

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski -

**Morphologische und funktionelle Charakterisierung im Verlauf der
Large-volume Leukapherese gewonnener hämatopoetischer Stammzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Christian Jäger

aus Kiel

2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. M. Zühlsdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Zühlsdorf

ZUSAMMENFASSUNG

Morphologische und funktionelle Charakterisierung im Verlauf der
Large-volume Leukapherese gewonnener hämatopoetischer Stammzellen

Christian Jäger

Die Effizienz der Large-volume Leukapherese (LVL) zur Gewinnung großer Mengen peripherer Blutstammzellen ist durch viele Studien eindeutig belegt. Der Mechanismus der Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen ist allerdings nur ansatzweise geklärt. Welche Stammzellkompartimente im Verlauf der LVL wann und in welchem Umfang freigesetzt werden, wurde bisher noch nicht systematisch untersucht. Eine Charakterisierung der mittels Apherese gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen ist nicht nur für das bessere Verständnis der peripheren Blutstammzelltransplantation wichtig, sondern hat auch für zukünftige gentherapeutische Ansätze sowie in der Immuntherapie maligner Tumoren mit dendritischen Zellen große Bedeutung.

Im Rahmen dieser prospektiven Studie wurden daher im Verlauf der LVL nach jeder Prozessierung eines Patientenblutvolumens bis zum Erreichen des sechsfachen Blutvolumens Stammzellen in getrennten Beuteln gesammelt. Daraus wurden dann Aliquots entnommen und deren Inhalt näher charakterisiert. Diese Untersuchungen zur Kinetik der gesammelten Stammzellsubpopulationen wurden bei insgesamt 17 verschiedenen Patienten mit Mamma-Karzinom, Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom bzw. Plasmozytom im Verlauf von 22 LVL durchgeführt. Die Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen erfolgte durch eine Chemotherapie und die subkutane Gabe von G-CSF. Am Tag der Apherese wurde G-CSF standardisiert zwei $\pm 0,5$ Stunden vor Beginn der Stammzellapherese appliziert. Aus jedem der sechs sequentiell gewonnenen Beutel wurden durchflußzytometrische Subpopulationsanalysen der Subsetmarker $CD34^+/CD90^+$, $CD34^+/CD117^+$, $CD34^+/CD38^-$ und $CD34^+/HLA-DR^-$ durchgeführt. Qualitative und quantitative Kurz- und Langzeitkulturtechniken (Klonogenitätsassay, LTC-IC-Assay, Limiting Dilution Analyse) sowie ein Expansionsassay nach $CD34$ -Positivselektion gestatteten neben einer morphologischen Charakterisierung auch eine Aussage über die funktionelle Integrität der gewonnenen Stammzellen.

Im Verlauf der LVL war keine signifikante Veränderung in der Zusammensetzung des Stammzellpools feststellbar. Zu allen Zeiten der LVL ließen sich annähernd gleiche Mengen sowohl primitiver als auch differenzierter hämatopoetischer Stammzellen gewinnen. Eine Verschiebung der Relationen zwischen den gesammelten Stammzellsubpopulationen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Ob die für eine periphere Blutstammzelltransplantation erforderlichen Stammzellen im Rahmen mehrerer Standard-Leukapheresen oder einer LVL gewonnen werden, hat offensichtlich auf die Qualität des Transplantates und das spätere Engraftment keinen Einfluß.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Historischer Überblick	1
1.1.1.	Entwicklung der Knochenmarktransplantation	1
1.1.2.	Entwicklung der Transplantation peripherer Blutstammzellen	2
1.2.	Hochdosis-Therapie in der Behandlung maligner Grunderkrankungen	4
1.3.	Transplantation peripherer Stammzellen versus Knochenmarktransplantation	5
1.4.	Durchführung der Blutstammzellapherese	8
1.5.	Large-volume Leukapherese versus Standard-Leukapherese	9
1.6.	Entwicklung von Testverfahren zum Nachweis hämatopoetischer Stammzellen	13
1.7.	Perspektiven in der autologen Stammzelltransplantation	16
2.	Fragestellung	19
3.	Material und Methode	21
3.1.	Patientenkollektiv	21
3.2.	Blutstammzellapherese	22
3.3.	Versuchsaufbau	23
3.3.1.	Durchflußzytometrische Subpopulationsanalysen des CD34 ⁺ -Stammzellpools	24
3.3.1.1.	Grundlagen	24
3.3.1.2.	Vorbereitung der Proben	25
3.3.1.3.	Durchführung der Messungen	26
3.3.1.4.	Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen	26
3.3.2.	LTC-IC-Assay	28

3.3.2.1.	Herstellung und Unterhaltung des Fibrolayers als Grundlage für den LTC-IC-Assay	32
3.3.2.2.	Anlegen der Langzeitkultur	34
3.3.2.3.	Unterhaltung der langzeitkultivierten Zellen	35
3.3.2.4.	Ernte der langzeitkultivierten Zellen	35
3.3.2.5.	Limiting Dilution Analyse	36
3.3.2.5.1	Theoretischer Hintergrund	36
3.3.2.5.2	Praktische Durchführung	40
3.3.2.6.	Klonogenitätsassay	42
3.3.3.	Ex-vivo Expansion	43
3.3.3.1.	CD34-Positivselektion	43
3.3.3.2.	Expansionsassay	45
3.4.	Statistik	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Leukozyten	47
4.2.	Anteil CD34 ⁺ -Zellen	49
4.3.	Subpopulationsanalysen	50
4.3.1.	Anteil CD34 ⁺ /CD38 ⁻ -Zellen an den CD34 ⁺ -Zellen	51
4.3.2.	Anteil CD34 ⁺ /CD90 ⁺ -Zellen an den CD34 ⁺ -Zellen	52
4.3.3.	Anteil CD34 ⁺ /CD117 ⁺ -Zellen an den CD34 ⁺ -Zellen	54
4.3.4.	Anteil CD34 ⁺ /HLA-DR ⁻ -Zellen an den CD34 ⁺ -Zellen	55
4.4.	Klonogenitätsassay	57
4.5.	Long Term Culture-Initiating Cell-Assay / Limiting Dilution Analyse	58
4.6.	Ex-vivo Expansion	64
4.6.1.	Reinheit nach CD34-Positivselektion	64
4.6.2.	Vitalität nach CD34-Positivselektion bzw. nach 14 Tagen Expansionsassay	65
4.6.3.	Vermehrung der Leukozyten	67
4.6.4.	Vermehrung der Zahl der koloniebildenden Zellen	67

5.	Diskussion	70
6.	Literaturverzeichnis	92
7.	Lebenslauf	110
8.	Danksagung	111
9.	Anhang	I

Meinen Eltern

1. Einleitung

1.1. Historischer Überblick

1.1.1. Entwicklung der Knochenmarktransplantation

Die Voraussetzung für die heutige Stammzelltransplantation wurde 1868 geschaffen, als Neumann und Bizzozero unabhängig voneinander das Knochenmark als Hauptort der Blutbildung beim Erwachsenen identifizierten¹.

1949 konnte Jacobson im Tierexperiment zeigen, daß nach Bleiabschirmung der Milz 77,7% der untersuchten Mäuse eine ansonsten letale Ganzkörperbestrahlung überlebten². In weiteren Studien bewies er, daß rezirkulierende Zellen aus der Milz die Hämatopoese im Knochenmark erneuerten und somit für den positiven Effekt der Organabschirmung verantwortlich waren.

Daraufhin bestrahlten Lorenz und Mitarbeiter genetisch reine Inzuchtmäuse mit sicher letaler Dosis und verabreichten ihnen anschließend intravenös syngenes Knochenmark. Empfänger und Spender gehörten zum gleichen Inzuchtstamm und waren daher genetisch weitestgehend identisch³. Nach drei Wochen lebten - je nach Inzuchtstamm - noch 68 bis 100% der Mäuse. Nach Gabe von allogenen Knochenmark lag dieser Wert bei 44%.

Bei dem ersten Versuch der klinischen Knochenmarktransplantation (KMT) wurden 1956 von E.D. Thomas und Mitarbeitern einem 63jährigen Plasmozytompatienten - verteilt auf fünf Tage - insgesamt $1,3 \times 10^9$ kernhaltige allogene Knochenmarkzellen transplantiert⁴. Vorausgegangen war der Transplantation eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung mit insgesamt sechs Gray in 17 Tagen. Der Patient verstarb 12 Tage nach der Transplantation aufgrund einer HLA-Differenz zwischen Patient und unverwandtem Spender. Hinzukam, daß durch die Fraktionierung die Bestrahlungsdosis für eine wirksame Immunsuppression zu niedrig war. Für eine dauerhafte Restitution reichte zudem die Zahl der übertragenen Knochenmarkzellen gar nicht aus.

Ende der 60er Jahre war es erneut die Gruppe um E.D. Thomas in Seattle, die nach der Entdeckung des HLA-Systems als Bedingung für eine erfolgreiche Weiterentwicklung

der allogenen KMT Standards setzte⁵: Bei vier der ersten sieben HLA-identen Patienten konnten die Wissenschaftler ein Anwachsen des Transplantates sicher nachweisen.

1977 gelang E.D. Thomas mit der Kombination von bisher alternativ verwendeten Konditionierungsmethoden der entscheidende Durchbruch⁶: Bei 100 HLA-identen Patienten wurde nach Ganzkörperbestrahlung mit zehn Gray und der zweimaligen Applikation von 60 mg Cyclophosphamid pro Kilogramm Körpergewicht in keinem einzigen Fall eine Abstoßung beobachtet; der antileukämische Effekt wurde zudem deutlich verbessert und 13 von 100 ehemals therapierefraktären Patienten blieben langfristig rezidivfrei. Die allogene KMT bei HLA-identen Spender-Empfänger-Kombinationen war damit als bewährtes Therapieverfahren etabliert.

Da aber nur bei etwa 30% der für eine Hochdosis-Chemotherapie in Frage kommenden Patienten ein HLA-identer Verwandter verfügbar war, erfolgte der Versuch einer Ausweitung der autologen KMT; diese blieb aber aufgrund eines langsameren Engraftments und einer höheren Rezidivrate (fehlender Graft-versus-Leukemia-Effekt, potentielle Tumorzellkontamination des autologen Transplantates) bisher in ihrer Anwendbarkeit begrenzt.

Die Entdeckung der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in den 80er Jahren beschleunigte zwar die Erholung des Knochenmarkes bei autologer KMT, konnte aber den Siegeszug der peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) seit Beginn der 90er Jahre nicht mehr aufhalten.

1.1.2. Entwicklung der Transplantation peripherer Blutstammzellen

Mit sogenannten „cross circulation experiments“ bei Ratten hatten Brecher und Cronkite bereits 1951 im peripheren Blut zirkulierende Zellen mit der Fähigkeit zur Knochenmarkregeneration nach Ganzkörperbestrahlung entdeckt⁷.

1971 fanden McCredie und Mitarbeiter dann auch im peripheren Blut des Menschen mononukleäre Zellen, die in der Lage waren, im Klonogenitätsassay hämatopoetische Kolonien zu bilden⁸.

Ende der 70er Jahre konnten Goldman et al. erstmals beim Menschen nachweisen, daß mononukleäre Zellen des peripheren Blutes die Hämatopoese in-vivo rekonstruieren

können⁹: Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie in akzelerierter Phase oder Blastenkrise wurden einer myeloablativen Therapie unterzogen. Dieser schloß sich die Retransfusion autologer mononukleärer Zellen an, welche zuvor während der chronischen Phase der Erkrankung gesammelt und kryokonserviert worden waren. Die auf diese Weise erreichte zweite chronische Phase war jedoch nur von kurzer Dauer.

Um ausreichend Stammzellen für ein Engraftment zu gewinnen, mußten sehr große Blutvolumina prozessiert werden. Auch die Einführung und Verbesserung leistungsfähiger Zellseparatoren in den 70er Jahren, die eine Prozessierung größerer Blutvolumina ermöglichte, konnte nicht über die Tatsache hinwegtäuschen, daß die Sammlung von peripheren Blutstammzellen (PBSZ) unter steady-state Bedingungen auf Dauer nicht akzeptabel war. Bis zu zehn Sitzungen am Zellseparator waren nötig, um eine ausreichende Zahl hämatopoetischer Stammzellen zu gewinnen.

Von großer Bedeutung war deshalb die 1976 von Richman et al. gemachte Entdeckung, daß es nach Standarddosis-Chemotherapie während der Leukozytenerholung nach Durchschreiten des Nadirs zu einem Anstieg der zirkulierenden Vorläuferzellen im peripheren Blut kommt¹⁰. Dieses Rebound-Phänomen der PBSZ nach Chemotherapie bezeichnet man heute als Mobilisation.

Mitte der 80er Jahre gelang vier Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich die erfolgreiche Transplantation peripherer Stammzellen nach Mobilisation durch Chemotherapie bei sehr unterschiedlichen Krankheitsentitäten^{11 12 13 14}.

Nach Entdeckung, gentechnischer Herstellung und verbreiteter Anwendung der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in Forschung und Klinik in den 80er Jahren zeigte sich schon bald, daß PBSZ auch mit bestimmten Wachstumsfaktoren mobilisiert werden können. Herausragende Bedeutung erlangte hier vor allem G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)¹⁵. Bei dauerhafter Gabe kommt es zu einem Leukozytenanstieg und über einen bisher noch nicht genau geklärten Mechanismus auch zur Ausschwemmung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Im klinischen Alltag hat sich G-CSF gegenüber GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) nicht zuletzt wegen der geringeren Nebenwirkungsrate und dem schnelleren Anstieg der Neutrophilen in der Mobilisierung autologer Blutstammzellen durchgesetzt¹⁶.

Die Kombination von zytostatischer Chemotherapie und hämatopoetischem Wachstumsfaktor kann die Zahl der zirkulierenden Blutstammzellen noch einmal deutlich steigern. Socinski und Siena zeigten dies 1988 bzw. 1989 für GM-CSF; aber auch für G-CSF ist dieser Zusammenhang inzwischen erwiesen^{17 18}.

Auf diese Weise ließ sich die Zahl der erforderlichen Apheresen drastisch reduzieren. Inzwischen reicht in vielen Fällen eine einzige Leukapherese aus, um ausreichend PBSZ für ein sicheres Engraftment nach Hochdosis-Chemotherapie zu gewinnen¹⁹.

1.2. Hochdosis-Therapie in der Behandlung maligner Grunderkrankungen

Die Hochdosis-Chemotherapie mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung und nachfolgender Stammzelltransplantation stellt die aggressivste Form der zytoreduktiven Therapie in der Krebsbehandlung dar.

Die theoretischen und experimentellen Grundlagen der Hochdosis-Chemotherapie sind bereits vor vielen Jahren gelegt worden; der klinische Einsatz in größerem Rahmen wurde jedoch erst durch die Verfügbarkeit der Technik zur Gewinnung peripherer hämatopoetischer Stammzellen möglich.

Medikamenten-assoziierte Toxizität - insbesondere in Bezug auf das blutbildende System - und Resistenz einiger Tumorzellen gegenüber vielen Chemotherapeutika in Standarddosierungen lassen konventionelle Chemotherapiestrategien häufig ineffektiv werden.

Rationale für dosiseskalierte Therapien bei Tumoren ist die Annahme, daß - zumindest für chemosensitive Neoplasien - eine Beziehung zwischen der verabreichten Dosis und dem Ausmaß der Tumorzellzerstörung besteht (Dosis-Wirkungs-Kurve) und daß durch die Erhöhung der Zytostatika-Dosis eine Tumorzellpopulation komplett zerstört werden kann²⁰. Seit die Beherrschung der bis dahin dosislimitierenden Myelotoxizität einer Hochdosis-Chemotherapie mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Stammzelltransplantation möglich ist, wird diese bei einer Vielzahl solider Tumoren und hämatologischer Neoplasien mit dem Ziel einer Verbesserung der Heilungsrate eingesetzt. Grundsätzlich ist die Hochdosis-Therapie eine therapeutische Option für

Patienten mit Rezidiv nach konventioneller Therapie, mit fortgeschrittener Erkrankung und schlechter Prognose sowie für Patienten mit primärem Knochenmarkbefall.

Dosisbegrenzend wirken sich aufgrund dieser Entwicklung jetzt in erster Linie extrahämatologische Nebenwirkungen (Herz, Lunge, Leber, Niere, ZNS, etc.) sowie zu erwartende Spätkomplikationen wie z.B. Zweitneoplasien aus.

Allerdings reicht ein einziger Hochdosis-Chemotherapiezyklus für die komplette Tumorzellelimination häufig nicht aus, sondern erst die sequentielle Anwendung der Hochdosis-Chemotherapie bringt den gewünschten Therapieerfolg^{21 22}. Entscheidend ist daher nicht nur die Chemotherapiedosis, sondern auch die zeitliche Abfolge der Chemotherapie - sozusagen die Dosisintensität der Applikation - , da viele Tumoren sich zwischen zwei Therapieblöcken regenerieren können. Um eine eventuelle Resistenz der Tumorzellen gegenüber einem Chemotherapeutikum zu umgehen, setzen sich Therapie- regime in der Regel aus einer Kombination mehrerer Substanzen zusammen.

Das ideale zytotoxische Agenz im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie sollte folgende Kriterien erfüllen: hohe Aktivität gegen den Tumor, steiler Verlauf der Dosis- Wirkungs-Kurve, eine Dosiserhöhung über die Standarddosis sollte ohne nicht mehr vertretbare Toxizität möglich sein, in Kombination angewandt sollte sich die Toxizität nicht potenzieren und Kreuzresistenzen sollten bei der Kombinationstherapie ebenfalls nicht vorliegen.

Eine als Konditionierungsregime vor der Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation durchgeführte Hochdosis-Chemotherapie ist für den Erfolg der Transplantation entscheidend und verfolgt neben der Vernichtung der Tumorzellen bei der allogenen Form der Transplantation auch das Ziel der ausreichenden Unterdrückung des Immunsystems des Patienten, um ein Anwachsen des Spendermarkes ohne Abstoßung zu ermöglichen.

1.3. Transplantation peripherer Stammzellen versus Knochenmarktransplantation

Seit Beginn der 90er Jahre verdrängt die autologe Stammzelltransplantation zunehmend die klassische KMT. Der wichtigste Grund dafür liegt in der signifikant kürzeren Aplasiedauer nach Stammzelltransplantation im Vergleich zur KMT. Zwar konnte durch die Einführung der Wachstumsfaktoren G-CSF bzw. GM-CSF in das Konzept der

autologen KMT die Phase der Neutropenie verkürzt werden, jedoch nicht in dem Maße, wie dies bei der PBSZT der Fall war.

PBSZ weisen einen höheren Anteil bereits differenzierter Vorläuferzellen auf und induzieren so eine schnellere hämatopoetische Regeneration^{23 24 25}. Die Phase der Neutropenie ist etwa eine Woche kürzer als bei der KMT. Auch die Regeneration der Thrombozyten und Erythrozyten ist beschleunigt.

Für eine erfolgreiche Behandlung ist jedoch nicht nur ein schnelles Kurzzeit-Engraftment sondern auch ein anhaltendes Langzeit-Engraftment nötig. Dies wird durch die Transplantation pluripotenter Stammzellen gesichert.

Bei Stammzelltransplantaten aus dem peripheren Blut ist das Verhältnis pluripotenter Stammzellen zu differenzierten Progenitoren in Richtung der Letzteren verschoben. Zwar weisen PBSZ einen höheren Anteil an differenzierten Vorläuferzellen auf, dafür enthalten Transplantate, die aus dem Knochenmark gewonnen werden, im Durchschnitt aber mindestens zehnmal mehr pluripotente Stammzellen als periphere Blutstammzellpräparate. Deshalb sollte laut Juttner et al. ein gleichwertiges peripheres Blutstammzellprodukt etwa die zehnfache Menge an Stammzellen enthalten²⁶. In Gentransferexperimenten konnte allerdings nachgewiesen werden, daß autologe Stammzelltransplantate neben bereits differenzierten Vorläuferzellen im Regelfall auch pluripotente Stammzellen in ausreichender Anzahl enthalten, so daß das Langzeit-Engraftment trotzdem gesichert sein dürfte^{27 28}. Dies ist der Grund, warum das übergangsweise verfolgte Konzept einer Kombination von autologer Knochenmark- und Stammzelltransplantation, welches die vermeintlichen Vorteile beider Verfahren - nämlich schnelle Überwindung der Aplasie durch PBSZ und sicheres Langzeit-Engraftment durch Knochenmark - ausnutzen sollte, inzwischen wieder aufgegeben wurde.

Vorteil der starken Verkürzung der Aplasiezeit durch Stammzelltransplantationen ist die Reduktion der Anzahl transfundierter Thrombozyten- und Erythrozytenkonzentrate, sowie eine Verkürzung der Zeit, in der eine breite antibiotische Abdeckung der Patienten erforderlich ist. So sinken nicht nur Morbidität und Mortalität, es fallen auch weniger stationäre Behandlungstage an; die Behandlungskosten insgesamt werden gesenkt²⁹.

Weil Blutstammzelltransplantate einen größeren Anteil immunkompetenter Lymphozyten enthalten, wird vermutet, daß die transplantierten Zellen die Erholungszeit des Immunsystems verkürzen und so einen zusätzlichen Antitumoreffekt implizieren^{30 31}.

Ein weiterer Vorteil der PBSZT besteht in der Tatsache, daß auch bei Patienten mit hypozellulärem Knochenmark - z.B. nach isolierter Bestrahlung des Beckens oder vorangegangener Chemotherapie - eine Stammzellgewinnung möglich ist.

Das Risiko einer Kontamination des Produktes mit Tumorzellen ist zwar bei der Stammzelltransplantation geringer als bei der KMT, nichtsdestotrotz ist eine gleichzeitige Ausschwemmung maligner Zellen bei der Mobilisation im Rahmen der Stammzelltransplantation möglich. Die malignen Zellen zirkulieren dann ebenfalls im Blut und können das Stammzellpräparat kontaminieren^{32 33 34 35}.

Bei der PBSZT geht die Stammzellgewinnung ohne Operations- bzw. Anästhesierisiko einher. Bei einer KMT dagegen sind wiederholte Knochenmarkaspirationen aus dem Beckenkamm erforderlich.

Erste Studien zeigen außerdem eindrucksvolle Unterschiede zwischen beiden Verfahren bezüglich der Überlebensrate der Patienten: Die Studie von Vose et al., die bereits 1993 das rezidivfreie Überleben von Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten nach Hochdosis-Chemotherapie in Verbindung mit autologer Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation untersucht hat, zeigt eine signifikante Überlegenheit der autologen Stammzelltransplantation. Die Rate des rezidivfreien Überlebens über drei Jahre betrug bei der Stammzelltransplantation 70% im Vergleich zu 32% bei der autologen KMT³⁶. Für das allogene Setting zeigten Bensinger et al. 2001 die Überlegenheit der Stammzelltransplantation gegenüber der KMT, was das rezidivfreie Überleben nach zwei Jahren betrifft (65% bei PBSZT versus 45% bei KMT)³⁷.

Einziger Nachteil der PBSZ ist die Tatsache, daß bei einigen Patienten nach exzessiver Vorbehandlung oder auch ohne ersichtlichen Grund trotz Chemotherapie und Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren es nicht möglich ist, einen nennenswerten Anstieg der Zahl der zirkulierenden Stammzellen zu erzielen. Bei diesen sogenannten „non-mobilizern“ sollte dann die Möglichkeit der Knochenmarkentnahme in Erwägung gezogen werden, um eventuell doch noch ein erfolgversprechendes Transplantat zu gewinnen.

Gegenüber der autologen KMT bietet das allogene Setting die Gewähr einer absoluten Tumorzellfreiheit und eines ausgeprägteren Graft-versus-Leukemia-Effektes^{38 39}. Auch bei der Blutstammzelltransplantation werden in vermehrtem Maße allogene Transplantate gewonnen. Verbunden mit einem ausgeprägteren Graft-versus Leukemia-Effekt

ist jedoch stets das Risiko der Graft-versus-Host-Reaktion. Eine T-Zell-Depletion kann dieses Risiko vermindern, reduziert dadurch aber gleichzeitig wieder den Graft-versus-Leukemia-Effekt^{40 41 42 43 44 45}.

Besonders die Vermeidung invasiver Techniken bei der Gewinnung der PBSZ-Transplantate könnte zu einer erhöhten Akzeptanz der allogenen Stammzellgewinnung unter potentiellen Spendern führen. Unklar ist derzeit allerdings, inwieweit die Mobilisierung mit G-CSF für Spender langfristig mit ernsthaften Nebenwirkungen verbunden sein könnte.

1.4. Durchführung der Blutstammzellapherese

Ziel der autologen Blutstammzellapherese ist die Gewinnung eines effizienten Transplantates, das nach einer Hochdosis-Therapie zu einer schnellen und dauerhaften Regeneration der Hämatopoese führt.

Bei Patienten erfolgt die Mobilisation autologer Blutstammzellen in der Regel mit einer milden zytostatischen Chemotherapie und einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor. Die Gabe von G-CSF beginnt am zweiten Tag nach Ende der Chemotherapie und wird bis zur letzten Leukapherese fortgeführt.

Wichtig ist die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Einleitung der Leukapherese nach Stammzellmobilisation. Nach Beendigung der Chemotherapie wird zunächst regelmäßig das Blutbild bestimmt, um den tiefsten Leukozytenwert (Nadir) zu erfassen. Sobald die Anzahl der Leukozyten über 500/ μ l steigt, erfolgen täglich Blutbildkontrollen und durchflußzytometrische Bestimmungen der zirkulierenden CD34-exprimierenden Zellen (CD34⁺-Zellen). Die Zahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD34⁺-Zellen korreliert sehr stark mit der Zahl der gewonnenen CD34⁺-Zellen im Apherisat und ist somit von hohem prädiktivem Wert^{46 47 48}. Bei Patienten, die vor der Apherese zwischen 30 und 100 CD34⁺-Zellen/ μ l aufweisen, können in der Regel mit einer einzigen konventionellen Apherese bei Prozessierung von acht bis zehn Litern Blut mehr als $2,5 \times 10^6$ CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht gewonnen werden⁴⁹. Diese Dosis führt in der Regel nach Transplantation zu einer raschen Rekonstitution der Hämatopoese^{50 51}. Gemäß den „Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstamm-

zellen“ der Bundesärztekammer werden für die autologe Transplantation mindestens 2×10^6 CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht empfohlen⁵².

Ein bis zwei Tage nach Beendigung der Hochdosis-Therapie wird das Stammzellprodukt dem Patienten retransfundiert.

1.5. Large-volume Leukapherese versus Standard-Leukapherese

In den Anfangszeiten der Blutstammzellapherese wurde je Apherese maximal das zweifache Blutvolumen (acht bis zehn Liter bei Erwachsenen) prozessiert. Um die für eine dauerhafte Rekonstitution der Hämatopoese erforderliche Zellzahl (7×10^8 mononukleäre Zellen/kg Körpergewicht bzw. $0,3-50 \times 10^4$ CFU-GM/kg Körpergewicht - je nach Autor und Labor - bzw. 2×10^6 CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht) zu gewinnen, waren bis zu zehn Sitzungen erforderlich^{53 54 55}. Eine großflächige Etablierung der autologen Stammzelltransplantation wurde zunächst dadurch verhindert, daß gerade nach exzessiver Vortherapie (Chemotherapie und/oder Radiatio) kaum noch Blutstammzellen zu mobilisieren waren. Das erforderliche Ausmaß an konventionellen Leukapheresen wäre nicht mehr praktikabel gewesen.

Mit der Einführung neuer Zellseparatoren Anfang der 90er Jahre wurde die Prozessierung auch größerer Blutvolumina in einem vertretbaren Zeitrahmen möglich. Zentrale Frage war nun, ob durch Erhöhung des prozessierten Volumens auch eine entsprechende Steigerung der Stammzellausbeute zu erwarten sei. Dadurch ließe sich die Zahl der erforderlichen Apheresen zur Gewinnung ausreichender Stammzellen drastisch reduzieren.

Die sogenannte Large-volume Leukapherese (LVL) wurde definiert als Apherese, die die Prozessierung von mehr als dem dreifachen Blutvolumen bzw. mehr als 15 Litern Blut beinhaltet^{56 57 58}. Das höchste dokumentierte prozessierte Volumen liegt bei 46,4 Litern Blut⁵⁹. Bei Kindern ist eine Leukapherese des 12-fachen Blutvolumens beschrieben worden⁶⁰.

Tatsächlich nahm mit Erhöhung des prozessierten Blutvolumens (pBV) auch die Stammzellausbeute in etwa proportional zu. Die LVL führte erstaunlicherweise sogar zu signifikant höheren Ausbeuten an Progenitorzellen, als sich aus der Differenz der Werte

vor und nach Apherese ableiten ließe. Während der Leukapherese scheinen also in gewissem Umfang Stammzellen mobilisiert zu werden⁶¹. Sowohl bei gesunden Spendern als auch bei Patienten postulierten einige Autoren sogar eine überproportionale Ausschüttung von Stammzellen ins periphere Blut mit fortschreitender Laufzeit der Leukapherese^{57 59 62 63 64}. Der LVL selbst wurde bei diesem als „Recruitment“ bezeichneten Phänomen der stimulierende Effekt auf die Freisetzung von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn zugeschrieben⁶⁵: Scherkräfte entlang den Knochenmarksinusoiden sollen letztendlich die Adhäsionskräfte zwischen CD34⁺-Vorläuferzellen und Endothelzellen sehr effektiv reduzieren. Wahrscheinlich spielen Selektine hierbei eine entscheidende Rolle: CD34⁺-Zellen exprimieren L-Selektin, während Endothelzellen positiv für P-Selektin sind. Selektine funktionieren nur in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen⁶⁶. Möglicherweise reduziert ACD-A, das während der LVL als Antikoagulum dient, die Selektin-vermittelte Adhäsion der CD34⁺-Zellen und beschleunigt so die Ausschüttung von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie⁶¹.

Hillyer et al. führten 1992 bei gesunden Spendern vierstündige Leukapheresen durch, in denen sie durchschnittlich 17,7 Liter Blut prozessierten. Nach jeder Stunde wurde der Sammelbeutel gewechselt und ein Aliquot für weitere Analysen entnommen. Dabei ergab sich ein mehr als zweifacher Anstieg sowohl der CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte-macrophage) als auch der CD34⁺-Zellen im letzten Beutel im Vergleich zum ersten⁶⁴.

Eine konventionelle Leukapherese über drei Stunden mit weniger als zehn Litern pBV hatte bei gesunden Spendern keine signifikante Veränderung der CFU-GM-Ausbeute gezeigt⁶⁷.

Auch bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen ließ sich nach steady-state Mobilisation ein „Recruitment“ der CFU-GM nachweisen⁵⁷: Bei einem durchschnittlichen pBV von etwa 23 Litern wurde sukzessive in vier Beuteln gesammelt. Dabei stieg die Ausbeute über das 1,4-fache in Beutel 2 bis auf das 1,8-fache in Beutel 4 an.

Genauso unterschiedliche Ergebnisse finden sich auch in aktuellen Untersuchungen: Smolovicz zeigte 1999 in einer Studie mit acht Patienten und neun Leukapheresen ein „Stammzellrecruitment“ bei der Prozessierung des dreifachen Blutvolumens⁶⁸. Alle

Patienten hatten vor der Leukapherese zur Mobilisierung eine milde Chemotherapie und G-CSF bekommen.

Die Gruppe um Bojko dagegen fand 1999 im Verlauf der LVL mit Prozessierung des bis zu fünffachen Blutvolumens konstante Mengen an CD34⁺-Zellen ohne einen Hinweis für ein „Recruitment“⁶⁹.

Auch Cassens et al. konnten in zwei Studien aus dem Jahre 1999 bzw. 2001 bei der Prozessierung des vier- bzw. sechsfachen Blutvolumens einen überproportionalen Anstieg der gewonnenen Stammzellen nicht nachweisen. Sie zeigten aber, daß zu allen Zeiten der LVL Progenitorzellen gewonnen werden können und allenfalls gegen Ende der LVL ein leichter Abfall zu verzeichnen ist^{70 71}.

Im Tierversuch konnte dieser Trend schon seit längerer Zeit gezeigt werden^{72 73 74}.

Für pädiatrische Patienten ist das „Recruitmentphänomen“ nach Mobilisation durch Chemotherapie und G-CSF-Gabe in einigen Fällen bei älteren Kindern beschrieben worden, wohingegen es bei jüngeren Kindern so nicht nachweisbar war⁶⁰.

Neben Unterschieden in der Vorbehandlung und der Sammeltechnik könnte eine denkbare Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse sein, daß möglicherweise bei steady-state mobilisierten Patienten bzw. gesunden Spendern die LVL über die Ausschüttung endogener Zytokine zu einem „Progenitorrecruitment“ führt, während bei durch Chemotherapie und/oder G-CSF bereits mobilisierten Patienten die Progenitorzellzahl, die für ein „Recruitment“ während der LVL zur Verfügung stünde, nach intensiver Mobilisierung nahezu erschöpft ist. Dieses in der Pharmakologie durchaus geläufige Phänomen des Ausbleibens einer Reaktion auf einen Wirkstoff, wenn der Stimulus gerade gegeben wurde, wird als Tachyphylaxie bezeichnet⁶⁰. Gleichwohl finden sich Hinweise für ein „Stammzellrecruitment“ in Einzelfällen auch bei mittels Chemotherapie und Wachstumsfaktoren mobilisierten Patienten.

Sicherlich sind manche Ergebnisse der oben genannten Untersuchungen aber auch sehr kritisch zu hinterfragen, da häufig nur Fallzahlen zwischen fünf und zehn Patienten erreicht wurden.

Veränderungen in der Zusammensetzung der Subpopulationen des CD34⁺-Zellkompartimentes im Verlauf der LVL wurden bisher nur in einer einzigen Studie näher untersucht⁶¹. Signifikante Unterschiede bezüglich der Freisetzung besonders primitiver

bzw. bereits differenzierter Vorläuferzellen zu irgendeinem Zeitpunkt der LVL fanden sich dabei nicht. Gleichwohl werfen die widersprüchlichen Studienergebnisse zum „Recruitment“ von Stammzellen die Frage auf, ob nicht möglicherweise doch zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Stammzellkompartimente durch die Kombination von Bestrahlung, Chemotherapie, Wachstumsfaktoren, Apherese und Antikoagulation freigesetzt werden.

Die Mechanismen der Stammzellfreisetzung sind bis dato nicht detailliert aufgeklärt. Eine wichtige Rolle scheinen Adhäsionsmoleküle zu spielen.

Die überzeugendste Hypothese auf diesem Gebiet besagt, daß Zytokine zytoadhäsive Interaktionen zwischen den Stammzellen und dem Knochenmarkstroma unterbrechen. Dementsprechend kommt es bei einigen zytoadhäsiven Molekülen (vor allem bei den Integrinen) nach Mobilisation zu Funktionsänderungen⁷⁵. Die Rekonstitution der Hämatopoese nach Stammzelltransplantation verläuft zumindest teilweise über dieselben molekularen Mechanismen wie die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen. Der als „Homing“ bezeichnete Prozeß der (Wieder-)Ansiedelung transplantiertter hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark des Empfängers ist ein entscheidender Schritt in der Etablierung eines Langzeit-Engraftments nach Transplantation. „Homing“ erfordert Integrin-vermittelte Zelladhäsion unter anderem durch „very late antigen 4“ (VLA-4), VLA-5 und „leukocyte function associated-1 molecule“ (LFA-1)⁷⁶. Es konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von Antikörpern gegen das Integrin VLA-4 oder seinen Ligand „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) das Knochenmark-„Homing“ hemmt und zu einem Anstieg der im peripheren Blut zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen führt, also einer Stammzellmobilisation gleichkommt^{77 78 79}. Die Aufklärung dieser Phänomene birgt die Chance, Stammzellen noch gezielter und effektiver zu mobilisieren und gleichzeitig durch vorab verabreichte Zytokine für ein verbessertes Outcome nach Stammzelltransplantation durch stimuliertes „Homing“ zu sorgen^{80 81}.

Allerdings ist nicht nur ungeklärt, wie Stammzellen freigesetzt werden, sondern insbesondere auch, welche Stammzellkompartimente (differenziert bzw. primitiv) wann und in welchem Umfang ausgeschüttet werden. Art und Menge der transplantierten Stammzellen sind aber später entscheidend für die Geschwindigkeit der Regeneration der Hämatopoese im Knochenmark nach der Hochdosis-Chemotherapie.

Auf der Basis der dargestellten Hypothese eines „Recruitments“ von Stammzellen durch die LVL ergibt sich daher aus klinischer Sicht die Frage, ob alle im Rahmen der LVL gesammelten Stammzellen geeignet sind, ein schnelles und langfristiges Engraftment zu induzieren, oder ob zu bestimmten Zeiten der LVL unterschiedlich differenzierte Stammzellen gewonnen werden können. Zu diesem Zweck müßte untersucht werden, ob es zeitabhängige Änderungen in der Zusammensetzung des Stammzellpools gibt.

Einigkeit besteht in Bezug auf die LVL bisher nur darüber, daß mit diesem Verfahren Stammzellen effizienter gewonnen werden können als mit der Standard-Leukapherese, ohne daß die Nebenwirkungen wie Hypokalzämien, Thrombozytopenien oder Verschlüsse des zentralen Venenkatheters überproportional ansteigen^{82 83}. Auch die Wahrscheinlichkeit, im Rahmen der LVL maligne Zellen zu mobilisieren, ist nicht höher als bei der konventionellen Leukapherese⁶¹.

1.6. Entwicklung von Testverfahren zum Nachweis hämatopoetischer Stammzellen

Im Rahmen der Knochenmark- und Stammzelltransplantation wurden auch geeignete Nachweis- und Quantifizierungsmethoden für hämatopoetische Stammzellen entwickelt. Ziel war insbesondere die Identifikation pluripotenter Stammzellen, ohne die die Rekonstitution einer langfristigen, multilinearen Hämatopoese nicht möglich ist.

Lichtmikroskopische Untersuchungen führten hier nicht weiter, da alle Stammzellen morphologisch den kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten entsprechen.

Von herausragender Bedeutung für das Verständnis der Physiologie der Hämatopoese war 1984 die Entdeckung des CD34-Antigens durch Civin⁸⁴. Das CD34-Antigen wird auf der Oberfläche hämatopoetischer Stammzellen und auf Endothelzellen exprimiert. Unter Ruhebedingungen sind etwa 1% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark und weniger als 0,01% der Leukozyten im peripheren Blut CD34-positiv. Die Expression des Glykoproteins CD34 bei hämatopoetischen Zellen nimmt im Laufe der Zelldifferenzierung kontinuierlich ab und geht schließlich vollkommen verloren. Mehr als 90% der CD34⁺-Zellen sind wahrscheinlich als determinierte Vorläuferzellen der Hämatopoese anzusehen, da sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Proliferation) nicht

mehr besitzen. Im Gegensatz dazu besitzen die pluripotenten Stammzellen die Fähigkeit zur dauerhaften Rekonstruktion aller Zellreihen der Hämatopoese (Differenzierung) und zur Selbsterneuerung.

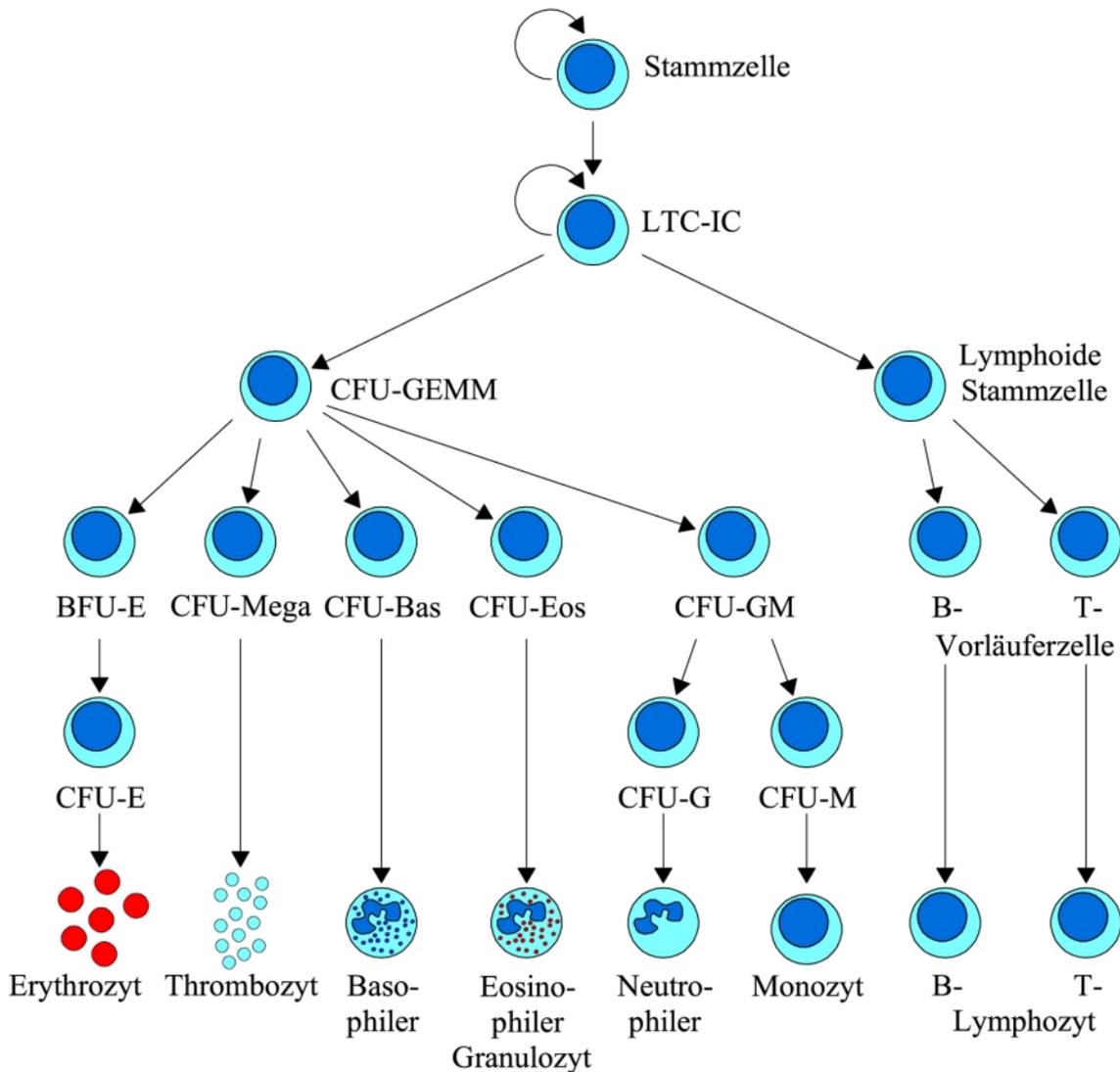


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese

Eine Abgrenzung der pluripotenten Stammzellen von den reiferen Vorstufen scheint heute durch die Entdeckung immer neuer und spezifischerer Oberflächenmarker (z.B. Thy-1 bzw. CD90 und c-kit-ligand bzw. CD117) in greifbare Nähe gerückt zu sein. Die $CD34^+/CD90^+$ -Zellen werden funktionell und phänotypisch als primitivste Zellpopulation beschrieben, die in der Lage ist, eine langfristige Aufrechterhaltung der Hämatopoese zu gewährleisten^{85 86}. Die Subpopulation der $CD34^+/CD90^+$ -Zellen ist besonders reich an HPP-CFC (high proliferative potential colony-forming cell) und

zumindest ein Teil dieser Zellen besitzt die Fähigkeit, Langzeitkulturen zu initiieren (Long Term Culture-Initiating Cells)^{87 88}. Diese pluripotenten Stammzellen zeichnen sich zugleich durch die fehlende Koexpression weiterer Oberflächenantigene wie z.B. CD38 und HLA-DR aus. Dagegen spricht die CD117-Expression eher für einen linien-spezifischen Charakter der Stammzellen.

Vorteil der durchflußzytometrischen Bestimmung der Stammzelloberflächenmarker ist also die Möglichkeit der Detektion unterschiedlich differenzierter Vorläuferzellen. Außerdem können die Stammzellen direkt quantifiziert werden, während aufwendige funktionelle Tests eine solche Bestimmung nur retrospektiv je nach Testverfahren erst nach zwei bis sieben Wochen ermöglichen.

Durch Konsensus-Protokolle, die die Verwendung einheitlicher Meß- und Auswerteverfahren festlegen, ist in der Durchflußzytometrie eine gewisse Standardisierung möglich⁸⁹. Die Technik der funktionellen Tests läßt eine solche Standardisierung nur sehr begrenzt zu, so daß zwangsläufig eine hohe Variabilität der Meßergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien besteht. Vorteil dieser in-vitro Kulturverfahren bleibt jedoch der funktionelle Charakter dieser Untersuchungsmethode, da nur sie Aussagen über Teilungs- und Wachstumsfähigkeit einer Stammzellpopulation zulassen. Verschiedene Studien konnten nachweisen, daß eine lineare Beziehung zwischen der Gesamtzahl der CD34⁺-Zellen eines Aphereseproduktes und dem Wachstum an CFU-GM im Klonogenitätsassay besteht^{48 90}. Aus beiden Einzelwerten läßt sich außerdem die sogenannte „cloning efficiency“ berechnen, also die Zahl an CD34⁺-Zellen, die zur Bildung genau einer CFU führen.

Tierische und humane hämatopoetische Stammzellen wurden erstmals in den 60er Jahren durch die Bildung von Kolonien auf Methylzellulose im in-vitro Assay nachgewiesen^{91 92}. Nachteil dieser in-vitro Assays war stets, daß damit nur bereits differenzierte, reifere Stammzellen erfaßt wurden, nicht aber pluripotente Stammzellen. Eine weitere Annäherung an die pluripotenten Stammzellen gelang Dexter et al. Mitte der 70er Jahre zunächst im Mausmodell, indem sie mononukleäre Zellen aus peripherem Blut bzw. Knochenmark in Langzeitkulturen auf einer Unterlage aus bestrahlten Stromazellen kultivierten^{93 94}. Die Stromazellen scheinen über enge Zell-zu-Zell-Interaktionen, membran-assoziierte Moleküle und Zytokine, die Hämatopoese zu

steuern und sind deshalb für die Aufrechterhaltung von Langzeitkulturen zur Zeit noch unabdingbar.

Gartner und Kaplan adaptierten 1980 dieses System erfolgreich für frühe menschliche Stammzellen⁹⁵. In der Folgezeit verfeinerte v.a. die Arbeitsgruppe um Sutherland und Eaves das Versuchsprinzip^{96 97 98 99}. Primitive hämatopoetische Vorläuferzellen, die in der Lage sind, Myelopoese in der Langzeitkultur zu initiieren und für einige Wochen aufrecht zu erhalten, wurden von ihnen erstmals als Long Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC) bezeichnet. Der sogenannte LTC-IC-Assay ist auch heute noch der beste funktionelle in-vitro Test für humane Stammzellen, weil er der Identifikation der pluripotenten Vorläuferzelle am nächsten kommt.

1.7. Perspektiven in der autologen Stammzelltransplantation

Die klinische Relevanz einer Tumorzellkontamination autologer Stammzelltransplantate ist bisher noch nicht endgültig geklärt^{100 101 102 103 104}.

Verschiedene Verfahren zur selektiven Tumorzelldepletion oder Stammzellenanreicherung werden derzeit getestet. Für die Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen wird in der Regel CD34 als Zielantigen benutzt. Zwei Verfahren der Stammzellenanreicherung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD34 sind in klinischer Anwendung:

Im Einsatz befinden sich zum einen sogenannte „immunomagnetische beads“, die an monoklonale Antikörper gegen das CD34-Antigen konjugiert werden. Durch Platzierung in einem starken magnetischen Feld werden die so markierten CD34⁺-Zellen von den übrigen Zellen abgetrennt¹⁰⁵. Zum anderen kann die Selektion CD34⁺-Zellen alternativ durch eine Säulenapherese vermittelt über die Biotin-Avidin-Reaktion erfolgen.

Mit beiden Verfahren ist es möglich, CD34⁺-Stammzellen in klinischem Maßstab in einer Reinheit von über 95% anzureichern und gleichzeitig die Anzahl der kontaminierenden Tumorzellen um bis zu vier log-Einheiten zu reduzieren^{106 107}. Ein weiterer Vorteil der Positivselektion ist die Konzentrierung der CD34⁺-Zellen. Dadurch nimmt das Zellvolumen, welches kryokonserviert werden muß, stark ab und auch die erforderliche Menge an Dimethylsulfoxid (DMSO) kann vermindert werden. Das Kryokonservierungsmittel DMSO wird bei autologen Transplantationen in vollem

Umfang mittransfundiert und verursacht Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Tachykardien und Hypotension.

Die Reduktion der Tumorzellkontamination bei hämatologischen Neoplasien mittels Inkubation des Stammzellproduktes mit 4-Hydroxycyclophosphamid („Purging“) fand keine breite Anwendung.

Eine Verminderung der Tumorzelllast ist auch durch die in-vitro Vermehrung von CD34⁺-Zellen nach Zusatz von Wachstumsfaktoren für hämatopoetische Progenitorzellen versucht worden. Allerdings hat dieses Verfahren aufgrund des hohen Aufwandes und der hohen Kosten noch keinen Eingang in die klinische Anwendung gefunden.

Haylock beschrieb 1992 erstmals diese ex-vivo Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen¹⁰⁸. In präklinischen Studien konnte er durch Zugabe eines Wachstumsfaktorcocktails in nur sieben Tagen den CFU-GM-Anteil um das 30fache steigern. Ziel war es dabei, innerhalb von wenigen Tagen ausreichend reife, funktionsfähige Neutrophile bereitzustellen, um so die Phase der Neutropenie möglicherweise immer weiter zu verkürzen. Brugger et al. nutzten 1994 die ex-vivo Expansion erstmals klinisch, indem sie Blutstammzelltransplantate nach Positivselektion über 14 Tage mit einem leicht modifizierten Zytokincocktail inkubierten¹⁰⁹. Sie konnten so die Zahl der mononukleären Zellen um den Faktor 62, die der klonogenen Zellen um den Faktor 50 vermehren. Der Gehalt an pluripotenten Stammzellen (LTC-IC) blieb annähernd konstant. Die Transplantation nach Hochdosis-Chemotherapie führte zu einer schnellen und langfristigen Erholung der Hämatopoese. In Zukunft wäre nach ex-vivo Expansion auch bei den sogenannten „non-“ oder „poor-mobilizern“ eine autologe Stammzelltransplantation denkbar, sofern ausreichend pluripotente Stammzellen vorhanden sind, da diese (noch) nicht vermehrt werden können.

Prinzipiell ähnlich funktioniert die ex-vivo Expansion von Nabelschnurblut: Diese Stammzellquelle hat den großen Vorteil einer vergleichsweise leichten Verfügbarkeit und könnte bei noch relativ geringer Immunogenität neben dem autologen Einsatz auch für die allogene Stammzelltransplantation geeignet sein. Problematisch ist allerdings die nur begrenzt verfügbare Menge an Stammzellen.

Vorstellbar ist auch, durch Zusatz von bestimmten Wachstumsfaktoren einzelne Zellreihen ganz gezielt zu vermehren - je nach beabsichtigtem Anwendungsgebiet des Transplantates. Außerdem wird die ex-vivo Expansion schon jetzt häufig in Verbindung

mit Geninsertionsexperimenten genutzt: Im Rahmen präklinischer Studien wird nach retroviralem Gentransfer des Multi-Drug-Resistance-Genes in ausgewählte CD34⁺-Zellen die Auswirkung auf das Knochenmark untersucht. Ziel ist die Vermeidung des myeloablativen Effektes einer Chemotherapie durch „Anzüchten“ eines Medikamenten-resistenten Knochenmarkes¹¹⁰.

Ebenfalls Gegenstand der Forschung ist zur Zeit die Einschleusung zellinienspezifischer Gene in hämatopoetische Stammzellen, um so die Nachkommenschaft der manipulierten Zellen beeinflussen zu können. Die Nutzung von Geninsertionen als Zellmarker ermöglicht eine Verfolgung des Zelldifferenzierungsprozesses¹¹¹.

2. Fragestellung

Periphere Blutstammzellen zur autologen Stammzelltransplantation können mit hoher Effizienz mittels LVL gewonnen werden^{56 57 61 83 112 113 114 115 116}.

Auch für die LVL bei gesunden Spendern zur Gewinnung eines allogenen Transplantates liegen ähnliche Studienergebnisse vor^{62 64 117}.

Zu einem „Recruitment“ von Stammzellen durch die LVL gibt es widersprüchliche Studien^{60 64 71 118}. Die unterschiedlichen Ergebnisse ergeben sich unter anderem aus den verschiedenen Studienbedingungen: Einige Zentren sammeln bei der LVL über einen konstanten Zeitraum von vier Stunden, während das prozessierte Volumen schwankt; andere prozessieren konstant zwanzig Liter Blut über unterschiedliche Zeiträume. Wieder andere gewinnen Stammzellen aus dem vier- bis sechsfachen Blutvolumen^{61 64 70 71}. Ob und wann es zu einem „Recruitment“ kommt, hängt demnach wahrscheinlich von einer gewissen Standardisierung, der (Chemo-)Therapie sowie dem Zeitpunkt der Apherese ab.

Gerade die Standardisierung des pBV spielt eine große Rolle zur Überprüfung der Effizienz der LVL und der Kinetik der in ihrem Verlauf gewonnenen Stammzellen¹¹⁹.

Von großer Bedeutung für eine hohe Stammzellausbeute scheint außerdem der optimale Zeitpunkt der G-CSF-Gabe vor der Apherese zu sein. Fischer et al. konnten bei Patienten mit Mamma-Karzinom oder Lymphomen nach steady-state Mobilisierung mit G-CSF zeigen, daß die Konzentration an G-CSF und PBSZ ihr Maximum zwei bis acht Stunden nach Applikation des Wachstumsfaktors erreicht¹²⁰. Dieses Phänomen soll durch Standardisierung der zeitlichen Abfolge von G-CSF-Gabe und Beginn der LVL ausgenutzt werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob und inwieweit die Kinetik der Freisetzung von Stammzellen durch Wachstumsfaktoren und/oder Chemotherapie bzw. durch ein potentiell „Recruitment“ zur Ausschüttung und Gewinnung verschiedener Stammzellfraktionen führt.

Relevant ist die Beantwortung dieser Frage vor allem aus fünf Gründen:

1. Klinisch ist es von entscheidender Bedeutung, ob es biologische bzw. qualitative Unterschiede zwischen mittels LVL und mittels herkömmlicher Apherese gewonnenen Stammzellen gibt.

2. Für den dauerhaften Erfolg einer Stammzelltransplantation ist ein ausgewogenes Verhältnis zwischen pluripotenten Stammzellen und differenzierten klonogenen Progenitorzellen im Transplantat erforderlich. Erstere sollen ein langfristiges Engraftment des Transplantates sichern, letztere gewährleisten durch eine schnelle Regeneration der Hämatopoese eine möglichst kurze Aplasiephase.
3. Auch bei der Behandlung hämatologischer Neoplasien stellt die Gentherapie eine zukünftige Behandlungsoption dar. Gentherapeutische Manipulationen erfolgen sinnvollerweise an Stammzellen, um einen möglichst breitflächigen Effekt zu erzielen^{121 122 123}. Voraussetzung für solche Ansätze ist jedoch immer eine genaue Charakterisierung der Stammzellen, da andernfalls Manipulationen des Genmaterials ins Leere führen können. So fanden Humeau et al. 1996 heraus, daß Stammzellen, die sowohl das CD34- als auch das CD90-Antigen tragen, nur noch eine begrenzte Differenzierungsfähigkeit in Richtung Erythropoese besitzen¹²⁴. Ein Gentransferprogramm, das auch die Erythropoese erfassen soll, erscheint mit dieser Art von Stammzellen zumindest fraglich.
4. Die Expansionsfähigkeit bei der ex-vivo Expansion von Stammzellen hängt wesentlich von der Differenzierungsstufe der Stammzellen ab. Insofern ist für künftige Modifikationen von Stammzelltransplantaten eine genaue Charakterisierung der gewonnenen Stammzellfraktionen von hoher Relevanz.
5. Rechtlich gilt das Stammzelltransplantat seit 1997 als Blutprodukt und somit als Arzneimittel⁵². Dies hat erhebliche Konsequenzen für die Gewinnung, Aufbereitung und Qualitätskontrolle solcher Transplantate. Aus diesen Regularien ergibt sich die Notwendigkeit, Wirkung, Zusammensetzung und Funktionsfähigkeit solcher Transplantate im Detail zu charakterisieren.

Diese Studie untersucht deshalb, ob die Gewinnung von PBSZ im Verlauf der LVL zu Änderungen in der Zusammensetzung des Stammzellpools führt. Dazu werden sequentiell gewonnene hämatopoetische Stammzellen näher charakterisiert. Durch die Kombination morphologischer Untersuchungsformen (durchflußzytometrische Antigenbestimmungen) und funktioneller Zellkulturtechniken (Klonogenitätsassay, LTC-IC-Assay, Limiting Dilution Analyse, Expansionsassay) soll eine möglichst umfassende Charakterisierung der Stammzellen erreicht werden.

3. Material und Methode

3.1. Patientenkollektiv

Bei 17 Patienten im Alter von 24 bis 61 Jahren mit soliden Tumoren (Mamma-Karzinom) oder hämatologischen Erkrankungen (Plasmozytom, sonstige Non-Hodgkin-Lymphome, Morbus Hodgkin) wurden insgesamt 22 LVL (sechsfaches Blutvolumen) durchgeführt. Von den 17 Patienten waren zehn männlichen und sieben weiblichen Geschlechts. Alle Patienten waren für eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer PBSZT vorgesehen.

Die Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen erfolgte durch unterschiedliche Chemotherapieregime und die subkutane Gabe von G-CSF (10 µg/kg Körpergewicht). Die Behandlung mit G-CSF begann 24 Stunden nach Beendigung der Chemotherapie und endete nach der Stammzellapherese. Die Patientendaten im Einzelnen und Angaben zu den unterschiedlichen Therapieregimen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Mobilisierungsschema	Konditionierungsschema
1	männlich	61	Plasmozytom	Cyclophosphamid/Adriamycin	Idarubicin/Melphalan/Cyclophosphamid
2	männlich	52	Plasmozytom	Idarubicin/ Dexamethason	Idarubicin/Melphalan/Cyclophosphamid
3	männlich	52	Plasmozytom	Cyclophosphamid	Melphalan 200
4	männlich	57	Mamma Ca	EC	Cyclophosphamid/Thiotepa/Mitoxantron
5	männlich	43	NHL	M-CHOEP	Adriamycin/Cyclophosphamid/Etoposid/Vincristin
6	männlich	61	Plasmozytom	Cyclophosphamid/Adriamycin	Idarubicin/Melphalan/Cyclophosphamid
7	männlich	61	NHL	Vincristin/Methotrexat/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Dexamethason	keine Konditionierung
8	weiblich	40	NHL	M-CHOEP	M-CHOEP
9	männlich	57	NHL	DexaBeam	Hochdosis BEAM
10	männlich	24	M. Hodgkin	DexaBeam	Hochdosis BEAM
11	männlich	40	NHL	DexaBeam	keine Konditionierung
12	weiblich	24	Mamma Ca	Epiadriamycin/Cyclophosphamid	Epirubicin/Thiotepa/Cyclophosphamid
13	männlich	57	NHL	DexaBeam	Hochdosis BEAM
14	weiblich	47	Plasmozytom	Cyclophosphamid/Adriamycin	Melphalan 200
15	männlich	24	M. Hodgkin	DexaBeam	Hochdosis BEAM
16	männlich	52	Plasmozytom	Idarubicin/ Dexamethason	Idarubicin/Melphalan/Cyclophosphamid
17	weiblich	45	Mamma Ca	Epirubicin/Taxol	CTTCb
18	weiblich	47	Mamma Ca	Epirubicin/Taxol	CTTCb
19	männlich	45	NHL	DexaBeam	Hochdosis BEAM
20	weiblich	29	Mamma Ca	Cyclophosphamid	CTTCb
21	weiblich	46	NHL	DexaBeam	Ganzkörperbestrahlung/Cyclophosphamid
22	männlich	57	NHL	DexaBeam	Hochdosis BEAM

Tabelle 1: Patientendaten

Bei einer Leukozytenzahl größer als 500/ μ l Blut wurde mit dem Monitoring der CD34⁺-Zellen im Blut begonnen. Bei mehr als zehn CD34⁺-Zellen/ μ l Blut wurde mit der Stammzellapherese begonnen.

Als weitere Voraussetzungen für die Durchführung einer Leukapherese wurden außerdem eine Mindestthrombozytenzahl von 50.000 Thrombozyten/ μ l und ein Ausgangshämoglobinwert von 9 g/dl festgelegt.

Die G-CSF-Gabe am Tag der Apherese erfolgte zwei (\pm 0,5) Stunden vor Beginn der Apherese.

Außer bei drei Leukapheresen erhielten alle Patienten vor der LVL einen zentralvenösen Zugang (Sheldon-Katheter).

3.2. Blutstammzellapherese

Alle Apheresen von PBSZ wurden mit dem COBE-Spectra®-Zellseparator (MNC-Programm, Software Version 5.1) durchgeführt. Die Maschine wurde gemäß den Herstellerangaben bedient und eingesetzt.

Um eine Beurteilung der zeit- und volumenabhängigen Kinetik bei der Anreicherung der PBSZ zu ermöglichen, wurde der Sammelbeutel durch ein steriles Sechsfach-Beutel-System ersetzt. Das insgesamt prozessierte Volumen bestand aus dem Sechsfachen des Patientenblutvolumens zuzüglich einem Vorlauf. Dieses Vorlaufvolumen war definiert als der Zeitraum vom Start der Leukapherese bis zur Optimierung der Schnittstelle für die Gewinnung mononukleärer Zellen. Sobald die Färbung der Sammellinie die Einstellung der korrekten Schicht anzeigte, wurde der erste Sammelbeutel geöffnet. Im weiteren Verlauf wurden die Sammelbeutel jeweils nach jedem pBV gewechselt. Alle Parameter wurden während der Apherese so konstant wie möglich gehalten. Aus jedem Sammelbeutel wurde nach der Leukapherese im Rahmen der Aufbereitung des Stammzellproduktes unter sterilen Bedingungen ein repräsentatives Aliquot (1 ml) für die weiteren Laboranalysen entnommen.

Tabelle 2 zeigt die wichtigsten Laufparameter der LVL im Überblick: Im Mittel wurden 30,4 (\pm 3,8) Liter mit einer mittleren Flußrate von 95,5 (\pm 13,8) ml/min in 325 (\pm 45) Minuten prozessiert. Zusammen mit dem Vorlauf betrug das insgesamt im Rahmen der

LVL prozessierte Volumen im Durchschnitt das 6,45 ($\pm 0,34$)-fache des Patienten-Blutvolumens.

Leukapherese (Nr.)	Körpergewicht (kg)	Blutvolumen (ml)	prozessiertes BV (ml)	prozessiertes BV (x-faches des Patienten-BV)	Durchfluß (ml/min)	Sammeln (ml/min)	ACD-A-Citrat-Ratio (1:x)	Dauer der Leukapherese (min)
1	67	4722	26779	5,67	76,3	0,6	1:16	372
2	73	4751	31005	6,53	90,3	0,6	1:16	344
3	83	5374	33820	6,29	102,1	0,6	1:16	334
4	89	5786	37318	6,45	92,3	0,6	1:14	406
5	74	5229	33272	6,36	84,9	0,6	1:16	394
6	60	4497	28600	6,36	91,5	0,6	1:20	316
7	64	4338	27850	6,42	83	0,6	1:16	343
8	53	3418	22050	6,45	66,4	0,6	1:20	285
9	76,5	5114	32550	6,36	100	0,6	1:18	327
10	73	5088	37558	7,38	101,1	0,6	1:18	383
11	86	5435	34050	6,26	110	0,6	1:24	313
12	65	4236	27933	6,59	100	0,7	1:22	290
13	77	5146	32760	6,37	103	0,7	1:19	307
14	64	4044	29512	7,30	85,4	0,7	1:18	368
15	78	5249	34226	6,52	116	0,7	1:22	304
16	70	4592	29892	6,51	106,3	0,7	1:20	276
17	82,1	4298	27560	6,41	120	0,7	1:24	238
18	80	4511	28850	6,40	84,5	0,7	1:16	343
19	63	4628	29214	6,31	88,6	0,7	1:16	323
20	70	4181	25902	6,20	110	0,9	1:23	238
21	74,1	4029	26390	6,55	78,9	0,9	1:16	342
22	80	5243	32437	6,19	110	0,9	1:18	297
Mittelwert	72,8	4723,1	30433,1	6,45	95,5	0,68	1:18,5	324,68
Standardabw.	9,0	575,6	3839,5	0,34	13,8	0,10		44,86
Minimum	53	3418	22050	5,67	66,4	0,6	1:14	238
Maximum	89	5786	37558	7,38	120	0,9	1:24	406

Tabelle 2: Laufparameter der Large-volume Leukapherese

Der Effekt des zugesetzten ACD-Citrat wurde durch die Substitution von 0,5 g Calcium/10 kg Körpergewicht antagonisiert. Außerdem wurden je 100 ml ACD-Citrat 300 IU Heparin zugesetzt, um so die ACD-Citrat-Ratio erhöhen zu können und dadurch die Flußrate mit geringerem Citrat-Zusatz zu steigern⁵⁷.

3.3. Versuchsaufbau

In der vorliegenden Studie sollen potentielle Änderungen der Zusammensetzung des gewonnenen Stammzellpools im Verlauf der LVL mit drei Verfahren untersucht werden:

1. Durchflußzytometrische Charakterisierung unterschiedlicher hämatopoetischer Differenzierungsmarker (CD34-Bestimmung und Subpopulationsanalysen)

2. Kurz- und Langzeitkulturtechniken (LTC-IC-Assay, Limiting Dilution Analyse und Klonogenitätsassay) zum indirekten Nachweis differenzierter und primitiver Stammzellen
3. Ex-vivo Expansion CD34⁺-Zellen nach Zugabe eines definierten Zytokincocktails zur Prüfung der Expansionsfähigkeit.

3.3.1. Durchflußzytometrische Subpopulationsanalysen des CD34⁺-Stammzellpools

3.3.1.1. Grundlagen

Prinzip: Ein Durchflußzytometer stellt ein optisches Meßsystem dar, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel (z.B. Zellen) analysiert.

Aus einer Suspension von Einzelzellen wird durch hydrodynamische Fokussierung mittels Hüllstromflüssigkeit ein Probenstrom erzeugt, der gewährleistet, daß die Zellen als Einzelzellen - wie Perlen an einer Kette - den Meßpunkt an definierter Stelle passieren¹²⁵. Hier trifft der fokussierte Lichtstrahl eines Lasers auf die Zelle und erzeugt Fluoreszenz und Lichtstreuung. In der Durchflußzytometrie findet überwiegend der luftgekühlte Argonionenlaser mit einer Emissionslinie bei 488 nm als Lichtquelle Verwendung. Das bedeutet, daß nur Fluorochrome, die einen Exzitationsbereich um 488 nm haben, zur Markierung der zu untersuchenden Zellen in Frage kommen. Unter anderem lassen sich Fluorescein-(FITC-), R-Phycoerythrin-(PE-) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein-(PerCP-)gekoppelte Antikörper bei 488 nm anregen. Wenngleich sich die Farbstoffe in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden, so ist ihre Fluoreszenz aber mit derselben Wellenlänge anregbar.

Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich (Vorwärtsstreulicht, FSC), während ein geringer Teil des Lichts seitwärts streut (Seitwärtsstreulicht, SSC). FSC liefert Informationen über die Zellgröße, während SSC Auskunft über die Granularität gibt. Mittels beider Lichtstreuparameter lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten, unterscheiden. Photodetektoren konvertieren

die optischen Signale in elektrische Impulse, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korreliert. So läßt sich über das optische Detektionssystem und die Elektronik die Fluoreszenz- und Streulichtemission jeder einzelnen Zelle quantifizieren. Abhängig von der Dynamik des Meßbereiches erfolgt eine Verstärkung der Signale bei der Fluoreszenzmessung logarithmisch, da der Dynamikbereich von einer niedrigen Autofluoreszenz bis zu mehreren hunderttausend Fluoreszenzäquivalenten reicht, ansonsten in der Regel linear. Die graphische Darstellung erfolgt als Zweiparameter-Punkthistogramm (dot plot). Jeder Punkt steht dabei für eine bestimmte Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Andererseits charakterisiert ein Punkt zwar eine Zelle, kann aber auch für mehrere Zellen mit identischen Eigenschaften stehen.

3.3.1.2. Vorbereitung der Proben

Das Probenmaterial aus jedem Beutel wurde mit „phosphate buffered saline“ (PBS) (ohne Calcium und Magnesium) auf 10.000 WBC/ μ l eingestellt. Pro Beutel wurden jeweils fünfmal 50 μ l Probe mit je 25 μ l CromPure MouseIgG mit einer Proteinkonzentration von 0,25 μ g/ μ l zwecks F_C-Rezeptor-Blockade zur Vermeidung unspezifischer Bindungen versetzt und nach dem Vortexen 15 Minuten lang inkubiert. Alle Proben wurden unter Lichtausschluß 15 Minuten bei 20°C mit jeweils 10 μ l FITC-gekoppeltem CD45-Antikörper und 10 μ l PerCP-gekoppeltem CD34-Antikörper inkubiert. Hinzu kamen je nach Ansatz 10 μ l PE-gekoppelter CD38-, CD90-, CD117- oder HLA-DR-Antikörper bzw. Isotypkontrolle. Nach Zugabe von einem Milliliter Ortho-Lyse je Ansatzröhrchen zur Erythrozytenlyse, Vortexen und erneuter zehnminütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Röhrchen bei 1200 Umdrehungen/min für zehn Minuten mit Bremse zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach Zugabe von einem Milliliter PBS (ohne Calcium und Magnesium) und erneutem Vortexen wurde ein weiteres Mal mit gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand dekantiert, 400 μ l PBS hinzugegeben und nach abermaligem Vortexen erfolgte die Messung von 100.000 Zellen.

3.3.1.3. Durchführung der Messungen

Die Messungen erfolgten gemäß dem Konsensusprotokoll über die „Durchflußzytometrische Analyse CD34-exprimierender hämatopoetischer Zellen in Blut und Zytaphereseprodukten“ aufgestellt von der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) und der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie/Onkologie (DGHO)⁸⁹.

3.3.1.4. Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen

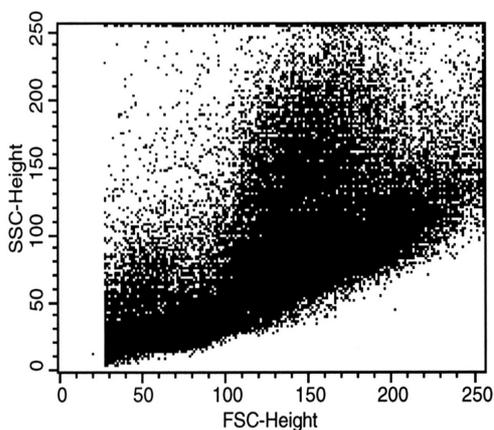


Abbildung 2: Parameterkombination Größe gegen Granularität

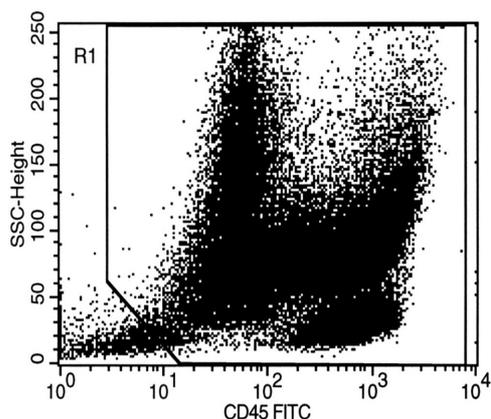


Abbildung 3: Parameterkombination CD45-Expression gegen Granularität

Die durchflußzytometrische Diagnostik erfolgte mit dem Gerät FACSCalibur der Firma Becton-Dickinson, Mountain View, USA. Alle Daten wurden mit der Software Lysis II auf einem Apple Mackintosh-Rechnersystem ausgewertet. Die Kalibrierung der Streulicht- und Fluoreszenzkanäle erfolgte mit fluoreszenten Latexpartikeln (CaliBRITE, Firma Becton-Dickinson).

Zunächst wurde in der Parameterkombination „Größe gegen Granularität“ die vermutete Population der Lymphozyten eingegrenzt („gating“). Ein Schwellenwert (Threshold), üblicherweise auf der FSC-Skala ermittelt, wurde so eingestellt, daß der Beginn der Rauschsignale bzw. des Debris noch sichtbar war (vgl. Abbildung 2).

Bei der weiteren Analyse fanden nur solche Ereignisse Berücksichtigung, die innerhalb des eingegrenzten Bereiches lagen.

In der Darstellung CD45-Expression versus

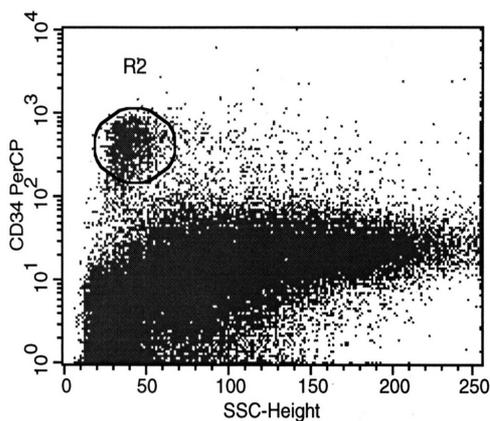


Abbildung 4: Parameterkombination Granularität gegen CD34-Expression

Seitwärtsstreulicht wurde eine Region definiert, die alle CD45⁺-Zellen einschloß („Gate-Kontrolle“ über das Panleukozytenantigen CD45) (vgl. Abbildung 3).

Alle Zellen dieser Region wurden in einem zweiten Schritt in einer Darstellung Seitwärtsstreulicht gegen CD34-Expression aufgetragen. Dabei ergab sich ein charakteristisches Bild, das CD34⁺-Zellen als Zellcluster mit geringer Seitwärtsstreuung auswies (vgl. Abbildung 4).

Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zeigen jeweils ein charakteristisches Färbemuster, so daß anhand der Immunfluoreszenz auf ein optimales Lymphozytenfenster im Streulicht zurückgeschlossen („Backgating“) und dessen Verunreinigung berechnet werden kann.

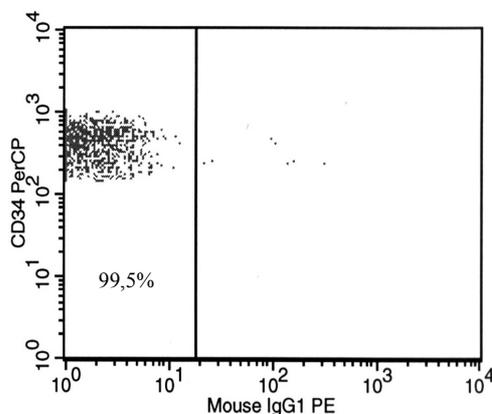


Abbildung 5: Negativkontrolle

Im letzten Schritt wurde die CD34-Expression unterschiedlichen Subset-Markern (HLA-DR, CD38, CD90, CD117) gegenübergestellt. Die Bestimmung antigen-positiver Zellen orientierte sich generell an der Verteilung einer geeigneten Negativkontrolle. Als „negativ“ galt dabei der Bereich, in den 99,5 Prozent der „Fluoreszenz“ (Autofluoreszenz und unspezifische Bindung) einer Negativkontrolle fallen (Abbildung 5). Diese Einteilung wurde für alle weiteren Messungen beibehalten.

In den folgenden vier Abbildungen sind am Beispiel der Leukapherese vom 12.01.1998 die Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Subsetanalyse dargestellt. Der eingeblendete Prozentwert gibt den Anteil der jeweiligen Subpopulation an den CD34⁺-Zellen an. Die durchflußzytometrische Analyse wurde stets bei 100.000 Zellen durchgeführt, von denen in diesem Fall etwa 1.500 das CD34-Antigen exprimierten.

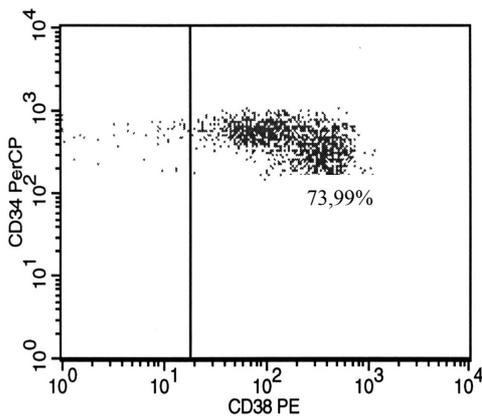


Abbildung 6: Anteil CD34⁺/CD38⁻-Zellen

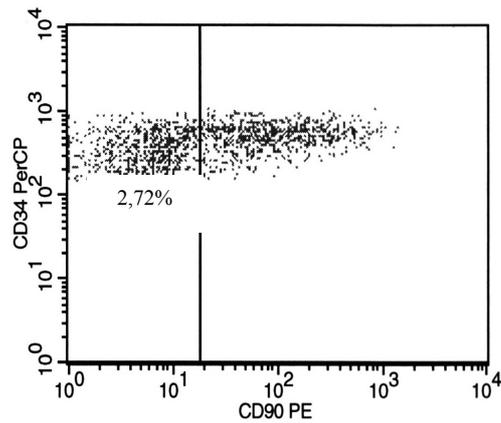


Abbildung 7: Anteil CD34⁺/CD90⁻-Zellen

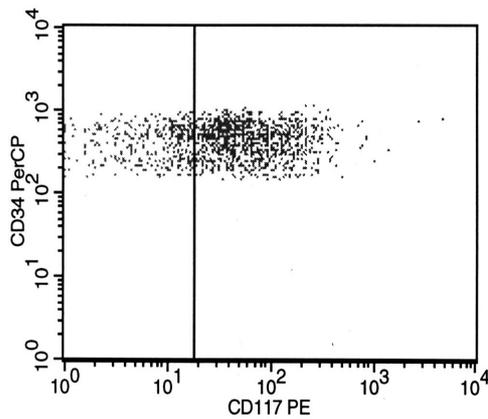


Abbildung 8: Anteil CD34⁺/CD117⁻-Zellen

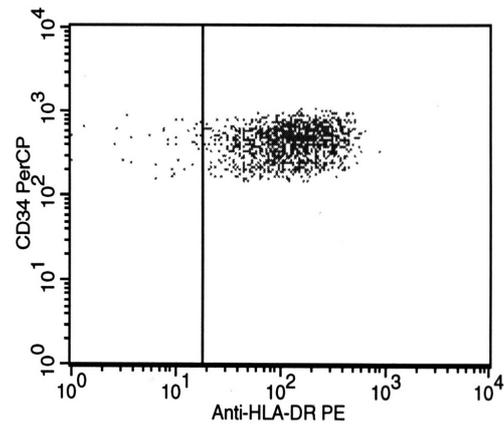


Abbildung 9: Anteil CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen

3.3.2. LTC-IC-Assay

Da humane pluripotente hämatopoetische Stammzellen derzeit nicht direkt nachgewiesen werden können und sich ein Nachweis mittels quantitativer Transplantationsversuche wie bei der Maus aus ethischen Gründen verbietet, bleibt als dynamische Nachweismethode primitiver Stammzellen nur der in-vitro Assay¹²⁶. Das als LTC-IC-Assay bezeichnete System ist ein solcher in-vitro Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung primitiver hämatopoetischer Zellen, die phänotypische und funktio-

nelle Eigenschaften mit jenen menschlichen Zellen teilen, die zur in-vivo Repopulation befähigt sind. Nach heutigem Wissensstand handelt es sich bei den LTC-IC allerdings um eine heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichem Phänotyp, Zellzykluscharakter und Expansionspotential^{97 98}.

Der Langzeitkultur menschlicher Stammzellen liegt folgendes Prinzip zugrunde: Vordifferenzierte klonogene Progenitorzellen erreichen in der Langzeitkultur relativ schnell ihren terminalen Differenzierungsgrad und verschwinden innerhalb von etwa vier Wochen; klonogene Progenitorzellen, die danach noch nachweisbar sind, repräsentieren frühere Vorläuferzellen (LTC-IC). Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der ursprünglich eingesetzten LTC-IC-Zahl und der Zahl der klonogenen Progenitorzellen nach vier bis acht Wochen (relative LTC-IC-Quantifizierung). Die Bestimmung der absoluten LTC-IC-Zahl ist nur über eine Limiting Dilution Analyse (LDA) möglich. Prinzip: Beschicken einer Mikrotiterplatte in linearen Verdünnungsschritten. Die Verdünnungsstufe, in der 37% der Vertiefungen negativ sind, beinhaltet die Zellzahl, auf die statistisch genau eine LTC-IC entfällt.

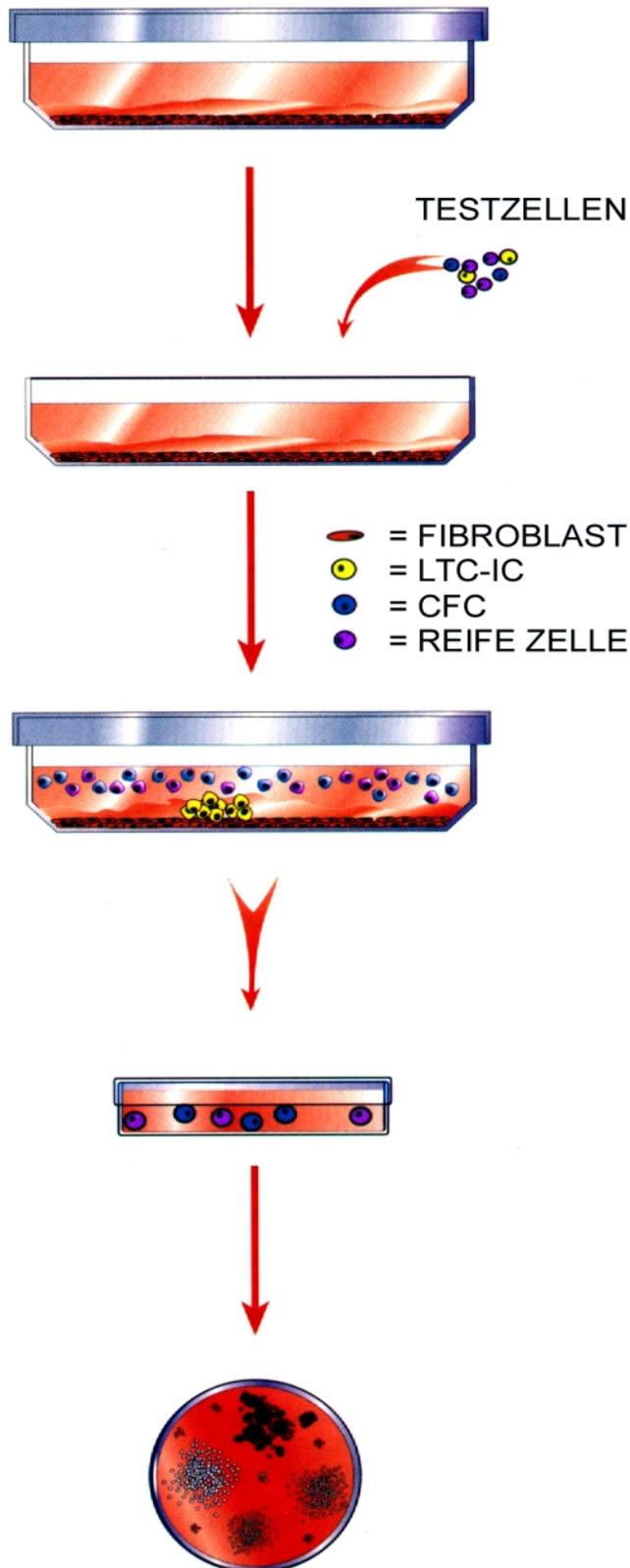


Abbildung 10: Prinzip des LTC-IC-Assay

1. Etablierung eines Stromalayers aus bestrahlten Maus-Fibroblasten (vgl. 3.3.2.1.)
2. Einsäen der gewünschten Zahl an Testzellen (vgl. 3.3.2.2.)
3. Langzeitkultur über fünf Wochen mit wöchentlichem Wechsel der Hälfte des Mediums (vgl. 3.3.2.3.)
4. Ablösen der langzeitkultivierten Zellen mit Trypsin und Überführen der Zellen in einen Klonogenitätsassay (vgl. 3.3.2.4.)
5. Auszählen der Kolonien nach 14 Tagen Kurzzeitkultur und Abschätzen der LTC-IC-Zahl (vgl. 3.3.2.4. und 3.3.2.6.)

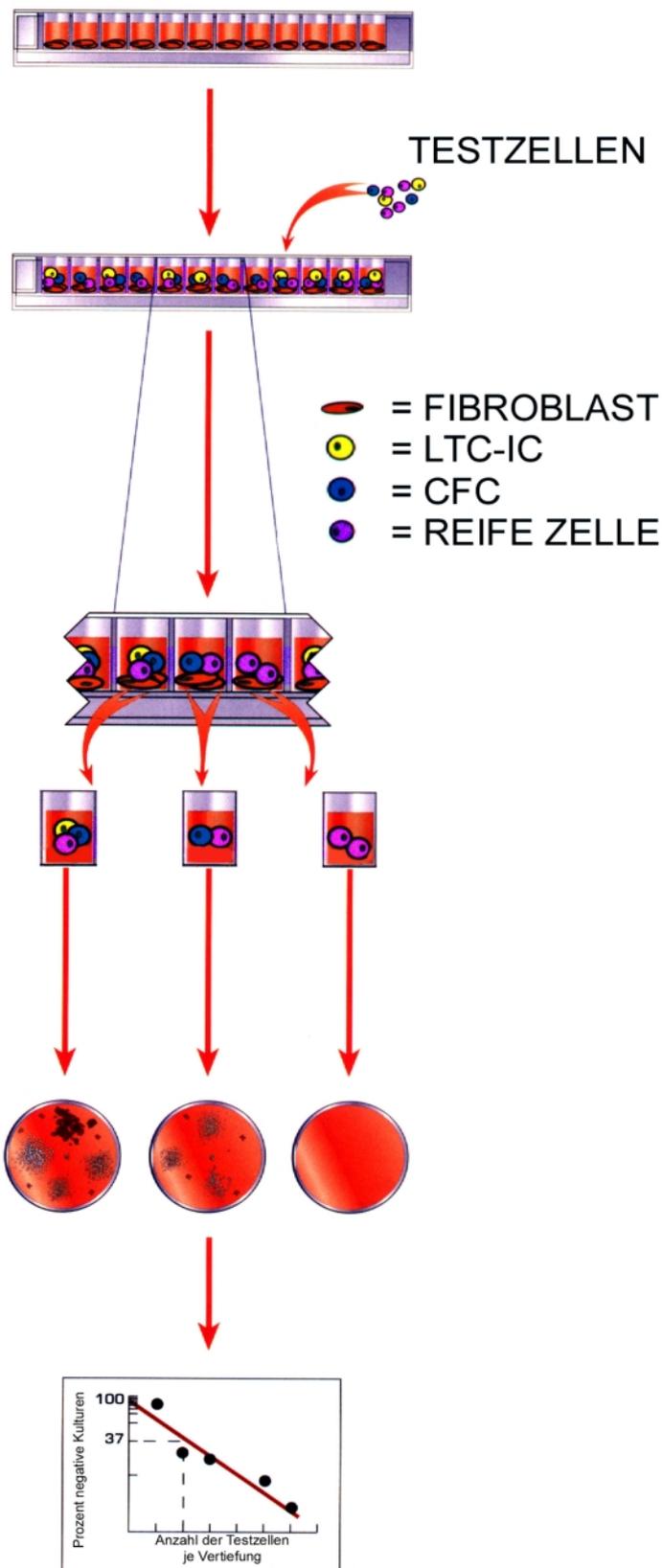


Abbildung 11: Prinzip der Limiting Dilution Analyse

1. Etablierung eines Stromalayers aus bestrahlten Maus-Fibroblasten (vgl. 3.3.2.5.2)
2. Einsäen der gewünschten Zahl an Testzellen in mehreren Verdünnungsstufen (vgl. 3.3.2.5.2)
3. Langzeitkultur über fünf Wochen mit wöchentlichem Wechsel der Hälfte des Mediums (vgl. 3.3.2.5.2)
4. Ablösen der langzeitkultivierten Zellen mit Trypsin und Durchführung eines Klonogenitätsassays in derselben Mikrotiterplatte (vgl. 3.3.2.5.2)
5. Auszählen der Vertiefungen ohne Koloniewachstum nach 14 Tagen Kurzeitkultur und Berechnung der absoluten LTC-IC-Zahl über die Methode der Minimierung der Chi-Quadrate (vgl. 3.3.2.5.1)

3.3.2.1. Herstellung und Unterhaltung des Fibrolayers als Grundlage für den LTC-IC-Assay

Zur Steigerung der Sensitivität des LTC-IC-Assays wurde ein Fibroblastenlayer bestehend aus einem 1:1 Gemisch geklonter, unsterblicher Maus-Fibroblasten vom Typ M2-10B4 und SI/SI eingesetzt^{127 128}.

Diese Maus-Fibroblasten waren zuvor genetisch so manipuliert worden, daß sie nun Wachstumsfaktoren der menschlichen Hämatopoese produzierten.

Dazu wurden die Maus-Fibroblasten vom Typ M2-10B4 nacheinander mit Vektorplasmiden, die die kodierenden Sequenzen für humanes G-CSF und IL-3 enthielten, „infiziert“. Als Überträger dienten Retroviren.

Als Selektionsmarker fungierten auf demselben Wege übertragene Resistenzen gegen die Antibiotika G418 (=Geneticin) bei G-CSF-produzierenden Zellen und Hygromycin B gekoppelt an die IL-3-Produktion, so daß eine Isolierung doppelt infizierter Zellen durch simultane Selektion in G418- und Hygromycinhaltigem Medium möglich wurde.

Entsprechend wurde der Maus-Fibroblasten-Typ SI/SI mit der cDNA, die zur Produktion von humanem Steel Factor (SF) (gekoppelt an G418-Resistenz) und humanem IL-3 (Selektion in Hygromycin-haltigem Medium) befähigt, „infiziert“. Einmal selektierte Zellklone bleiben auch ohne erneute Antibiotika-Selektion für mindestens zwei Monate stabil.

Die oben genannten Zellklone M2-10B4-J-GCSF-tkneo-J-IL3-hytk und SI/SI-J-SF-tkneo-J-IL3-hytk wurden freundlicherweise vom Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canada zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Vorteile des 1:1 Gemisches aus Wachstumsfaktor produzierenden Maus-Fibroblasten vom Typ M2-10B4 und SI/SI führten zum Einsatz im Rahmen dieser Untersuchung:

Unter der Einwirkung der großen Mengen der von den Maus-Fibroblasten produzierten humanen Wachstumsfaktoren sind unter in-vitro Bedingungen im peripheren Blut am Tag Null viermal mehr LTC-IC nachweisbar als z.B. auf einem Layer aus Fibroblasten menschlichen Ursprungs (erhöhte Sensitivität). Außerdem wird die Produktion von „colony-forming cells“ (CFC) je LTC-IC als Maß für die Differenzierungskapazität auf

fast das Dreifache gesteigert. Dabei bleibt der relative Anteil erythroider oder gemischter Vorläuferzellen im Vergleich zu granulozytären Vorstufen konstant.

Gleichzeitig ist jedoch eine Aufrechterhaltung der eingesetzten LTC-IC-Zahlen über fünf bzw. sechs Wochen mit dem eingesetzten Fibroblastengemisch nur in dem Ausmaß möglich, wie dies auch auf menschlichen Fibroblasten der Fall wäre.

Humanes G-CSF- und humanes IL-3-produzierende Maus-Fibroblasten vom Typ M2-10B4 wurden in 50 ml Nährmedium (RPMI 1640 und 10% „fetal calf serum“ (FCS)) nach Zusatz von 0,4 mg G418 pro ml und 0,06 mg Hygromycin pro ml in 250 ml fassenden Kulturflaschen kultiviert und im Brutschrank bei 37°C und konstant fünf Prozent CO₂ enthaltender Raumlufte zur Konfluenz gebracht.

Entsprechend wurden die humanen SF- und humanes IL-3-produzierenden Maus-Fibroblasten vom Typ SI/SI in 50 ml Medium aus RPMI und 15% FCS, dem 0,8 mg G418/ml und 0,125 mg Hygromycin/ml zugesetzt wurden, unter gleichen Kulturbedingungen zur Konfluenz gebracht. Bei Gelbfärbung des Nährmediums - als Zeichen für einen Verbrauch der Nährstoffe und die Ansammlung toxischer Stoffwechselmetabolite - vor Erreichen der Konfluenz wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt.

Ein Ablösen der Fibroblasten aus den Kulturflaschen erfolgte bei Ausbildung eines zu 70 bis 90% konfluenten Layers durch Trypsinierung:

Zunächst wurde das Nährmedium und alle nichtadhärenten Zellen abgegossen und verworfen. Anschließend wurden 50 ml „Hanks` buffered salt solution without calcium and magnesium“ (HBSS) vorsichtig auf den Fibrolayer gegeben und unter langsamem Hin- und Herschwenken der Kulturflasche wieder abgegossen. Dadurch sollten alle nicht-adhären Zellen und eventuell zurückgebliebenes Serum ausgewaschen werden. Serumreste würden eine spätere Trypsinierung blockieren. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 50 ml HBSS wiederholt. Nun wurden 25 ml Trypsin 0,25% auf den Fibrolayer gegeben und die Kulturflaschen zehn Minuten bei 37°C inkubiert, um die adhären Zellen abzulösen. Die Zugabe von sieben Millilitern FCS nach zehn Minuten inaktivierte dann noch vorhandenes Trypsin.

Durch Auf- und Abpipettieren mit der Pasteur-Pipette entlang des Bodens der Kulturflasche wurden noch verbliebene adhären Zellen abgelöst und eventuell vorhandene Zellaggregationen resuspendiert.

Die entstandene Zellsuspension mit inaktiviertem Trypsin und FCS wurde in „Falcon Tubes“ überführt, mit IMDM + 2% FCS auf 50 ml aufgefüllt, anschließend zehn Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand schließlich dekantiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert, erneut mit IMDM + 2% FCS auf 50 ml aufgefüllt und dann wieder zehn Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert.

Die nicht benötigten Fibroblasten wurden erneut in Kulturflaschen abgefüllt und wiederum bis zur Konfluenz inkubiert.

Die übrigen Zellen wurden mit 80 Gray bestrahlt und die bestrahlte Zellsuspension mit Langzeitkultur-Medium auf eine Zellzahl von $1,25 \times 10^5$ Zellen/ml LTC-Medium verdünnt. Die bestrahlten Fibroblasten vom Typ M2-10B4 und SI/SI wurden jetzt im Verhältnis 1:1 in die vorgesehenen Kulturgefäße eingesät: 2,5 ml LTC-Medium mit ca. 3×10^5 Fibroblasten in die „Culture Dishes“ (35mm Durchmesser, Nunc®) und jeweils 100 µl LTC-Medium mit $1,25 \times 10^4$ Fibroblasten pro Vertiefung in die Mikrotiterplatten. Die Kulturgefäße wurden bei 37° C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert, damit die Fibroblasten adhärent werden konnten. Am nächsten Tag war nach dem Abgießen des Mediums ein Beschicken mit hämatopoetischen Stammzellen in LTC-Medium möglich. Wurde der Fibrolayer innerhalb einer Woche nicht benötigt, erfolgte nach einer Woche ein Wechsel der Hälfte des Mediums.

3.3.2.2. Anlegen der Langzeitkultur

Voraussetzung für den Beginn einer Langzeitkultur war die Etablierung eines Stromalayers aus bestrahlten Maus-Fibroblasten spätestens am Vortag des eigentlichen Versuches (siehe oben). Beim Ansetzen der Langzeitkultur wurde das Aliquot mit LTC-Medium unter Zusatz von frisch aufgetautem Hydrokortison Natrium Succinat in einer Endkonzentration von 10^{-6} M so weit verdünnt, daß eine Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl von 3×10^6 WBC/ml LTC-Medium entstand. Das LTC-Medium MyeloCult™ HCC-5100 für menschliche Zellen bestand aus 12,5% Pferdeserum, 12,5% fötalem Kälberserum, 2-Mercaptoethanol 10^{-4} M in alpha-MEM versetzt mit L-Glutamin 2 mM, i-Inositol 0,2 mM und Folsäure 20 µM. Vor dem Einsäen von $7,5 \times 10^6$ Test-Zellen in jeweils 2,5 ml Langzeitkulturmedium erfolgte das vorsichtige Ab-

pipettieren des vorgelegten Mediums aus den Kulturgefäßen (35 mm Durchmesser, Nunc®). Das Einsäen mit der Pipette erfolgte ebenfalls sehr vorsichtig und langsam entlang des Randes des Kulturgefäßes, ohne den Fibrolayer dabei zu berühren. Für jeden der sechs Beutel wurde jeweils ein Doppelansatz mit Zellen beschickt.

3.3.2.3. Unterhaltung der langzeitkultivierten Zellen

Die Kulturen wurden zunächst drei bis vier Tage bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Jeweils sechs mediumgefüllte Kulturgefäße und eine offene 35 mm-Durchmesser-Schale mit sterilem Aqua ad iniectabilia wurden in einer Schale mit 100 mm Durchmesser plaziert, um den Verdunstungsverlust zu minimieren. Anschließend wurden die Kulturen bis zum Ablauf der fünften Woche in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 33° C und 5% CO₂ enthaltender Raumluft umgesetzt. Was die Unterstützung der Langzeit-Hämatopoese angeht, so konnten Gartner und Kaplan bereits 1980 die Überlegenheit von 33°C zeigen, während 37°C eher die Entwicklung des Stroma-Layers beschleunigt⁹⁵. Regelmäßige Medienwechsel erfolgten an den Tagen 10, 14, 21 und 28: Nach vorsichtigem Aufwirbeln und Durchmischen der nicht-adhärennten Zellen und des Mediums durch kreisende Bewegungen wurde die Hälfte des Mediums mit der Hälfte der nicht-adhärennten Zellen entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Das frische Medium wurde vorsichtig entlang der Seite des Kulturgefäßes pipettiert. Das entnommene Medium mit den nichtadhärennten Zellen wurde verworfen. Das Hinauszögern des ersten Mediumwechsels auf den zehnten Tag verhinderte ein Verwerfen von am siebten Tag noch nicht adhärennt gewordenen primitiven Stammzellen.

3.3.2.4. Ernte der langzeitkultivierten Zellen

Nach fünf Wochen in der Kultur noch detektierbare koloniebildende Zellen entsprechen von LTC-IC abstammenden Zellen, da in der Ursprungspopulation nachweisbare kolo-

niebildende Zellen inzwischen ihren terminalen Differenzierungsschritt durchlaufen haben und abgestorben sind.

Die 2,5 ml LTC-Medium mit den nicht-adhären Zellen wurden in ein 12 ml-Röhrchen überführt. Der Überstand aus zweimaligem Waschen mit jeweils 2,5 ml HBSS (ohne Calcium und Magnesium) wurde ebenfalls in dem Röhrchen gesammelt. Anschließend erfolgte das Ablösen der adhären Stammzellen sowie der bestrahlten Fibroblasten durch Zugabe von 1,25 ml Trypsin 0,25% und zehnminütiger Inkubation bei 37° C. Die Wirkung des Trypsins wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit 313 µl FCS beendet. Reste des Trypsins wurden zunächst mit 1 ml IMDM und 2% FCS durch Zentrifugation bei 1000 U/min über zehn Minuten ausgewaschen. Anschließend wurde dieser Schritt mit 7,5 ml IMDM und 2% FCS wiederholt. Das zurückbleibende Zellpellet wurde mit 0,8 ml IMDM und 2% FCS vorsichtig resuspendiert, um die Bildung von Zellklumpen zu vermeiden. Nach der Zellzahlbestimmung (Sysmex® K-1000) erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Zellen als indirektes Maß für den LTC-IC-Gehalt der ursprünglichen Probe im Klonogenitätsassay als Doppelansatz je Kulturgefäß. Der LTC-IC-Gehalt der Probe wurde mittels Division der ermittelten Zahl der CFC durch vier geschätzt⁹⁸.

3.3.2.5. Limiting Dilution Analyse

3.3.2.5.1 Theoretischer Hintergrund

Die Limiting Dilution Analyse ist zur Zeit die einzige Möglichkeit der Absolutzellzahlbestimmung der LTC-IC und rechtfertigt daher auch aufwendigste Arbeitstechniken.

Bei der LDA handelt es sich um eine in-vitro Mikrokulturtechnik zur Frequenzbestimmung von Zellen. Mit Hilfe dieses Bioassays wird über eine Anzahl von Verdünnungsschritten nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz entweder das Ereignis „Stammzelle bzw. Koloniewachstum vorhanden“ oder „keine Stammzelle vorhanden“ und damit auch „kein Wachstum“ detektiert. Unter der Annahme, daß es sich bei allen Verdünnungsschritten um homogene Suspensionen handelt, entspricht die Verteilung der Testzellen und damit auch die Verteilung der LTC-IC in jedem Verdünnungsschritt

der Poisson-Verteilung, einer Grenzverteilungsfunktion der Binomialverteilung für besonders seltene Ereignisse. Zwar können die Zahlen zwischen einzelnen Vertiefungen variieren, im Mittel ergeben sich jedoch die beabsichtigten Verdünnungen. Gemäß dem sogenannten Single-Hit-Model löst bei entsprechender Verdünnung irgendwann genau eine Zelle des gesuchten Zelltyps (LTC-IC) eine „positive Antwort“ (d.h. hier: Koloniewachstum) aus - immer unter der Voraussetzung, daß alle anderen Zelltypen und Kulturfaktoren nicht limitierend sind und daher unberücksichtigt bleiben können. Da allerdings die „positive Antwort“ nicht zwischen einer oder mehreren Zellen, die zu einer Reaktion führen, unterscheiden kann, ist es einfacher, im Umkehrschluß die „negative Antwort“ zu erfassen: Die erstmalige Abwesenheit der gesuchten Zelle bedeutet immer fehlendes Koloniewachstum. Die Poisson-Gleichung für das Single-Hit-Model läßt sich in diesem Fall wie folgt herleiten:

Wenn eine Kultur eine festgelegte Zellzahl (x) enthält, so daß Φ die Wahrscheinlichkeit ist, daß genau eine dieser Zellen eine LTC-IC ist (und positiv reagiert), dann ist P_{neg} (konstantes x) die Wahrscheinlichkeit, daß keine LTC-IC unter den Zellen (x) ist:

$$P_{\text{neg}}(\text{konstantes } x) = (1 - \Phi)^x$$

Da aber die Zellzahl (x) aus einer homogenen Zellsuspension entstammt, ist x keine bekannte Konstante, sondern eine unbekannt Poisson-Variable. Wenn eine Zufallsvariable x mit dem Parameter X Poisson-verteilt ist, dann entspricht P_{neg} (variables x) der Wahrscheinlichkeit P_{neg} (konstantes x) nach Anwendung der Poissonverteilung:

$$\begin{aligned} P_{\text{neg}}(\text{variables } x) &= \sum_{x=0}^{\infty} \frac{X^x e^{-X}}{x!} (1 - \Phi)^x \\ &= e^{-X} \sum_{x=0}^{\infty} \frac{(X - X\Phi)^x}{x!} \\ &= e^{-X} e^{X - X\Phi} \\ &= e^{-\Phi X} \end{aligned}$$

Diese Gleichung beinhaltet die mathematische Formulierung des Single-Hit-Poisson-Models. Genau eine LTC-IC liegt dann vor, wenn gilt: $\Phi \cdot x = 1$. Dann ist x die Zellzahl, auf die genau eine LTC-IC entfällt. Das entspricht etwa der Verdünnungsstufe, in der

37% der Vertiefungen negativ sind ($e^{-1}=0,37\cong 37\%$).

Das Single-Hit-Poisson-Model liefert so die theoretische Basis für alle weiteren Methoden zur Frequenzabschätzung der LTC-IC aus Daten, die mittels LDA gewonnenen wurden. Taswell verglich bereits 1981 statistische Methoden wie „least squares“, „weighted mean“, „maximum likelihood“ und „minimum chi-square“ und stellte fest, daß die Methoden nicht nur erheblich in ihrer Komplexität, sondern auch in ihrer Präzision variieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die Methode der Minimierung der Chi-Quadrate mindestens doppelt so exakte Werte wie das Prinzip des gewichteten Mittelwertes liefert. Daher sollen die Grundzüge der Bestimmung von Phi (Φ) über die Methode der Minimierung der Chi-Quadrate hier kurz skizziert werden. χ^2 berechnet sich aus den Frequenzklassen als:

$$\chi^2[I-1] = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^2 \left[\frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \right]$$

Dabei sind O_{ij} und E_{ij} die beobachteten („observed“) bzw. erwarteten („expected“) Frequenzen der ij-sten Klasse. Es gibt 2-I Frequenzklassen mit einer positiven ($j=1$) und einer negativen ($j=2$) Antwortklasse für jede der I Dosisklassen. Wenn für jede Frequenzklasse n_{ij} die Anzahl der Vertiefungen und P_{ij} die Wahrscheinlichkeit für ein Ereignis ist, dann gilt:

$$\chi^2[I-1] = \sum_{i=1}^I \left[\frac{(O_{i2} - n_{i2}P_{i2})^2}{n_{i2}P_{i2}(1-P_{i2})} \right]$$

Wenn n_{i2} der Anzahl der Vertiefungen je Verdünnungsschritt n_i entspricht, P_{i2} der Wahrscheinlichkeit P_i einer Negativantwort je Verdünnungsschritt gemäß der Gleichung $P_i = e^{-\Phi x_i}$, und O_{i2} die Zahl der negativen Antworten je Verdünnungsschritt (r_i) ist, kann χ^2 hergeleitet werden als:

$$\chi^2[I-1] = \sum_{i=1}^I \left[\frac{(r_i - n_i e^{-\Phi x_i})^2}{n_i e^{-\Phi x_i} (1 - e^{-\Phi x_i})} \right]$$

(Dieser Rechenschritt entspricht Spalte L (Summe der Chi-Quadrate) in der Beispiel-

rechnung im Anhang.)

Bei der Frequenzabschätzung über die Methode der Minimierung der Chi-Quadrate ergibt die Minimierung dieser Gleichung schließlich den gesuchten Wert Phi (Φ), wobei I-1 die Zahl der Freiheitsgrade anzeigt. Die Minimierung der Gleichung erfolgt über eine Nullstellensuche für die erste Ableitung mit Hilfe der Newtonschen Näherung, ein Maß für die Standardabweichung von Phi ist die zweite Ableitung.

Die Newtonsche Näherung berechnet sich nach der Gleichung:

$$f_{j+1} = f_j - \frac{\delta\chi^2 / \delta\Phi}{\delta^2\chi^2 / \delta\Phi^2}$$

wobei f_j die j-ste Näherung der Abschätzung von Phi (Φ) mittels der Minimierung der Chi-Quadrate ist und

$$\frac{\delta\chi^2}{\delta\Phi} = \sum \left[\frac{nx_i e^{-\Phi x_i} (2r_i - n_i) + r_i^2 x_i (e^{\Phi x_i} - 2)}{n_i (1 - e^{-\Phi x_i})^2} \right]$$

die erste Ableitung (entspricht Spalte M im Rechenbeispiel), bzw.

$$\frac{\delta^2\chi^2}{\delta\Phi^2} = \sum \left[\frac{n_i^2 x_i^2 (e^{-\Phi x_i} - e^{-3\Phi x_i}) + nr_i x_i^2 (-2e^{-\Phi x_i} + 2e^{-3\Phi x_i}) + r_i^2 x_i^2 (e^{\Phi x_i} - 4 + 7e^{-\Phi x_i} - 4e^{-2\Phi x_i})}{n_i (1 - e^{-\Phi x_i})^4} \right]$$

die zweite Ableitung (entspricht Spalte N im Rechenbeispiel) der Summe der Chi-Quadrate.

(Legende: I = Anzahl der Verdünnungsschritte; i = Verdünnungsschritt; N = Anzahl der Vertiefungen insgesamt; n_i = Vertiefungen je Verdünnungsschritt; x_i = Testzellen je Verdünnungsschritt; r_i = Zahl der negativen Antworten je Verdünnungsschritt; $P_i = e^{-\Phi x_i}$ = Wahrscheinlichkeit einer Negativantwort je Verdünnungsschritt).

Weitere Einzelheiten zu den Rechenschritten sind der zitierten Arbeit von Taswell zu entnehmen¹²⁹. Die Nullstellenberechnung im Rahmen der Minimierung der Chi-Quadrate erfolgte mit Hilfe eines speziellen Excel-Rechenblattes nach der sogenannten Ridder's Method¹³⁰.

Ist einmal die durchschnittliche Zahl der von einer LTC-IC produzierten koloniebildenden Zellen für eine Probe ermittelt, genügt prinzipiell ein herkömmlicher, nicht

quantitativer LTC-IC-Assay, um die absolute LTC-IC-Zahl näherungsweise zu ermitteln. Unter der Annahme der gleichen Quelle der Testzellen sowie identischen Assay-Bedingungen muß nur die Gesamtzahl produzierter koloniebildender Zellen durch die zuvor bestimmte durchschnittliche Zahl der von einer LTC-IC produzierten koloniebildenden Zellen geteilt werden, um die Zahl der in der ursprünglichen Probe enthaltenen LTC-IC abschätzen zu können.

3.3.2.5.2 Praktische Durchführung

Zunächst wurden 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatten in oben angegebener Weise mit einem Gemisch aus bestrahlten SI/SI- und M2-10B4-Fibroblasten in einer Konzentration von $1,25 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ LTC-Medium beschickt. Am folgenden Tag wurde eine LDA für die Beutel zwei, vier und sechs durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine 24-fach-Bestimmung über acht Verdünnungsstufen für jeden Beutel angestrebt. In die oberste Reihe der Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung $200 \mu\text{l}$ LTC-Medium – versetzt mit Hydrocortison in einer Endkonzentration von 10^{-6} M - und 6×10^5 Zellen aus dem Apherisat vorgelegt. Alle übrigen Vertiefungen wurden nur mit $100 \mu\text{l}$ LTC-Medium und Hydrocortison gefüllt. Mit der 12-fach-Pipette wurden anschließend je $100 \mu\text{l}$ Zellen und Medium aus der Reihe A in Reihe B überführt und durch dreimaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren unter Schonung des Fibrolayers gut durchmischt. Nach diesem Muster erfolgte die kontinuierliche 1:1 Verdünnung bis zur Reihe H. Die überschüssigen $100 \mu\text{l}$ aus der Reihe H wurden verworfen. Auch hier gelang die Herstellung einer feuchten Kammer zur Vermeidung gravierender Verdunstungsverluste durch Platzierung von jeweils sechs offenen Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser und je zwei Mikrotiterplatten in einer 24,5 cm x 24,5 cm messenden Kulturschale. Das Procedere zur Aufrechterhaltung der Langzeitkultur entsprach im Wesentlichen dem des herkömmlichen LTC-IC-Assay: Zunächst Inkubation bei 37°C , ab dem vierten Tag bei 33°C mit Wechsel der Hälfte des Mediums an den Tagen 10, 14, 21 und 28. Der Mediumwechsel erfolgte in aufsteigender Konzentration von der Reihe H bis zur Reihe A, wobei nach vorsichtigem Aufwirbeln und Durchmischen der nicht-adhärenen Zellen mit dem Nährmedium jeweils $40 \mu\text{l}$ Medium inklusive anteilig vorhandener nicht-

adhärenter Zellen entfernt und verworfen wurden und 50 µl frisches Nährmedium neu hinzugegeben wurden. Nach fünf Wochen erfolgte die Auflösung der Kulturen: Nachdem Nährmedium und nicht-adhärente Zellen durch vorsichtiges Schütteln gut durchmischt worden waren, wurden sie mit der 12-fach-Pipette in Rundboden-Mikrotiterplatten überführt. Anschließend wurden die Vertiefungen zweimal mit 30 µl HBSS ohne Calcium und Magnesium gespült; der Überstand wurde ebenfalls in die Rundboden-Mikrotiterplatten überführt. Das Pipettieren erfolgte stets in aufsteigender Konzentration. Nach Zugabe von 30 µl Trypsin 0,25% wurde zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde noch vorhandenes Trypsin mit 30 µl FCS inaktiviert. Jetzt wurde der Inhalt der Rundboden-Mikrotiterplatte zurück in die Flachboden-Mikrotiterplatte überführt und dort gut durchmischt. Bei 2000 U/min wurde zehn Minuten lang mit Bremse zentrifugiert, dann der Überstand abgegossen und das verbleibende Zellpellet mit 200 µl IMDM und 2% FCS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden statt IMDM 100 µl Methylcellulose-Medium zugegeben und das Ganze dann gut durchmischt. Abschließend vervollständigte der Vortexer den Durchmischungsprozeß. Ebenso wie im herkömmlichen LTC-IC-Assay wurden die Kulturen dann für 14 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde in diesem Fall nicht die Zahl der gewachsenen Kolonien gezählt, sondern nur die Tatsache „Koloniewachstum ja oder nein“ bewertet. Die Verdünnungsstufe, in der 37% der Vertiefungen negativ waren (kein Koloniewachstum), entsprach der Zellzahl, auf die genau eine LTC-IC entfiel.

Bei dem hier dargestellten Versuchsaufbau handelt es sich um eine Modifikation der von Sutherland und Eaves verwendeten LDA-Technik. Gemäß der Originalarbeit hätte der Inhalt jeder einzelnen Vertiefung nicht in der Vertiefung selber mit Methylcellulose-Medium durchmischt, sondern jeweils in einer Kulturschale (35 mm Durchmesser) mit Methylcellulose-Medium ausplattiert werden sollen. Die hier beschriebene Arbeitstechnik erwies sich nach einigen Vorversuchen jedoch sowohl vom Arbeits- als auch vom Materialaufwand als praktikabler.

3.3.2.6. Klonogenitätsassay

Klonogene hämatopoetische Vorläuferzellen bilden im halbfesten Methylcellulose-Medium des Klonogenitätsassays Kolonien. Die Anzahl, Größe und Morphologie der Kolonien erlaubt Rückschlüsse auf die Art und Zahl der eingesetzten Zellen bzw. den Einfluß des umgebenden Mediums auf Teilung und Differenzierung dieser Zellen.

Der Klonogenitätsassay wurde in geringer Modifikation der ursprünglich von Wunder beschriebenen Technik durchgeführt¹³¹: Das zuvor in Portionen von 2,5 ml in sterilen Röhrchen eingefrorene Methylcellulose-Medium MethoCult™ H4434 (1% Methylcellulose in Iscove's MDM, 30% fötales Kälberserum, 1% Rinderserumalbumin, 3 U/ml rekombinantes Erythropoietin, 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 50 ng/ml rekombinanter Stem Cell Faktor, 10 ng/ml rekombinanter GM-CSF, 10 ng/ml rekombinantes Interleukin-3) wurde nach dem Auftauen mit einer Zellsuspension aus $1,25 \times 10^5$ WBC versetzt. Die so erreichte Konzentration beim „Einsäen“ der Zellen von 5×10^4 Zellen pro Milliliter entsprach den Herstellerangaben. Das Volumen der zugesetzten Zellsuspension betrug in der Regel ein Zehntel von dem des Methylcellulose-Mediums. Nährmedium und Zellsuspension wurden ausgiebig durchmischt - wobei auf ein blasenfreies Resultat geachtet wurde - und auf zwei Kulturschalen à 1 ml verteilt (Doppelbestimmung). Um eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurden die angesetzten Kulturschalen jeweils zusammen mit einer Schale sterilem Aqua ad iniectabilia in einer größeren Kulturschale plaziert. Der Ansatz wurde 14 Tage lang bei 37° C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. In der mikroskopischen Auswertung wurden Zellverbände mit mehr als 40 Zellen als Kolonien gezählt. Eine Klassifizierung in „burst-forming unit-erythroid“ (BFU-E), CFU-GM und „colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte“ (CFU-GEMM) erfolgte anhand des charakteristischen morphologischen Aspektes¹³². Der Klonogenitätsassay wurde am Tag Null und Tag 35 durchgeführt.

3.3.3. Ex-vivo Expansion

Prinzip: Nach Aufreinigung der CD34-exprimierenden Zellen durch Positivselektion erfolgte die in-vitro Expansion durch Zusatz eines definierten Zytokincocktails und Inkubation über 14 Tage. Verlaufskontrollen erfolgten über Klonogenitätsassay, CD34-Bestimmungen und über Vitalitätskontrollen (Trypanblaufärbung) jeweils an den Tagen Null und 14.

Die ex-vivo Expansion wurde mit Proben aus den Beuteln zwei, vier und sechs durchgeführt.

3.3.3.1. CD34-Positivselektion

Die Anreicherung CD34⁺-Zellen erfolgte über eine MiniMACS-Säule gemäß den Angaben des Herstellers¹³³:

Jedes Aliquot (1 ml) wurde durch einen 30 µm-Zellsuspensionsfilter (Miltenyi Biotec) geschickt, um eventuell vorhandene Zellaggregate zu entfernen. Das gefilterte Probenmaterial und acht Milliliter einer Pufferlösung (PBS ohne Calcium und Magnesium mit 0,6% ACD-A und 0,5% HSA) wurden bei 1000 U/min 10 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert, um die Zahl der Thrombozyten im Leukapherisat zu reduzieren. Der Proteinzusatz in der Pufferlösung verhinderte Zellaggregationen während der nachfolgenden Arbeitsschritte. Eine Entgasung im Ultraschallbad vermied Blasenbildung in der MACS-Säule mit konsekutivem Verschluß.

Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet mit Pufferlösung so resuspendiert, daß 300 µl Puffer-Zellsuspension 10⁸ Zellen entsprachen. 100 µl humanes Immunglobulin wurden zur Blockade der F_C-Rezeptoren zugegeben. In gleicher Weise erfolgte der Zusatz von 100 µl eines monoklonalen, haptenkonjugierten CD34-Antikörpers (Klon: QBEND/10, Isotyp: Maus IgG1). Die Probe wurde nun 15 Minuten bei 9°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von neun Millilitern Pufferlösung bei 1000 U/min 10 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand abgegossen und erneut mit Pufferlösung auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt. Jetzt wurden 100 µl an einen anti-Hapten Antikörper konjugierte, kolloidale super-paramagnetische MACS

MicroBeads zugeführt, die Probe gut durchmischt und abermals für 15 Minuten bei 9°C inkubiert. Durch die Koppelung der MicroBeads an spezifische anti-Immunglobuline erfolgte eine selektive Markierung der CD34⁺-Zellen, ohne daß der funktionale Status der so markierten Zellen beeinträchtigt worden wäre. Für einen Nachweis im Durchflußzytometer sind die Beads ebenfalls zu klein.

Die 500 µl Probe und sechs Milliliter Pufferlösung wurden dann bei 1000 U/min zehn Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit Puffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt.

Abschließend wurden zunächst 500 µl Pufferlösung, dann 500 µl Zellsuspension mit den indirekt magnetisch markierten CD34⁺-Zellen und zuletzt noch viermal je 500 µl Pufferlösung auf die MACS-Trennsäule vom Typ MS⁺ gegeben. Über die im Magnetfeld des MiniMACS-Magneten angebrachte Trennsäule wurden die Zellen, die mit kolloidalen super-paramagnetischen MikroBeads markiert wurden, abgetrennt. Die Trennsäulen sind gefüllt mit dünnen, plastiküberzogenen ferromagnetischen Fasern, die im Feld des starken permanenten MiniMACS-Magneten magnetisch aufgeladen werden.

Danach wurde die Trennsäule aus dem Magnetfeld des MiniMACS-Magneten entfernt und über einem neuen Auffanggefäß plaziert. Mit einem Milliliter Pufferlösung wurden mit Hilfe des mitgelieferten Spritzenkolbens die zunächst im Magnetfeld retinierten indirekt magnetisch markierten CD34⁺-Zellen aus dem Säulensystem entfernt.

Für die Positivselektion hat sich eine beschleunigte Flußrate in Kombination mit der mehrmaligen Passage des Säulensystems als günstig erwiesen, um die Sensitivität der Auftrennung zu erhöhen. Daher wurde das aufgefangene Eluat ein zweites Mal entsprechend obengenanntem Procedere über eine Trennsäule geschickt.

Für die Reinheitsbestimmung des Eluats wurden je 40 µl Probe mit 10 µl CD45-Antikörper (Immunotech) und mit 20 µl CD34-Antikörper (Becton Dickinson) bzw. als Negativkontrolle mit 10 µl CD45-Antikörper und mit 20 µl muriner Isotypkontrolle (Becton Dickinson) gemischt und für 15 Minuten unter Lichtausschluß inkubiert. Die Proben wurden dann ohne vorherige Erythrozytenlyse mit 500 µl PBS ohne Calcium und Magnesium verdünnt und 10.000 Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Die Werte der Negativkontrolle wurden als Maß für unspezifische Bindungen von der Gesamtzahl der CD34⁺-Zellen abgezogen. Die Differenz wurde durch die Zahl der

tatsächlich berücksichtigten Zellen („gated cells“) geteilt und mit der WBC-Zahl pro Milliliter, die zuvor am Zellzählgerät (K-1000 der Firma SYSMEX) bestimmt worden war, multipliziert.

3.3.3.2. Expansionsassay

Gemäß dem Protokoll von Brugger et al. wurden $1,2 \times 10^5$ CD34⁺-Zellen mit vier Millilitern einer vorbereiteten Nährlösung aus RPMI 1640 und 10% FCS versetzt und dann in ein 12 ml-Röhrchen mit definiertem Wachstumsfaktorcocktail gegeben^{109 134 135}. Der Ansatz wurde so auf zwei Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser verteilt, daß letztendlich folgende Konzentrationen je Gefäß vorlagen: zwei Milliliter RPMI 1640 und 10% FCS mit 6×10^4 CD34⁺-Zellen und 3 ng rekombinantes humanes Interleukin-1 β /ml (Firma genzyme), 100 ng rekombinantes humanes Interleukin-3/ml (Firma genzyme), 100 ng rekombinantes humanes Interleukin-6/ml (gespendet von der Firma Novartis), 1 Unit rekombinantes humanes Erythropoietin/ml (Firma R&D Systems), 100 ng rekombinanter humaner Stem Cell Factor/ml (gespendet vom ICP-Labor der Hämatologie/Onkologie der WWU Münster) sowie 100 ng rekombinanter humaner Flt3-Ligand/ml (Firma TEBU). Flt3-Ligand war in der Originalarbeit von Brugger et al. bisher nicht vorgesehen, zeigte jedoch bessere Resultate¹³⁶.

Die Kulturschalen wurden in einer größeren Kulturschale bei 37°C und 5% CO₂ über 14 Tage inkubiert. Nach einer Woche wurden je Kulturschale ein Milliliter RPMI 1640 und 10% FCS mit doppelter Zytokinkonzentration hinzugegeben. Um eine Vermehrung der koloniebildenden Zellen beurteilen zu können, wurde an den Tagen Null und 14 ein Klonogenitätsassay durchgeführt: Am Tag Null wurden je Beutel zwei Klonogenitätsassays mit 500 WBC/ml Methylcellulose-Medium und zwei Ansätze mit 1000 WBC/ml Methylcellulose-Medium angesetzt. Am Tag 14 wurde die Zellzahl auf 2000 bzw. 4000 WBC/ml Methylcellulose-Medium erhöht. Zur Bestimmung der Vitalität erfolgte nach der Positivselektion bzw. nach 14 Tagen Expansionsassay eine Trypanblaufärbung.

3.4. Statistik

Bei allen untersuchten Parametern wurden zunächst Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Die weitere statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS) für Windows, Version 10.0. Zum statistischen Vergleich der Daten wurde der nichtparametrische Test für verbundene Stichproben nach Friedman durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ angenommen.

In allen Diagrammen sind die Signifikanzwerte aus dem Vergleich des ersten prozessierten Blutvolumens (pBV) mit den Blutvolumina 2 bis 6 dargestellt. Wenn nur die Blutvolumina 2, 4 und 6 untersucht wurden (LDA, Ex-vivo Expansion), wurde jeweils das zweite pBV mit den Blutvolumina 4 und 6 verglichen. Die Signifikanzwerte wurden in den Grafiken aufgelistet. Für den Fall, daß keine signifikante Zu- bzw. Abnahme nachgewiesen werden konnte, wurde dies durch das Kürzel n.s. (nicht signifikant) kenntlich gemacht.

Die Ermittlung absoluter Zellfrequenzen für die LTC-IC erfolgte mittels Limiting Dilution Analyse. Die dafür im Einzelnen notwendigen Kalkulationen wurden im Zusammenhang unter 3.3.2.5.1 ausführlich dargestellt.

4. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 22 Leukapheresen bei 17 verschiedenen Patienten durchgeführt und ausgewertet.

Berücksichtigt wurden bei der Auswertung nur die Ergebnisse, bei denen mindestens zwei Drittel der ermittelten Einzelwerte je Versuchsteil vorlagen. Die Zahl der berücksichtigten Fälle im Einzelnen ist jeweils in den nachfolgenden Graphiken aufgeführt.

Aufgrund der Variabilität in der Vorbehandlung und Mobilisierungsfähigkeit der Patienten ergaben sich erwartungsgemäß sehr unterschiedliche Stammzellausbeuten, was sich in den hohen Standardabweichungen bei der Darstellung der Absolutwerte zeigte. Daher wurden die relativen zeitabhängigen Ausbeuten kalkuliert, indem die Ausbeute des einzelnen pBV durch die Gesamtausbeute der entsprechenden LVL dividiert wurde.

4.1. Leukozyten

Ziel jeder Stammzellapherese ist es, die „Schicht“ der mononukleären Zellen möglichst genau zu erfassen und diese Einstellung über den gesamten Zeitraum der Prozessierung beizubehalten. Aussagen über die erzielte Effizienz und ihre Kinetik waren daher besonders gut anhand der Untersuchung der Leukozytenzahlen je pBV möglich.

Abbildung 12 zeigt die Kinetik der gesammelten Leukozyten im Verlauf der LVL. In der Darstellung Leukozytenzahlen pro Mikroliter in Abhängigkeit vom pBV sind alle 22 ermittelten Einzelwerte erfaßt; der Mittelwert ist durch einen horizontalen Balken kenntlich gemacht. Signifikante Änderungen im Verlauf der LVL fanden sich nicht.

Abbildung 13 stellt die relativen Leukozytenausbeuten je pBV bezogen auf die Gesamtausbeute dar.

Es fand sich kein signifikanter Anstieg oder Abfall der Leukozytenzahlen im Verlauf der Stammzellapherese. Allenfalls ein ansteigender Trend, der jedoch keine Signifikanz erreichte, in der ersten Hälfte der Apherese (erstes bis drittes pBV) und ein abfallender

Trend im zweiten Teil (viertes bis sechstes pBV) deuteten sich an. Im fünften und sechsten pBV lagen die Leukozytenzahlen unter dem Wert des ersten pBV.

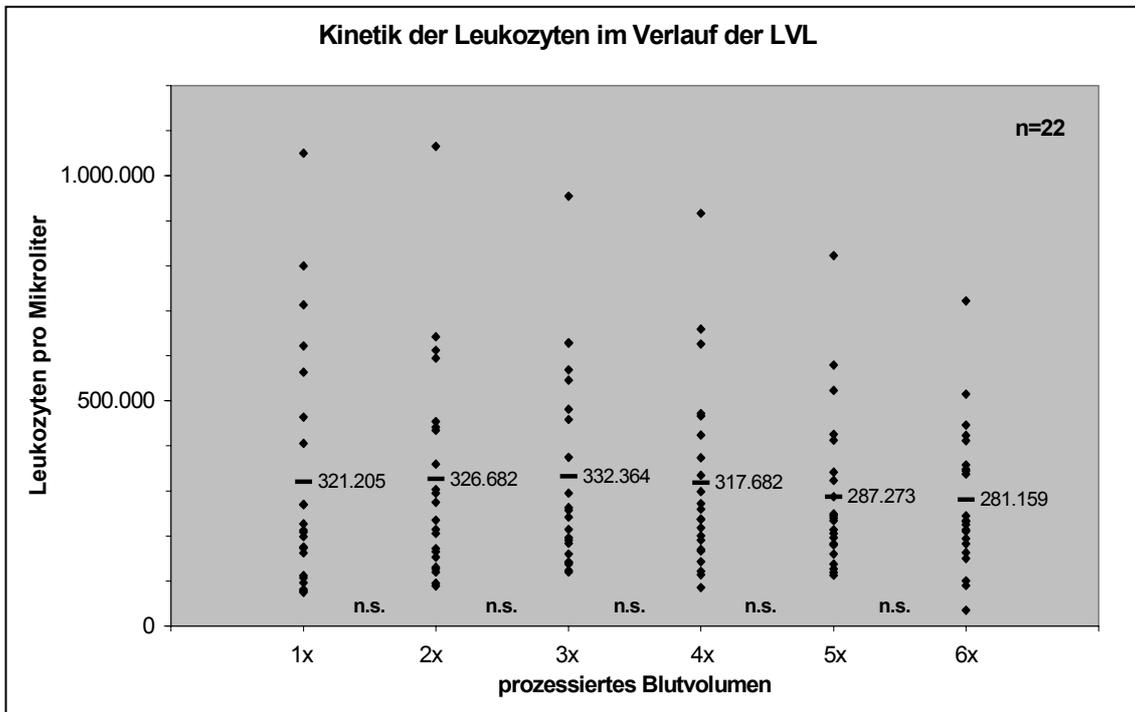


Abbildung 12: Kinetik der Leukozyten im Verlauf der LVL (absolute Werte)

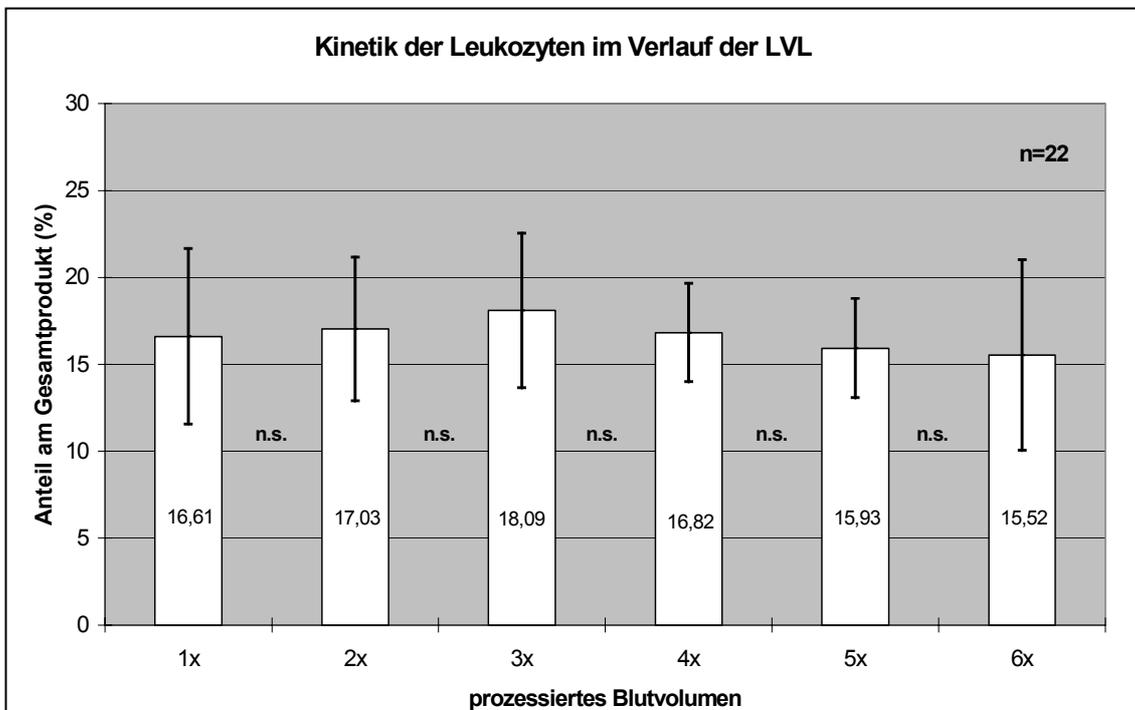


Abbildung 13: Kinetik der Leukozyten im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.2. Anteil CD34⁺-Zellen

Um die Kinetik des Stammzellanteils an den Leukozyten zu ermitteln, wurden durchflußzytometrische Messungen aus jedem Teilprodukt durchgeführt.

Abbildung 14 und 15 geben die Veränderungen in der Kinetik der CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL wieder. Abgebildet ist zunächst der prozentuale Anteil der CD34⁺-Zellen an den Leukozyten als Darstellung aller Einzelwerte. Der Anteil CD34⁺-Zellen betrug im Mittel zwischen 1,93% im zweiten pBV und 1,72% im fünften pBV. Die Veränderungen der einzelnen pBV im Vergleich zu pBV 1 waren nicht signifikant.

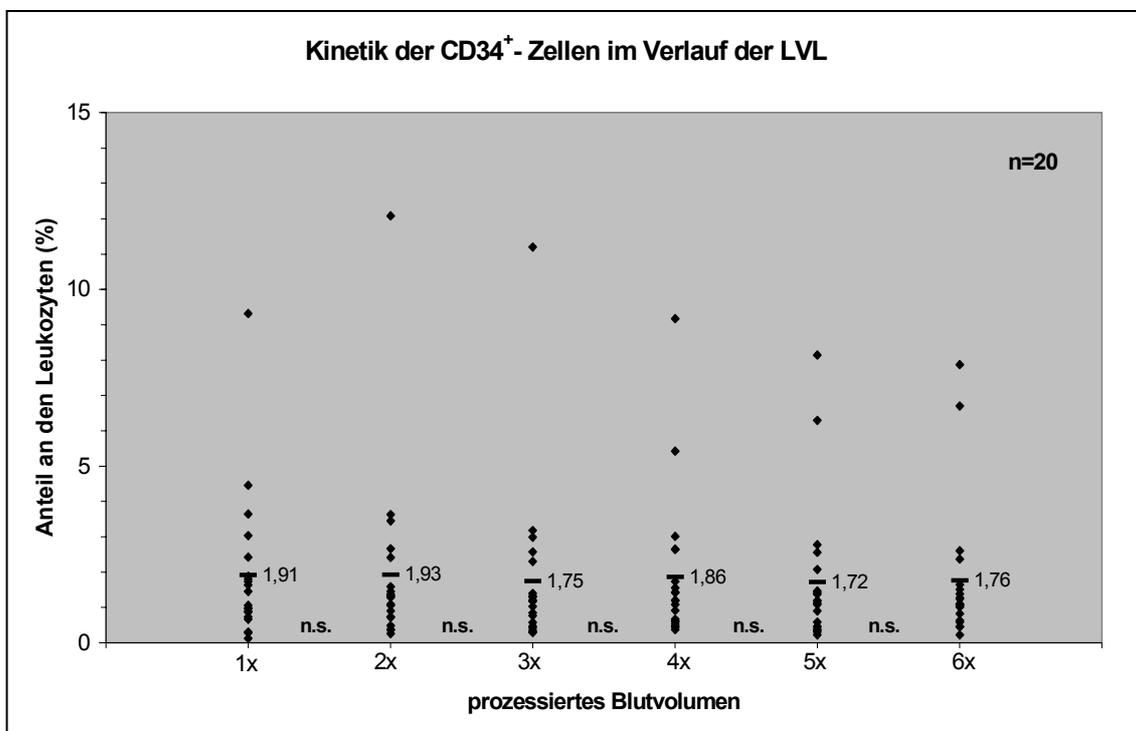


Abbildung 14: Kinetik der CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL (Anteil an den Leukozyten)

Über die Bestimmung der absoluten Werte an CD34⁺-Zellen/ μ l und die Umrechnung auf den gesamten Beutelinhalt ließ sich auch in dieser Untersuchung durch Bezugnahme des jeweils pBV auf die Gesamtausbeute die relative zeitabhängige Ausbeute kalkulieren. Diese relative Darstellung ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit selbst so unterschiedlicher Anteile von CD34⁺-Zellen an den Leukozyten wie 0,12% (Leukapherese vom 02.01.1998) und 12,08% (Leukapherese vom 24.02.1998); das statistische Ergebnis blieb dabei unverändert.

Auch bei dieser Form der Darstellung wurde in keinem Fall das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreicht.

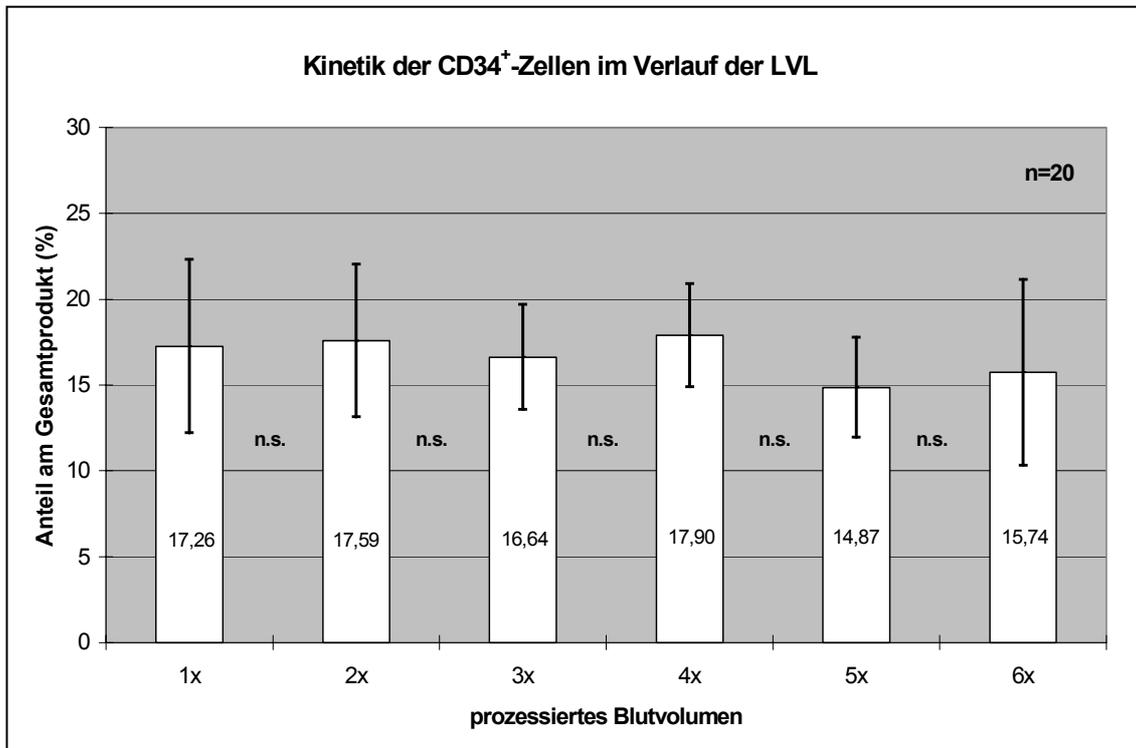


Abbildung 15: Kinetik der CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.3. Subpopulationsanalysen

Zur morphologischen Bestimmung des Differenzierungsgrades der Stammzellen wurde die Expression von vier Subset-Markern (CD38, CD90, CD117 und HLA-DR) auf CD34⁺-Zellen bestimmt. Dabei erschien - angesichts eines durchschnittlichen Anteils der CD34⁺-Zellen von etwa zwei Prozent und 100.000 untersuchten Leukozyten (d.h. etwa 2.000 Zellen, deren Dichte an Subpopulationsmarkern bestimmt werden sollte) - auch die Untersuchung seltenerer Subpopulationen wie der CD34⁺/CD38⁻- und CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen statthaft.

4.3.1. Anteil CD34⁺/CD38⁻-Zellen an den CD34⁺-Zellen

Abbildung 16 zeigt die Veränderung des Anteils CD34⁺/CD38⁻-Zellen an den CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL. Insgesamt ergab sich keine signifikante Änderung des prozentualen Anteils der CD34⁺/CD38⁻-Zellen zwischen dem ersten und sechsten pBV. Nach im Mittel nahezu konstantem Anteil CD34⁺/CD38⁻-Zellen im ersten bis dritten pBV fand sich allenfalls ein leicht ansteigender Trend zum Ende der Leukapherese hin, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

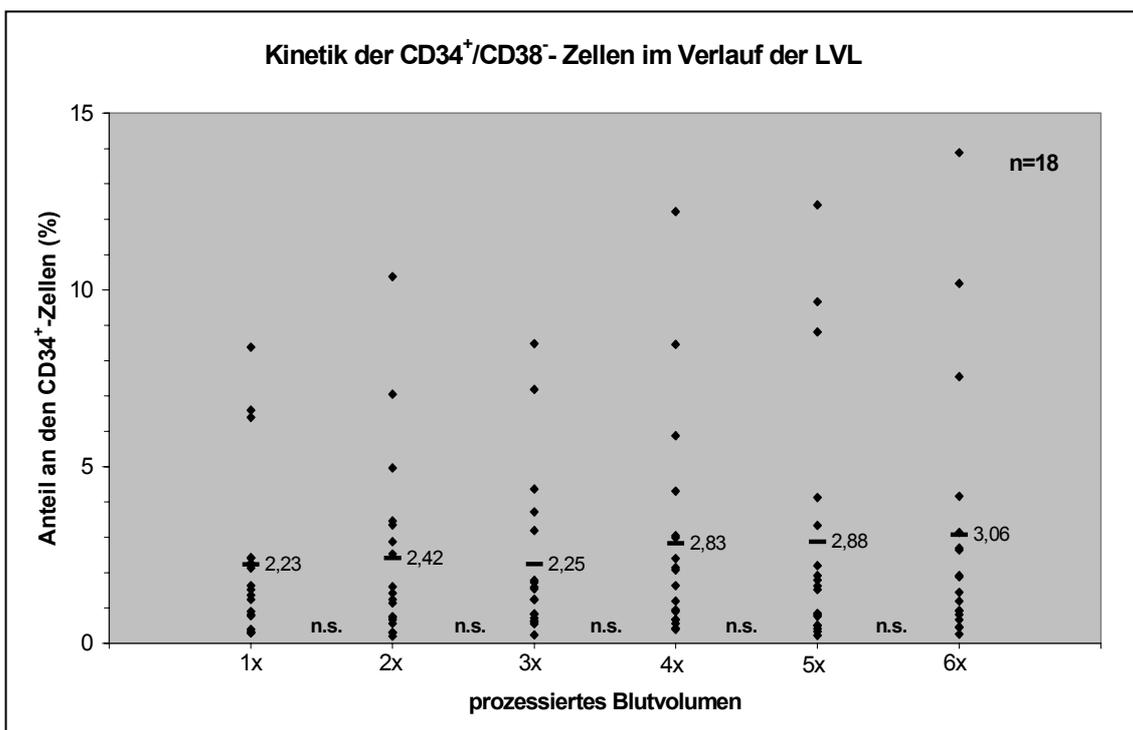


Abbildung 16: Kinetik der CD34⁺/CD38⁻-Zellen im Verlauf der LVL (Anteil an den CD34⁺-Zellen)

In der Darstellung der mittleren relativen Ausbeuten (Abbildung 17) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen.

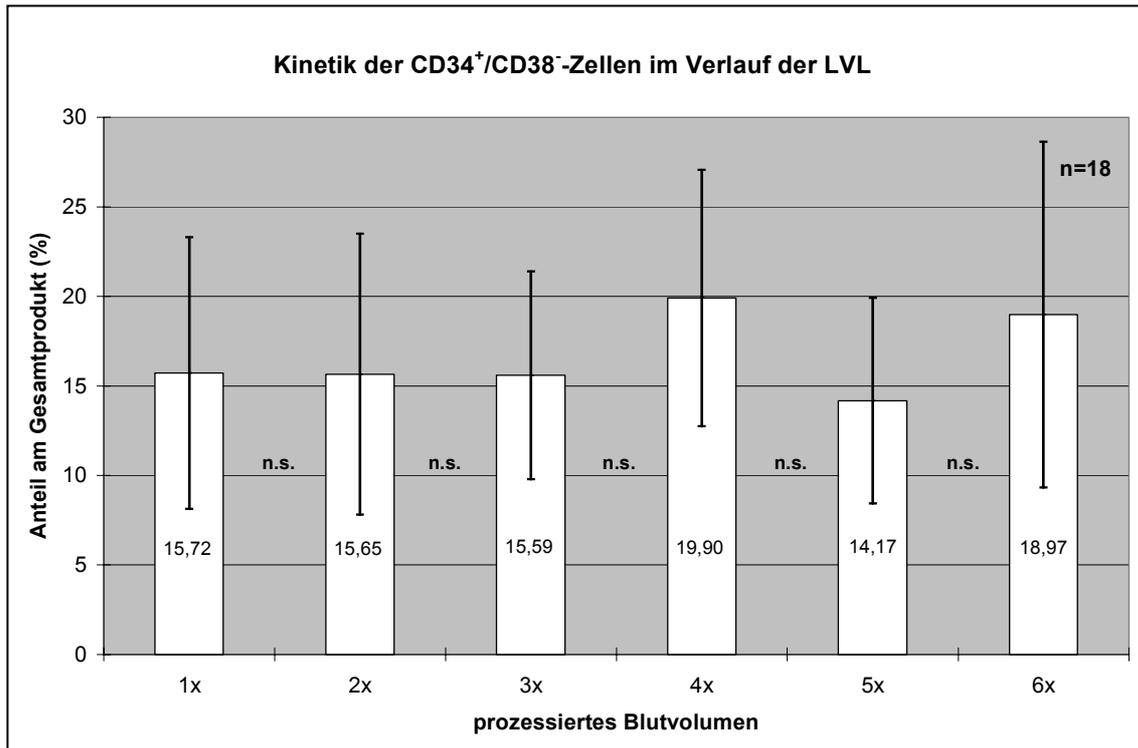


Abbildung 17: Kinetik der CD34⁺/CD38⁻-Zellen im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.3.2. Anteil CD34⁺/CD90⁺-Zellen an den CD34⁺-Zellen

Abbildung 18 stellt den prozentualen Anteil CD34⁺/CD90⁺-Zellen an den CD34⁺-Zellen in Abhängigkeit vom pBV als Punktwolke der Einzelwerte dar. Im Mittel lag der Anteil der Thy-1-exprimierenden CD34⁺-Zellen zwischen 50,78% im ersten pBV und 47,53% im sechsten pBV. Keine der Änderungen bezogen auf das erste pBV war signifikant.

In der Darstellung der relativen zeitabhängigen Ausbeuten (Abbildung 19) bestätigte sich ein leicht abfallender Trend, aber auch hier erreichte keine der Veränderungen das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Bei einer nach dem Zeitpunkt der FACS-Analyse getrennten Darstellung (Daten sind nicht abgebildet.) fällt auf, daß der Anteil der Thy-1-exprimierenden CD34⁺-Zellen scheinbar umso höher war, je später die FACS-Messung im gesamten Versuchsaufbau erfolgte. Wurde die FACS-Messung direkt im Anschluß an die LVL durchgeführt, so lag der durchschnittliche Anteil der CD34⁺/CD90⁺-Zellen bei knapp 45%. Fand die

Subpopulationsanalyse aufgrund der zunächst durchgeführten Zellkulturversuche erst ca. 24 Stunden später statt, lag dieser Wert bei über 50%.

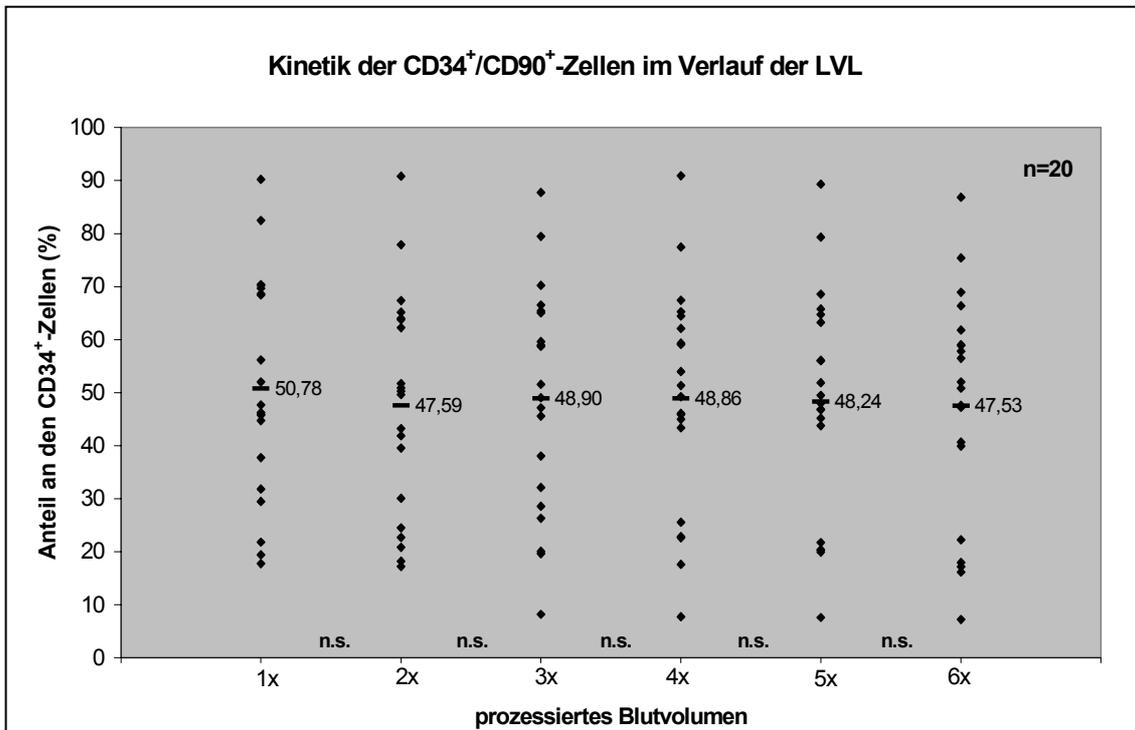


Abbildung 18: Kinetik der CD34⁺/CD90⁺-Zellen im Verlauf der LVL (Anteil an den CD34⁺-Zellen)

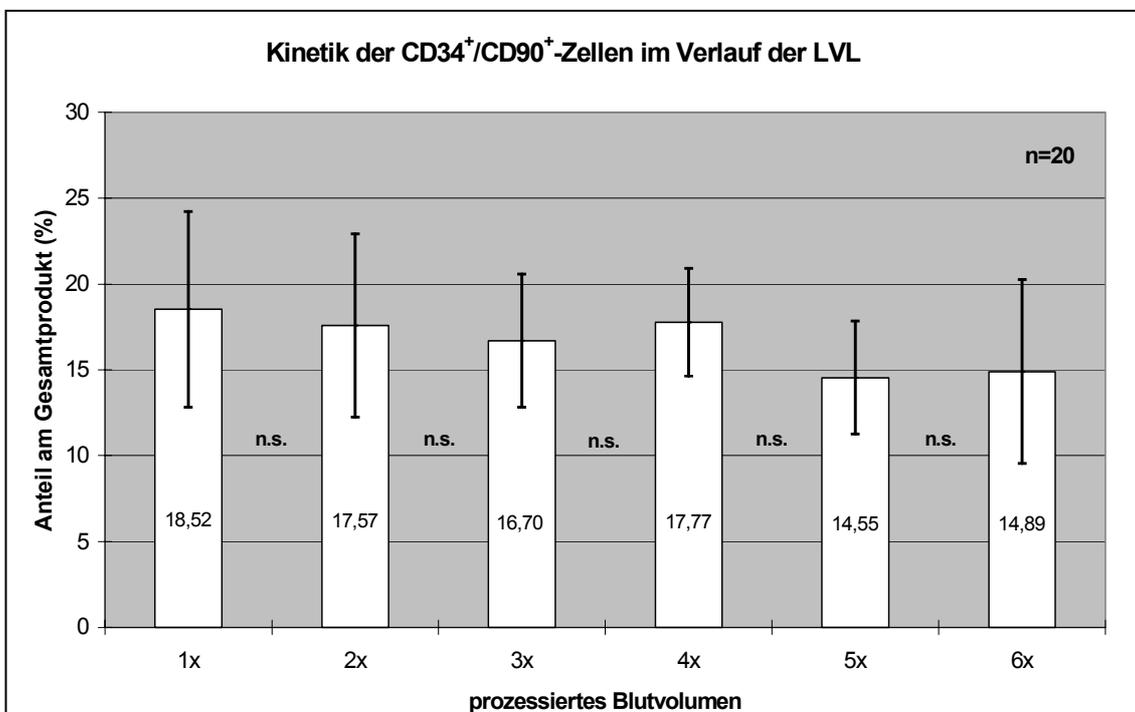


Abbildung 19: Kinetik der CD34⁺/CD90⁺-Zellen im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.3.3. Anteil CD34⁺/CD117⁺-Zellen an den CD34⁺-Zellen

Abbildung 20 zeigt die Veränderungen des Anteils der CD34⁺/CD117⁺-Zellen an den CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL. Es fand sich keine signifikante Änderung des Anteils c-kit-ligand-exprimierender Zellen. Der prozentuale Anteil schwankte zwischen 79,09% im dritten pBV und 80,53% im sechsten pBV.

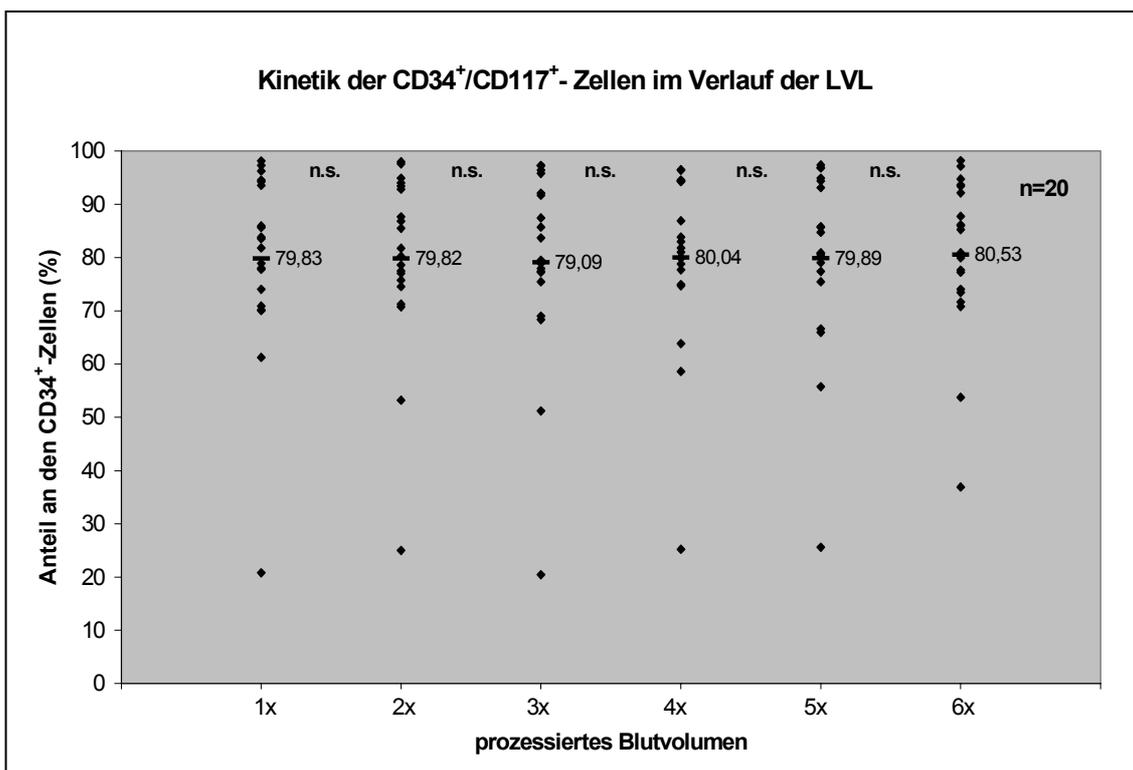


Abbildung 20: Kinetik der CD34⁺/CD117⁺-Zellen im Verlauf der LVL (Anteil an den CD34⁺-Zellen)

Entsprechend ergaben sich auch in der Darstellung der relativen Ausbeuten je pBV in Bezug auf die Gesamtausbeute (Abbildung 21) keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen prozessierten Blutvolumina.

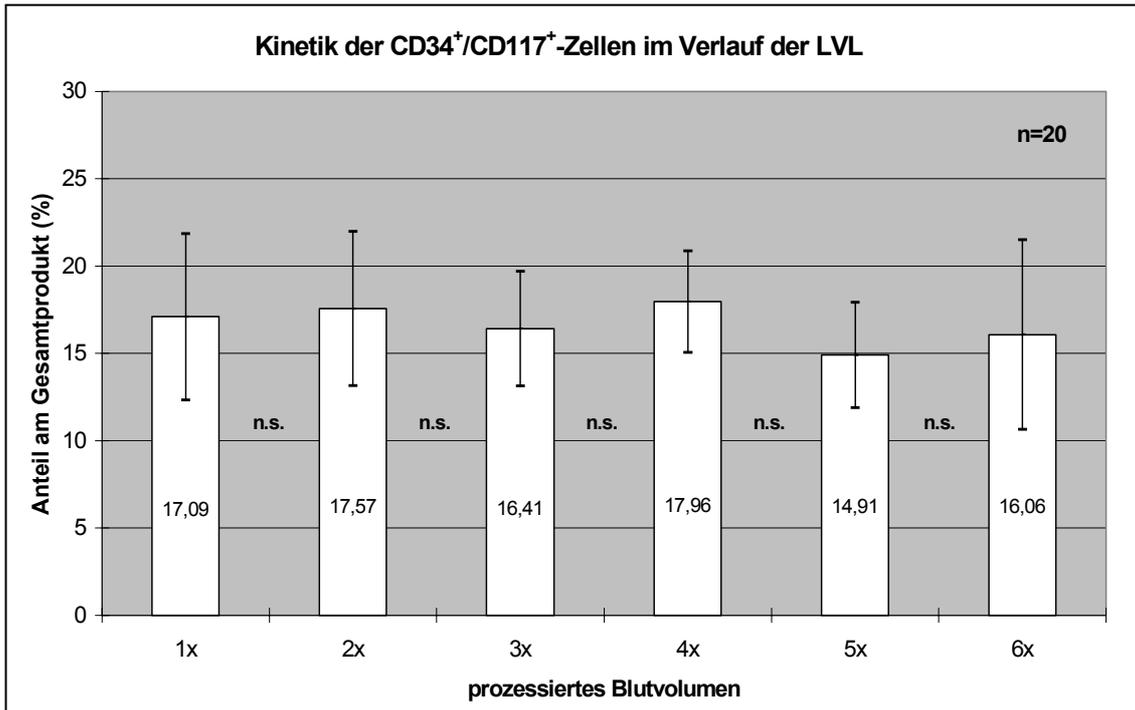


Abbildung 21: Kinetik der CD34⁺/CD117⁺-Zellen im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.3.4. Anteil CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen an den CD34⁺-Zellen

Abbildung 22 zeigt die Veränderungen des Anteils CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen an den CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL. Nach einem ansteigenden Trend beim prozentualen Anteil der CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen an den CD34⁺-Zellen von 1,66% im pBV 1 über 1,65% im pBV 2 auf 2,07% im pBV 3 (höchster Wert) erfolgte ein Abfall über 1,70% im pBV 4 auf den mit 1,58% niedrigsten Wert im pBV 5. Danach stieg der Anteil der CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen noch einmal auf 1,74% im pBV 6.

Abbildung 23 beschreibt prinzipiell den gleichen Sachverhalt nach Bezugnahme auf das jeweilige pBV und relativer Gewichtung der Ausbeuten der einzelnen pBV als Anteil am Gesamtprodukt. Keine dieser Veränderungen im Verlauf der LVL war signifikant.

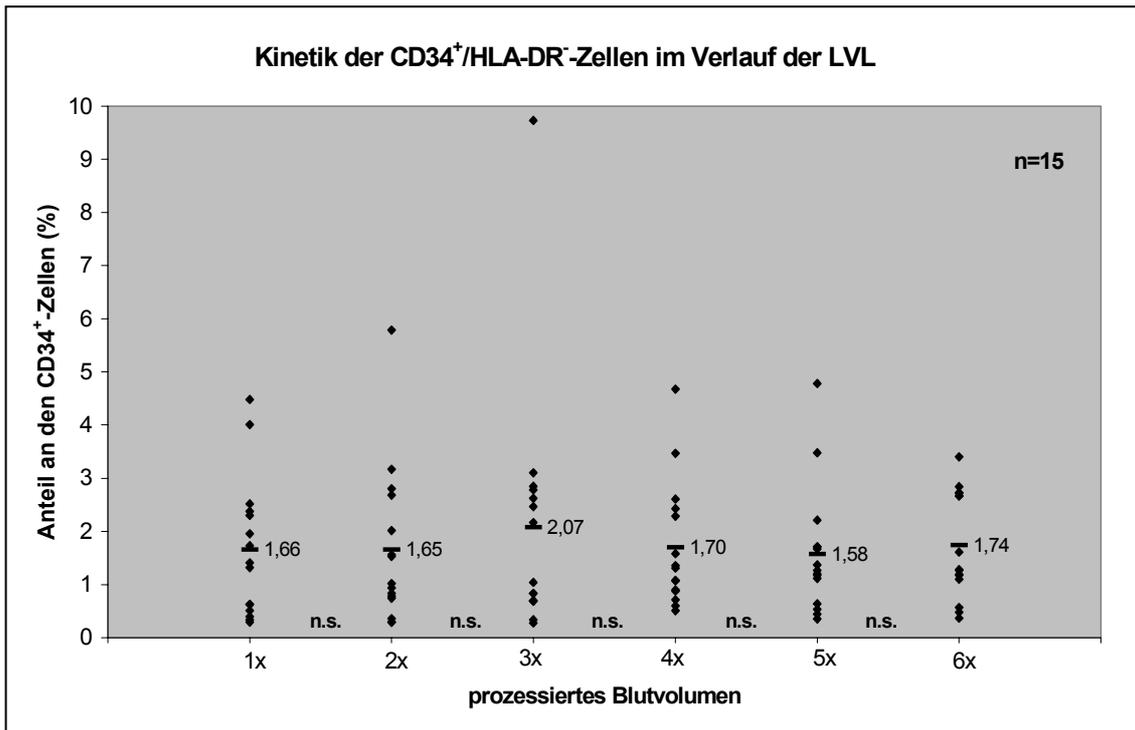


Abbildung 22: Kinetik der CD34⁺HLA-DR⁻-Zellen im Verlauf der LVL (Anteil an den CD34⁺-Zellen)

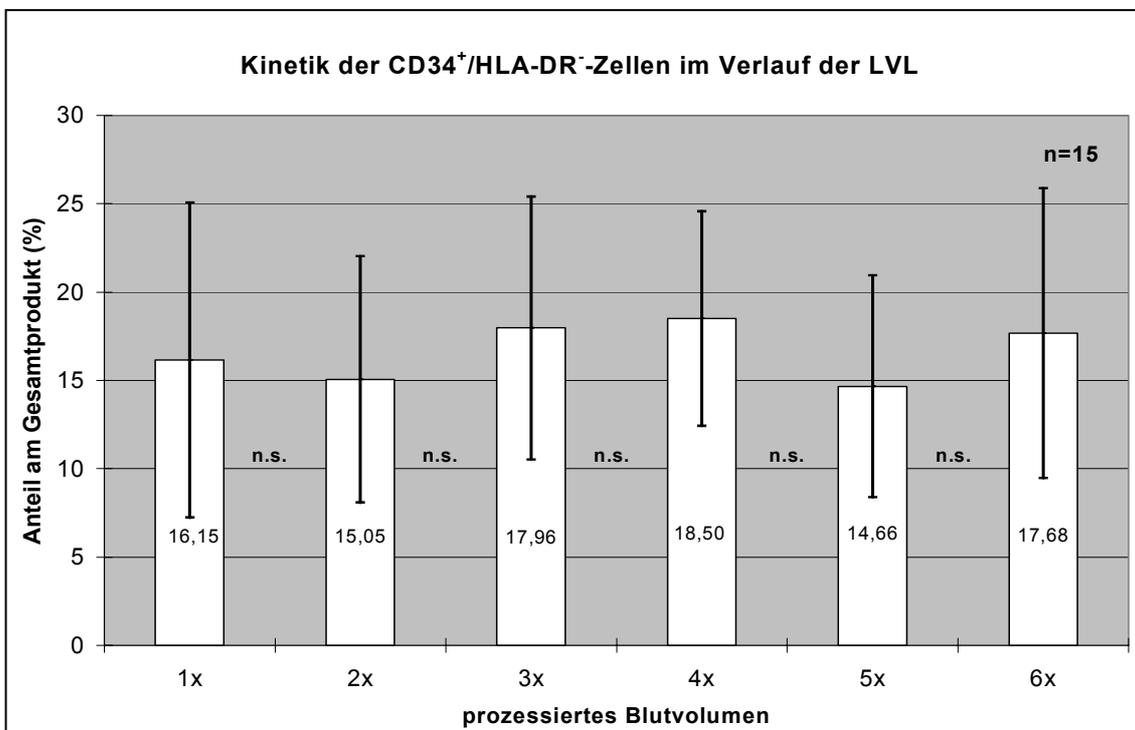


Abbildung 23: Kinetik der CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.4. Klonogenitätsassay

Ziel dieser Studie war es nicht nur, statisch die Antigenbeschaffenheit der Stammzellen mittels Durchflußzytometrie zu ermitteln, sondern darüber hinaus die prozessierten Blutvolumina im Rahmen des Klonogenitätsassays auch einer funktionellen Untersuchung zu unterziehen.

Aus versuchstechnischen Gründen konnten nur bei sieben Leukapheresen repetitive Colony-Assays durchgeführt werden.

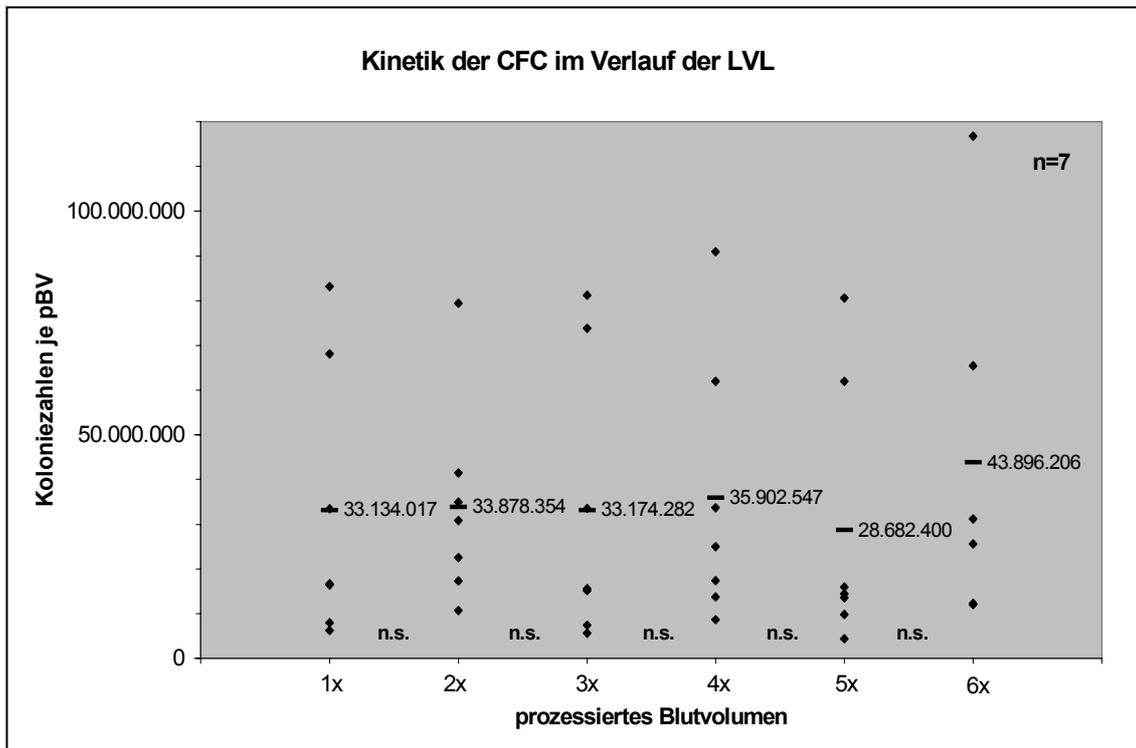


Abbildung 24: Kinetik der CFC im Verlauf der LVL (absolute Werte)

Sowohl beim Vergleich der unter dem Mikroskop ausgezählten Koloniezahlen je Assay als auch beim Vergleich der Koloniezahlen je pBV (Abbildung 24) ergaben sich zwischen den einzelnen LVL erneut erhebliche interindividuelle Unterschiede mit enorm hohen Standardabweichungen, so daß wiederum auf die bereits weiter oben angesprochene Darstellung der relativen Ausbeuten in Bezug auf das Gesamtprodukt zurückgegriffen wurde (Abbildung 25). Auffallend war hierbei eine ähnliche Kinetik wie bei der durchflußzytometrischen Charakterisierung der Stammzellen über das CD34-Antigen. Abbildung 25 zeigt den Progenitor-Gehalt der einzelnen prozessierten

Blutvolumina als prozentualen Anteil am Gesamtprodukt. Keine der Veränderungen im Verlauf der LVL erreichte das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

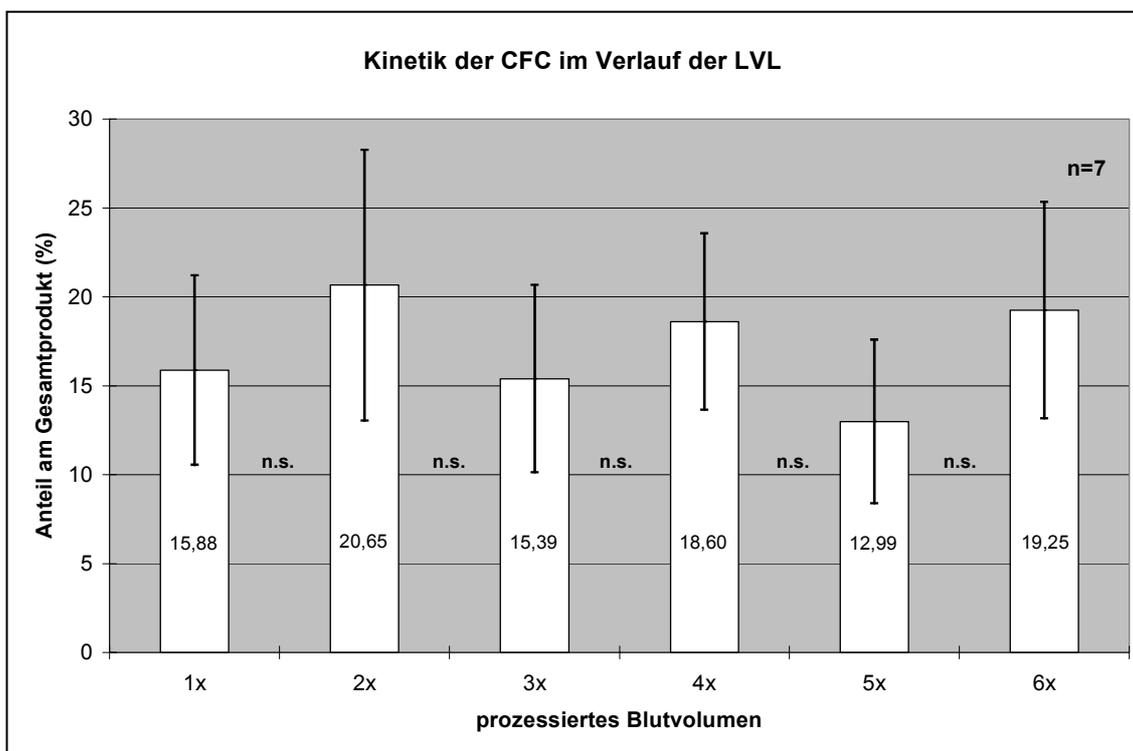


Abbildung 25: Kinetik der CFC im Verlauf der LVL (relative Werte)

4.5. Long Term Culture-Initiating Cell-Assay / Limiting Dilution Analyse

Aussagen über ein mögliches Langzeit-Engraftment eines Stammzelltransplantates lassen sich nach heutigem Wissen am ehesten über die Long Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC) treffen. Daher ist die Auswertung der Kinetik dieser Zellen im Verlauf der LVL von entscheidender Bedeutung.

Bei 21 Leukapheresen wurde aus den sequentiell gewonnenen Proben ein LTC-IC-Assay angesetzt; zwei Ansätze blieben in der Auswertung unberücksichtigt, da sich nur im pBV 6 bzw. in den pBV 5 und 6 ein Koloniewachstum zeigte.

Bei der Ermittlung der Veränderung der LTC-IC-Zahlen je Klonogenitätsassay im Verlauf der LVL (Abbildung 26) zeigte sich ein abfallender Trend von durchschnittlich 10,2 im pBV 1 bis zu 7,9 im pBV 5. Die LTC-IC-Zahlen im Ansatz aus dem pBV 6 lagen mit 8,1 LTC-IC je 50.000 Leukozyten tendenziell über denen aus dem pBV 5, im

Vergleich zum pBV 1 fiel der Wert aber ab. Dieser Abfall erreichte mit $p=0,039$ ebenso das geforderte Signifikanzniveau wie die Veränderung vom pBV 1 zum pBV 3 ($p=0,012$).

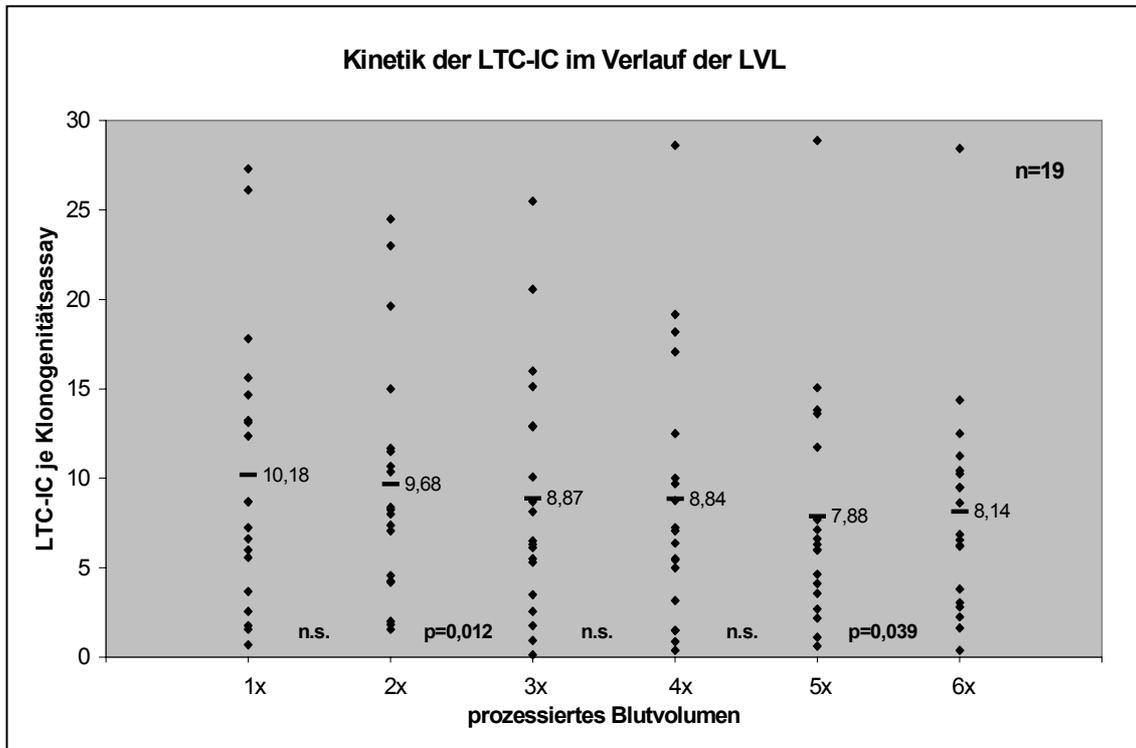


Abbildung 26: Kinetik der LTC-IC im Verlauf der LVL (Zellzahlen je Klonogenitätsassay)

Die Aussagekraft dieser Darstellung wurde jedoch dadurch vermindert, daß hier Leukapheresen miteinander verglichen wurden, in denen die Ausbeute an LTC-IC je Kultur zwischen Werten kleiner als eins und 29 lag (vgl. Abbildung 26). Außerdem blieben bei dieser Form der Auswertung die Leukozytenzahlen des Stammzellproduktes pro Mikroliter und die Beutelvolumina zunächst unberücksichtigt. Daher wurde auch in diesem Fall wieder auf die Darstellung in Form der relativen Ausbeute im pBV x bezogen auf das Gesamtprodukt zurückgegriffen (Abbildung 27).

Dabei ergab sich folgendes Bild: Nach ansteigender Tendenz von 17,74% im pBV 1 auf 22,72% im pBV 2 fand sich ein abfallender Trend bis auf 13,67% im pBV 5. Anschließend zeigte sich tendenziell noch einmal ein leichter Anstieg auf 14,19% im pBV 6. Keine dieser Veränderungen war signifikant.

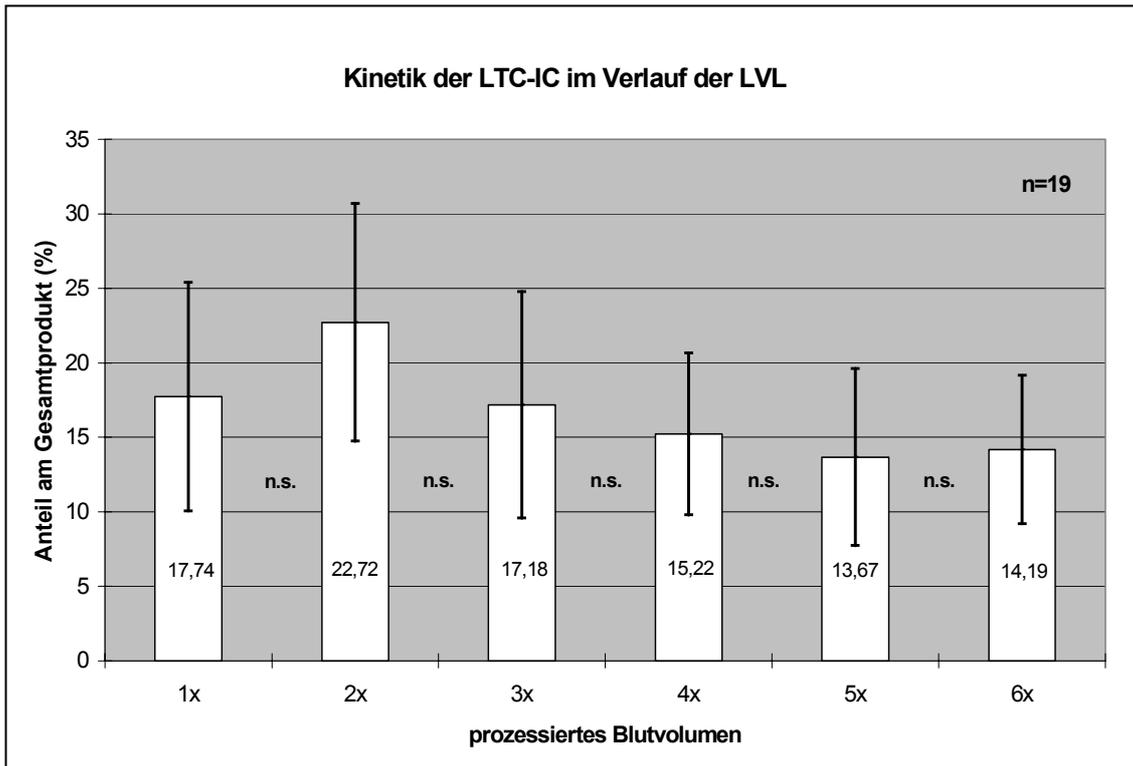


Abbildung 27: Kinetik der LTC-IC im Verlauf der LVL (relative Werte)

Was die absolute Zahl der LTC-IC betrifft, so kann die Auswertung des LTC-IC-Assays immer nur Näherungswerte liefern. Die Ermittlung der LTC-IC-Zahlen durch Auszählen der Kolonien im Klonogenitätsassay nach fünf Wochen Langzeitkultur und anschließende Division durch vier beruht weniger auf exakten Messungen als auf Durchschnitts- bzw. Erfahrungswerten⁹⁸. Trotzdem konnte eine enge Korrelation mit der wesentlich genaueren Methode der Limiting Dilution Analyse (LDA) der LTC-IC festgestellt werden (vgl. Abbildung 31).

Die LDA wurde bei 13 der 22 Leukapheresen jeweils für die pBV 2, 4 und 6 durchgeführt.

Abbildung 28 stellt die Veränderung der Frequenz der LTC-IC bezogen auf die Leukozyten im Verlauf der LVL dar. Im Durchschnitt entfiel dabei im pBV 2 eine LTC-IC auf 118.753 Leukozyten, im pBV 4 kam auf 153.278 Leukozyten eine LTC-IC und im pBV 6 sogar nur eine LTC-IC auf 171.545 Leukozyten. Die Auswertung der LDA zeigte also, daß die Frequenz der LTC-IC im Laufe der LVL tendenziell eher abnahm; jedoch war diese Änderung nicht signifikant.

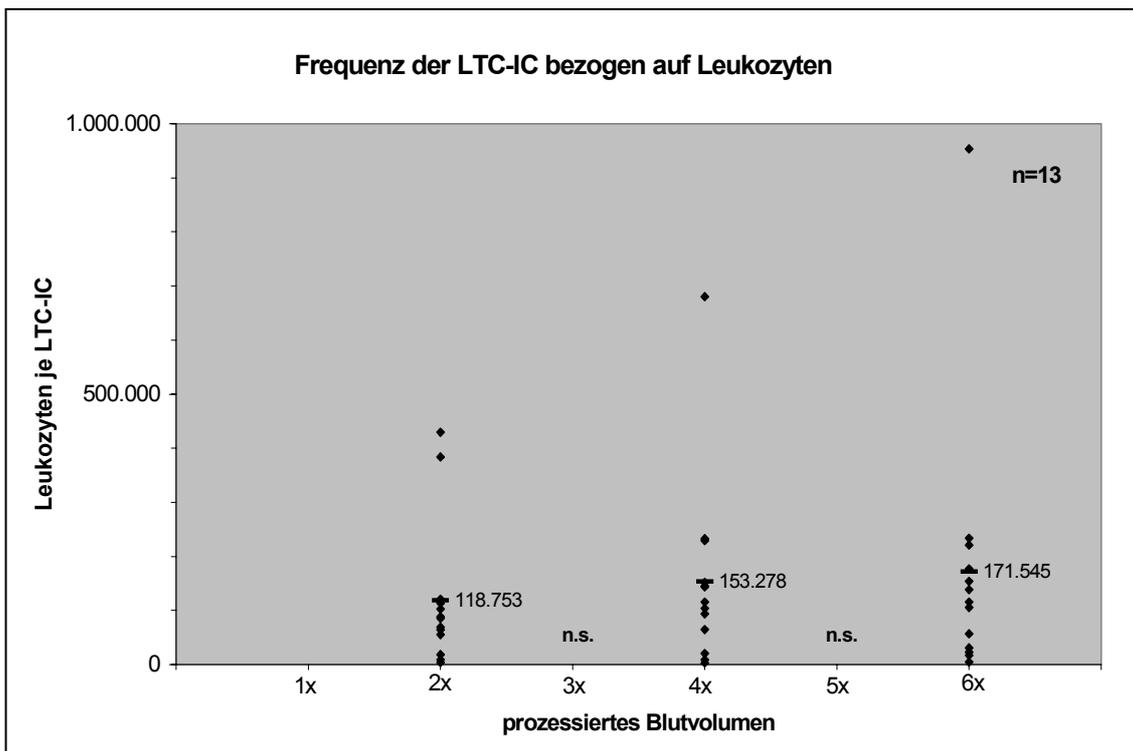


Abbildung 28: Frequenz der LTC-IC (bezogen auf Leukozyten)

Berechnet man aus diesen Werten die Anzahl der LTC-IC je pBV und bezieht die so ermittelten Werte auf das Gesamtprodukt (Abbildung 29), so bestätigt sich der in Abbildung 28 angedeutete Trend: Relativ zur Gesamtausbeute nahm der LTC-IC-Gehalt der pBV von 36,99% im pBV 2 über 33,20% im pBV 4 bis auf 29,81% im pBV 6 ab; das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde in keinem Fall erreicht.

Vergleicht man diese Tendenz mit den entsprechenden „Schätzwerten“ des LTC-IC-Assays bei genau denselben 13 Leukapheresen, so ergeben sich zwar zunächst wesentlich höhere absolute LTC-IC-Zahlen je pBV (Daten sind nicht abgebildet.): Im Mittel liegen die im LTC-IC-Assay bestimmten Werte knapp 50 Prozent über den in der LDA ermittelten Werten. Werden diese Daten jedoch wiederum als LTC-IC-Gehalt je pBV relativ zur Gesamtausbeute im Verlauf der Leukapherese dargestellt (Abbildung 30), so bestätigt sich die oben beschriebene tendenzielle Abnahme. Hier ist eine abfallende Tendenz von 38,5% im pBV 2 über 31,49% im pBV 4 auf 30% im pBV 6 zu verzeichnen. Auch diese Veränderungen waren nicht signifikant.

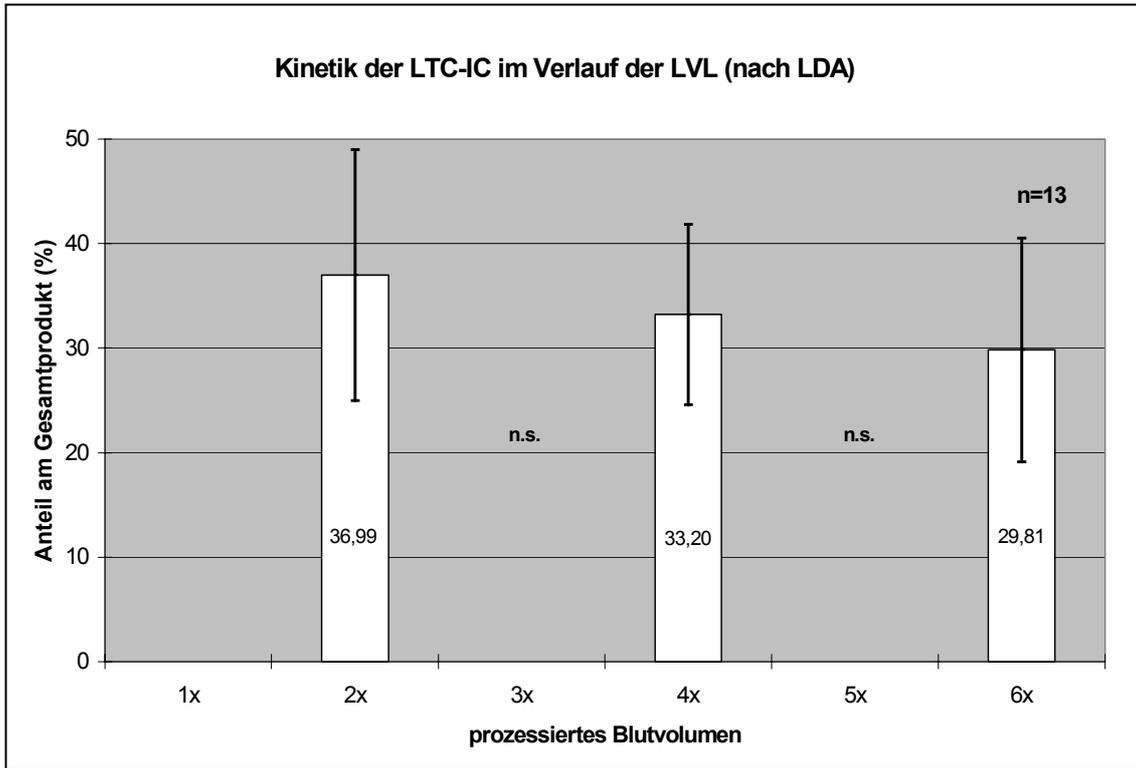


Abbildung 29: Kinetik der LTC-IC im Verlauf der LVL (relative Werte nach LDA)

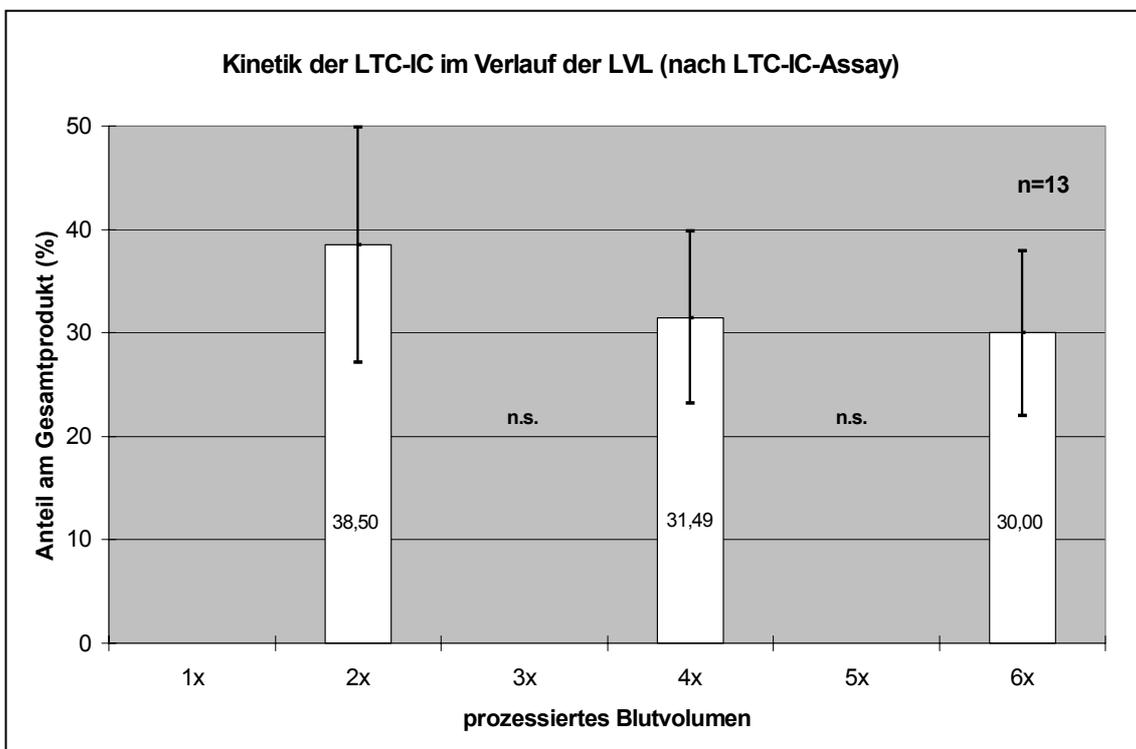


Abbildung 30: Kinetik der LTC-IC im Verlauf der LVL (relative Werte nach LTC-IC-Assay)

Für die in Abbildung 31 dargestellte Korrelationsanalyse zwischen der im normalen LTC-IC-Assay und in der LDA ermittelte Zahl von LTC-IC je pBV wurde eine logarithmische Darstellungsform gewählt, um die zum Teil erheblich schwankenden Einzelwerte übersichtlicher darzustellen. Die in der LDA ermittelten Werte wurden auf der Ordinate aufgetragen, da es sich hierbei um die valideren Werte handelt. Unter der Annahme, daß - wenn in der LDA keine Zellen nachweisbar sind - auch im LTC-IC-Assay kein Koloniewachstum festgestellt werden kann, wurde die Regressionsgerade durch den Nullpunkt gelegt. Die Herkunft der Einzelwerte aus den pBV 2, 4 bzw. 6 ist durch unterschiedliche Symbole kenntlich gemacht, wobei das Viereck für das pBV 2, der Kreis für das pBV 4 und das Dreieck für das pBV 6 stehen. Die einzelnen Leukapheresen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet.

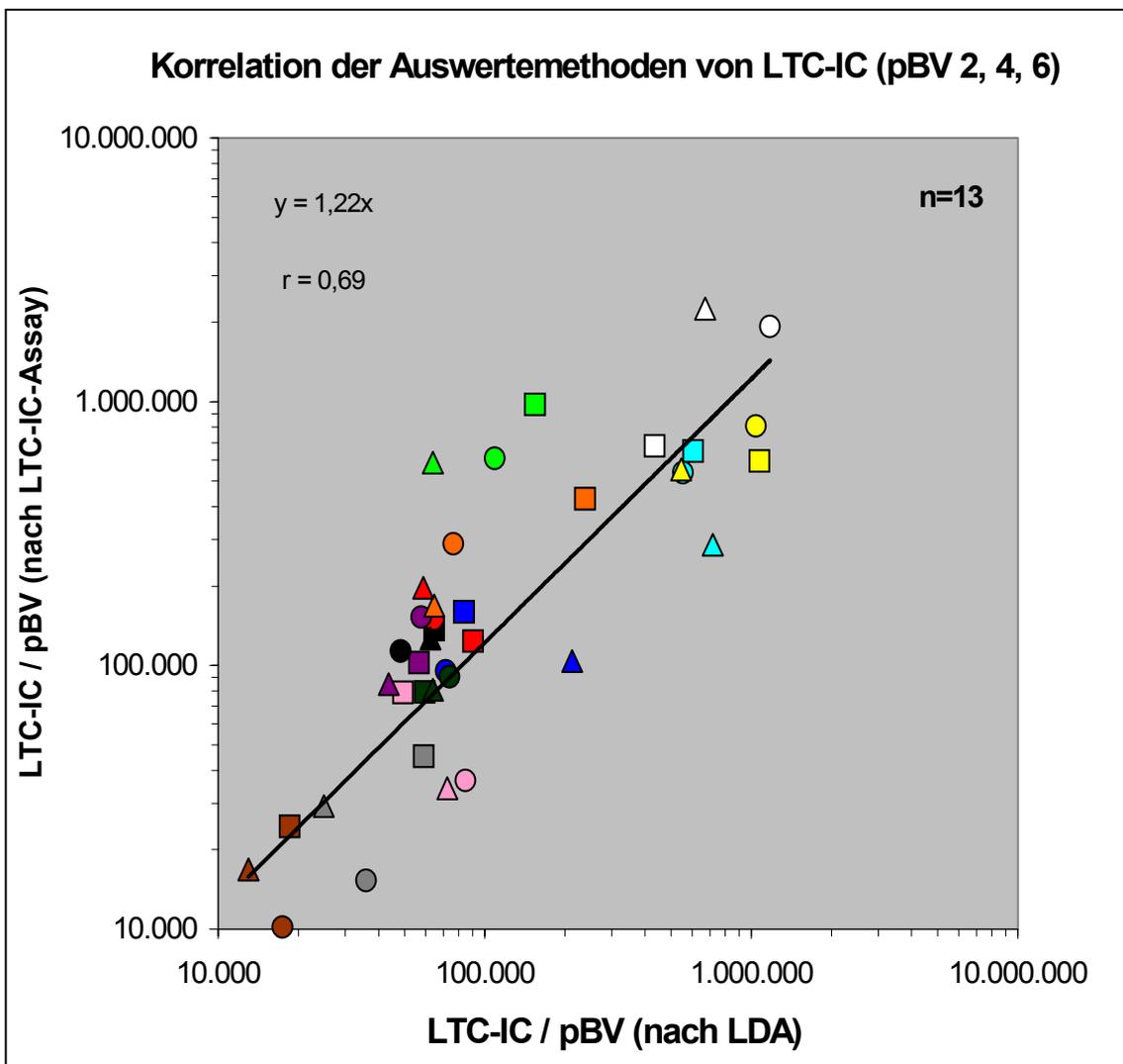


Abbildung 31: Korrelation der Auswertemethoden von LTC-IC

Der Korrelationskoeffizient betrug im Mittel für alle prozessierten Blutvolumina 0,69; im Einzelnen lag der Korrelationskoeffizient zwischen 0,39 im pBV 2 und 0,88 im pBV 4. Der Wert für das pBV 6 lag mit 0,65 dazwischen.

4.6. Ex-vivo Expansion

In Anlehnung an das von Brugger et al. publizierte Verfahren der ex-vivo Expansion wurden nach Aufreinigung der gewonnenen Proben durch Positivselektion und Zugabe des genannten Zytokincocktails Unterschiede in der Expandierbarkeit sowohl der Leukozyten- als auch der Koloniezahlen untersucht^{109 134 135}.

4.6.1. Reinheit nach CD34-Positivselektion

Die Aufreinigung der CD34⁺-Zellen wurde bei 20 der insgesamt 22 Leukapheresen durchgeführt.

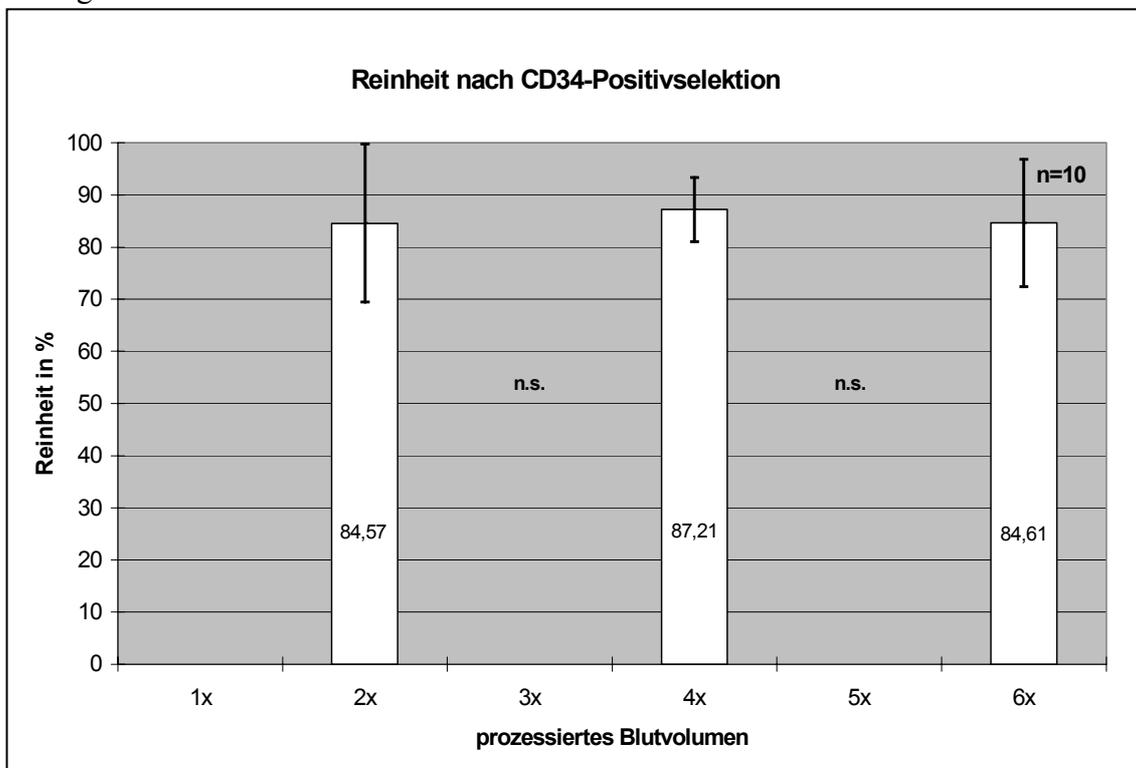


Abbildung 32: Reinheit nach CD34-Positivselektion

Berücksichtigt wurden aber letztendlich nur die zehn Fälle, bei denen der Expansionsassay sinnvoll ausgewertet werden konnte. Ausschlusskriterien bei der Auswertung waren u.a. mangelhafte Aufreinigung, fehlende Leukozytenvermehrung oder fehlendes Koloniewachstum.

Abbildung 32 zeigt die Unterschiede in der erzielten Reinheit nach Positivselektion im Verlauf der LVL: Die durchschnittlichen Reinheiten nach CD34-Positivselektion lagen zwischen 84,57% (pBV 2) und 87,21% (pBV 4). Der Mittelwert für das pBV 6 betrug 84,61%. Signifikante Unterschiede zwischen den erzielten Reinheiten in den prozessierten Blutvolumina 2, 4 und 6 fanden sich nicht.

4.6.2. Vitalität nach CD34-Positivselektion bzw. nach 14 Tagen Expansionsassay

Die Vitalität der Zellen sowohl unmittelbar nach Aufreinigung über die MACS-Säule als auch nach 14 Tagen Expansionsassay wurde durch Auszählen der avitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung durchgeführt.

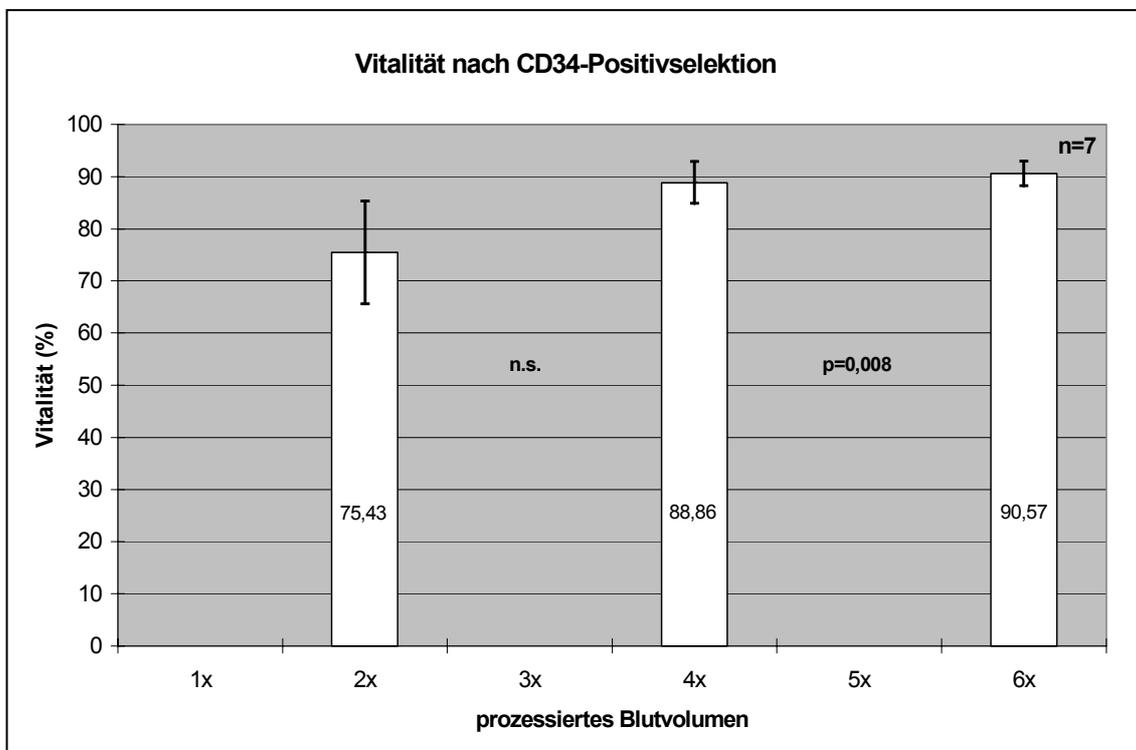


Abbildung 33: Vitalität nach CD34-Positivselektion

Abbildung 33 zeigt die Vitalität der aufgereinigten Zellen direkt nach der Positivselektion angegeben in Prozent im Verlauf der LVL. Auffällig beim Vergleich der Vitalitäten am Tag Null des Expansionsassays war die zunehmende Tendenz der Vitalitäten von 75,43% im pBV 2 über 88,86% im pBV 4 bis auf 90,57% im pBV 6. Die Zunahme der Vitalität vom pBV 2 zum pBV 6 erreichte mit $p=0,008$ das Signifikanzniveau.

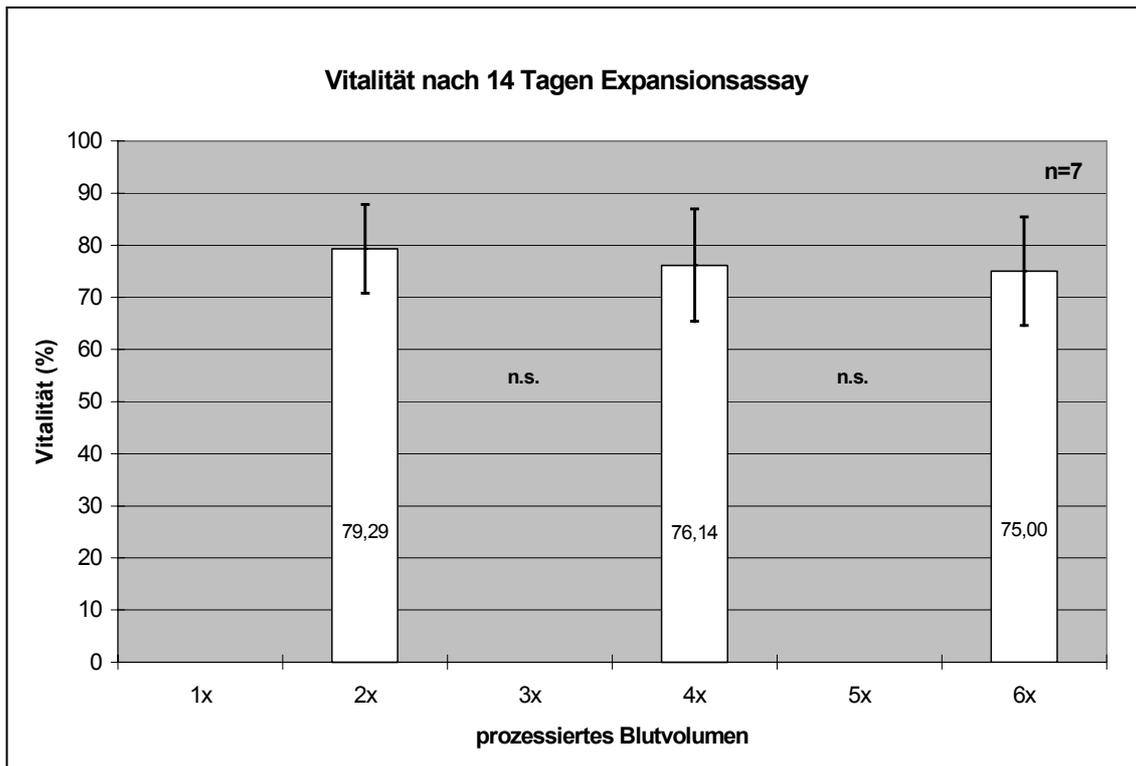


Abbildung 34: Vitalität nach 14 Tagen Expansionsassay

Abbildung 34 stellt die Vitalität der expandierten Zellen nach 14 Tagen Expansionsassay im Verlauf der LVL dar. Die Vitalität ist in Prozent angegeben. Nach 14 Tagen Expansion waren die Unterschiede in der Vitalität der Proben verschwunden. Die Vitalität zeigte vom pBV 2 mit 79,29% über das pBV 4 mit 76,14% bis zum pBV 6 mit 75% einen leicht abnehmenden Trend, diese Unterschiede waren indes nicht signifikant. Berücksichtigt wurden aus der Gesamtzahl (Tag Null $n=14$, Tag 14 $n=9$) nur die sieben Leukapheresen, in denen sowohl am Tag Null als auch am Tag 14 eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt wurde und in denen tatsächlich eine Expansion zu verzeichnen war.

4.6.3. Vermehrung der Leukozyten

Abbildung 35 stellt die Vermehrung der Leukozyten im Verlauf der LVL nach 14 Tagen Expansionsassay dar. Im Durchschnitt ließ sich die Zahl der Leukozyten aus den Proben, die aus dem pBV 2 gewonnenen wurden, um das 54-fache steigern; bei dem pBV 4 lag dieser Wert sogar bei dem 56-fachen des Ausgangswertes. Die Expandierbarkeit der Proben aus dem pBV 6 betrug dagegen nur das 48-fache des Ausgangswertes. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Im Einzelfall war ein Anstieg der Leukozytenzahlen zwischen dem fünf- und dem 135-fachen des Ausgangswertes zu verzeichnen.

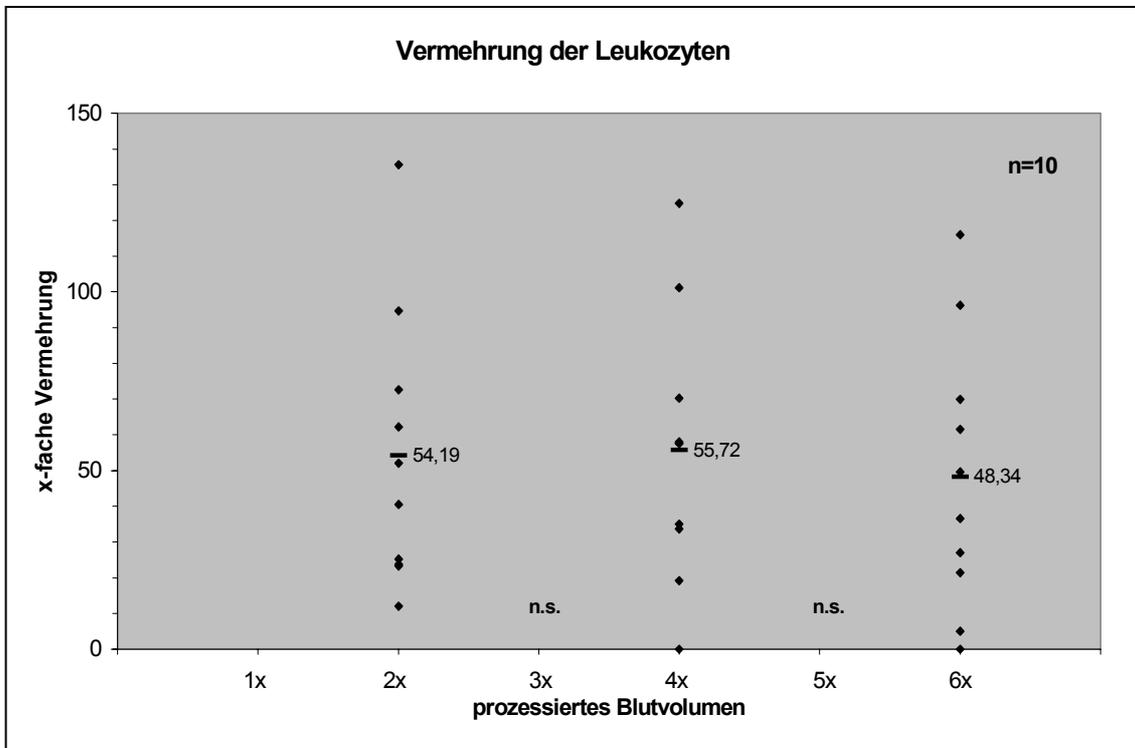


Abbildung 35: Vermehrung der Leukozyten

4.6.4. Vermehrung der Zahl der koloniebildenden Zellen

Abbildung 36 zeigt die Vermehrung der Zahl der koloniebildenden Zellen im Verlauf der LVL nach 14 Tagen Expansionsassay. Es wurden nicht die Absolutwerte für die

Ausbeute an koloniebildenden Zellen ermittelt, sondern der Faktor, um den die zum jeweiligen Zeitpunkt der LVL gewonnenen Progenitorzellen - bei annähernd gleicher Reinheit nach der Positivselektion - vermehrt werden konnten. Untersucht wurde nur die Expansionsfähigkeit gemessen an der Zu- bzw. Abnahme der Koloniezahl im Klonogenitätsassay der Tage Null und 14. Unberücksichtigt blieb, daß möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Leukapherese unterschiedlich viele Stammzellen in unterschiedlicher Zusammensetzung gewonnen wurden.

Von 17 Leukapheresen, in denen im Colony-Assay aus dem Tag Null der Expansion ein Koloniewachstum feststellbar war, wurden nur die zehn Fälle in der Auswertung berücksichtigt, bei denen auch noch nach 14 Tagen Expansion ein Koloniewachstum messbar war.

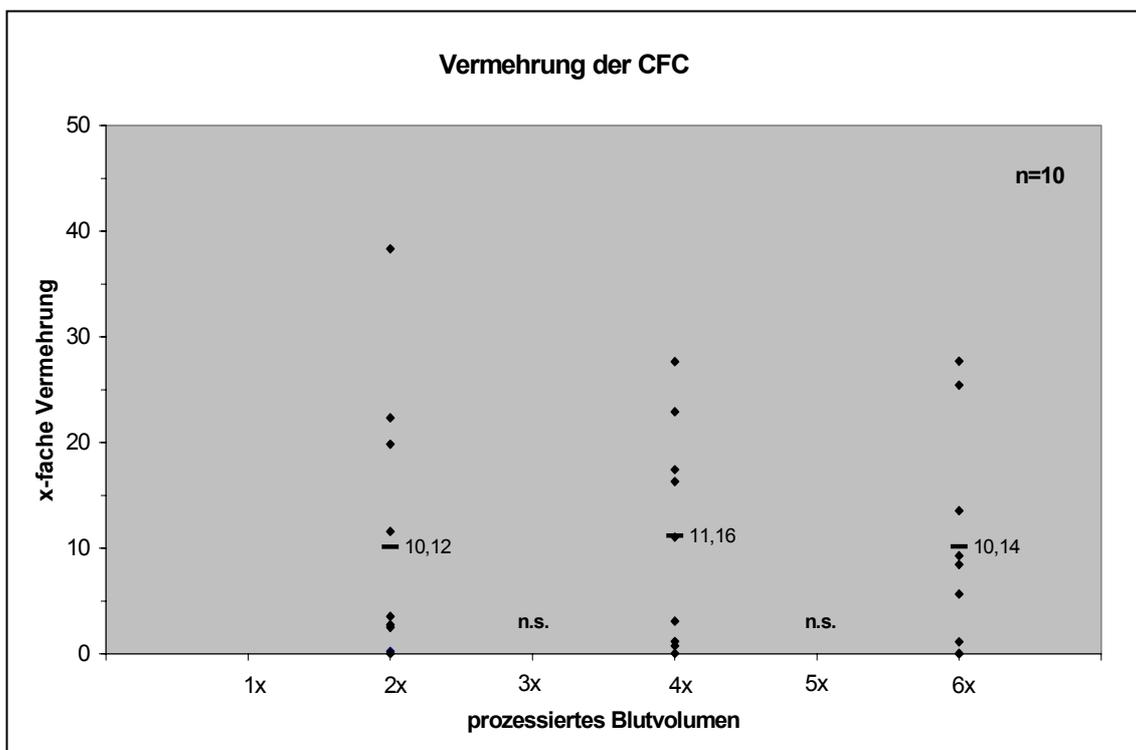


Abbildung 36: Vermehrung der Zahl der koloniebildenden Zellen

Am Tag Null lag die Zahl der koloniebildenden Zellen im Expansionsassay aus dem pBV 2 mit 7.628 CFC leicht über dem Wert vom pBV 4 mit 7.583 CFC. Den größten Anteil koloniebildender Zellen verzeichnete der Expansionsassay aus dem pBV 6 mit 8.156 CFC.

Nach 14 Tagen Expansion fanden sich mit 84.546 CFC die meisten koloniebildenden Zellen im Ansatz aus dem pBV 4. 78.860 CFC waren im Ansatz aus dem pBV 2

nachweisbar, der niedrigste Wert wurde mit 74.661 CFC pro Expansionsassay im Ansatz aus dem pBV 6 erreicht.

Weder die Unterschiede im Klonogenitätsassay am Tag Null noch am Tag 14 waren statistisch signifikant.

Daraus ergab sich insgesamt eine durchschnittliche Vermehrung der koloniebildenden Zellen von Tag Null bis Tag 14 um das Zehn- bis Elffache. Für die einzelnen prozessierten Blutvolumina konnten folgende Vermehrungen der CFC nachgewiesen werden: pBV 2 zehnfach, pBV 4 elffach, pBV 6 zehnfach.

Keiner der Unterschiede zwischen den pBV 2, 4 und 6 erreichte das Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

In Einzelfällen wurde eine Steigerung der Zahl der koloniebildenden Zellen auf das bis zu 38-fache des Ausgangswertes ebenso beobachtet wie gar keine Vermehrung bzw. sogar eine Abnahme der Zahl der koloniebildenden Zellen.

5. Diskussion

Die Transplantation peripherer Blutstammzellen hat in den vergangenen Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Dies ist insbesondere auf die kürzere Aplasiezeit und die leichtere Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut im Vergleich zum Knochenmark zurückzuführen. Als effizientes Verfahren zur Gewinnung von PBSZ hat sich in den letzten zehn Jahren die LVL etabliert.

Neben der Einführung von Wachstumsfaktoren, einer Verbesserung der Separationstechniken und der Durchführung der Apherese in immer früheren Phasen der malignen Erkrankung (möglichst ohne knochenmarkschädigende Vortherapie) ist das Large-volume Verfahren eine Möglichkeit, die Stammzellausbeute zu erhöhen.

Rationale für die weitere Ausdehnung des pBV war außerdem der häufig nur kurzzeitige Anstieg der CD34⁺-Zellen im peripheren Blut, der mit der Gefahr verbunden war, den optimalen Zeitpunkt für eine effiziente Stammzellsammlung zu verpassen (v.a. bei den sogenannten „poor mobilizern“)⁶⁹.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß eine Ausdehnung des Leukapheresevolumens auf das sechsfache Blutvolumen zu einer größeren Stammzellausbeute führt⁷¹. Die Ausbeute fiel zwar zum Ende der Apherese hin leicht ab; trotzdem konnte auch noch aus dem sechsten pBV eine nennenswerte Anzahl an Stammzellen gewonnen werden. Der parallel dazu untersuchte Stammzellspiegel im peripheren Blut nahm ebenfalls ab, erschöpfte sich aber nicht vollständig. Dies ist ein Hinweis darauf, daß - induziert durch die G-CSF-Gabe - Stammzellen kontinuierlich freigesetzt werden. Zu einem überproportionalen „Stammzellrecruitment“ durch die Apherese selbst liegen sehr kontroverse Daten vor^{60 64 71 118}. Cassens et al. konnten 2001 durch Etablierung einer - bezüglich Patientengut und Mobilisierungsschema vergleichbaren - Kontrollgruppe erstmals zeigen, daß ein „Stammzellrecruitment“ im peripheren Blut nach G-CSF-Applikation auch ohne Apherese nachweisbar ist⁷¹.

Eng verknüpft mit der Frage nach einem potentiellen „Recruitment“ ist die Frage nach dem genauen Mechanismus der Stammzellfreisetzung. Hier wird zur Zeit eher eine multifaktorielle Genese favorisiert.

Radiatio und Chemotherapie könnten allerdings - ebenso wie die Applikation von Wachstumsfaktoren - die Freisetzung sehr unterschiedlicher Stammzellkompartimente

bewirken. Genauso denkbar sind Veränderungen des Stammzellpools durch die Apherese selbst - im Sinne eines „Recruitments“ unterschiedlich primitiver Stammzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der LVL. Auch die erforderliche Antikoagulation im Rahmen der Apherese könnte einzelne Stammzellsubpopulationen in völlig unterschiedlicher Weise mobilisieren. Bisher ist allerdings keine dieser Einflußgrößen systematisch untersucht worden.

Zumindest die Frage nach der Freisetzung unterschiedlicher Stammzellkompartimente zu verschiedenen Zeitpunkten der LVL konnte mit dieser Studie beantwortet werden.

Um das Maximum der Stammzellfreisetzung mit der LVL sicher zu erfassen, erfolgte die G-CSF-Gabe in dieser Untersuchung zu einem definierten Zeitpunkt jeweils zwei Stunden vor Beginn der Leukapherese. Sowohl Fischer als auch Tanaka konnten zeigen, daß die Freisetzung von Stammzellen nach G-CSF-Mobilisierung einer ansteigenden Kinetik folgt und ungefähr vier Stunden nach G-CSF-Applikation ihr Maximum erreicht, um dann im weiteren Verlauf wieder langsam abzufallen^{120 137}.

Mit Hilfe der PBSZT ist heute eine erfolgreiche (zumindest zeitweilige) Regeneration der Hämatopoese nach ablativer Chemo-/Radio-Therapie sicher möglich. Sammel-effizienz und Patientenverträglichkeit der dafür notwendigen LVL sind erwiesen.

Allerdings fehlt bisher noch der endgültige Nachweis eines dauerhaften Langzeit-Engraftments der peripheren Blutstammzelltransplantate, da bisher maximal ein Zeitraum von etwa zehn Jahren überblickt werden kann.

Auch der Einfluß der relativen Zusammensetzung der Subpopulationen des Kompartimentes der CD34⁺-Zellen auf die Regenerationszeit nach Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation ist umstritten. Während Stewart et al. 1995 vor allem über den Oberflächenmarker CD90 nachzuweisen versuchten, daß Stammzellpräparate im Vergleich zu Knochenmark mehr pluripotente hämatopoetische Stammzellen enthalten und so besonders den Langzeiterfolg eines Transplantates sichern, postulierten Dercksen et al. ebenfalls 1995, daß Stammzellpräparate besonders reich an bereits differenzierten Vorläuferzellen sind und ebendiese Zusammensetzung eine beschleunigte Regeneration der Hämatopoese erklären könne^{138 139}. Diese Ansicht hatten Juttner et al. bereits 1985 vertreten¹¹. Möglicherweise ist die Ursache für eine schnellere

Regeneration aber auch ganz einfach in der höheren Zellzahl, die im Rahmen einer Stammzelltransplantation transplantiert wird, zu suchen.

Aus den oben genannten Gründen ist es wichtig sicherzustellen, daß jedes Stammzelltransplantat neben den differenzierten Progenitoren zur kurzfristigen Überwindung der Aplasiaphase auch ausreichend pluripotente Stammzellen für ein Langzeit-Engraftment enthält - wobei zur Zeit nicht endgültig festgelegt werden kann, wieviele und welche Zellen dafür tatsächlich erforderlich sind.

Bezogen auf die LVL bedeutet dies, daß sichergestellt werden muß, daß auch die Prozessierung des sechsten Blutvolumens noch ausreichend frühe Stammzellen liefert. Deshalb ist es wichtig, periphere Blutstammzelltransplantate näher zu charakterisieren und mögliche Unterschiede in der Kinetik einzelner Stammzellsubpopulationen im Laufe der LVL aufzuzeigen. Nachdem bereits 1996 Murea et al. in einer Untersuchung mit 19 Patienten bzw. 1997 Kobbe et al. in einer Untersuchung bei vier gesunden Spendern über Subsetanalysen erste Erkenntnisse zu dieser Fragestellung lieferten, wurde in der vorliegenden Studie erstmals systematisch untersucht, welche Stammzellkompartimente im Verlauf der LVL gesammelt werden^{61 150}.

Es ist von großer klinischer Relevanz, ob zu Beginn der LVL v.a. differenzierte Progenitoren und zum Ende - d.h. nach Prozessierung des fünf- oder sechsfachen Blutvolumens - eher pluripotente Stammzellen gewonnen werden können. Dies wäre eine Variante des „Recruitment“-Phänomens in dem Sinne, daß erst durch das Abschöpfen von Stammzellen durch die Apherese selbst die Ausschüttung weiterer sehr früher Zellen der Hämatopoese ins periphere Blut initiiert wird. Eine weitere Ausweitung der Leukapherese wäre dann besonders sinnvoll.

Genau der umgekehrte Fall würde eine Ausdehnung des Leukapheresevolumens in Form der LVL eher in Frage stellen.

Ein schnelles und dauerhaftes Engraftment nach PBSZT kann nur durch die optimale Anzahl und Zusammensetzung der transplantierten Stammzellen erreicht werden. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung bereits differenzierter klonogener Zellen im Stammzellprodukt würde ein Langzeit-Engraftment somit eher unwahrscheinlich machen.

Denkbar wäre allerdings auch die Gewinnung verschiedener Transplantationseinheiten im Laufe der LVL zu jeweils unterschiedlichen Zwecken: Die Transplantationseinheit

aus den ersten beiden pBV könnte möglicherweise überwiegend klonogene Progenitoren enthalten, während die Einheit aus dem fünften und sechsten pBV in erster Linie pluripotente Stammzellen enthielte. Auf diesem Wege ließen sich für den jeweiligen Bedarf „maßgeschneiderte“ Stammzellprodukte herstellen: Die Transplantationseinheit aus dem ersten und zweiten pBV wäre z.B. zur Überwindung bzw. Verkürzung einer kurzfristigen Aplasiephase nach milder Chemotherapie ohne dauerhafte Schädigung der Hämatopoese geeignet, während das Produkt aus dem fünften und sechsten pBV als Ergänzung bzw. Aufwertung eines möglicherweise für ein Langzeit-Engraftment nicht ausreichenden Stammzelltransplantates dienen könnte.

Bereits seit Anfang der 90er Jahre sind durchflußzytometrische Subpopulationsanalysen zur immunologischen Charakterisierung von Stammzellen vermehrt Gegenstand der Forschung. Haas et al. untersuchten 1993 die Zusammensetzung des Kompartimentes der CD34⁺-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zum Knochenmark⁸⁵. Dabei bestimmten sie die unterschiedliche Expression früher Oberflächenmarker wie CD90 und CD117 bzw. das Fehlen des HLA-DR-Antigens im Stammzellprodukt und im Knochenmarkaspirat.

Fritsch et al. interessierten sich 1994 v.a. für den Anteil CD34⁺/CD38⁻-Zellen am Pool der CD34⁺-Zellen in Blut und Knochenmark¹⁴⁰.

Bender nutzte die Durchflußzytometrie 1992, um eher zellinienspezifische Untergruppen der CD34⁺-Zellen zu definieren (CD33, CD13, CD10, CD19, CD45RA, CD71)¹⁴¹.

Auch funktionelle Testverfahren wie der Klonogenitätsassay wurden zur Charakterisierung der Stammzellen im Verlauf der LVL bereits herangezogen:

Hillyer et al. zeigten 1992 bei sieben gesunden Spendern während einer LVL über vier Stunden ein „Recruitment“ der CD34⁺-Zellen und der CFU-GM⁶⁴. Im Verlauf der LVL wurden jeweils nach einer, zwei, drei und vier Stunden Proben entnommen und aufgearbeitet.

LTC-IC-Assay bzw. LDA werden in der vorliegenden Studie jedoch erstmals zur Bestimmung der Kinetik pluripotenter Stammzellen im Verlauf der LVL herangezogen. Der Frage nach einer unterschiedlichen Expandierbarkeit des sequentiell gewonnenen Apherisates zu verschiedenen Zeitpunkten der LVL wurde ebenfalls noch nie weiter nachgegangen.

Erst die Kombination morphologischer Analysen mit diesen drei funktionellen Untersuchungsverfahren sollte den gewünschten Erkenntniszuwachs bringen; bestimmte Tendenzen in mehreren Untersuchungen sollten deren Plausibilität unterstreichen. Ansonsten hätte eventuell schon die weit weniger aufwendige Bestimmung der Subpopulationsfrequenzen als Versuchsansatz ausgereicht.

Nach der sequentiellen Sammlung und Charakterisierung der gewonnenen Stammzellen zu sechs verschiedenen Zeitpunkten der Leukapherese sind jetzt erstmals genaue Aussagen über die Kinetik der verschiedenen Subpopulationen der CD34⁺-Zellen und etwaige Änderungen in der Zusammensetzung des Stammzellpools über die Zeit möglich.

Mit Hilfe sowohl immunologischer als auch funktioneller Testverfahren konnte in der vorliegenden Untersuchung erstmals gezeigt werden, daß zu jedem Zeitpunkt der LVL nicht nur bereits differenzierte, sondern auch frühe, pluripotente Stammzellen im Apherisat nachweisbar sind. Eine Änderung in der Zusammensetzung des Stammzellpools während der LVL war nicht nachweisbar.

Insgesamt zeichnete sich der Trend ab, daß die Stammzellausbeute - unabhängig von der untersuchten Subpopulation - zum Ende der Apherese hin geringgradig abfiel. Allerdings erreichte diese Veränderung das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht.

Hinweise dafür, daß die LVL selbst zu einer vermehrten Ausschüttung („Recruitment“) von Stammzellen - welchen Differenzierungsgrades auch immer - führen könnte, fanden sich bei fehlendem Anstieg der Stammzellausbeute folglich nicht.

Für die Änderung der Stammzellausbeute im Verlauf der LVL verantwortlich war kein anderer Mechanismus als die pharmakodynamische Veränderung der CD34⁺-Zellen im Blut nach G-CSF-Gabe.

Bei gleichartigen Aphereseparametern entsprach die Kinetik der CD34⁺-Zellen im wesentlichen den von Cassens et al. gefundenen Daten⁷¹: Im Verlauf der LVL zeigte der Anteil der CD34⁺-Zellen an den Leukozyten eine abfallende Tendenz, jedoch war keine dieser Veränderungen signifikant.

Neue Erkenntnisse lieferten dagegen insbesondere die durchflußzytometrischen Subpopulationsanalysen der CD34⁺-Zellen:

Sowohl frühe pluripotente Stammzellen als auch bereits differenzierte Vorläuferzellen exprimieren das CD34-Antigen. CD34⁺-Zellen stellen jedoch nicht nur bezüglich ihrer Funktion und Differenzierung sondern auch bezüglich ihrer Oberflächenmarker eine heterogene Gruppe dar. Dies macht man sich bei der Differenzierung des Kompartimentes der CD34⁺-Zellen in Subpopulationen mit Hilfe monoklonaler Antikörper zunutze.

Sowohl die fehlende Expression von CD38 als auch von HLA-DR auf CD34⁺-Zellen gelten als Hinweis auf das Vorliegen primitiver Stammzellen. Was den Anteil primitiver Stammzellen betrifft, so konnte Rusten jedoch 1994 zeigen, daß es quantitative Unterschiede zwischen beiden Subpopulationen gibt¹⁴²: Die CD34⁺/CD38⁻-Zellen repräsentieren eine homogenere Gruppe von Zellen als die CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen; sie enthalten einen höheren Anteil der funktionell primitivsten derzeit nachweisbaren Stammzellen, der LTC-IC, wohingegen die Gruppe der CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen mehr erythroide Vorläuferzellen (BFU-E) enthält. Zwischen beiden Subpopulationen primitiver Vorläuferzellen scheint es nur eine geringe Überlappung zu geben, nur 12 bis 14 Prozent der CD34⁺/CD38⁻ bzw. der CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen sind doppelt negativ (CD34⁺/CD38⁻/HLA-DR⁻).

Maximal fünf Prozent der CD34⁺-Zellen im Knochenmark bzw. in Stammzelltransplantaten gewonnen aus dem peripheren Blut nach Mobilisation sind laut Literaturangaben CD34⁺/CD38⁻, während die Angaben über das Vorkommen CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen im Knochenmark je nach Autor zwischen zweieinhalb und 25 Prozent schwanken^{140 143 144 145}. In unserer Untersuchung lag der Anteil CD34⁺/CD38⁻-Zellen zwischen 0,23 und 13,88 Prozent.

Wenn man die gewonnenen PBSZ aus der LVL in zwei gleichartige Hälften aufteilen würde, dann wäre ein leicht ansteigender Trend von frühen Phasen der LVL zum Ende hin feststellbar (relativer Anteil am Gesamtprodukt pBV 1-3: 46,96% versus pBV 4-6: 53,04%). Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant.

HLA-DR und CD38 sind Aktivierungsantigene^{146 147}. Es ist bekannt, daß nach Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowohl das HLA-DR- als auch das CD38-Antigen auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Erwiesenermaßen können z.B. Zellseparationen

den Aktivierungsgrad von Zellen beeinflussen. Gutensohn et al. konnten dies 1997 z.B. für die Thrombozyten zeigen^{148 149}.

Die scheinbare Zunahme des Anteils CD34⁺/CD38⁻-Zellen gegen Ende der Leukapherese könnte durch eine stärkere Aktivierung der Zellen in den ersten drei pBV gegenüber den letzten drei pBV erklärbar sein.

Da die letzten drei pBV aber bis zu sechsmal durch den Zellseparator gelaufen sind, ist im Hinblick auf die Gewinnung der Stammzellen die Annahme einer vermehrten Aktivierung der letzten drei pBV naheliegender. Neben einer vermehrten Aktivierung durch die Zellseparation ist aber auch eine Aktivierung durch eine längere Lagerung ohne Kühlung oder Plasmazusatz denkbar. Dies träfe in erster Linie auf die ersten drei pBV zu.

Die Mehrzahl der FACS-Analysen (n=14) mußte am Ende des gesamten Untersuchungsganges durchgeführt werden. Durch die vielfältigen vorherigen experimentellen Tätigkeiten waren die Zellen des ersten pBV zu diesem Zeitpunkt etwa 20 Stunden alt, die Zellen des sechsten pBV etwa 14 Stunden. Dieser Zeitraum ließ sich aus versuchstechnischen Gründen nicht weiter verkürzen, da zunächst der Ansatz der funktionellen Analysen (LTC-IC-Assay, LDA, Ex-vivo Expansion) erfolgen mußte.

Bei einer Aktivierung würde die CD38-Expression wahrscheinlich entsprechend dem Mechanismus bei der Differenzierung der CD34⁺-Zellen zunehmen¹⁴³. Dies würde eine Zunahme der CD34⁺/CD38⁺-Zellpopulation zu Beginn der LVL bedeuten und damit umgekehrt den geringeren Anteil an CD34⁺/CD38⁻-Zellen erklären. Gegen Ende der Leukapherese scheint dieser Mechanismus keine so große Rolle mehr zu spielen; der Anteil CD34⁺/CD38⁻-Zellen nimmt zu.

In einer als Kontrolle geschaffenen Gruppe (n=6) wurde die FACS-Analyse direkt am Anfang des Untersuchungsganges durchgeführt. Hier fand sich der oben erwähnte ansteigende Trend von pBV 1-3 zu pBV 4-6 nicht wieder.

Eine ähnliche Kinetik wie die CD34⁺/CD38⁻-Zellen zeigen auch die CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen: Diese Subpopulation charakterisiert ebenfalls primitivere Stammzellen, wenn auch nicht in der Quantität wie das Kompartiment der CD34⁺/CD38⁻-Zellen. Der Anteil der CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen lag zwischen 0,29 und 9,73 Prozent. Auch hier fand sich

ein leicht ansteigender Trend von der ersten (49,16%) zur zweiten Hälfte der LVL (pBV 4-6: 50,84%), wenngleich diese Veränderung das geforderte Signifikanzniveau ebenfalls nicht erreichte.

Separate Analysen der FACS-Messung zu Beginn bzw. zum Ende des Untersuchungs-ganges lieferten in diesem Fall keine zusätzlichen Erkenntnisse.

Für die Subpopulationsanalysen der CD34⁺/CD38⁻ bzw. CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen er-gaben sich aus statistischen Gründen Grenzen der Bestimmbarkeit so seltener Ereig-nisse: Bei einem durchschnittlichen Anteil CD34⁺-Zellen von etwa zwei Prozent und der FACS-Analyse von 100.000 Leukozyten bleiben zur Auswertung 40 Zellen (bei einem Anteil CD34⁺/CD38⁻ bzw. CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen von ebenfalls etwa zwei Prozent). Sind bei der Analyse der CD34⁺-Zellen noch 1.000 Zellen erforderlich, um eine einprozentige Veränderung zu bewirken, so reichen dafür bei der Analyse der CD34⁺/CD38⁻ bzw. CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen schon 20 Zellen, also 1/50, aus.

Eine genaue Bewertung der Streuung dieser Daten ermöglicht z.B. der Variationskoeffizient; er setzt die Standardabweichung in Beziehung zum Mittelwert. Der Varia-tionskoeffizient für die CD34⁺/CD38⁻ bzw. für die CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen lag etwa bei 44%. Eine Auszählung noch größerer Zellzahlen war aus Material- und Zeitgründen aber nicht möglich.

Weniger anfällig - weil in höherer Frequenz vorkommend - gestaltete sich die Subpopu-lationsanalyse der CD34⁺/CD90⁺ bzw. CD34⁺/CD117⁺-Zellen. Hier lag der Variationskoeffizient bei 27 bzw. 24 Prozent.

Craig et al. konnten 1993 für Knochenmarkpräparate zeigen, daß die Untergruppe der CD34⁺/CD90⁺-Zellen, die etwa 25 Prozent der CD34⁺-Zellen ausmacht, eine starke Anreicherung phänotypisch und funktionell sehr primitiver Vorläuferzellen zeigt (stark angereichert für LTC-IC, mit geringem Anteil an koloniebildenden Zellen)⁸⁶. Thy-1-Expression war nach ihren Erkenntnissen begrenzt auf Zellen, die mittlere bis niedrigere Werte für c-kit-ligand-Expression aufwiesen. Daraus folgerte die Arbeitsgruppe, daß primitive Stammzellen nur in geringem Maße c-kit-ligand exprimieren. Die höchste CD90-Expression fand sich in der Gruppe der CD34⁺/CD38⁻-Zellen und nahm mit zunehmender CD38-Expression ab. Die Thy-1-Expression sinkt also mit zunehmendem

Differenzierungsgrad. Insofern schien Thy-1 ein sinnvoller Marker bei der Suche nach der primitivsten menschlichen Stammzelle zu sein. Craig sah außerdem einen Zusammenhang zwischen T-Zell-Aktivierung und Thy-1-Expression¹⁵⁰.

Im Vergleich dazu hatte eine Studie von Baum et al. mit fetalem Knochenmark ein Jahr zuvor wesentlich niedrigere Werte für CD34⁺/CD90⁺-Zellen ergeben, nämlich nur fünf Prozent⁸⁸.

Steward et al. dagegen konnten das CD90-Antigen sogar in einer Frequenz von bis zu 77 Prozent auf den CD34⁺-Zellen im peripheren Blut nachweisen¹³⁸.

Haas und Möhle wiesen 1995 auf Unterschiede in der Thy-1-Expression zwischen Knochenmark und Stammzellpräparaten aus dem peripheren Blut hin⁸⁵. Sie fanden im Leukapherisat einen Anteil CD34⁺/CD90⁺-Zellen von im Median 24,4 Prozent (0,6-49,6%) im Vergleich zum Knochenmark, wo der Median bei 14,4 Prozent lag. Die Tatsache, daß die Thy-1-Expression in der Regel mit niedriger oder fehlender HLA-DR-Expression verbunden war, wurde als weiterer Hinweis für den primitiven Charakter der CD34⁺/CD90⁺-Zellen gewertet.

Die Koexpression von c-kit-ligand auf CD34⁺-Zellen stand nach ihren Untersuchungen in umgekehrtem Verhältnis zur CD90-Expression: Der Anteil CD34⁺/CD117⁺-Zellen ist im Knochenmark (Median 31%) wesentlich höher als im Leukapherisat (20,5%), wobei im Leukapherisat die Einzelwerte zwischen 4,1 und 100 Prozent extrem schwankten.

Überwiegend CD34⁺/HLA-DR⁺-Zellen coexprimieren c-kit-ligand. Das ist ein Indiz dafür, daß CD117-exprimierende Zellen in der Regel zellinienspezifisch sind und damit wahrscheinlich nicht den Weg zur primitivsten pluripotenten Stammzelle weisen. Haas und Möhle fanden in ihren Untersuchungen Hinweise dafür, daß periphere Blutstammzelltransplantate nach Mobilisierung mit Cyclophosphamid und G-CSF einen höheren Anteil pluripotenter Stammzellen beherbergen als das Knochenmark. Sie zogen daraus bereits 1995 den Schluß, daß sich das periphere Blut als Stammzellquelle gegenüber dem Knochenmark durchsetzen würde. Außerdem vertraten sie die Auffassung, daß die CD34⁺/CD90⁺-Zellen als pluripotente Stammzellen für potentielle gentherapeutische Ansätze geeignet seien.

Humeau et al. sahen dies ein Jahr später etwas anders¹²⁴: Sie hielten die Charakterisierung der CD34⁺/CD90⁺-Subpopulation für inkomplett und wiesen für PBSZ nach, daß die Thy-1-Expression nur noch mit einer begrenzten Differenzierungsfähigkeit in

Richtung der erythroiden Reihe einhergeht (ablesbar an der niedrigen Frequenz der BFU-E und der niedrigen bzw. fehlenden c-kit-ligand-Expression). Ausgehend von dem hohen Anteil CD34⁺/CD90⁺-Zellen, der einen homogenen Zelltyp schon sehr unwahrscheinlich machte, wiesen sie auf eine sowohl phänotypisch als auch funktionell begründete Heterogenität der CD34⁺/CD90⁺-Zellen hin. Im Gegensatz dazu stellt die Gruppe der CD34⁺/CD38⁻-Zellen eine ziemlich homogene Population unreifer Vorläuferzellen dar. Daher hielten sie die Auswahl der CD34⁺/CD90⁺-Zellen nicht für die effizienteste Strategie zur Charakterisierung primitiver menschlicher Stammzellen. Auch von der Verwendung in Gentherapie-Programmen, die auf die Korrektur von Gendefekten in der erythroiden Reihe abzielen, rieten sie ab. In ihrer Untersuchung exprimierten etwa neun Prozent der CD34⁺-Zellen das CD90-Antigen.

Über die Frequenz der c-kit-ligand-Expression und deren Vorkommen auf primitivsten Stammzellen lassen sich - wie oben bereits angedeutet - sehr unterschiedliche Angaben in der Literatur finden. Die Anwesenheit von c-kit-ligand auf frühesten Vorläuferzellen wurde ebenso beschrieben wie das besonders häufige Vorkommen auf zelllinien-spezifischen erythroiden Vorläufern, wobei die Rolle des CD117-Antigens auf unreifen Vorläuferzellen bisher nur wenig beleuchtet wurde. Macedo et al. wiesen 1995 CD117 auf 60 ± 26,8 Prozent aller CD34⁺-Zellen im Knochenmark nach¹⁵¹.

In unserer Untersuchung lag der Anteil c-kit-ligand-exprimierender Zellen an den CD34⁺-Zellen bei etwa 80 Prozent; der Anteil CD34⁺/CD90⁺-Zellen lag im Mittel bei knapp unter 50 Prozent.

Diese Ergebnisse liegen höher als die Daten der oben genannten Autoren, auch wenn in Einzelfällen durchaus solche Werte beschrieben wurden. Unterschiede im Anteil sowohl der CD34⁺/CD90⁺ als auch der CD34⁺/CD117⁺-Zellen könnten z.B. durch ein unterschiedliches Patientenkollektiv, Unterschiede im Mobilisierungsregime und auch durch Unterschiede im Zeitraum zwischen Mobilisierung und LVL begründet sein. Außerdem wurden die beschriebenen Studien mit unterschiedlichen Antikörperklonen durchgeführt.

Es läßt sich allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, daß ein so hoher Anteil CD34⁺/CD90⁺-Zellen die Annahme relativiert, es handele sich hier um eine homogene Population, die nur früheste Vorläuferzellen enthalte. Die von Humeau 1996 nachgewiesene Abwesenheit der c-kit-ligand-Expression in der CD34⁺/CD90⁺-Population

konnte die vorliegende Untersuchung ebenfalls nicht bestätigen. Bei einem Anteil der CD34⁺/CD90⁺-Zellen von knapp 50 Prozent und einem Anteil der CD34⁺/CD117⁺-Zellen von um die 80 Prozent muß zumindest eine geringe Überschneidung beider Oberflächenmarker vorhanden sein.

Bei der Analyse der Kinetik der CD34⁺/CD90⁺-Zellen im Verlauf der LVL findet sich eine abnehmende Tendenz des Anteils CD90-exprimierender Zellen gegen Ende der LVL (pBV 1-3: 52,79% versus pBV 4-6: 47,21%). Diese Veränderung ist nicht signifikant. Außerdem sieht es so aus, als ob der Anteil der CD34⁺/CD90⁺-Zellen umso höher gewesen wäre, je später die FACS-Messung durchgeführt wurde. Dies mag z.B. in der Zunahme der unspezifischen Bindungen begründet gewesen sein.

Der Anteil CD34⁺/CD117⁺-Zellen zeigte im Verlauf der LVL ebenfalls eine leicht abnehmende Tendenz (pBV 1-3: 51,07% versus pBV 4-6: 48,93%); auch diese Veränderung war nicht signifikant. Eine Abhängigkeit des Anteils der CD34⁺/CD117⁺-Zellen vom Zeitpunkt der FACS-Messung im Versuchsaufbau ließ sich nicht feststellen.

In einer ähnlichen Untersuchung hatten Murea et al. 1995 bei 27 LVL jeweils nach zehn und nach zwanzig Litern prozessiertem Blutvolumen Subpopulationsanalysen durchgeführt. Bei postuliertem „Stammzellrecruitment“ trat eine signifikante Veränderung in der Zusammensetzung der Entwicklungsstufen der Hämatopoese im Verlauf der LVL nicht auf⁶¹. Untersucht wurde u.a. die Expression von CD90, CD117 und CD38 auf CD34⁺-Zellen. Murea et al. vermuteten daraufhin, daß die Geschwindigkeit der Regeneration der Hämatopoese nicht von der Art des Produktes (LVL versus Standard-Leukapherese) abhängt, sondern von der Menge der transplantierten CD34⁺-Zellen⁶¹.

Ähnliche Ergebnisse bei ebenfalls nicht standardisierten Blutvolumina erzielten Kobbe et al. 1996 in sechs durchflußzytometrischen Subpopulationsanalysen bei vier gesunden Spendern¹⁵². Sie zeigten, daß die Zusammensetzung des Kompartiments der CD34⁺-Zellen über eine vier Stunden dauernde LVL konstant bleibt. Der relative Anteil gewonnener Subpopulationen war unabhängig vom Zeitabschnitt der Leukapherese. Untersucht wurde die Expression von CD38, HLA-DR und CD33 auf der Oberfläche CD34⁺-Zellen. Im Durchschnitt wurde das dreieinhalbfache Blutvolumen prozessiert, die Analysen erfolgten jeweils nach 33%, 66% und 100% des zu erwartenden Apheresevolumens. Auch diese Ergebnisse sprachen eher gegen eine vermehrte Freisetzung besonders primitiver bzw. zellinienspezifischer Progenitorzellen im Laufe der LVL.

Allerdings war die Fallzahl zu begrenzt, um weitreichende Schlußfolgerungen zu ziehen.

In der vorliegenden Studie wurden darüberhinaus differenzierte und primitive hämatopoetische Stammzellen mit funktionellen Testverfahren (Kurz- und Langzeitkulturtechniken) bestimmt und im Verlauf der LVL quantifiziert.

Bei der Auswertung des Klonogenitätsassays fand sich erwartungsgemäß dieselbe Kinetik wie schon in der durchflußzytometrischen Bestimmung des Anteils der CD34⁺-Zellen^{48 90 153 154}. Diese Daten decken sich weitgehend mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie aus dem Institut für Transfusionsmedizin der WWU Münster. Geringgradige kinetische Abweichungen könnten sich z.B. durch niedrigere Fallzahlen ergeben oder aber mit dem Alter der untersuchten Zellen, d.h. dem Abstand zwischen Leukapherese und Versuchsansatz, zusammenhängen.

Für den LTC-IC-Assay und die LDA erfolgte der Versuchsansatz ebenfalls noch am Tag der LVL. Anschließend mußten die Kulturen fünf Wochen lang mit frischem Nährmedium versorgt werden, um sie dann - nach Ablösen des Stammzellmikrokosmos aus der Kulturschale mittels Trypsin - in den 14-tägigen Klonogenitätsassay zu überführen. Erst nach insgesamt sieben Wochen war eine Aussage über die Änderung der Zusammensetzung des Anteils primitivster Stammzellen (LTC-IC) im Verlauf der LVL möglich.

Das Verfahren wird wegen des enormen Zeit- und Materialaufwandes sicher niemals Eingang in den Routinebetrieb der die Stammzelltransplantation begleitenden Untersuchungsmethoden finden. Dennoch liefern die Ergebnisse dieser Untersuchung neue physiologische Erkenntnisse: Zu jedem Zeitpunkt der LVL können - neben den koloniebildenden Progenitoren - auch die derzeit als primitivste Stammzellen der Hämatopoese nachweisbaren LTC-IC gewonnen werden. Die Frequenz der LTC-IC bezogen auf Leukozyten lag dabei im Mittel zwischen einer LTC-IC auf 118.753 Leukozyten im pBV 2 und einer LTC-IC auf 171.545 Leukozyten im pBV 6. Dieser abnehmende Trend im Verlauf der LVL war jedoch nicht signifikant (vgl. Abbildung 28). Die ermittelten Frequenzen stimmen mit den von Sutherland und Eaves für das Knochenmark postulierten Werten überein (eine LTC-IC auf 20.000 Leukozyten), wenn man die

Untersuchungsergebnisse von Juttner et al. berücksichtigt, die nahelegen, daß im Leukapherisat aus dem peripheren Blut etwa zehnmal weniger pluripotente Stammzellen enthalten sind als im Knochenmark^{11 26 155}.

Die für die LTC-IC nachgewiesene Kinetik im Verlauf der LVL entspricht ziemlich genau jener der koloniebildenden Zellen in der Arbeit von Cassens et al.⁷¹: Nach Erreichen eines Maximums im pBV 2 fällt die Zahl der LTC-IC zum Ende der LVL geringgradig - aber nicht signifikant - ab. Der erneute ansteigende Trend im pBV 6 ist möglicherweise artifiziell, da diese Zellen am kürzesten ohne Kühlung gelagert wurden und daher am vitalsten sein dürften.

Zur Beurteilung einer signifikanten Verschiebung der Relation zwischen primitiven und differenzierten Stammzellen im Verlauf der LVL wurde in der vorliegenden Studie der Quotient aus LTC-IC und CD34⁺-Zellen je pBV gebildet.

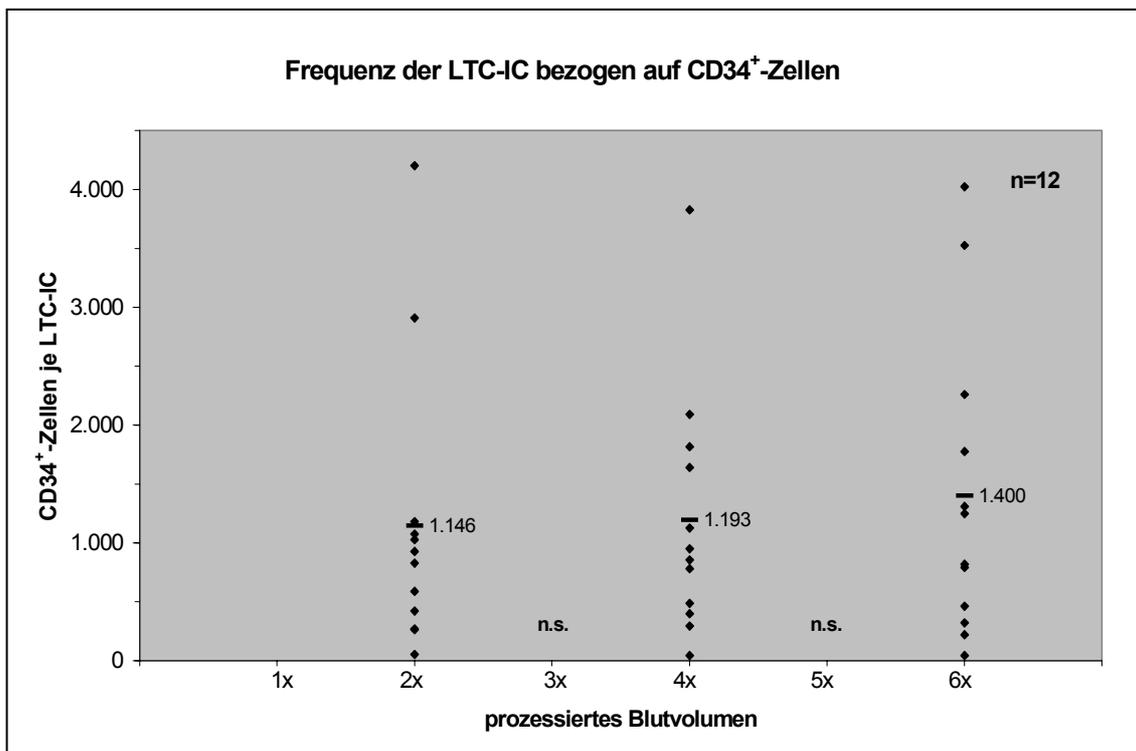


Abbildung 37: Frequenz der LTC-IC bezogen auf CD34⁺-Zellen

Abbildung 37 stellt die Frequenz der LTC-IC (ermittelt in der LDA) bezogen auf die CD34⁺-Zellen im Verlauf der LVL dar. Zwar deutet sich ein abnehmender Trend in der Häufigkeit der LTC-IC im Vergleich zu den CD34⁺-Zellen gegen Ende der LVL an, jedoch erreicht diese Veränderung keine statistische Signifikanz. Mit dem Nachweis,

daß sowohl differenzierte Progenitoren als auch pluripotente Stammzellen zu jedem Zeitpunkt der LVL in gleichen Relationen gewonnen werden können, dürfte das Verfahren der LVL endgültig etabliert sein. Damit ist es im Regelfall möglich, nach einer (maximal zwei) Leukapheresesitzung(en) vollwertige Stammzellprodukte für klinische Transplantationen bereitzustellen. Dies ist für die Patienten - bei nachweislich kaum verändertem gesundheitlichen Risiko - von enormer Bedeutung.

Damit stellt sich aber sofort auch die Frage, inwieweit sich die LVL bei vertretbarem Risiko für den Routineeinsatz noch weiter ausdehnen läßt. Denkbar ist z.B., daß selbst nach Prozeption des zehnfachen Blutvolumens noch ausreichend Stammzellen im Apherisat nachweisbar bleiben. Gemäß den „Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen“ der Bundesärztekammer sollte allerdings das bei einer Stammzellentnahme prozessierte Blutvolumen in der Regel das Vierfache des jeweiligen Körperblutvolumens nicht überschreiten⁵².

Daß die Frage einer weiteren Ausdehnung der LVL dabei durchaus nicht nur von akademischem Interesse ist, zeigt eine Studie von Stewart et al., der zufolge nach der Mobilisations-Chemotherapie nur ein enges Zeitfenster besteht, in dem die Stammzellausbeute hoch und die Tumorzellkontamination gering ist¹³⁸. Dieses Phänomen gilt es optimal - aber natürlich auch unter Berücksichtigung der Patientenverträglichkeit - auszuschöpfen.

Ungelöst bleibt weiter die Frage nach der Vorausplanbarkeit der erforderlichen Leukapheresedauer. Schwella et al. lieferten 1996 bereits einen Ansatz, wie es gelingen kann, während des Monitorings im Vorfeld der Leukapherese die zu erwartende Ausbeute klonogener Stammzellen vorauszuberechnen und so die erforderliche Leukapheresedauer bzw. die Menge des zu prozessierenden Blutvolumens festzulegen⁴⁷. In ihren Untersuchungen korrelierte die Zahl der CD34⁺-Zellen im peripheren Blut hoch mit der Zahl der CD34⁺-Zellen im Apherisat. Allerdings sind tägliche CD34-Messungen im peripheren Blut erforderlich, um den optimalen Leukapheresezeitpunkt zu bestimmen, da eine allgemeingültige Voraussage bei größten interindividuellen Unterschieden hier nicht möglich ist.

Anhand der Zahl der transplantierten CD34⁺-Zellen lassen sich außerdem Voraussagen über ein Kurzzeit-Engraftment mit verlässlicher Sicherheit treffen. Ähnliche Empfeh-

lungen über das Minimum an CD34⁺-Zellen, das für ein Langzeit-Engraftment benötigt wird, existieren jedoch noch nicht.

Einen funktionellen Test, um das Engraftment-Potential eines Stammzellproduktes sicher zu beurteilen, gibt es bisher nicht, da die klinische Korrelation zwischen Klonogenitätsassay und Engraftment noch nicht sicher belegt ist. Dieser Test hätte außerdem den Nachteil, daß - aufgrund einer Kulturzeit von vierzehn Tagen - nicht während der Apherese quantifiziert werden könnte, sondern nur retrospektiv. Gerade die primitiven Stammzellen, die das Langzeit-Engraftment vermitteln, würden mit dem Colony-Assay überhaupt nicht erfaßt.

Gesucht wird also ein einfacher und reproduzierbarer klinischer Test, der ohne Zeitverzögerung eine Aussage zu der folgenden Frage ermöglicht: Stellen alle Aphereseformen und -zeitpunkte sicher, daß ausreichend differenzierte und primitive Stammzellen in ähnlicher Relation gewonnen werden?

Die Definition einer LTC-IC-Menge, die mit Sicherheit ein dauerhaftes Langzeit-Engraftment gewährleisten würde, ist theoretisch von großer Bedeutung. Bei einer Kulturzeit des LTC-IC-Assays von sieben Wochen ist dieser in der alltäglichen Praxis zur Abschätzung des Engraftment-Potentials eines Stammzellproduktes allerdings noch weniger geeignet als der oben erwähnte Klonogenitätsassay.

Bereits 1995 wiesen Stewart et al. auf die enge Korrelation zwischen der Zahl der CD34⁺-Zellen im peripheren Blut und der Menge der CD34⁺/CD90⁺-Zellen im Apherisat hin¹³⁸. Sie gingen allerdings noch davon aus, daß die Gruppe der CD34⁺/CD90⁺-Zellen eine Subpopulation besonders primitiver Stammzellen darstellt, die alle „High-Proliferative-Potential“-Vorläuferzellen und LTC-IC enthält. Dies ist nach der vorliegenden Studie allerdings so nicht unbedingt nachvollziehbar und trifft in viel größerem Maße für die CD34⁺/CD38⁻-Zellen zu. Die Frage, ob Subpopulationsanalysen, die die CD34⁺/CD38⁻-Zellen erfassen, einen Stellenwert im Rahmen des Monitorings vor der LVL erlangen können, muß offen bleiben, da ein Problem bisher ungelöst bleibt: Es müßten enorm hohe Zellzahlen durchflußzytometrisch analysiert werden, um aussagekräftige Werte für die CD34⁺/CD38⁻-Zellen zu erhalten, da diese Zellen selbst im Stammzell-angereicherten Apherisat nur in sehr niedriger Frequenz vorhanden sind.

Im dritten Teil der vorliegenden Studie wurde die Expansionsfähigkeit des Stammzellproduktes zu verschiedenen Zeitpunkten der LVL näher untersucht. 1995 kam erstmals ein ex-vivo manipuliertes Stammzellprodukt zum klinischen Einsatz und erzielte eine schnelle und anhaltende Regeneration des hämatopoetischen Systems nach Hochdosis-Chemotherapie¹³⁵. Es konnte nachgewiesen werden, daß ein Zytokincocktail aus SCF, IL-1, IL-3, IL-6 und EPO in der Lage ist, die Ausbeute an klonogenen Progenitorzellen und Leukozyten eines zunächst für eine Retransfusion nicht ausreichenden Stammzellpräparates soweit zu erhöhen und den LTC-IC-Gehalt dabei konstant zu halten, daß letztendlich ein vollwertiges Transplantat entsteht.

Ziel der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob das Leukapherisat zu jedem Zeitpunkt der LVL in gleichem Ausmaß für eine solche ex-vivo Expansion geeignet ist. Auch hier ging es letztlich um eine funktionelle Untersuchung des Stammzellpools im Hinblick auf potentielle, durch die LVL induzierte Veränderungen des Stammzellkompartimentes. Dazu wurden Proben aus dem pBV 2, 4 und 6 nach Positivselektion mit dem publizierten Zytokincocktail - und zusätzlich flt3-ligand - 14 Tage lang inkubiert, wobei nach einer Woche frisches Nährmedium mit neuen Wachstumsfaktoren hinzugefügt wurde¹³⁶. Die publizierte Reinheit nach Positivselektion lag im Durchschnitt bei 87 Prozent. Dies entspricht in etwa der in der vorliegenden Studie erzielten Reinheit nach Aufreinigung über die MACS-Säule, sofern nur die Fälle berücksichtigt werden, in denen nach 14 Tagen Expansion tatsächlich noch ein Koloniewachstum stattfand (etwa 85,5%). In allen drei prozessierten Blutvolumina ließ sich dabei im Mittel eine vergleichbare Reinheit erzielen. In der zitierten Publikation betrug die Vitalität nach Aufreinigung 95 Prozent. Ein Wert, der in der vorliegenden Studie zwar in einzelnen Leukapheresen erreicht wurde, aber im Durchschnitt wesentlich niedriger lag (85%): Im Mittel lagen die Vitalitätswerte für die tatsächlich expandierten Proben zwischen 75,4% im pBV 2 und 90,6% im pBV 6, wobei pBV 4 mit 88,9% zwischen beiden Werten lag. Der Anstieg der Vitalität zum Ende der Leukapherese hin erreichte das geforderte Signifikanzniveau, wenn man Beginn und Ende der LVL vergleicht. Es stellt sich die Frage, wie diese Vitalitätsunterschiede zustande kommen. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte versuchsbedingt in der Regel 12 bis 16 Stunden nach der Leukapherese im Anschluß an die Aufreinigung über die MACS-Säule. Wie stets bei dem gewählten Versuchsaufbau sind die Proben aus dem pBV 6 etwa vier bis sechs Stunden

„jünger“ als die aus dem pBV 2. Möglicherweise macht sich dieser Unterschied hier bemerkbar.

Nach 14 Tagen Expansion waren die Vitalitätsunterschiede weitgehend verschwunden, die Werte lagen im Durchschnitt zwischen 74 bis 78 Prozent mit nicht signifikanten Unterschieden im Verlauf der LVL.

Was das Ausmaß der Expansion sowohl der mononukleären Zellen als auch der koloniebildenden Progenitoren angeht, sind die Unterschiede zwischen den publizierten Daten und der vorliegenden Studie erstaunlich groß. Dies könnte mit der größeren Erfahrung der Arbeitsgruppe um Brugger zusammenhängen. Während diese im Median eine Expansion der mononukleären Zellen um das 260-fache erzielte und die Zahl der koloniebildenden Zellen immerhin um das 190-fache (Median) steigern konnte, lag die Expansionsrate für Leukozyten in der vorliegenden Studie zwischen dem fünf- und dem 135-fachen des Ausgangswertes, im Durchschnitt wurde eine etwa 55-fache Vermehrung erreicht. Die Vermehrung der koloniebildenden Zellen beschränkte sich im Mittel auf das zehn- bis elffache des Ausgangswertes mit Einzelergebnissen, in denen immerhin eine 38-fache Expansion dieser Progenitoren erreicht wurde.

Diese Unterschiede sind eigentlich nur durch Differenzen im Versuchsaufbau zu erklären: Laut mündlicher Auskunft verwandte die Arbeitsgruppe um Brugger nicht nur die im NEJM angegebenen konstanten Bedingungen für Kohlendioxid im Brutschrank (fünf Prozent), sondern auch der Sauerstoffgehalt war klar definiert (ebenfalls fünf Prozent). In der vorliegenden Untersuchung wurde ebenfalls mit fünf Prozent Kohlendioxid, aber einem Sauerstoffgehalt, der der Raumluft entsprach, gearbeitet. Koller et al. hatten 1992 erstmals einen negativen Effekt durch eine zu hohe und damit unphysiologische Sauerstoffspannung beschrieben¹⁵⁶.

Neben unterschiedlichen Materialien und Versuchsanordnungen mag auch eine unterschiedliche Koloniezählweise eine Rolle gespielt haben. Lumley konnte 1997 Unterschiede um das bis zu Achtfache bei der Auszählung ein und derselben Kultur in verschiedenen Laboratorien nachweisen¹⁵⁷.

Trotz der Unterschiede bei der Höhe der Expandierbarkeit ändert dies nichts an der Erkenntnis, daß zu allen Zeitpunkten der LVL ein Stammzellpräparat gewonnen werden kann, aus dem eine Expansion sowohl der mononukleären Zellen als auch der koloniebildenden Zellen möglich ist. Offensichtlich liegt während der gesamten LVL ein

gleichartiger Stammzellpool vor. Dies bedeutet, daß die LVL in ihrem gesamten Verlauf zur Gewinnung eines Stammzellpräparates, das in der Folgezeit eine ex-vivo Expansion erfahren soll, bestens geeignet ist.

Die Relevanz dieser Aussage wird allein dadurch etwas relativiert, daß diese Therapieform maligner (hämatologischer) Erkrankungen zur Zeit ein wenig in den Hintergrund getreten ist, vielleicht auch deshalb, weil weder das Problem der Expansion frühester Stammzellen (LTC-IC) noch die Frage einer Tumorzellkontamination und gegebenenfalls sogar einer Tumorzellvermehrung in vitro endgültig geklärt wurden¹⁵⁸.

Inzwischen gewinnt stattdessen eine andere Form der in-vitro Manipulation hämatopoetischer Stammzellen immer mehr an Bedeutung: Seit einigen Jahren rückt die Immuntherapie maligner Tumoren verstärkt in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Dabei konzentriert sich die Forschung v.a. auf die sogenannten dendritischen Zellen, eine Zellart, die erstmals 1868 in Form der Langerhans-Zellen der Haut beschrieben wurde.

Im Rahmen der Charakterisierung der dendritischen Zellen, die im wesentlichen innerhalb der letzten 25 Jahre erfolgte, wurde ihre zentrale Rolle bei der Immunantwort deutlich^{159 160}: Dendritische Zellen der Peripherie phagozytieren in den Körper eingedrungene Antigene und präsentieren sie - nach einigen Umbauvorgängen - gebunden an den sogenannten „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) an ihrer Zelloberfläche. In dieser aktivierten Form wandern die dendritischen Zellen zu den lymphoiden Organen wie Milz und Lymphknoten, um dort antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren¹⁶¹. Die T-Killerzellen attackieren direkt die antigentragenden Zellen, während die T-Helferzellen Makrophagen aktivieren und B-Zell-Wachstum sowie Antikörperproduktion induzieren. Dendritische Zellen können jedoch B-Zellen auch direkt zur Proliferation und Antikörperproduktion stimulieren.

Tumorzellen verfügen über „escape“-Mechanismen, die eine derartige, hochwirksame Immunabwehr verhindern. Das Fehlen einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort ist zum einen auf das Fehlen des Antigencharakters mancher Tumorzellen zurückzuführen, zum anderen aber auch auf die Sekretion von Faktoren wie IL-10, TGF β , und „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) durch die Tumorzellen. Diese Faktoren beein-

flussen die Entwicklung und Funktion der dendritischen Zellen negativ. Die immunstimulatorische Wirkung dendritischer Zellen geht so verloren.

Gelingt es, in-vitro dendritische Zellen mit Tumorantigenen zu beladen, so läßt sich - nach Retransfusion dieser manipulierten dendritischen Zellen - eine spezifische Immunität erzielen. Die dendritischen Zellen lösen auf dem oben beschriebenen Weg über die Präsentation der Antigene sehr effizient eine T-Zell-Antwort aus. Man spricht in diesem Fall daher auch von Tumorkvakzinen.

Die Wege der Applikation von Tumorantigenen auf dendritische Zellen reichen dabei von viralen Vektoren über Plasmid-DNA, RNA, Liposomen mit Nukleinsäuren oder Proteinen bis hin zu Tumorlysaten und apoptotischen Zellen. Im Tiermodell wurde auf diese Weise bereits ein Schutz gegen Tumore und sogar eine Tumorreduktion bei bereits bestehendem Tumor erzielt^{162 163 164}. Erste klinische Studien beim Menschen zeigen ebenfalls erfolgversprechende Ergebnisse.

Die in der ex-vivo Expansion von Stammzellen gesammelte Erfahrung könnte sich bei der Gewinnung dendritischer Zellen als hilfreich erweisen, da dendritische Zellen sich ebenfalls aus CD34⁺-Knochenmarkzellen kultivieren lassen¹⁶⁵.

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um die größte Studie, die im Verlauf der LVL gewonnene hämatopoetische Stammzellen in dieser umfassenden Form näher charakterisiert. Dazu wurden sowohl morphologische (Durchflußzytometrie) als auch funktionelle Untersuchungsverfahren (LTC-IC-Assay, LDA, Klonogenitätsassay, Ex-vivo Expansion) herangezogen. Mit Hilfe dieser aufwendigen Techniken konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Zusammensetzung unterschiedlichster Stammzellkompartimente und ihre Relation untereinander im Verlauf der LVL keine signifikante Änderung erfährt. Das bedeutet aber gleichzeitig, daß zu jedem Zeitpunkt der LVL sowohl primitive als auch differenzierte Stammzellen gewonnen werden können. Dies läßt sich unter anderem mit der in Abbildung 37 dargestellten LTC-IC / CD34⁺-Zellen-Ratio belegen. In Abbildung 38 wird die Kinetik primitiver Stammzellen im Verlauf der LVL verglichen. Dargestellt ist jeweils die je pBV gewonnene Stammzellmenge als prozentualer Anteil am Gesamtprodukt. Dabei zeigt diese Übersichtsgraphik noch einmal zusammenfassend die enge Korrelation zwischen den Ergebnissen der Subpopulationsanalysen (CD34⁺/CD90⁺-Zellen, CD34⁺/CD117⁺-Zellen, CD34⁺/CD38⁻-

Zellen, CD34⁺/HLA-DR⁻-Zellen) und den Daten aus dem LTC-IC-Assay. In keiner dieser Untersuchungen fanden sich signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des Stammzellpools zwischen den einzelnen prozessierten Blutvolumina. Wenn sich aber die Zusammensetzung des Stammzellpools im Verlauf der LVL nicht ändert, so kann daraus die Schlußfolgerung gezogen werden, daß es - was das Engraftment des Stammzelltransplantates angeht - keinen Unterschied macht, ob sich der Patient über zwei oder mehr Tage einer Standard-Leukapherese oder einmalig einer LVL unterzieht.

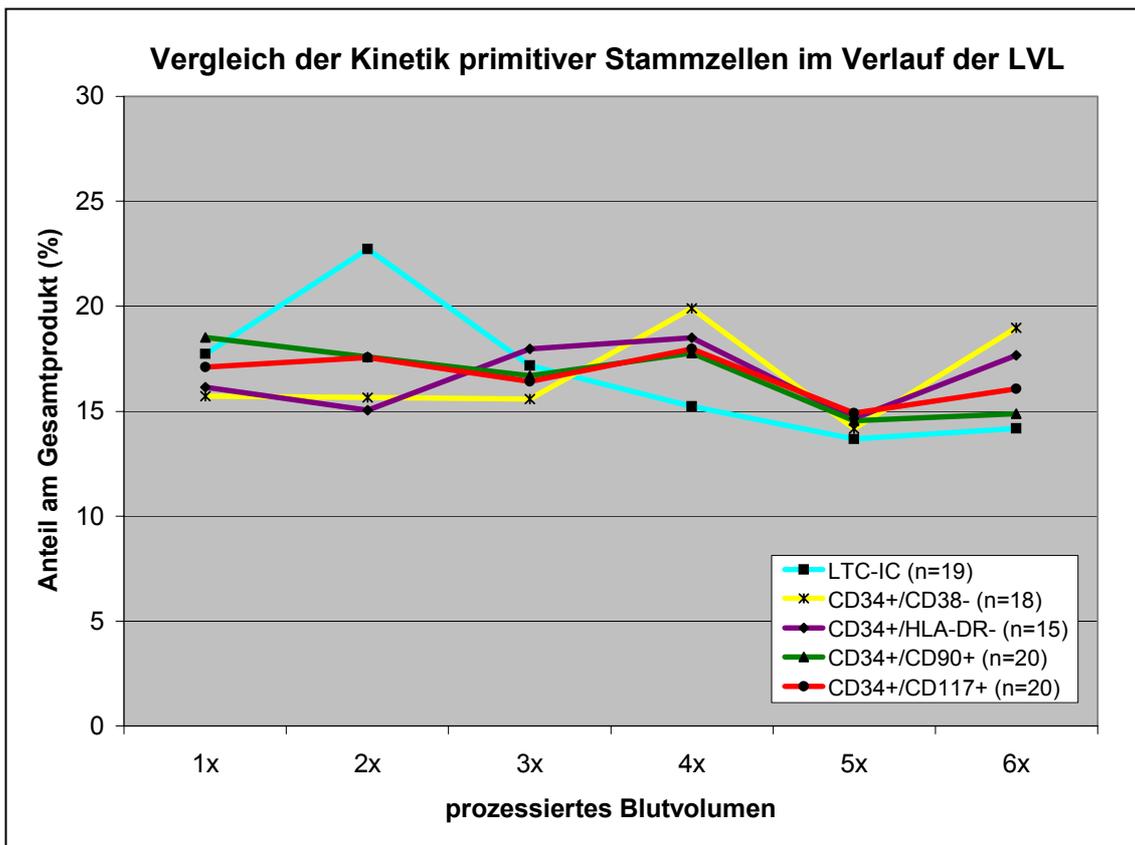


Abbildung 38: Vergleich der Kinetik primitiver Stammzellen im Verlauf der LVL

Offensichtlich kam dem Zeitfaktor in der vorliegenden Studie eine nicht unerhebliche und vor allem zu Studienbeginn so nicht absehbare Bedeutung zu. Die aufwendigen (Zellkultur-)Techniken bedingten Zeitspannen von bis zu 24 Stunden zwischen Eingang des Probenmaterials und Ansatz des letzten Versuchsteils. Aus versuchstechnischen Gründen war eine andere Vorgehensweise jedoch nicht möglich. Dies hatte zum Teil auch negativen Einfluß auf die Versuchsergebnisse. Bei längerer Lagerung und naturgemäß niedrigem Plasmaanteil der Proben kam es unter anderem zu Änderungen der Lichtstreuungseigenschaften der Stammzellen mit scheinbarer Aufspaltung der Stamm-

zellpopulation in der Durchflußzytometrie, obwohl auch andere Arbeitsgruppen ihre Proben über Nacht bei Raumtemperatur lagern⁶⁸. Die Abnahme der Vitalität vom pBV 6 hin zum pBV 2 ließ ebenfalls Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen vermuten. In einzelnen Klonogenitätsassay fand sich bei sehr hohen Leukozytenzahlen im Leukapheresat (und damit erhöhtem Nährstoffbedarf) nur noch im Ansatz aus dem pBV 6 bzw. pBV 5 und 6 ein Koloniewachstum. Diese prozessierten Blutvolumina enthielten die „frischesten“ Zellen. Bei einer annähernd zeitgleichen Aufarbeitung aller sechs Teilprodukte war der Inhalt des ersten pBV - bei einer durchschnittlichen Leukapheresedauer von vier bis sechs Stunden - immer mindestens vier Stunden „älter“ (d.h. länger ohne Kühlung und ernährenden Plasmaanteil) als der Inhalt des sechsten pBV. Dies scheint besonders gegen Ende des Versuchsansatzes (Ex-vivo Expansion und FACS-Analyse) an Bedeutung zu gewinnen. Daher wurde mit den letzten fünf Versuchen eine Kontrollgruppe geschaffen, in der die Reihenfolge der einzelnen Versuchsteile umgestellt wurde. Gleichzeitig erschien es sinnvoll, bei der Auswertung der Ergebnisse feste Ausschlußkriterien zu definieren.

Bei einer so zeitaufwendigen Versuchsanordnung und zum Teil sehr anfälligen Untersuchungsmethoden verwundert es nicht, wenn nicht alle Versuchsteile in gleicher Häufigkeit auswertbare Ergebnisse lieferten. Die Fragestellung wurde aber bewußt so weitreichend gewählt, da gerade die Zusammenschau der verschiedenen Verfahren den Erkenntniszuwachs liefern sollte. Für die Zukunft erscheint es aber durchaus sinnvoll, einzelne „Studienbausteine“ in vertiefenden Einzeluntersuchungen noch näher zu beleuchten bzw. zu verifizieren.

So muß rückblickend sicherlich kritisch diskutiert werden, ob bei weiterführenden Untersuchungen auf die gleiche Auswahl „primitiver“ Stammzellmarker für die Durchflußzytometrie zurückgegriffen werden sollte. Zur Differenzierung zwischen primitiven Stammzellen und differenzierten Progenitoren im CD34⁺-Kompartiment würden sich heute beispielsweise anstatt der beiden eingesetzten Marker CD90 und CD117 eher vielversprechendere „neue“ Marker wie z.B. AC133 oder KDR-Rezeptor anbieten^{166 167 168 169}.

Zusammenfassend kann indes schon jetzt festgestellt werden, daß die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen mittels LVL unter konstanten Apheresebedingungen

primär und nahezu proportional von der Apheresedauer abhängt, ohne daß sich die Zusammensetzung des Stammzelltransplantates dabei wesentlich ändert. Dies dürfte von hoher klinischer Relevanz für künftige Transplantationsstrategien sein.

Und nicht nur für die PBSZT ist die in dieser Studie erarbeitete umfassende Charakterisierung im Verlauf der LVL gewonnener Stammzellen von großer Bedeutung. Sie birgt auch Chancen für andere aktuelle bzw. zukünftige Ansätze wie die Gentherapie oder die Immuntherapie maligner Tumoren mit dendritischen Zellen.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ Cirenza E. Peripheral blood stem cells: a historical perspective. *J Infus Chemother* 1996; 6: 4-8
- ² Jacobson LO, Simmons EL. Recovery from radiation injury. *Science* 1951; 113: 510
- ³ Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; 12: 197
- ⁴ Thomas ED, Lochte HL, Wan Ching Lu, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New Engl J Med* 1957; 257: 491-496
- ⁵ Buckner CD, Epstein RB, Rudolph RH, Clift RA, Storb R, Thomas ED. Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood* 1970; 35: 741-750
- ⁶ Thomas ED, Buckner CD, Rudolph RH, Fefer A, Storb R, Neiman PE, Bryant JI, Chard RL, Clift RA, Epstein RB, Fialkow PJ, Funk DD, Giblett ER, Lerner KG, Reynolds FA, Slichter S. Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood* 1971; 38: 267-287
- ⁷ Brecher G, Cronkite EP. Post-radiation parabiosis and survival in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 77: 292-294
- ⁸ McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171: 293-294
- ⁹ Goldman JM, Catovsky D, Hows J, Spiers ASD, Galton DAG. Cryopreserved peripheral blood cells functioning as autografts in patients with chronic granulocytic leukaemia in transformation. *Br Med J* 1979; 1: 1310-1313
- ¹⁰ Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47: 1031-1039
- ¹¹ Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ. Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol* 1985; 61: 739-745

-
- ¹² Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986; 67: 529-532
- ¹³ Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol* 1986; 14: 312-315
- ¹⁴ Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986; 14: 192-196
- ¹⁵ Platzer E. Human hemopoietic growth factors. *Eur J Haematol* 1989; 42: 1-15
- ¹⁶ Peters WP, Rosner G, Ross M, Vredenburgh J, Meisenberg B, Gilbert C, Kurtzberg J. Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993; 81: 1709-1719
- ¹⁷ Socinski MA, Elias A, Schnipper L, Cannistra SA, Antman KH, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988; 1: 1194-1198
- ¹⁸ Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 74: 1905-1914
- ¹⁹ Pettengell R, Morgenstern GR, Woll PJ, Chang J, Rowlands M, Young R, Radford JA, Scarffe JH, Testa NG, Crowther D. Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood* 1993; 82: 3770-3777
- ²⁰ Frei E, Canellos GP. Dose: a critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 1980; 69: 585-594
- ²¹ Peters WP, Ross M, Vredenburgh JJ, Meisenberg B, Marks LB, Winer E, Kurtzberg J, Bast RC, Jones R, Shpall E, Wu K, Rosner G, Gilbert C, Mathias B, Coniglio D, Petros W, Henderson IC, Norton L, Weiss RB, Budman D, Hurd D. High-dose chemotherapy and autologous bone marrow support as consolidation after standard-dose adjuvant therapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1132-1143

-
- ²² Gianni AM, Bregni M, Siena S, Brambilla C, Di Nicola M, Lombardi F, Gandola L, Tarella C, Pileri A, Stern A, Valagussa P, Bonadonna G. 5-year update of the Milan Cancer Institute randomized trial of high-dose sequential (HDS) versus MACOP-B therapy for diffuse large-cell lymphomas. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994; 13: 373 (Abstract 1263)
- ²³ Beyer J, Schwella N, Zingsem J, Strohscheer I, Schwaner I, Oettle H, Serke S, Huhn D, Siegert W. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1328-1335
- ²⁴ Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demuyneck HMS, Link H, Zander A, Barge A, Borkett K. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 353-357
- ²⁵ To LB, Roberts MM, Haylock DN, Dyson PG, Branford AL, Thorp D, Ho JQK, Dart GW, Horvath N, Davy MLJ, Olweny CLM, Abdi E, Juttner CA. Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 277-284
- ²⁶ Juttner CA, To LB, Dyson P, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ. The peripheral blood CFU-mix : CFU-GM ratio during very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1986; 62: 598-599
- ²⁷ Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Peccatori F, Gianni AM. Durability of hematopoiesis after transplantation of peripheral blood hematopoietic progenitors elicited by cancer chemotherapy and cytokine(s). *Ann Hematol* 1989; 66: A81 (Abstract 28)
- ²⁸ Niitsu Y, Sakamaki S, Kuga T. Expression of neo gene in peripheral blood cells of SCID mouse transplanted with the neo gene transferred human peripheral CD34⁺ cells. *Proceedings of the 25th Congress of the International Society of Hematology, Cancun, 1994; 185 (Abstract 4)*
- ²⁹ Smith TJ, Hillner BE, Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Link H, Zander A, Yanovich S, Kitchin R, Erder MH. Economic analysis of a randomized clinical trial to compare filgrastim-mobilized peripheral-blood

progenitor-cell transplantation and autologous bone marrow transplantation in patients with Hodgkin's and Non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 5-10

³⁰ Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner CA. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 469-475

³¹ Zander AR, Lyding J, Cockerill KJ. Autologous blood stem cell transplantation. In: Gale RP, Champlin RE (Hrsg). *Bone marrow transplantation: Current controversies*. Alan R. Liss, New York, 1989, 313-320

³² Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D, Winter C, Akard L, Jansen J, Copelan E, Meagher RC, Herzig RH, Klumpp TR, Kahn DG, Warner NE. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1993; 82: 2605-2610

³³ Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83: 636-640

³⁴ Rill DR, Santana VM, Roberts WM, Nilson T, Bowman LC, Krance RA, Heslop HE, Moen RC, Ihle JN, Brenner MK. Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994; 84: 380-383

³⁵ Shpall EJ, Jones RB. Release of tumor cells from bone marrow. *Blood* 1994; 83: 623-625

³⁶ Vose JM, Anderson JR, Kessinger A, Bierman PJ, Coccia P, Reed EC, Gordon B, Armitage JO. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1846-1851

³⁷ Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers MED, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001; 344: 175-181

-
- ³⁸ Sullivan KM, Storb R, Buckner CD, Fefer A, Fisher L, Weiden PL, Witherspoon RP, Appelbaum FR, Banaji M, Hansen J, Martin P, Sanders JE, Singer J, Thomas ED. Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. *N Engl J Med* 1989; 320: 828-834
- ³⁹ Butturini A, Bortin MM, Gale RP. Graft-versus-leukemia following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1987; 2: 233-242
- ⁴⁰ Russel NH, Hunter AE. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 353-355
- ⁴¹ Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, Landmark JD, Dooley DC, Law P, Coccia PF, Warkentin PI, Weisenburger DD, Armitage JO. Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 643-646
- ⁴² Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Löffler H, Schmitz N, Schroyens W. Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation. *Blood* 1993; 81: 1404-1407
- ⁴³ Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet* 1993; 341: 1482
- ⁴⁴ Goldman J. Peripheral blood stem cells for allografting. *Blood* 1995; 85: 1413-1415
- ⁴⁵ Körbling M, Przepiora D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralto S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB, Andreeff M, Champlin R. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* 1995; 85: 1659-1665
- ⁴⁶ Schwella N, Siegert W, Beyer J, Rick O, Zingsem J, Eckstein R, Serke S, Huhn D. Autografting with blood progenitor cells: predictive value of preapheresis blood cell counts on progenitor cell harvest and correlation of the reinfused cell dose with hematopoietic reconstitution. *Ann Hematol* 1995; 71: 227-234
- ⁴⁷ Schwella N, Beyer J, Schwaner I, Heuft HG, Rick O, Huhn D, Serke S, Siegert W. Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor-cell dose with engraftment after high-dose chemotherapy in patients with germ cell cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1114-1121

-
- ⁴⁸ Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni AM. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991; 77: 400-409
- ⁴⁹ Möhle R, Murea S, Pförsich M, Witt B, Haas R. Estimation of the progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous measurement of CD34+ cells in the peripheral blood. *Vox Sang* 1996; 71: 90-96
- ⁵⁰ Haas R, Möhle R, Frühauf S, Goldschmidt H, Witt B, Flentje M, Wannemacher M, Hunstein W. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83: 3787-3794
- ⁵¹ Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1: 329-341
- ⁵² Richtlinien zur Transplantation peripherer Blustammzellen. Erarbeitet vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes. *Dt Ärztebl* 1997; 94: B1268-B1276
- ⁵³ Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, Landmark JD, Bierman PJ, Weisenburger DD. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. *Blood* 1989; 74: 1260-1265
- ⁵⁴ Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Smith DM, Weisenburger DD. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 1988; 71: 723-727
- ⁵⁵ Gillespie TW, Hillyer CD. Peripheral blood progenitor cells for marrow reconstitution: mobilization and collection strategies. *Transfusion* 1996; 36: 611-624
- ⁵⁶ Comenzo RL, Malachowski ME, Miller KB, Erban JJ, Schenkein DP, Desforges JF, Berkman EM. Engraftment with peripheral blood stem cells collected by large-volume leukapheresis for patients with lymphoma. *Transfusion* 1992, 32: 729-731
- ⁵⁷ Malachowski ME, Comenzo RL, Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. *Transfusion* 1992; 32: 732-735
- ⁵⁸ Hillyer CD. Large volume leukapheresis to maximize peripheral blood stem cell collection. *J Hematother* 1993; 2: 529-532

-
- ⁵⁹ Passos-Coelho JL, Braine HG, Wright SK, Davis JM, Schepers KG, Huelskamp AM, Clarke B, Noga SJ, and Kennedy MJ. Large-volume leukapheresis using regional citrate anticoagulation to collect peripheral blood progenitor cells. *J Hematother* 1995; 4: 11-19
- ⁶⁰ Gorlin JB, Vamvakas EC, Cooke E, Galacki D, Geha R, Humphreys D, Kent P. Large-volume leukapheresis in pediatric patients: processing more blood diminishes the apparent magnitude of intra-apheresis recruitment. *Transfusion* 1996; 36: 879-885
- ⁶¹ Murea S, Goldschmidt H, Hahn U, Pförsich M, Moos M, Haas R. Successful collection and transplantation of peripheral blood stem cells in cancer patients using large-volume leukapheresis. *J Clin Apheresis* 1996; 11: 185-194
- ⁶² Hillyer CD, Tiegermann KO, Berkman EM. Increase in circulating colony-forming units-granulocyte-macrophage during large-volume leukapheresis: evaluation of a new cell separator. *Transfusion* 1991; 31: 327-332
- ⁶³ Zingsem J, Serke S, Zeiler T, Zimmermann R, Schwella N, Weisbach V, Eckstein R. Mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen im peripheren Blut durch die Leukapherese. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1993; 31: 111-117
- ⁶⁴ Hillyer CD, Lackey DA, Hart KK, Stempora LL, Bray RA, Bender JG, Donnenberg AD. CD34⁺ progenitors and colony-forming units-granulocyte macrophage are recruited during large-volume leukapheresis and concentrated by counterflow centrifugal elutriation. *Transfusion* 1993; 33: 316-321
- ⁶⁵ Cull G, Ivey J, Chase P, Picciuto R, Herrmann R, Cannell P. Collection and recruitment of CD34⁺ cells during large-volume leukapheresis. *J Hematother* 1997; 6: 309-314
- ⁶⁶ Kuijpers TW, Roos D. Leukocyte extravasation: Mechanisms and consequences. *Behring Inst Mitt* 1993; 92: 107-137
- ⁶⁷ Lasky LC, Smith JA, McCullough J, Zanjani ED. Three-hour collection of committed and multipotent hematopoietic progenitor cells by apheresis. *Transfusion* 1987; 27: 276-278
- ⁶⁸ Smolovicz AG, Villman K, Berlin G, Tidefelt U. Kinetics of peripheral blood stem cell harvests during a single apheresis. *Transfusion* 1999; 39: 403-409

-
- ⁶⁹ Bojko P, Stellberg W, Küdde C, Scharifi M, Herrmann M, Mayer S, Harstrick A, Seeber S. Kinetic study of CD34+ cells during peripheral blood stem cell collections. *J Clin Apheresis* 1999; 14: 18-25
- ⁷⁰ Cassens U, Ostkamp-Ostermann P, van der Werf N, Garritsen H, Ostermann H, Sibrowski W. Volume-dependent collection of peripheral blood progenitor cells during large-volume leukapheresis for patients with solid tumours and haematological malignancies. *Transfus Med* 1999; 9: 311-320
- ⁷¹ Cassens U, Momkvist PH, Zühlsdorf M, Mohr M, Kienast J, Berdel WE, Sibrowski W. Kinetics of standardized large volume leukapheresis (LVL) in patients do not show a recruitment phenomenon of peripheral blood progenitor cells (PBPC). *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 13-20
- ⁷² Kovacs P, Bruch C, Herbst EW, Fliedner TM: Collection of in vitro colony-forming units from dogs by repeated continuous flow leukaphereses. *Acta Haematol* 1978; 60: 172-181
- ⁷³ Bolin RB, Stewart DA, Cheney BA, Chapman KW, Tompkins DR. Granulocyte progenitor cell (CFU_C) harvest by continuous apheresis in dogs. Effects of blood volume and lithium on yields. *Exp Hematol* 1983; 11: 226-230
- ⁷⁴ Hillyer CD, Swenson RB, Hart KK, Lackey DA, Winton EF. Peripheral blood stem cell acquisition by large-volume leukapheresis in growth factor-stimulated and unstimulated rhesus monkeys: development of an animal model. *Exp Hematol* 1993; 21: 1455-1459
- ⁷⁵ Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* 1997; 90: 4779-4788
- ⁷⁶ Gazitt Y. Recent developments in the regulation of peripheral blood stem cell mobilization and engraftment by cytokines, chemokines, and adhesion molecules. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 229-236
- ⁷⁷ Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA₄ integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9374-9378
- ⁷⁸ Papayannopoulou T. Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm. *Semin Hematol* 2000; 37 (Suppl. 2): 11-18

-
- ⁷⁹ Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA₄/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9647-9651
- ⁸⁰ Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkovich R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34⁺CD38^{-/low}CXCR4⁺ stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m^{null} mice. *Blood* 2001; 97: 3283-3291
- ⁸¹ Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; 283: 845-848
- ⁸² Goldberg SL, Mangan KF, Klumpp TR, Macdonald JS, Thomas C. Complications of peripheral blood stem cell collections. *Blood* 1993; 82 (Suppl. 1): 631a
- ⁸³ Reik RA, Noto TA, Fernandez HF. Safety of large-volume leukapheresis for collection of peripheral blood progenitor cells. *J Clin Apheresis* 1997; 12: 10-13
- ⁸⁴ Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984; 133: 157-165
- ⁸⁵ Haas R, Möhle R, Pförsich M, Frühauf S, Witt B, Goldschmidt H, Hunstein W. Blood-derived autografts collected during granulocyte colony-stimulating factor-enhanced recovery are enriched with early Thy-1⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 85: 1936-1943
- ⁸⁶ Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1331-1342
- ⁸⁷ Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994; 83: 2410-2417
- ⁸⁸ Baum CM, Weissmann IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2804-2808

-
- ⁸⁹ Gutensohn K, Serke S. Durchflußzytometrische Analyse CD34-exprimierender hämatopoetischer Zellen in Blut und Zytaphereseprodukten. Beitr Infusionsther Transfusionsmed 1996; 23 (Suppl. 2): 1-23
- ⁹⁰ Serke S, Säuberlich S, Huhn D. Multiparameter flow-cytometrical quantitation of circulating CD34⁺-cells: correlation to the quantitation of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony-assay. Brit J Haematol 1991; 77: 453-459
- ⁹¹ Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 1966; 44: 287-300
- ⁹² Pike BL, Robinson WA. Human bone marrow colony growth in agar-gel. J Cell Physiol 1970; 76: 77-84
- ⁹³ Dexter TM, Lajtha LG. Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. Br J Haematol 1974; 28: 525-530
- ⁹⁴ Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J Cell Physiol 1977; 91: 335-344
- ⁹⁵ Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 4756-4759
- ⁹⁶ Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. Blood 1983; 62: 291-297
- ⁹⁷ Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. Blood 1989; 74: 1563-1570
- ⁹⁸ Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 3584-3588
- ⁹⁹ Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. Blood 1992; 80: 2513-2521
- ¹⁰⁰ Craig JIO, Langlands K, Parker AC, Anthony RS. Molecular detection of tumor contamination in peripheral blood stem cell harvests. Exp Hematol 1994; 22: 898-902

-
- ¹⁰¹ Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12: 475-482
- ¹⁰² Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro J, Anderson WF, Ihle JN. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-86
- ¹⁰³ Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, Goldberg L, Thomas M, Janicek K, Anderson WF, Hester J, Korbling M, Durett A, Moen R, Berenson R, Heimfeld S, Hamer J, Calvert L, Tibbits P, Talpaz M, Kantarjian H, Champlin R, Reading C. Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994; 83: 3068-3076
- ¹⁰⁴ Rill DR, Santana VM, Roberts WM, Nilson T, Bowman LC, Krance RA, Heslop HE, Moen RC, Ihle JN, Brenner MK. Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994; 84: 380-383
- ¹⁰⁵ Kato K, Radbruch A. Isolation and characterization of CD34⁺ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 1993; 14: 384-392
- ¹⁰⁶ Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Franklin WA, Archer PG, Curiel T, Bitter M, Claman HN, Stemmer SM, Purdy M, Myers SE, Hami L, Taffs S, Heimfeld S, Hallagan J, Berenson RJ. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994; 12: 28-36
- ¹⁰⁷ Hoppe B, Mohr M, Roots-Weiss A, Kienast J, Berdel WE. Improvement of tumor cell depletion by combining immunomagnetic positive selection of CD34-positive hematopoietic stem cells and negative selection (purging) of tumor cells. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 809-817
- ¹⁰⁸ Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34⁺ cells into the myeloid lineage. *Blood* 1992; 80: 1405-1412

-
- ¹⁰⁹ Henschler R, Brugger W, Luft T, Frey T, Mertelsmann R, Kanz L. Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34⁺-selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994; 84: 2898-2903
- ¹¹⁰ Hanania E, Fu S, Roninson I, Mechetner E, Hegewisch-Becker S, Andreeff M, Berenson R, Heimfeld S, Gottesman M, Deisseroth A. CDNA for the multidrug resistance (MDR-1) gene in a transcription unit of a safety modified retrovirus confers in vivo resistance to taxol on early precursor cells in a mouse transplant model and on long-term culture initiating cells in long-term human marrow culture. *Blood* 1993; 82 (Suppl. 1): 216a (Abstract 848)
- ¹¹¹ Sorb R. Bone marrow transplantation. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Hrsg). *Cancer - principles and practice of oncology*. JB Lippincott, Philadelphia, 1989, 2474-2489
- ¹¹² Comenzo RL, Vosburgh E, Weintraub LR, Tansan S, Arkin CF, Wright DG. Collection of mobilized blood progenitor cells for hematopoietic rescue by large-volume leukapheresis. *Transfusion* 1995; 35: 493-497
- ¹¹³ Passos-Coelho JL, Braine HG, Davis JM, Huelskamp AM, Schepers KG, Ohly K, Clarke B, Wright SK, Noga SJ, Davidson NE, Kennedy MJ. Predictive factors for peripheral-blood progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization. *J Clin Oncol* 1995; 13: 705-714
- ¹¹⁴ Smolowicz AG, Villman K, Tidefelt U. Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. *Transfusion* 1997; 37: 188-192
- ¹¹⁵ Desikan KR, Jagannath S, Siegel D, Nelson J, Bracy D, Barlogie B, Tricot G. Collection of more hematopoietic progenitor cells with large volume leukapheresis in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 501
- ¹¹⁶ Waller CF, Heinzinger M, Rosenstiel A, Lange W. Mobilization and transplantation of Philadelphia chromosome-negative peripheral blood progenitor cells in patients with CML. *Br J Haematol* 1998; 103: 227-234
- ¹¹⁷ Kadar JG, Arseniev L, Schnitger K, Südmeier I, Zaki M, Battmer K, Jacobs R, Diedrich H, Poliwoda H, Stangel W, Link H. Technical and safety aspects of blood and

marrow transplantation using G-CSF mobilized family donors. *Transfus Sci* 1996; 17: 611-618

¹¹⁸ Cull G, Cannel P. Recruitment of CD34⁺ cells during large-volume leukapheresis (letter). *Transfusion* 1997; 37: 672-673

¹¹⁹ Cassens U, Sibrowski W. Large-volume leukapheresis in pediatric patients (letter). *Transfusion* 1997; 37: 671-672

¹²⁰ Fischer J, Unkrig C, Ackermann M, Frick M, Giers G. Intra-day CD34⁺ cell counts depend on time to application and correlate with the resulting G-CSF plasma level after steady-state mobilization of PBPC by filgrastim. *Blood* 1994, 84 (Suppl. 1): 23a (Abstract 81)

¹²¹ Bregni M, Magni M, Siena S, Di Nicola M, Bonadonna G, Gianni AM. Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 1992; 80: 1418-1422

¹²² Cassel A, Cottler-Fox M, Doren S, Dunbar CE. Retroviral-mediated gene transfer into CD34-enriched human peripheral blood stem cells. *Exp Hematol* 1993; 21: 585-591

¹²³ Bagnis C, Gravis G, Imbert AM, Herrera D, Allario T, Galindo R, Lopez M, Pavon C, Sempere C, Mannoni P. Retroviral transfer of the nlsLacZ gene into human CD34⁺ cell populations and into TF-cells: Future prospects in gene therapy. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1325-1333

¹²⁴ Humeau L, Bardin F, Maroc C, Alario T, Galindo R, Mannoni P, Chabannon C. Phenotypic, molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34⁺/Thy-1⁺ cells. *Blood* 1996; 87: 949-955

¹²⁵ Raffael A, Nebe CT, Valet G. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schattauer, Stuttgart, 1994, 3-49

¹²⁶ Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8736-8740

¹²⁷ Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Thacker JD, Hogge DE. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* 1991; 78: 666-672

-
- ¹²⁸ Hogge DE, Lansdorp PM, Reid D, Gerhard B, Eaves CJ. Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1996; 88: 3765-3773
- ¹²⁹ Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. *J Immunol* 1981; 126: 1614-1619
- ¹³⁰ Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP. Numerical recipes in FORTRAN. The art of scientific computing. UP, Cambridge, 1993.
- ¹³¹ Wunder E. Short term colony assay for CFU-GM. In: Hematopoietic stem cells. AlphaMed Press, Dayton, 1994
- ¹³² StemCell Technologies (Hrsg.). Colony atlas. Vancouver, 1996, Kat.-Nr. 28700
- ¹³³ Radbruch A. Flow cytometry and cell sorting. Springer, Berlin Heidelberg, 1992, 141-152
- ¹³⁴ Brugger W, Möcklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 β , IL-6, IL-3, interferon γ , and erythropoietin. *Blood* 1993; 81: 2579-2584
- ¹³⁵ Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 1995; 333: 283-287
- ¹³⁶ Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL, Ramshaw HS, Niutta S, Protopsaltis S, Peng L, Burrell C, Rappold I, Buhring HJ, Simmons PJ. Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 1997; 90: 2260-2272
- ¹³⁷ Tanaka H, Kaneko T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparisons between human granulocyte colony-stimulating factor purified from human bladder carcinoma cell line 5637 culture medium and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced in *Escherichia coli*. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262: 439-444
- ¹³⁸ Stewart AK, Imrie K, Keating A, Anania S, Nayar R, Sutherland DR. Optimizing the CD34⁺ and the CD34⁺Thy-1⁺ stem cell content of peripheral blood collections. *Exp Hematol* 1995; 23: 1619-1627
- ¹³⁹ Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MKA, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, Slaper-Cortenbach ICM, Pinedo HM, von dem Borne AEGKr, van der Schoot

CE, Gerritsen WR. Subsets of CD34⁺ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1922-1932

¹⁴⁰ Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, Printz D, Buchinger P, Fischmeister G, Hoecker P, Gadner H. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 169-178

¹⁴¹ Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, Lee W, Smith S, Williams S, van Epps DE. Phenotypic analysis and characterization of CD34⁺ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70: 10-18

¹⁴² Rusten LS, Jacobsen SEW, Kaalhus O, Veiby OP, Funderud S, Smeland EB. Functional differences between CD38⁻ und DR⁻ subfractions of CD34⁺ bone marrow cells. *Blood* 1994; 84: 1473-1481

¹⁴³ Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 1991; 77: 1218-1227

¹⁴⁴ Cairo MS, Law P, van den Ven C, Plunkett JM, Williams D, Ishizawa L, Gee A. The in vitro effects of stem cell factor and PIXY 321 on myeloid progenitor formation (CFU-GM) from immunomagnetic separated CD34⁺ cord blood. *Pediatr Res* 1992; 32: 277-281

¹⁴⁵ Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in G₀ and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4013-4017

¹⁴⁶ Terhorst C, van Agthoven A, LeClair K, Snow P, Reinherz E, Schlossmann S. Biochemical studies of the human thymocyte cell surface antigens T6, T9 and T10. *Cell* 1981; 23: 771

¹⁴⁷ Boyd AW, Anderson KC, Freedman AS, Fisher DC, Slaughenhaupt B, Schlossman SF, Nadler LM. Studies of in vitro activation and differentiation of human B-lymphocytes: I. Phenotypic and functional characterization of the B cell population responding to anti-Ig antibody. *J Immunol* 1985; 134: 1516-1523

-
- ¹⁴⁸ Gutensohn K, Bartsch N, Kuehnl P. Flow cytometric analysis of platelet membrane antigens during and after continuous-flow plateletpheresis. *Transfusion* 1997; 37: 809-815
- ¹⁴⁹ Gutensohn K, Maerz M, Kuehnl P. Alteration of platelet-associated membrane glycoproteins during extracorporeal apheresis of peripheral blood progenitor cells. *J Hematother* 1997; 6: 315-321
- ¹⁵⁰ Kroczek RA, Gunter KC, Seligmann B, Shevach EM. Induction of T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies. *J Immunol* 1986; 136: 4379-4384
- ¹⁵¹ Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Martinez A, Landolfi C, Canizo C, San Miguel JF. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995; 9: 1896-1901
- ¹⁵² Kobbe G, Soehngen D, Heyll A, Fischer J, Thiele KP, Aul C, Wernet P. Large volume leukapheresis maximizes the progenitor cell yield for allogeneic peripheral blood progenitor donation. *J Hematother* 1997; 6: 125-131
- ¹⁵³ Bender JG, Lum L, Unverzagt KL, Lee W, van Epps D, George S, Coon J, Ghalie R, McLeod B, Kaizer H, Williams SF. Correlation of colony-forming cells, long-term culture initiating cells and CD34⁺ cells in apheresis products from patients mobilized for peripheral blood progenitors with different regimens. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 479-485
- ¹⁵⁴ Fritsch G, Emminger W, Buchinger P, Printz D, Gadner H. CD34-positive cell proportions in peripheral blood correlate with colony-forming capacity. *Exp Hematol* 1991; 19: 1079-1083
- ¹⁵⁵ Sutherland HJ, Eaves CJ. Long-term culture of human myeloid cells. In: Freshney RI. *Culture of hematopoietic cells*. John Wiley & Sons, New York, 1994, 139-162
- ¹⁵⁶ Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutsakis ET. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol* 1992; 20: 264-270
- ¹⁵⁷ Lumley MA, Burgess R, Billingham LJ, McDonald DF, Milligan DW. Colony counting is a major source of variation in CFU-GM results between centres. *Brit J Haematol* 1997; 97: 481-484

-
- ¹⁵⁸ Vogel W, Behringer D, Scheduling S, Kanz L, Brugger W. Ex vivo expansion of CD34⁺ peripheral blood progenitor cells: implications for the expansion of contaminating epithelial tumor cells. *Blood* 1996; 88: 2707-2713
- ¹⁵⁹ Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- ¹⁶⁰ Williams LA, McLellan AD, Summers KL, Sorg RV, Fearnley DB, Hart DNJ. Identification of a novel dendritic cell surface antigen defined by carbohydrate specific CD24 antibody cross-reactivity. *Immunology* 1996; 89: 120-125
- ¹⁶¹ Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, Grabbe S, Zänker KS, Bröcker EB, Kämpgen E, Friedl P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 2000; 13: 323-332
- ¹⁶² Specht JM, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med* 1997; 186: 1213-1221
- ¹⁶³ Song W, Kong HL, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MAS, Crystal RG. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model tumor antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1247-1256
- ¹⁶⁴ Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1183-1187
- ¹⁶⁵ Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999; 162: 168-175
- ¹⁶⁶ Watt SM, Bühring HJ, Rappold I, Chan JYH, Lee-Prudhoe J, Jones T, Zannettino ACW, Simmons PJ, Doyonnas R, Sheer D, Butler LH. CD164, a novel sialomucin on CD34⁺ and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21. *Blood* 1998; 92: 849-866
- ¹⁶⁷ Corbeil D, Röper K, Weigmann A, Huttner WB. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 1998; 91: 2625- 2626

¹⁶⁸ Kratz-Albers K, Zühlsdorf M, Leo R, Berdel WE, Büchner T, Serve H. Expression of AC133, a novel stem cell marker, on human leukemic blasts lacking CD34-antigen and on a human CD34⁺ leukemic cell line: MUTZ-2. *Blood* 1998; 92: 4485-4487

¹⁶⁹ Ziegler BL, Valtieri M, Almeida Porada G, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999; 285: 1553-1558

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski danke ich für die Überlassung des interessanten Themas meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Oberarzt Dr. med. U. Cassens für die Betreuung beim Entwurf, bei der Durchführung und bei der Auswertung der Arbeit.

Für die Beratung und Kooperation - insbesondere bei der Etablierung der Limiting Dilution Analyse - danke ich Herrn Privatdozent Dr. med. M. Zühlsdorf ganz herzlich.

Ohne die tatkräftige Unterstützung und die aufbauenden Worte der Medizinisch Technischen Assistentinnen des Instituts für Transfusionsmedizin, v.a. von Marion Behr, Nikola Götzelmann, Astrid Krämer, Kordula Lippert-Coerd und Mariam Tabib wäre diese Arbeit wohl nicht fertig geworden.

Anhang

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	LDA-Auswertung													
2														
3	Datenbereich					Auswertung								
4														
5	Beispielpatient					weighted mean				Chi2				
6														
7														
8	Zellzahl	positiv	negativ	Anzahl	mean 1	frequency 1	Sum Nenner	Sum Zähler	exp(-phi x)	Sum Chi2	Sum dChi2/dPhi			
9	Beutel 4													
10														
11	30000	15	9	24	0,981	0,000003289	1298000000000	4237182	0,041	60,046	24859808,861	7,54E+12		
12	150000	19	5	24	1,589	0,000010457	142105283158	1488057	0,201	0,007	84113,318	2,77E+11		
13	75000	19	5	24	1,589	0,000020915	35528315788	743029	0,448	5,805	-1491145,223	3,41E+11		
14	37500	21	3	24	2,079	0,000055452	4821428571	267357	0,670	32,214	-4213140,640	8,04E+11		
15	18750	16	8	24	1,099	0,000058593	4218750000	247188	0,618	38,007	-4904229,971	6,34E+11		
16	9375	7	17	24	0,345	0,000036783	5122767857	188431	0,905	10,728	-1780774,588	3,88E+11		
17	4687,5	12	12	24	0,893	0,000147871	527343750	77979	0,951	105,117	-11177488,895	2,13E+12		
18	2343,75	3	21	24	0,134	0,000058973	922851563	52578	0,975	10,002	-1358943,103	2,62E+11		
19														
20														
21														
22														
23														
24														
25														
26														
27														
28														
29														
30														
31														
32														
33														
34														
35														
36														
37														
38														
39														
40														
41														
42														
43														
44														
45														
46														
47														
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														
63														
64														
65														
66														
67														
68														
69														
70														
71														
72														
73														
74														
75														
76														
77														
78														
79														
80														
81														
82														
83														
84														
85														
86														
87														
88														
89														
90														
91														
92														
93														
94														
95														
96														
97														
98														
99														
100														

Tabelle 3: Beispielpatient Limiting Dilution Analyse