDS-Stadium CD8+ Lymphozyten durch ein zytapheretisches Verfahren zu entnehmen. Die Zellen wurden in vitro expandiert und anschließend den Patienten (autolog) zurückgegeben (Herberman et al., 1992; Ho et al., 1993; Klimas et al., 1994). Diese Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß es bei den Patienten zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen durch die Zytapheresen kam und die expandierten Zellen klinisch zu einer Besserung (z.B. die Rückbildung von cutanen Kaposi-Sarkom) führten.
Durch diese Vorarbeiten zur autologen adoptiven T-Zelltherapie an HIV-infizierten, bzw. bereits an AIDS erkrankten Patienten und aufgrund der Tatsache, daß eine Retransfusion der Zellen auch nach der in vitro Expansion im Prinzip möglich ist und keine gravierenden Nebenwirkungen birgt, ist der Grundgedanke zu dieser Arbeit entstanden.

1.2.4 Lymphozytapherese

Die Leukapherese stellt eine lang etablierte Technik zur schonenden Separation von Leukozyten bei hämatologischen und onkologischen Indikationen dar. Die selektive Lymphozytapherese ist dagegen eine relativ neue Modifikation der klassischen Leukapherese. Sie hat durch die Fortschritte in der Therapie mit lymphokine-activated-killing (LAK) Zellen und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) zunehmend an Bedeutung gewonnen und ist heute, neben den Stammzellapheresen, an vielen hämatologisch/onkologischen und transfusionsmedizinischen Zentren etabliert.

Die isolierte Separation von Lymphozyten wird durch die Einstellung der Absauggeschwindigkeit und durch die Geschwindigkeit der Zentrifugenrotation erreicht. Zur Separation werden Einmalsysteme verwendet um eine Kontamination der Spender auszuschließen. Wie Hester et al. zeigen konnten, kann eine Ausbeute von 2-9 x 10^9 mononukleärer Zellen (PBMC) durch eine continuos-flow cytapheresis (CFC) Leukapherese bei gesunden Probanden erreicht werden. Die Separation an drei aufeinanderfolgenden Tagen führte im Mittel zu einer 10%igen Reduktion der PBMC beim Spender, was auf einen raschen Ersatz der entnommen Zellen aus dem extravaskulären Gewebe schließen läßt. Entscheidener ist die Reduktion der Thrombozyten um ca. 39% nach drei aufeinanderfolgenden Leukapheresen. Ein weiterer einschränkender Faktor bei der Laukapherese kann die Antikoagulation (mit ACD-A) darstellen, die zu einem Verlust von ionisierten Serumkalzium führt. Ernsthafte Komplikationen sind jedoch selten und können in der Regel mit einfachen Mitteln beherrscht werden.

Bis heute gibt es noch wenig Erfahrung über Lymphozytapheresen bei HIV-positiven Patienten. Wie Herberman et al. aber zeigen konnten, birgt die Lymphozytapherese auch bei HIV-infizierten Patienten in einem späten Stadium der Infektion keine wesentlichen kurzfristigen Risiken.

1.2.5 In vitro Expansion von Lymphozyten HIV-infizierter Patienten

Seit der Entwicklung und Einführung chemisch genau definierter Zellkulturmedien ist in vielen biologischen oder medizinischen Labors die Technik der Zellkultur eine Standardmethode. Für die Kultivierung von menschlichen T-Lymphozyten sind eine Vielzahl von Mitogenen erhältlich, die zur Stimulation von T-Zellen geeignet sind. Neben PHA und Ionomycin, Staphylokokkenprotein A, den Interleukinen IL-1 und IL-2 kommen auch monoklonale Antikörper gegen Lymphozytenantigene zum Einsatz (Adriaansen et al., 1990; Chang et al., 1991; Wong et al., 1990; Zagury et al., 1986; Crossland et al., 1991; Riddell et al., 1990; Levine et al., 1998). Zudem kann die Kultivierung und Expansion von T-Lymphozyten auch durch die Kokultivierung mit antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen) und anderen sogenannten Feeder Zellen (z.B. Fibroblasten) unterstützt werden (Sprent et al., 1989; Sorg et al., 1989).

Optimale Kulturbedingungen für T-Lymphozyten wurden zunächst in der adoptiven Immuntherapie bei krebskranken Patienten etabliert, da aktivierte und expandierte Lymphozyten durch die Kultur zu sogenannten LAK-Zellen heranreifen und diese in der Lage sind Tumorzellen zu lysieren (West et al., 1987; Rosenberg et al., 1988; Stoter et al., 1990). An der Universität in Minnesota wurden bei an ALL erkrankten Kindern Leukapheresen durchgeführt und anschließend die gewonnenen Zellen in der Kultur mit OKT3 (gegen CD3+ gerichteter monoklonaler Antikörper) und IL-2 stimuliert. Dabei konnten ausreichend hohe Zellzahlen zur erforderlichen Therapie erreicht werden (Anderson et al., 1988).

Herberman et al. stimulierten durch die Leukapherese gewonnen Zellen bei HIV-infizierten und an AIDS erkrankten Patienten mit Interleukin-2. Es konnte dadurch eine größere Anzahl von Lymphozyten und wie die Ergebnisse nach Retransfusion zeigten, auch immunkompetente Zellen gewonnen werden.

1.3 Problemstellung

Da es bei HIV-infizierten Patienten zu einer progredienten Abnahme der CD4-Zellen und dadurch bedingten Störung der Funktionalität aller Zellen des Immunsystems kommt, wurden durch diese Arbeit die wissenschaftliche Grundlagen der zellvermittelten Immuntherapie bei HIV-Patienten untersucht. Hierbei wurden Methoden gewählt, die zur Beantwortung folgender Fragestellungen dienten:

- Kann durch das Verfahren der Lymphozytapherese eine komplikationslose und nebenwirkungsarme Entnahme von T-Lymphozyten bei HIV infizierten Patienten kurz- und mittelfristig erfolgen?
- Kann durch die Lymphozytapherese eine ausreichende Menge an Lymphozyten für die adoptive Immuntherapie gewonnen werden?
- Können die gewonnenen Zellen kryopräserviert und über einen längeren Zeitraum ohne erheblichen Zellverlust oder Veränderung Ihrer Funktionalität aufbewahrt werden?
- Können die anschließend aufgetauten Zellen in vitro stimuliert und expandiert werden?
- Sind die kultivierten Zellen für eine autologe Retransfusion geeignet?

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Erarbeitung der wissenschaftlichen Grundlagen für einen innovativen Therapieansatz der HIV-Infektion durch autologe Retransfusion von in vitro expandierten T-Lymphozyten.

Es wurden asymptomatischen HIV-infizierten Patienten mit über 300/µl CD4+ Lymphozyten im peripheren Blut Lymphozyten durch die Lymphozytapherese entnommen. Diese Patienten wurden in einem frühen Stadium der HIV-Erkrankung ausgewählt, da bei diesen Patienten eine noch ausreichende Menge an CD4+ Lymphozyten und CD8+ T-Zellklonen (Pantaleo et al., 1997) vorhanden ist, so daß durch eine Entnahme keine akute Verschlechterung des Gesundheitszustands der Patienten zu erwarten ist. Zudem zeigen die Zellen in diesem Stadium kaum eine Einschränkung ihrer Funktionalität und das immunologische Repertoire ist noch weitgehend intakt. Dies sollte die Qualität der entnommenen

Zellen gewährleisten, von denen die Patienten dann bei der später geplanten Retransfusion profitieren.

Durch regelmäßige Untersuchungen der Patienten vor, während und nach den Apheresen wurden mögliche Veränderungen klinischer, laborchemischer, immunologischer und virologischer Parameter erfaßt. Insgesamt wurden die Patienten bis zu 2 Jahren nach den Lymphozytapheresen beobachtet. Der potentielle Einfluß der Zellseparationen auf den Verlauf der HIV-Erkrankung konnte hierdurch charakterisiert werden.

Um eine ausreichende Menge an Lymphozyten durch die Apheresen zu gewinnen, wurden bis zu 4 Zellseparationen pro Patient durchgeführt. Anschließend wurden die Lymphozyten nach einem vorgegebenen Protokoll kryopräserviert. Um den potentiellen schädigenden Einfluß durch die Kryokonservierung und Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum genauer zu charakterisieren, wurden in regelmäßigen Zeitabständen gewonnene Aliquots aufgetaut. Es galt, quantitative und funktionelle Veränderungen dieser Zellen zu untersuchen und über die Zeit miteinander zu vergleichen.

Die durch die Lymphozytapherese gewonnenen Zellen wurden schließlich in der Langzeitkultur stimuliert und proliferiert. Durch die quantitative Bestimmung der Proliferationsraten sollte geklärt werden, ob durch die Kultur eine größere Menge an Zellen für eine adoptive Immuntherapie gewonnen werden kann. Zudem wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen die expandierten Zellen charakterisiert. Um festzustellen ob diese Zellen auch nach Kultur auf einen Immunstimulus reagieren können, wurden die expandierten Zellen in Proliferationsassays gegeben. Durch die Evaluierung der Virusreplikation während der Expansion sollte die theoretische Möglichkeit einer gesteigerten Virusreplikation durch T-Zellaktivierung in vitro untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte über die Ambulanz der klinischen Abteilung am Bernhard-Nocht-Institut. Die Patienten wurden in schriftlicher Form über den wissenschaftlichen Zweck, die möglichen Risiken und die entsprechenden Vorsorgemaßnahmen aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten eingeholt. Bei der Durchführung der Lymphozytapheresen, der Untersuchungen zur Lymphozytenkinetik bei HIV-infizierten Patienten, sowie den in vitro Experimenten mit den humanen Zellen, wurden die Empfehlungen des Weltärztebundes (revidierte Deklaration von Helsinki, 10.10.1975, Tokio) eingehalten. Ein entsprechender Antrag zur Lymphozytapherese und Untersuchung der Lymphozytenkinetik beim Menschen wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt.

Eingeschlossen wurden 13 männliche HIV-positive Patienten im CDC Stadium A1/A2 (CDC-Klassifikation von 1993: Laborkategorie 1 und 2 (>500/µl CD4-Lymphozyten, 200 - 499/µl CD4-Lymphozyten) und klinische Kategorie A (asymptomatisch)). Das Alter der Patienten lag zwischen 31 und 55 Jahren. Bei allen Patienten wurde eine eingehende körperliche Untersuchung durchgeführt und hämatologische sowie laborchemische Parameter untersucht.

Einschlusskriterien:

- Nachgewiesene HIV-Infektion im ELISA und Western-Blot
- Wiederholt gemessene CD4+ Lymphoyztenzellzahl von >300/µl
- Normales Blutbild, normale Gerinnungsparameter, normale chemische Laborparameter

Ausschlusskriterien:

- Floride, behandlungsbedürftige Infektion oder maligne Erkrankung
- Deutlich pathologische Laborbefunde (Blutbild, Gerinnungsstatus, Klinische Chemie, Leberenzyme, Lymphozytensubpopulationen)
- Diagnose einer opportunistischen Infektion oder eines HIV-assoziierten Malignoms in der Vorgeschichte.
- Karnofsky - Index <80%

Keiner der Patienten hatte bis zum Zeitpunkt der Rekrutierung und während der Untersuchungen eine antiretrovirale Therapie oder andere alternative Therapien erhalten.

Die Patienten wurden im Schnitt 22 Monate lang beobachtet. Neben den zu der Lymphozytapherese gehörenden Untersuchungen wurde im Abstand von höchstens drei Monaten bei den Patienten eine körperliche Untersuchung durchgeführt und das Differentialblutbild, klinisch chemische Parameter, Lymphozytensubpopulationen, Neopterin-Spiegel sowie weitere Routine-Laborparameter bestimmt. Die Bestimmung der Viruslast war zum Zeitpunkt der Arbeit keine Routineuntersuchung und wurde daher nicht durchgeführt.

2.2 Lymphozytapherese

Vor jeder Lymphozytapherese wurden die Patienten laborchemischen und körperlichen Untersuchungen unterzogen. Die Untersuchungen wurden zu den Zeitpunkten unmittelbar vor und nach Lymphozytapherese, 1 Stunde, 3 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Lymphozytapherese wiederholt. Postzytapheretische Veränderungen der klinischen und laborchemischen Parameter konnten dadurch frühzeitig erfaßt werden, um therapeutische Interventionen gegebenenfalls rechtzeitig zu ermöglichen.

Die Lymphozytapheresen wurden durch einem Arzt, der Verfasserin und einer Krankenschwester kontinuierlich überwacht und durchgeführt. Die Zellseparationen erfolgten durch die Methode der continuous flow cytapheresis (CFC) mittels eines halbautomatischen Zellseparators vom Typ IBM 2997 (Cobe Laboratories GmbH, Heimstetten, Deutschland). Die Zentrifugalkraft lag zwischen 850-1100 g. Die Antikoagulation erfolgte mit Anticoagulant Citrat Dextrose Formula A (ACD-A) in einem Verhältnis von 1:10 (Antikoagulant zu Vollblut).

Für jeden Patienten wurde ein Einmal-Entnahmesystem (Schlauchsystem, Separationsring, 2000 ml waste bag von Cobe Laboratories GmbH, Heimstetten, Deutschland) verwendet und die gewonnene Zellsuspension in einem einfriertauglichen Beutel (Cryocyte 500 ml freezing bag , Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) aufgefangen. Eine kleinere Fraktion der Zellen (ca. 1×10^{8} Zellen) wurde separat für in vitro Untersuchungen in einem 200 ml fassenden Beutel gewonnen. Die einzelnen Lymphozytapheresen dauerten zwischen 3-4 Stunden, je nach Höhe der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut und der gewählten Flußrate

(15-30 ml pro Minute). Abhängig von der Absauggeschwindigkeit wurde die Kontamination mit Granulozyten und Thrombozyten reguliert.
Angestrebt wurde eine Ausbeute von 5-10x10^9 Leukozyten pro CFC-Lymphozytapherese. Pro Patient wurden bis zu vier Lymphozytapheresen im Abstand von mindestens 2 Wochen durchgeführt. Der Zeitraum zwischen den einzelnen Zellseparationen war abhängig von der Erholung der Laborparameter (Thrombozytenzahl, Gerinnungsstatus, Immunstatus, Serumkalzium) auf die Ausgangswerte.

2.3 Dichtegradientenseparation von PBMC aus heparinisiertem Vollblut

Für die PCR Analysen zur Bestimmung des Anteils HIV-infizierter Zellen im peripheren Blut wurde Vollblut zu den Zeitpunkten vor und drei Stunden nach Lymphozytapherese gewonnen. Für die Expansionsversuche wurde zudem Vollblut von HIV negativen Probanden gewonnen. Durch Dichtegradientenseparation wurden mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Dabei wurde dem heparinisierten Blut im Verhältnis 1:1 phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, Eggenstein, Deutschland) zugegeben und auf das Ficollmedium (Ficoll-Paque, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) pipettiert. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2500 UpM wurde anschließend der Lymphozytenring (buffy coat) mit einer Pasteurpipette geerntet. Die gewonnenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in RPMI oder AIM-V resuspendiert.

2.4 Kryopräservation und Lagerung von humanen T-Lymphozyten

Die durch die Lymphozytapheresen gewonnene Zellsuspension wurde direkt in sterile einfriertaugliche Beutel (maximal 60 ml pro Beutel) aufgefangen. Bis zum Ende der Apheresen wurden die einzelnen Beutel zunächst auf Eis gelagert. Vor dem Einfrieren wurde die absolute Zellzahl der separierten Lymphozyten pro Beutel mit einem Zellzähler (Model ZF, Coulter Electronics GmbH, Krefeld, Deutschland) bestimmt. Für die in vitro Untersuchungen wurde ein kleiner Teil der gewonnenen Zellsuspension in Aliquots (Cryotubes 1,8 ml, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) in einer Konzentration von maximal 5x10^6 Zellen pro ml aufgeteilt.
Unter sterilen Bedingungen wurde 4° Celsius kaltes Einfriermedium in einem Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Das Einfriermedium bestand zu 65% aus serumfreien Medium (AIM-V, Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland),

10% Dimethylsulfoxid (DSMO, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 25% Plasmaexpander (PLA, Gelifundol^{R}, Biotest, Dreieichen, Deutschland).
Die Beutel wurden mit einem Beutelschweißgerät (BSG-100, Cryoson, Schöllkrippen, Deutschland) luftdicht verschlossen und in Aluminiumkassetten (ST-100 Kassetten, Cryoson) gelegt. Zusammen mit den Aliquots wurden die Beutel mit einem Cryoson-Einfrierapparat (Cryoson BV-25 Bildschirm orientierter programmierbarer biologischer Einfrierautomat, Firma Cryoson GmbH, Schöllkrippen, Deutschland) nach einem vorgegebenen Lymphozyten-Einfrierprotokoll innerhalb einer Stunde auf -100° Celsius tiefgefroren. Anschließend wurden diese sofort in einen Flüssigstickstoff enthaltenden Behälter (Cryoson Gefrierbehälter Typ BSR-390) überführt.

2.4.1 Auftauprotokoll

Pro Versuchsansatz (Kultur, Durchflusszytometrische Analysen, Lymphozytenstimulationstest, PCR) wurden drei Aliquots pro Patient aufgetaut. Diese wurden für ungefähr 5 Minuten in ein 40° Celsius warmes Wasserbad (Kottermann, Deutschland) gestellt, bis die Zellsuspension einen flüssigen Zustand erreichte. Die Flüssigkeit wurde dann mittels einer Pasteurpipette in kaltes Medium (4° Celsius, 75% AIM-V, 25% PLA) überführt und 15 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute in einer 4° Celsius vorgekühlten Zentrifuge (Sigma 4K10) zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellsuspension noch zweimal mit einer Lösung aus 90% AIM-V und 10% PLA gewaschen.

2.4.2 Messung der Viabilität und Recovery

In einmonatigen Abständen wurden Aliquots der gewonnenen Zellsuspensionen aufgetaut und die Viabilität und Recovery untersucht.
Die Viabilität der Lymphozyten wurde mittels Trypanblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) unter einem Lichtmikroskop (Standard25, Zeiss) bestimmt. Dabei wurden 20 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen und 20 µl Trypanblau hinzu gemischt. Unter dem Lichtmikroskop wurden 100 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz der nicht blau gefärbten Zellen bestimmt.
Die Recovery wurde aus dem Verhältnis zwischen viablen Zellen nach dem Auftauen und der Anzahl der Zellen vor dem Einfrieren errechnet:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{Zellzahl nach dem Auftauen x \% Viabilität}}{\text{Zellzahl vor dem Einfrieren}}$$

2.5 Langzeit-Kultur

Die nach dem Auftauen oder durch die Dichtegradientenseparation (HIV negativer Kontrollprobanden) gewonnenen Zellen wurden in einer Zellzahl von $0{,}5 \times 10^6$ Zellen pro ml für die Kultur eingesetzt. Diese wurden in eine Kulturflasche (25 cm^3 Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegeben. Es wurden 9 ml AIM-V und 1 ml hitzeinaktiviertes menschliches AB-Serum (Blutbank Springe, Deutschland) hinzugefügt. Zur Vorstimulation wurden 100 µl Phythaemagglutinin (PHA, Sigma) in einer Konzentration von 1 mg pro ml zu der Kultur gegeben und anschließend für 72 Stunden bei 37° Celsius und 8% CO_2 vorinkubiert (Brutschrank Heraeus Instruments). Nach der Inkubation wurde 100 µl humanes rekombinantes Interleukin-2 (Blutbank Springe, Deutschland) in einer Konzentration von 25 U/ml hinzugegeben. Im Abstand von höchstens drei Tagen wurden die Kulturen lichtmikroskopisch überprüft und je nach Bedarf Kulturmedium, AB-Serum oder Interleukin-2 hinzu gegeben. Ein Füllungsvolumen von 20 ml pro Kulturflasche wurde nicht überschritten und der Überschuß nach guter Durchmischung verworfen. Nach 14 Tagen wurde die Kultur schließlich abgebrochen. Es wurde die Gesamtzellzahl mit dem Zellzähler und die Viabilität mittels Trypanblau bestimmt.

2.5.1 Bestimmung der Proliferationsrate

Es wurde eine Anfangszellzahl von $0{,}5 \times 10^6$ Zellen pro ml und ein Anfangsvolumen von 10 ml pro Kultur eingesetzt (A=Anfangsvolumen). In den vierzehn Tagen Kulturdauer wurde neues Kulturmedium hinzugegeben (C = zugegebene Volumenmenge) und / oder Kulturmedium verworfen (B = entnommene Volumenmenge). Pro Kulturversorgung ergab sich so ein Faktor (F1, F2, F3...) aus folgender Formel: Anfangsvolumen minus entnommenen Volumen plus zugegebener Volumenmenge geteilt durch Anfangsvolumen minus entnommenen Volumen:

$$\text{Faktor (F1, F2, F3....)} = \frac{(A - B + C)}{(A - B)}$$

Der Endfaktor ergibt sich aus der Multiplikation aller so errechneten Faktoren (F1xF2xF3....).

Die Proliferationsrate pro Tag errechnet sich schließlich aus folgender Formel: Zellzahl pro ml nach Kultur geteilt durch die Angangszellzahl pro ml

($0{,}5 \times 10^6$ Zellen / ml) vor Kultur mutlipliziert mit dem Endfaktor. Die End-proliferationsrate wurde auf 14 Tage hochgerechnet:

$$\text{Proliferationsrate (14 Tage)} = \frac{\text{Zellzahl/ml nach Kultur}}{\text{Zellzahl/ml vor Kultur}} \times \text{Endfaktor} \times 14$$

2.6 Lymphozytenstimulationstest / Proliferationsassay

Ein Teil der nach dem Auftauen und nach Kultur gewonnenen Zellen wurde in Kurzzeitstimulationstests eingesetzt. Auf einer Flachbodentiterplatte (96well, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurde eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro ml eingesetzt und diese in einem Milliliter AIM-V pro well aufgenommen. Folgende Mitogene wurden pro well hinzugegeben: Phythämagglutinin (PHA), Pokeweed Mitogen (PWM) und Concanavalin A (Con A). Zudem wurde Interleukin-2 und eine Kombination von PHA mit IL-2 pro well eingesetzt. Die Konzentration der Mitogene betrug 4µg / ml und von IL-2 250 U/ml. Als Kontrolle dienten eingesetzte autologe Lymphozyten mit der gleichen Zellzahl jedoch ohne Zugabe eines Mitogens oder Zytokins (Leerwert). Alle Bestimmungen erfolgten dreifach. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37° Celsius und 8% CO_2 für drei Tage inkubiert. Sechzehn Stunden vor der Zellernte wurde tritium-markiertes Thymidin (^{3}H-Thymidin) dazugegeben. Schließlich wurden die Zellen auf eine Glasfiberfilter-scheibe geerntet und die Zellen, die ^{3}H-Thymidin inkorporiert hatten, mit einem Szintillationszähler gemessen.

Aus den drei gemessenen Werten pro Mitogen bzw. Zytokin wurde ein Mittelwert errechnet. Der Stimulationsindex wurde schließlich aus dem Verhältnis des Mittel-wertes der Anzahl der ^{3}H-Thymidin inkorporierenden Zellen pro Mitogen zu der Anzahl der Zellen ohne Mitogen errechnet:

$$\text{Stimulationsindex} = \frac{\text{Anzahl der } ^3\text{H-Thymidin inkorporierenden Zellen / Mitogen}}{\text{Anzahl der } ^3\text{H-Thymidin inkorporierenden Zellen ohne Mitogen}}$$

2.7 Phänotypisierung von PBMC durch die Durchflusszytometrie

Die immunologische Phänotypisierung von Leukozyten erfolgte durch die Färbung mit verschiedenen direkt oder indirekt Fluorescein-isothiocyanat- (FITC), Phyco-erythrin- (PE) oder Peridin chlorophyll-a protein complex- (PerCP) konjugierten monoklonalen Antikörpern (mAk), die gegen die cluster of differentiation (CD) An-tigene gerichtet sind. Die Analysen wurden mit einem Durchflusszytometer

(FACScan) der Firma Becton and Dickinson, Heidelberg, Deutschland durchgeführt.

Die Leukozyten Subpopulationen vor und direkt nach, 1 Stunde, 3 Stunden, 24 Stunden, 7 Tage nach Lymphozytapherese sowie die im Rahmen der Verlaufskontrollen der HIV positiven Patienten durchgeführten immunologischen Untersuchungen wurden mit der FACScan Simulset Software (Becton and Dickinson) analysiert. Dies ist ein Software Programm der Version 2.3.2, das Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen durch die Lichtstreuung sowie CD4-Zellen, CD8-Zellen, aktivierte T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) mittels entsprechender Antikörper (alle von Becton and Dickinson) differenziert. Für diese Analysen wurde Vollblut eingesetzt und dieses zunächst für 15 Minuten mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde eine Lysesuspension für 10 Minuten hinzu gegeben und die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden schließlich zweimal in PBS gewaschen und sofort mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Die nach dem Auftauen und nach Kultur gewonnenen Zellen wurden mit der Software Lysis II (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Hierbei wurden die Lymphozyten von den gesamten Zellen (tote Zellen, Granulozyten, Makrophagen) durch „gating“ im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht getrennt und nur diese Population weiter analysiert.

Für diese FACScan-Analysen wurde eine Zellzahl von $1x10^6$ pro ml und Färbung eingesetzt. Es wurden verschiedene Antikörper von folgenden Firmen verwendet: CD3+, CD4+, CD8+, CD7+, CD11b+, CD19+, CD34+, und HLA-DR von Becton und Dickinson; S6F1, TIA-1 und Anti-Mouse Antikörper von Coulter Electronics GmBH; CD59 von Monosan (Am Unden, Niederlande), CD55 von Wako Chemicals (Neuss). Diese wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt:

Zweifachfärbungen: Erster FITC-, zweiter PE- konjugierter monoklonaler Antikörper (mAk) gerichtet gegen folgende Antigene:

CD8 / CD4
HLA-DR / CD34
CD19 / CD34
CD8 / S6F1
CD3 / CD25

Zu den Zellen wurden jeweils 10 µl der Antikörpersuspension gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

Dreifachfärbungen: Erster FITC-, zweiter PE-, dritter PerCP- konjugierter mAk gerichtet gegen folgende Antigene:

CD55 / CD8 / CD4
CD59 / CD8 / CD4
CD7 / CD8 / CD4
CD8 / CD11b / CD4
CD7 / HLA-DR / CD4
CD7 / HLA-DR / CD8

Es wurden wieder 10 µl der Antikörpersuspension, für den PerCp- konjugierten Antikörper jedoch 15 µl zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend wurde genau wie oben beschrieben vorgegangen.

Die gegen die CD55 und CD59 gerichteten Antikörper waren nicht mit den gängigen Farbstoffen für FACScan-Analysen konjugiert. Sie wurden deshalb indirekt mittels eines FITC markierten Anti-Mouse-Antikörper vom Typ IgG1 gefärbt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 50 µl der CD55 Antikörpersuspension vom Typ IgG1 in einer Verdünnung von 1:100 und mit 100 µl der CD59 Antikörpersuspension vom Typ IgG1 in einer Verdünnung von 1:50 für 30 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde von der Anti-Mouse-Antikörper Suspension (Verdünnung 1:50) jeweils 50 µl hinzu gegeben, wieder für 30 Minuten inkubiert und zweimal gewaschen. Jetzt wurden die PE- und PerCP-konjugierten Antikörper wie im oben genannten Verfahren hinzu gegeben und weiter behandelt.

Intrazelluläre Färbung: Erster FITC-, zweiter PE- konjugierter mAk gerichtet gegen folgende Antigene:

TIA-1 / CD4
TIA-1 / CD8

Zunächst ging man wie bei den Zweifachfärbungen vor und die Zellen wurden mit PE-konjugierten mAk gegen CD4 und mit FITC- konjugierten mAk gegen CD8 gefärbt. Diese mAk sind jedoch vom Typ IgG2a und es wurden 100 µl in einer Verdünnung von 1:100 für den gegen CD4 gerichteten und 1:75 für den gegen CD8 gerichteten Antikörper zu den Zellen gegeben. Diese wurden für 20 Minuten inku-

biert und zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 2 ml einer 1%iger Paraformaldehydlösung hinzu gegeben und die Zellen für 24 Stunden bei 4°Celsius fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 0,2% BSA-Lösung in PBS und einmal mit 0,6% Saponin-Lösung in PBS gewaschen (Membranpermeabilisierung). Der intrazelluläre mAk gegen TIA-1 vom Typ IgG1 wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 50 µl auf die Zellen gegeben. Dies wurde für 50 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit der 0,6%igen Saponin-Lösung gewaschen. Dann wurden 50 µl der IgG1 Anti-Mouse-Antikörper Suspension (dem Äquivalent entsprechend FITC oder PE markiert) in einer Verdünnung von 1:50 hinzu gegeben, für 50 Minuten inkubiert, zweimal mit der 0,2%igen BSA-Lösung gewaschen und in 1%iger Paraformaldehydlösung fixiert.

2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zu den Zeitpunkten vor und drei Stunden nach Lymphozytapherese wurde bei acht Patienten zusätzlich heparinisiertes Blut entnommen. Die PBMC wurden über einen Dichtegradienten (wie weiter oben beschrieben) isoliert und anschließend kryopräserviert. Die Zellen wurden dann zu einem gemeinsamen Zeitpunkt aufgetaut, gewaschen und auf provir
ale DNA untersucht. Dies gelang mit der Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR).

1. Isolierung der DNA aus Lymphozyten: Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zu 1 x 10^6 Zellen wurden 500 µl Lysis-Puffer A gegeben. Hiervon wurden 50 µl (10^5 Zellen) und 5 µl (10^4 Zellen) entnommen. Schließlich wurde zu weiteren 5 µl aus der ersten Verdünnung 495 µl Lysis-Puffer A gegeben. Davon wurden wieder 50 µl (10^3 Zellen) und 5 µl (100 Zellen) entnommen. Diese Zellen und weitere 1 x 10^6 Zellen wurden zentrifugiert und in 50 µl Lysis-Puffer A resuspendiert. So entstand eine Verdünnungsreihe von 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 und 100 Zellen. Dann wurde jedem Verdünnungsröhrchen 1000 µl Lysis-Puffer B und 30 µl Proteinkinase K (0,1 mg / ml) hinzu gegeben. Nach der Inkubation bei 56° Celsius für 2 Stunden wurde bei 95° Celsius (10 Minuten) die Proteinkinase K inaktiviert. Die hierdurch isolierte DNA wurde dann durch die folgenden PCR Methoden amplifiziert. (Lysis-Puffer A: 100mM KCl, 10mM Tris, pH 8,3, 2,5mM $MgCl_2$; Lysis-Puffer B: 10mM Tris, pH 8,3, 2,5mM $MgCl_2$, 1% Tween 20, 1% NP-40).

2. rT-PCR (reverse Transkription): Zu 10 µl der nach Isolierung gewonnenen DNA-Proben wurden 10 µl der PCR-Suspension (50 U / ml Tag-Polymerase (Perkin-El-

mer-Cetus, Norwalk, USA), 0,4 mM Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's), 10 mM Tris (pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,01% Gelantine) und 50 pM der 3'-V3Not und 5'-V3Not Primer (Wolfs et al., 1991) gegeben.

Die Proben wurden mit einem Tropfen Öl (Sigma, St. Loius, USA) bedeckt und anschließend in den Thermoblock gestellt. Es wurden 30 Zyklen mit folgenden Abläufen durchgeführt: Denaturierung bei 94° Celsius für 1,5 Minuten, Primer-Bindung durch Abkühlung (Annealing) auf 50° Celsius für 1,5 Minuten und schließlich DNA-Synthese bei 72° Celsius (Elongation) für 3 Minuten.

3. Hybridisierung / nested PCR: Es wurde zu 1 µl der spezifisch amplifizierten DNA Fragmente 10 µl der 2.PCR-Suspension gegeben: Die hier verwendeten Primer: 5' Primer: SK38 (Ou et al, 1988), T1 (Meyerhans et al., 1989), HP1, Oram1 (Oram et al., 1991) und 5'-V3NOT (Wolfs et al., 1991); 3' Primer: SK39, T2, HP2, 3'-V3NOT, Oram4 (Hufert et al., 1989). Die nPCR erfolgte in 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94° Celsius für 1,5 Minuten, Annealing mit 58° Celsius für 1 Minute und Elongation bei 72° Celsius für 2 Minuten.

Kontrollen: Als Negativkontrollen dienten Pufferkontrollen ohne DNA-Gehalt und 10^3 nicht HTLVIIIb-infizierte H9 Zellen (Hufert et al., 1991), um eine Kontamination der Reagenzien mit HIV-1 DNA auszuschließen. Als Positivkontrolle diente die DNA von 10^3 HTLVIIIb-infizierten H9 Zellen. Zudem wurde die PCR auch an ACH-2 Zellen durchgeführt (Folks et al., 1989). Diese Zell-Linie trägt ein virales Genom pro Zelle und wurde in verschiedenen Verdünnungsreihen in die PCR eingesetzt. Die PCR Produkte wurden anschließend durch die Elektrophorese auf einem Agarosegel ausgewertet. Die Anzahl der Zellen, die das Virusgenom integriert hatten, wurde schließlich auf die Anzahl der CD4+ Zellen im peripheren Blut adjustiert. Durch den Vergleich mit den bekannten Virusgehalt der ACH-2 Zellen in den Verdünnungen, konnte eine semi-quantitative Auswertung erfolgen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Lymphozytapherese

Die folgenden Ergebnisse werden zeigen, daß die einzelnen Lymphozytapheresen von den HIV+ Patienten gut vertragen wurden. Es traten keine klinischen Nebenwirkungen oder Gerinnungsstörungen während oder nach den Apheresen auf. Zwischen den Lymphozytapheresen wurde ein Abstand von mindestens zwei Wochen eingehalten, um so die Erholung der Laborparameter auf Normwerte zu gewährleisten. In zwei Fällen lag der Abstand allerdings nur bei einer Woche, was aber durch die frühzeitige Normalisierung der Laborparameter und dem guten Gesundheitszustand der Patienten zugelassen werden konnte.

Insgesamt wurden bei 13 HIV-positiven Patienten 37 Lymphozytapheresen durchgeführt. In einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden wurde ein durchschnittliches Gesamtvolumen von 5368,65 ml (±1651,51 ml) prozessiert und insgesamt 164 einfriertaugliche Beutel mit einem mittleren Volumen von 267,16 ml (±94,86 ml) gewonnen. Diese enthielten im Schnitt 6,16 x 10^9 (±2,64 x 10^9) Leukozyten, mit einem Lymphozytenanteil von 60-95 %. Die Kontamination durch Monozyten und Granulozyten betrug 5-40 %. Bei der Subpopulationsanalyse dieser Zellfraktionen zeigte sich, daß im Mittel 1,73 x 10^9 (±0,91 x 10^9) CD4+ und 3,15 x 10^9 (± 1,3 x 10^9) CD8+ Lymphozyten isoliert werden konnten.

Die CD4 / CD8 Ratio in den gewonnenen Zellkonzentraten betrug im Mittel 0,535 (±0,144) und reflektierte die Verteilung dieser Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut vor den jeweiligen Zellseparationen. Darüber hinaus befand sich ein Anteil von 10,898 x 10^6 (±6,072 x 10^6) CD34+ peripheren Progenitorzellen in den Isolaten. Diese Zellen entsprechen phänotypisch frühen T-Vorläuferzellen (CD34+, HLA-DR+, CD7+, CD19-, CD4-, CD8-). Diese Daten sind für die einzelnen Patienten in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Absolute Werte und Subpopulationen der durch die Lymphapherese an HIV+ Patienten gewonnenen Zellen

Patient	Prozessiertes Gesamt-volumen (ml)	Gewonnenes Volumen (ml)	Gesamt-zellzahl ($x10^9$)	CD4+ Zellen ($x10^9$)	CD8+ Zellen ($x10^9$)	CD34+ Zellen ($x10^6$)
1	4700	240	10,3	1,8	1,4	n.g.
1	5700	300	9,2	3,1	5,4	n.g.
1	4750	240	4,4	0,7	5,0	n.g.
2	4240	180	6,1	1,4	2,0	n.g.
2	5230	250	7,9	n.g.	n.g.	n.g.
2	7200	420	8,3	2,3	3,9	19,9
3	6000	300	5,6	1,3	3,4	7,8
3	7900	360	6,7	1,4	3,7	11,4
3	3600	150	5,3	1,1	3,0	n.g.
4	5000	300	4,9	1,5	2,0	7,3
4	5960	300	4,7	1,2	2,1	n.g.
4	7950	420	7,4	2,3	3,2	20,0
5	5330	240	7,7	n.g.	n.g.	n.g.
6	7200	360	4,2	1,3	2,0	8,9
6	7500	420	6,1	2,0	2,7	7,3
6	7100	420	5,5	1,7	2,6	6,1
7	2500	120	2,6	0,7	1,4	n.g.
8	5300	300	7,9	3,6	4,0	n.g.
8	5300	300	6,8	2,4	3,4	18,3
8	6200	300	7,9	2,7	4,4	16,6
9	4750	240	5,2	1,6	3,4	11,4
9	2040	150	1,8	n.g.	n.g.	1,6
9	2870	120	1,8	0,6	1,0	2,9
9	2360	60	1,2	0,4	0,6	n.g.
10	5920	300	5,9	1,2	2,5	3,5
10	5910	300	7,7	1,9	4,1	12,3
10	4840	225	7,1	1,8	4,2	10,6
11	8000	420	14,2	4,1	5,0	18,4
11	6000	280	7,2	1,9	4,0	10,0
11	6570	240	6,9	2,1	4,3	14,7
11	7300	360	10,8	3,6	5,7	17,3
12	7550	300	5,2	1,1	3,7	n.g.
12	3700	180	3,1	0,6	1,7	2,2
12	2880	120	2,3	0,5	1,3	2,8
13	4760	250	7,4	1,5	2,8	n.g.
13	3330	120	3,9	n.g.	n.g.	n.g.
13	5200	300	6,9	2,1	4,2	19,4
Mittel-werte	5369 (±1651,5)	267 (±94,86)	6,2 (±2,64)	1,7 (±0,91)	3,2 (±1,3)	10,9 (±6,07)

3.1.1 Verlauf der peripheren Lymphozyten

Die peripheren Lymphozyten fielen unmittelbar nach den Lymphozytapheresen deutlich im Vergleich zum Vorwert ab. Die absolute Anzahl der im Blut zirkulierenden Lymphozyten lag vor den Apheresen im Mittel bei 1672 pro µl (±565 pro µl), relativ bei 30% (±7,7%). Unmittelbar nach den Lymphozytapheresen lag dieser Wert absolut bei 1304 pro µl (±440 pro µl) und relativ bei 26% (±8,5%). Innerhalb einer Stunde nach der Separation erreichten die Werte wieder den Ausgangswert (absolut bei 1734,8 pro µl (±417 pro µl) und relativ bei 30% (±6,39%)) und zeigten nach drei Stunden sogar leicht höhere Werte. Nach 7 Tagen hatten sich die Werte wieder normalisiert (absolut bei 1743 pro µl (±576 pro µl) und relativ bei 31% (±9,1%)). Siehe dazu die Abbildungen 1 und 2.

Diese Phänomene werden ebenfalls nach Plasmapherese, Routineleukapherese und Thrombozytapherese beobachtet und können durch den unmittelbaren Ausgleich von entnommenen Zellen aus dem Marginalpool erklärt werden. Da sich nur etwa 2 % der Gesamtlymphozyten im peripheren Blut befinden und der restliche Teil sich auf die lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz, Leber, Knochenmark, etc.) verteilt, werden diese Zellen aus den Geweben ausgeschüttet um den Anteil der Zellen im peripheren Blut, im Sinne eines hämostatischen Gleichgewichts, aufrecht zu erhalten. Nach einiger Zeit kommt es zu einem leichten Überschuß an Zellen im Vergleich zum Vorwert (Rebound-Phänomen), der aber dann durch Rückkehr der Zellen in die Gewebe normalisiert wird.

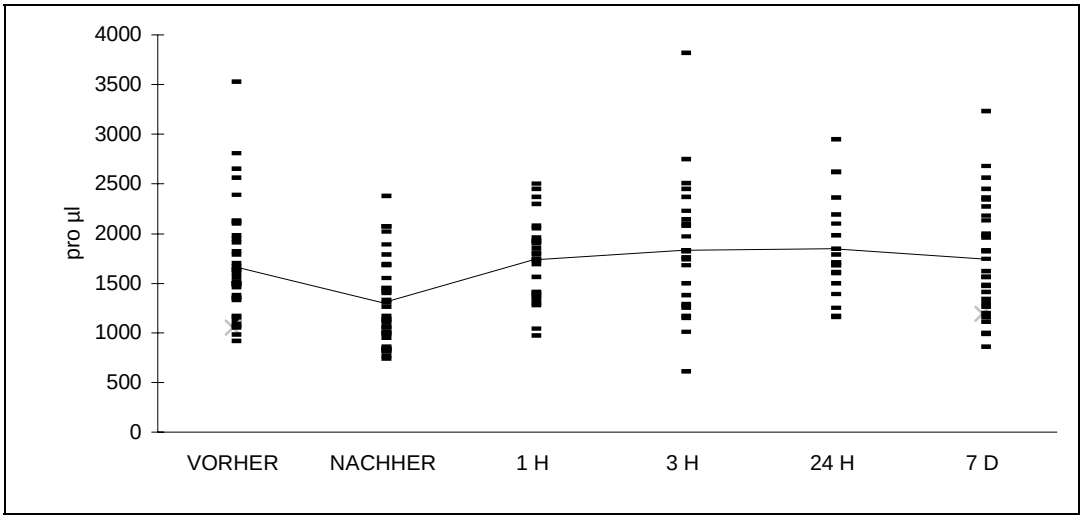

Abbildung 1: Verlauf der absoluten Anzahl der peripheren Lymphozyten

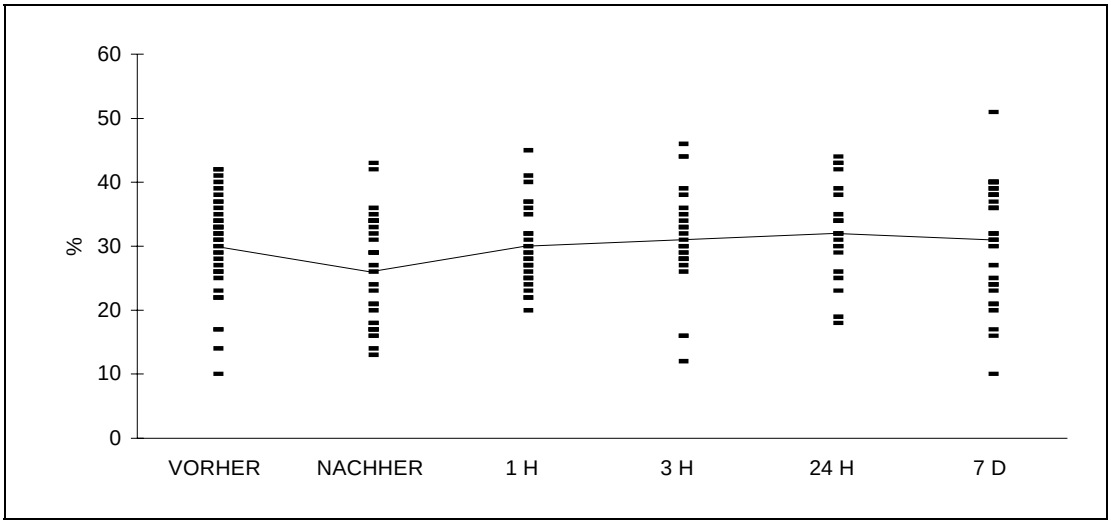

Abbildung 2: Verlauf des relativen Anteils der peripheren Lymphozyten

3.1.2 Verlauf der CD4+ Zellen

Die absolute Zellzahl der CD4+ Zellen betrug vor den Lymphozytapheresen im Mittel 477 pro µl (±200,31 pro µl). Nach den Apheresen lag die absolute Zellzahl bei 379 pro µl (±141 pro µl). Eine Stunde nach den Lymphozytapheresen hatte sich die Zellzahl wieder normalisiert und lag bei 500 pro µl (±131,23 pro µl). 3 Stunden danach wurden 542 pro µl (±216,34 pro µl), nach 24 Stunden 478 pro µl (±193 pro µl) und nach 7 Tagen 492 pro µl (±223 pro µl) gemessen. Siehe dazu Abbildung 3.

Die relative CD4-Zellzahl lag zu Beginn im Mittel bei 28,6% (±6,9%), stieg unmittelbar nach den Apheresen auf 29,2% (±6,7%). Nach 1 Stunde wurden 30,4% (±8,3%) und 3 Stunden danach 31,3% (±7,9%) gemessen. Nach 24 Stunden sank der Wert auf 24,4% (±6,5%) und nach 7 Tagen lag er dann bei 28,5% (±7,32%). Siehe dazu Abbildung 4.

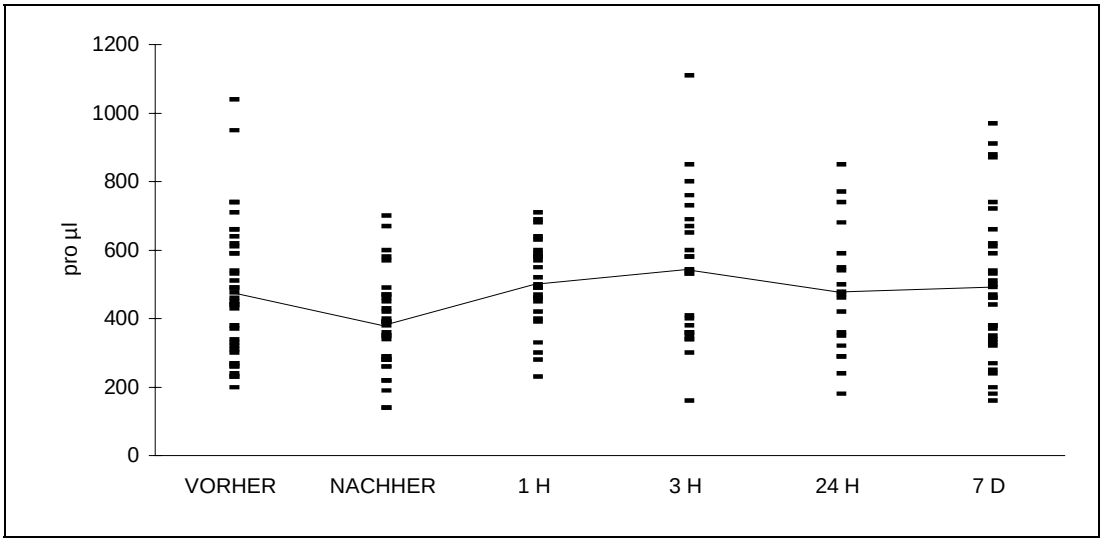

Abbildung 3: Verlauf der absoluten Anzahl der CD4+ Zellen

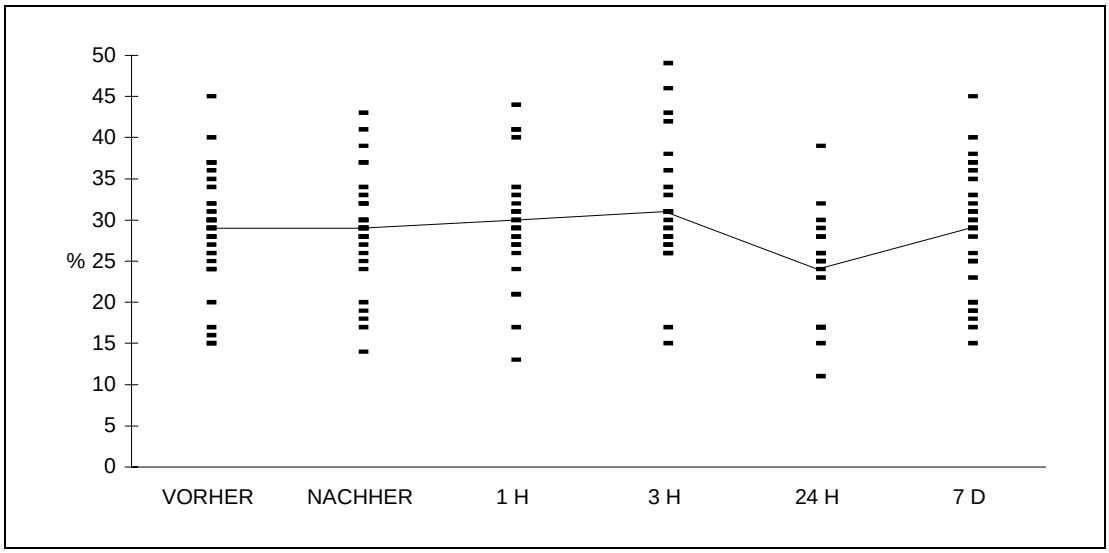

Abbildung 4: Verlauf des relativen Anteils der CD4+ Zellen

3.1.3 Verlauf der CD8+ Zellen

Die absolute Zellzahl der CD8+ Zellen lag im Mittel vor den Lymphozytapheresen bei 949 pro µl (±360,6 pro µl) und nach Apherese bei 741 pro µl (±296 pro µl). Schon nach einer Stunde stieg der Wert auf 974 pro µl (±367 pro µl) und nach 3 Stunden auf 1110 pro µl (±460 pro µl). Nach 24 Stunden fiel er leicht ab auf 1014 pro µl (±394 pro µl). Nach 7 Tagen wurden dann 997 pro µl (±422 pro µl) gemessen. Siehe dazu Abbildung 5.

Der relative Anteil der CD8-Zellen lag vor den Apheresen bei 55,6% (±8,6%), reduzierte sich nach den Apheresen auf 54,9% (±8,5%), stieg nach 1 Stunde wieder auf 55,5% (±9,3%) und 3 Stunden danach weiter auf 57,4% (±9,9%). Nach 24 Stunden lagen die CD8-Zellen bei 55,6% (±7,4%) und nach 7 Tagen wurden 54,1% (±8,3%) gemessen. Siehe dazu Abbildung 6.

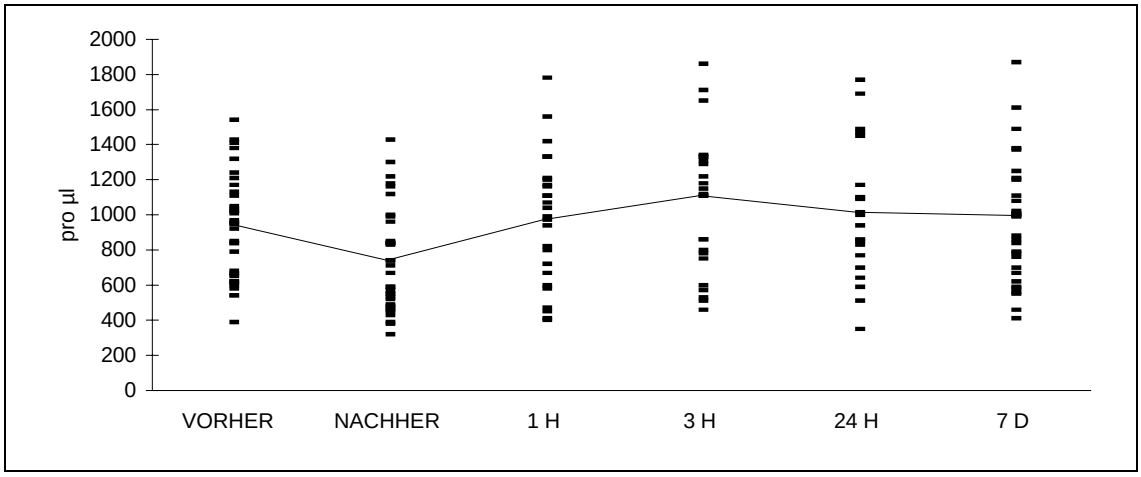

Abbildung 5: Verlauf der absoluten Anzahl der CD8+ Zellen

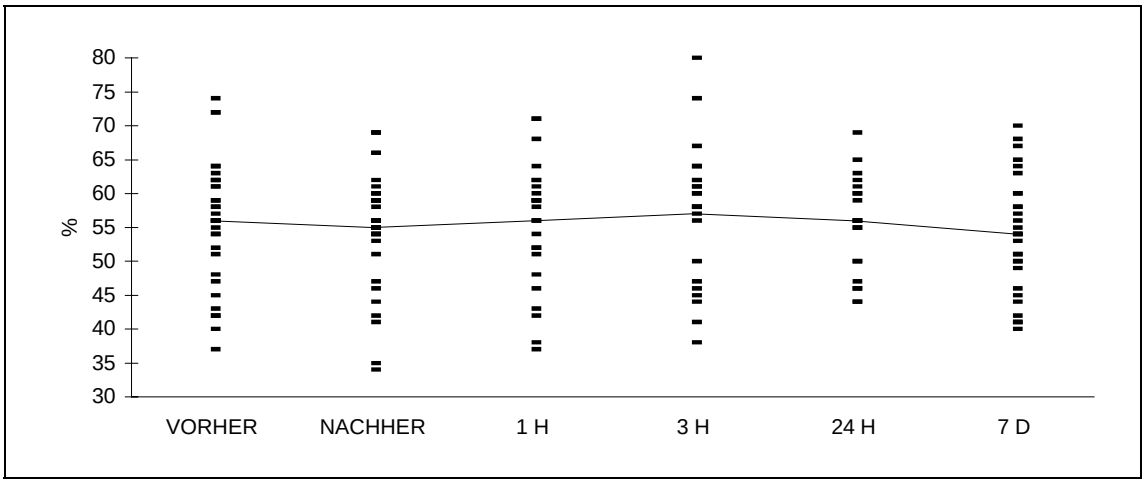

Abbildung 6: Verlauf des relativen Anteils der CD8+ Zellen

3.1.4 Verlauf der CD4/CD8 Ratio

Die CD4/CD8 Ratio änderte sich im Verlauf der Lymphozytapheresen nicht wesentlich. Im Mittel lag der Ausgangswert vor den Apheresen bei 0,523 (±0,18), danach bei 0,546 (±0,19), nach 1 Stunde bei 0,561 (±0,23), nach 3 Stunden bei 0,558 (±0,19), nach 24 Stunden bei 0,453 (±0,152) und 7 Tage danach bei 0,538 (±0,19). Siehe dazu auch Abbildung 7.

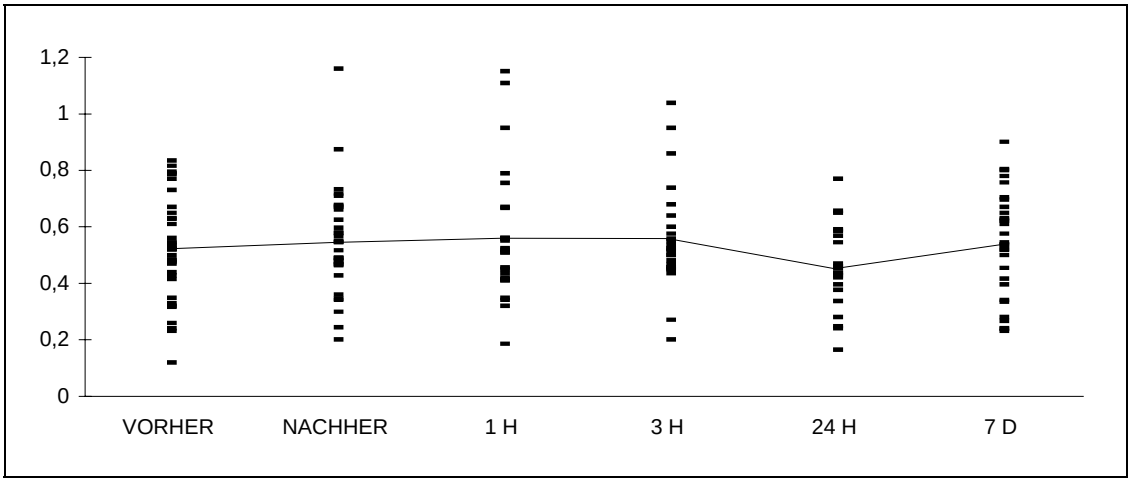

Abbildung 7: Verlauf der CD4/CD8-Ratio

3.1.5 Verlauf der Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl lag im Mittel vor den Apheresen bei 200 x 10^4 pro µl (±57 x 10^4 pro µl) und sank danach auf 134 x 10^4 pro µl (±36 x 10^4 pro µl). Nur langsam stiegen die Werte wieder an und lagen nach 1 Stunde bei 140 x 10^4 pro µl (±35,6 10^4 pro µl), nach 3 Stunden bei 147 x 10^4 pro µl (±39,8 x 10^4 pro µl) und nach 24 Stunden bei 150 x 10^4 pro µl (±47,1 x 10^4 pro µl). 7 Tage später erholten sich die Werte schließlich und lagen im Mittel wieder bei 204 x 10^4 pro µl (±53,5 x 10^4 pro µl). Siehe dazu Abbildung 8.

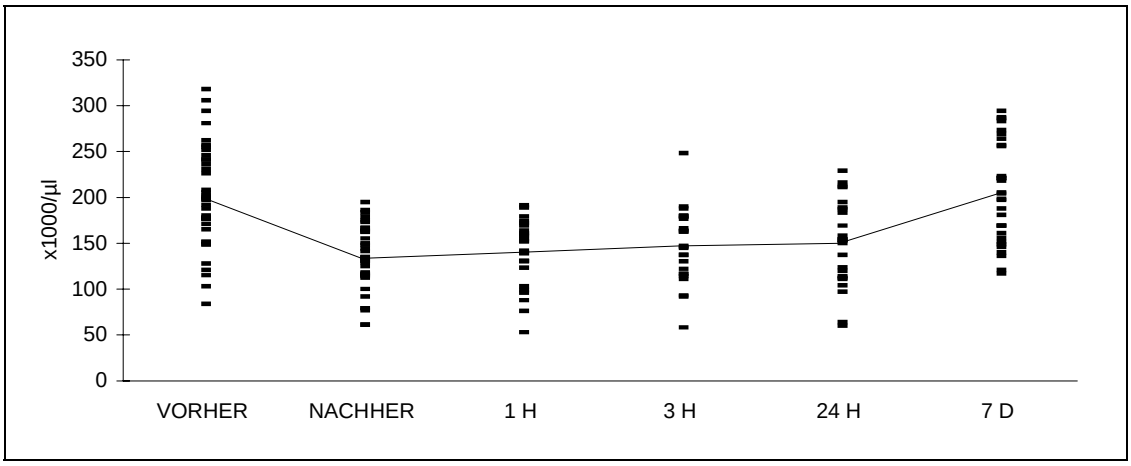

Abbildung 8: Verlauf der Thrombozyten

3.1.6 Verlauf der Leukozyten und Erythrozyten

Der Anteil der Leukozyten im Blut lag vor den Lymphozytapheresen im Mittel bei 5,9 x 10^9 / l (±1,8 x 10^9 / l) und sank danach auf 5,3 x 10^9 / l (±1,4 x 10^9 / l). Die Leukozyten stiegen nach 1 Stunde auf 6,03 x 10^9 / l(±1,9 x 10^9 / l) und nach 3 Stunden auf 6,09 x 10^9 / l (±1,49 x 10^9 / l). Nach 24 Stunden sanken die Werte auf 5,88 x 10^9 / l (±1,34 x 10^9 / l). Nach 7 Tagen lagen die Leukozyten bei 5,82 x 10^9 / l (±1,7 x 10^9 / l). Siehe dazu Abbildung 9.

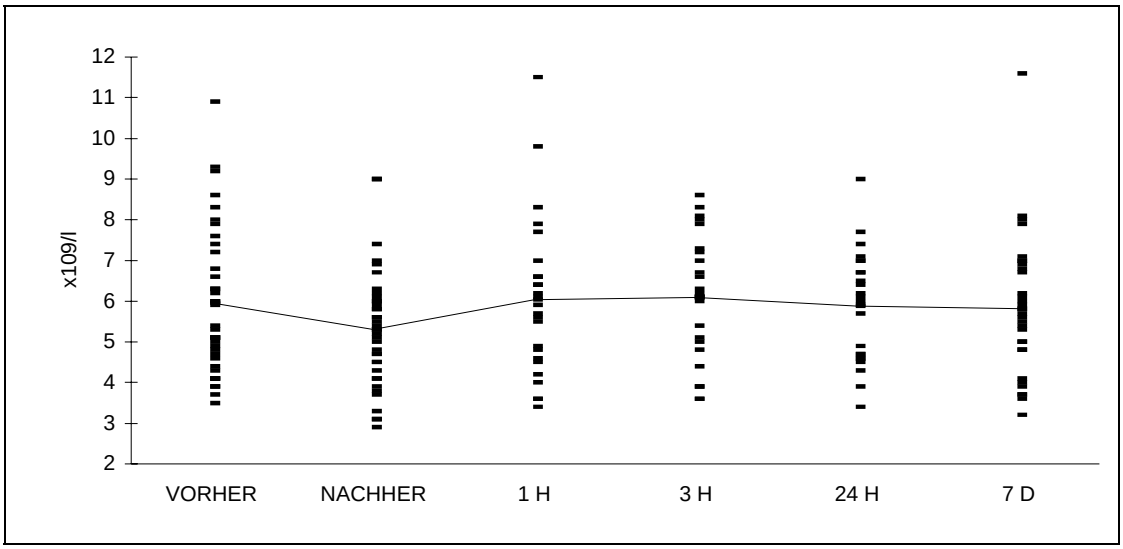

Abbildung 9: Verlauf der Leukozyten

Der Anteil der Erythrozyten im Blut lag vor den Lymphozytapheresen im Mittel bei 5 x 10^9 / l (±0,39 x 10^9 / l) und sanken danach auf 4,7 x 10^9 / l (±0,38 x 10^9 / l). Eine Stunde nach den Lymphozytapheresen stiegen die Werte wieder auf 4,77 x 10^9 / l (±0,28 x 10^9 / l), nach drei Stunden auf 4,88 x 10^9 / l (±0,24 x 10^9 / l) und 24 Stunden nach auf 4,94 x 10^9 / l(±0,23 x 10^9 / l). Nach 7 Tagen lagen die Werte bei 5,07 x 10^9 / l (±0,36 x 10^9 / l). Siehe dazu Abbildung 10.

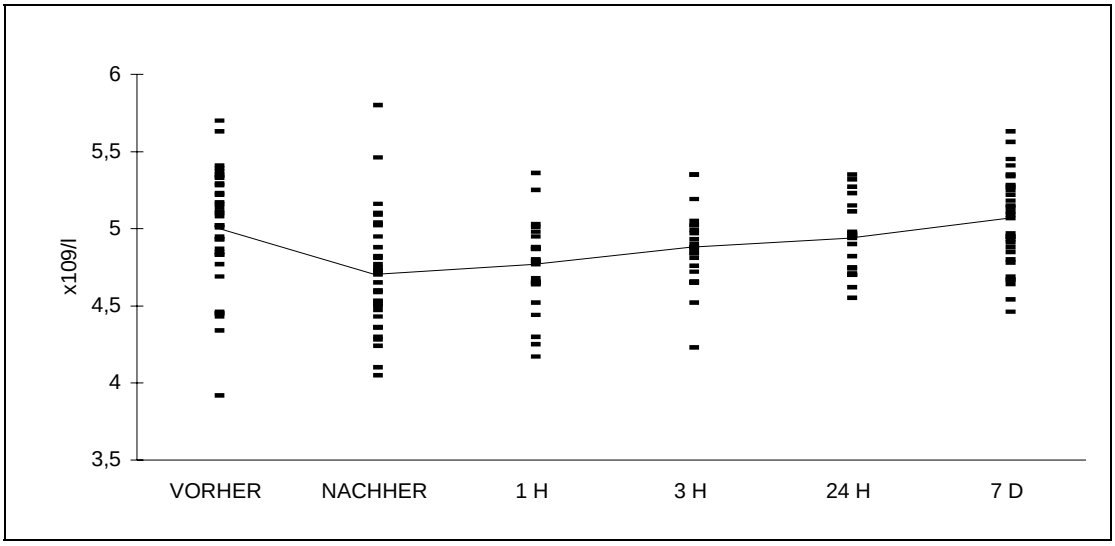

Abbildung 10: Verlauf der Erythrozyten

3.1.7 Verlauf der Granulozyten und Monozyten

Die Granulozytenzahl im Blut veränderte sich im Mittel nach den Zellseparationen folgendermaßen: sie fiel von 3825 pro µl (±1593 pro µl) auf 3746 pro µl (±1398 pro µl). Nach einer Stunde lag der Wert höher als vor den Lymphapheresen bei 3902 pro µl (±1668 pro µl), sank nach drei Stunden auf 3804 pro µl (±1248 pro µl) und nach 24 Stunden weiter auf 3568 pro µl (±1310 pro µl). Nach 7 Tagen lagen die Granulozyten bei 3779 pro µl (±1642 pro µl). Relativ gesehen lag der Granulozytenanteil vorher bei 63,5% (±8,5%) nach der Lymphozytapherese bei 68,69% (±9,3%) und sank nach einer und drei Stunden leicht ab, lag nach 24 Stunden dann bei 60,22% (±9%) und nach 7 Tagen bei 62,81% (±9,56%). Siehe dazu Abbildungen 11 und 12.

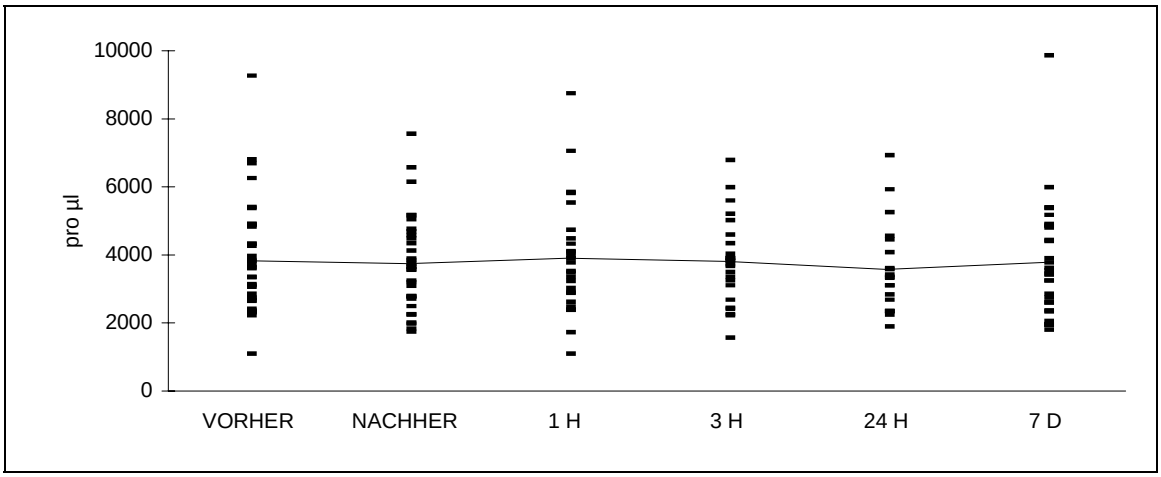

Abbildung 11: Verlauf der absoluten Anzahl der Granulozyten

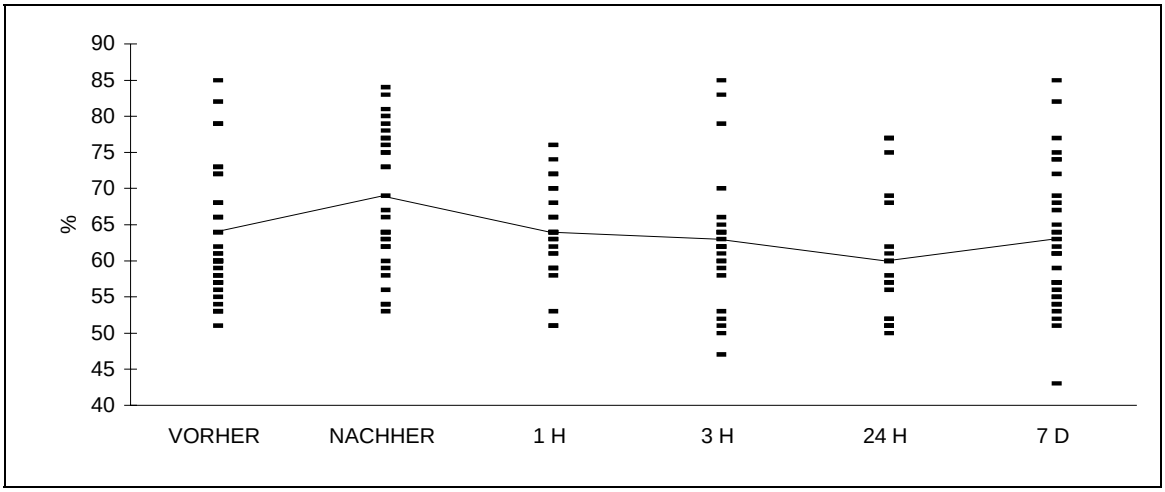

Abbildung 12: Verlauf des relativen Anteils der Granulozyten

Die Monozytenzahl lag im Mittel vor den Apheresen bei 371 pro µl (±137 pro µl), danach bei 288 pro µl (±91,1 pro µl). Eine Stunde nach den Apheresen waren die Monozyten schon wieder gestiegen und lagen nach drei Stunden bei 373 pro µl (±132 pro µl). Nach 24 Stunden waren die Monozyten im wesentlichen unverändert und lagen nach 7 Tagen bei 380 pro µl (±107 pro µl). Siehe dazu Abbildung 13.

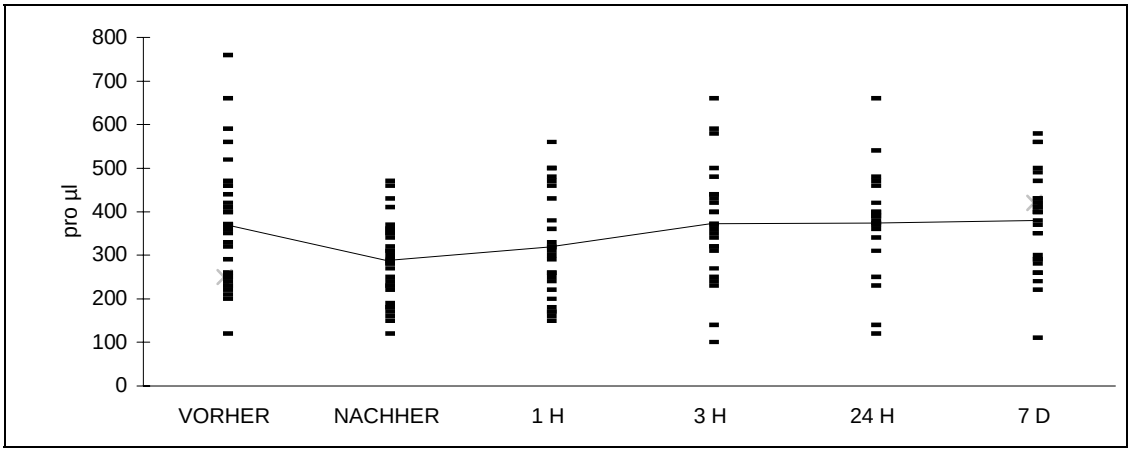

Abbildung 13: Verlauf der Monozyten

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die peripheren Blutzellen, trotz der Entnahme durch die Lymphozytapherese, rasch normalisieren und auf die gemessenen Ausgangswerte zurückkehren. Es kommt also durch das Apherese-Verfahren bei den hier gewählten HIV-infizierten Patienten, zu keinen Aktivierungen oder Verschiebungen innerhalb bestimmter Leukozytenpopulationen. Auch die Anzahl der

peripheren Thrombozyten erholte sich 7 Tage nach der Lymphozytapherese und blieb innerhalb des Beobachtungszeitraums im nicht therapiebedürftigen Rahmen.

3.1.7 Verlauf anderer Laborparameter

Die Gerinnungsparameter Quick und PTT wurden vor, direkt nach, 24 Stunden und 7 Tage nach den Lymphozytapheresen gemessen und blieben bei allen Patienten in diesem Zeitraum innerhalb der Normwerte. Unmittelbar nach der Lymphozytapherese waren bei einigen Patienten durch das zugegebene ACD-A die PTT leicht verlängert und der Quick-Wert leicht erniedrigt. Da das ACD-A schnell abgebaut wird, kam es zu keinen wesentlichen Nebenwirkungen und dadurch waren keine engmaschigeren Kontrollen nötig.

Auch die Elektrolyte Natrium und Kalium blieben in den beobachteten Zeitraum innerhalb der Normbereiche. Trotz der Verabreicherung einer Kalziumtablette während der Apheresen, sank der Kalziumwert nach den Apheresen meist in den unteren Normbereich ab. Gelegentlich berichteten die Patienten über Kribbelparästhesien perioral und über ein Taubheitsgefühl im Bereich der Finger, welches sich jedoch rasch besserte, nachdem die ACD-A Zugabe leicht verringert und Kalzium zugeführt wurde.

3.2 Polymerasekettenreaktion vor und nach Lymphpozytapherese

Da die Anzahl der virusinfizierten Zellen in den lymphatischen Geweben bei HIV-positiven Patienten wesentlich höher liegt als im peripheren Blut, sollte eine Zunahme der virusinfizierten Zellen nach den Lymphozytapheresen durch eine Umverteilung vom lymphatischen Gewebe in das periphere Blut ausgeschlossen werden.

Zu den Zeitpunkten vor und drei Stunden nach den Lymphozytapheresen wurde an acht Patienten die Polymerase-Kettenreaktion zur Quantifizierung HIV-DNA positiver Zellen durchgeführt. Der Zeitpunkt drei Stunden nach Lymphozytapherese wurde deshalb gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt bereits ein Ausgleich der peripheren Lymphozytenzahl erreicht wird. Der gemessene Anteil der HIV-DNA der positiven Zellen wurde auf die absolute Anzahl der CD4-Zellen im peripheren Blut bezogen. Vor Lymphozytapherese lag das Verhältnis der virusinfizierten zu nicht virusinfizierten CD4-Zellen zwischen $1:10^3$ und $1:10^6$. Drei Stunden nach den Lymphozytapheresen konnte keine Zunahme dieses Verhältnisses ermittelt werden. Nach den Lymphozytapheresen kam es bei diesen

acht Patienten also nicht zu einer Erhöhung des Anteils virusinfizierter CD4+ Zellen, obwohl diese Zellen wahrscheinlich aus dem lymphatischen Gewebe ersetzt wurden.

Die als Positivkontrolle eingesetzte ACH-2 Zell-Linie mit dem bekannten Virusgehalt von einem Virusgenom pro Zelle, zeigte auch bei einer Verdünnung von 10 Zellen noch ein positives Signal. Hierdurch konnte die Sensitivität unserer hier angewandten PCR-Methode bestätigt werden. Siehe dazu Tabelle 2.

Tabelle 2: Anteil der virusinfizierten Zellen bezogen auf die Gesamt CD4+ Anzahl vor und drei Stunden nach Lymphozytapherese

Patient	Vor Lymphozytapherese	3 Stunden nach Lymphozytapherese
1	1 : 130	1 : 130
2	1 : 290	1 : 200
3	1 : 300	1 : 320
4	1 : 260	1 : 310
5	1 : 400	1 : 430
6	1 : 250	1 : 260
7	1 : 2900	1 : 2700
8	1 : 3400	1 : 3600
Mittelwert	1 : 990	1 : 990

3.3 Patientenbeobachtung im Verlauf

Keiner der Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Rekrutierung und während der Lymphapheresen eine antiretrovirale Therapie. Der Zeitpunkt der klinischen und körperlichen Verlaufsuntersuchungen richtete sich nach dem Gesundheitszustand der Patienten und nach dem Zeitpunkt der Rekrutierung. In der Regel wurden die Patienten im Abstand von 3 Monaten und im Mittel bis zu 23 Monate lang nachuntersucht.

Zwei der Patienten, die zu Studienbeginn eine niedrige CD4/CD8 Ratio zeigten, entwickelten im Laufe der Zeit AIDS-definierende Erkrankungen (nach der CDC-Klassifikation). Der Patient Nr. 12 entwickelte 12 Monate nach den Lymphozytapheresen ein kutanes Kaposi-Sarkom. Patient Nr. 10 nach 10 Monaten eine Kryptosporidiose. Alle anderen Patienten waren klinisch stabil und zeigten keine

wesentlichen Veränderungen der Laborparameter. Es kam also zu keiner beschleunigten Krankheitsprogression nach Lymphozytapherese.

Als Beispiel soll hier ein Patient im Verlauf dargestellt werden. Die Daten zu den weiteren Patienten werden im Anhang in Tabellen aufgeführt. Der Patient Nr. 9 wurde in regelmäßigen Abständen körperlich untersucht und laborchemische Kontrollen durchgeführt. Der Verlauf der CD4+ und CD8+ Zellen wird in Abbildung 14 dargestellt.

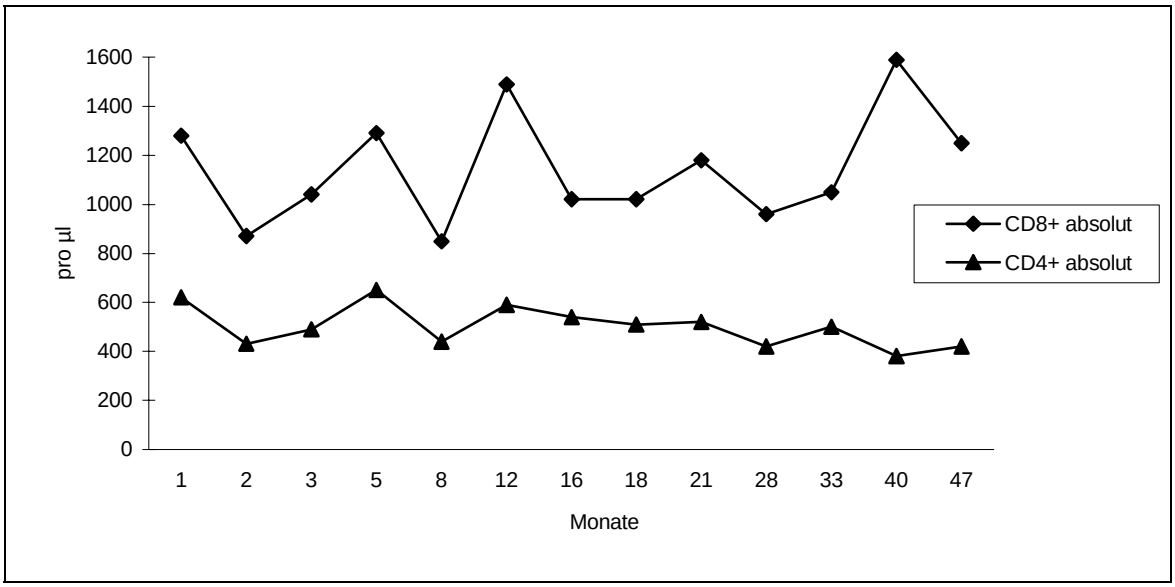

Abbildung 14: Patient 9: Verlauf der absoluten Anzahl der CD4+ Zellen und CD8+ Zellen

Die Lymphozytapheresen wurden zu den Zeitpunkten Monat 1, 6 , 11 und nach 13 Monaten durchgeführt. Zu Beginn des Beobachtungzeitraumes lag die absolute Anzahl der CD4+ Zellen bei 620 pro µl und nach knapp 4 Jahren bei 420 pro µl. Es kam also zu einer Abnahme von 50 CD4+ Zellen pro µl pro Jahr. Dies entspricht der erwarteten jährlichen CD4-Depletion in der Literatur (Schacker et al., 1998; Kvale et al., 1999).

Die CD8+ Zellen lagen zu Beginn der Beobachtung bei 1280 pro µl und am Ende bei 1250 pro µl. Hier zeigte sich zunächst keine wesentliche Veränderung. Beim Anlegen einer linearen Trendlinie zeigt sich der erwartete Anstieg der Zellen im Verlauf. Siehe dazu Abbildung 15. Diese Zunahme liegt jedoch innerhalb des Rahmens der Werte, die in der Literatur bei nicht durch die Lymphozytapherese behandelten HIV-positven Patienten beschrieben werden.

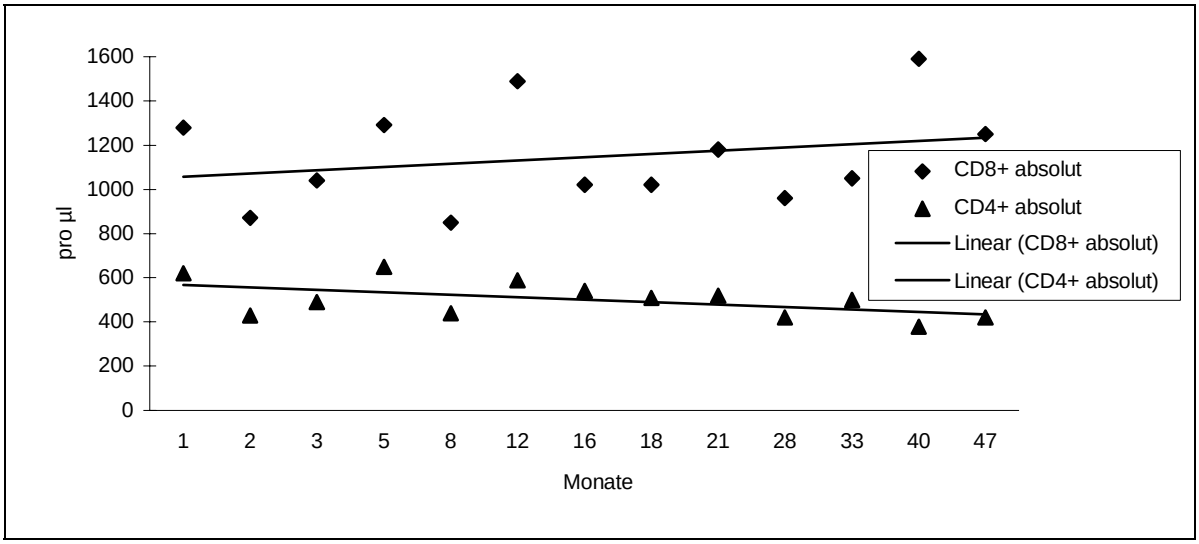

Abbildung 15: Patient 9: Verlauf der absoluten Anzahl der CD8+ und CD4+ Zellen mit linearer Trendlinie

Die CD4/CD8 Ratio zeigte bei diesem Patienten über den Beobachtungszeitraum im linearen Trend eine Abnahme. Zu Beginn des Beobachtungszeitraumes lag die Ratio noch bei 0,48% und fiel nach 47 Monaten auf 0,336% ab. Auch diese Werte liegen innerhalb der normalen Veränderungen, die bei HIV-positiven Patienten beschrieben werden. Siehe dazu Abbildung 16.

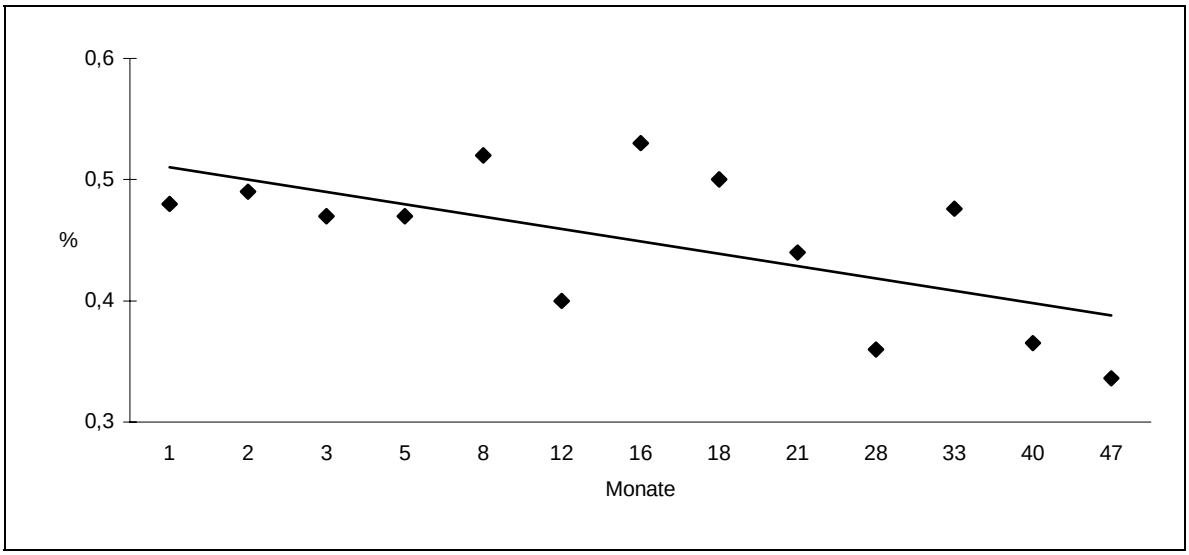

Abbildung 16: Patient 9: Verlauf der CD4/CD8 Ratio

Alle anderen kontrollierten Laborparameter wie z.B. weitere Lymphozyten-Subpopulationen, Blutbild, Neopterin, Gerinnung, Elektrolyte, Leberwerte,

Gesamteiweiß und Immunglobuline lagen innerhalb des Normbereiches. Der Patient zeigte auch bei den klinischen Untersuchungen keine Auffälligkeiten oder Veränderungen, die eine therapeutische Intervention nötig gemacht hätten.
Dieser Patient wurde als exemplarischer Fall für die ausführliche Darstellung gewählt, da die Daten aus einem sehr langen Beobachtungszeitraum vorliegen. Bei diesem Patienten zeigte sich, daß die Lymphozytapheresen zu keinen wesentlichen Veränderungen der klinischen und laborchemischen Laborparameter im Verlauf der Beobachtung führten.
In Abschnitt 8 sind die Tabellen der Laborparameter der anderen Patienten aufgeführt. Auch noch weiter bestimmte Laborparameter werden hier aufgeführt.

3.4 Kryopräservierung von humanen T-Lymphozyten

Im Rahmen des Projektes wurden umfangreiche Voruntersuchungen zum Einfrieren und zur Lagerung von human T-Lymphozyten durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene serumhaltige (RPMI+FCS) und serumfreie Medien (AIM-V) sowie osmotisch wirksame Substanzen (HAES, PLA) getestet und miteinander verglichen. Wie gezeigt werden konnte, war die Kombination von serumfreien Medien (AIM-V), versetzt mit 10% DSMO, und dem Plasmaexpander Gelifundol (PLA) hinsichtlich der Zellrecovery und -viabilität am besten geeignet, insbesondere unter Wahrung eines streng autologen Systems ohne Zufuhr von Fremdproteinen (FCS, BSA). Deswegen wurde in dieser Arbeit dieses Medium für die Kryopräservation der gewonnenen T-Lymphozyten verwendet und weiter getestet.
Im Abstand von bis zu 3 Monaten (maximale Nachbeobachtungszeit 10 Monate), wurden Aliquots der gelagerten Zellen aufgetaut und auf die Zellrecovery, Viabilität, Zusammensetzung der Zellsubpopulationen und Zellfunktionalität in vitro untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.4.1 Viabilität und Recovery

Im Abstand von 4 Wochen und bis zu 10 Monaten nach Einfrieren wurden die Aliquots der gewonnenen Zellsuspensionen aufgetaut und die Viabilität sowie Zellrecovery bestimmt und miteinander verglichen. Die Daten hierzu sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Viabilität und Recovery der eingefrorenen Zellen nach dem Auftauen

Zeitraum (Monate)	Anzahl der aufgetauten Aliquots	**Viabilität** (%) Mittelwerte (±Std.-Abw. %)	**Recovery** (%) Mittelwerte (±Std.-Abw. %)	Signifikanz
1	22	91,1 (±5,83)	72,8 (±9,08)	n. sign.
2	8	92,5 (±3,54)	72,9 (±6,54)	n. sign.
3	5	89 (±5,83)	81,6 (±7,39)	p<0,1
4	6	89,2 (±8,86)	76,1 (±15,03)	n. sign.
5	3	81,7 (±2,36)	68,9 (±4,51)	n. sign.
6	10	83,5 (±10,74)	69,9 (±11,72)	n. sign.
7	7	87,9 (±4,52)	69,9 (±9,3)	n. sign.
8	6	80 (±7,6)	62,6 (±10,1)	p<0,1
10	6	82,5 (±4,79)	67,9 (±8,32)	n. sign.

Nach der statistischen Auswertung mit dem t-Test für unverbundene Stichproben, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten an denen die Aliquots aufgetaut wurden (ein Monat im Vergleich zu 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 Monaten nach dem Einfrieren). Die vorliegenden Daten zeigen, daß es durch das Einfrieren zu einem Zellverlust von 15-37% kommt. Nach einer Lagerung von 10 Monaten konnten wir zusätzlich keinen signifikanten Zellverlust im Verlauf detektieren. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der autologen Knochenmarkstransplantation (Tollerud et al., 1991; Sleasman et al., 1997).

3.4.2 CD4+, CD8+ Zellen und CD4/CD8 Ratio in vivo, nach dem Auftauen und nach in vitro Expansion

Die Werte der gemessenen CD4+ und CD8+ Lymphozytensubpopulationen in vivo im Vergleich zu den Werten vor dem Einfrieren, nach dem Auftauen und nach Kultur sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: CD4+, CD8+ Zellen und CD4/CD8 Ratio im Vergleich

	Mittelwerte relative Werte (%)	**Standard-abweichung (%)**	**Anzahl**	**Signifikanzen in vivo**	**im Kryo-Präservat**	**vor und nach Kultur**
CD4+ Zellen						
in vivo	27,97	5,99	38			
im Beutel	26,89	5,41	30	n. sign.		
vor Kultur	22,17	9,28	71	p<0,001	p<0,001	
nach Kultur	21,92	11,57	42	p<0,002	p<0,01	n. sign.
CD8+ Zellen						
in vivo	55,34	8,35	38			
im Beutel	51,96	8,75	30	p<0,02		
vor Kultur	42,25	12,71	71	p<0,001	p<0,001	
nach Kultur	61,92	13,2	42	p<0,001	p<0,001	P<0,001
CD4/CD8 Ratio						
in vivo	0,526	0,165	38			
im Beutel	0,537	0,126	30	n. sign.		
vor Kultur	0,615	0,441	71	n. sign.	n. sign.	
nach Kultur	0,412	0,33	42	p<0,02	p<0,02	P<0,01

Die CD4+ Zellen und die CD4 / CD8 Ratio zeigen im Vergleich zwischen den in vivo Verhältnissen und der Zellsuspension im Kryopräservat keinen signifikanten Unterschied. Die CD8+ Zellen sind im Kryopräservat weniger vertreten als in vivo, mit jedoch nur geringer Signifikanz (p<0,02). Nach dem Auftauen, welches gleichbedeutend ist mit den Werten vor Kultur, zeigen die einzelnen relativen Werte für die CD4+ und CD8+ Zellen jedoch signifikante Unterschiede zu der in vivo Situation. Wie bereits die obigen Ergebnisse gezeigt haben, kommt es durch das Einfrieren zu einem Zellverlust von 15 - 35%. Dieser scheint sich eher auf CD8+ Zellen auszuwirken, da diese im Verhältnis zu den CD4+ Zellen (4%) mit fast 10% nach dem Auftauen stärker abnehmen. Dies äußert sich auch in der

leichten Zunahme der CD4 / CD8 Ratio im Vergleich zu der Situation vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Die Expansion in vitro führt zu signifikanten Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen im Vergleich zu den in vivo Verhältnissen. Der relative Anteil der CD4+ Zellen ist zunächst nicht wesentlich verändert. Da es aber nach der Kultur vor allem zu einer signifikanten Zunahme der CD8+ Zellen kommt, sinkt entsprechend auch die CD4/CD8 Ratio.

Um festzustellen, ob diese Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen in Abhängigkeit des Auftaudatums, bzw. von der Dauer der Lagerung auftreten, wurden weitere statistische Analysen durchgeführt. Hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Siehe dazu Tabelle 5.

Tabelle 5: Anteile der CD4+ und CD8+ Lymphozytensubpopulationen vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung

Signifikanzen Zeit nach dem Einfrieren	**Student t-Test**	
	CD4 + Zellen	**CD8+ Zellen**
1 Monat	$p < 0,01$	$p < 0,0001$
2 Monate	n. sign.	$p < 0,02$
3 Monate	n. sign.	$p < 0,01$
4 Monate	n. sign.	n. sign.
5 Monate	n. sign.	n. sign.
6 Monate	n. sign.	n. sign.
7 Monate	n. sign.	n. sign.
8 Monate	n. sign.	n. sign.
9 Monate	n. sign.	n. sign.
10 Monate	n. sign.	n. sign.
11 Monate	$p < 0,02$	n. sign.

3.5 Proliferationsassays der gewonnenen Zellen nach dem Auftauen

Um eine Voraussage machen zu können, wie die Zellen in der Langzeitkultur wachsen werden, führten wir mit einem Teil der nach dem Auftauen gewonnenen Zellen Proliferationsassays durch. Hier zeigte sich zunächst, daß vor allem in der Gegenwart mit dem Mitogen PHA und in der Kombination von PHA mit IL-2 die Zellen, wie erwartet, am besten proliferieren. Siehe dazu Tabelle 6.

Tabelle 6: Stimulationsindex im Lymphozytentransformationstest der gewonnenen Zellen nach dem Auftauen

Pat	Lymph-apherese	Datum	Stimulationsindex PHA	PWN	ConA	IL 2	PHA + IL 2	Proliferations-rate in Kultur
1	22.12.92	30.06.93	166,38	36,26	62,26	5,24	161,07	45,50
2	26.11.92	07.06.93	69,53	10,62	14,57	1,73	39,69	21,43
2	29.06.93	30.06.93	242,88	64,57	46,51	2,35	200,68	55,73
3	13.07.93	23.07.93	12,62	13,87	11,67	8,77	8,29	24,32
3	03.09.93	28.09.93	46,20	7,53	18,79	4,71	38,78	38,89
4	18.02.93	17.08.93	61,40	4,93	6,66	0,96	46,68	41,28
4	25.03.93	07.06.93	27,57	10,73	18,38	1,24	37,22	33,42
4	25.03.93	30.06.93	227,03	108,78	56,76	7,46	354,94	43,79
4	01.07.93	27.09.93	37,47	5,99	1,10	1,35	34,23	24,94
6	08.07.93	27.09.93	81,62	22,14	59,01	1,67	75,95	32,07
6	05.08.93	17.08.93	14,98	1,08	2,57	0,20	35,86	28,16
8	10.08.93	17.08.93	60,30	6,43	24,86	0,40	44,82	29,01
9	07.01.93	17.08.93	86,76	1,82	17,25	4,13	132,03	38,90
10	09.12.92	27.09.93	8,13	2,00	3,20	1,16	25,90	19,80
11	14.09.93	29.09.93	37,21	3,75	12,12	2,42	48,41	39,39
11	21.09.93	29.09.93	42,36	10,55	26,15	2,95	35,67	39,68
12	05.11.92	07.06.93	55,18	5,46	21,57	1,48	87,60	35,55
12	05.11.92	14.07.93	17,13	11,93	1,44	6,78	11,48	29,31
12	17.12.92	07.06.93	7,34	1,85	1,62	1,12	16,71	20,81
12	04.03.93	07.06.93	25,61	1,11	0,30	1,28	21,78	39,04
		Mittelwert	95,99	16,57	20,34	2,87	72,89	34,05
		Standabw	±70,39	±17,58	±19,7	±2,4	±81,6	±8,96

Der Stimulationsindex der Zellen (in Gegenwart von PHA und Interleukin-2) und die Proliferationsrate in Langzeitkultur ergeben einen Korrelationskoeffizient von r=0,625. Im Student t-Test ergibt sich hier eine Signifikanz von p=0,0528. Beim Vergleich des Stimulationsindexes und der Proliferationsrate der Zellen in Gegenwart von PHA alleine ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von r=0,729 (Signifikanz p=0,0489).

Es läßt sich also mit diesen Mitogenen eine Voraussage machen, daß die Zellen auch in der Langzeikultur gut wachsen werden. D.h. der Proliferationsindex im LTT kann bedingt die Proliferationskapazität in der Langzeitkultur vorhersagen. Siehe dazu die Abbildungen 17 und 18.

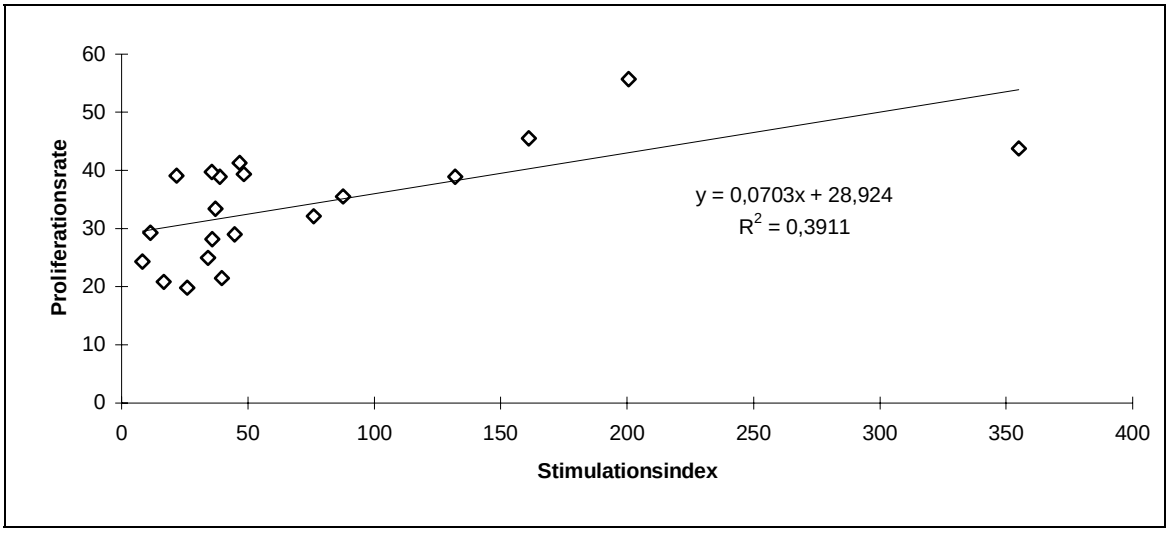

Abbildung 17: Stimulationsindex von PHA und IL-2 im Verhältnis zur Proliferationsrate in der Langzeitkultur

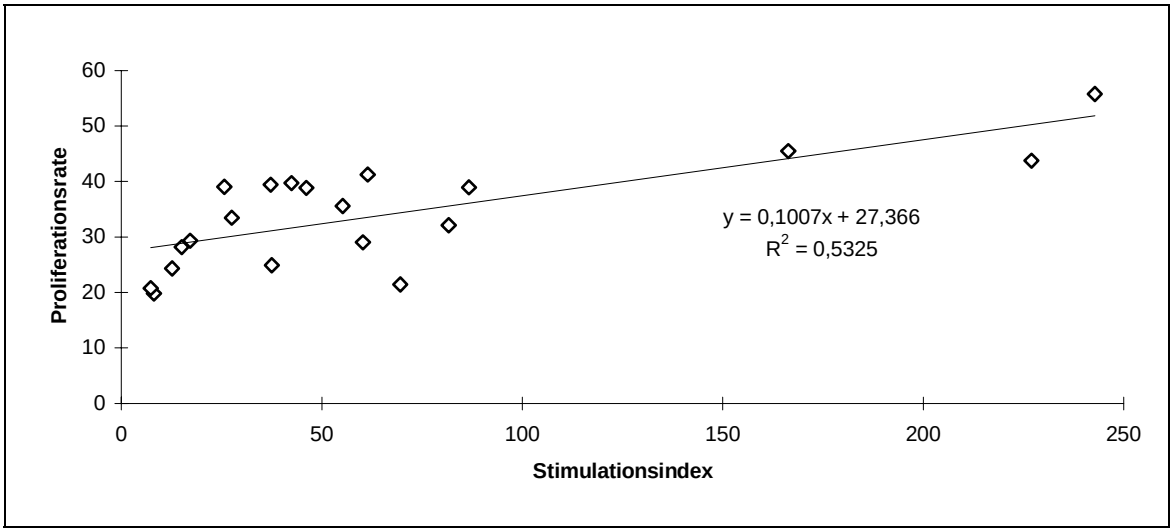

Abbildung 18: Stimulationsindex von PHA im Verhältnis zur Proliferationsrate in der Langzeitkultur

3.6 Langzeitkultur

Die Untersuchungen zur Expansion humaner T-Lymphozyten in vitro stellten einen substantiellen Anteil der durchgeführten Arbeiten dar. Insgesamt wurden 35 Langzeitkulturen durchgeführt. Als Kontrolle dienten über die Dichtegradientenseparation isolierte PBMC von HIV negativen Probanden. Es zeigte sich, daß eine optimale Stimulation und Proliferation mit Phythämagglutinin und Interleukin-2 erreicht wurde. Die Verwendung von monoklonalen anti-CD3-Antikörpern oder Staphylokokken-Protein A erbrachte keinen Vorteil gegenüber der herkömmlichen Methode. Ebenfalls konnte kein Vorteil durch die Zugabe von IL-1ß erreicht werden.

In die geschilderten Kulturbedingungen wurden anfänglich $0{,}5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Im Mittel wurden diese 14 Tage lang kultiviert. Nach Kulturabbruch wurde die Zellzahl gemessen und die Proliferationsrate bestimmt. Es konnte so eine Expansion der Zellen um das knapp 40 (±12,35) fache (bei HIV-infizierten Patienten) bis 100 (±6,08) fache (bei HIV-negativen Probanden) erreicht werden. Die expandierten Zellen zeigten eine Viabilität von fast 90% (±10,2%) nach der Kultur. Die Daten hierzu sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Die Expansion der T-Lymphozyten und damit die Zahl der Mitosen ist begrenzt, da zu einer unbegrenzten Mitoserate nur neoplastisch transformierte Zellen in der Lage sind. Im Hinblick auf das später geplante Retransfusionsprogramm der expandierten T-Lymphozyten, müssen nach Beendigung der Expansion diese Zellen in vivo als Antwort auf einen Immunstimulus auch noch zur weiteren Proliferation nach Antigen-Stimulus fähig sein. Um die Funktionsfähigkeit der expandierten Zellen zu prüfen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

Tabelle 6: Expansion der T-Lymphozyten und Proliferationsraten

Patient	Lymph-apherese Datum	Zeit der Kryoprä-servation (Monate)	Viabilität %	Reco-very %	Zellzahl $x10^7$	Kultur-dauer (Tage)	Viabi-lität %	End Faktor	Expan-sions-rate (14d)
1	22.12.92	1	85	81,5	5,12	12	90	8	45,5
2	26.11.92	8	85	72,9	2,72	13	90	11,34	21,43
2	29.06.93	1	90	73,1	4,66	13	90	11,7	55,73
2	29.06.93	3	95	91,8	8,44	14	95	10,9	43,79
2	29.06.93	4	95	79,8	4,4	13	95	11,3	68,91
3	13.07.93	1	95	68,8	3,04	14	90	8,8	24,32
3	13.07.93	3	95	68,8	5,08	14	95	5,67	35,99
3	03.09.93	1	95	69,3	8,08	14	95	3,85	38,89
4	18.02.93	6	90	86,6	8,08	13	60	5,22	41,28
4	25.03.93	3	80	85,2	4,93	12	90	8	43,79
4	25.03.93	6	95	85,2	6,44	14	95	10,9	33,42
4	01.07.93	2	85	76,3	8,02	14	80	2,33	24,94
4	01.07.93	1	90	84,1	3,72	14	75	8,8	29,76
6	08.07.93	1	95	82,5	3,52	14	85	8,8	28,16
6	05.08.93	1	85	70,9	6,76	13	60	5,22	32,07
6	05.08.93	1	95	76	8	14	95	10,9	41,53
6	05.08.93	2	95	67,7	3,82	14	95	12	61,12
6	12.08.93	2	90	68	5,72	14	95	5,67	40,526
8	10.08.93	1	95	82,65	3,5	14	80	8	27,93
8	10.08.93	1	95	81,7	5,6	14	95	10,9	29,01
8	10.08.93	2	95	95	3,24	14	95	12	51,84
8	19.08.93	1	95	69,7	8	14	80	4,09	29,78
9	07.01.93	7	95	74,1	8,2	13	80	5,22	38,9
9	15.06.93	1	95	86,3	4,56	13	60	11,7	54,54
9	15.06.93	3	95	85,3	7,2	14	95	10,9	37,3
9	15.06.93	4	95	87,7	3,22	14	95	12	51,6
10	09.12.92	9	80	65,2	4,4	14	85	3,38	19,8
10	17.06.93	1	75	61,2	3,16	14	95	8,8	25,28
11	14.09.93	1	80	63,4	5,56	14	95	5,67	39,39
11	21.09.93	1	95	72,3	4,1	14	95	12	65,5
11	21.09.93	1	95	66,8	5,6	14	95	5,67	39,68
12	05.11.92	8	80	61,5	3,72	13	90	11,3	29,31
12	05.11.92	10	80	76,4	3,16	14	85	11,25	35,55
12	17.12.92	9	90	72,7	3,22	14	85	6	20,81
12	04.03.93	6	80	77,67	3,47	14	85	11,25	39,04
	Mittelwerte		90	76,2	5,16		87,43		38,47
	St.-Abw.(±)		6,32	8,68	1,83		10,2		12,35

3.6.1 Phänotypisierung der durch Lymphozytapherese gewonnenen Zellen mittels Durchflusszytometrie vor und nach Kultur

CD4+ / CD8+ Lymphozyten: Wie bereits oben besprochen, kam es in unserem Kultursystem präferentiell zur Stimulation und Proliferation der CD8+ Zellen. Vor Kultur fanden sich bei den HIV-positiven Patienten 42,25% (±12,7%) und nach Kultur 61,92% (±13,2%) CD8+ Zellen (p<0,001). Auch die CD8+ Zellen der HIV-negativen Probanden stiegen von 22,35% (±4,94%) vor Kultur auf 43,13% (±12,58%) nach Kultur. Im Vergleich zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Probanden ist der relative Anteil der CD8+ Zellen bei den HIV-positiven jeweils (vor und nach Kultur) signifikant höher.

Die CD4+ Zellen bei HIV-positiven Patienten bleiben in ihrem relativen Anteil vor und nach Kultur fast unverändert (CD4+ Zellen vor Kultur 22,17% (±9,28%) und nach Kultur 21,92% (±11,57%)). Der relative Anteil der CD4+ Zellen von HIV-negativen Probanden lag vor Kultur bei 46,56% (±6,5%) und hier signifikant höher als bei den HIV-positiven Patienten (p<0,001). Nach Kultur waren die CD4+ Zellen der HIV-negativen Probanden im Vergleich zu den Werten vor Kultur leicht erniedrigt (37,94% (±14,04%) (p<0,05)). Dieser Anteil der CD4+ Zellen bei den HIV-negativen Probanden nach Kultur lag jedoch noch signifikant höher (p<0,001) als bei den HIV-positiven Patienten.

Die CD4+ / CD8+ Ratio lag bei HIV-positiven Patienten vor Kultur bei 0,62 (±0,44) und nach Kultur bei 0,41 (±0,33). Ebenso nahm die Ratio bei den HIV-negativen Probanden nach Kultur signifikant (p<0,001) ab (2,21 (±0,65) vor Kultur zu 1,02 (± 0,76) nach Kultur.

Aktivierungsmarker: Die expandierten Zellen zeigten bei den HIV-negativen Probanden und HIV-positiven Patienten einen immunologischen Phänotyp, der hochaktivierten T-Lymphozyten entsprach. Bei den HIV-positiven Patienten kam es zu einer signifikanten Zunahme der CD3+/CD25+ Zellen. Dieser Anteil lag vor Kultur bei 1,5% (±0,63%) im Vergleich zu 10,84% (±2,09%) nach Kultur (p<0,001). Auch die CD3+/CD45RO+ Zellen nahmen nach Kultur bei HIV-negativen und positiven Patienten zu (HIV-positive: vor Kultur 44,4% (±11,9%), nach Kultur 99,1 (±2,2%); HIV-negative: vor Kultur 41,9%(4,1%), nach Kultur 96% (±2,6%)).

Die HLA-DR Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zellen war bei den HIV-positiven Patienten präkulturell signifikant höher (HLA-DR+/CD4+ Zellen vor Kultur 5,37% (±1,45%) bei HIV-positiven; 2,87% (±2,26%) bei HIV-negativen, HLA-DR+/CD8+ vor Kultur 7,84% (±2,95%) bei HIV-positiven; 3,21% (±1,73%) bei HIV-negativen). Nach Kultur stieg bei den HIV-positiven Patienten und Kontrollpersonen der Anteil HLA-DR+/CD4+ und CD8+ T-Zellen signifikant an. Hier zeigte sich jedoch nunmehr nur ein signifikanter Unterschied im Anteil der HLA-DR+/CD8+ T-Zellen im Vergleich zum Kontrollkollektiv (HLA-DR+/CD4+ nach Kultur 62,31% (±9,59%) bei HIV-positiven; 58,72% (±18,31%) bei HIV-negativen, HLA-DR+/CD8+ nach Kultur 77,45% (±12,89%) bei HIV-positiven; 43,13% (±12,58%) bei HIV-negativen).

Komplementregulierende Moleküle: In der Membran einer jeden menschlichen Zelle finden sich eine Vielzahl von Molekülen, die die Zelle vor der Lyse durch das homologe Komplement schützt und die Aktivation sowie Anlagerung des Komplementssystems regulieren. Die Aktivierung von C3 (größter Bestandteil des Komplementsystems) über spontane Hydrolyse oder über proteolytische Spaltung durch ein C3-Konvertaseenzym ist der entscheidene Schritt für die Aktivierung der Komplementkaskade. Die Schlußphase der Komplementkaskade wird durch die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) eingeleitet, welches schließlich zur Lyse der Zelle führt. Neben anderen, das Komplementsystem kontrollierenden Molekülen, verursacht der decay accelerating factor (DAF oder CD55) eine Dissoziation der C3-Konvertase und verhindert so eine weitere Aktivierung der Komplementkaskade. Der membran inhibitor of reactive lysis (MIRL oder CD59) ist ein mebranständiges Protein, daß neben weiteren Proteinen die Bildung des MAC verhindern. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression dieser Oberflächenantigene (CD55 und CD59) auf Lymphozyten von HIV-positiven Patienten vermindert ist (Lederman et al., 1989; Weiss et al., 1991). Auch wir konnten zeigen, daß die Expression der Oberflächenantigene CD55 und CD59 auf den CD4+ und CD8+ Zellen vor Kultur bei den HIV-positiven Patienten signifikant niedriger lag als bei den Gesunden. In der Kultur wurden diese Antigene, bis auf das CD59 Antigen auf den CD4+ Zellen, welches keinen signifikanten Unterschied

vor und nach Kultur sowohl bei den HIV-negativen als auch bei den HIV-positiven Probanden zeigt, hochreguliert.

Zytotoxische T-Zellen: Das intrazellulär nachweisbare Antigen TIA-1 ist in bestimmten Lymphoyztensubpopulation enthalten, die zytolytische Aktivitäten besitzen (Anderson et al., 1990). Vor Kultur war das Antigen TIA-1 in den CD4+ und CD8+ Zellen bei HIV-positiven Patienten im Vergleich zu HIV-negativen Probanden bereits signifikant erhöht. In unserem Kultursystem proliferierten die TIA-1+/CD4+ und TIA-1+/CD8+ Zellen der HIV-positiven Patienten jedoch kaum, während es bei den HIV-negativen Probanden zu einer signifikanten Zunahme dieser Zellen kam. Nach Kultur zeigten die Werte im Vergleich zu den HIV-positiven Patienten keinen signifikanten Unterschied mehr.

Die relativen Anteile der Antigenexpression auf Lymphozyten sind in der Tabelle 7 (HIV-positive Patienten) und Tabelle 8 (HIV-negative Probanden) dargestellt.
Die Signifikanzen der Unterschiede der hier untersuchten Antigene bei den HIV-positiven Patienten und HIV-negativen Probanden vor und nach Kultur sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 7: Expression von Oberflächenantigenen auf CD4+, CD8+ und anderen Lymphozyten bei HIV- positiven Patienten vor und nach Kultur

HIV + Oberflächen-antigene:		**Vor Kultur** Mittelwerte (%)	St.abw (%)	Anzahl (n)	**Nach Kultur** Mittelwerte (%)	St.abw (%)	Anzahl (n)
CD4 +		**22,17**	9,28	71	**21,92**	11,57	42
CD4 +	HLA-DR +	**5,37**	1,54	4	**62,31**	9,59	5
	11 B +	**2,88**	1,59	5	**11,93**	4,91	5
	TIA-1 +	**14,9**	8,28	6	**23,00**	8,77	6
	CD 7 +	**70,33**	7,82	9	**83,75**	6,19	14
	CD 55 +	**12,26**	4,18	11	**18,60**	9,01	13
	CD 59 +	**21,33**	6,25	13	**17,94**	8,28	16
CD8 +		**42,25**	12,71	71	**61,92**	13,20	42
CD8 +	HLA-DR +	**7,84**	2,95	4	**77,45**	12,89	5
	11 B +	**8,12**	2,50	5	**21,15**	5,30	5
	TIA-1 +	**77,17**	3,48	6	**77,91**	10,87	6
	CD 7 +	**64,85**	18,02	9	**91,78**	4,61	10
	CD 55 +	**8,37**	3,78	11	**59,74**	6,69	13
	CD 59 +	**10,64**	2,92	13	**49,42**	11,24	16
	S6 F1 +	**28,39**	11,61	20	**53,99**	13,53	13
CD7 +		**53,15**	15,70	22	**88,38**	6,05	29
CD7 +	HLA-DR +	**5,27**	2,96	4	**77,98**	5,27	5
CD19 +		**4,17**	2,95	20	**0**		5
CD3+		**72,2**	12,50	10	**89,10**	7,80	10
CD3 +	CD25 +	**1,50**	0,63	4	**10,84**	2,09	8
	CD45RO+	**44,4**	11,90	8	**99,10**	2,20	8

Tabelle 8: Expression von Oberflächenantigenen auf CD4+, CD8+ und anderen Lymphozyten bei HIV-negativen Probanden vor und nach Kultur

HIV - Oberflächen-antigene:		**Vor Kultur** Mittelwerte (%)	St.abw (%)	Anzahl (n)	**Nach Kultur** Mittelwerte (%)	St.abw (%)	Anzahl (n)
CD4 +		**46,56**	6,50	13	**37,94**	14,04	19
CD4 +	HLA-DR +	**2,87**	2,26	6	**58,72**	18,31	10
	TIA-1 +	**2,74**	0,51	3	**7,73**	0,29	3
	CD 7 +	**87,54**	3,41	6	**89,81**	7,67	10
	CD 55 +	**28,13**	10,24	5	**44,58**	15,18	8
	CD 59 +	**37,77**	8,13	5	**41,60**	12,89	8
CD8 +		**22,35**	4,94	13	**43,13**	12,58	19
CD8 +	HLA-DR +	**3,21**	1,73	6	**49,51**	22,82	10
	TIA-1 +	**52,09**	6,62	3	**58,87**	18,78	3
	CD 7 +	**92,49**	2,39	6	**97,47**	1,95	10
	CD 55 +	**15,86**	3,90	5	**43,92**	11,40	8
	CD 59 +	**23,56**	8,61	5	**46,18**	11,38	8
CD4+/CD8+ Ratio		**2,21**	0,65	13	**1,02**	0,76	13
CD7 +		**79,92**	5,66	12	**94,31**	3,60	20
CD7 +	HLA-DR +	**1,45**	0,37	6	**53,91**	13,63	9
CD19 +		**6,90**	1,30	8	**0**		
CD3+		**74,50**	7,70	10	**94,00**	2,50	10
CD3+	CD45RO+	**41,90**	4,10	10	**96,00**	2,60	10

Tabelle 9: Unterschiede der T-Zellsubpopulationen vor und nach Kultur sowie im Vergleich zwischen HIV-positiven und HIV-negativen Probanden

Signfikanzen der Zellen vor und nach Kultur			**HIV+ und HIV- im Vergleich**	
	HIV +	**HIV-**	**vor Kultur**	**nach Kultur**
CD4+	n. sign.	p<0,05	p<0,001	p<0,001
CD8+	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CD4+/CD8+ Ratio	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,05
CD4+/HLA-DR+	p<0,001	p<0,001	p<0,1	n.sign.
CD8+/HLA-DR+	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,02
CD4+/CD7+	p<0,002	n.sign.	p<0,001	p<0,1
CD8+/CD7+	p<0,003	p<0,003	p<0,003	p<0,005
CD4+/TIA-1+	n. sign.	p<0,006	p<0,04	n.sign.
CD8+/TIA-1+	n. sign.	p<0,05	p<0,001	n.sign.
CD4+/CD55+	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,003
CD8+/CD55+	p<0,001	p<0,002	p<0,02	p<0,001
CD4+/CD59+	n.sign.	n.sign.	p<0,02	p<0,002
CD8+/CD59+	p<0,001	p<0,004	p<0,04	p<0,1
CD7+/HLA-DR+	p<0,001	p<0,001	n.sign.	p<0,001
CD3+/CD25+	p<0,001			
CD8+/S6F1+	p<0,001			

3.6.2 Semiquantitative PCR vor und nach Kultur

Die Expansion von humanen T-Lymphozyten HIV-infizierter Spender in vitro birgt das potentielle Risiko einer gesteigerten Virusreplikation durch Aktivierung von infizierten Zellen. Zur Evaluierung des Ausmaßes der Virusreplikation wurde der Anteil der CD4+ Zellen, die provirale DNA integriert haben, vor und nach Kultur mittels PCR gemessen. Hierbei zeigte sich, daß keine signifikante Steigerung der Virusreplikation durch die Expansion zu detektieren war. Der Anteil der infizierten CD4+ Zellen blieb in 3 von 10 hier untersuchten Kulturen gleich. In zwei Drittel (7 von 10) der Kulturen nahm die Anzahl der infizierten Zellen gar um 1 bis 2 Logstufen ab. Nur in einem Fall kam es zu einem Anstieg um eine Logstufe (Patient 7). Siehe dazu Abbildung 19.

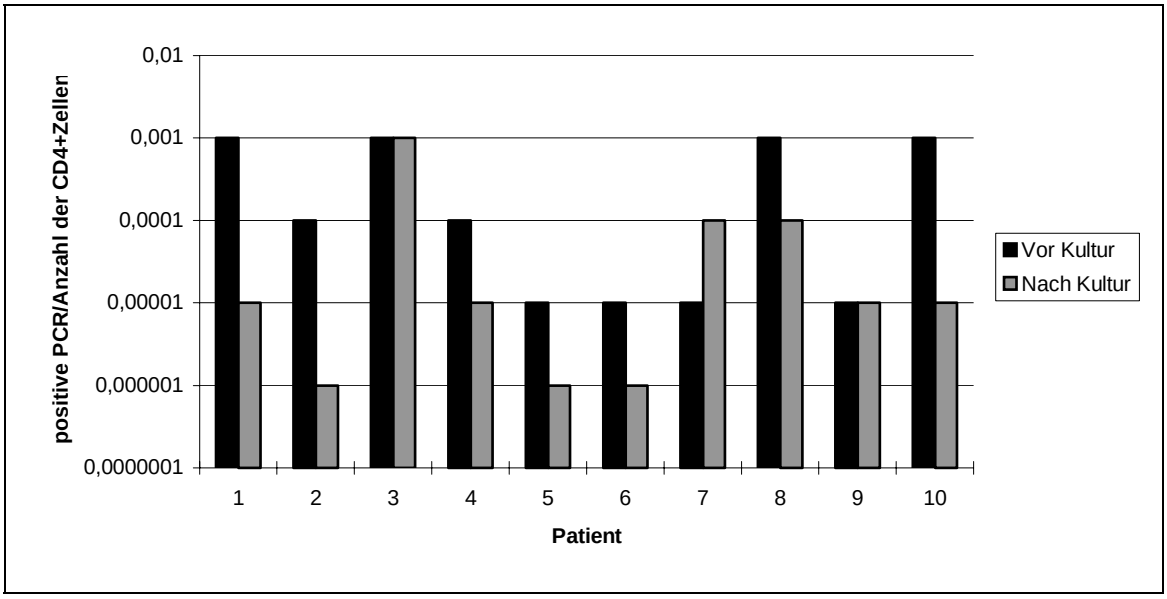

Abbildung 19: Verhältnis infizierter CD4+ Zellen vor und nach Kultur

3.6.3 Proliferationsassay nach Kultur

Um zu überprüfen, ob die Zellen auch nach der Kultur noch zur Proliferation fähig sind, führten wir einen Proliferationsassay durch. Hier zeigte sich allerdings, daß die Zellen nach der Kultur gegenüber den Mitogenen Concanavalin A (ConA), Phytohaemagglutinin (PHA) und Pokeweed mitogen (PWM) nicht mehr in der Lage waren zu proliferieren. Lediglich in der Kurzzeitkultur mit Interleukin-2 zeigten die Zellen noch eine Proliferation. Siehe dazu Tabelle 10.

Tabelle 10: Stimulationsindex im Proliferationsassay nach Kultur

PHA	PWN	ConA	IL 2
1,44	0	1,28	19,63
2,46	3,55	2,24	10,92
3,67	2,72	1,62	17,31
1,65	2,4	1,41	13,86
4,01	1,55	2,64	76,44
0	1,64	1,1	117,32
2,205 ±1,37	1,98 ±1,11	1,72 ±0,55	42,58 ±41,16

4. DISKUSSION

4.1 Lymphozytapherese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Lymphozytapheresen von asymptomatischen HIV-positiven Patienten gut vertragen wurden und eine große Anzahl von T-Zellen gewonnen werden konnte. Die Lymphozytapheresen an HIV-positiven Patienten führten zu keinen therapiebedürftigen Veränderungen, weder im virologischen, immunologischen noch im klinischen Bereich. Eine mögliche immunologisch / virologische Aktivierung durch die Zellseparationen erscheint aufgrund der aufgeführten Daten extrem unwahrscheinlich.

Die Blutlymphozyten stellen im Gegensatz zu anderen Blutzellen (Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten) einen Anteil von nur 2% der Gesamtlymphozyten im Körper dar (Westermann et al., 1990). Während Erythrozyten und Thrombozyten ihre gesamte Lebenszeit im Blutkreislauf verbringen und Granulozyten nach etwa 20 Stunden intravasalen Aufenthaltes ins Gewebe auswandern und dort nach ca. 1-3 Tagen absterben, findet bei Lymphozyten eine ständige Migration und Rezirkulation zwischen lymphatischem Gewebe und Intravasalraum statt. Der bei den HIV-infizierten Patienten initial postapheretisch gemessene Abfall der Gesamtlymphozyten im peripheren Blut wurde bereits innerhalb einer Stunde ausgeglichen. Möglicherweise wurden diese Zellen durch Zellen aus den lymphatischen Geweben ersetzt. Da man heute weiß, daß in den Lymphknoten bei HIV-positiven Patienten die Anzahl der virusinfizierten Zellen weitaus größer ist als im peripheren Blut (Schmitz et al., 1994; Embretson et al., 1993; Pantaleo et al., 1993), ist es bemerkenswert, daß es nach dem Ersatz der Zellen aus den lymphatischen Geweben nicht zu einer Zunahme der infizierten zirkulierenden T-Helferzellen, wie wir zeigen konnten, gekommen ist.

Die während der Lymphozytapheresen gemessen Werte für Erythrozyten, Makrophagen, Granulozyten, Gerinnungswerte, Elektrolyte sowie weitere Parameter der klinischen Chemie erreichten bereits nach wenigen Stunden wieder die jeweiligen Ausgangswerte und lagen größtenteils innerhalb der Normbereiche. Die Thrombozytenzahl im peripheren Blut erholte sich, wie zu erwarten, wesentlich langsamer. Es kam aber bei keinem der Patienten zu einem solchen Abfall der Thrombozyten, der eine Substitutionstherapie benötigt hätte. Nach 7 Tagen

waren die Thrombozytenz schließlich wieder auf Werte angestiegen, die vor den Lymphozytapheresen gemessen wurden.

Innerhalb des Beobachtungszeitraums der HIV-positiven Patienten nach den Lymphozytapheresen von bis zu fast 4 Jahren, konnten keine wesentlichen Verschlechterungen der verschiedenen Laborparameter gegenüber denen, die allgemein bei HIV-positiven Patienten innerhalb dieses Zeitraums auftreten, festgestellt werden. Wir konnten also zeigen, daß die Lymphozytapherese ein schonendes und komplikationsloses Verfahren zur Entnahme von Lymphozyten an HIV-positiven Patienten darstellt.

Insgesamt gibt es heute noch wenig Erfahrungen zu Lymphozytapheresen bei HIV-positiven Patienten. An der Universität in Pittsburgh und an der Universität in Miami wurden Lymphozytapheresen bei HIV-positiven Patienten in weit fortgeschrittenen Stadien (acquired immunodeficiency syndrome-related complex (ARC) oder AIDS) durchgeführt. Auch hier konnte gezeigt werden, daß die sechs durchgeführten Lymphozytapheresen im Abstand von drei Wochen von den Patienten insgesamt gut toleriert wurden (Klimas et al., 1994). Es wurde jedoch in dieser Arbeit nicht darauf eingegangen, ob die Apheresen den Krankheitsverlauf der Patienten beeinflußte. Vielmehr lag der Schwerpunkt der Arbeit darin, aus den durch die Apherese gewonnenen Zellen CD8+ Lymphozyten zu isolieren, diese zu kultivieren und zügig zu retransfundieren (Whiteside et al., 1993; Ho et al., 1993).

Heute haben vor allem die Stammzellseparationen und -transplantationen von an Tumor erkrankten Patienten vor bzw. während der Hochdosischemotherapie an Bedeutung gewonnen. Die hämatopoetische Stammzelle stellt mit ihrer Fähigkeit zur Selbsterhaltung, -vermehrung ohne Differenzierung (sogenanntes „self-renewal“) und der Pluripotenz in jede hämatopoetische Zellreihe zu differenzieren bzw. proliferieren, die Ziel-Zelle vieler immuntherapeutischer Ansätze dar. Die Fortschritte in der Gentherapie haben gezeigt, daß der Transfer von anti-HIV Genen auf diese pluripotenten Stammzellen möglich ist (Riddell et al., 1992; Gervaix et al., 1997). Die anschließende autologe Retransfusion dieser genmanipulierten HIV-resistenten Zellen könnte, in der Theorie, eine komplette und permanente Rekonstitution aller Blutzellen und Immunfunktionen erzielen. Erst vor kürzerer Zeit sind Stammzellseparationen auch an HIV-positiven Patienten durchgeführt worden. Es hat sich gezeigt, daß durch die Gabe von

Wachstumsfaktoren (granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)) die Anzahl der peripheren Stammzellen auch bei diesen Patienten wesentlich gesteigert werden kann (Slobod et al., 1996; Law et al., 1999). Trotzdem bei unseren Patienten keine Wachstumsfaktoren eingesetzt wurden, konnten auch wir eine relativ hohe Anzahl von Stammzellen ($10{,}9 \times 10^6$ CD34+ Zellen) mittels der Apherese gewinnen.

4.2 Kryopräservierung

Nach unserem Kryopräservierungsprotokoll kommt es zu einem Zellverlust von 15 bis 37 %. Sleasman et al. beschreiben einen Zellverlust (mononukleäre Zellen) von nur 4 bis 16 % in einem Beobachtungszeitraum von 18 Monaten. Hier wurden allerdings Aliquots von Proben schnell (innerhalb von 10 Minuten) tiefgefroren, während in unserem Protokoll die Aliquots gemeinsam mit den Produkten aus den Lymphozytapheresen innerhalb einer Stunde tiefgefroren wurden. Möglicherweise ist der erhöhte Verlust dadurch zu erklären, daß die Kälte nicht schnell genug die Zellen erreichen konnte und diese so durch das zelltoxische DSMO bereits angegriffen wurden. Der Verlust der Zellen nimmt im Verlauf der Lagerung (Beobachtungszeitraum: 10 Monate) nicht weiter zu. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Zellen auch über einen noch viel längeren Zeitraum gelagert werden können.

Der Vergleich der relativen Anteile der CD4+ und CD8+ Lymphozyten in der vivo Situation, in der gewonnenen Zellsuspension und nach dem Auftauen zeigt einen Verlust des relativen Anteils vorallem der CD8+ Lymphozyten durch die Kryopräservierung. Dies wurde bereits von Tollerud et al. beschrieben. Durch die ex vivo Expansion der kryopräservierten Zellen kann jedoch eine gute Proliferation und Stimulation der Zellen erreicht werden, so daß ein funktioneller Verlust dieser Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

4.3 Kultur

In unserem Kulturansatz ging es vor allem um die Proliferation der Zellen, um quantitativ eine noch weit ausreichendere Menge zu erhalten, die dann bei der Retransfusion der Zellen die CD4+ Verluste im Verlauf der HIV Erkrankung zumindest teilweise ausgleichen kann. Mit der in vitro Kultivierung gelang uns eine Vermehrung der gewonnenen Zellen um das fast 40fache, womit das Ziel der

einer quantitativ ausreichenden zellvermittelten Immuntherapie bei HIV-positiven Patienten erreicht wäre.

Zudem wurden durch die Dichtegradientenseparation gewonnene Lymphozyten von HIV-negativen Probanden in die in vitro Expansion mit gleichen Verhältnissen eingesetzt. Hier konnte eine Proliferationsrate um das 100fache erreicht werden. Eine mögliche Erklärung für die geringere Proliferationsrate auf Seiten der HIV-positiven Zellen ist, daß die Zellen eben nicht mehr „frisch“ sind und daß es durch das Einfrieren, neben dem Viabilitätsverlust, auch zu einem Verlust ihrer Expansionsfähigkeit kommt. Dieser qualitative Defekt der Expansionsraten der T-Zellen von HIV-positiven Patienten ist allerdings auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Neben erhöhter Apoptose-Bereitschaft und verminderter Zytokinproduktion sind noch viele andere Mechanismen als Erklärungsmodell für dieses Phänomen beschrieben worden (siehe auch unter 1.2.5 In vitro Expansion von Lymphozyten HIV-infizierter Patienten). Die Expansionsfähigkeit dieser Zellen kann jedoch durch Kokultivierung mit Antigenen, monoklonalen Antikörpern, antigenpräsentierenden Zellen, konditionierten Medien und vielen anderen Zusätzen in die Kultur (siehe auch unter 1.2.5) wieder hergestellt werden. Es ist jedoch dabei anzumerken, daß es hierbei möglicherweise zu einer Erhöhung der Toxizität der zu retransfundierenden Zellen kommt. Dies könnte bei der Retransfusion noch unklare Nebenwirkungen mit sich bringen.

Bekannterweise vermehrt sich das HI-Virus vorallem in aktivierten T-Lymphozyten. In unserem Kulturmodell sind die Lymphoyzten einem steten Stimulationsreiz ausgesetzt und befinden sich, wie durch die durchflusszytometrischen Analysen gezeigt werden konnte, in einem hochaktivierten Zustand. Es ist deshalb bemerkenswert, daß es in unserem Kulturansatz nicht zu einer Vermehrung des HI-Virus, wie wir durch die PCR-Analysen vor und nach Kultur zeigen konnten, gekommen ist. Die Unterdrückung der Virusreplikation könnte durch die Kokultivierung mit zytotoxischen CD8+ Lymphozyten, die eine antivirale Potenz besitzen, erklärt werden (Walker et al., 1986 und 1989).

4.4 Die gewonnenen Zellen durch die Lymphozytapherese und Kultur

Durch eine einmalige Lymphozytapherese konnten wir, bei einer angenommenen Gesamtkörperlymphozytenzahl von ca. 500 x 10^9 Zellen, etwa 1/100 der gesamten menschlichen Lymphozyten pro Zellseparation (Mittelwert: 6,16x10^9 Leukozyten pro Apherese) unseren Patienten entnehmen. Spiegeln die gemessenen Blutwerte für die verschiedenen Leukozytenpopulationen die Verhältnisse auch in anderen Kompartimenten wider, so kann davon ausgegangen werden, daß HIV-infizierte Patienten im Stadium A1/A2 der CDC-Klassifikation ca. 75 - 112 x 10^9 CD4+ Lymphozyten besitzen. Um das Defizit an CD4+ Lymphozyten im Verlauf der HIV Erkrankung von z.B. 200/µl auf 500/µl aufzufüllen, werden 45 - 67 x 10^9 CD4+ Lymphozyten benötigt. Wir konnten demnach durch eine Lymphozytapherese 1/10 bis 1/20 der Gesamt CD4+ Lymphozyten (Mittelwert: 1,73 x 10^9 CD4+ Lymphozyten) entnehmen. Nach Berücksichtigung des Viabilitätsverlustes von 30% durch die Kryopräservierung und der anschließenden in vitro Kultivierung mit einem Expansionsfaktor von 40, können in unserem Ansatz 47,6 x 10^9 CD4+ Lymphozyten gewonnen werden. Es kann also nach einmaliger Lymphozytapherese und ex vivo Expansion die erforderliche Menge von T-Lymphozyten zur autologen Immuntherapie erreicht werden.

Die Unterschiede der Antigenexpression auf Lymphozyten von HIV-positiven Patienten im Vergleich zu HIV-negativen Probanden ist bereits vielerorts beschrieben worden (Reddy et al., 1991; Roederer et al., 1996). Auch wir konnten zeigen, daß im Vergleich zu Gesunden die aktivationstypischen Oberflächenantigene (HLA-DR, CD25, CD45RO, CD7) auf Lymphozyten bei HIV-positiven Probanden erhöht sind. Durch unser Kultursystem werden diese Antigene auch auf den Lymphozyten der HIV-negativen Probanden hochreguliert. Interessant ist zudem, daß es durch unser Kultursystem zu einer Hochregulierung der komplementregulierenden Antigene (CD59 und CD55) auf den T-Lymphozyten kommt. Diese Antigene schützen T-Lymphozyten vor der antikörpervermittelten Lyse durch Komplementfaktoren. Möglicherweise könnte die Aktivierung des Komplementsystems bei HIV infizierten Patienten im Verlauf der Erkrankung auch eine Rolle bei dem zunehmenden T-Zellverlust spielen. Das intrazellulär nachweisbare TIA-1 Antigen, welches zytolytische Aktivität nachweist, ist auf den Lymphozyten der HIV-positiven Patienten im Vergleich zu HIV-negativen

Probanden signifikant erhöht. Dies ist möglicherweise durch die erhöhte Apoptose der in vivo präaktivierten CD8+ Zellen bei HIV-positiven Patienten zu erklären (Anderson et el., 1990). Insgesamt kann gesagt werden, daß die expandierten Lymphozyten der HIV-positiven und HIV-negativen Probanden in unserem Kultursystem sich vom Phänotyp her durch die Stimulation angleichen (Abnahme der Signifikanzen nach Kultur).

Die durch die Kultur gewonnenen Lymphozyten müssen jedoch auch in vivo (nach der Retransfusion) noch in der Lage sein, auf einen Immunstimulus zu reagieren. Durch die Kultur mit PHA und IL-2 verlieren die gewonnenen Lymphozyten ihre Proliferationsfähigkeit und werden rasch apoptotisch, wenn man der Kultur kein IL-2 mehr zuführt. In unseren Proliferationsassays konnten wir auch zeigen, daß die Zellen nach Kultur nur in Gegenwart von IL-2, aber nicht auf die Mitogene PHA, PWN oder ConA proliferieren. Eine Retransfusion dieser expandierten Zellen könnte jedoch unter der gleichzeitigen Applikation von IL-2 zu den Patienten erfolgen. Die Frage nach der Funktionsfähigkeit der nach der Kultur gewonnenen Zellen bleibt jedoch schwer zu beantworten.

Whiteside et al. und Ho et al. isolierten und expandierten vor allem CD8+ Lymphozyten bei HIV-infizierten Patienten. Dies beruht auf den Beobachtungen von Walker et al. 1986, daß humane spezifische zytotoxische CD8+ Lymphozyten (CTL) in der Lage sind, die HI-Virusreplikation in vitro zu hemmen. Daneben konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, daß durch eine in vitro Expansion von T-Lymphozyten und anschließende autologe Retransfusion die spezifische Immunabwehr von Tumorzellen, Bakterien (Mykobakterium), Viren (CMV und EBV) und Protozoen (Leishmanien) zu erreichen ist (Leveton et al., 1989; Reddehase et al., 1987; Murray et al. 1992; Lima et al., 1984). Im Unterschied zu anderen viralen Infeketen (CMV, EBV), bei denen verschiedene Tiermodelle den humanen Infektionen eine ähnliche Pathogenese aufweisen, ist der Affe (simian immunodeficiency virus (SIV)-infizierte Rhesus Affen) daß einzige Tiermodell, das der humanen HIV-Infektion ähnlich pathologische Charakteristika zeigt. Erst kürzlich konnte bei primär und chronisch SIV-infizierten Affen gezeigt werden, daß CD8+ Lymphozyten eine wesentliche Rolle bei der SI-Virusreplikation spielen. Durch die Applikation eines spezifischen Antikörpers, wurden bei den SIV-infizierten Affen CD8+ Lymphozyten depletiert. Bereits nach

11 Tagen kam es zu einer deutlichen Zunahme der Virämie (Schmitz et al., 1999). Ob eine Entnahme, die in vitro Kultivierung und Differenzierung der T-Zellen zu spezialisierten gegen virusinfizierte Zellen gerichtete zytotoxischen CD8+ Zellen oder zu spezifischen Antigen-präsentierenden Zellen auch bei SIV-infizierten Affen im Sinne einer adoptiven Zelltherapie möglich ist, Bedarf noch weiterer Erforschung (Letvin et al. 1992). Bis zu dem Zeitpunkt der Retransfusion der Zellen bei unseren HIV-positiven Patienten, haben sich vielleicht weitere erfolgs-versprechende Ergebnisse spezifischen in vitro Expansion ergeben oder in dem Bereich der Gentherapie (Siehe auch unter 4.1) und die isolierten Zellen können dann entsprechend behandelt und retransfundiert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorgestellten Arbeit ist die Grundlagenforschung zum innovativen Ansatz einer gezielten Therapie bei HIV-Patienten durch Restauration der zellulären immunologischen Kapazität bei ausgeprägter Immunschwäche.
Dazu wurden an HIV-infizierten Patienten zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung Lymphozyten durch die Lymphozytapherese entnommen. Diese wurden von den Patienten wie durch die Beobachtung klinischer und laborchemischer Parameter von bis zu zwei Jahren bestätigt, von allen gut vertragen und es kam zu keinen wesentlichen Nebenwirkungen. Die Patienten standen nach den durchgeführten Apheresen weitere 24 Monate unter klinischer und laborchemischer Kontrolle. Auch hier kam es zu keinen wesentlichen klinischen Verschlechterungen oder sichtbaren Veränderung der immunologischen Kapazität. Die Zellen wurden nach den Apheresen kryopräserviert, um später eine Rückgabe bei weiter fortgeschrittener Immundefizienz zu ermöglichen. In dem Untersuchungszeitraum von 10 Monaten zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen, der Viabilität und der Proliferationsfähigkeit der Zellen gegenüber dem Zeitpunkt der Kryopräservierung. Um eine quantitativ ausreichende Menge immunkompetenter Zellen autolog retransfundieren zu können, wurde die Möglichkeit einer in vitro Expansion untersucht. Die Zellen lassen sich in der Kultur um das 40fache expandieren und zeigen einen hochaktivierten Immunstatus, wie durch die FACS Analysen gezeigt werden konnte. Die potentielle Möglichkeit einer Restauration des Immunsystems bei weit fortgeschrittener Erkrankung ist direkt abhängig von der Überlebenszeit, dem Migrationsverhalten und der Immunfunktion von solchen expandierten und autolog retransfundierten T-Lymphozyten in vivo. Wie unsere Ergebnisse gezeigt haben, sind die Lymphozyten in einem weiteren Proliferationsassay nach der Kultur mit verschiedenen Mitogenen nicht mehr in der Lage zu expandieren. Die Expansionsfähigkeit zeigt sich jedoch durch die Zugabe von Interleukin-2. Die Substitution von gentechnisch hergestelltem Interleukin-2 bei HIV-infizierten Patienten ist technisch möglich und in klinischen Studien untersucht.

Ob eine Retransfusion kryopräservierter und später kulturell expandierter Lymphozyten bei HIV-Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung indiziert ist, läßt sich im Augenblick nicht absehen. Tierversuche an Primaten müßten einer solchen Entscheidung vorausgehen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adriaansen HJ, Osman C, Van Dongen JJ, Wijdenes-de Bresser JH, Kappetijn-van Tilborg CM, Hooijkaas H. Immunological marker analysis of mitogen-induced proliferating lymphocytes using BrdU incorporation or screening of metaphases. Staphylococcal protein A is a potent mitogen for CD4+ lymphocytes. Scand J Immunol 1990;32:687-94

Anderson PM, Bach FH, Ochoa AC. Augmentation of cell number and LAK activity in peripheral blood mononuclear cells activated with anti-CD3 and interleukin-2. Preliminary results in children with acute lymphocytic leukemia and neuroblastoma. Cancer Immunol Immunother 1988;27:82-8

Anderson P, Nagler-Anderson C, O´Brien C, Levine H, Watkins S, Slayter HS, Blue ML, Schlossman SF. A monoclonal antibody reactive with 15-kDa cytoplasmic granule-associated protein defines a subpopulation of CD8+ T lymphocytes. J Immunol 1990;144:574-82

Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. Immunol Today 1991;12:102-5

Baier M, Bannert N, Werner A, Adler HS, Otteken A, Beer B, Norley S, Kurth R. Chemoattractant factors and the control of human immunodeficiency virus replication. Pathobiology 1998;66:128-30

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983;220:868-71

Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1997;14:128-35

Chang JF, Thomas CA 3d, Kung JT. Induction of high level IL-2 production in CD4+8- T helper lymphocytes requires post-thymic development. J Immunol 1991;147:851-9

Chang JF, Thomas CA 3d, Kung JT. Mitogen-induced IL-2 production and proliferation at defined stages of T helper cell development. J Immunol 1991;147:860-6

Clerici M, Shearer GM. A T_H-1 --> T_H-2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. Immunol Today 1993;14:107-11

Crossland KD, Lee VK, Chen W, Riddell SR, Greenberg PD, Cheever MA. T cells from tomur-immune mice nonspecifically expanded in vitro with anti-CD3 plus IL-2 retain specific function in vitro and can eradicate disseminated leukemia in vivo. J Immunol 1991;146:4414-20

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. Nature 1993;362:359-62

Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho D, Richman D, Siliciano R. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science 1997;278:1295-300

Finzi D, Blankson J, Siliciano J, Margolick J, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano R. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistance of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. Nature 1999;5:512-17

Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS. Tumor necrosis factor α induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2365-8

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. Science 1984;224:500-3

Garzino-Demo A, DeVico AL, Gallo RC. Chemokine receptors and chemokines in HIV infection. J Clin Immunol 1998;18:243-55

Gervaix A, Schwarz L, Law P, Ho AD, Looney D, Lane T, Wong-Staal F. Gene therapy targeting peripheral blood CD34+ hematopoietic stem cells of HIV-infected individuals. Hum Gene Ther 1997;8:2229-38

Gougeon ML, Lecoeur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. J Immunol 1996;156:3509-20

Groux H, Torpier G, Monté D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. J Exp Med 1992;175:331-40

Heath SL, Tew JG, Szakal AK, Burton GF. Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. Nature 1995;377:740-4

Herberman RB. Adoptive therapy with purified CD8 cells in HIV infection. Sem Hematol 1992;Suppl 1-3:35-40

Heinkelein M, Sopper S, Jassoy C. Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. J Virol 1995;69:6925-31

Hester JP, Kellogg RM, Freireich EJ. Mononuclear cell (MNC) collection by continues-flow centrifugation (CFC). J Clin Aphareses 1990;1:197-201

Ho M, Armstrong J, McMahon D, Pazin G, Huang XL, Rinaldo C, Whiteside T, Tripoli C, Levine G, Moody D, Okarma T, Elder E, Gupta P, Tauxe N, Torpey D, Herberman RB. A phase 1 study of adoptive transfer of autologous CD8+ T lymphocytes in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-related complex or AIDS. Blood 1993;81:2093-101

Hufert FT, von Laer D, Schramm C, Tarnok A, Schmitz H. Detection of HIV-1 DNA in different subsets of human peripheral blood mononuclear cells using the polymerase chain reaction. Rapid communication. Arch Virol 1989;106:341-5

Hufert FT, von Laer D, Fenner TE, Schwander S, Kern P, Schmitz H. Progression of HIV-1 infection. Monitoring of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells by PCR. Arch Virol 1991;120:233-40

Hufert FT, van Lunzen J, Janossy G, Bertram S, Schmitz J, Haller O, Racz P, von Laer D. Germinal center CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. AIDS 1997;11:849-57

Klimas NG. Clinical impact of adoptive therapy with purified CD8 cells in HIV infection. Sem Hematol 1992;Suppl 1-3:40-43

Klimas NG, Patarca R, Walling J, Garcia R, Mayer V, Moody D, Okarma T, Fletcher MA. Clinical and immunological changes in AIDS patients following adoptive therapy with activated autologous CD8 T cells and interleukin-2 infusions. AIDS 1994;8:1073-81

Kvale D, Aukrust P, Osnes K, Müller F, Froland S. CD4+ and CD8+ lymphocytes and HIV RNA in HIV infection: high baseline counts and in particular rapid decrease of CD8+ lymphocytes predict AIDS. AIDS 1999;13:195-201

Law P, Lane TA, Gervaix A, Looney D, Schwarz L, Young D, Ramos S, Wong-Staal F, Recktenwald D, Ho AD. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for human immunodeficiency virus-infected individuals. Exp Hematol 1999;27:147-54

Lederman MM, Purvis SF, Walter EI, Carey JT, Medot ME. Heightend complement sensitivity of acquired immunodeficiency syndrome lymphocytes related to diminished expression of the decay-accelerating factor. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:4205-9

Letvin NL. Animal models for the study of human immunodeficiency virus infections. Curr Opin Immunol 1992;4:481-5

Leveton C, Barnass S, Champion B, Lucas S, De Souza B, Nicol M, Banerjee D, Rook G. T-cell-mediated protection of mice against Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immun 1989;57:390-5

Levine BL, Cotte J, Small CC, Carroll RG, Riley JL, Bernstein WB, Van Epps DE, Hardwick RA, June CH. Large-scale production of CD4+ T cellls from HIV-1-infected donors after CD3/CD28 costimulation. J Hematother 1998;7:437-48

Lima GC, Engers HD, Louis JA. Adoptive transfer of delayed type hypersensitivity reactions specific for Leishmania major antigens to normal mice using murine T cell populations and clones generated in vitro. Clin Exp Immunol 1984;57:130-8

Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science 1996;272:1167-70

Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeldt-Manson L, Asjo B, Wain-Hobson S. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. Cell 1989;58:901-10

Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, AI BJ, Roos M, Lange JM, Danner SA, Goudsmit J, et al. Immunological abnormalities in human immunodeficienvy virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. J Clin Invest 1988;82:1908-14

Moss AR. Predicting who will progress to AIDS. BMJ 1988;297:1067-8

Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, Thomas WA, Rowe M, Kieff E, Rickinson AB. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. J Exp Med 1992;176:157-68

Nardelli B, Gonzalez CJ, Schechter M, Valentine FT. CD4+ blood lymphocytes are rapidly killed in vitro by contact with autologous human immunodeficiency virus-infected cells. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7312-6

Oram JD, Downing RG, Roff M, Serwankambo N, Clegg JC, Featherstone AS, Booth JC. Sequence analysis of the V3 loop regions of the env genes of Ugandan human immunodeficiency proviruses. AIDS Res Hum Retroviruses 1991;7:605-14

Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DANN of peripheral blood mononuclear cells. Science 1988;239:295-7

Pantaleo G, Graciosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. Nature 1993;362:355-8

Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher MB, Cohen OJ, Denis F, Biddison WE, Sekaly RP, Fauci A. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:9848-53

Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho D. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. Nature 1997;387:188-91

Phillips AN, Lee CA, Elford J, Janossy G, Timms A, Bofill M, Kernoff PB. Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS. Lancet 1991;337:389-92

Racz P, Tenner-Racz K, Schmidt H. Follicular dendritic cells in HIV-induced lymphadenopathy and AIDS. APMIS Suppl 1989;8:16-23

Reimann KA, Tenner-Racz K, Racz P, Montefiori DC, Yasutomi Y, Lin W, Ransil BJ, Letvin NL. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. J Virol 1994;68:2362-70

Reddehase MJ, Mutter W, Munch K, Buhring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalievirus immediate-early antigens mediate protective immunity. J Virol 1987;61:3102-8

Reddy MM, Grieco MH. Quantitative changes in T helper inducer (CD4+ CD45RA+), T suppressor inducer (CD4+ CD45RA+), T suppressor (CD8+ CD11b+), and T cytotoxic (CD8+ CD11b-) subsets in human immunodeficiency virus infection. J Clin Lab Analysis 1991;5:96-100

Riddell SR, Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. J Immunol Methods 1990;128:189-201

Riddell SR, Greenberg PD, Overell RW, Loughran TP, Gilbert MJ, Lupton SD, Agosti J, Scheeler S, Coombs RW, Corey L. Phase I study of cellular adoptive immunotherapy using genetically modified CD8+ HIV-specific T cells for HIV seropositive patients undergoing allogenic bone marrow transplant. The Fred Hutchinson Cancer Research Center and the University of Washington School of Medicine, Department of Medicine, Division Oncology. Hum Gene Ther 1992;3:319-38

Riddler SA, Mellors JW. HIV-1 viral load and clinical outcome: review of recent studies. AIDS 1997;11(Suppl A):141-8

Roederer M, Herzenberg LA, Herzenberg L. Changes in antigen densities on leukocyte subsets correlate with progression of HIV disease. Int Immunol 1996;8:1-11

Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N Engl J Med 1988;319:1676-80

Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virological characteristics of primary HIV infection. Ann Intern Med 1998;128:613-20

Schmitz J, van Lunzen J, Tenner-Racz K, Grossschupff G, Racz P, Schmitz H, Dietrich M, Hufert FT. Follicular dendritic cells retain HIV-1 particels on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia. J Immunol 1994;153:1352-9

Schmitz J, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghrayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. Science 1999;283:857-60

Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, Thompson L, Baseler M, Massari F, Fox CH, Salzman NP, Fauci AS. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. Science 1989;245:305-8

Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justement JS, Baseler M, Fauci AS. Preferential infection of CD4+memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:6058-62

Slobod KS, Bennett TA, Freiden PJ, Kechli AM, Howlett N, Flynn PM, Head DR, Srivastava DK, Boyett JM, Brenner MK, Garcia JV. Mobilizarion of CD34+ progenitor cells by granulocyte colony-stimulating factor in human immunodeficiany virus type 1-infected individuals. Blood 1996;88:3329-35

Sleasman JW, Leon BH, Aleixo LF, Rojas M, Goodenow MM. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:653-8

Sorg C, Lohmann-Matthes ML. Macrophages and accessory cells of the immune system. Immunol Today 1989;8:S27-9

Stoter G, Goey SH, Eggermont AM, Slingerland R, Braakman E, Lamers C, Bolhuis RL. Interleukin-2. The experience of the Rotterdam Cancer Institute; Daniel den Hoed Kliniek. Biotherapy 1990;2:261-5

Sprent J, Schaefer M. Antigen-presenting cells for unprimed T cells. Immunol Today 1989;10:17-23

Tollerud DJ, Brown LM, Clark JW, Neuland CY, Mann DL, Pankiw-Trost LK, Blattner WA. Cryopreservation and long-term liquid nitrogen storage of peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry analysis: effects on cell subset proportions and fluorescence intesity. J Clin Lab Anal 1991;5:255-61

Tyler DS, Stanley SD, Nastala CA, Austin AA, Bartlett JA, Stine KC, Lyerly HK, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV-1infection. Humoral and cellular defects. J Immunol 1990;144:3375-84

Walker BD, Flexner C, Birch-Limberger K, Fisher L, Paradis TJ, Aldovini A, Young R, Moss B, Schooley RT. Long-term culture and fine specificity of human cytotoxic T-lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:9514-8

Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. Science 1986;234:1563-6

Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ T lymphocyte control of HIV replication in cultured CD4+ cells varies among infected individuals. Cell Immunol 1989;119:470-5

West WH, Tauer KW, Yannelli JR, Marshall GD, Orr DW, Thurman GB, Oldham RK. Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. N Engl J Med 1987;316:898-905

Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window of the lymphoid system?. Immunol Today 1990;11:406-10

Weiss L, Okada N, Haeffner-Cavaillon N, Hattori T, Faucher C, Kazatchkine MD, Okada H. Decreased expression of the membrane inhibitor of complement-mediated cytolysis CD59 on T-lymphocytes of HIV-infected patients. AIDS;6:379-85

Whiteside TL, Elder EM, Moody D, Armstrong J, Ho M, Rinaldo C, Huang X, Torpey D, Gupta P, McMahon D, et al. Generation and characterization of ex vivo propagated autologous CD8+cells used for adoptive immunotherapy of patients infected with human immunodeficiency virus. Blood 1993;81:2085-92

Wong JT, Eylath AA, Ghobrail I, Colvin RB. The mechanism of anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation of cytolysis by inter-T cell bridging. Transplantation 1990;50:683-9

Wolfs TF, Zwart G, Bakker M, Valk M, Kiuken CL, Goudsmit J. Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution. Virology 1991;185:195-205

Vidal C, Garcia F, Romeu J, Riuz L, Miro JM, Cruceta A, Soriano A, Pumarola T, Bonaventura C, Gatell JM. Lack of evidence of a stable viral load set-point in early stage asymptomatic patients with chronic HIV-1 infection. AIDS 1998;12:1285-9

Yarchoan R, Venzon DJ, Pluda JM, Lietzau J, Wyvill KM, Tsiatis AA, Steinberg SM, Broder S. CD4 count and the risk for death in patients infected with HIV receiving antiretroviral therapy. Ann Intern Med 1991;115:184-9

Zagury D, Bernard J, Leonard R, Cheynier R, Feldman M, Sarin PS, Gallo RC. Long-term cultures of HTLV-III-infected T cells: A model of cytopathology of T-cell depletion in AIDS. Science 1986;231:850-53

Zhang BL, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanicolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho D. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-infected individuals before and after therapy. J Exp Med 1999;190:725-32

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AIDS	Aquired immune deficiency syndrome
AIM-V	Serumfreies Kulturmedium
AZT	Zidovudin: Nukleosidanaloga; Nekleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
BSA	Bovine serum albumin: Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation: international standadisierte Nomenklatur für Antigene auf der Zelloberfläche. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen diese antigenen Determinanten können Zellpopulationen differenziert werden
ConA	Concanavalin A: ein als Mitogen verwendetes Protein
CMV	Cytomegalovirus: Zytomegalievirus
DDC	Zalcitabin; siehe unter AZT
DDI	Didanosin; siehe unter AZT
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxiribonucleid acid: Desoxyribonukleinsäure (DNS)
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluorescent activated cell sorter: Fluoreszenz-zellsorter
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FITC	Flourescein-isothiocyanat (Fluoreszenz)
HLA	Human leucocyte antigen
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukine
LAK	Lymphokine-activated-killing cells: Lymphokinaktivierte Zellen
LDL	Low density lipoprotein; Lipoprotein mit niedrigen spezifischen Gewicht
mAk	Monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex; Haupthisto-kompatibilitätskomplex
NK-Zellen	„Natural-killer„-Zellen
Tc-Zellen	Zytotoxische Zelle
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells: periphere Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline: mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenz)
PerCP	Peridin chlorophyll-a protein complex (Fluoreszenz)
PHA	Phythämagglutinin: ein T-Zell-Mitogen
PWM	Pokeweed-Mitogen

8. LABORPARAMETER DER PATIENTEN IM VERLAUF

Patient 1

	Apheresen:	**25.11.92**	**30.11.92**	**22.12.92**					
	Einheiten	25.11.92	26.11.92	30.11.92	02.12.92	22.12.92	15.04.93	12.08.94	01.12.94
Hb	g/dl	15,7	13,9	14,4	12,9	14,8	13,9	14,9	15
Hkt	L/L	44,2	41,5	40,7	37,5	41,8	39,9	43,9	42
WBC	$x10^9$	8,3	7,4	6,8	5,8	3,9	3,3	4,9	6,8
RBC	$x10^9$	4,77	4,43	4,46	4,05	4,45	4,28		4,56
MCV	fl	92,7	93,5	91,2	92,4	93,8	93,4		92,2
MCH	pg	32,9	31,3	32,3	32	33,2	32,5		33
MCHC	g/dl	35,4	33,5	35,4	34,6	35,4	35,3		35,8
Thrombos	x1000/µl	192	148	205	125	103	79	191	172
Eosinophile	%	1	1	2	0	3	4	7	0
Basophile	%	1	2	0	0	0	0	0	0
Neutrophile	%	64	70	65	67	47	53	49	84
Lymphozyten	%	34	26	29	30	43	38	29	15
Monozyten	%	0	0	4	3	7	5	13	1
Stabkernige	%	22	24	3	5	14	6		6
Segmentkernige	%	42	46	62	62	33	47		78
CD 4 absolut	pro µl	200	470	530	260	340			310
CD 4 relativ	%	17	37	34	32	30			28
CD 8 absolut	pro µl	600	830	840	450	540			480
CD 8 relativ	%	52	66	54	56	48			43
Ratio		0,33	0,566	0,631	0,577	0,629			0,615
Lymphos abs	pro µl	1160	1260	1560	810	1130			1010
Lymphos rel.	%	14	17	23	14	29			23
Monos abs.	pro µl	330		410	350	350			390
Monos rel.	%	4		6	6	9			7
Granulos abs.	pro µl	6810	6140	4900	4580	2420			2500
Granulos rel.	%	82	83	72	79	62			68
Total T-cells abs.	pro µl	680	1080	1290	700				810
Total T-cells rel.	%	59	86	83	86				84
Total B-cells abs.	pro µl	90	100	90	60				80
Total B-cells rel.	%	8	8	6	7				7
Activated T-cells abs.	pro µl	130	190	250	150				130
Activated T-cells rel.	%	11	15	16	19				16
NK-cells abs.	pro µl	120	180	160	70				110
NK-cells rel.	%	10	14	10	9				12
Quick %		128	107	114	100	114	107	103	100
Quick	Sekunden	11,8	12,9	12,5	13,4	12,5	12,9		12,6
PTT	Sekunden	20,7	24,9	27	26,3	26,3	25,5	28,4	27,2
Fibrinogen	mg/dl	426	401	318	344	294	269	392	380
BSG	1.Std								
Neopterin	nmol/l	14	12	10					
Haptoglobin	mg/dl	570		480	470				
Kreatinin	mg/dl	0,9	0,9	1	0,9			0,9	0,7
Harnsäure	mg/dl	4,2	3,5	3,1	4,2				5,3
GOT	U/l	9	8	10	10			13	10
GPT	U/l	16	14	18	17			13	19
GGT	U/l	15	13	19	15				19
LDH	U/l	161	132	165	143				176
Lipase	U/l								
Amylase	U/l								
Cholinesterase	U/l								
APH	U/l								
Bilirubin ges.	mg/dl	0,4	0,3	0,5	0,4				
Natrium	mmol/l	144	144	138	136	141	140	136	138
Kalium	mmol/l	4	3,8	4,1	3,6	4,1	3,9	4	4
Calcium	mmol/l	2,2	2,2	2,1	2	2,2	2,3	2,2	2,4
Chlorid	mmol/l								
Gesamt Eiweiß	g/l	66	58	62	53				69
Albumin	g/l	41,9	35,8	36,2	30,5				58,8
	%	63,5	61,8	58,4	57,5				40,5
alpha 1	g/l	2,3	2,1	2,6	2,3				3
alpha 2	g/l	6,3	5,6	7,1	6,1				7,2
beta	g/l	7,2	6,7	7	6,2				7,7
gamma	g/l	8,1	7,1	8,9	7,7				10,3
IgG	mg/dl	910		910	860				
IgA	mg/dl	190		250	150				
IgM	mg/dl	190		210	180				

Patient 2

	Apheresen:	**04.11.92**	**26.11.92**	**29.06.93**				
	Einheiten:	16.10.92	04.11.92	11.11.92	19.11.92	26.11.92	03.12.92	29.06.93
Hb	g/dl	16,3	14,6	15,7	16,6	16,1	15	14,5
Hkt	L/L	46,7	40,9	43,7	45,5	46,5	42,3	42,5
WBC	$x10^9$	5,1	5,1	6,2	7,2	7,6	6	5,9
RBC	$x10^9$l	5,42		5,11	5,26	5,35	4,95	5,14
MCV	fl	86,1		85,6	86,4	86,9	85,5	83
MCH	pg	30		30,8	31,6	30,2	30,3	28,2
MCHC	g/dl	34,8		36	36,5	34,7	35,4	34,1
Thrombos	x1000/µl	214	197	223	234	241	218	178
Eosinophile	%	5		9	8	2	2	1
Basophile	%	2		0	0	1	0	1
Neutrophile	%	45	44	45	42	44	42	49
Lymphozyten	%	42	46	38	41	51	53	38
Monozyten	%	6		8	9	2	3	11
Stabkernige	%	3		2	11	1	0	5
Segmentkernige	%	42		43	31	43	42	44
CD 4 absolut	pro µl	430		610	550	1040	870	590
CD 4 relativ	%	35		31	32	37	37	30
CD 8 absolut	pro µl	620		990	920	1320	1080	1050
CD 8 relativ	%	45		50	53	47	46	54
Ratio		0,77		0,62	0,597	0,787	0,805	0,56
Lymphos abs	pro µl	1380		1980	1730	2810	2340	1950
Lymphos rel.	%	27		32	24	37	39	33
Monos abs.	pro µl	360		560	430	460	420	590
Monos rel.	%	7		9	6	6	7	10
Granulos abs.	pro µl	3370		3660	4970	4330	3240	3360
Granulos rel.	%	66		59	69	57	54	57
Total T-cells abs.	pro µl	1080		1580	1380	2330	1900	
Total T-cells rel.	%	78		80	80	83	81	
Total B-cells abs.	pro µl	170		200	120	220	160	
Total B-cells rel.	%	12		10	7	8	7	
Activated T-cells abs.	pro µl	30		530	570	980	560	
Activated T-cells rel.	%	2		27	33	35	24	
NK-cells abs.	pro µl	190		180	210	280	260	
NK-cells rel.	%	14		9	12	10	11	
Quick %		86	82	87	99	101	106	93
Quick	Sekunden							
PTT	Sekunden	31,7	31,7	32,3	34	31,6	34,9	25,4
Fibrinogen	mg/dl	423	261	249	328	267	282	196
BSG								
Neopterin	nmol/l	6		19	12	8	12	
Haptoglobin	mg/dl	85		81		131	80	
Kreatinin	mg/dl	0,7		1,1	1	1	1	
Harnsäure	mg/dl	5,4				4,5	5,6	
GOT	U/l	14		15	13	14	16	
GPT	U/l	17		16	12	12	18	
GGT	U/l	9		9	8	8	9	
LDH	U/l	157		177	172	167	173	
Lipase	U/l							
Amylase	U/l							
Cholinesterase	U/l							
APH	U/l							
Bilirubin ges.	mg/dl	2,3		2,2	1,7	1,2		
Natrium	mmol/l	139		145	141	142	140	141
Kalium	mmol/l	4,1		3,9	4,3	4,1	4,6	3,7
Calcium	mmol/l	2,3		2,3	2,4	2,4	2,4	2,3
Chlorid	mmol/l							
Gesamt Eiweiß	g/l	74			76	75	71	
Albumin	g/l	51,9			51,3	50	46,6	
	%	70,2			67,6	66,7	65,7	
alpha 1	g/l	2			2,2	2,6	2,3	
alpha 2	g/l	3,8			4,4	4,8	4,3	
beta	g/l	5,4			6	6,3	7	
gamma	g/l	10,7			11,8	11,1	10,5	
IgG	mg/dl	1580				1570	1560	
IgA	mg/dl	270				284	190	
IgM	mg/dl	176				186	230	

Patient 2

	Einheiten:	30.06.93	06.07.93	16.09.93	18.01.94	21.09.94	10.05.95
Hb	g/dl	13,8	14,8	15	15,3	14,7	14
Hkt	L/L	41,2	40,1	46,6	42,6	44,7	41,2
WBC	$x10^9$	4,6	5,6	5,6	5,8	6,4	6,7
RBC	$x10^9$	4,97	4,67	5,35	4,95	5,33	4,73
MCV	fl	83	85,7	87			87
MCH	pg	27,7	31,8	28			29,5
MCHC	g/dl	33,4	37,1	32,1			33,9
Thrombos	x1000/µl	111	188	194	195	220	162
Eosinophile	%	1		16			4
Basophile	%	0		1			0
Neutrophile	%	53		51			65
Lymphozyten	%	38		27			25
Monozyten	%	8		5			6
Stabkernige	%	1		1			3
Segmentkernige	%	52		50			62
CD 4 absolut	pro µl	470	720	610	530	570	420
CD 4 relativ	%	26	33	33	24	29	37
CD 8 absolut	pro µl	1000	1110	870	1300	1070	480
CD 8 relativ	%	56	51	47	59	54	42
Ratio		0,47	0,649	0,7	0,41	0,53	0,875
Lymphos abs	pro µl	1790	2180	1850	2200	1980	1140
Lymphos rel.	%	39	39	33	38	31	17
Monos abs.	pro µl	460		340	350	510	470
Monos rel.	%	10		6	6	8	7
Granulos abs.	pro µl	2350	3420	3420	3250	3900	5160
Granulos rel.	%	51	61	61	56	61	77
Total T-cells abs.	pro µl			1480	1890	1640	910
Total T-cells rel.	%			80	86	83	80
Total B-cells abs.	pro µl			190	130	260	140
Total B-cells rel.	%			10	6	13	12
Activated T-cells abs.	pro µl			540		710	260
Activated T-cells rel.	%			29		36	23
NK-cells abs.	pro µl			110	150	140	70
NK-cells rel.	%			6	7	7	6
Quick %		91		100		86	84
Quick	Sekunden			12,6		14	
PTT	Sekunden	29,3		39,3		34,4	34
Fibrinogen	mg/dl	216		280		319	221
BSG							
Neopterin	nmol/l			10		12	8
Haptoglobin	mg/dl			0,7			95
Kreatinin	mg/dl	1	0,9	0,9		0,9	1
Harnsäure	mg/dl	5,7		6,8			2,9
GOT	U/l	22	17	13		20	11
GPT	U/l	36	18	16		22	10
GGT	U/l	9	10	10		10	7
LDH	U/l	158	193	149		182	143
Lipase	U/l						
Amylase	U/l						
Cholinesterase	U/l						
APH	U/l						
Bilirubin ges.	mg/dl			2			0,9
Natrium	mmol/l	143	144	140		145	140
Kalium	mmol/l	4,1	4	4,4		3,9	3,8
Calcium	mmol/l	2,3	2,2	2,3		2,4	2,3
Chlorid	mmol/l					108	
Gesamt Eiweiß	g/l			74			63
Albumin	g/l			50,8			41,9
	%			68,6			66,5
alpha 1	g/l			1,9			2,1
alpha 2	g/l			3,9			3,8
beta	g/l			5,5			5,4
gamma	g/l			11,7			9,5
IgG	mg/dl			1560		2052	1340
IgA	mg/dl			230		242	231
IgM	mg/dl			220		196	158

Patient 3

	Apheresen:	**13.07.93**	**03.09.93**	**01.02.94**			
	Einheiten:	24.02.93	28.04.93	13.07.93	14.07.93	20.07.93	03.09.93
Hb	g/dl	14,1	15,4	11,4	15,8	15,1	15,6
Hkt	L/L	39,8	47,5	32,9	39,5	45,6	44,7
WBC	$x10^9$	8,2	5,9	3,9	7	6,9	5,4
RBC	$x10^9$	4,64	5,69	3,92	4,74	5,56	4,85
MCV	fl	85,7	83	83,9	83,3	82	92,1
MCH	pg	30,5	27	29	33,3	27,1	32,3
MCHC	g/dl	35,6	32,4	34,5	39,9	33,1	35
Thrombos	x1000/µl	188	148	188	64	117	128
Eosinophile	%	5	6	4		2	2
Basophile	%	0	0	0		0	1
Neutrophile	%	32	50	39		52	51
Lymphozyten	%	34	40	39		37	36
Monozyten	%	9	4	18		8	10
Stabkernige	%	2	1	2		5	1
Segmentkernige	%	50	49	37		47	50
CD 4 absolut	pro µl	300	200	270	240	240	230
CD 4 relativ	%	13	13	37	15	18	25
CD 8 absolut	pro µl	1400	950	850	1000	900	660
CD 8 relativ	%	61	62	64	62	67	72
Ratio		0,21	0,21	0,317	0,24	0,266	0,348
Lymphos abs	pro µl	2300	1530	1330	1610	1340	920
Lymphos rel.	%	28	26	34	23	21	17
Monos abs.	pro µl	660	530	230	140	260	220
Monos rel.	%	28	9	6	2	4	4
Granulos abs.	pro µl	5250	3890	2340	5250	4800	4270
Granulos rel.	%	64	66	60	75	75	79
Total T-cells abs.	pro µl	1700	1130				
Total T-cells rel.	%	74	74				
Total B-cells abs.	pro µl	210	120				
Total B-cells rel.	%	9	8				
Activated T-cells abs.	pro µl	510	290				
Activated T-cells rel.	%	22	19				
NK-cells abs.	pro µl	370	310				
NK-cells rel.	%	16	20				
Quick %				78			89
Quick	Sekunden			14,4			14
PTT	Sekunden			28,3			40,8
Fibrinogen	mg/dl			194			217
BSG	1.Std						
Neopterin	nmol/l		9			85	
Haptoglobin	mg/dl						
Kreatinin	mg/dl	0,9	0,8	0,7	0,9	1	
Harnsäure	mg/dl					5,8	
GOT	U/l	14	10	18	12	12	
GPT	U/l	22	11	13	14	14	
GGT	U/l	10	8	4	6	8	
LDH	U/l	364	185	219	183	191	
Lipase	U/l			109	60		
Amylase	U/l			46			
Cholinesterase	U/l			1874	1543		
Bilirubin ges.	mg/dl						
Natrium	mmol/l			141	142	142	144
Kalium	mmol/l		3,8	3,9	4,1	3,7	3,5
Calcium	mmol/l			2,4	2,2	2,2	2,2
Chlorid	mmol/l			106		105	
Gesamt Eiweiß	g/l			70		74	
Albumin	g/l			44,8		47,8	
	%			63,8		64,6	
alpha 1	g/l			2		1,7	
alpha 2	g/l			4,6		4,1	
beta	g/l			6,7		6,9	
gamma	g/l			11,7		133	
IgG	mg/dl		1620			2100	
IgA	mg/dl		501			470	
IgM	mg/dl		96			100	

Patient 3

	Einheiten:	04.09.93	09.09.93	14.01.94	01.02.94	02.03.95
Hb	g/dl	14,8	14,7	16,3	16,9	15,3
Hkt	L/L	42,4	42,8	47	48,9	47
WBC	$x10^9$	5,9	5,4	6	6	4,5
RBC	$x10^9$	4,71	4,67	5,41	5,7	5,63
MCV	fl	91,1	91,6	86,8	85,8	83
MCH	pg	31,6	31,4	30,1	29,7	27,1
MCHC	g/dl	34,6	34,3	34,7	34,6	32,5
Thrombos	x1000/µl	112	136	95	84	60
Eosinophile	%	2	2			8
Basophile	%	1	0			0
Neutrophile	%	54	63			56
Lymphozyten	%	34	28			29
Monozyten	%	9	7			7
Stabkernige	%		1			
Segmentkernige	%		62			
CD 4 absolut	pro µl	290	160	260	230	270
CD 4 relativ	%	17	19	20	15	23
CD 8 absolut	pro µl	860	670	810	960	640
CD 8 relativ	%	50	78	61	64	55
Ratio		0,337	0,238	0,32	0,24	0,42
Lymphos abs	pro µl	1710	860	1320	1500	1170
Lymphos rel.	%	29	16	22	25	26
Monos abs.	pro µl	120	110	360	120	540
Monos rel.	%	2	2	6	2	12
Granulos abs.	pro µl	4070	4430	4320	4320	2840
Granulos rel.	%	69	82	72	72	63
Total T-cells abs.	pro µl		720	1020		850
Total T-cells rel.	%		84	77		73
Total B-cells abs.	pro µl		90	90		140
Total B-cells rel.	%		11	7		12
Activated T-cells abs.	pro µl		210	280		210
Activated T-cells rel.	%		24	21		18
NK-cells abs.	pro µl		90	210		130
NK-cells rel.	%		11	16		11
Quick %			96		99	
Quick	Sekunden		13,9		13,3	
PTT	Sekunden		40,6		41,2	
Fibrinogen	mg/dl		194		278	
BSG	1.Std					
Neopterin	nmol/l		15			18
Haptoglobin	mg/dl		180			
Kreatinin	mg/dl	1	0,9			
Harnsäure	mg/dl	4,8	5,9			
GOT	U/l	10	13			
GPT	U/l	10	11			
GGT	U/l	6	7			
LDH	U/l	216	176			
Lipase	U/l					
Amylase	U/l					
Cholinesterase	U/l					
Bilirubin ges.	mg/dl		0,4			
Natrium	mmol/l	141	148			
Kalium	mmol/l	3,5	4,2			
Calcium	mmol/l	2,3	2			
Chlorid	mmol/l					
Gesamt Eiweiß	g/l		70			
Albumin	g/l		46,1			
	%		65,8			
alpha 1	g/l		1,8			
alpha 2	g/l		3,9			
beta	g/l		6			
gamma	g/l		11,9			
IgG	mg/dl		1690			
IgA	mg/dl		430			
IgM	mg/dl		110			

Patient 4

	Apheresen:	18.02.93	25.03.93	01.07.93					
	Einheiten:	11.02.93	18.02.93	19.02.93	24.02.93	25.03.93	26.03.93	01.04.93	01.07.93
Hb	g/dl	15,5	16,4	15,4	15,5	14,7	14,3	14,4	15,5
Hkt	l/l	44,2	47	43,6	42,1	44,4	42,1	42,7	39
WBC	$x10^9$	6,3	4,3	4,7	3,7	3,7	3,4	3,9	4,1
RBC	$x10^9$		5,33	4,9	4,78	5,08	4,82	4,95	4,43
MCV	fl		88,1	88,8	88	87	87	86	87,9
MCH	pg		30,7	31,4	32,3	28,9	29,6	29	34,9
MCHC	g/dl		34,9	35,3	36,7	33,1	33,9	33,7	39,7
Thrombos	x1000/µl	232	262	195	221	226	158	198	208
Eosinophile	%		2	1	1	3	0	0	6
Basophile	%	71	0	0	1	0	0	0	2
Neutrophile	%	20	44	31	47	50	46	43	39
Lymphozyten	%	6	38	42	38	42	48	51	27
Monozyten	%		16	6	13	5	6	6	26
Stabkernige	%		8	2	18	1	3	12	1
Segmentkernige	%		36	49	29	49	43	31	38
CD 4 absolut	pro µl	370	440	460	350	260	290	470	450
CD 4 relativ	%	33	30	29	25	24	25	30	28
CD 8 absolut	pro µl	470	540	700	560	540	510	700	670
CD 8 relativ	%	42	37	44	40	56	44	45	42
Ratio		0,787	0,815	0,657	0,625	0,48	0,568	0,67	0,67
Lymphos abs	pro µl		1460	1600	1410	1070	1160	1560	1600
Lymphos rel.	%		34	34	38	29	34	40	39
Monos abs.	pro µl		520	420	410	370	340	430	410
Monos rel.	%		12	9	11	10	10	11	10
Granulos abs.	pro µl		2370	2680	1810	2220	1900	1950	2090
Granulos rel.	%		55	57	51	60	56	550	51
Total T-cells abs.	pro µl	840	930					1140	
Total T-cells rel.	%	74	64					73	
Total B-cells abs.	pro µl	60	90					60	
Total B-cells rel.	%	5	6					4	
Activated T-cells abs.	pro µl	140	60					220	
Activated T-cells rel.	%	12	4					14	
NK-cells abs.	pro µl	260	390					390	
NK-cells rel.	%	23	27					25	
Quick %		136	131	122	124	139	121	132	117
Quick	Sekunden		11,7	12,1	12	11,4	1,7	11,3	11,9
PTT	Sekunden	25,8	26	25,3	25,5	25	242	22,9	22,9
Fibrinogen	mg/dl	290	233	225	242	205	215	184	205
BSG	1.Std	20							
Neopterin	nmol/l	14						12	
Haptoglobin	mg/dl	320			240			210	
Kreatinin	mg/dl	1		0,9	0,9		0,9	0,9	
Harnsäure	mg/dl			6,4	7,2		6	4,8	
GOT	U/l	11		11	15		10	13	
GPT	U/l	16		12	15		12	15	
GGT	U/l	17		16	16		15	15	
LDH	U/l	168		144	180		144	195	
Bilirubin ges.	mg/dl	0,3			0,6				
Natrium	mmol/l	136	143	142	137	141	140		139
Kalium	mmol/l	3,8	4	4,3	4,2	4,5	4,2		4,1
Calcium	mmol/l	2,3	2,4	2,3	2,3	2,3	2,2		2,2
Chlorid	mmol/l								
Gesamt Eiweiß	g/l	85						77	
Albumin	g/l	51,3						46,9	
	%							61	
alpha 1	g/l	2,7						1,9	
alpha 2	g/l	6,8						5,7	
beta	g/l	6,7						7,2	
gamma	g/l	16,2						15	
IgG	mg/dl	2110						2410	
IgA	mg/dl	330						320	
IgM	mg/dl	210						180	

Patient 4

	Einheiten:	02.08.93	08.09.93	24.09.93	16.10.93	03.06.94	08.11.94	03.05.05
Hb	g/dl	13,4	14,9	14,2	14	13,7	13,8	13,4
Hkt	l/l	39,5	39,5	42	43,6	39,8	41,9	38
WBC	$x10^9$	4,3	3,7	3,6	4,5	4,8	5,4	3,6
RBC	$x10^9$	4,7	4,54	5,01	5,08	4,61	4,98	4,23
MCV	fl	84	87	84	86	86,3	84,2	89,8
MCH	pg	28,5	32,7	28,3	27,5	29,7	27,6	31,8
MCHC	g/dl	33,9	37,8	31,6	32,1	34,5	32,6	35,4
Thrombos	x1000/µl	124	197	218	222	253	162	130
Eosinophile	%	2	6	2	3	2	0	
Basophile	%	0	0	3	1	0	0	
Neutrophile	%	55	35	46	42	52	49	
Lymphozyten	%	32	36	40	39	43	39	
Monozyten	%	11	22	8	15	3	9	
Stabkernige	%	4		6	1	5	3	
Segmentkernige	%	51		40	41	49	46	
CD 4 absolut	pro µl	420	320	350	540	390	340	360
CD 4 relativ	%	25	29	34	30	25	25	31
CD 8 absolut	pro µl	770	460	580	880	710	560	530
CD 8 relativ	%	46	41	56	49	46	41	45
Ratio		0,545	0,696	0,6	0,614	0,549	0,61	0,679
Lymphos abs	pro µl	1680	1110	1040	1800	1540	1370	1170
Lymphos rel.	%	31	30	29	40	32	35	39
Monos abs.	pro µl	390	220	140	590	430	200	270
Monos rel.	%	9	6	4	13	9	5	9
Granulos abs.	pro µl	2240	2370	2410	2120	2880	2300	1560
Granulos rel.	%	52	64	67	47	60	59	52
Total T-cells abs.	pro µl				1280	1170	1000	
Total T-cells rel.	%				71	76	73	
Total B-cells abs.	pro µl				110	90	40	
Total B-cells rel.	%				6	6	3	
Activated T-cells abs.	pro µl				290	550	410	
Activated T-cells rel.	%				16	36	30	
NK-cells abs.	pro µl				430	280	260	
NK-cells rel.	%				24	18	19	
Quick %		114	117	128			112	
Quick	Sekunden	12	11,9	12			12,2	
PTT	Sekunden	24,1	24,5	32,6			31,4	
Fibrinogen	mg/dl	178	227	269			439	
BSG	1.Std							
Neopterin	nmol/l			15	17	15		
Haptoglobin	mg/dl			380				
Kreatinin	mg/dl	1	1	1	1,3	1,2	1	
Harnsäure	mg/dl	5,7		7,9				
GOT	U/l	11	10	12	12	14	15	
GPT	U/l	14	12	16	16	13	20	
GGT	U/l	13	14	17	16	15		
LDH	U/l	145	177	189	151	165	195	
Bilirubin ges.	mg/dl			0,4				
Natrium	mmol/l	141		142			127	
Kalium	mmol/l	4	4,5	4,2		4,4	4	
Calcium	mmol/l	2,1	2,1	2,2			2,4	
Chlorid	mmol/l						91	
Gesamt Eiweiß	g/l			76			80	
Albumin	g/l			47,8				
	%			62,9				
alpha 1	g/l			1,4				
alpha 2	g/l			5,4				
beta	g/l			6,3				
gamma	g/l			14,9				
IgG	mg/dl			2260	2317	2930	1690	
IgA	mg/dl			217	235	341	240	
IgM	mg/dl			419	166	202	130	

Patient 5

	Apheresen:	**10.12.92**						
	Einheiten:	16.10.92	10.12.92	11.12.92	16.12.92	11.03.93	06.07.93	15.11.93
Hb	g/dl	17,8	16,9	16,6	16,6	15,7	16,5	14,2
Hkt	L/L	49,4	46,4	44,9	47,2	44	50	44,6
WBC	$x10^9$	5,6	6	6	5,3	7,9	5,9	6
RBC	$x10^9$	5,49	5,22	4,96	5,25	5,02	5,87	5,11
MCV	fl	90	88,8	90,4	90	87,6	85	87
MCH	pg	32,4	32,2	32,9	31,7	31,3	28,1	27,7
MCHC	g/dl	36	36,4	36,4	35,2	35,7	33	31,8
Thrombos	x1000/µl	169	149	120	140	146	105	156
Eosinophile	%	1	1	2	0	1	1	1
Basophile	%	0	0	0	0	0	1	0
Neutrophile	%	58	59	58	53	54	32	31
Lymphozyten	%	35	34	35	41	38	37	43
Monozyten	%	6	6	4	6	6	7	0
Stabkernige	%	5	10		11	28	16	9
Segmentkernige	%	53	49		42	26	16	42
CD 4 absolut	pro µl	370	300	360	330	300	230	
CD 4 relativ	%	20	15	17	17	11	9	
CD 8 absolut	pro µl	1240	1430	1450	1370	1990	2110	
CD 8 relativ	%	67	72	69	70	74	83	
Ratio		0,298	0,12	0,248	0,24	0,15	0,109	
Lymphos abs	pro µl	1850	1980	2100	1960	2690	2540	
Lymphos rel.	%	33	33	35	37	34	43	
Monos abs.	pro µl	340	420	480	420	550	470	
Monos rel.	%	7	7	8	8	7	8	
Granulos abs.	pro µl	3360	3600	3420	2860	4740	2890	
Granulos rel.	%	60	60	57	54	60	49	
Total T-cells abs.	pro µl	1570			1650	2310	2290	
Total T-cells rel.	%	85			84	86	90	
Total B-cells abs.	pro µl	200			180	220	130	
Total B-cells rel.	%	11			9	8	5	
Activated T-cells abs.	pro µl	670			1000	860	1520	
Activated T-cells rel.	%	36			51	32	60	
NK-cells abs.	pro µl	70			140	110	100	
NK-cells rel.	%	4			7	4	4	
Quick %		100	128	101	104			
Quick	Sekunden	12,8	11,8	13,3	13,1			
PTT	Sekunden	26,7	26,1	27,3	28			
Fibrinogen	mg/dl	355	184	167	211			
BSG	1.Std							
Neopterin	nmol/l	16			16	62	30	49
Haptoglobin	mg/dl	227			240			250
Kreatinin	mg/dl	0,6		0,7	0,8	0,9		0,9
Harnsäure	mg/dl	4,8		2,3	3,1			
GOT	U/l	12		12	12	14		31
GPT	U/l	12		16	19	11		47
GGT	U/l	13		12	14			26
LDH	U/l	141		158	157			150
Lipase	U/l							
Amylase	U/l							
Cholinesterase	U/l							
APH	U/l							
Bilirubin ges.	mg/dl	1,1						
Natrium	mmol/l	141	146	145	141			
Kalium	mmol/l	3,9	4,2	4,1	4,3			4
Calcium	mmol/l	2,3	2,3	2,3	2,1			
Chlorid	mmol/l							
Gesamt Eiweiß	g/l	84			79			81
Albumin	g/l	33,7			42,5			45,6
	%	63,9			53,9			56,3
alpha 1	g/l	2,3			3,1			1,7
alpha 2	g/l	4,9			6,3			5,2
beta	g/l	6,6			7,5			5,7
gamma	g/l	16,3			19,4			22,7
IgG	mg/dl	2180			2190			2810
IgA	mg/dl	535			530			630
IgM	mg/dl	253			300			360

Patient 5

	Einheiten:	10.02.94	29.03.94	27.04.94	25.05.94	12.07.94
Hb	g/dl	14,8	13,9	14	14,6	15
Hkt	L/L	48	41,6	41,7	42	47
WBC	$x10^9$	8,1	7,4	6,9	6,8	64
RBC	$x10^9$	5,51	4,55	4,29	4,19	4,66
MCV	fl	86	91	97,1	101,3	
MCH	pg	26,4	30,5	32,7	34,9	
MCHC	g/dl	30,8	33,4	33,7	34,4	
Thrombos	x1000/µl	120	149	201	185	162
Eosinophile	%	1	1	2	0	1
Basophile	%	0	0	0	0	0
Neutrophile	%	41	57	53	50	48
Lymphozyten	%	59	33	40	40	44
Monozyten	%	9	9	6	10	7
Stabkernige	%	5	3	8	10	17
Segmentkernige	%	36	54	45	40	31
CD 4 absolut	pro µl	150	200	170	250	170
CD 4 relativ	%	4	6	7	7	6
CD 8 absolut	pro µl	3250	2760	2150	3080	2310
CD 8 relativ	%	89	83	89	87	82
Ratio		0,046	0,072	0,079	0,081	0,074
Lymphos abs	pro µl	3650	3300	2420	3540	2820
Lymphos rel.	%	45	45	35	52	44
Monos abs.	pro µl	730	300	550	480	510
Monos rel.	%	9	4	8	7	8
Granulos abs.	pro µl	3750	3770	3930	2790	3070
Granulos rel.	%	46	51	57	41	48
Total T-cells abs.	pro µl	3320	3030	2130	3190	2480
Total T-cells rel.	%	91	91	88	90	88
Total B-cells abs.	pro µl	180	170	150	250	170
Total B-cells rel.	%	5	5	6	7	6
Activated T-cells abs.	pro µl	2850	1960	1020	2020	1690
Activated T-cells rel.	%	78	54	42	57	60
NK-cells abs.	pro µl	110	130	100	140	80
NK-cells rel.	%	3	4	4	4	3
Quick %						
Quick	Sekunden					
PTT	Sekunden					
Fibrinogen	mg/dl					
BSG	1.Std					
Neopterin	nmol/l					
Haptoglobin	mg/dl					
Kreatinin	mg/dl	0,8	0,9	0,9	0,9	
Harnsäure	mg/dl	6,6				
GOT	U/l	46	10	11	12	16
GPT	U/l	69	14	13	16	23
GGT	U/l	47	16	11	11	10
LDH	U/l	166	137	151	138	124
Lipase	U/l					
Amylase	U/l					
Cholinesterase	U/l					
APH	U/l					
Bilirubin ges.	mg/dl					
Natrium	mmol/l	144	146	145	144	145
Kalium	mmol/l	4,3	4,5	4,5	4,2	4,2
Calcium	mmol/l					
Chlorid	mmol/l					
Gesamt Eiweiß	g/l					
Albumin	g/l					
	%					
alpha 1	g/l					
alpha 2	g/l					
beta	g/l					
gamma	g/l					
IgG	mg/dl					
IgA	mg/dl					
IgM	mg/dl					

Patient 6

	Apheresen:	08.07.93	05.08.93	12.08.93				
	Einheiten:	02.06.93	08.07.93	09.07.93	15.07.93	05.08.93	12.08.93	13.08.93
Hb	g/dl	14,7	15,3	14,9	13,5	15,2	15,1	14,7
Hkt	L/L	43,9	38,1	41,1	43,9	44,2	43,6	41,4
WBC	$x10^9$	4,1	3,5	5,7	3,6	4,4	4,1	3,9
RBC	$x10^9$		4,34	4,55	5,18	5,02	4,93	4,62
MCV	fl		87,7	90,3	85	88	88,5	89,4
MCH	pg		35,2	32,8	26	30,3	30,6	31,8
MCHC	g/dl		40,1	36,4	30,7	34,4	34,6	35,6
Thrombos	x1000/µl	119	115	97	146	152	151	104
Eosinophile	%	3	3	2	1	6	4	3
Basophile	%	0	3	0	1	1	3	1
Neutrophile	%	41	54	71	56	53	55	53
Lymphozyten	%	46	29	21	38	31	33	38
Monozyten	%	9	11	6	4	9	5	5
Stabkernige	%	0	2	12	14	0	0	0
Segmentkernige	%	41	52	59	52	53	55	53
CD 4 absolut	pro µl	420	310	540	440	460	380	350
CD 4 relativ	%	25	32	30	35	34	26	28
CD 8 absolut	pro µl	810	390	830	550	580	620	590
CD 8 relativ	%	48	40	46	44	43	42	47
Ratio		0,519	0,795	0,65	0,8	0,79	0,61	0,59
Lymphos abs	pro µl		980	1500	1260	1360	1480	1250
Lymphos rel.	%		28	30	36	31	36	32
Monos abs.	pro µl		210	400	280	400	290	310
Monos rel.	%		6	8	8	9	7	8
Granulos abs.	pro µl		2310	3100	1960	2640	2340	2340
Granulos rel.	%		66	62	56	60	57	60
Total T-cells abs.	pro µl	1010						
Total T-cells rel.	%	60						
Total B-cells abs.	pro µl	100						
Total B-cells rel.	%	6						
Activated T-cells abs.	pro µl	370						
Activated T-cells rel.	%	22						
NK-cells abs.	pro µl	440						
NK-cells rel.	%	26						
Quick %			108			112	115	123
Quick	Sekunden		12,3			12,7	12,6	12,3
PTT	Sekunden		26			27,1	23,9	27,4
Fibrinogen	mg/dl		155			259	207	217
BSG	1.Std	2						
Neopterin	nmol/l	11			13			
Haptoglobin	mg/dl	110			92			
Kreatinin	mg/dl		0,9		1,3	1,1		1,1
Harnsäure	mg/dl				6,9	7,1		8,7
GOT	U/l	11	9		11	10		12
GPT	U/l	15	12		15	12		12
GGT	U/l	12	18		11	8		9
LDH	U/l		223		227	195		211
Lipase	U/l							
Amylase	U/l							
Cholinesterase	U/l							
Bilirubin ges.	mg/dl				0,7			
Natrium	mmol/l		144		144	147	142	140
Kalium	mmol/l		3,9		4,5	4,3	4	3,6
Calcium	mmol/l		2,2		2,4	2,2	2	2,1
Chlorid	mmol/l		105		103			
Gesamt Eiweiß	g/l				75			
Albumin	g/l				52,2			
alpha 1	g/l				1,7			
alpha 2	g/l				4,7			
beta	g/l				7,6			
gamma	g/l				8,5			
IgG	mg/dl	1070			1190			
IgA	mg/dl	140			160			
IgM	mg/dl	70			176			

Patient 6

	Einheiten:	20.09.93	16.11.93	01.06.94	10.11.94	08.12.94
Hb	g/dl	14,4	15,1	14,8	14,5	15,9
Hkt	L/L	41,1	48,3	43,3	42,8	48,1
WBC	$x10^9$	3,2	3,5	3,1	3,9	4,1
RBC	$x10^9$	4,64	5,74	5,04	5,02	5,66
MCV	fl	88,6	84	86	85,4	
MCH	pg	31	26,3	29,3	28,8	
MCHC	g/dl	34,9	31,2	34,1	33,7	
Thrombos	x1000/µl	149	153	120	137	89
Eosinophile	%	0	3	0		8
Basophile	%	1	0	1		1
Neutrophile	%	49	54	54		57
Lymphozyten	%	42	32	36		26
Monozyten	%	8	9	8		8
Stabkernige	%	0	2	16		13
Segmentkernige	%	49	52	38		44
CD 4 absolut	pro µl	370	270	200		250
CD 4 relativ	%	37	30	20		21
CD 8 absolut	pro µl	410	400	440		390
CD 8 relativ	%	41	44	43		41
Ratio		0,9	0,675	0,455		0,51
Lymphos abs	pro µl	990	910	1020		980
Lymphos rel.	%	31	26	33		27
Monos abs.	pro µl	260	210	220		250
Monos rel.	%	8	6	7		7
Granulos abs.	pro µl	1950	2380	1860		2100
Granulos rel.	%	61	68	60		54
Total T-cells abs.	pro µl		620	690		
Total T-cells rel.	%		68	68		
Total B-cells abs.	pro µl		90	70		
Total B-cells rel.	%		10	7		
Activated T-cells abs.	pro µl		170	340		
Activated T-cells rel.	%		19	33		
NK-cells abs.	pro µl		110	130		
NK-cells rel.	%		12	13		
Quick %		118			107	84
Quick	Sekunden	12			12,5	13,7
PTT	Sekunden	25,9			37,1	43
Fibrinogen	mg/dl	192			285	211
BSG	1.Std					
Neopterin	nmol/l	11	17	13		
Haptoglobin	mg/dl	80		120		
Kreatinin	mg/dl	1	1,2	1	1,1	1
Harnsäure	mg/dl	8,7				
GOT	U/l	12	10	12		9
GPT	U/l	13	12	14	11	8
GGT	U/l	10	9		12	10
LDH	U/l	250	189	231	196	238
Lipase	U/l					
Amylase	U/l					
Cholinesterase	U/l					
Bilirubin ges.	mg/dl	0,7				0,6
Natrium	mmol/l	145			142	135
Kalium	mmol/l	4,1	4,5		4,1	4,3
Calcium	mmol/l	2,3			2,4	2,1
Chlorid	mmol/l				106	98
Gesamt Eiweiß	g/l	71				
Albumin	g/l	48,5				
alpha 1	g/l	1,9				
alpha 2	g/l	5,4				
beta	g/l	6,9				
gamma	g/l	8				
IgG	mg/dl	1130	1020	1250		700
IgA	mg/dl	150	210	240		150
IgM	mg/dl	100	100	190		80

Patient 7

	Apheresen:	**03.06.93**							
	Einheiten:	28.05.93	03.06.93	10.06.93	15.08.93	02.12.92	24.04.93	17.06.93	04.08.94
Hb	g/dl	14,2	15,9	15	14,5	14,7	15,3	16	15
Hkt	L/L	43	48,3	43,6	42,9	43,6	45,9	47,9	43,6
WBC	$x10^9$	5,1	5,3	5	5	6,4	6,1	6,4	5
RBC	$x10^9$	5,13	5,29	4,8	4,65	4,79	5,02	5,23	4,8
MCV	fl	89	91	91	92	91	91	92	91
MCH	pg	32	30	34	31,1	30,6	30,5	30,5	4
MCHC	g/dl	31	32,9	32,2	33,7	33,7	33,3	33,4	2,2
Thrombos	x1000/µl	176	177	181	131	139	137	169	181
Eosinophile	%		0	0	0	2	4	3	0
Basophile	%		1	0	0	0	0	0	0
Neutrophile	%		45	46	59	63	62	57	46
Lymphozyten	%		45	47	35	29	32	33	47
Monozyten	%		9	7	6	6	2	7	7
Stabkernige	%		15	8	5	6	6	1	8
Segmentkernige	%		30	38	54	57	56	56	38
CD 4 absolut	pro µl	580	610	500	460	600	600	740	500
CD 4 relativ	%	31	29	25	32	31	33	28	25
CD 8 absolut	pro µl	1200	1170	1200	840	1170	1120	1690	1200
CD 8 relativ	%	58	55	60	58	61	61	63	60
Ratio		0,53	0,52	0,416	0,548	0,51	0,535	0,438	0,416
Lymphos abs	pro µl	1760	2120	2000	1450	1920	1830	2620	2000
Lymphos rel.	%	42	40	40	29	30	30	42	40
Monos abs.	pro µl	320	370	400	350	380	370	380	400
Monos rel.	%	6	7	6	7	6	6	6	6
Granulos abs.	pro µl	3000	2860	2600	3200	4100	3900	3330	2600
Granulos rel.	%	49	54	52	64	64	64	52	52
Total T-cells abs.	pro µl			1600					1600
Total T-cells rel.	%			80					80
Total B-cells abs.	pro µl			140					140
Total B-cells rel.	%			7					7
Activated T-cells abs.	pro µl			460					460
Activated T-cells rel.	%			23					23
NK-cells abs.	pro µl			120					120
NK-cells rel.	%			6					6
Quick %		161		149	129			161	149
Quick	Sekunden	10,5		10	11,4			10,5	10
PTT	Sekunden	22,7		21,3	19,8			20,4	21,3
Fibrinogen	mg/dl	245		217				221	217
BSG	1.Std								
Neopterin	nmol/l		7	6					6
Haptoglobin	mg/dl	80		80					80
Kreatinin	mg/dl	0,8		1,1				0,8	1,1
Harnsäure	mg/dl	7,8		6,8				7,3	6,8
GOT	U/l	13		12				12	12
GPT	U/l	21		18				20	18
GGT	U/l	34		32				33	32
LDH	U/l	208		203				212	203
Lipase	U/l								
Amylase	U/l								
Cholinesterase	U/l								
APH	U/l								
Bilirubin ges.	mg/dl			0,4					0,4
Natrium	mmol/l	138		145	140		140	140	145
Kalium	mmol/l	4,1		4	4		3,6	3,6	4
Calcium	mmol/l	2,2		2,2	2		2,2	2,2	2,2
Chlorid	mmol/l	102					109	109	
Gesamt Eiweiß	g/l	80		76					76
Albumin	g/l	52,8		51,3					51,3
	%	66		67,5					67,5
alpha 1	g/l	1,6		1,2					1,2
alpha 2	g/l	5,5		5					5
beta	g/l	6,1		5,9					5,9
gamma	g/l	13,7		12,3					12,3
IgG	mg/dl	2040							
IgA	mg/dl	180							
IgM	mg/dl	180		1713					1713
				164					164
				157					157

Patient 8

	Apheresen:	**14.01.93**	**10.08.93**	**19.08.93**					
	Einheiten:	14.01.93	15.01.93	22.01.93	29.03.93	10.08.93	19.08.93	26.08.93	27.09.93
Hb	g/dl	16,9	16,8	16,3	15,4	16,6	16,3	17,2	15,4
Hkt	L/L	46	46,1	45,3	47,1	45,6	45,5	49,6	48,6
WBC	$x10^9$	6,6	7,4	8,1	5,7	6,3	9,3	7,1	5,9
RBC	$x10^9$	4,93	4,96	4,85	5,25	4,83	4,83	5,22	5,06
MCV	fl	93,2	92,8	93,3	90	94,3	94,1	94,9	96
MCH	pg	34,4	33,9	33,5	29,3	34,3	33,8	33	30,4
MCHC	g/dl	36,8	36,5	35,9	32,6	36,4	35,9	34,8	31,6
Thrombos	x1000/µl	281	211	269	241	241	306	283	187
Eosinophile	%	4	3	0	1	3	0	0	3
Basophile	%	0	0	2	2	0	0	1	1
Neutrophile	%	55	59	68	65	59	60	58	65
Lymphozyten	%	34	35	27	25	23	35	30	26
Monozyten	%	7	8	3	7	15	5	11	5
Stabkernige	%	1	0	1	4	0	0	1	0
Segmentkernige	%	54	59	67	61	59	60	57	65
CD 4 absolut	pro µl	710		620	540	660	740	910	
CD 4 relativ	%	37		38	38	40	36	40	
CD 8 absolut	pro µl	970		790	730	790	1130	1200	
CD 8 relativ	%	51		49	51	48	55	53	
Ratio		0,73		0,78	0,74	0,835	0,65	0,758	
Lymphos abs	pro µl	1910		1620	1430	1640	2050	2270	
Lymphos rel.	%	29		20	25	26	22	32	
Monos abs.	pro µl	660		410	230	760	560	500	
Monos rel.	%	10		5	4	12	6	7	
Granulos abs.	pro µl	3960		5990	4050	3840	6700	4400	
Granulos rel.	%	60		74	71	61	72	62	
Total T-cells abs.	pro µl				1120				
Total T-cells rel.	%				78				
Total B-cells abs.	pro µl				60				
Total B-cells rel.	%				4				
Activated T-cells abs.	pro µl				40				
Activated T-cells rel.	%				3				
NK-cells abs.	pro µl				230				
NK-cells rel.	%				16				
Quick	%	150	133			114	152	141	
Quick	Sekunden	11	11,6			12,6	10,8	11,6	
PTT	Sekunden	29,2	30,4			27	26,1	37,7	
Fibrinogen	mg/dl	335	348			264	256	349	
BSG									
Neopterin	nmol/l		7	<5	10			9	14
Haptoglobin	mg/dl		270	270	300			260	310
Kreatinin	mg/dl		1	1	0,9	1		1,2	1,1
Harnsäure	mg/dl			5,3		4,2		6,6	
GOT	U/l		15	15	35	16	14	18	35
GPT	U/l		17	22	29	43	19	21	41
GGT	U/l		20	21	11	27	29	30	30
LDH	U/l		201	192		193			
Lipase	U/l								
Bilirubin ges.	mg/dl		0,3	0,2				0,3	
Natrium	mmol/l	143	148	144		144	143	148	
Kalium	mmol/l	4,6	4,8	4,9		4,4	4,4	4,8	
Calcium	mmol/l	2,2	2,3	2,1		2,1	2,3	2,4	
Chlorid	mmol/l								
Gesamt Eiweiß	g/l				80			81	81
Albumin	g/l				51,4			53,3	53,4
	%				64,3			65,8	65,9
alpha 1	g/l				1,8			1,4	1,7
alpha 2	g/l				6,2			6	5,3
beta	g/l				7			7,2	7,3
gamma	g/l				13,4			12,9	13,2
IgG	mg/dl			1970	2190			1760	1970
IgA	mg/dl			300	160			310	360
IgM	mg/dl			360	180			370	270

Patient 8

	Einheiten:	13.01.94	24.03.94	17.05.94	21.02.95	11.05.95	05.09.95
Hb	g/dl	15,4	14,3	15,9	15,9	16,9	14,8
Hkt	L/L	48,4	48,4	47	47,1	49,8	43
WBC	$x10^9$	4,8	7,4	5	4,8	6,4	5,8
RBC	$x10^9$	5,36	5,22	5,05	5,13	5,03	4,97
MCV	fl	90	93	92,9	91,8	93	
MCH	pg	28,7	27,3	31,5	31		
MCHC	g/dl	31,8	29,5	33,8	33,8		
Thrombos	x1000/µl	207	190	220	227	253	
Eosinophile	%	1	2	0	0		
Basophile	%	1	1	2	0		
Neutrophile	%	50	28	59	55		
Lymphozyten	%	46	63	33	34		
Monozyten	%	2	6	6	11		
Stabkernige	%	0	2	0	0		
Segmentkernige	%	50	26	59	55		
CD 4 absolut	pro µl	750	1050	750	510	610	720
CD 4 relativ	%	37	29	43	37	35	41
CD 8 absolut	pro µl	1050	2320	650	610	750	690
CD 8 relativ	%	52	64	37	44	52	39
Ratio		0,71	0,45	1,154	0,84	0,67	1,04
Lymphos abs	pro µl	2820	3630	1750	1390	1500	1760
Lymphos rel.	%	42	49	35	29	25	28
Monos abs.	pro µl	290	520	350	430	380	500
Monos rel.	%	6	7	7	9	8	6
Granulos abs.	pro µl	2500	3260	2900	2980	2500	4030
Granulos rel.	%	52	44	58	62	54	64
Total T-cells abs.	pro µl	1560	2580	1310	1030	1380	1320
Total T-cells rel.	%	77	71	75	74	76	75
Total B-cells abs.	pro µl	140	110	120	80	70	110
Total B-cells rel.	%	7	3	7	6	7	6
Activated T-cells abs.	pro µl	20	40	20	30	30	40
Activated T-cells rel.	%	1	1	1	2	2	2
NK-cells abs.	pro µl	340	910	320	260	250	320
NK-cells rel.	%	17	25	18	19	23	18
Quick	%						
Quick	Sekunden						
PTT	Sekunden						
Fibrinogen	mg/dl						
BSG						4	
Neopterin	nmol/l	7	10	6	8	10	
Haptoglobin	mg/dl				1		
Kreatinin	mg/dl	0,9	1,1	1,1			
Harnsäure	mg/dl						
GOT	U/l	16	25	36	17	34	
GPT	U/l	21	28	48	21	40	
GGT	U/l	29	38	45	36	70	
LDH	U/l	189	262	242	210	314	
Lipase	U/l			153	188	245	
Bilirubin ges.	mg/dl						
Natrium	mmol/l		142				
Kalium	mmol/l		4,3	4,3	5,4		
Calcium	mmol/l		2				
Chlorid	mmol/l		105				
Gesamt Eiweiß	g/l						
Albumin	g/l						
	%						
alpha 1	g/l						
alpha 2	g/l						
beta	g/l						
gamma	g/l						
IgG	mg/dl	1836	1898	2013	1927		
IgA	mg/dl	282	293	304	315		
gM	mg/dl	253	249	253	275		

Patient 9

	Aphersen:	07.01.93	15.06.93	04.11.93	11.01.94			
	Einheiten:	23.10.92	01.12.92	07.01.93	18.01.93	29.03.93	15.06.93	23.06.93
Hb	g/dl	16,2	16,2	15,2	15,6	14,2	13,6	14,7
Hkt	L/L	48,3	46,7	443,8	48,4	43,1	40,8	44,9
WBC	x10hoch9/l	5,4	6	4,6	4,8	4,9	4,9	5,9
RBC	x10hoch9/l	5,51	5,36	5,02	5,18	5,05	4,87	5,28
MCV	fl	87,6	87,2	87,1		85	84	85
MCH	pg	29,4	30,3	30,1		28,1	27,9	27,8
MCHC	g/dl	33,6	34,7	34,8		32,9	33,3	32,7
Thrombozyten	x1000/µl	273	252	231	248	203	176	221
Eosinophile	%	0	2	3		2	1	0
Basophile	%	0	1	0		1	1	1
Neutrophile	%	46	51	49		59	51	41
Lymphozyten	%	46	40	46		34	42	52
Monozyten	%	8	6	2		4	5	6
Stabkernige	%	7	1	0		19	0	16
Segmentkernige	%	39	50	49		45	51	25
CD 4 absolut	pro µl	620	430	490	1394		440	590
CD 4 relativ	%	28	26	29	33		29	25
CD 8 absolut	pro µl	1280	870	1040	2975		850	1490
CD 8 relativ	%	58	53	61	70		56	63
Ratio		0,48	0,49	0,47	0,47		0,52	0,396
Lymphos abs	pro µl	2210	1650	1700	4224		1520	2360
Lymphos rel.	%	41	33	37	88		31	40
Monos abs.	pro µl	320	250	230	144		250	300
Monos rel.	%	6	5	5	3		5	5
Granulos abs.	pro µl	2920	3100	2670	432		3140	3250
Granulos rel.	%	54	62	58	9		64	55
Total T-cells abs.	pro µl	1900	1400					
Total T-cells rel.	%	86	85					
Total B-cells abs.	pro µl	180	100					
Total B-cells rel.	%	8	6					
Activated T-cells abs.	pro µl	750	530					
Activated T-cells rel.	%	34	32					
NK-cells abs.	pro µl	150	100					
NK-cells rel.	%	7	6					
Quick %		130	112				101	
Quick	Sekunden	11,7	12,6				12,7	
PTT	Sekunden	28,8	26				25,3	
Fibrinogen	mg/dl	216	221				182	
BSG								
Neopterin	nmol/l	12	10			16		
Haptoglobin	mg/dl	218	190		187	220		192
Kreatinin	mg/dl	0,9		0,8	2,3	0,9		1
Harnsäure	mg/dl	6,7		5	5,5			5,2
GOT	U/l	10		10	18	9		11
GPT	U/l	14		14	26	15		12
GGT	U/l	11		8		9		9
LDH	U/l	147		155	254	137		219
Lipase	U/l							
Amylase	U/l							
Cholinesterase	U/l							
Bilirubin ges.	mg/dl	0,7		0,5				0,6
Natrium	mmol/l	147		141	146		141	144
Kalium	mmol/l	4,1		3,9		4,1	4,2	4,2
Calcium	mmol/l	2,2		2,1			2,4	2,3
Chlorid	mmol/l				97			
Gesamt Eiweiß	g/l	86	83	74	85	78		85
Albumin	g/l	52	49,2	46,5	51,7	46,8		53,6
	%	60,4	59,3	62,9	60,8	60		61
alpha 1	g/l	2,2	2,3	1,5	2,1	1,9		1,3
alpha 2	g/l	5,3	5,8	4,2	5,8	4,9		5,2
beta	g/l	7,3	7,2	6	7,1	6,5		6,3
gamma	g/l	19,1	18,2	15,5	18,1	17,7		18,3
IgG	mg/dl	2650	2980		2540	2490		
IgA	mg/dl	280	270		248	270		
IgM	mg/dl	127	150		108	150		

Patient 9

	Einheiten:	12.10.93	04.11.93	11.01.94	25.04.94	29.11.94	16.01.95	12.04.95	20.11.95	11.06.96
Hb	g/dl	15,3	15	15,7	14,8	15,4	16,6	15,7	15,1	14,9
Hkt	L/L	49,3	42,4	45,5	44,4	45,4	49,3	46	44,2	44,6
WBC	x10hoch9/l	7,5	5,1	4,8	5,7	6,8	5,7	5,6	7,4	5,5
RBC	x10hoch9/l	5,58	4,95	5,41	5,17	5,21	5,84	5,4	5,22	5,23
MCV	fl	88	85,6	84,2	85,9				84,4	85,3
MCH	pg	27,4	30,3	29,1	28,7				28,9	28,5
MCHC	g/dl	31	35,4	34,6	33,4				34,1	33,5
Thrombozyten	x1000/µl	224	236	121	252	128	110	136	181	
Eosinophile	%	1	1		2		1	3	0	2
Basophile	%	1	0		1		0	0	0	0
Neutrophile	%	55	49		51		50	56	49	43
Lymphozyten	%	37	45		38		39	36	40	44
Monozyten	%	6	5		7		9	5	5	11
Stabkernige	%	1	0		0		3	6	3	12
Segmentkernige	%	54	49		51		47	50	46	31
CD 4 absolut	pro µl		540	510	520	420		500	380	420
CD 4 relativ	%		30	28	26	26		27	23	20
CD 8 absolut	pro µl		1020	1020	1180	960		1050	1590	1250
CD 8 relativ	%		57	56	59	59		57	63	60
Ratio			0,529	0,5	0,44	0,356		0,476	0,365	0,336
Lymphos abs	pro µl		1790	1820	2000	1630		1840	2520	2070
Lymphos rel.	%		35	38	35	24		36	34	38
Monos abs.	pro µl		260	240	290	270		200	300	390
Monos rel.	%		5	5	5	4		4	4	7
Granulos abs.	pro µl		3060	2740	3420	4900		3060	4590	3030
Granulos rel.	%		60	57	60	72		60	62	55
Total T-cells abs.	pro µl				1680	1420		1580	2270	1820
Total T-cells rel.	%				84	87		86	90	87
Total B-cells abs.	pro µl				140	100		150	100	100
Total B-cells rel.	%				7	6		8	4	5
Activated T-cells abs.	pro µl				640	550		700	1160	1050
Activated T-cells rel.	%				32	34		38	46	50
NK-cells abs.	pro µl				140	100		110	180	150
NK-cells rel.	%				7	6		6	7	7
Quick %			109	108			119	97		
Quick	Sekunden		12,4	13,1			12,3	13,3		
PTT	Sekunden		31,8	31,5			31,1	30,7		
Fibrinogen	mg/dl		221	240			289	275		
BSG										
Neopterin	nmol/l	9			14	14		12	13	25
Haptoglobin	mg/dl	220								
Kreatinin	mg/dl	1,1		1	1	1,2	1	1	1	1,2
Harnsäure	mg/dl									
GOT	U/l	10		18	10	14	13	14	8	9
GPT	U/l	13		20	15	16	12	9	11	8
GGT	U/l	10		11	10	11	10	9	11	8
LDH	U/l	139		179	167	199	170	253	160	164
Lipase	U/l			113					113	
Amylase	U/l									
Cholinesterase	U/l			2316						
Bilirubin ges.	mg/dl			0,6			0,9	1,2		
Natrium	mmol/l		141	138			141	139		
Kalium	mmol/l	3,9	3,6	4,2	4,8	3,8	3,7	3,9	4,3	3,7
Calcium	mmol/l		2,6	2,1			2,1	2,1		
Chlorid	mmol/l						102			
Gesamt Eiweiß	g/l						70	86		
Albumin	g/l						42,7			
	%						61,1			
alpha 1	g/l						1,6			
alpha 2	g/l						4,3			
beta	g/l						5,5			
gamma	g/l						15,7			
IgG	mg/dl	2410			2766	2440			2373	2154
IgA	mg/dl	250			223	188			199	196
IgM	mg/dl	150			115	120			102	95

Patient 10

	Apheresen:	**29.10.92**	**09.12.92**	**17.06.93**			
	Einheiten:	15.10.92	29.10.92	04.11.92	09.12.92	17.06.93	24.06.93
Hb	g/dl	18	17,3	17,3	17,3	16,5	16,2
Hkt	L/L	51,5	48,4	48,9	47,2	49,6	47,9
WBC	$x10^9$/l	6,1	6,2	7	10,9	7,4	7
RBC	$x10^9$/l	5,65	5,28	5,27	5,17	5,63	5,45
MCV	fl	91,3	91,7	92,6		88	88
MCH	pg	31,9	32,8	32,8		29,3	29,7
MCHC	g/dl	35	35,7	35,4		33,2	33,8
Thrombos	x1000/µl	170	171	169	198	149	156
Eosinophile	%	0		0	0	0	0
Basophile	%	0		0	0	1	0
Neutrophile	%	71		62	78	72	72
Lymphozyten	%	21		35	18	22	22
Monozyten	%	8		3	4	5	6
Stabkernige	%	3		1	3	10	8
Segmentkernige	%	68		61	75	62	64
CD 4 absolut	pro µl	570	330	380	320	490	460
CD 4 relativ	%	37	31	32	24	30	31
CD 8 absolut	pro µl	990	650	760	610	1010	880
CD 8 relativ	%	25	62	64	56	62	60
Ratio		0,575	0,507	0,5	0,52	0,485	0,52
Lymphos abs	pro µl	1530	1050	1190	1090	1630	1470
Lymphos rel.	%	25	17	17	10	22	21
Monos abs.	pro µl	490	250	420	440	370	350
Monos rel.	%	8	4	6	4	5	5
Granulos abs.	pro µl	4150	4900	5390	9270	5400	5180
Granulos rel.	%	68	79	77	85	73	74
Total T-cells abs.	pro µl	1470	910	1020			
Total T-cells rel.	%	86	87	86			
Total B-cells abs.	pro µl	110	50	70			
Total B-cells rel.	%	7	5	6			
Activated T-cells abs.	pro µl	310	300	270			
Activated T-cells rel.	%	20	29	23			
NK-cells abs.	pro µl	110	80	100			
NK-cells rel.	%	7	8	8			
Quick %		117	104	106	106	114	114
Quick	Sekunden	12,3	12,9	12,8	13	12	12
PTT	Sekunden	25,3	25,8	27,8	26,3	22,8	23,4
Fibrinogen	mg/dl	426	192	229	351	191	273
Neopterin	nmol/l	17			10		10
Haptoglobin	mg/dl	327	179	251	400		340
Kreatinin	mg/dl	1,5	0,7		0,8	0,8	0,8
Harnsäure	mg/dl	3,8	3,4		3	4,4	3,1
GOT	U/l	15	15	13	16	11	10
GPT	U/l	22	23	23	21	16	15
GGT	U/l	41	35	32	32	26	26
LDH	U/l	156	162	148	219	183	160
Lipase	U/l						
APH	U/l		88				
Bilirubin ges.	mg/dl	0,4		0,5	0,4		0,5
Natrium	mmol/l	139	137	138	136	136	138
Kalium	mmol/l	4	4,7	4,7	3,8	4,8	4,6
Calcium	mmol/l	2,4	2,1	2,4	2	2,4	2,3
Chlorid	mmol/l		101				
Gesamt Eiweiß	g/l	82	70	76	87		80
Albumin	g/l	49,4	42,3	48	46,1		47,7
	%	60,3	60,5	63,2	52,9		59,7
alpha 1	g/l	2,3	1,7	2,3	3,9		1,9
alpha 2	g/l	6,5	4,9	5,5	8,8		7,2
beta	g/l	9,9	8,2	8,7	10,7		9,1
gamma	g/l	13,7	12,5	11,2	17,3		13,8
IgG	mg/dl	1960	1550		1970		1970
IgA	mg/dl	624	542		600		600
IgM	mg/dl	140	173		180		180

Patient 10

	Einheiten:	16.09.93	20.06.94	11.10.94	31.08.95	27.09.95	20.03.96
Hb	g/dl	17,5	16,3	16	15,5	15,8	14,7
Hkt	L/L	55	52,8	48,3	45,8	46,3	43
WBC	$x10^9$/l	6,3	8,8	9,1	16,7	10,5	8,2
RBC	$x10^9$/l	5,88	5,89	5,27	5,11	5,2	4,88
MCV	fl	94			89,6	89,1	88,2
MCH	pg	29,7			30,2	30,4	30,1
MCHC	g/dl	31,8			33,7	34,2	34,1
Thrombos	x1000/µl	124	125		140	150	160
Eosinophile	%	2	1		0	1	0
Basophile	%	1	0		0		0
Neutrophile	%	57	75		96	79	74
Lymphozyten	%	37	16		3	16	16
Monozyten	%	3	8		1		8
Stabkernige	%	3	1		26	10	6
Segmentkernige	%	54	74		70	69	68
CD 4 absolut	pro µl		600		440	460	380
CD 4 relativ	%		31		33	29	29
CD 8 absolut	pro µl		1130		1190	950	790
CD 8 relativ	%		58		89	60	60
Ratio			0,53		0,37	0,484	0,481
Lymphos abs	pro µl		1940		1340	1580	1710
Lymphos rel.	%		22		8	15	16
Monos abs.	pro µl		440		500	420	490
Monos rel.	%		5		3	4	6
Granulos abs.	pro µl		6420		14860	8510	6400
Granulos rel.	%		73		89	81	78
Total T-cells abs.	pro µl		1730		1190	1420	1170
Total T-cells rel.	%		89		89	90	89
Total B-cells abs.	pro µl		120		80	80	50
Total B-cells rel.	%		6		6	5	4
Activated T-cells abs.	pro µl		80		250	410	250
Activated T-cells rel.	%		4		19	26	19
NK-cells abs.	pro µl		100		30	80	50
NK-cells rel.	%		5		2	5	4
Quick %		114		112			
Quick	Sekunden	11,8		12,2			
PTT	Sekunden	23,7		37,1			
Fibrinogen	mg/dl	260		453			
Neopterin	nmol/l		11	9	16		17
Haptoglobin	mg/dl						
Kreatinin	mg/dl	0,8	0,9	0,9	0,8		0,9
Harnsäure	mg/dl	4,1		4,2			
GOT	U/l	15	12	16	7		9
GPT	U/l	21	18	12	10		8
GGT	U/l	37	26	23	23		16
LDH	U/l	139	164	139	159		178
Lipase	U/l		141	215			
APH	U/l						
Bilirubin ges.	mg/dl	0,5		0,7			
Natrium	mmol/l	139		147			
Kalium	mmol/l	2,4	4	4,7	3,6	4,2	4,4
Calcium	mmol/l			2,4			
Chlorid	mmol/l			101			
Gesamt Eiweiß	g/l	81					
Albumin	g/l	49,3					
	%	60,9					
alpha 1	g/l	1,8					
alpha 2	g/l	6,3					
beta	g/l	9,5					
gamma	g/l	13,2					
IgG	mg/dl		1962		1727		2139
IgA	mg/dl		633		520		569
IgM	mg/dl		149		109		166

Patient 11

	Apheresen:	**14.09.93**	**21.09.93**	**25.11.93**	**02.12.93**		
	Einheiten:	10.12.92	30.07.93	29.07.93	14.09.93	15.09.93	21.09.93
Hb	g/dl	17		16	17,6	16,6	16,9
Hkt	L/L	46,6		46,9	48,8	46,3	44,2
WBC	$x10^9$	9		10,2	9,2	6,1	8
RBC	$x10^9$	5,32		5,35	5,37	5,11	5,11
MCV	fl	87,5			90,9	90,5	86,5
MCH	pg	32			32,8	32,4	33,2
MCHC	g/dl	36,5			36,1	35,8	38,4
Thrombos	x1000/µl	301		258	318	183	294
Eosinophile	%	3		1	3	0	3
Basophile	%	0		0	0	0	0
Neutrophile	%	49		67	34	37	48
Lymphozyten	%	46		27	35	54	44
Monozyten	%	2		5	8	9	5
Stabkernige	%	6		7	5	0	3
Segmentkernige	%	43		60	49	54	45
CD 4 absolut	pro µl	800		1360	620	680	740
CD 4 relativ	%	24		29	26	26	45
CD 8 absolut	pro µl	2130		2760	1410	1470	1380
CD 8 relativ	%	64		58	59	56	54
Ratio		0,38		0,5	0,44	0,46	0,536
Lymphos abs	pro µl	3330	4690		2390	2620	2560
Lymphos rel.	%	37	46		26	43	32
Monos abs.	pro µl	450	820		460	370	560
Monos rel.	%	5	8		5	6	7
Granulos abs.	pro µl	5310	4690		6260	3110	4880
Granulos rel.	%	59	46		68	51	61
Total T-cells abs.	pro µl	2560	3990				
Total T-cells rel.	%	77	85				
Total B-cells abs.	pro µl	200	280				
Total B-cells rel.	%	6	6				
Activated T-cells abs.	pro µl	1170	940				
Activated T-cells rel.	%	35	20				
NK-cells abs.	pro µl	570	470				
NK-cells rel.	%	17	10				
Quick %					130	124	118
Quick	Sekunden				12	12	11,9
PTT	Sekunden				30,3	31,6	31,8
Fibrinogen	mg/dl				330	289	259
BSG	1.Std			10			
Neopterin	nmol/l	10	5				
Haptoglobin	mg/dl	238					
Kreatinin	mg/dl					0,6	
Harnsäure	mg/dl					3,8	
GOT	U/l			10		10	
GPT	U/l			14		14	
GGT	U/l			31		26	
LDH	U/l			132		145	
Lipase	U/l						
Amylase	U/l						
Cholinesterase	U/l						
APH	U/l						
Bilirubin ges.	mg/dl						
Natrium	mmol/l				142	142	141
Kalium	mmol/l		4,9		4,1	4	4,5
Calcium	mmol/l				2,2	2,1	2,3
Chlorid	mmol/l						
Gesamt Eiweiß	g/l	78					
Albumin	g/l	48,8					
	%	62,5					
alpha 1	g/l	2,6					
alpha 2	g/l	5,8					
beta	g/l	7,6					
gamma	g/l	13					
IgG	mg/dl		1446				
IgA	mg/dl		377				
IgM	mg/dl		201				

Patient 11

	Einheiten:	22.09.93	25.11.93	02.12.93	09.12.93	08.04.94	10.06.95
Hb	g/dl	16,5	16,2	15,9	14,5	16,3	15,4
Hkt	L/L	45,3	40,1	42,5	46	49,8	43,4
WBC	$x10^9$	6,7	8,6	7,9	4,8	9,3	8,3
RBC	$x10^9$	4,97	4,45	4,69	5,15	5,56	4,76
MCV	fl	91,1	90,2	90,5	89	89,5	91,1
MCH	pg	33,2	36,4	34	28,1	29,3	32,3
MCHC	g/dl	36,4	40,6	17,5	31,5	32,8	35,4
Thrombos	x1000/µl	212	202	257	286	268	163
Eosinophile	%	3	2	3	5	4	0
Basophile	%	0	1	0	0	0	0
Neutrophile	%	43	52	64	22	42	38
Lymphozyten	%	44	37	26	63	51	32
Monozyten	%	10	8	7	9	3	10
Stabkernige	%		2		4	9	
Segmentkernige	%		50		18	33	
CD 4 absolut	pro µl	770	950	660	880	430	1110
CD 4 relativ	%	26	27	31	36	27	29
CD 8 absolut	pro µl	1770	2220	1210	1250	2100	2330
CD 8 relativ	%	60	63	57	51	61	61
Ratio		0,435	0,428	0,545	0,704	0,44	0,48
Lymphos abs	pro µl	2950	3530	2130	2450	3340	3820
Lymphos rel.	%	44	41	27	51	37	46
Monos abs.	pro µl	400	260	400	290	560	580
Monos rel.	%	6	3	5	6	6	7
Granulos abs.	pro µl	3350	4820	5370	2060	5300	3900
Granulos rel.	%	50	56	68	43	57	47
Total T-cells abs.	pro µl					2860	
Total T-cells rel.	%					83	
Total B-cells abs.	pro µl					140	
Total B-cells rel.	%					4	
Activated T-cells abs.	pro µl					650	
Activated T-cells rel.	%					19	
NK-cells abs.	pro µl					480	
NK-cells rel.	%					14	
Quick %		131	120	103		103	
Quick	Sekunden	11,8	12	12,3		12,3	
PTT	Sekunden	32,8	32,2	30,8		30,8	
Fibrinogen	mg/dl	315	261	257		257	
BSG	1.Std						
Neopterin	nmol/l		10			9	
Haptoglobin	mg/dl						
Kreatinin	mg/dl	1	0,7	0,5		1,3	
Harnsäure	mg/dl	5,2					
GOT	U/l	10	9	11		16	
GPT	U/l	16	12	13		25	
GGT	U/l	27	18			25	
LDH	U/l	137	216	164		157	
Lipase	U/l		90				
Amylase	U/l						
Cholinesterase	U/l		1761				
APH	U/l						
Bilirubin ges.	mg/dl						
Natrium	mmol/l	138		146			
Kalium	mmol/l	4,7		4,7		5	
Calcium	mmol/l	2,3		2,1			
Chlorid	mmol/l	105					
Gesamt Eiweiß	g/l		63				
Albumin	g/l						
	%						
alpha 1	g/l						
alpha 2	g/l						
beta	g/l						
gamma	g/l						
IgG	mg/dl					1594	
IgA	mg/dl					414	
IgM	mg/dl					255	

Patient 12

	Apheresen:	05.11.92	17.12.92	04.03.93						
	Einheiten:	19.10.92	05.11.92	17.12.92	18.12.92	23.12.92	09.02.93	04.03.93	05.03.93	08.03.93
Hb	g/dl	16,9	15,9	15,5	15,5	16,1	15,7	16,1	14,2	15,1
Hkt	L/L	49,1	47,5	43,6	44,5	43,6	43,6	44,4	40,1	41,8
WBC	$x10^9$	5	4,7	4,1	4,9	4	4,2	5	6,7	5
RBC	$x10^9$	5,82		5,16	5,27	5,14	5,2	5,34	4,75	4,91
MCV	fl	84,3		84,6	84,5	84,8	83,7	83	84,4	85
MCH	pg	29,1		30	29,6	31,3	30,2	30,1	29,9	30,7
MCHC	g/dl	34,5		35,5	35	36,9	36,1	36,3	35,4	36,1
Thrombos	x1000/µl	194	178	165	137	169	140	180	154	169
Eosinophile	%	0		4	1	1	0	0	1	2
Basophile	%	2		0	0	1	0	0	0	0
Neutrophile	%	51		47	64	58	72	51	64	63
Lymphozyten	%	42		42	31	28	25	41	30	29
Monozyten	%	5		7	4	12	3	8	5	6
Stabkernige	%	2		4	1	5	7	0	1	8
Segmentkernige	%	49		43	63	53	65	51	63	55
CD 4 absolut	pro µl	310	260	270		200	200	240	180	180
CD 4 relativ	%	19	17	20	17,1	20	19	16	11	15
CD 8 absolut	pro µl	1110	1110	840		580	700	920	1090	780
CD 8 relativ	%	67	74	62	60,1	58	67	61	65	65
Ratio		0,279	0,23	0,32	0,28	0,34	0,286	0,26	0,165	0,23
Lymphos abs.	pro µl	1650	1500	1350		1000	1050	1500	1680	1200
Lymphos rel.	%	33	32	33		25	25	30	25	24
Monos abs.	pro µl	450	470	330		400	250	400	470	350
Monos rel.	%	9	10	8		10	6	8	7	7
Granulos abs.	pro µl	2900	2730	2420		2600	2900	3100	4560	3450
Granulos rel.	%	58	58	59		65	69	62	68	69
Total T-cells abs.	pro µl	1290					860			
Total T-cells rel.	%	78					82			
Total B-cells abs.	pro µl	100					120			
Total B-cells rel.	%	6					11			
Activated T-cellsabs.	pro µl	410					290			
Activated T-cells rel.	%	25					28			
NK-cells abs.	pro µl	230					120			
NK-cells rel.	%	14					11			
Quick %		127	110	114	118	128		128	124	122
Quick	Sekunden	11,6	12,6	12,5	12,3	11,8		11,8	12	12,1
PTT	Sekunden	28	27,6	28,3	25,7	28,4		29,2	26	25,5
Fibrinogen	mg/dl	678	312	324	342	366		311	283	324
Neopterin	nmol/l	11				15	15			16
Haptoglobin	mg/dl	410				4,4	300			330
Kreatinin	mg/dl	0,7			0,9	0,9	0,8			
Harnsäure	mg/dl	4,9			3,5	4,4				
GOT	U/l	11			10	10	9			
GPT	U/l	11			8	9	9			
GGT	U/l	14			11	13	12			
LDH	U/l	170			213		141			
Bilirubin ges.	mg/dl	0,3								0,3
Natrium	mmol/l	140		145	140	148		138	138	140
Kalium	mmol/l	4,4		4,2	4,6	4,8	4	4	4,2	4,4
Calcium	mmol/l	2,4		2,1	2,3	2,3		2,1	2,1	2,2
Gesamt Eiweiß	g/l	85				78	77			71
Albumin	g/l	50,7				47,8	55,5			44,1
	%	59,7				61,3	42,7			62,2
alpha 1	g/l	3				2,5	5,1			2,4
alpha 2	g/l	7,7				6,8	9,7			6,6
beta	g/l	8,5				7,4	10,8			6,7
gamma	g/l	14,7				13,4	18,7			10,9
IgG	mg/dl	2030				1760	1900			1900
IgA	mg/dl	399				350	360			370
IgM	mg/dl	157				150	170			150

Patient 12

	Einheiten:	22.03.93	03.05.93	17.07.93	16.08.93	16.09.93	12.10.93	22.11.93	06.12.93	05.01.94
Hb	g/dl	13,2	14	14,9	13,7	14,9	14,4	14,8	14,9	13,8
Hkt	L/L	39,4	43,8	43,9	41,5	45,2	45,2	47	45,3	42,2
WBC	$x10^9$	3,8	3,8	4	4	4,6	5,1	3,7	3	3,2
RBC	$x10^9$l	4,65	4,85	4,84	4,63	4,87	4,87	5,18	5,05	4,65
MCV	fl	85	90	91	90	93	93	91	90	91
MCH	pg	28,3	28,8	30,7	29,5	30,5	25,5	28,5	25,5	29,6
MCHC	g/dl	33,5	31,9	33,9	33	32,9	31,8	31,4	32,8	32,7
Thrombos	x1000/µl	161	161	143	167	143	162	172	126	
Eosinophile	%	0	1			0		1	0	
Basophile	%	0	0			0		1	0	
Neutrophile	%	53	51			55	60	51	56	
Lymphozyten	%	44	39			40	32	37	41	
Monozyten	%	3	8			5	7	10	3	
Stabkernige	%	1	7			2		0	5	
Segmentkernige	%	52	44			53		51	51	
CD 4 absolut	pro µl	230	190	150	100	130	90	120	60	80
CD 4 relativ	%	21	15	14	11	9	9	9	7	8
CD 8 absolut	pro µl	690	880	720	590	960	730	960	610	730
CD 8 relativ	%	63	70	67	67	65	92	73	75	74
Ratio		0,333	0,216	0,208	0,169	0,138	0,123	0,125	0,0984	0,1095
Lymphos abs.	pro µl	1100	1250	1080	880	1470	1020	1310	810	990
Lymphos rel.	%	29	33	27	22	32	20	41	27	31
Monos abs.	pro µl	380	300	200	280	370	360	260	120	190
Monos rel.	%	10	8	5	7	8	7	8	4	6
Granulos abs.	pro µl	2280	2240	2720	2840	2760	3720	1630	2040	2020
Granulos rel.	%	60	59	68	71	60	73	51	68	63
Total T-cells abs.	pro µl	890	1010	840	690	1150	810		630	780
Total T-cells rel.	%	81	81	78	78	78	79		78	79
Total B-cells abs.	pro µl	130	90	110	80	150	130		80	110
Total B-cells rel.	%	12	7	10	9	10	13		10	11
Activated T-cellsabs.	pro µl	2180	200	280	180	220	230		180	210
Activated T-cells rel.	%	16	16	26	20	15	23		22	21
NK-cells abs.	pro µl	90	140	130	90	120	70		100	90
NK-cells rel.	%	8	11	12	10	8	7		12	9
Quick %						116				
Quick	Sekunden					11,7				
PTT	Sekunden					33,5				
Fibrinogen	mg/dl					365				
Neopterin	nmol/l	19	19		17	19	12		17	
Haptoglobin	mg/dl					270	340			
Kreatinin	mg/dl	0,8	0,6	0,9	0,9	0,8	0,9	0,7	1	0,9
Harnsäure	mg/dl	4,6			6,3	6,3	6,3			
GOT	U/l	9	9	12	10	10	10	11	10	12
GPT	U/l	8	7	10	10	10	10	16	11	16
GGT	U/l	11	12	14	13	12	13		14	15
LDH	U/l					130		146	138	
Bilirubin ges.	mg/dl					0,3			0,3	
Natrium	mmol/l		140	142		141	144			139
Kalium	mmol/l	4,5	4,3	4,8		4,5	4,3	4,9	4,2	4,1
Calcium	mmol/l					2,3				
Gesamt Eiweiß	g/l					77	74			
Albumin	g/l					47,3	59,2			
	%					61,5	43,8			
alpha 1	g/l					2,2	3,4			
alpha 2	g/l					6,2	9,8			
beta	g/l					7,3	10,4			
gamma	g/l					13,8	16,9			
IgG	mg/dl					1760	1760			
IgA	mg/dl					490	560			
IgM	mg/dl					220	200			

Patient 13

	Apheresen:	20.10.92	19.11.92	25.02.93				
	Einheiten:	15.10.92	22.10.92	28.10.92	04.11.92	19.11.92	20.11.92	27.11.92
Hb	g/dl	15,5	15,6	14,6	15,3	14,3	14,4	14,5
Hkt	L/L	42	45,7		42,6	41,3	40,7	40,4
WBC	$x10^9$	5	6,5	5,8	5,9	5,1	4,7	6,1
RBC	$x10^9$	5,23		5,34	5,29	5,17	5,06	5,02
MCV	fl	80,3		81,2	80,5	79,9	80,5	80,4
MCH	pg	29,7		27,4	28,9	27,7	28,4	28,9
MCHC	g/dl	36,9		33,6	35,8	34,6	35,3	36
Thrombos	x1000/µl	246	252	273	277	246	229	256
Eosinophile	%	2		1	4	6	6	3
Basophile	%	3		1	0	0	0	2
Neutrophile	%	45		51	51	53	57	51
Lymphozyten	%	45		41	44	36	31	39
Monozyten	%	5		6	1	5	6	5
Stabkernige	%	0		11	2	6	10	1
Segmentkernige	%	45		40	49	47	47	50
CD 4 absolut	pro µl	590		970	450	370		460
CD 4 relativ	%	28		30	27	32		25
CD 8 absolut	pro µl	1240		1870	1020	680		1010
CD 8 relativ	%	59		58	62	58		55
Ratio		0,476		0,519	0,44	0,544		0,455
Lymphos abs	pro µl	2100		3230	1650	1170		1830
Lymphos rel.	%	42		38	28	23		30
Monos abs.	pro µl	250		430	300	200		370
Monos rel.	%	5		5	5	4		6
Granulos abs.	pro µl	2650		4850	3950	3720		3900
Granulos rel.	%	53		57	67	73		64
Total T-cells abs.	pro µl	1720		2680	1340	980		1390
Total T-cells rel.	%	82		83	81	84		76
Total B-cells abs.	pro µl	40		100	50	40		50
Total B-cells rel.	%	2		3	3	3		3
Activated T-cells abs.	pro µl	610		1070	580	440		700
Activated T-cells rel.	%	29		33	35	38		38
NK-cells abs.	pro µl	290		450	250	160		270
NK-cells rel.	%	14		14	15	14		15
Quick %		121	113	116	125	118	125	118
Quick	Sekunden	12,1						
PTT	Sekunden	25,3	27,7	26,9	27	27,2	27,2	28,6
Fibrinogen	mg/dl	343	390	247	277	216	214	267
BSG	1.Std	10						
Neopterin	nmol/l	21		13		13		13
Haptoglobin	mg/dl	173			189	140	149	191
Kreatinin	mg/dl	0,8		0,9	0,8	0,9	0,9	0,8
Harnsäure	mg/dl	6,6				4,7		5,8
GOT	U/l	15		13	14	12	13	12
GPT	U/l	22		25	20	22	22	21
GGT	U/l	50		47	42	46	44	40
LDH	U/l	229			191	189	189	172
Lipase	U/l							
Amylase	U/l							
Cholinesterase	U/l							
APH	U/l							
Bilirubin ges.	mg/dl	0,5		0,6		0,4	0,5	0,5
Natrium	mmol/l	140		145	142	140	137	138
Kalium	mmol/l	4,1		3,8	3,9	3,9	3,9	3,8
Calcium	mmol/l	2,2		2,4	2,2	2,2	2,2	2,3
Chlorid	mmol/l							
Gesamt Eiweiß	g/l	82	77	83	81	78	76	79
Albumin	g/l	48,3	46,4	49,1	51,7	47,2	47,6	48,1
alpha 1	g/l	2,3	2,5	2,5	2,4	2,2	2,3	2,5
alpha 2	g/l	4,7	4,9	4,8	4,2	3,8	3,9	4,7
beta	g/l	8,4	7,4	8,1	7	7,6	6,8	7,6
gamma	g/l	18	15,6	18,2	15,4	16,9	15	15,8
IgG	mg/dl	2440				2250	2130	2240
IgA	mg/dl	192				135	140	137
IgM	mg/dl	334				243	248	252

Patient 13

	Einheiten:	02.12.92	25.02.93	26.02.93	05.03.93	28.05.93	05.08.93	16.11.93	18.01.94
Hb	g/dl	14,3	15,2	14,4	15,1	13,5	13,6	13,6	14,4
Hkt	L/L	40,3	42,6	38,9	40,4	40,1	38,5	47,3	42,8
WBC	$x10^9$	6	6,3	4,6	6,7	4,9	4,9	5,8	4,5
RBC	$x10^9$	5,05	5,39	4,95	5,09	5,18	4,74	5,31	5,3
MCV	fl	79,9	79	78,4	79,8	77	81,2	80	
MCH	pg	28,4	28,3	29,2	29,6	26	28,7	25,6	
MCHC	g/dl	35,6	35,8	37,2	87,1	33,6	35,3	32,1	
Thrombos	x1000/µl	278	255	189	264	193	221	268	233
Eosinophile	%	6	1	3	1	6	1	5	
Basophile	%	1	0	0	1	0	0	1	
Neutrophile	%	47	54	50	43	55	54	55	
Lymphozyten	%	40	40	44	50	35	33	36	
Monozyten	%	6	5	3	5	4	12	3	
Stabkernige	%	5	7	2	5	6	0	2	
Segmentkernige	%	42	47	48	38	49	54	53	
CD 4 absolut	pro µl	570	640	500	540	550	520	570	370
CD 4 relativ	%	27	24	25	20	28	27	29	33
CD 8 absolut	pro µl	1220	1540	1170	1610	1140	1150	1040	550
CD 8 relativ	%	58	58	59	60	58	60	53	49
Ratio		0,467	0,415	0,427	0,335	0,456	0,456	0,548	0,673
Lymphos abs	pro µl	2100	2650	1980	2680	1960	1910	1970	1130
Lymphos rel.	%	35	42	43	40	40	39	34	25
Monos abs.	pro µl	360	320	230	470	290	200	230	180
Monos rel.	%	6	5	5	7	6	4	4	4
Granulos abs.	pro µl	3540	3340	2350	3550	2650	2790	3600	3150
Granulos rel.	%	59	53	51	53	54	57	62	70
Total T-cells abs.	pro µl	1790				1610		1460	840
Total T-cells rel.	%	85				82		74	74
Total B-cells abs.	pro µl	40				40		80	30
Total B-cells rel.	%	2				2		4	3
Activated T-cells abs.	pro µl	60				670		490	280
Activated T-cells rel.	%	3				34		25	25
NK-cells abs.	pro µl	190				250		350	180
NK-cells rel.	%	9				13		18	16
Quick %		122	112	116	122	124			
Quick	Sekunden								
PTT	Sekunden	27,5	27,6	26,5	26,8	11,6			
Fibrinogen	mg/dl	261	237	256	255	240			
BSG	1.Std								
Neopterin	nmol/l	8			22	9	19	16	
Haptoglobin	mg/dl	190			140	211	210		
Kreatinin	mg/dl	0,9		0,9	0,8	0,9	1,1	1	
Harnsäure	mg/dl	7,2		6	4,3	4,3	7,5		
GOT	U/l	15		16	13	11	54	12	
GPT	U/l	23		27	24	21	55	21	
GGT	U/l	39		40	41	67	71	64	
LDH	U/l	175		202	202	161	222	165	
Lipase	U/l								
Amylase	U/l								
Cholinesterase	U/l								
APH	U/l								
Bilirubin ges.	mg/dl	0,4				0,5	0,7		
Natrium	mmol/l	142	137	140	137	138	143		
Kalium	mmol/l	3,9	3,6	3,8	3,5	3,6	4	4,5	
Calcium	mmol/l	2,1	2,3	2,2	2,2	2,2	2,1		
Chlorid	mmol/l					101			
Gesamt Eiweiß	g/l	78			83	79	76		
Albumin	g/l	47			48,9	49,4	47,6		
alpha 1	g/l	2,8			3,1	1,3	1,9		
alpha 2	g/l	5,4			4,6	4,9	5		
beta	g/l	6,8			8,4	6,7	6,7		
gamma	g/l	15,7			17,7	16,4	14,7		
IgG	mg/dl	2340			2730	1930	2190	2403	
IgA	mg/dl	140			160	107	280	116	
IgM	mg/dl	290			300	262	130	335	

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Manfred Dietrich für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Erstellung der Arbeit bedanken.

Bei Dr. Jan van Lunzen möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und Betreuung während der Durchführung der klinischen und labortechnischen Untersuchungen sowie für die Beratung bei der Ausarbeitung der Arbeit bedanken.

Dr. Jörn E. Schmitz danke ich für die Unterstützung und Beratung bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Bruder für ihre andauernde und hilfreiche Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

10. LEBENSLAUF

Name	Kathrin Julie Dengler
Geburtstag und -ort	25.04.1969 in Nürnberg
Eltern	Dipl.-Ing. Karlheinz Dengler Ingeborg Dengler, geb. Schradin

Ausbildung:

1974 - 1979	Grundschule Holzhausen, Frankfurt am Main
1979 - 1981	Internationale Schule, Saudi Arabien
1981 - 1985	Ernst-Reuter-Schule, Frankfurt am Main
1985 - 1986	Reicher Highschool, Waco, Texas
1986 - 1988	Ernst-Reuter-Schule, Frankfurt am Main, Abitur 1988
1989 - 1991	Medizinstudium, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main
1991 - 1995	Medizinstudium, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
November 1995	Ärztliche Prüfung
1996	Besuch des Kursus für Tropenmedizin und medizinische Parasitologie, Tropeninstitut, Hamburg

Ärztliche Tätigkeiten:

1996 - 1997	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Royal Cornwall Hospital, Truro, England.
1997 - 1998	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Nordenham
1998 - 1999	Assistenzärztin, Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Nordenham
1999 - 2000	Assistenzärztin und wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung für Klinische Chemie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Regensburg
Seit September 2000	Assistenzärztin und wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn