

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Abteilung für Hämatologie und Onkologie
Einrichtung für Knochenmarktransplantation
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Leiter: Prof. Dr. med. Axel R. Zander

**T-Zell-Depletion mittels immunomagnetischer CD34⁺-Selektion
bei menschlichem Nabelschnurblut**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Ulla-Maarit Begemann

aus Juankoski, Finnland

Hamburg, 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 11.03.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. A. R. Zander

Koreferent: Prof. Dr. H. Kabisch

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Einführung.....	1
1.2. Hämatopoese.....	1
1.3. Zellkulturen zur Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen.....	2
1.3.1. Semisolidе Zellkulturmedien.....	3
1.3.2. Flüssige Zellkulturmedien.....	3
1.4. Oberflächenantigene (CD-Antigene).....	4
1.4.1. Das CD34-Antigen.....	4
1.4.2. Das CD3-Antigen.....	5
1.4.3. Das CD4-Antigen.....	5
1.4.4. Das CD5-Antigen.....	6
1.4.5. Das CD6-Antigen.....	7
1.4.6. Das CD8-Antigen.....	7
1.4.7. Das CD10-Antigen.....	7
1.4.8. Das CD19-Antigen.....	8
1.5. Zellseparation.....	8
1.6. Zellzyklus.....	9
1.7. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen.....	11
1.7.1. Autologe und allogene Stammzelltransplantation.....	11
1.7.2. Indikationen.....	12
1.7.3. Quellen hämatopoetischer Stammzellen.....	14
1.7.3.1. Knochenmark.....	14
1.7.3.2. Periphere Blutstammzellen.....	14
1.7.3.3. Nabelschnurblut.....	15

1.7.4. Methode der Transplantation.....	15
1.7.5. Engraftment.....	15
1.7.6. Komplikationen.....	16
1.7.6.1. Prophylaxe und Behandlung der Komplikationen.....	17
1.8. Graft-versus-Host Disease (GvHD).....	18
1.8.1. Pathophysiologie der Graft-versus-Host Disease.....	19
1.8.2. Akute Graft-versus-Host Disease.....	20
1.8.3. Chronische Graft-versus-Host Disease.....	22
1.8.4. Prophylaxe und Therapie der akuten und chronischen GvHD.....	22
1.9. T-Zell-Depletion.....	24
1.10. Nabelschnurbluttransplantation.....	24
1.11. Fragestellung und Zielsetzung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Verwendete Substanzen.....	28
2.2. Untersuchungsmaterialien.....	29
2.2.1. Nabelschnurblut.....	29
2.2.2. Knochenmark.....	29
2.2.3. Positiv- und Negativkontrollen zur immunhistochemischen APAAP-Färbung.....	30
2.3. Immunomagnetische Separation.....	30
2.3.1. Anreicherung der mononukleären Zellen.....	30
2.3.2. Anreicherung der CD34 ⁺ -Zellen.....	31
2.4. Immunhistochemische Färbung.....	33
2.5. Auswertung.....	34

3. Ergebnisse	37
3.1. Immunhistochemischer Vergleich verschiedener Leukozyten- antigene von menschlichem Nabelschnurblut.....	37
3.1.1 Zellseparation.....	37
3.1.2. T- und B-Zellseparation.....	37
3.1.2.1. CD3 ⁺ -Zellen.....	37
3.1.2.2. CD4 ⁺ -Zellen.....	37
3.1.2.3. CD5 ⁺ -Zellen.....	38
3.1.2.4. CD6 ⁺ -Zellen.....	38
3.1.2.5. CD8 ⁺ -Zellen.....	38
3.1.2.6. CD10 ⁺ -Zellen.....	38
3.1.2.7. CD19 ⁺ -Zellen.....	38
3.2. Zellzyklusantigene.....	44
3.2.1. Cyclin A vor und nach immunmagnetischer CD34 ⁺ -Selektion in menschlichem Knochenmark und Nabelschnurblut.....	44
3.2.2. Cyclin D1 vor und nach immunmagnetischer CD34 ⁺ -Selektion in menschlichem Knochenmark und Nabelschnurblut.....	45
4. Diskussion	47
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	57
Danksagung	71
Lebenslauf	72
Erklärung	73

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden zwischen Frühjahr 1996 und Sommer 1999 in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Materialien für die Experimente (Nabelschnur und Knochenmark) wurden zwischen 1996 und 1998 in der Frauenklinik und in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation des UKE gesammelt und im Hämatopoese-Labor der Einrichtung für Knochenmarktransplantation verarbeitet.

1.2. Hämatopoese

Die Bildung der Blutzellen erfolgt nach der Embryonalphase ausschließlich im Knochenmark und in den lymphatischen Organen. Am Anfang der Entwicklung der Blutzellen im Knochenmark stehen die sog. pluripotenten Stammzellen, aus denen sich die Vorläuferzellen der Erythropoese, Leukopoese und Thrombopoese entwickeln. Die pluripotenten Stammzellen, die ca. 0,01% (Knapp et al. 1995) der Knochenmarkzellen ausmachen, müssen einerseits in der Lage sein, sich selbst zu erneuern und andererseits Ursprungszellen für Vorläuferzellen (Progenitorzellen) sein. Diese sind differenzierter als die pluripotenten Stammzellen und können sich in eine oder mehrere hämatopoetische Richtungen entwickeln. Progenitorzellen machen zusammen ca. 1% der Knochenmarkzellen aus (Knapp et al. 1995, Link et al. 1997). (Abb. 1.1).

Eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differentiation der Blutzellen, spielen die sog. Zytokine. Dies sind hämatopoetische Wachstumsfaktoren (CSF=Colony stimulating factors), die als parakrine Hormone (Peptide) u.a. von Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen produziert und freigesetzt werden (Dexter 1989). Darüber hinaus sind an der Blutbildung eine Reihe anderer Hormone, z.B. Kathecholamine, Steroidhormone, Schilddrüsenhormone und das Wachstumshormon (STH), beteiligt. Als wichtigste Wachstumsfaktoren seien die Interleukine (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-11), Stammzell Faktor (SCF), Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF),

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), Erythropoietin (Epo) und Thrombopoietin (Tpo) genannt. Die Wachstumsfaktoren können aktivierend, inhibierend oder synergistisch auf die Entwicklung und Ausreifung der Blutzellen wirken.

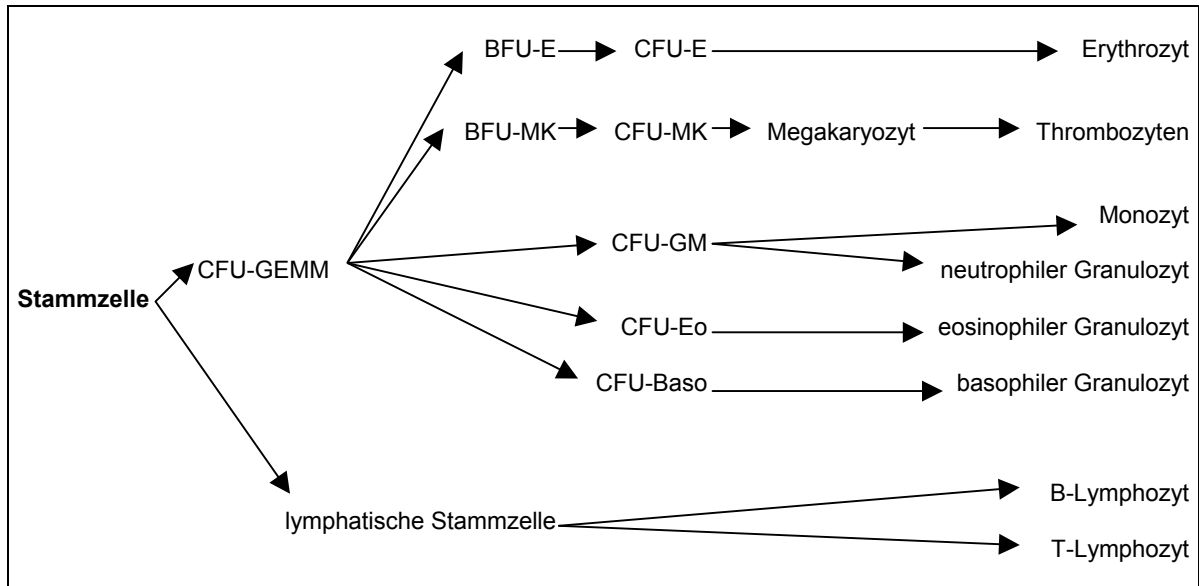


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung der Hämatoopoese. BFU: burst forming unit; CFU: colony forming unit; GEMM: granulocyte-erythrozyte-monocyte-megakaryocyte; E: erythrocyte; MK: megakaryocyte; GM: granulocyte-monocyte; Eo: eosinophil; Baso: basophil (nach Begemann 1993)

1.3. Zellkulturen zur Differenzierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen

Zur Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen können u.a. Zellkulturen verwendet werden. Es können dabei grundsätzlich zwei verschiedene Techniken unterschieden werden: Flüssigkulturen und semisoliden Zellkulturen.

1.3.1. Semisoliden Zellkulturen

Bei semisoliden Zellkulturen werden Wachstumsmedien verwendet, die Kolonienbildung in einer semisoliden Matrix fördern. Solche Substanzen sind z.B. Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) als Grundsubstanz, 2-Mercaptoethanol und fötales Kälberserum (FCS), Pferdeserum oder humanes Plasma. Weil tierische oder humane serum- oder plasmahaltige Wachstumsmedien durch die, darin vorkommenden Substanzen das Wachstum der Zellkolonien beeinflussen können, können auch sogenannte serumfreie

Wachstumsmedien verwendet werden. Diese beinhalten statt Serum oder Plasma Albumin, Transferrin, Eisen, ungesättigte Fettsäuren, Lecithin, Cholesterol etc. (Iscove et al.1980). Die semisoliden Konsistenz des Zellkulturmediums wird durch Zufügen von 0,3% Agar oder 0,9% Methylzellulose erreicht (Messner 1984). Üblicherweise werden, je nach Fragestellung, unterschiedliche Zytokine (Wachstumsfaktoren) zur Evaluation der Klonogenität verschiedener Stammzell-/Progenitorzellproben eingesetzt. Anschließend folgt eine 12 bis 20-tägige Inkubation bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Ausgewertet werden die Kolonien unter einem Inversionsmikroskop. Die beobachteten Kolonien (BFU-E, CFU-E, CFU-MK etc.) werden morphologisch (Farbe, Größe, Form etc.) unterschieden. Dies war die übliche Methode vor Einführung der immunhistochemischen Untersuchungsmethoden.

1.3.2. Flüssige Zellkulturmedien

Die Zusammensetzung der flüssigen Zellkulturmedien unterscheidet sich von semisoliden Zellkulturmedien nur durch das Fehlen der matrixbildenden Substanzen (Agar, Methylzellulose).

Auch hier können serum-haltige oder serum-freie Kulturmedien verwendet werden. Nach Ende der Inkubation werden die Zellen aus dem Kulturmedium gewaschen und mit verschiedenen Untersuchungsmethoden (z.B. APAAP-Färbung, Immunfluoreszenzfärbung, Durchflußzytometrie etc.) untersucht, bzw. können anschließend zur Koloniedifferenzierung in semisoliden Kulturmedien erneut inkubiert werden.

1.4. Oberflächenantigene (CD)

Die Blutzellen (Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten), aber auch andere Zellen besitzen Oberflächenmoleküle (Antigene), nach denen sie systematisch in Gruppen (clusters) erfasst und funktionell, biochemisch und genetisch aufgeschlüsselt werden können. Diese Nomenklatur wird auf Englisch als cluster of differentiation kurz als CD-Nomenklatur bezeichnet (Bock 1993).

Aus den lymphopoetischen Stammzellen entstehen in mehreren Schritten die Bausteine des zellulären und humoralen Immunsystems, die T- und die B-

Lymphozyten. Diese können anhand der o.g. unterschiedlichen Oberflächenmerkmale identifiziert werden. Neben der Transplantationsimmunologie spielen die T-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen, insbesondere bei Infektionen durch Pilze, Viren, Tuberkulose- und Lepraerreger sowie in der Tumoralabwehr und bei der Allergie vom verzögerten Typ. Die B-Zellen sind für die Produktion von Immunglobulinen sowie für die Präsentation von Antigenen zuständig.

1.4.1. Das CD34-Antigen

Das CD34-Antigen ist ein glykolysiertes, transmembranes Typ I Protein, dessen Molekulargewicht ca. 116 kDa beträgt. Es wurde 1984 als erstes von Civin et al. (Civin et al. 1984) beschrieben. Das Antigen befindet sich auf der Oberfläche von frühen lymphohämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, den Endothelzellen kleiner Blutgefäße und embryonalen Fibroblasten (Krause et al. 1996). Eine wichtige Eigenschaft der CD34⁺-Zellen ist ihre Fähigkeit nach Knochenmarkstransplantation eine dauerhafte Lymphohämatopoese aufzubauen (Berenson et al. 1991). Von praktischer Bedeutung ist das CD34-Antigen daher besonders im Rahmen einer Stammzelltransplantation. Diagnostisch ist das Antigen bei der Beurteilung des Blastenanteils beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder der chronisch myeloischen Leukämie (CML) hilfreich (Hastka 1997). Unter dem Mikroskop sehen die CD34⁺-Zellen wie Blasten aus, die etwas größer als die Lymphozyten sind (Baines et al. 1988, Terstappen et al. 1991). Mit zunehmender Reifung und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen nimmt die Expression des CD34-Antigens ab (Bühning et al. 1989). Von den MNC (Mononukleären Zellen) des Knochenmarkes sind ca. 1-2% CD34⁺-Zellen, im peripheren Blut sind es 0,1-0,2% und im Nabelschnurblut 0,8-1,2% (Link 1997).

1.4.2. Das CD3-Antigen

Das CD3-Antigen ist eines der wichtigsten T-Zellmarker und ist seit 1982 bekannt (Kung et al. 1979). Das CD3-Antigen besteht aus mindestens fünf verschiedenen Polypeptidketten. Das Molekulargewicht liegt zwischen 16 kD und 28 kD. Die

verschiedenen Ketten werden als Gamma-, Delta-, Epsilon-, Zeta- und Eta-Ketten bezeichnet. Die meisten monoklonal hergestellten Antikörper richten sich gegen die Epsilon-Kette, deren Gewicht ca. 20 kD beträgt (Clevers et al. 1988). Das CD3-Antigen kommt an der Oberfläche aller reifen T-Lymphozyten vor und wird deshalb als Pan-T-Zellmarker zu deren Nachweis und Quantifizierung angewandt (Hastka 1997). Das CD3-Antigen ist Teil eines T-Lymphozytenrezeptors, der Fremdstrukturen erkennt. Eine Strategie_immunsuppressiver Therapie ist die Verwendung monoklonaler Antikörper aus der Klasse der IgG, die gegen das CD3-Antigen der T-Lymphozyten gerichtet sind. Nach Bindung des monoklonalen Antikörpers an das CD3-Antigen sind die Rezeptoren nicht mehr in der Lage Fremdartigene z.B. die eines transplantierten Organs zu identifizieren (Buddecke 1989). Im peripheren Blut beträgt der Anteil der CD3-positiven T-Lymphozyten an der lymphozytären Gesamtpopulation etwa 75%; das Antigen wird auch von 65-85% der Thymozyten und von den Purkinje-Zellen im Kleinhirn exprimiert (Hastka 1997). Im Krankenhausalltag wird die Bestimmung der CD3-positiven Zellen bei der Diagnostik von chronisch lymphatischen Leukämie, des Sezary-Syndrom, der Mycosis fungoides und der erwachsenen T-Zellleukämie eingesetzt.

1.4.3. Das CD4-Antigen

Bei der Abwehr einer Reihe von Antigenen benötigen die B-Lymphozyten die Gegenwart aktiver Lymphozyten, damit sie Antikörper bilden können. Die dafür zuständigen Zellen werden als Helfer-Zellen oder T4-Zellen bezeichnet, die durch das Zelloberflächenantigen CD4 gekennzeichnet sind. Dies ist ein 55 kDa großes transmembranöses Glykoprotein, das zur Immunoglobulin-Superfamilie gehört (Ibelgaufts 1992, Lanier 1991). Es kommt auf ca. 45% der peripheren Lymphozyten und 80-95% der Thymozyten vor (Hastka 1997). Das CD4-Antigen konnte auf dem humanen Chromosom 2 lokalisiert werden. Die CD4-positiven T-Helfer-Zellen produzieren nach Aktivierung eine Vielzahl von immunstimulierten Zytokinen (z.B. IL-2, -3, -4, -5, und -6) (Ibelgaufts 1992, Lanier 1991). Die Funktion der T-Helferzellen besteht darin, andere Zellen dahingehend zu unterstützen, dass sie entsprechend ihrer Bestimmung aktiv werden können. Dabei lassen sich drei Aufgabenbereiche abgrenzen: 1. Die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten zur antikörperbildenden Plasmazelle (IL-2, -4, -5 und -6), 2. die

Differenzierung von Vorläuferzellen zu zytotoxischen T-Zellen (IL-2) und 3. die Befähigung von Makrophagen (IFN- γ) zur Antigenpräsentation sowie zur Abtötung intrazellulärer Mikroorganismen (Bock v. 1993). Das CD4-Antigen funktioniert auch als Rezeptor für MHC Klasse II Moleküle und für das HI-Virus. Das Antigen wird beim Menschen nicht nur auf peripheren T-Zellen und Thymozyten sondern auch auf Makrophagen exprimiert. Monoklonale Antikörper gegen CD4 inhibieren die Funktionen der Zellen in vitro und sind u.a. in Tiermodellen für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt worden (Ibelgaufts 1992, Lanier 1991).

1.4.4. Das CD5-Antigen

Das Antigen CD5 ist ein Oberflächenglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 67 Kda (Reiter 1989) und ist auf ca. 70% der peripheren Lymphozyten und 95% der Thymozyten nachweisbar (Hastka 1997). Alle T-Zellen in der Milz und den Lymphknoten sowie viele T-Zelleukämien und Lymphome exprimieren dieses Antigen und es wird regelmäßig bei der chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-CLL) und dem zentrozytischen Non-Hodgkin-Lymphom (cc-NHL) nachgewiesen (Hastka 1997). Auch ein kleiner Anteil normaler B-Zellen präsentiert das CD5-Antigen (Hardy 1994). Diese CD-5-positiven B-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen (Hastka 1997).

1.4.5. Das CD6-Antigen

Das CD6-Antigen ist ein Glykopolypeptid mit einem Molekulargewicht von 100kDa. Es wird von über 95% der normalen humanen T-Zellen präsentiert. Im Gegensatz zur normalen B-Zellen, die CD6-negativ sind, scheint ein kleiner Anteil der niedrig-malignen B-Zell-Lymphomzellen dieses Antigen zu besitzen. Unter den bisher bekannten T-Zellantigenen ist das CD6-Antigen eines, das erst relativ spät während der fötalen Entwicklung auftritt (Feller et al. 1986).

1.4.6. Das CD8-Antigen

Das CD8-Antigen ist das Antigen der T-Suppressorzellen (Hastka 1997).

Das CD8-Oberflächenprotein ist ein transmembranöses Glykoprotein. Es gehört, wie das CD4-Antigen zur Immunoglobulin-Superfamilie. Das kodierende Gen liegt im menschlichem Genom auf Chromosom 2. CD8⁺-Zellen sind zytotoxische T-Lymphozyten, die die Ziel-Zellen (target-cells) über direkten Zellkontakt lysieren. Sie spielen eine Rolle in der Abtötung von virusinfizierten Zellen, Tumorzellen und bei der Abstoßung von Transplantaten, da sie fremde MHC-Klasse I tragende Zellen erkennen und abtöten (Ibelgaufts 1992, Bock 1993). Das CD8-Antigen hat ein Molekulargewicht von 32 kDa. Es wird auf bis zu 80 % der humanen Knochenmark-T-Zellen, etwa 30% der normalen peripheren Lymphozyten und 60-85% der Thymozyten nachgewiesen (Hastka 1997). CD8⁺ wird neben der Bestimmung von CD4⁺-Zellen hauptsächlich in HIV-Diagnostik eingesetzt.

1.4.7. Das CD10-Antigen

Das CD10-Antigen wird aufgrund seines vermehrten Auftretens auf den Zellen der akuten lymphoplastischen Leukämie auch als CALLA-Antigen (common acute lymphoblastic leukemia antigen) bezeichnet. Das CD10-Antigen wird von einem kleinen Teil der normalen humanen Knochenmarkzellen produziert. Es hat ein Molekulargewicht von 100 kDa und ist ein polypeptisches Glykoprotein. Das Antigen entspricht der neutralen Endopeptidase und ist in Chromosom 3 auf Position q21-27 codiert (Barker et al. 1989). Neben den CD9- und CD23 – Antigenen scheint auch das CD10-Antigen als Fc-Rezeptor für IgE zu dienen (Kamani et al. 1991). Es reduziert möglicherweise zusätzlich die Aktivität von Peptidhormonen und wird sowohl auf den T- als auch den B-Zellen gefunden (Human Cluster of Differentiation (CD) Antigens -Chart, R&D Systems 1996).

1.4.8. Das CD19-Antigen

Das CD19-Antigen ist ein transmembranöses Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 90 kDa. Das Antigen scheint mindestens zwei extrazelluläre Domänen zu haben, die immunoglobulin-ähnlich sind. Die intrazytoplasmatische Domäne hat Ähnlichkeiten mit Proteinen, die von dem Epstein-Barr Virus und dem

IMT-1 Onkogen freigesetzt werden (Stamenkovic und Seed 1988). Das CD19-Antigen tritt in der frühen Phase der B-Zellentwicklung auf und geht erst kurz vor der Umwandlung in eine Plasmazelle verloren, so ist das CD19 an ca. 10% der peripheren Lymphozyten nachweisbar (Hastka 1997). CD19 wird in peripherem Blut, Knochenmark und in anderem Gewebe gefunden (Mason et al. 1986) und wird als "Pan-B-Zellmarker" bei der Quantifizierung von B-Lymphozyten angewandt (Hastka 1997). Auch neoplastische Zellen z.B. Zellen bei der akuten B-Zellleukämie präsentieren das CD19-Antigen (Campos et al. 1988) und so findet die Bestimmung von CD19⁺-Zellen insbesondere bei der Diagnostik von hämatologischen Neoplasien Verwendung (Hastka 1997).

1.5. Zellseparation

CD34⁺-Zellen können für wissenschaftliche Zwecke oder zur klinischen Verwendung aus den mononukleären Zellen (MNC) des Knochenmarks, peripheren Blutstammzellen oder Nabelschnurblut mit verschiedenen Methoden selektiert werden.

Eine Möglichkeit die CD34⁺-Zellen zu selektieren ist die Verwendung von sog. FACS-Geräten ("Fluorescence activated cell sorting"). Dabei werden die spezifischen Oberflächenantigene der zu selektierenden Zellen mit mit Immunfluoreszenz-Farbstoffen gekoppelten Antikörpern markiert und in dem FACS-Gerät entsprechend ihrer Fluoreszenz selektiert. Der Reinheitsgrad dieser Methode ist sehr hoch (über 90%) und sie eignet sich ebenfalls gut zur Selektion von Subpopulationen, die mit einer zweiten Färbung markiert werden können (Debili et al. 1992, Winslow et al. 1994). Der Nachteil der FACS-Separation liegt in der Dauer der Prozedur: von der Ficoll-Separation bis zum Ende der FACS-Messung werden ca. 6-8 Stunden benötigt.

Eine weitere gebräuchliche Methode der Separation von CD34⁺-Zellen ist die Verwendung von Zellseparationssäulen unterschiedlicher Techniken. Bei der Separation mit Ceparate LC-Säulen (CellPro, Biothel, WA, USA) werden die MNC zuerst mit einem Anti-CD34-Antikörper und anschließend mit einem biotinkoppelten Antikörper gegen den Anti-CD34-Antikörper markiert. Anschließend laufen die Zellen durch die Separationssäulen und die markierten CD34⁺-Zellen werden in der Säule durch einen Avidin-Biotin-

Immunoaffinitätsprozeß zurückgehalten und können anschließend herausgewaschen werden. Nach Winslow et al. (1994) liegt der Reinheitsgrad bei dieser Methode bei $73 \pm 14\%$.

In dieser Arbeit wurde die Zellseparation mit MiniMACS -Zellseparationssäulen (Milteney Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach der Methode von Milteney et al. (1994) durchgeführt. Die CD34⁺-Zellen werden zuerst mit einem Anti-CD34-Antikörper markiert, an den, in einem zweiten Schritt, ein mit einem paramagnetischen Teilchen gekoppelter Antikörper angelagert wird. Die so markierten CD34⁺-Zellen werden in eine Separationssäule, die in einem Magneten platziert ist, gegeben. Beim Durchlaufen der Zellsuspension durch die Säule werden die markierten CD34⁺-Zellen in dem magnetischen Feld zurückgehalten. Nach Entfernen der Säule aus dem Magneten können die CD34⁺-Zellen elutriert werden. Der Reinheitsgrad bei dieser Messung liegt nach Milteney et al. (1994) bei über 95%. Die Methode wird genauer im Kapitel 2.3 im Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

1.6. Zellzyklus

Wenn man eine Zelle, z.B. eine menschliche Hautzelle, über längeren Zeitraum hinweg beobachtet, dann wächst die Zelle so lange, bis sie eine gewisse Größe erreicht hat und teilt sich dann um erneut zu wachsen. Diese Periode von einer Zellteilung und Zellreifung bis zur nächsten Zellteilung wird Zellzyklus genannt. Der Zellzyklus wird in einzelne, unterschiedlich lange Phasen: G1-, S-, G2- und Mitose-Phase unterteilt (Abb. 1.2) (Hirsch-Kauffmann und Schweiger 1987).

Wie aus der Abbildung 1.2 hervorgeht, steht der Mitose-Phase, in der die Zellteilung stattfindet, der übrige Zellzyklus als Interphase gegenüber. Das wichtigste Ereignis der Interphase ist die Verdoppelung der DNA. Diese Replikationsphase der DNA wird als S-Phase, Synthesephase, bezeichnet. Ihre durchschnittliche Dauer beträgt ca. 8 Stunden. Die für die Zellteilung benötigten DNA-Bindungsproteine, die sog. Histone, werden hauptsächlich während der Synthesephase synthetisiert. Die zwischen Mitose und S-Phase einerseits und zwischen S-Phase und nächster Mitose andererseits verbleibenden Perioden sind die sogenannten G-Phasen (G = gap) G1 und G2. Die G1-Phase, die postmitotische Ruhephase, ist eine intensive Wachstumsphase der Zelle, mit

ausgeprägter RNA- und Proteinsynthese. In der späten G1-Phase werden im Zytoplasma die Zentriolen verdoppelt. Die Dauer dieser Phase ist variabel. Eine G1-Phase ohne nachfolgende S-Phase wird als G0-Phase oder Ruhephase bezeichnet, die Zellen nehmen am Zellzyklus nicht mehr Teil, bleiben aber unter bestimmten Voraussetzungen zu erneuter Proliferation fähig. In der, nach der S-Phase beginnenden prämitotischen Ruhephase, G2-Phase, die auch als Korrekturphase bezeichnet werden kann, werden Reparaturen an der DNA vorgenommen. Auch die für die Zellteilung notwendigen Proteine werden in dieser ca. 4 Stunden dauernden Phase synthetisiert. Die als nächstes folgende Mitose läuft in mehreren aufeinanderfolgenden Stufen ab und führt letztendlich in ca. 3 Stunden mittels Durchschnürung der Mutterzelle zur Bildung zweier Tochterzellen (Hirsch-Kauffmann und Schweiger 1987).

In einem Teil dieser Arbeit wurden mit zwei verschiedenen Antigenen, nämlich Cyclin D1 und Cyclin A, die Wachstumsphase und die DNA-Synthesephase der Nabelschnurblutzellen und Knochenmarkzellen nach immunomagnetischer CD34⁺-Selektion untersucht und miteinander verglichen. Die Fragestellung beruht auf der Hypothese, dass die unreiferen Nabelschnurblutzellen deutlich teilungsaktiver wären als die reiferen Knochenmarkzellen und dass sich dementsprechend im Vergleich zu den Knochenmarkzellen mehr Nabelschnurblutzellen in der G1- und S-Phase befinden.

Die Phasen des Zellzyklus

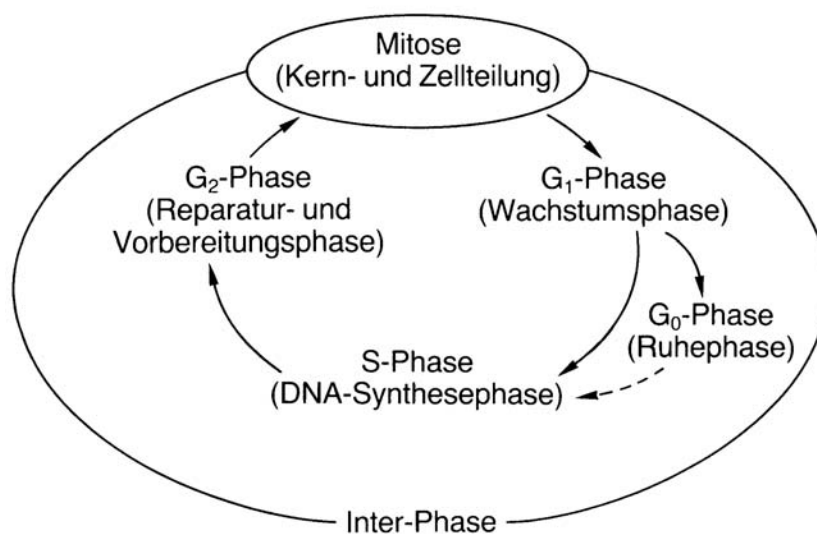


Abbildung 1.2: Die Phasen des Zellzyklus (Hirsch-Kaufmann 1987)

1.7. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Hämatopoetische CD34⁺-Stammzellen können aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut gewonnen werden. Im Knochenmark beträgt der Anteil der Stammzellen an den mononukleären Zellen (MNC) 1-2%, in peripherem Blut 0,1-0,2% und im Nabelschnurblut 0,8-1,2% (Link 1997). Eine Indikation zur Knochenmark- oder Stammzelltransplantation ist bei malignen und nicht-malignen Erkrankungen gegeben, bei denen eine zerstörte oder defekte Hämato- und Lymphopoese ersetzt oder substituiert werden muss (Begemann 1999). Zusätzliche Indikationen sind bei Erbkrankheiten mit Enzymmangel gegeben, bei denen die Blutzellen die defekten oder fehlenden Enzyme produzieren können.

1.7.1. Autologe und allogene Stammzelltransplantation

Von autologen Transplantationen spricht man, wenn die transplantierten Zellen vom Empfänger selbst stammen. Da sie genetisch identisch sind, können sie keine Abstoßungsreaktion verursachen. Das autologe Transplantat kann aber bei malignen Tumorerkrankungen mit Tumorzellen kontaminiert sein, wodurch das Rezidivrisiko erhöht ist (Begemann 1999). Ebenfalls fehlt der immunologische, tumor-verhindernde Graft-versus-Leucemia-Effekt. Durch Selektion von CD34⁺-Zellen oder durch Antikörper vermittelte Lyse von Lymphozyten oder, wenn möglich Tumorzellen, wenn diese spezifische Antikörper besitzen, wird versucht, das autologe Transplantat von Tumorzellen zu reinigen. Diese sog. Purging-Verfahren sind weiterhin Gegenstand weltweiter Forschung.

Bei allogenen Transplantationen werden die zu transplantierenden Zellen einem HLA-identischen, verwandten oder nicht-verwandten, Spender entnommen. Weil die allogenen Transplantationen mit einer erheblichen Gefahr einer Abstoßungsreaktion einhergehen, muss bei der Vorbereitung der Transplantation das Immunsystem des Empfängers unterdrückt und ausgelöscht werden (Link 1997). Eine HLA-Inkompatibilität ist neben einem erhöhten Risiko einer Abstoßungsreaktion auch mit einem verzögerten Engraftment („Anwachsen“ der Zellen mit selbständiger Produktion der Blutzellen) und einem vermehrten Auftreten einer akuten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) verbunden (Long und Blume 1995). Ein Sonderfall der allogenen Transplantation ist die sog. syngene

Transplantation, wo Spender und Empfänger eineiige Zwillinge, und damit genetisch identisch sind. Die Unterschiede zwischen den Transplantationsarten müssen bei der Indikationsstellung berücksichtigt werden.

Eine Knochenmarktransplantation (KMT) und eine Transplantation der peripheren Blutzellen (PBSZT) können sowohl in autologer als auch allogener Form durchgeführt werden. Die neueste Stammzelltransplantationsmethode, die Nabelschnurbluttransplantation (NBT/CBT), gehört in den meisten Fällen zu den allogenen Transplantationen.

1.7.2. Indikationen

Die Indikation zur myeloablativen Therapie und Transplantation mit autologen oder allogenen hämatopoetischen Stammzellen kann bei malignen Erkrankungen der Hämatopoese und Lymphopoese, bei soliden Tumoren und Knochenmarkaplasie gestellt werden, wenn die Prognose mit konventioneller Therapie ungünstig ist (Link 1997).

Die Ziele der Therapie sind:

- Ersatz der zerstörten Hämatopoese und Lymphopoese nach myeloablativer Ganzkörperbestrahlung und/oder Chemotherapie, die zur maximalen Reduktion maligner Zellen durchgeführt wurden.
- Substitution defekter oder fehlender Zellen der Hämatopoese oder Lymphopoese.
- Nutzung des GvL- bzw. GvT-Effektes bei myeloischen und lymphoiden Neoplasien.
- Beschleunigung der hämatopoetischen Regeneration nach myelosuppressiver, nicht myeloablativer auch wiederholter intensiver Strahlen oder Chemotherapie maligner Erkrankungen.
- Bei Speicherkrankheiten zur permanenten Substitution und Produktion fehlender Enzyme durch die transplantierten Zellen.

(Link 1997)

Unterschiedliche Indikationen zur myeloablativen Therapie mit Stammzelltransplantation differenziert nach Grundkrankheit und Stammzellherkunft sind in der Tabelle 1.1 aufgelistet.

Allogene Stammzell-Transplantation	Autologe Stammzell-Transplantation
Akute Leukämie	Akute Leukämie
Chronisch myeloische Leukämie	Lymphome
Myelodysplastische Syndrome	Morbus Hodgkin
Myeloproliferative Syndrome	Plasmozytom
Plasmozytom	Ausgewählte solide Tumoren
Aplastische Anämie	Neuroblastom
Fanconi Anämie	
Thalassämie	
Sichelzellanämie	
Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	
Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)	
Speicherkrankheiten	

Tabelle 1.1: Wichtige Indikationen zu allogenen und autologen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (Link et al. 1997, Link 1997)

1.7.3. Quellen hämatopoetischer Stammzellen

1.7.3.1. Knochenmark

Das Knochenmark wird dem Spender unter sterilen Bedingungen in Vollnarkose oder Spinalanästhesie meistens aus dem Beckenkamm entnommen. An verschiedenen Stellen des Beckenkamms werden, um eine Kontamination mit peripheren Blutzellen zu vermeiden, durch mehrfache Punktionen insgesamt etwa 2×10^{10} kernhaltige Knochenmarkzellen in einem Volumen von 1000 bis 1200 ml aspiriert, entsprechend 10 bis 20 ml pro Kilogramm Körpergewicht (Link 1997). Aus dem gewonnenen Blut werden die Stammzellen herausgefiltert und dem Empfänger wie eine Bluttransfusion in die Blutbahn transfundiert oder nach Separation der mononukleären Zellen unter Zugabe von Kryopräservativa wie Dimethylsulfoxyd (DMSO), Albumin, Hydroxyethylstärke etc. eingefroren und bis zur Transplantation in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt (Begemann 1999, Schaefer und Beelen, McLaughlin und Ku 1994).

1.7.3.2. Periphere Blutstammzellen

Die Aspiration von Stammzellen aus dem Knochenmark ist weitestgehend durch die Blutstammzellseparation (Leukapherese) ersetzt worden (Link 1997).

Weil das periphere Blut ca. zehn Prozent weniger Stammzellen enthält als das Knochenmark, werden zur peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) dem Spender über fünf bis sieben Tage subkutan G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) injiziert (Link 1997). Diese sog. Mobilisation von Blutstammzellen führt über eine Proliferation der Stammzellen im Knochenmark zu einem vermehrtem Austreten der Stammzellen aus dem Markraum in das periphere Blut (Körbling et al. 1995, Lane et al. 1995, Schmitz et al. 1996). Im Gegensatz zu einer Knochenmarktransplantation (KMT) ist bei einer Transplantation der peripheren Blutstammzellen (PBSZT) eine Narkose des Spenders zur Stammzellgewinnung nicht notwendig. In mehreren Leukapheresesitzungen werden dem Spender die mobilisierten Stammzellen aus dem Blut "gefiltert", die übrigen Blutbestandteile (Plasma, Erythrozyten, Thrombozyten, etc.) werden zurückgeführt (Schwella und Huhn 1998). Diese Technik kann selbst bei den Kindern angewendet werden (Emminger et al. 1989, Takaue et al. 1995). Ein weiterer wichtiger Vorteil der PBSZT ist, dass das Engraftment im allgemeinen schneller eintritt als nach einer KMT (Glaspy et al. 1996).

1.7.3.3. Nabelschnurblut

Siehe Kapitel 1.10.

1.7.4. Methode der Transplantation

Jede autologe und allogene Transplantation muss durch eine sog. Konditionierung eingeleitet werden. Das Ziel dieser myeloablativen Therapie ist erstens eine möglichst effektive Beseitigung des Empfänger-Knochenmarks und der Tumorzellen und zweitens (nur bei allogenen Transplantationen) eine Immunsuppression zur Vermeidung der Transplantatabstoßung (Pfreundschuh 1997). Weil bei der Konditionierung Zytostatika, Bestrahlung und Glukokortikoide verwendet werden, entsprechen die Nebenwirkungen der Therapie den

Nebenwirkungen und Toxizitäten der gegebenen Medikamente und der Bestrahlung. Nach der Konditionierung werden das Knochenmark oder die Stammzellen dem Empfänger wie eine Bluttransfusion transplantiert. Es werden mindestens $1-2 \times 10^8$ mononukleäre Zellen oder 2×10^6 CD34⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers benötigt (Pfreundschuh 1997). Eine erfolgreiche allogene Transplantation macht sich durch einen Chimärismus erkennbar, die Blutzellen des Empfängers weisen die Blutgruppe und die chromosomalen und molekulargenetischen Merkmale des Spenders auf, während die übrigen Gewebe die ursprünglichen genetischen Eigenschaften des Empfängers besitzen (Link 1997).

1.7.5. Engraftment

Das „Anwachsen“ des Knochenmarks wird als Engraftment bezeichnet. Hämato- und Lymphopoese brauchen ca. 14-28 Tage zum Regenerieren, wobei die Zeitspanne durch Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) verkürzt werden kann (Link 1997). Kennzeichnend für das Engraftment ist der Anstieg der Leukozytenzahl über 1000/ μ l und eine Thrombozytenzahl von über 20 000/ μ l nach einem, mindestens 3 Tage andauernden thrombozyten-substitutionsfreien Intervall. In der vorausgehenden aplastischen Phase, in der die Leukozytenzahl sogar unter einer messbaren Grenze liegen, sind die Patienten sehr infektgefährdet und müssen dementsprechend prophylaktisch mit Antibiotika und Antimykotika und ggf. Virustatika behandelt werden und sich in einer möglichst sterilen Umgebung aufhalten.

1.7.6. Komplikationen

Die Probleme und Risiken einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation resultieren in erster Linie aus den Nebenwirkungen der myeloablativen Therapie, aus immunologischen Komplikationen und dem biologischen Verhalten der Grunderkrankung nach der Transplantation (Schaefer und Beelen 1991).

Es kann zwischen toxischen, infektiösen und immunologischen Komplikationen unterschieden werden.

Nach Link et al. (1997) bestimmen vier Faktoren die wesentlichen Toxizität und Komplikationen der Therapie:

1. Grundkrankheit
2. Intensität und Art der Behandlung: a) hochdosierte, myelosuppressive Therapie, b) myeloablative Therapie, c) myeloablative Therapie mit maximaler Immunsuppression (Konditionierung)
3. Zeitdauer und Ausprägung von Knochenmarkinsuffizienz, insbesondere von Leukozytopenie und Thrombozytopenie sowie der Immundefizienz
4. Herkunft der Hämatopoetischen Stammzellen und die davon abhängige, Indizienz von Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) und Immundefizienz bei:
a) autologen oder syngenen Stammzellen von Familienspendern, b) allogenen Stammzellen von Familienspendern oder c) allogenen Stammzellen von nichtverwandten Spendern

Unter Frühtoxizität werden Komplikationen und Nebenwirkungen der Chemotherapeutika und der Bestrahlung verstanden, die unmittelbar nach Behandlung auftreten. Solche sind z.B. Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Mukositis, Diarrhöe, Parotisschwellung, generalisierte Ödeme, Lebervenen-Verschluss-Krankheit, hämorrhagische Zystitis, Kardiomyopathie, interstitielle Pneumonie etc.. Organfunktionsstörungen, die später als 100 Tage nach einer Transplantation auftreten, können häufig als Spätmanifestationen einer durch die Konditionierungstherapie bedingten Toxizität identifiziert werden. Bekannte späte Nebenwirkungen der Konditionierungsbehandlung sind z.B. Katarakt, Gonadeninsuffizienz, Wachstumsstörungen bei Kindern sowie sekundäre Malignome (Schaefer und Beelen 1991).

Infektionen bilden eine weitere Gruppe schwieriger Komplikationen vor und nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation. Septische Infektionen durch Bakterien und Pilze treten vor allem in der aplastischen Phase auf. Während der längerfristigen immunsupprimierten Phase nach der Transplantation kommen besonders opportunistische Infektionen wie z.B. interstitielle Pneumonie durch CMV vor (Schaefer und Beelen 1991).

Ein Tumorrezidivrisiko nach KMT ist in erster Linie vom Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Transplantation und von Transplantationsart abhängig. Nach allogener KMT scheint die Rezidivwahrscheinlichkeit geringer zu sein, als nach autologer oder syngener Transplantation oder bei Patienten, die eine schwere akute oder chronische GvHD entwickeln (Schaefer und Beelen 1991). Nach

Schaefer und Beelen (1991) ist die Rezidivwahrscheinlichkeit z.B. bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) bei KMT in der 1. Vollremission 20% - 25%, in der 2. Vollremission ca. 40% und in weiter fortgeschrittenen Stadien ca. 60% .

Zu den wichtigsten Ursachen der transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität innerhalb der ersten Monate nach Knochenmark- oder Stammzell-Transplantation gehört auch die sog. Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease) (Klingebiel und Schlegel 1998). Die Ursachen dieser immunologischen Komplikation sind Differenzen in den Antigenen zwischen Spender- und Empfängerzellen, mit der Folge von zytokininduzierter und zytotoxischer immunologischer Reaktionen (Siehe Kapitel 1.8.).

1.7.6.1. Prophylaxe und Behandlung der Komplikationen

Die Vorbeugung möglicher Komplikationen muss schon vor der Transplantation begonnen werden. Von der myeloablativen Therapie bis über das Anwachsen der transplantierten Zellen hinaus müssen die Patienten sowohl prophylaktisch und ggf. auch therapeutisch mit antibiotischen, antimykotischen und antiviralen Substanzen behandelt werden. Eine parenterale Ernährung ist z.B. bei toxischer Mukositis des Gastrointestinaltraktes indiziert. Auch antiemetische Therapie, Schmerzbekämpfung mit Opiaten oder Gabe von keimfreien Blutprodukten muss meist eingesetzt werden. Regelmäßige Blutentnahmen mit Spezialuntersuchungen (u.a. Pilz- und Virusserologie, Bakterienkulturen, Wachstumshormon bei Kindern etc.) sowie Röntgen-Aufnahmen des Thorax, Lungenfunktionsanalyse, EKG, Echokardiographie und Abdomen-Sonografie gehören zur Routine. Viele dieser Behandlungsmethoden richten sich nach den verwendeten Substanzen oder der verwendeten Bestrahlung. Z.B. muss nach Cyclophosphamid-Gabe insbesondere auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr geachtet werden, um einer Nierenschädigung vorzubeugen; bei allen weiblichen Patienten, die mit einer Ganzkörperbestrahlung behandelt wurden, ist eine lebenslange Hormonsubstitution notwendig. Nicht zu vergessen ist auch die psychosoziale Betreuung der Patienten und der Angehörigen. Nach Entlassung werden die Kontrolluntersuchungen im Rahmen der ambulanten Nachsorge weitergeführt. Grundsätzlich sollen alle Patienten lebenslang in größeren Abständen in einem Transplantationszentrum nachbetreut werden (Schaefer und

Beelen 1991). Prophylaxe und Therapie der Graft-versus-Host- Disease siehe Kapitel 1.8.4.

1.8. Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Die Graft-versus-Host-Disease (GvHD) oder Transplantat-Gegen-Wirt-Reaktion ist eine wesentliche Transplantationskomplikation bei allogenen Stammzelltransplantationen und tritt auf, wenn nach Engraftment des Transplantats allogene Spender-T-Lymphozyten auf Empfänger-Antigene reagieren und eine immunologische Antwort gegen Empfängergewebe verursachen. Schon im Jahr 1966 wurden von Billingham drei Voraussetzungen für die Entwicklung einer GvHD beschrieben: das Transplantat muss immunkompetente Zellen erhalten, das Transplantat muss den Empfängerorganismus als fremd erkennen und der Empfänger ist nicht in der Lage effektiv gegen die fremden Spenderzellen zu reagieren (Billingham 1966). Eine GvHD ist bei starker Ausprägung mit einer hohen Letalität behaftet. Entscheidend für die Ausprägung der GvHD ist die genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger. Je mehr Unterschiede zwischen den HLA-Merkmalen bestehen, desto höher ist das Risiko einer GvHD. Aufgrund von Differenzen der Gewebsverträglichkeits-Antigene außerhalb des MHC (Major histocompatibility complex) können jedoch auch bei vollständiger Übereinstimmung der HLA-Antigene Unverträglichkeits-Reaktionen auftreten (Schaefer und Beelen 1991). Weitere wichtige Risikofaktoren für das Auftreten einer GvHD sind hohes Alter, schlechter Allgemeinzustand des Empfängers, Geschlechterdifferenz zwischen Spender und Empfänger, positiver CMV-Status oder Alloimmunisierung des Spenders durch Transfusion oder Schwangerschaft (Link et al.1997). Eine Entfernung von immunkompetenten T-Lymphozyten aus dem Transplantat verringert die Häufigkeit einer GvHD, wobei eine totale T-Zell-Depletion wiederum mit einem erhöhtem Risiko eines leukämischen Rückfalls korreliert bzw. die Patienten mit diskreter GvHD seltener einen Rückfall erleiden. Dieser Effekt wird Graft-versus-Leucemia-Effekt (GvL) genannt. (Nagler et al. 1998, Schaefer und Beelen 1991) .

1.8.1. Pathophysiologie der Graft-versus-Host-Disease

Die GvHD nach Stammzell-Transplantation ist ein pathophysiologischer Prozess, der von alloreaktiven Spender-T-Lymphozyten verursacht wird, und sich als Multiorgandysfunktion manifestieren kann. Die aktivierten Spender T-Lymphozyten sowie freigesetzte Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interleukin 1 führen zur direkten Zytolyse und schädigen das Gewebe (Link et al. 1997, Ghayr et al. 1987). Die Menge der im Stammzell-Transplantat vorhandenen T-Lymphozyten scheint eine entscheidende Rolle bei Entstehung einer GvHD zu spielen. Von Kernan et al. (1986) wurde beobachtet, dass keiner der 31 von ihnen untersuchten Leukämiepatienten, die weniger als 1×10^5 T-Zellen pro kg KG erhielten an einer GvHD erkrankten, jedoch bei den Patienten, die mehr T-Zellen erhielten die Schwere der entstandenen GvHD nicht mit der Zellzahl korrelierte. Weitere Studien haben gezeigt, dass nahezu alle Patienten nach allogener Transplantation, die keine prophylaktische immunsuppressive Therapie erhielten, an einer GvHD erkrankten (Ferrara und Deeg 1991) und, dass eine T-Zell-Depletion des Transplantates die Indizienz einer GvHD senkt, aber das Risiko eines leukämischen Rückfalls erhöht (Sehn et al. 1999, Champlin 1995a). Welche Zellen letztendlich eine GvHD verursachen, ist z.Z. noch nicht vollständig geklärt. In Tierexperimenten hat man nachweisen können, dass sowohl $CD4^+$ -Zellen als auch $CD8^+$ -Zellen bei der Entstehung einer GvHD eine Rolle spielen (Korngold und Sprent 1987, Champlin 1995b). In einer Studie von Nimer et al. (1994) führte eine selektive Depletion von $CD8^+$ -Zellen aus dem Spender Knochenmark zu einer deutlich niedrigeren Indizienz von GvHD bei Leukämiepatienten, ein vermehrter leukämischer Rückfall wurde nicht beobachtet. Auch die Entfernung von $CD3^+$, $CD5^+$ - und $CD6^+$ -Zellen aus dem Spender- Knochenmark hat sich als erfolgreich in der Vermeidung der GvHD erwiesen (Neipp et al. 1999, Soiffer et al. 1992). Die selektive Entfernung der $CD4^+$ -Zellen alleine scheint die Indizienz der akuten und chronischen GvHD nicht zu reduzieren (Nagler et al. 1998).

1.8.2. Akute Graft-versus-Host-Disease

Eine Akute GvHD tritt definitionsgemäß innerhalb von 100 Tagen nach einer autologen KMT/PBSZT auf. Im Allgemeinen wird der Zeitpunkt der Erstmanifestation von den Disparitäten der MHC-Antigene mitbeeinflusst und die Symptome treten im Falle einer HLA-Unkompatibilität früher auf. Der mittlere Zeitraum bis zu den ersten Symptomen beträgt nach HLA-genotypisch identischer Transplantation ca. drei Wochen, nach inkompatibler Transplantation ist er etwa um eine Woche verkürzt (Schaefer und Beelen 1991).

Die akute GvHD kann in verschiedenen Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase (afferent Phase) wird das Antigen als Fremd erkannt und T-Zellen werden aktiviert. In der zweiten Phase (amplification Phase) werden Zytokine freigesetzt, und in der dritten Phase (effector Phase) schließlich verursachen die zytotoxischen T-Zellen und natürlichen („natural“) Killerzellen eine Gewebeschädigung (Klingebiel und Schlengel 1998).

Die akute GvHD befällt vor allem die Haut, die Leber und den Gastrointestinaltrakt. Ein Befall der Haut manifestiert sich durch ein erythematös-makulopapulöses Exanthem unterschiedlicher Ausdehnung bis hin zur generalisierten Erythrodermie mit Blasenbildung und Desquamation. Eine Leberbeteiligung spiegelt sich klinisch in einem cholestatischen Ikterus wieder. Die Cholestase-Parameter und Transaminasen sind hierbei erhöht, wobei der Anstieg des Serum-Bilirubins mit dem Ausmaß der Leberbeteiligung korreliert. Im schwersten Falle kann es zum akuten Leberversagen kommen. Für eine Darmbeteiligung typische Symptome sind eine gesteigerte Darm-Motilität mit wässrigen Diarrhöen. Bei fortschreitender Krankheit können heftigste Bauchschmerzen mit zum Teil blutigen Durchfällen mit Flüssigkeitsverlusten von 10 bis 20 Litern täglich, massivem Eiweißverlust und schließlich paralytischem Ileus auftreten. Um eine akute GvHD von toxischen Medikamentennebenwirkungen und anderen Infektionen abzugrenzen, ist es manchmal sinnvoll die Diagnose durch eine Biopsie der befallenen Organe zu sichern. Typischerweise können auch begleitende Allgemeinsymptome wie Fieber, Tachykardie, Hinfälligkeit und Gewichtsverlust bei akuter GvHD auftreten (Begemann 1996, Schaefer und Beelen 1991).

Je nach Ausprägung der klinischen Symptome wird die akute GvHD in vier verschiedenen Stadien eingeteilt (Tab. 1.2). Die akute GvHD tritt trotz immunsuppressiver Prophylaxe bei 20 – 80 % der Empfänger von nicht T-Zell-

depletiertem HLA-identischem Knochenmark auf (Link et al. 1997). Aufgrund der immunsupprimierenden Wirkung der akuten GvHD, kann es noch spät nach der Transplantation zu schweren infektiösen Komplikationen kommen, die die Prognose der Erkrankung zusätzlich verschlechtern. Die Mortalität einer akuten GvHD liegt bei etwa 30%. Zusätzlich wird die Entwicklung einer chronischen GvHD durch eine akute GvHD begünstigt (Begemann 1996, Schaefer und Beelen 1991). Wie schon oben beschrieben korreliert die Schwere der akuten GvHD mit der MHC-Disparität. Ein Transplantat von einem HLA-identischen Spender führt bei ca. 40% der Empfänger zur akuten GvHD grades II-IV, bei einem mismatch von einem Antigen ist der Anteil 60-80% (Beatty et al. 1985). Auch die Bedeutung von "subtype mismatches" ist durch neue Untersuchungstechniken bewiesen worden. Eine Studie von Speiser et al. (1996) hat gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit an einer akuten GvHD Grades III-IV zu erkranken bei Patienten, die ein „subtype matched“ Transplantat erhalten haben bei 21% liegt, in der Gruppe von „subtype mismatched“ Transplantationen bei 47%.

Zu Prophylaxe und Behandlung siehe Kapitel 1.8.4.

Stage	Skin	Liver	Intestinal Tract
0	No rash	Bilirubin < 2 mg/100 ml	< 500 ml diarrhea/day
+	Maculopapular rash < 25% of body surface	Bilirubin 2-3 mg/100 ml	> 500 ml diarrhea/day
++	Maculopapular rash 25% - 50 % of body surface	Bilirubin 3-6 mg/100 ml	> 1000 ml diarrhea/day
+++	Generalized erythroderma	Bilirubin 6-15 mg/100 ml	> 1500 ml diarrhea/day
++++	Generalized erythroderma with bullous formation and desquamation	Bilirubin >15 mg/100 ml	Severe abdominal pain with or without ileus
Grade	Degree of Organ Involvement		
I	+ to ++ skin rash; no gut involvement; no liver involvement; no decrease in clinical performance		
II	+ to +++ skin rash; + gut involvement or + liver involvement (or both); mild decrease in clinical performance		
III	++ to +++ skin rash; ++ to +++ gut involvement or ++ to ++++ liver involvement (or both); marked decrease in clinical performance		
IV	Similar to grade III with ++ to +++ organ involvement and extreme decrease in clinical performance		

Tabelle 1.2: Klinische Stadieneinteilung der Organbeteiligung und der Schweregrade der akuten Graft-versus-Host-Disease (Schäfer und Beelen 1991, Thomas et al. 1975)

1.8.3 Chronische Graft-versus-Host- Disease

Eine chronische GvHD ist eine einer autoimmunen Systemerkrankung ähnliche Erkrankung, die definitionsgemäß nach Tag 100 nach KMT/PBSZT auftritt. Eine chronische GvHD kann in zwei Stadien eingeteilt werden. Bei einer limitierten chronischen GvHD treten typischerweise lokale Hauterscheinungen und/oder Leberfunktionsstörungen auf. Eine extensive chronische GvHD liegt vor, wenn entweder eine generalisierte Hautbeteiligung in Verbindung mit einer Leberbeteiligung oder der Befall anderer Organsysteme durch die chronische GvHD bestehen. Weitere allgemeine Symptome der chronischen GvHD sind Gewichtsverlust, Malabsorption, rekurrende Infektionen und Gelenkkontrakturen (Begemann 1996, Schaefer und Beelen 1991, McLaughlin und Ku 1994).

1.8.4. Prophylaxe und Therapie der akuten und chronischen GvHD

Wie schon oben beschrieben hängt die Häufigkeit und Schwere der GvHD von vielen Faktoren ab. Der wichtigste ist die möglichst ideale Übereinstimmung der genetischen Faktoren zwischen Spender und Empfänger. Um das Risiko einer späteren GvHD zu minimieren werden HLA-identische (HLA-A, -B-, -DR-, -DQ-identisch), gleichgeschlechtliche Geschwister als Spender bevorzugt. Ist ein gleichgeschlechtlicher Geschwister als Spender nicht verfügbar, kommen zuerst Geschwister anderen Geschlechtes, dann andere Familienangehörigen (bei 25-30% der Patienten) und schließlich ein Fremdspender (bei 50-70% der Patienten verfügbar) aus einer internationalen Knochenmarkspenderdatei in Frage (Begemann 1999, Pfreundschuh 1997).

Bei der Vorbeugung und der Behandlung der GvHD spielt u.a. die immunsuppressive Therapie eine wichtige Rolle. Diese Therapie wird bei allogenen Transplantationen eingesetzt, bei autologen oder syngenen Transplantationen kann dagegen darauf verzichtet werden. Nach einer Transplantation muss die immunsuppressive Behandlung, trotz der erhöhten Gefahr eines Auftretens opportunistischer Infektionen und einer Reduktion der Graft-versus-Leucemia-Reaktion (Klingebiel und Schlegel 1998) in der Regel für 1 Jahr lang fortgesetzt werden, wobei in speziellen Fällen auch eine längere Therapiedauer nötig werden kann, z. B. bei chronischer GvHD. Die am häufigsten

benutzten Immunsuppressiva sind Kortikosteroide und Cyclosporin A (CsA), daneben können aber auch Cyclophosphamid, Methotrexat und FK-506 verwendet werden (McLaughlin und Ku 1994).

CsA ist ein Pilzmetabolit und supprimiert primär die Helfer-T-Zellen aber auch in geringerem Maße die B-Zellen. CsA hat keine myelodepressive Wirkung und ist somit ein ideales Immunsuppressivum bei KMT. Die unerwünschten Nebenwirkungen wie Nephro- und Hepatotoxizität, ZNS-Schäden und Bluthochdruck begrenzen jedoch seine Einsetzbarkeit. Die individuelle Dosis wird u.a. nach Kreatininwerten und CsA-Spiegel bestimmt. Cyclophosphamid und Methotrexat verhindern die Lymphozyten-Expansion. Die CsA-ähnliche Substanz FK-506, inhibiert die T-Zell-Funktion durch Regulation der Genexpression von Zytokinen. Monoklonale Antikörper, die zur Entfernung der Lymphozyten (T-Zell-Depletion siehe Kapitel 1.9) verwendet werden können, werden ebenfalls bei Immunsuppression eingesetzt (Mc Laughlin und Ku 1994).

1.9. T-Zell-Depletion

Unter T-Zell-Depletion (TCD) versteht man die Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat. Mehrere Studien (Löwenberg et al. 1986, Atkinson et al. 1987) haben gezeigt, dass eine T-Zell-Depletion die Inzidenz sowohl der akuten als auch chronischen GvHD reduziert. Insbesondere die Entfernung von CD3⁺, CD6⁺ und CD8⁺ -Zellen scheint bei der Vorbeugung der GvHD eine wichtige Rolle zu spielen (MC Laughlin und Ku 1994, Soiffer et al. 1992). Als unerwünschter Nebeneffekt der T-Zell-Depletion ist eine Zunahme der Transplantatabstoßung und der Leukämie-Rückfallrate beobachtet worden (Dreger und Schmitz 1999). Zur T-Zell-Depletion werden verschiedene Methoden eingesetzt. Eine davon ist die, auch in dieser Arbeit verwendete, immunomagnetische Zellseparation mittels Zellseparationssäulen (Civin et al. 1990, Kato und Radbruch 1992). In ähnlicher Weise funktionieren die immunadsorptiven Zellseparationsmethoden (Bensinger et al. 1990, Doyay et al. 1993). Bei diesen beiden Separationsarten wird die Entfernung der T-Lymphozyten indirekt durch eine positive Selektion der CD34⁺-Zellen erzielt. Direkte TCD wird mit monoklonalen Antikörpern, z.B. mit dem IgM-Antikörper Camptan-1 (Dreger et al. 1995) mit oder ohne Lyse der Zellen durch

Komplementfaktoren (Filipovich et al. 1982, Dreger et al. 1995), durchgeführt. Die Antikörper können, als weitere Möglichkeit, mit T-Zell-Immuntoxinen zur Zell-Tötung konjugiert sein. Wie bei der o.g. CD34⁺-Selektion mit MiniMACS-Säulen können hiermit auch T-Zellen mit einem Mix aus Anti-T-Zell-Antikörpern markiert werden, die dann wiederum mit einem paramagnetischen Teilchen gekoppelten Antikörper inkubiert werden. In der in einem Magneten platzierten Separationssäule werden die T-Zellen zurückgehalten.

Die sog. "Counterflow Central Elutriation" (De Witte et al. 1986, Wagner et al. 1990) sowie eine Trennung über einem Dichtegradienten (Löwenberg et al. 1986, Dicke et al. 1968) gehören zu den physikalischen T-Zell-Depletions-Methoden.

1.10. Nabelschnurbluttransplantation

Nur für etwa 25-30% (Amylon 1996) der Patienten mit malignen und nicht-malignen Erkrankungen, denen durch eine allogene Knochenmarktransplantation geholfen werden könnte, kann ein HLA-Identischer oder fast-identischer Familienspender gefunden werden. Die Suche nach passenden Fremdspendern in nationalen und internationalen Blutbanken ist häufig sehr schwierig und Zeitaufwendig. So ist man gezwungen nach alternativen Stammzellquellen zu suchen. Neben der vorbeschriebenen Transplantation von Knochenmark (KMT) und der peripheren Blutzellen (PBSZT) wird neuerdings auch Nabelschnurblut transplantiert. Die erste Nabelschnurbluttransplantation wurde 1988 bei einem Kind mit Fanconi Anämie durchgeführt. Der Spender war die HLA-identische Zwillingsschwester der Patientin (Gluckmann et al. 1989). Bis 1998 waren über 500 Nabelschnurbluttransplantationen, von denen 75% der Transplantate von nicht HLA-identischen Spendern stammten, durchgeführt worden (Kline und Bertolone 1998). Die meisten Nabelschnurbluttransplantationen wurden bei Kindern (Wagner et al. 1995) gemacht, wobei in letzter Zeit auch vermehrt Berichte über Nabelschnurbluttransplantationen bei Erwachsenen veröffentlicht wurden (z.B. Deliliers et al. 1996).

Der Vorteil einer Nabelschnurbluttransplantation ist erstens die große Anzahl an Spendern verschiedener ethnischer Herkunft und zweitens die leichte und ungefährliche Gewinnung der Stammzellen (Madrigal et al. 1997). Zusätzlich wird vermutet, dass eine GvHD aufgrund der verminderten Funktionsfähigkeit der

unreifen Lymphozyten (Kline et al. 1998) seltener oder in einer mildern Form nach einer Nabelschnurbluttransplantation auftritt als nach anderen allogenen Stammzelltransplantationsarten. Der Nachteil der geringeren Funktionsfähigkeit der Lymphozyten ist eine vermehrte Abwehrschwäche bei Abstoßungsreaktionen (Kline et al 1998). Hierdurch scheint die HLA-Übereinstimmung bei Nabelschnurbluttransplantation weniger wichtig zu sein als bei konventionellen Transplantationen (Flomenberg et al.1992, Miniero et al. 1993). Als ein weiterer Vorteil einer CBT kann die niedrigere virale Kontaminationsrate des Transplantates erwähnt werden. Nachteilig sind die Übertragung von genetischen Krankheiten, die Kontamination des Transplantates mit mütterlichen Zellen und die geringe Menge an Blut pro Blutentnahme (durchschnittlich 100ml) (Kline et al. 1998).

Die Gewinnung des Nabelschnurblutes ist, wie oben schon erwähnt, technisch sehr einfach und für Mutter und Kind ungefährlich. Verschiedene Methoden sind entwickelt worden um einerseits das Volumen zu optimieren und andererseits das Risiko einer Kontamination mit Mikroben oder mütterlichen Zellen zu minimieren. Das Nabelschnurblut wird nach der Geburt steril aus der Nabelvene entnommen und kann nach Zugabe von Cryopräservativa (z.B. Dimethylsulfoxyd (DMSO)) tiefgefroren und in einem flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zur Verwendung aufbewahrt werden. So lassen sich große Mengen an möglichen Stammzellequellen für Transplantationen sammeln und aufbewahren.

1.11. Fragestellung und Zielsetzung

Hämatopoetische CD34⁺-Stammzellen zur Transplantation bei hämatologischen oder genetischen Erkrankungen können aus Knochenmark oder peripherem Blut gewonnen werden. Aufgrund des Mangels an passenden Knochenmark- und Stammzellspendern ist die Suche nach alternativen Stammzellquellen seit Jahren ein wichtiges Forschungsgebiet. Eine solche seit 1987 bekannte Stammzellquelle ist das Nabelschnurblut.

Die Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (GvHD) ist eine der häufigsten und für den Patienten auch bedrohlichsten Komplikationen der allogenen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Viele Forschungsergebnisse und neuerdings auch klinische Erfahrungen lassen vermuten, dass schwerere Komplikationen, u.a. GvHD, nach einer Nabelschnurbluttransplantation seltener auftreten als nach einer Knochenmarktransplantation oder peripheren Blutstammzelltransplantation.

Zusätzlich haben mehrere Studien gezeigt, dass eine T-Zell-Depletion die Inzidenz sowohl der akuten als auch chronischen GvHD reduziert.

In dieser Arbeit soll die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes vor und nach immunomagnetischer Separation der CD34⁺- Zellen untersucht werden. Es soll neben der Reinheit der Zellseparationssäulen der prozentuale Anteil an B- und T-Lymphozyten im Nabelschnurblut mittels Färbung von CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD10 und CD19 ermittelt werden, um so herauszufinden, ob sich eine CD34⁺-Selektion mittels MiniMACS-Separationssäulen zur T-Zell-Depletion von Nabelschnurblut ereignet.

Möglicherweise lassen sich damit in der Zukunft auch Nabelschnurbluttransplantationen mit größeren HLA-Unterschieden durchführen, wenn kein geeigneter Spender gefunden werden kann.

Weiterhin soll durch die Färbung von Nabelschnurblut und Knochenmark vor und nach immunomagnetischer CD34⁺-Selektion mit MiniMACS-Zellseparationssäulen mit den Zellzyklusproteinen Cyclin A und Cyclin D1 herausgefunden werden, ob sich bei den CD34⁺-Nabelschnurblutzellen mehr Zellen in Teilung befinden als im Knochenmark, und ob dadurch erklärt wird, dass für eine Nabelschnurbluttransplantation weniger Zellen benötigt werden als für eine Knochenmark- oder periphere Blutstammzelltransplantation.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Substanzen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden folgende Substanzen verwendet.

Im Text werden die hier unterstrichenen Namen benutzt. In einzelnen Fällen werden die Hersteller direkt im Text erwähnt.

1. Zellseparation

- BSA = Bovine Serum Albumin, Fraction V Solution, sterile (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Ficoll-Paque Research Grade (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- PBS-Puffer = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium and Magnesium (Gibco Brl, Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland)
- Trypan Blau = Trypan Blue Solution 0,4% (Sigma, St. Louis, MO, USA)

1. APAAP-Färbung

- Aceton-Lösung (Hauseigene Abfüllung Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Aqua ad iniectabilia (Pharmacia & Upjohn AS, Halden, Norwegen)
- APAAP (Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase) Mouse Monoclonal (DAKO Corp., Carpinteria, USA)
- Cyclin A mouse monoclonal antibody (Novo Castra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK)
- Cyclin D1 mouse monoclonal antibody (Novo Castra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK)
- DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- DAKO ChemMate Hematoxylin (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- DAKO Faramount, Aqueous Mounting Medium (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- DAKO Neufuchsin Substrate System (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- DAKO TBS = Tris-Buffered Saline (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)

- Monoclonal Mouse Anti-Human Haematopoietic Progenitor Cell, CD34 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell CD3 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell, CD4 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell, CD5 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell, CD6 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell, CD8 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human Common Acute Lymphoblastic Antigen, CD10 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Monoclonal Mouse Anti-Human B Cell, CD19 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)
- Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)

2.2. Untersuchungsmaterialien

2.2.1. Nabelschnurblut

Das Nabelschnurblut stammt von 79 gesunden Neugeborenen, die zwischen Januar 1996 und Juni 1998 im Kreissaal der Klinik für Frauenheilkunde der Universitätsklinik Eppendorf geboren wurden. Vor der Blutentnahme war das schriftliche Einverständnis der Mutter eingeholt worden. Nach der Abstoßung der Plazenta wurden, mit 20 ml Spritzen, die jeweils 500 IE Heparin-Natrium enthielten, bis zu 40 ml Blut aus der Nabelvene entnommen. Bis zur späteren Bearbeitung wurde das Blut für max. 8 Stunden bei +4°C gelagert.

2.2.2. Knochenmark

Das Knochenmark wurde in dem gleichen Zeitraum in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation zehn 26 bis 51 jährigen gesunden

Knochenmarkspendern entnommen. Vier von diesen Knochenmarkspendern waren Frauen, sechs Männer. Das für eine Transplantation vorgesehene Knochenmark wurde unter sterilen Bedingungen entweder in Intubationsnarkose oder in Spinalanästhesie durch Beckenkammaspiration gewonnen. Von dem Gesamtaspirat (ca. 1300 ml) wurden, nach schriftlichem Einverständnis des Patienten, 50 ml für wissenschaftliche Zwecke verwendet.

2.2.3. Positiv- und Negativkontrollen zur immunhistochemischen APAAP- Färbung

Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden Proben aus bekannten Zellreihen (MOLT-16, NALM-6 und K-562) mit einem definierten Anteil an verschiedenen CD-Antigenen verwendet. Bei diesen Zellreihen handelt es sich um aus peripherem Blut gewonnenen, sich schnell teilenden humanen T- und B-Zell-Leukämie-Zellen. Der prozentuale Anteil der verschiedenen Oberflächenantigene wurde mit Durchflußzytometrie-Messungen bestimmt. Die Zelllinien wurden je nach Art der vorhandenen CD-Antigene entweder als Positiv- oder Negativkontrollen benutzt. Bei CD34 wurden als Positiv-Kontrollen Präparate, die nach Selektion der CD34⁺ - Zellen angefertigt wurden, verwendet. Bei CD8 wurde bei fehlenden Positiv-Kontrollen nur mit Negativ-Kontrollen gearbeitet. Die Anfertigung der Objektträger erfolgte nach Verdünnung der Gesamtzellzahl, so dass jeder Objektträger ca. 1x10⁵ Zellen erhielt. Die einzelnen Schritten der Anfertigung entsprechen denen der Objektträger mit MNC und CD34⁺-Zellen und sind unter Kapitel 2.3.1 aufgeführt.

2.3. Immunomagnetische Separation

2.3.1. Anreicherung der mononukleären Zellen

Die die CD34⁺-Zellen enthaltenden mononukleären Zellen (MNC) wurden vor immunomagnetischer Separation der CD34⁺ -Stammzellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Paque aus dem Nabelschnurblut und Knochenmark isoliert, um so viele Erythrozyten, Thrombozyten und reife Granulozyten wie möglich aus der Probe zu entfernen. Das Ficoll-Paque lagert

sich beim Zentrifugieren mit seiner Dichte von $1,0647 \pm 0,001$ g/ml zwischen die weniger dichten MNC und die dichteren Erythrozyten, Thrombozyten und reifen Granulozyten.

20 ml Nabelschnurblut wurden 1:5 mit PBS verdünnt. Die Verdünnung von ca. 50 ml Knochenmark erfolgte mit 200 ml PBS. Als nächstes wurden die Zellsuspensionen in 50 ml-Röhrchen in 25 ml-Fractionen über jeweils die gleiche Menge Ficoll-Paque geschichtet und bei 300g und 21°C für 30 min zentrifugiert.

Die Zentrifuge wurde nach Ablauf der 30 min nicht abgebremst, um eine erneute Vermischung der Zellen zu vermeiden. Die Schicht mit den MNC wurde abpipettiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Pellettierung zwischen den Waschschritten erfolgte durch Zentrifugation bei 300g und 21°C für 10 min. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS mit 0,5 % BSA (für die CD34⁺-Selektion) resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypan Blau gefärbt und danach mikroskopisch mittels Neugebauer Zellzählkammer gezählt und die Viabilität abgeschätzt. Aus ca. 1×10^6 MNC wurden 10 Präparate für die APAAP-Färbung angefertigt. Dafür wurde die Zellsuspension mit PBS weiter verdünnt, so dass die pro Präparat benötigten 70 µl der Verdünnung ca. 1×10^5 Zellen erhielten. Die ca. 70µl Zellmaterial wurden in einem mit einem Objektträger (Shandon Cytoträger, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) gekoppeltem Cytofunnel (Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) pipettiert. Diese wurden für 5 min mit 700 Umdrehungen/min zentrifugiert (Cytospin-Zentrifuge, Shandon Inc., Pittsburgh, PA,USA). Anschließend wurden die Objektträger von dem Cytofunnel befreit und ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Präparate, die nicht am selben Tag gefärbt wurden, wurden in Aluminiumfolie eingewickelt und für die spätere Weiterbearbeitung in einem Tiefkühlschrank bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Anreicherung der CD34⁺-Zellen

Aus den MNC wurden die CD34⁺ -Zellen mit MiniMACS-Zellseparationssäulen und dem CD34 Progenitor Zell Isolations-Set (Milteney Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) angereichert. Nach Zugabe eines sog. „blocking reagent“, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an Fc-Rezeptoren, wurden die MNC mit einem chemisch modifizierten Anti-CD34-Antikörper zuerst für 15 min bei 4 bis

8°C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben gewaschen. Es wurde ein mit einem Hapten modifizierter QBEND/10-Antikörper gegen das CD34-Antigen verwendet. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden bei 6 bis 12°C für 15 min Anti-Hapten-MicroBeads an das Hapten gebunden. Diese Anti-Hapten-MicroBeads sind Antikörper gegen das o.g. Hapten, die wiederum mit einem ca. 50 nm großen "superpragmatischen Bead" (Milteney Biotec Inc. 1997) gekoppelt sind. Die so markierten Zellen wurden nach einem weiteren Waschschrift in MiniMACS Zellseparationssäulen gegeben, die in einem Magneten platziert waren. Die markierten CD34⁺-Zellen wurden beim Durchlaufen der Zellsuspension in dem magnetischen Feld der Säule zurückgehalten. Die CD34⁻-Zellen konnten dagegen das Feld passieren und verließen die Säule. Nach Entfernen der Säule aus dem Magneten konnten die CD34⁺-Zellen elutriert werden. Dieser Separationsschritt wurde, um eine noch größere Reinheit an CD34⁺-Zellen zu erreichen, zweimal durchgeführt. Für die Inkubation und die CD34⁺-Anreicherung wurde PBS mit 0,5% BSA verwendet (Abb. 2.1). Die gewonnenen Zellen wurden mikroskopisch (s.o.) gezählt. Mindestens 1 x 10⁵ Zellen wurden für die Anfertigung von 10 Cytospin-Objekträgern (s.o.) zur Bestimmung der Reinheit (CD34⁺) und der verschiedenen anderen Oberflächenantigene mittels APAAP-Färbung benötigt.

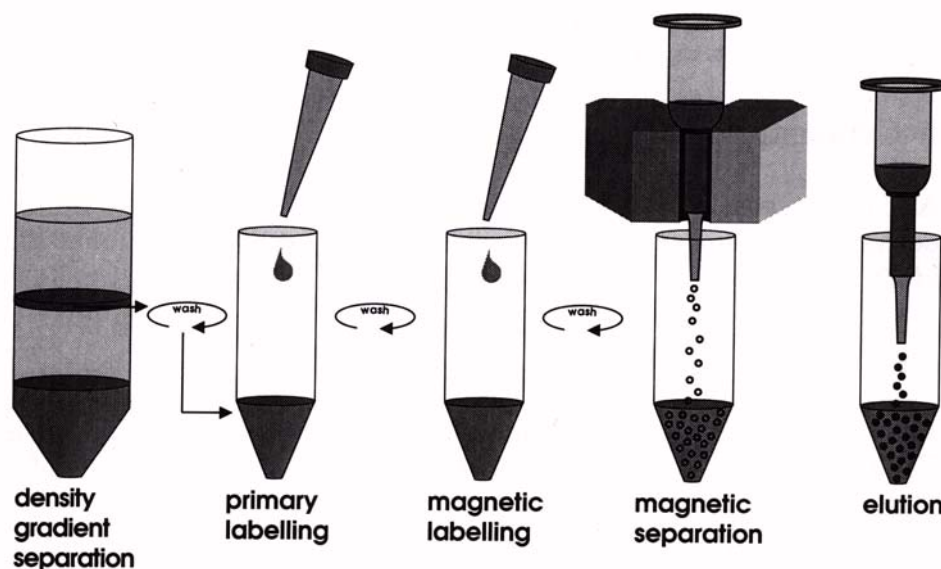


Abbildung 2.1: Magnetische Markierung und Separation mit dem CD34-Isolation Kit und MiniMACS. Mononukleäre Zellen werden mittels Dichtegradienten-Separation isoliert. Die CD34⁺-Zellen werden mit einem chemisch modifizierten CD34-Antikörper markiert, der mit spezifischen MACS Microbeads magnetisch gefärbt wird. Die Zellen werden mit einer magnetischen Separations-Säule separiert, wobei die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden. Die gebundenen Zellen werden nach dem Entfernen der Säule aus der magnetischen Halterung elutriert (Miltenyi et al. 1994).

2.4. Immunhistochemische Färbung

Vor der Färbung wurden die eingefrorenen Präparate etwa eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und gemäß DAKO-Anleitung für Standardfixierung für 90 sec in Aceton fixiert. Als nächstes wurden die Objektträger ohne Unterbrechung der Nassphase in Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Saline), die täglich frisch angesetzt wurde, überführt und 5 min gespült.

Um die fixierte Präparate vor Austrocknung zu schützen, wurden sie nach der TBS-Spülung in einer feuchten Kammer weiterverarbeitet.

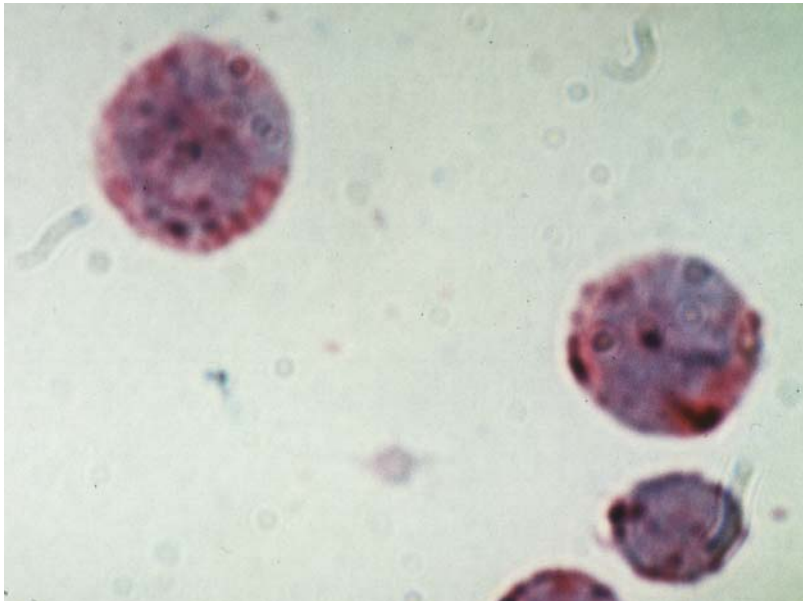
Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper (monoklonale Antikörper gegen CD3⁺ -, CD4⁺ -, CD5⁺ -, CD6⁺ -, CD8⁺ -, CD10⁺ -, CD19⁺ -, CD34⁺ - Zellen) wurde das Gebiet, auf das der Antikörper pipettiert werden sollte, mit einem Silikonstift (Pap Pen, Immunotech, Hamburg, Deutschland) umkreist, um das Abfließen der Antikörper zu minimieren. Die Primärantikörper wurden nach Anleitung mit Antikörperverdünnungsmittel mit Hintergrundfärbung reduzierenden Eigenschaften (DAKO Antibody Diluent, DAKO Inc., Carpinteria, CA, USA) in der empfohlenen Konzentration verdünnt und auf die Objektträger pipettiert. Pro Objektträger wurden jeweils 70-100µl verdünnte Antikörperlösung pipettiert. Nach 30 min Inkubation in der feuchten Kammer wurden die Präparate für 2 min in TBS-Puffer gespült. Anschließend wurde der ebenfalls verdünnte Brückenantikörper (Rabbit-Anti-Maus-Ig, DAKO Inc., Carpinteria, CA, USA) auf die Präparate pipettiert. Nach Beenden der Inkubationszeit wurden die Präparate erneut für 2 min in TBS gewaschen. Der nächste Schritt war wieder um eine 30 min Inkubation mit dem APAAP-Komplex mit einem daran anschließend erneuten Waschvorgang mit TBS. Um die Intensität der Immunfärbung zu steigern, wurden die Inkubationsschritte mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex zweimal durchgeführt. Bei den Wiederholungsininkubationen wurde die Inkubationszeit auf 10 min reduziert.

Zum Schluss erfolgte eine Inkubation mit der Färbelösung (DAKO Neufuchsin Substratsystem, DAKO Inc., Carpinteria, CA, USA) für 10 min, Waschen in TBS und Gegenfärbung mit Haematoxylin. Die positiven Zellen waren, je nach Verteilung der Antigene, entweder rot oder hatten eine rote Ummantelung. Die negativen Zellen waren blau gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden vor dem Austrocknen auf dem Objektträger mit einem wässrigen Eindeckmedium (DAKO

Faramount Aqueous Mounting Medium, DAKO Inc., Carpinteria, CA, USA) und einer gläsernen Deckplatte abgedeckt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

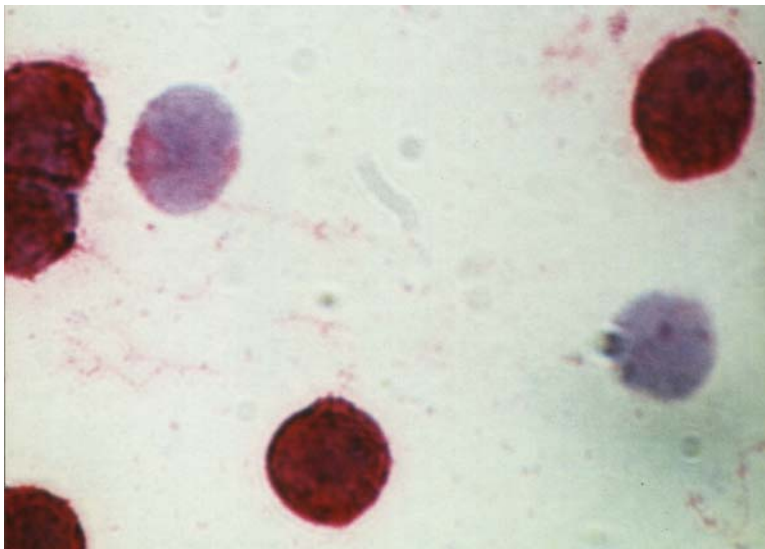
2.5. Auswertung

Es wurden unter dem Mikroskop pro Präparat die positiven Zellen von insgesamt 3 x 100 Zellen bei Vergrößerung von x 1000 gezählt. Der Mittelwert der jeweils 3 x 100 gezählten Zellen in % wurde zur Endauswertung verwendet. (Abb. 2.2-2.6).



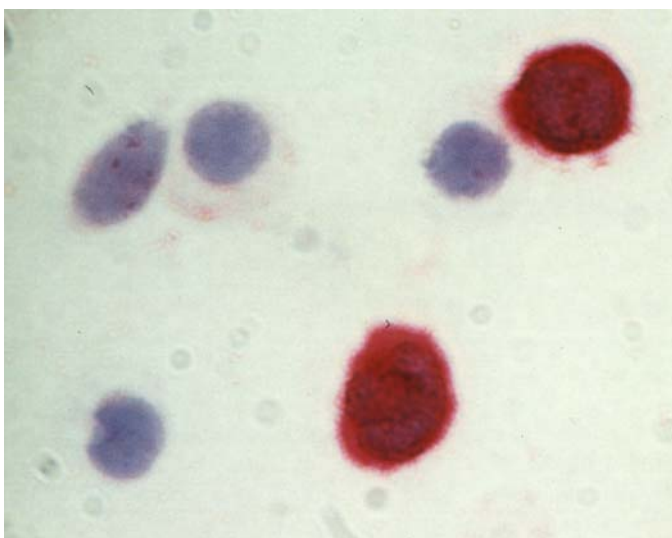
x 1000

Abbildung 2.2 CD34⁺-Nabelschnurblutzellen nach Zellseparation



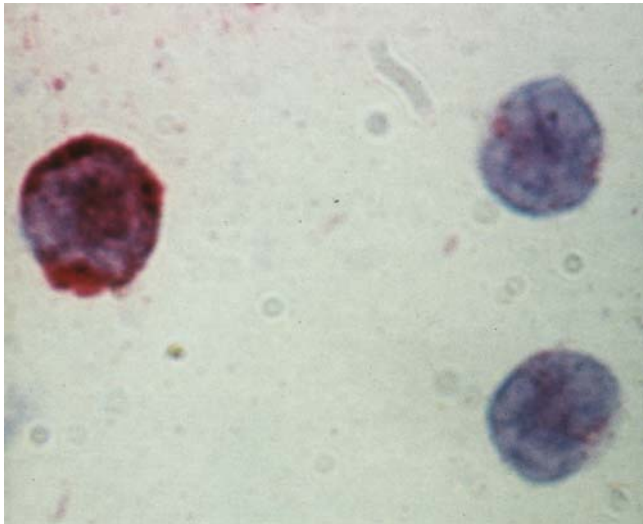
x 1000

Abbildung 2.3 CD3⁺-Nabelschnurblutzellen vor Zellseparation (rot)



x 1000

Abbildung 2.4 CD4⁺-Nabelschnurblutzellen nach Zellseparation (rot)



x 1000

Abbildung 2.5 CD8⁺-Nabelschnurblutzellen nach Zellseparation (rot)



x 1000

Abbildung 2.6 Cyclin D1⁺-Nabelschnurblutzelle (2. v. links) nach Zellseparation

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischer Vergleich verschiedener Leukozytenantigene von menschlichem Nabelschnurblut

3.1.1 Zellseparation

Der Anteil der CD34⁺-Zellen an mononukleären Zellen vor der immunomagnetischen Separation lag bei untersuchten 20 Zellproben zwischen 0,33 % und 7,6 % , wobei der Median 1,5% betrug. Nach der Separation lagen die Werte zwischen 10,0% und 97,0%, der Median der untersuchten 29 Zellproben war 86,67%.

Die Spannweite bei der Ausbeute lag zwischen 2,43% und 69,36% (n=18), der Median war 16,47%. (Abb.2.2 und 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2 T- und B-Zellseparation

Die Formulierungen „vor Säule“ und „nach Säule“ beziehen sich auf die Durchführung einer immunomagnetischen CD34-Zellseparation mit MiniMACS-Zellseparationssäulen.

3.1.2.1. CD3⁺ -Zellen

Bezüglich der CD3⁺-Zellen wurden vor der Säule 26 und nach der Säule 25 Proben untersucht. Der Median vor der immunomagnetischen Zellseparation war 28,00% und danach 0,00%. Die entsprechenden Spannweiten lagen vor Säule zwischen 7,0% und 51,0% und nach Säule 0,0% - 5,0%. (Abb.2.3 und 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2.2. CD4⁺ -Zellen

Zur Expression von CD4 wurden vor der Säule 32 und nach der Säule 30 Zellproben untersucht. Der Median betrug vor der Säule 34,80% und nach der Säule 5,17%. Vor der Säule lag der niedrigste Wert bei 9,0%, der höchste bei

60,0%. Nach der Säule lagen die Werte zwischen 0,0% und 8,3%. (Abb.2.4 und 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2.3. CD5⁺ -Zellen

CD5⁺-Zellen wurden vor der Säule 13 Zellproben und nach der Säule 14 Zellproben gefärbt und gezählt. Vor der Säule lag die Spannweite zwischen 22,0%-44,67% und nach der Säule zwischen 0,0%-17,0%. Die entsprechenden Mediane betragen 39,30% vor und 1,00% nach Säule. (Abb. 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2.4. CD6⁺ -Zellen

Der Median der CD6⁺-Zellen vor Säule war 19,33% (n=17) und nach Säule 1,00% (n=18). Die Spannweite lag vor Säule zwischen 3,67% und 36,3% und nach Säule zwischen 0,0% und 6,0%. (Abb. 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2.5. CD8⁺ -Zellen

Das CD8-Antigen wurde vor der Säule bei 13 Zellproben und nach Säule bei 14 Zellproben gefärbt. Vor der Säule lag der Median bei 12,00%. Die Spannweite lag zwischen 8,0% und 24,0%. Nach der Säule betrug der Median 0,67% und die Spannweite 0,0% bis 7,0%. (Abb. 2.5 und 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2.6. CD10⁺ -Zellen

Bei den 6 Zellproben vor Säule, die mit CD10-Antigen gefärbt wurden, lag die Spannweite vor der Separation zwischen 5,33% und 36,5%, nach der Separation (n=5) zwischen 0,33% und 8,67%. Der Median betrug vor der Säule und nach der Säule 0,50%. (Abb. 3.1; Tab. 3.1).

3.1.2.7. CD19⁺ -Zellen

Zu den CD19⁺-Zellen wurden vor Säule 6 und nach Säule 7 Präparate untersucht. Vor der Säule lag die Spannweite zwischen 1,0% und 20,0%, nach der Säule

zwischen 0,0% und 6,0%. Die entsprechenden Mediane waren 9,92% und 0,00%.
(Abb. 3.1; Tab. 3.1).

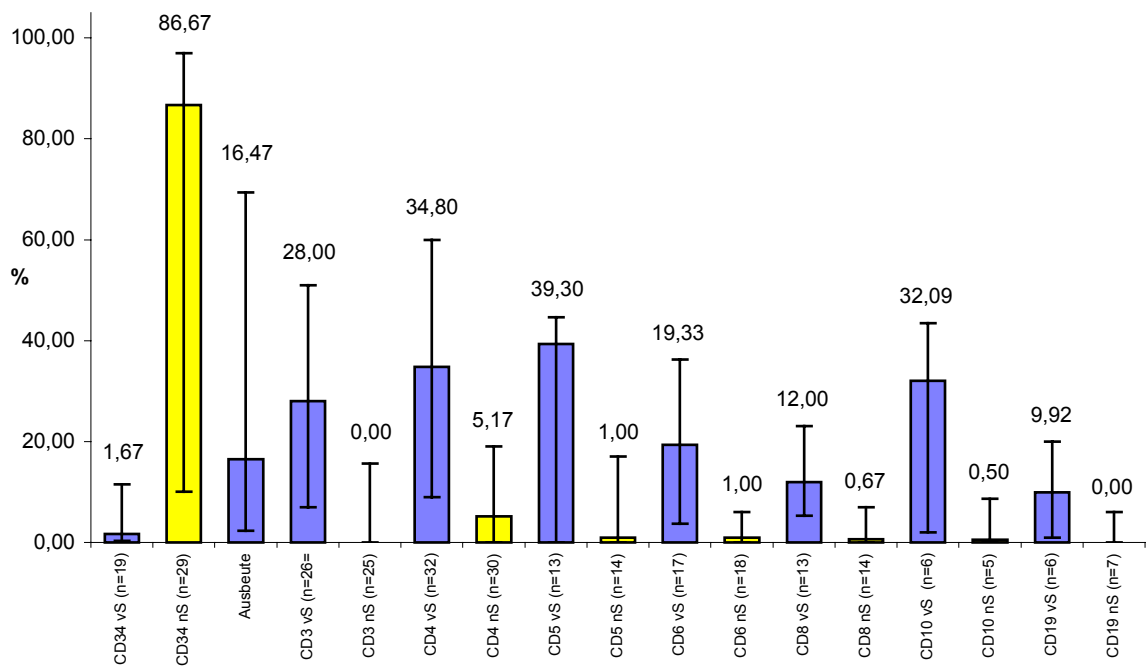


Abbildung 3.1: T-Zell-Depletion mittels immunomagnetischer CD34⁺-Selektion bei menschlichem Nabelschnurblut (Median mit Spannweite)

Vers. Nr.	Zellzahl		CD34		Ausbeute der CD34 ⁺ Selektion	CD3		CD4		CD5		CD6		CD8		CD10		CD19	
	vor Säule (x10 ⁶)	nach Säule (x10 ⁴)	vor Säule (%)	nach Säule (%)		vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)
8	130,0	16,0						29,00	0,00										
9	218,0	78,0						33,30	6,67										
10	247,0	43,0						37,30	0,00										
12	310,0	170,0						38,67	0,00										
13	330,0	150,0	1,00	58,67	26,67			29,30	15,00			3,67	6,00						
14	40,0	8,5						36,30	9,00				5,00						
15	133,0	36,5						31,67	19,00			6,67	3,30						
16	117,0	21,0						41,00	10,00										
17	218,0	520,0							5,00									11,33	0,33
18	165,0	8,0	1,67	83,00	2,41			36,33	9,00										
19	83,0	37,0						31,33	2,00										
20	106,0	16,0						35,30	5,50				0,00						
21	230,0	80,0		91,00															
23	119,0	29,3		75,30												43,50	8,67		
29	128,0	9,5		55,67			29,67									18,33	7,30		
30	118,0	20,0		65,30															
31	83,9	15,5					29,67					19,33	2,00						
32	410,0	38,0														36,50			
34	36,0	34,0	2,67	28,33	10,02							10,33	0,50						
36	78,0	0,0					19,00												
39	55,8	10,0	0,67	63,00	16,85					41,00		8,00	0,00						
40	100,0	44,0					0,00		2,67			25,00	0,00						
41	34,6	9,0	0,33	88,00	69,36							10,00	0,00						
42	63,0	60,0					7,00	0,00	14,67		22,00		27,00	0,00		0,33			

Tabelle 3.1 (1 von 4): Versuchsergebnisse CD-Oberflächenantigene, Fortsetzung nächste Seite

Vers. Nr.	Zellzahl		CD34		Ausbeute der CD34 ⁺ Selektion	CD3		CD4		CD5		CD6		CD8		CD10		CD19	
	vor Säule (x10 ⁶)	nach Säule (x10 ⁴)	vor Säule (%)	nach Säule (%)		vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)
43	69,3	13,0	7,60	95,00	2,34									12,67					
44	50,6	30,5							2,00		0,00								
45	65,8	19,0							8,33	40,00	5,00		6,00						
46	51,6	27,8	2,00	93,00	25,05	36,00													
47	61,3	11,7					0,00												
48	31,0	5,5	1,00	93,67	16,62														
49	43,0	16,5	4,00	85,00	8,15	22,00	0,00												
50	110,0	33,0								0,00	19,33	2,00		4,67					
51	136,0	38,5				20,33	4,67					11,67	0,00						
52	27,3	15,0								35,30	0,00			12,00	0,00				
53	320,0	100,0	1,33	94,00	22,09	51,00	0,50					22,30	1,00						
54	136,0	35,0					5,00					25,00	5,00		1,00			20,00	6,00
55	94,6	16,0	2,67	94,00	5,95					8,00									
56	36,0	22,6	2,70	39,67	9,22	24,33	4,30			2,00				2,33					
57	47,5	28,0				15,33	0,00												
58	119,0	20,0	0,50	93,00	31,26	15,33	0,00						0,00						
59	29,6	17,5				49,00	3,00			42,00	0,00				1,33				
62	37,8	36,0										36,30							
63	43,8	22,0	1,00	10,00	5,02	44,00	0,00			44,67	17,00	27,67		8,00					
64	89,0	27,0				43,00						25,30			0,33				
65	170,0	44,5				11,33	0,00			22,00									
66	59,3	23,3		62,50							0,00								
68	62,8	25,0				27,33		10,00				24,00			3,67				
69	84,0	14,5				22,67		34,30						23,00					
70	193,0	60,0				8,33	0,00	43,00	0,00				1,00	10,67	0,00				

Tabelle 3.1 (2 von 4): Versuchsergebnisse CD-Oberflächenantigene, Fortsetzung nächste Seite

Vers. Nr.	Zellzahl		CD34		Ausbeute der CD34 ⁺ Selektion	CD3		CD4		CD5		CD6		CD8		CD10		CD19	
	vor Säule (x10 ⁶)	nach Säule (x10 ⁴)	vor Säule (%)	nach Säule (%)		vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)
71	149,0	60,0					0,00	20,67	4,00			8,00			3,00				
72	122,0	22,5					26,00	0,00	28,67	7,67		0,00		3,33	13,67	0,00			
73	166,0	25,5					13,00	0,00	20,00					10,67	7,00				
75	43,5	13,8					34,00	1,00	45,75			6,00		10,00					
79	100,0	26,5									44,00							12,00	0,00
80	79,5	11,5																	5,00
81	124,0	67,0		38,50															
82	500,0	50,0																8,50	0,00
88	118,0	11,0						51,00	4,00										
91	39,6	7,5						48,00	7,00						0,00	42,33	0,50		
92	59,4	15,5						21,00	7,00					5,33				1,00	0,00
96	189,0	122,0		97,00												2,00	0,00		
106	61,0	18,5	1,33	97,00	22,12	34,33	5,00	38,00	2,00	34,33	4,30								
107	69,3	37,0				41,00	7,00	34,30	5,33	43,00	0,00								
108	67,0	2,0					0,00		0,00	0,00									
109	31,0	13,5					0,50	9,00	0,33										
110	162,0	30,5	1,00	86,67	16,32				7,67					16,00	0,00				
111	142,0	58,5	2,00	96,00	19,77			39,67	6,67					10,33					
117	85,4	26,0	2,00	95,00	14,46											27,67	0,33		
120	45,0	35,0		93,00		45,00	0,00	60,00	3,00										
121	40,0	22,0		28,67		28,67	0,00	18,33	0,00	39,30				19,00					
124	17,0	15,0		94,50				55,67										1,33	0,00
125	95,0	80,0						50,33											
126			11,50	78,33				41,33	8,00										
127						31,67	15,67	9,00		20,00	15,67			15,30					

Tabelle 3.1 (3 von 4): Versuchsergebnisse CD-Oberflächenantigene, Fortsetzung nächste Seite

Vers. Nr.	Zellzahl		CD34		Ausbeute	CD3		CD4		CD5		CD6		CD8		CD10		CD19	
	vor Säule (x10 ⁶)	nach Säule (x10 ⁴)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	der CD34 ⁺ Selektion	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)
Min.	17,0	0,0	0,33	10,00	2,34	7,00	0,00	9,00	0,00	0,00	0,00	3,67	0,00	5,33	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00
Max.	500,0	520,0	11,50	97,00	69,36	51,00	15,67	60,00	19,00	44,67	17,00	36,30	6,00	23,00	7,00	43,50	8,67	20,00	6,00
Med.	87,2	25,3	1,67	86,67	16,47	28,00	0,00	34,80	5,17	39,30	1,00	19,33	1,00	12,00	0,67	32,09	0,50	9,92	0,00
n	72	72	19	29	18	26	25	32	30	13	14	17	18	13	14	6	5	6	7

Tabelle 3.1 (4 von 4): Versuchsergebnisse CD-Oberflächenantigene

3.2. Zellzyklusantigene

3.2.1. Cyclin A vor und nach immunomagnetischer CD34⁺-Selektion in menschlichem Knochenmark und Nabelschnurblut

Es wurden 7 Nabelschnurblutpräparate vor und 6 Nabelschnurblutpräparate nach Stammzellseparation mit immunomagnetischen MiniMACS-Säulen auf Cyclin A-Positivität mittels APAAP-Färbung untersucht. Bei den Knochenmarkpräparaten waren es 6 Präparate vor und 7 Präparate nach der Säule. Im Vergleich zu den Knochenmarkzellen war der Anteil der Cyclin-A⁺-Nabelschnurblutzellen sowohl vor als auch nach der Säule höher. Bei den Nabelschnurblutzellen betrug der Median vor der Säule 0,0% (Spannweite 0,0% - 30,0%). Nach der Säule lag der Median bei 34,9% mit einer Spannweite von 0,0% - 79,3%. Bei den Knochenmarkzellen war der Median vor der Säule 0,0% bei einer Spannweite zwischen 0,00% und 7,3%. Nach der Säule war der Median 7,3%, die Spannweite von 0,00%-17,0%. (Abb. 3.2; Tab. 3.2).

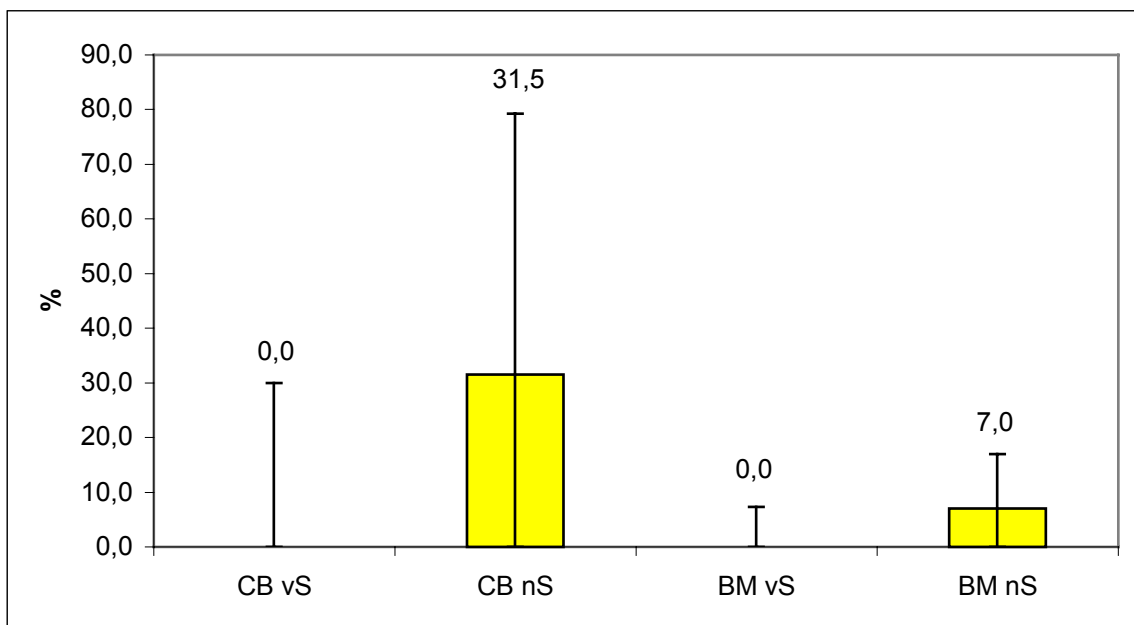


Abbildung 3.2: Cyclin A nach immunomagnetischer CD34⁺-Selektion in menschlichem Knochenmark und Nabelschnurblut (Median mit Spannweite)

Versuch Nr.	Nabelschnurblut		Knochenmark	
	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)
CB - BM				
23 - 1		50,0	0,0	0,0
28 - 2		17,3	7,3	14,0
30 - 3	7,0	43,0	0,0	7,0
32	30,0	79,3		
34 - 5	0,0		0,0	0,0
47 - 6			1,0	17,0
58	0,0	20,0		
59 - 8	0,0	0,0		8,0
64 - 9	0,0		0,0	5,0
80	0,0			
Min.	0,0	0,0	0,0	0,0
Max.	30,0	79,3	7,3	17,0
Median	0,0	31,5	0,0	7,0

Tabelle 3.2: Versuchsergebnisse Cyclin A

3.2.2. Cyclin D1 vor und nach immunomagnetischer CD34⁺ -Selektion in menschlichem Knochenmark und Nabelschnurblut

Es wurden 8 Nabelschnurblutpräparate vor Säule und 12 nach Säule, sowie je 7 Knochenmarkpräparate vor und nach Zellseparationssäule untersucht. Bei den Nabelschnurblutzellpräparaten war der Median vor der Säule 12,5% und nach der Säule 82,2%. Die Spannweite vor der Säule lag zwischen 1,0% und 36,0%, nach Säule zwischen 16,5% und 96,0%. Bei Knochenmarkpräparaten lag der Median der Cyclin D1⁺-Zellen vor Säule bei 50,3%. Die Spannweite war 23,0%-86,7%. Nach der Säule war der das Median 30,0% und die Spannweite 10,7% bis 60,0%. (Abb. 2.6 und 3.3; Tab. 3.3).

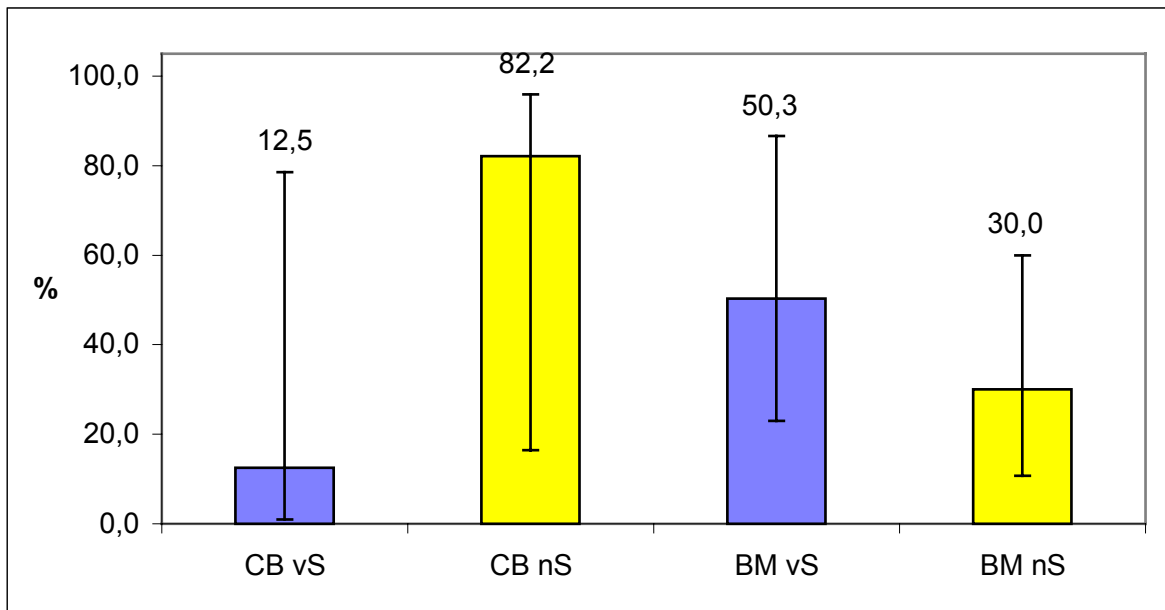


Abbildung 3.3: Cyclin D1 nach immunomagnetischer CD34⁺-Selektion in menschlichem Knochenmark und Nabelschnurblut (Median mit Spannweite)

Vers. Nr.	Nabelschnurblut		Knochenmark	
	vor Säule (%)	nach Säule (%)	vor Säule (%)	nach Säule (%)
CB - BM				
13 - 1		16,5	62,0	60,0
19 - 2		88,0	50,3	11,5
23	78,5	50,0		
30	10,0	83,3		
34	36,0	80,0		
42 - 3		87,3		22,0
45 - 4	1,0	81,0		30,0
46	3,0	21,7		
64 - 5	1,0	96,0	68,0	57,0
67 - 6		95,0	23,0	40,0
68 - 7	15,0	92,0		10,7
80	47,3	80,0		
-- - 8			27,0	
--- - 10			86,7	
--- - 11			35,0	
Min.	1,0	16,5	23,0	10,7
Max.	78,5	96,0	86,7	60,0
Med.	12,5	82,2	50,3	30,0

Tabelle 3.3: Versuchsergebnisse Cyclin D1

5. Diskussion

Durch eine allogene Knochenmarktransplantation können einige hämatologische Erkrankungen und auch genetische Erkrankungen geheilt werden. Der Mangel an passenden Spendern hat dazu geführt nach alternativen Stammzellquellen zu suchen. Neben einer peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) sind in den letzten zehn Jahren auch vermehrt Nabelschnurbluttransplantationen (NBT) durchgeführt worden. Ob eine Nabelschnurbluttransplantation Vor- oder Nachteile gegenüber den anderen Stammzelltransplantationsmethoden hat, ist momentan Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Das Ziel dieser Arbeit war es, weitere Informationen über die Eigenschaften der Nabelschnurblutstammzellen zu gewinnen und die immunomagnetische CD34⁺-Selektionssäulen (MiniMACS-Säulen) als Zellseparationsmethode zu beurteilen.

In dieser Arbeit wurden die gesammelten Nabelschnurblutzellen vor und nach CD34⁺-Selektion mit einer immunomagnetischen Isolationssäule (MiniMACS-Säulen) untersucht. Vor der Zellseparation konnten alle untersuchten T- und B-Zell-Rezeptorantigene (CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, CD6⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD19⁺), nachgewiesen werden. Nach der Säule konnten diese Marker nur in wenigen Fällen und nur in einem sehr geringen Maße von 0,00% (z.B. CD3⁺) bis 5,17% (z.B. CD4⁺) nachgewiesen werden was weitestgehend den Ergebnissen anderer Studien entspricht (Knapp et al. 1995), was zeigt, dass die immunomagnetische Separation primär gut zur Depletion der untersuchten T- und B-Zell-Antigene geeignet sein könnte.

In 45% von 20 untersuchten Nabelschnurblutproben war der prozentuale Anteil der CD34⁺-Zellen vor Separation mehr als 2% und nur in 20% der Proben unter 1%. Der Reinheitsgrad nach der Säule war relativ hoch. Der Anteil an CD34⁺-Zellen lag zwischen 10% und 97% und war bei 69% der Nabelschnurblutzellproben über 80% (Median: 86,67%). Problematisch ist jedoch die schon geringe Stammzellzahl im Nabelschnurblut (in den untersuchten Proben: 0,0 - 520,0 x 10⁴), zusätzlich gehen durch T-Zell-Depletion, weitestgehend unabhängig davon, nach welcher Methode T-Zellen depletiert werden (Hows et al. 1996, de Wyter et al. 1995), neben T-Zellen auch CD34⁺-Stammzellen verloren. In

dieser Arbeit wurde eine positive CD34⁺-Zellselektion, die auch als eine Art T-Zell-Depletion gesehen werden kann, mit MiniMACS-Säulen durchgeführt. Die Vorteile dieser Säulen ist, dass sie relativ kostengünstig und einfach im Gebrauch sind, dass die Separation effektiv und nicht sehr zeitaufwendig ist und vor allem, dass der Reinheitsgrad der CD34⁺-Zellen nach der Separation im Vergleich zu den anderen Methoden mit über 70% (de Wynter et al. 1995) relativ hoch ist. Zu den wichtigsten Nachteilen dieser, sowie auch vieler anderer Separationsmethoden gehört die meist niedrige Ausbeute. Auch in dieser Arbeit war die Ausbeute mit 16,47% im Median (Spannweite: 2,34 – 69,36%) sehr gering. Somit gingen durch die Verarbeitung des Nabelschnurblutes mit MiniMACS-Säulen über 80% der schon von vorne herein wenigen CD34⁺-Zellen verloren. Diese geringe Menge an CD34⁺-Zellen wäre nach bisherigen Erfahrungen sogar für eine Transplantation eines Kindes ungenügend. Um eine, für eine Nabelschnurbluttransplantation für einen Erwachsenen notwendige Zellzahl zu haben, muss die Anzahl, der CD34⁺-Zellen z.B. durch eine ex vivo Expansion der Stammzellen erhöht werden. Bis dahin erscheint diese Methode der T-Zell-Depletion mittels immunomagnetischer CD34⁺-Selektion mit MiniMACS-Zellseparationssäulen insgesamt nicht geeignet eine T-Zell-Depletion für eine anschließende Transplantation durchzuführen, obwohl alle untersuchten Subpopulationen wie o.g. signifikant reduziert werden konnten.

Um eine mögliche Ursache für die höhere Proliferationskapazität der Nabelschnurstammzellen im Vergleich zur KMT herauszufinden, untersuchten wir in dieser Arbeit neben den T-Zellsubtypen auch Zellzyklusantigene, die sog. Zyklone. Cyclin D1 erreicht seinen höchst Wert in der mittleren und späten G1-Phase, kurz bevor die Zellen in die S-Phase eintreten, somit wird es bei aktiven, teilungsfähigen Zellen nachgewiesen. Die Cyclin D1-Expression war bei den CD34⁺-Nabelschnurblutzellen (Median: 82,2%; Spannweite: 16,5 – 96,0%) deutlich höher als bei den CD34⁺-Knochenmarkzellen (Median: 30,0%; Spannweite: 0,7 – 60,0%).

Auch Cyclin A, ein Zellzyklusmarker für die S/G2-Phase, wurde häufiger bei den CD34⁺-Nabelschnurblutzellen (Median: 34,9%; Spannweite: 0,0 – 79,3%) als bei den CD34⁺-Knochenmarkzellen (Median: 7,3%; Spannweite: 0,0 – 17,0%) gefunden. Es ist möglich, dass sich die höhere Proliferationskapazität der CD34⁺-

Nabelschnurblutzellen in der höheren Expression von der Zellzyklusprogressionsgene Cyclin D1 und Cyclin A widerspiegelt, und deshalb für eine Nabelschnurbluttransplantation weniger Zellen benötigt werden als für eine Knochenmark- oder periphere Blutstammzelltransplantation.

Nach Gluckmann et al. (1999) waren bis 1999 weltweit mehr als 700 Nabelschnurtransplantationen durchgeführt worden. Die meisten Empfänger waren Kinder. Die bisherigen Erfahrungen haben gezeigt, dass Nabelschnurbluttransplantationen einige Vorteile im Vergleich zu anderen Stammzelltransplantationsarten haben. Das Material ist leicht zu sammeln, der Spenderpool ist sehr groß, verschiedene ethnische Gruppen sind bei den Spendern gut vertreten und die Infektionsrate des direkt nach der Geburt gesammelten Blutmaterials ist sehr niedrig. Die Gefahr einer GvHD scheint durch die weniger immunaktiven frühkindlichen Zellen kleiner zu sein, das Nabelschnurblut beinhaltet nur wenig reife zytotoxische T-Zellen und ein höherer HLA-mismatch wird somit besser toleriert (Wagner et al. 1993, Hows et al. 1996). Nicht zu vergessen ist auch die Möglichkeit gesammeltes Nabelschnurblut in einer Nabelschnurblutbank für spätere Transplantationen zu konservieren, dadurch kann das zeitaufwendige Suchprozedere nach einem passenden Spender verkürzt werden und eine schnellere Transplantation kann ermöglicht werden (Hows et al. 1997, Sugarman et al. 1995).

Im Nabelschnurblut können alle Typen von T-Zellen gefunden werden, sie unterscheiden sich jedoch von den adulten T-Zellen (Gluckmann 1999). Die Nabelschnurblutlymphozyten produzieren weniger Zytokine als die adulten Zellen. Sie sind in der Lage $\text{INF-}\gamma$, IL-4 und IL-10 herzustellen, produzieren aber sehr wenig IL-2 und werden möglicherweise durch die niedrige Anzahl an CD95^+ -Zellen vor Apoptose geschützt. Die Aktivität von NK-Zellen ist bei Nabelschnurblutzellen reduziert (Gluckmann 1999). Mayani et al. (1994) und Vaziri et al. (1994) beobachteten, dass Nabelschnurblutstammzellen in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren größere Kolonien als adulte Stammzellen bilden, sie in der Lage sind, in vitro in Langzeit-Kulturen zu expandieren und längere Telomere haben als die adulten Zellen. Es wird vermutet, dass diese Eigenschaften der Stammzellen die relativ niedrige Anzahl der

Nabelschnurblutstammzellen pro Spender kompensieren können, und dass das schnelle Expansionspotential dieser Zellen eine ausreichende Rekonstitution nach einer myeloablativen Therapie ermöglicht (Gluckmann 1999). Zusätzlich scheinen die Nabelschnurblutzellen im Vergleich zur Knochenmarkzellen weniger empfindlich auf einige hämatopoetische Hemmfaktoren wie TGF- β , TNF- α , MIP-1 α und INF- α zu reagieren (Cairo et al. 1997).

Die geringere Indizienz von GvHD bzw. deren mildere Form nach einer Nabelschnurbluttransplantation scheint, wie o.g., etwas mit der Naivität der kindlichen Stammzellen zu tun haben. In einer Studie von Kurtzberg et al. (1996), in der 25 Patienten untersucht wurden, von denen die meisten Kinder waren, stellte man fest, dass von den 21 Patienten, die evaluiert werden konnten, nur zwei an einer akuten GvHD Grad III und zwei an einer chronischen GvHD erkrankten. Die meisten Spender-Empfänger-Paare hatten 1 bis 3 unterschiedliche HLA-Antigene (Kurtzberg et al. 1996). Bei einer allogenen Knochenmarktransplantation ist die Gefahr einer höhergradigen GvHD wesentlich höher. Nach einigen Studien liegt die Wahrscheinlichkeit an einer akuten GvHD Gr. III oder IV nach einer Knochenmarktransplantation von einem nicht verwandtem, HLA-identischem Spender zu erkranken, bei 47% bei allen Altersgruppen und bei den unter 18-jährigen bei 30% ; die Wahrscheinlichkeit einer chronischen GvHD liegt bei 55% (Kurtzberg et al. 1996).

In einer Studie von Wagner et al. (1995) wurde ein erfolgreiches Engraftment bei 85% der transplantierten Kinder gesehen, wobei das Engraftment nach Nabelschnurbluttransplantation etwas später auftrat als nach Knochenmarktransplantation. Eine GvHD wurde in der zitierten Arbeit nur bei 6% der Patienten beschrieben, was dahingehend interpretiert wurde, dass es sowohl an dem geringem Alter der Empfänger als auch an der geringen Menge an reifen T-Zellen im Nabelschnurblut liegen kann. Der größte Nachteil der Nabelschnurbluttransplantationen liegt in der reduzierten Gesamtzahl der Stammzellen. Weitere, weniger relevante Nachteile sind eine mögliche Kontamination des Transplantates durch mütterlichen Zellen oder durch Mikroben (gering), Übertragung von genetischen Krankheiten und ein vermutlich reduzierter Graft-versus-Leucemia-Effekt (Wagner et al. 1993, Kurtzberg et al. 1996).

Der hohe Anteil an immunkompetenten T-Zellen im allogenen Stammzelltransplantat (PBSZ, KM) scheint das Risiko einer akuten und/oder chronischen GvHD zu erhöhen. Andererseits scheint die T-Zell-Depletion, das Risiko einer GvHD zu reduzieren, wobei die Gefahr einer Abstoßungsreaktion, die einer letalen Infektion und eines Leukämie-Rückfalles durch Verlust des Graft-versus-Leukämia-Effektes (GvL-Effekt) gleichzeitig ansteigt. Die kritische Anzahl an T-Zellen, die eine akute GvHD verursachen kann, liegt nach bisherigen Ergebnissen bei 1×10^5 - 1×10^6 T-Zellen/kg KG, wobei eine hohe Anzahl der T-Helferzellen des Empfängers protektiv gegen GvHD wirken kann (Link 1999). Eine komplette Entfernung der T-Zellen ist wegen des schon oben erwähnten Fehlen des Graft-versus-Leukämia-Effektes nicht erstrebenswert, wobei der Effekt nicht bei allen Krankheiten (autoimmunologische Krankheiten, metabolische Erkrankungen etc.) unbedingt notwendig ist (Link 1999). Nach einigen Studien könnte schon eine selektive Entfernung von $CD3^+$, $CD5^+$, $CD6^+$ und $CD8^+$ -Zellen einer GvHD vorbeugen (Neipp et al. 1999, Nimer et al. 1994, Soiffer et al. 1992). Eine alleinige Entfernung von $CD4^+$ -Zellen scheint dagegen keinen Einfluss auf die Indizienz von GvHD zu haben (Nagler et al. 1998). Bei Knochenmarktransplantationen ist eine T-Zellzahl von 1×10^5 Zellen/kg KG als kritische Grenze für einen ausreichenden Graft-versus-Leucemia-Effekt gesehen worden (Link 1999). Andere Studien haben gezeigt, dass die im Transplantat befindlichen Suppressorzellen ($CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^-$) möglicherweise die GvH-Reaktion supprimieren, ohne einen Einfluss auf das Graft-versus-Leucemia-Effekt zu haben (Palathumpat et al. 1992, Negrin et al. 1996). Von peripheren Blutstammzellen weiß man, dass das durch Leukapheresen gesammelte Produkt zehnmal mehr T-Zellen beinhaltet als Knochenmark, und dass, die hämatopoetische Rekonstitution nach einer peripheren Blutstammzelltransplantation wesentlich schneller eintritt als nach einer Knochenmarktransplantation (Schmitz et al. 1996). Man vermutet aber, dass die Gefahr einer chronischen GvHD nach Transplantation von peripheren Blutstammzellen im Vergleich zu Knochenmarktransplantation größer ist, wobei die Indizienz einer akuten GvHD sich nicht signifikant von der bei einer Knochenmarktransplantation unterscheidet (Dreger et al. 1999). Sirchia et al. (1999) analysierten die Daten des New York Placental/Umbilical Cord Blood Program und von Eurocord und stellten fest, dass die Indizienz sowohl einer

akuten als auch chronischen GvHD bei Nabelschnurbluttransplantation niedriger ist als nach Transplantation der peripheren Blutstammzellen oder Knochenmarktransplantation, dass aber das Zeitintervall bis zum Thrombozyten Engraftment verlängert ist. Eine Ursache für die verminderte Inzidenz von GvHD nach NBT könnte in der höheren Relation der CD4/CD8-Zellen im Nabelschnurblut liegen. Auch in dieser Arbeit war die CD4/CD8-Relation der Nabelschnurblut-MNC mit 2,7 relativ hoch und damit wesentlich höher als von Hassan et al. (1996) bei Knochenmark (0,91) und bei PBSZ (1,14) beschrieben. Es bleibt also zu überlegen, ob, wie viele, welche und durch welche Methoden T-Zellen am besten depletiert werden sollen und ob es vielleicht auch andere Methoden neben der T-Zell-Depletion gibt, mit denen man den gefürchteten Komplikationen vorbeugen kann und gleichzeitig das Engraftment-Potential nicht reduziert.

Gluckmann et al. (1999) stellten fest, dass bei Patienten, die eine NBT von einem nicht-verwandten Spender erhielten und weniger als $3,7 \times 10^7$ MNC/kg KG erhielten, die mittlere Leukozyten Engraftmentzeit ($\geq 500 \mu\text{l}$ ANC) 34 Tage betrug und eine Thrombozytenzahl von $\geq 20\ 000/\mu\text{l}$ durchschnittlich in 134 Tagen erreicht wurde. Bei Patienten, die mehr als $3,7 \times 10^7$ MNC/kg KG erhielten lag die mittlere Leukozyten Engraftmentzeit bei 25 Tagen und die der Thrombozyten bei 47 Tagen. Die gleiche Forschungsgruppe (Gluckmann et al. 1999) stellte fest, dass keiner der erwachsenen Patienten, die weniger als 1×10^7 MNC/kg KG erhielten, die Beobachtungszeit überlebte. Ebenfalls berichteten sie, dass bei Patienten, die weniger als 2×10^7 MNC/kg KG erhielten, die Wahrscheinlichkeit eines Engraftments am 60. Tag bei 69% und die Wahrscheinlichkeit eine Thrombozytenzahl $\geq 20\ 000/\mu\text{l}$ am gleichen Tag zu haben bei 45% lag. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine niedrige Zahl an transplantierten Zellen sowohl mit einem späten Auftreten des Engraftments als auch mit einem zunehmenden Risiko eines Nicht-Engraftments korreliert (Gluckmann et al. 1999). Nach diesen Ergebnissen halten Gluckmann et al. (1999) es für sinnvoll, bei NBT nicht mit weniger als 1×10^7 Nabelschnurblutstammzellen/kg KG zu transplantieren. Zu bemerken ist, dass die empfohlene Zellzahl ca. 1 log niedriger als bei einer Knochenmarktransplantation und um das 10fache weniger als bei einer Transplantation mit peripheren Blutstammzellen (Gluckmann et al. 1999,

Sierra et al. 1997). Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass Nabelschnurblutstammzellen einen selektiv qualitativen Vorteil gegenüber erwachsenen Knochenmarkszellen besitzen.

Die Blutmenge, die aus einer Nabelschnur gewonnen werden kann (bis ca. 250 ml), beinhaltet meistens nicht die, nach bisherigen klinischen Ergebnissen, für die Transplantation eines Erwachsenen erforderliche Mindestanzahl (1×10^7 MNC/kg) an Stammzellen (Gluckmann et al. 1996), erst recht nicht, wenn eine T-Zell-Depletion durchgeführt werden soll. Eine Lösung für dieses Problem kann möglicherweise in der ex-vivo Expansion gefunden werden. Bisherige Studien haben gezeigt, dass bei Knochenmarkstransplantationen und peripheren Blutstammzelltransplantationen die Anzahl der CFU-GM mit der Geschwindigkeit des hämatopoetischen Engraftments korreliert (Takaue et al. 1991, Kawano Y 1993). Broxmeyer et al. (1992) fanden heraus, dass die totale Zahl von CFU-GM in Nabelschnurblut sich nicht wesentlich von der von nicht-gereinigtem Knochenmark unterscheidet, aber die Anzahl von MNC und Progenitorzellen in Nabelschnurblut kleiner ist als in einem für eine Transplantation geeignetem Knochenmark. Die gleiche Forschungsgruppe fand heraus, dass die Nabelschnurblutzellen eine größere Expansionskapazität als Knochenmarkszellen in Kurzzeit-Flüssigkulturen in Anwesenheit von spezifischen Zytokinen haben. Bekannt ist auch, dass die CD34⁺-Zellen im Nabelschnurblut eine größere Proliferationskapazität haben und andere Wachstumsfaktoren benötigen als adulte Knochenmarkstammzellen (Wagner 1995b). Traycoff et al. (1994) stellten fest, dass Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6) und Erythropoietin eine 2500-fache Zunahme der Zellzahl in 9 Wochen, mit maximaler Produktion von CFU-GM in der dritten und BFU-E in der vierten Woche, in Lang-Zeit-Kulturen induzieren. Cardoso et al. (1993) untersuchten CD34⁺/CD38⁻ - Nabelschnurblutzellen in Flüssig-Kulturen mit IL-3, IL-6, G-CSF, SCF und TGF- β (anti-transforming growth factor). Im Vergleich zu Knochenmark-Kulturen produzierten diese wesentlich effektiver CFU-GM, BFU-E und CFU-GEMM in Lang-Zeit-Kulturen als CD38⁺ Subpopulationen. Bemerkenswert war auch, dass die totale CFU-GM -Produktion der CD34⁺/CD38⁻ Nabelschnurblutzellen 7,6-fach größer war als die der entsprechenden Subpopulation von Knochenmark. Es scheint also durch ex vivo-Expansion möglich zu sein die Zahl der

hämatopoetischen Progenitorzellen im Nabelschnurblut (auch in KM und PBSZ) zu erhöhen und dadurch einerseits eine Transplantation erst zu ermöglichen und andererseits die Zeit bis zum Engraftment zu verkürzen. Erfolgreiche Transplantationen von ex-vivo expandierten hämatopoetischen Stammzellen sind sowohl bei Mäusen (Holyoake et al. 1996) als auch Menschen (Chang et al. 1986) beschrieben worden.

Die wesentlichen Vorteile einer Nabelschnurbluttransplantation liegen somit in ihrem Einsatz bei nicht-verwandten Empfängern mit höherer Mismatch-Toleranz besonders nach Durchführung einer T-Zell-Depletion. Aufgrund der vielen vielversprechenden klinischen Erfahrungen und Untersuchungsergebnisse sind seit 1993 (Sirchia et al. 1999) weltweit Nabelschnurblutbanken eingerichtet worden, um den weltweiten großen Bedarf an Stammzellen besser decken zu können. Weitere Untersuchungen sind u.a. bei der Frage nach der Standardisierung der Kollektion des Nabelschnurblutmaterials und Art der Kryopreservation notwendig. Auch viele ethischen Fragen, wie z.B. wessen Eigentum das Blutmaterial ist, welche Informationen können von den Eltern des „Blutspenders“ verlangt werden und wie die Identität des Spenders geschützt werden kann usw., müssen noch diskutiert und beantwortet werden (Sugarman et al. 1995).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes vor und nach immunomagnetischer Separation der CD34⁺- Zellen untersucht. Es sollte neben der Reinheit der Zellseparationssäulen der prozentuale Anteil an B- und T-Lymphozyten im Nabelschnurblut mittels Färbung von CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD10 und CD19 ermittelt werden, um so herauszufinden, ob sich eine CD34⁺- Selektion mittels MiniMACS-Separationssäulen zur T-Zell-Depletion von Nabelschnurblut ereignet.

Vor der Zellseparation konnten alle untersuchten T- und B-Zell-Rezeptorantigene nachgewiesen werden. Nach der Säule konnten diese Marker nur in wenigen Fällen und nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden. Der Reinheitsgrad nach der Säule war relativ hoch, die Ausbeute jedoch mit 16,47% nur sehr gering. Schon um eine, für eine Nabelschnurbluttransplantation für einen Erwachsenen notwendige Zellzahl zu haben, müsste die Anzahl der CD34⁺-Zellen z.B. durch eine ex vivo Expansion der Stammzellen erhöht werden, erst recht, wenn eine T-Zell-Depletion durchgeführt werden soll, somit eignet sich diese Methode nicht für eine T-Zell-Depletion vor Stammzelltransplantation. Bemerkenswert ist, dass die erreichbare Zellzahl für eine Nabelschnurbluttransplantation ca. 1 log niedriger als bei einer Knochenmarktransplantation und um das 100fache geringer als bei einer Transplantation mit peripheren Blutstammzellen. Durch die Färbung von Nabelschnurblut und Knochenmark vor und nach immunomagnetischer Separation mit MiniMACS -Zellseparationssäulen mit Cyclin A und Cyclin D1 sollte herausgefunden werden, ob sich bei den CD34⁺-Nabelschnurblutzellen mehr Zellen in Teilung befinden als im Knochenmark, und ob dadurch die o.g. Eigenschaft der Nabelschnurblutstammzellen erklärt wird.

Die Cyclin D1-Expression war bei den CD34⁺-Nabelschnurblutzellen deutlich höher als bei den CD34⁺-Knochenmarkzellen. Auch Cyclin A wurde häufiger bei den CD34⁺-Nabelschnurblutzellen gefunden. Es ist möglich, dass die höhere Proliferationskapazität der CD34⁺-Nabelschnurblutzellen durch die höhere Expression der Zellzyklusprogressionsgene Cyclin D1 und Cyclin A mit bedingt sein kann, und deshalb für eine Nabelschnurbluttransplantation weniger Zellen benötigt werden als für eine Knochenmark- oder periphere Blutstammzelltransplantation.

6. Literaturverzeichnis

- Amylon MD (1996) Umbilical cord blood: an important new source of stem cells for transplantation? Bulletin, a quarterly publication of the Bone Marrow Transplantation Program at Stanford University Medical Center, Stanford, California
- Baines P, Mayani H, Bains M, Fisher J, Hoy T, Jacobs A (1988) Enrichment of CD34 (My10)-positive myeloid and erythroid progenitors from human marrow and their growth in cultures supplemented with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Exp Hematology* 16: 785 - 789
- Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL (1989) The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-27). *J Immunol* 142: 283 - 287
- Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM (1985) Marrow Transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med* 313: 765 - 771
- Begemann M (1999) *Praktische Hämatologie*, 11. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Bender JG, Williams SF, Myers S, Nottleman D, Lee WJ, Unvezagt KL, Walker D, To LB, Van Epps DE (1992) Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 13: 479 – 485
- Bensinger WI, Berenson RJ, Andrews RG, Kalamasz DF, Holl RS, Bernstein ID, Lopez JG, Buckner CD, Thomas ED (1990) Positive selection of hematopoietic progenitors from marrow and peripheral blood for transplantation. *J Clin Apheresis* 5: 74 - 75

- Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED (1991) Engraftment after infusion of CD34⁺ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77: 1717 - 1722
- Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. In: The Harvey Lectures. Academic Press, New York , pp. 21 - 78
- Bock v. U. (1993) Die T-Zellen: Differenzierung, Aktivierung, Funktion. *Forum Immunologie* 6: 10 - 14
- Broxmeyer H, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro R, Graves V, Yoder M, Wagner J, Vadhan-Raj S, Benninger L, Rubinstein P, Broun ER (1992) Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4109 -4113
- Buddecke E (1989) *Grundriss der Biochemie*, 8. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Bühning HJ, Asenbauer B, Katrilaka K, Hummel G, Busch W (1989) Sequential expression of CD34 and CD33 antigens on myeloid colony-forming cells. *Eur J Hematol* 42: 143 - 149
- Cairo MS, Wagner JE (1997) Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Blood* 90: 4665 - 4678
- Campos L, Guyotat D, Larese A, Mazet L, Bourgeot JP, Ehram A (1988) Expression of CD19 antigen on acute monoblastic leukemia cells at diagnosis and after TPA-induced differentiation. *Leuk Res* 12: 369 – 372

- Cardoso AA, Li ML, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque JP, Sookdeo H, Batard P, Clark SC, Hatzfeld J (1993) Release from quiescence of CD34⁺ CD38⁻ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8707 - 8712
- Champlin R (1995a) Separation of graft-vs.-host disease and graft-vs.-leukemia effect against chronic myelogenous leukemia. *Experimental Hematology* 23: 1148 - 1151
- Champlin R (1995b) Optimizing the Composition of Bone Marrow for Allogeneic Transplantation. *Journal of Hematotherapy* 4: 53 – 60
- Chang J, Morgenstern G, Deakin D, Testa NG, Coutinho L, Scarffe JH, Harrison C, Dexter TM (1986) Reconstitution of hematopoietic system with autologous marrow taken during relapse of acute myeloblastic leukemia and grown in long-term culture. *Lancet* 1(8476): 294-295
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133: 157 - 165
- Civin CI, Strauss LC, Fackler MJ, Trischmann TM, Wiley JM, Loken MR (1990) Positive stem cell selection – basic science. In: Gross S, Gee A, Worthington White DA (eds) *Progr clin biol res*, Vol 333: Bone marrow purging and processing, Wiley-Liss, New York: 387 - 402
- Clevers H, Dunlap S, Terhorst C (1988) The transmembrane orientation of the epsilon chain of the TcR/CD3 complex. *Eur immunol* 6: 705 – 710
- Debili N, Issaad C, Masse JM, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W (1992) Expression of CD34 and platelet glycoproteins during megakaryocytic differentiation. *Blood* 80: 3022 - 3035

- Deliliers G, Soligo D, Dellavolpe A, Poli F, Romitti L, Tagliaferri E, Ibataci A, Onida F, Annoloro C, Sirchia G (1996) Unrelated mismatched cord blood transplantation in an adult with secondary AML. *Bone marrow Transplantation* 11: 199 - 200
- DeWitte T, Hoogenhout J, de Paow B, Hodrinet R, janssen J, Wessels J, van Daal W, Hustinx T, Haanen C (1986) Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft –versus host disease in matched allogenic marrow transplantation. *Blood* 67: 1302 - 1308
- Dexter TM (1989) Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies. *Leukemia* 3/7: 469 - 474
- Dicke KA, Van Hooft J, Van Bekkum DW (1968) The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures. *Transplantation* 6: 562 – 570
- Doyay L, Lopez M, Heferlach T, Löffler H, Schmitz N, Schroyens W (1993) Autologous bone marrow transplantation with CD34 positive selected cells in patients with non-hodgkins lymphoma. *Exp hematol* 21: 1066 (Abstract)
- Dreger P, Schmitz N (1999) Allogenic transplantation of peripheral blood stem cells. In: Gorin NC Ballière's Clinical Haematology, University printing Hall, Cambridge, pp. 261 - 278
- Dreger P, Viehmann K, Steinmann J, Eckstein V, Müller-Ruchholtz W, Löffler H, Schmitz N (1995) G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogenic transplantation: Comparison of T cell depletion strategies using different CD34⁺ selection systems or CAMPATH-1: *Experimental Hematology* 23: 147 - 154
- Emminger W, Emminger-Schmiedmeier W, Hocker P, Hawliczek R, Peters C, Pawlowsky J, Neuwirth M, Kummer H, Gadner H (1989) Autologous peripheral stem cell transplantation in children. *Klin. Pädiatr.* 201: 299 – 303

- Feller AC, Parawaresch MR, Stein H, Ziegler A, Herbst H, Lennert K (1986) Immunophenotyping of T-lymphoplastic lymphoma/leukemia: correlation with normal T-cell maturation. *Leukemia Res* 10: 1025 - 1031
- Ferrara J, Deeg HJ (1991) Graft-versus-Host disease. *N Engl J Med* 324: 667 – 674
- Filipovich AH, McGlave PB, Ramsay NK, Goldstein G, Warkentin PI, Kersey JH (1982) Pretreatment of donor bone marrow with monoclonal antibody OKT3 for prevention of acute graft-versus-host disease in allogenic histocompatible bone marrow transplantation. *Lancet* 1(8284): 1266 - 1269
- Flomenberg EN, Keever CA (1992) Cord blood transplants: potential utility and potential limitations. *Bone Marrow transplantation* 1(115): 115 - 120
- Ghayr T, Seemayer TA, Kongshavn PAL, Gartner JG, Lapp WS (1987) Graft-versus-host reactions in the beige mouse: an investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Transplantation* 44: 261 – 267
- Glaspy J, Davis MW, Parker WRL, Foote MA, McMiece I (1996) Biology and clinical potential of stem-cell factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 (Suppl): 53 – 57
- Gluckmann E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie GW, Devergie AE, Esperov H, Thierry D, Socie G, Lehn P (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi`s anemia by means of umbilical-cord blood from HLA-identical siblings. *N Engl J Med* 321: 1174 - 1178

- Gluckmann E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C (1997) Outcome of Cord-Blood Transplantation from related and unrelated Donors. *N Engl J Med* 337: 373 – 381
- Gluckmann E, Rocha V, Chasting C (1999) Cord blood Stem cell transplantation. In: Gorin NC (ed) *Balliere's Clinical Haematology*. University printing House, Cambridge, pp. 279 – 292
- Hardy RR (1994) CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 55: 297 - 339
- Hassan HT, Stockschräder M, Schleimer B, Krüger W, Zander AR (1996) Comparison of the content and subpopulations of CD3 and CD34 positive cells in bone marrow harvests and G-CSF-mobilized peripheral blood leukapheresis products from healthy adult donors. *Transplant Immunology* 4: 319 - 323
- Hastka J (1997) *Immunzytologie*. Schattauer, Stuttgart New York
- Hirsch- Kauffmann M, Schweiger M (1987) *Biologie für Mediziner*, 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Holyoake TL, Freshney MG, McNair L, Parker AN, McKay PJ, Steward WP, Fitzsimons E, Graham GJ, Pragnell IB (1996) Ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin-11 augments both short-term recovery posttransplant and the ability to serially transplant marrow. *Blood* 87: 4589 - 4595
- Hows J, Nicol A, Denning-Kendall P, Donaldson C, Nieda M, Bradley B (1996) Cord blood as an alternative source of haemopoietic stem cells. *Annals of Oncology* 7 (Suppl 2): 47 - 51
- Human Cluster of Differentiation (CD) Antigens –Chart from R&D Systems(1996) Vllth International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens held in Kobe, Japan

Ibelgaufts H (1992) Lexikon Zytokine. Medikon Verlag, München

Iscove NN, Guilbert LJ, Weyman C (1980) Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp Cell Res* 126: 121 - 126

Kamani NR, Douglas SD (1991) Structure & Development of the Immune System. In: Stites DP, Terr AI (ed) *Basic and Clinical Immunology*, 7th edn. Appleton & Lange, Connecticut, p. 19

Kato K, Radbruch A (1992) Isolation and characterization of CD34⁺ hematopoietic stem cells from human blood by high gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 14: 384 - 392

Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly R (1986) Clonable T Lymphocytes in T-Cell-Depleted Bone Marrow Transplants Correlate with development of Graft-v-Host-Disease. *Blood* 68: 770 – 773

Kinniburgh D, Russell NH (1993) Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone marrow Transplantation* 12: 489 - 494

Kline RM, Bertolone SJ (1998) Umbilical Cord Blood Transplantation: Providing a Donor for Everyone Needing a Bone Marrow Transplant? *Southern Medical Journal* 91: 821 – 828

Klingebl T, Schlegel PG (1998) GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone marrow Transplantation* 21: 45 - 49

Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, Cello-Fernandez C, Majdic O (1995) Molecular characterization of CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 70: 281 - 296

- Körbling M, Przepiorka D, Van Besien K, Giralt S, Andersson B, Huh YO, Kleine HD, Seong D, Dreisseroth M, Andreeff M, Champlin R (1995) Allogenic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* 85: 1659 – 1665
- Koller MR, Palsson BO (1993) Tissue Engineering: Reconstitution of Human Hematopoiesis Ex Vivo. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 909 - 921
- Korngold R, Sprent J (1987) T cell subset and Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 44: 335 - 339
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* 87: 1 - 13
- Kung PC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 206: 347 – 349
- Kurtzberg J, Laughlin M, Graham M, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P (1996): Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 335: 157 - 166
- Lane T, Law AP, Maryama M, Young D, Burgess M, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LWMM, Hardwick A, Moybayaed M, Oldham F, Corringham RET, Ho AD (1995) Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: Potential role in allogenic marrow transplantation. *Blood* 85: 275 – 282
- Lanier Lewis (1991) Cells of the Immune response: Lymphocytes & Mononuclear Phagocytes In: Stites D, Terr AI (ed) *Basic and Clinical Immunology*, 7th edn. Appleton & Lange, Connecticut, p. 61

- Link H (1999) T-cell depletion of allogenic peripheral blood stem cells. In: Gorin NC (ed) Bailliere`s Clinical Haematology. University Printing House, Cambridge, p. 87 - 98
- Link H (1997) Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Onkologie 3 (Supplement 1): 1 - 11
- Link H, Kolb HJ, Ebell W, Hossfeld DK, Zander A, Niethammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, Schaefer UW (1997) Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (Teil I) Medizinische Klinik 92: 480 – 491
- Link H, Kolb HJ, Ebell W, Hossfeld DK, Zander A, Niethammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, Schaefer UW (1997) Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (Teil II) Medizinische Klinik 92: 534 – 545
- Long GD, Blume KG (1995) Allogenic and autologous marrow transplantation. In: Beutler, Lichmann, Coller, Kipps (ed) Hematology, 5th edn. Mcgraw-Hill Inc., New York, p. 172 – 194
- Löwenberg B, Wagemaker G, Bekkum van DW, Sizoo W, Sintnicolaas K, Hendriks WDH, Hegenbeek A (1986) Graft-versus-host- disease following transplantation of „one log“ versus „two log“ T-lymphocyte-depleted bone marrow from HLA-identical donors. Bone Marrow Transplant 1: 133 – 140
- Madrigal JA, Cohen SBA, Gluckman E, Charron J (1997) Does Cord Blood Transplantation Result in Lower Graft-Versus-Host Disease? It takes more Than Two to Tango: Human Immunology 56: 1 – 5
- Mason DY, Ladyman H, Gatter KC (1986) Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, (eds) Leukocyte Typing II, Volume 2, Springer Verlag, New York Berlin Heidelberg, pp. 245 – 255

- Mayani H, Lansdorp PM (1994) thy-1 Expression Is Linked to Functional Properties of Primitive hematopoietic Progenitor Cells from Human Umbilical Cord Blood. *Blood* 83: 2410 - 2417
- McLaughlin CJ, Ku NC (1994): Bone marrow transplantation. In: Cameron R.B., (ed) *Practical Oncology*, 1st edn. Appleton & Lange, Connecticut
p. 2632
- Messner HA (1984) Human stem cells in culture. *Clinics in Haematology* 13: 393 - 404
- Milteney S, Guth S, Radbruch A, Pflüger E, Thiel A (1994) Isolation of CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells by High-Gradient Magnetic Cell Sorting (MACS). *Hematopoietic Stem Cells: The Mulhouse Manual 1994*: 201 - 213
- Miniero R, Ramenghi U, Crescenizio N, Perungini L, Busca A, Vassallo E, Timeus F (1993) Umbilical cord blood stem cell transplantation. *Int J Artif Organs* 16: 113 - 115
- Nagler A, Codiotti R, Nabet C, Naparstek E, Or R, Samuel S, Slavin Sh (1998) Selective CD4⁺ T-Cell Depletion does not prevent Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 66: 138 - 141
- Nimer SD, George J, Gajewski JL, Ku N, Schiller GJ, Lee K, Territo M, Ho W, Feig S, Selch M, Isacescu V, Reichert TA, Champlin RE (1994) Selective Depletion of CD8⁺ cells for Prevention of Graft-versus-Host Disease after Bone Marrow Transplantation. *Transplantation* 57: 82 - 87
- Palathumpat V, Dejbakhsh-Jones S, Holm B, Wang H, Liang O, Strober S (1992) Studies of CD4⁺ CD8⁻ $\alpha\beta$ Bone Marrow T Cells with suppressor activity. *The Journal of Immunology* 148: 373 - 380
- Pfreundschuh M (1997) *Onkologische Therapie*, 1. Aufl. Thieme, Stuttgart New York

- Reiter C (1989) Cluster Report: CD5. In: Knapp W et al. (eds) Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, Oxford New York Tokio, pp. 331-332
- Risdon G, Gaddy J, Stethman FB., Broxmeyer HE (1994) Proliferative and Cytotoxic Responses of Human Cord Blood T Lymphocytes Following Allogenic Stimulation. Cellular Immunology 154: 14 - 24
- Schaefer U, Beelen D (1991) Knochenmarktransplantation, 2. Aufl. Karger GmbH, Basel München Paris London New York New Delhi Bangkok Singapore Tokyo Sydney
- Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demunynck HMS, Link H, Zander A, Barge A, Borkett KM (1996) Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. Lancet 347: 353 – 357
- Schwella N, Huhn D (1998) Mobilisation und Separation autologer Blutstammzellen. Onkologe 4: 639 –648
- Sehn LH, Edwin P. Alyea, Edie Weller, Christine Canning, Stephanie Lee, Jerome Ritz, Joseph H. Antin, Robert J. Soiffer (1999) Comparative Outcomes of T-Cell-Depleted and non-T-Cell-Depleted Allogenic Bone Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia: Impact of Donor Lymphocyte Infusion. Journal of Clinical Oncology 17: 561 – 568
- Sirchia G, Rebullà P (1999) Placental/umbilical cord blood transplantation. Haematologica 84: 738 - 747

- Sierra J, Storer B, Hansen AJ, Bjerke JW, Martin PJ, Petersdorf EW, Appelbaum FR, Bryant E, Chauncey TR, Sale G, Sanders JE, Storb R, Sullivan KM, Anasetti C (1997) Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood* 89: 4226 - 4235
- Soiffer J, Murray Ch, mauch P, Anderson K, Freedman AS, Rabinowe SN, Takvorian T, Robertson MJ, Spector N, Gonin R, Miller KB, Rudders RA, Freeman A, Blake K, Coral F, Nadler LM, Ritz J (1992) Prevention of Graft-Versus-Host Disease by Selective Depletion of CD6-Positive Lymphocytes From Donor Bone Marrow. *Journal of Clinical Oncology* 10: 1191 - 1200
- Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N (1996) High Resolution HLA matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 87: 4455 - 4462
- Stamenkovic I, Seed D (1988) CD19, the earliest differentiation antigen of the B cell lineage, bears three extracellular immunoglobulin-like domains and an Epstein-Barr-virus related cytoplasmic tail. *J Exp Med* 168: 1205 – 1210
- Sugarman J, Reisner E, Kurtzberg J (1995) Ethical Aspects of Banking Placental Blood for Transplantation. *The Journal of the American Medical Association* 274: 1783 - 1785
- Takaue Y, Kawano Y, Abe T, Okamoto Y, Suzue T, Shimizu T, Saito S, Sato J, Makimoto A, Nakagawa R, Watanbe T, Ito M, Kuroda Y (1995) Collection and transplantation of peripheral blood stem cells in very small children weighting 20 kg or less. *Blood* 86: 372 – 380
- Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD (1975) Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 292: 896

- Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Brandt JE, Hoffman R, Law P, Ishizawa L, Srour EF (1994) evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematology* 22: 215 - 222
- Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp P, Loken MR (1991) Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 77: 1218 – 1227
- Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9857 - 9860
- Vilmer E, Sterkers G, Rahimy C, Elion J, Broyart A, Lescoeur B, Gerota J, Loche M, Tiercy JM, Blot P (1991) HLA- mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukaemia. *Bone marrow transplantation* 7 (Suppl 2) : 2
- Wagner JE (1995) Umbilical Cord Blood Stem Cell Transplantation In: Bruckner CD (ed) Technical and biological components of marrow. Kluwer Academic Publishers, Boston, Kap. 8
- Wagner JE, Donnenberg AD, Noga SJ, Rowley SD, Vogelsang GB, Hess AD, Saral R, Santos GW (1990) Bone marrow graft engineering by counter-flow centrifugal elutriation: results of a phase I-II clinical trial. *Blood* 75: 1370 - 1377
- Wagner JE, Moch KI (1993) Umbilical Cord Blood: An alternative source of hematopoietic Stem Cells for transplantation. *Hematology Reviews* 8: 79 - 86
- Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R et al. (1996) Successful transplantation of HLA matched and HLA mis-matched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft versus host disease. *Blood* 88: 795 - 802

Wagner JE, Santos GW, Noga SJ, Rowley SD, Davis J, Vogelsang GB, Farmer ER, Zehnbauser BA, Saral R, Donnenberg AD (1990) Bone Marrow Graft Engineering by Counterflow Centrifugal Elutriation: results of a Phase I-II Clinical Trial. *Blood* 75: 1370 - 1377

Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E (1995) Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 346: 214 - 219

Winslow JM, Liesveld JL, Ryan DH, Dipersio JF, Abboud (1994) CD34⁺ progenitor cell isolation from blood and marrow: a comparison of techniques for smallscale selection. *Bone Marrow Transplantation* 14: 265 - 271

Witte de T, Hoogenhout J, Pauw de B, holdrinet R, Janssen J, Wessels J, Daal van W, hustinx T, Haanen C (1986) Depletion of Donor Lymphocytes by Counterflow Centrifugation Successfully Prevents Acute Graft-Versus-Host Disease in Matched Allogeneic Marrow Transplantation. *Blood* 67: 1302 - 1308

Wynter de EA, Coutinho LH, Pei X, Marsh JCW, Hows J, Luft T, Testa NG (1995) Comparison of Purity and Enrichment of CD34⁺ Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord and Peripheral Blood (Primed for Apheresis) Using Five Separation Systems. *Stem Cells* 13: 524 - 532

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Axel R. Zander für die Möglichkeit die Experimente zu meiner Dissertation am Knochenmarktransplantationszentrum der Universität Hamburg durchführen zu dürfen bedanken. Seine ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung insbesondere während der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit waren mir eine große Hilfe.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Hassan T. Hassan bedanken, der mir bei der Formulierung der Fragestellung und der praktischen Durchführung der Arbeit zur Seite stand und trotz des späteren Umzugs nach England bereit war mich weiter zu betreuen und mir zu helfen.

Ich danke Fr. Dr. Storjohann von der Firma DAKO Diagnostica, Hamburg, die mir bei der Einarbeitung in die Methodik der APAAP-Färbung und deren Auswertung eine große Hilfe war.

Mein Dank gilt auch den medizintechnisch-technischen Assistentinnen Fr. Birgit Biermann und Fr. Lourdes Cortes, die im Labor jederzeit sehr entgegenkommend und hilfsbereit waren.

Der Doktorandin Fr. Daniela Plantholz danke ich für ihre Bereitschaft mir einen Teil der von ihr gewonnenen Nabelschnurblutproben und CD34⁺-Zellen für meine Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Als letztes bedanke ich mich bei meinem Mann Philipp, der mir bei der Aufarbeitung der Arbeit mit Rat und Tat beiseite stand.

Lebenslauf

Name: Ulla-Maarit Begemann geb. Holopainen

Geburtstag: 25. April 1967 in Juankoski, Finnland

Eltern: Esko Holopainen
Maija-Liisa Holopainen

Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Philipp Begemann

Grundschule: 1974 – 1983 in Juankoski, Finnland

Gymnasium: 1983 – 1986 in Juankoski, Finnland

Abitur: 1986

Studium: 1986 Beginn des Volkswirtschafts- und Sozialpolitikstudiums an der Universität Helsinki, Finnland

Ausbildung: 1988 – 1991 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester in der staatlichen Krankenschwesterschule von Finnland, in Helsinki, Finnland

Medizinstudium: Wintersemester 1991 bis Wintersemester 1998 an der Universität Hamburg

Physikum: März 1994

1. Staatsexamen. März 1995

2. Staatsexamen: September 1997

3. Staatsexamen: September 1998

Arzt im Praktikum: Januar 1999 – Juni 2000 in der Abteilung für Innere Medizin in AK Eilbek, in Hamburg

Approbation: 2000

Assistenzärztin: Seit Juli 2000 in der Abteilung für Innere Medizin im AK Eilbek in Hamburg

ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.