

Medizinische Klinik, Abteilung Onkologie / Hämatologie
Einrichtung für Knochenmarktransplantation
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
Leiter: Prof. Dr. med. Axel R. Zander

**Thrombozyten-Engraftment nach allogener
Knochenmarktransplantation
und
Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten-
Progenitorzellen aus CD34⁺-angereicherten Knochenmarkzellen
gesunder Spender in Flüssigkulturen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Philipp G. C. Begemann

aus Worms

Hamburg, 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 02. März 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg.

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. A. R. Zander

Koreferent: Prof. Dr. D. K. Hossfeld

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Hämatopoese.....	1
1.3 Die menschlichen Leukozyten-Oberflächenantigene.....	2
1.3.1 Das CD34-Antigen.....	4
1.3.2 Das CD41-Antigen.....	5
1.3.3 Das CD45-Antigen.....	5
1.4 Selektion CD34 ⁺ -Zellen.....	5
1.5 Zellkulturen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen.....	7
1.5.1 Semisolidе Zellkulturmedien.....	7
1.5.2 Flüssige Zellkulturmedien.....	8
1.6 Durchflußzytometrie.....	9
1.7 Megakaryozytopoese.....	10
1.7.1 Thrombopoetin (TPO).....	13
1.7.2 Stammzell Faktor (SCF).....	14
1.7.3 Interleukin-3 (IL-3).....	15
1.7.4 Interleukin-11 (IL-11).....	16
1.8 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen.....	16
1.9 Leukozyten- und Thrombozytenengraftment nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen.....	17
1.10 Problemstellung und Zielsetzung.....	19

2. Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Substanzen.....	21
2.2 Thrombozyten-Engraftment nach allogener Knochenmarktransplantation.....	22
2.1.1 Untersuchte Patienten.....	22
2.1.2 Korrelation und statistische Auswertung der klinischen Daten.....	24
2.3 Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten- Progenitorzellen.....	24
2.3.1 Untersuchungsmaterialien.....	24
2.3.2 Anreicherung den mononukleären Zellen.....	25
2.3.3 Anreicherung der CD34 ⁺ -Zellen.....	25
2.3.4 Ansatz der Flüssigkulturen.....	27
2.3.5 Zellzahlbestimmung nach Beendigung des Versuches.....	27
2.3.6 Färbung der Zellen für die durchflußzytometrische Messung.....	28
2.3.7 Durchflußzytometrische Messung von CD34 und CD41.....	28
2.3.8 Verarbeitung der Meßdaten und statistische Auswertung...	29
3. Ergebnisse	31
3.1 Thrombozyten-Engraftment nach allogener Knochenmark- transplantation.....	31
3.2 Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten- Progenitorzellen.....	34
3.2.1 Die CD34 ⁺ -Anreicherung.....	34
3.2.2 Die absolute Zellzahl.....	35

3.2.3	Der prozentuale Anteil an CD34 ⁺ -Zellen an der absoluten Zellzahl.....	37
3.2.4	Der prozentuale Anteil an CD41 ⁺ -Zellen an der absoluten Zellzahl.....	37
3.2.5	Anzahl der CD34 ⁺ -Zellen.....	40
3.2.6	Anzahl der CD41 ⁺ -Zellen.....	42
3.2.7	Zusammenfassung.....	42
4.	Diskussion.....	44
4.1	Thrombozyten-Engraftment nach allogener Knochenmarktransplantation.....	44
4.2	Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten-Progenitorzellen.....	49
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Literaturverzeichnis.....	56
	Glossar.....	67
	Danksagung.....	68
	Lebenslauf.....	69
	Erklärung.....	70
	Anhang.....	71

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden einschließlich der Vorversuche zwischen Sommer 1995 und Frühjahr 1998 in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation der II. Medizinischen Klinik am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg durchgeführt. Zum Erlernen von Zellkulturtechniken und deren Auswertung verbrachte ich knapp drei Wochen am Institute of Hematology des Tel-Aviv Sourasky Medical Center in Israel bei Dr. Varda Deutsch.

Die Auswertung der klinischen Daten erfolgte von Patienten, die in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation des UKE zwischen Februar 1997 und März 1998 eine allogene Knochenmarktransplantation erhielten.

Einige Fachausdrücke bei Zellkulturen oder Zytokinen werden im Text in Ermangelung eindeutiger deutscher Bezeichnungen in der englischen Originalbezeichnung verwendet.

1.2 Hämatopoese

Als Hämatopoese bezeichnet man die Entstehung aller Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) aus einer sogenannten pluripotenten Stammzelle. Die Stammzelle muß einerseits die Fähigkeit haben sich selbst zu erneuern, andererseits muß sie die Ursprungszelle weiter differenzierter Vorläuferzellen sein, die sich, mit verminderter Möglichkeit der Selbsterneuerung, in eine oder mehrere hämatopoetische Richtungen entwickeln können (Knapp et al. 1995, Sieff 1994).

Entsprechend ihrem Differenzierungsgrad und ihrer morphologischen Erscheinung in semisoliden Zellkulturmedien (Agar, Methylzellulose, etc.; siehe Kapitel 1.4.1), sog. Kolonie-Assays, können „colony-forming units“ (CFU) (Metcalf 1977) und „burst-forming units“ (BFU) als Vorläuferzellen der verschiedenen Zellreihen unterschieden werden, aus denen dann, nach weiteren Differenzierungsschritten, die reifen Blutzellen hervorgehen (Abb. 1.1).

Die Differenzierung der Zellen wird durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Zytokine) reguliert, die von verschiedenen Zelltypen, z.B. Fibroblasten,

Lymphozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen (Dexter 1989), produziert werden. Als die wichtigsten Zytokine der Hämatopoese seien hier die Interleukine (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, 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. Diese, sowie eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren, können eine aktivierende, inhibierende oder synergistische Wirkung auf die Entwicklung und Ausreifung der Stamm- und Vorläuferzellen haben. So gibt es Hinweise dafür, daß einige Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in Richtung Zellteilung, andere in Richtung Zelldifferenzierung spielen (Sieff 1994). Die im experimentellen Teil dieser Arbeit verwendeten Zytokine TPO, SCF, IL-3 und IL-11 werden in Kapitel 1.7 noch ausführlich behandelt.

Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielen die direkten Zell-Zell Interaktionen.

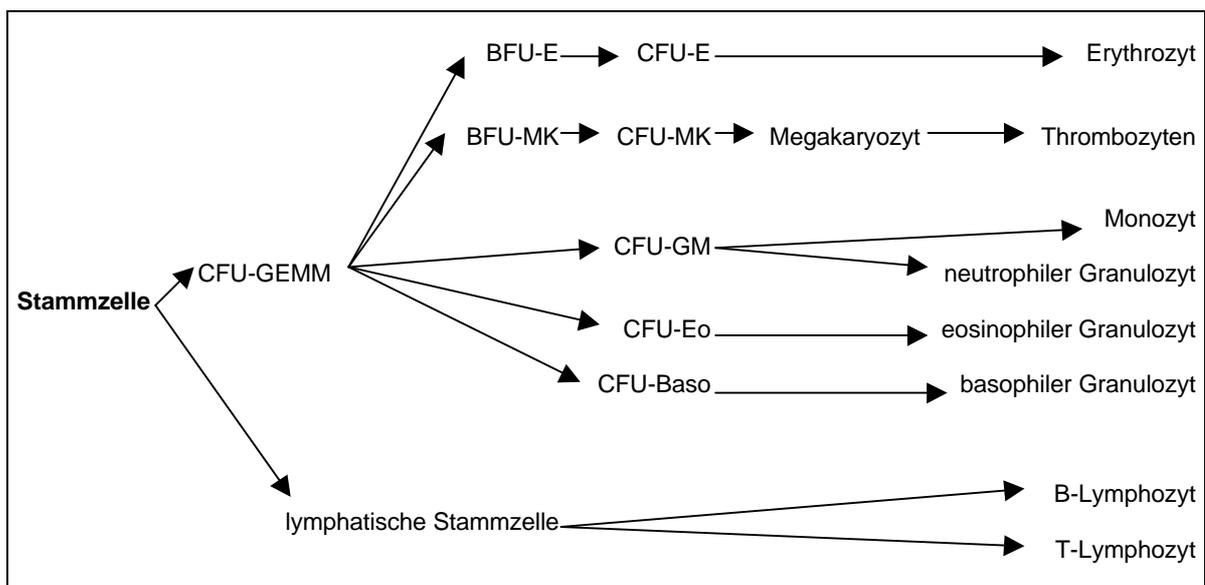


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese. BFU: burst forming unit; CFU: colony forming unit; GEMM: granulocyte-erythrozyte-monocyte-megakaryocyte; E: erythrocyte; MK: megakaryocyte; GM: granulocyte-monocyte; Eo: eosinophil; Baso: basophil (nach Begemann 1993)

1.3 Die menschlichen Leukozyten-Oberflächenantigene

Die Stammzellen und die frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen gehören im Knochenmark zu der Gruppe der mononukleären (einkernig, einfachkernigen)

Zellen, und sind morphologisch nach entsprechender Färbung nicht sicher zu unterscheiden. Eine etwas genauere Zuordnung zu Zelllinie und Reifungsgrad läßt sich, wie oben schon erwähnt, durch die Morphologie ihrer Kolonien in semisoliden Medien erreichen (BFU-E, CFU-E, CFU-MK, etc.).

Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung liegt in der Kenntnis der Leukozyten-Oberflächenantigene („human leukocyte surface markers“, Tab. 1.1). Dies sind auf der Zelloberfläche lokalisierte Glykoproteine, die entsprechend der Zellfunktion verschiedene Aufgaben erfüllen, z.B. Bindungsrezeptoren, Immunglobulin-Rezeptoren, Rezeptoren für Signaltransduktion, Rezeptoren für die Blutgerinnung, Adhäsionsmoleküle etc. (Schlossmann et al. 1995). Diese Antigene können spezifisch für Zelllinien sein, können in Kombination mit anderen vorliegen, oder sich mit zunehmender Zelldifferenzierung zurückbilden, oder erst exprimiert werden. Alle bekannten Oberflächenantigene erhalten, zur Vereinfachung, neben ihrer funktionellen oder chemischen Bezeichnung eine CD-Bezeichnung.

CD	Zelluläre Expression	MW (kDa)	wichtige Funktion(en)
CD4	T-Zellen, Thymozyten	59	Antigenpräsentation, Rezeptor für HIV
CD8	T-Zellen, natürliche Killerzellen, Thymozyten	32	Antigenpräsentation
CD33	panmyeloische Zellen, Granulozyten, Monozyten und ihre Vorläufer	67	unbekannt
CD34	hämatopoetische Vorläuferzellen, Endothelzellen	105-120	s.u.
CD38	B-Zellen, T-Zellen, Plasmazellen, Thymozyten, Monozyten, Progenitorzellen	45	Leukozyten-Aktivierungsantigene
CD41	Megakaryozyten, Thrombozyten	135	s.u.
CD42a	Megakaryozyten, Thrombozyten	23	Untereinheit des vWf- und Thrombin-Rezeptors
CD42b	Megakaryozyten, Thrombozyten	135	
CD42c	Megakaryozyten, Thrombozyten	22	
CD42d	Megakaryozyten, Thrombozyten	85	
CD45	Leukozyten	180-220	Signaltransduktion
CD61	Thrombozyten, Megakaryozyten, Endothelzellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen, Mesothelzellen, Mastzellen, div. Tumorzellen	105	Thrombozyten-Aggregation, Zell-Matrix Adhäsion etc.

Tabelle 1.1: Einige der wichtigsten Leukozyten-Oberflächenantigene. MW: Molekulargewicht (nach Schlossmann et al. 1995)

Auf das CD34-, das CD41- und das CD45-Antigen wird in den folgenden Kapiteln noch gesondert eingegangen, da diese sowohl im klinischen, als auch im experimentellen Teil dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.3.1 Das CD34-Antigen

Das CD34-Antigen wurde 1984 zuerst von Civin et al. beschrieben (Civin et al. 1984). Hierbei handelt es sich um ein hochgradig glykolysiertes transmembranes Typ I Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 116 kDa. Es befindet sich auf der Oberfläche von frühen lymphohämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, Endothelzellen kleiner Blutgefäße und embryonalen Fibroblasten (Krause et al. 1996). Nur etwa 1,5 % der „low-density“ mononukleären Zellen in Knochenmarksaspiraten gesunder Spender werden durch CD34-Antikörper markiert (Civin et al. 1984, Loken et al. 1987, Knapp et al. 1995). Im peripheren Blut finden sich weniger als 0,5 % CD34-markierte Zellen (Civin et al. 1987), laut Knapp et al. (1995) sogar nur $0,06 \pm 0,02$ %. Als Hinweis auf ihre frühe Entwicklungsstufe in der Hämatopoese reichern immunoaffinitäts-aufgereinigte CD34⁺-Knochenmarkzellen in Zellkulturen 10- bis 100-fach in „colony forming units“ (CFU) an, einschließlich der frühesten Typen kolonie-formender Zellen, wie z.B. der CFU-mix und CFU-blast (Strauss et al. 1986). CD34⁺-Zellen können nach Knochenmarktransplantation eine dauerhafte, vom Spender kommende lymphohämatopoetische Rekonstitution initiieren (Berenson et al. 1991).

Die Funktion des CD34-Glykoproteins ist noch nicht vollständig geklärt, vermutet wird eine Funktion im Bereich der Zelladhäsion (z.B. „homing“) und der Hemmung der Hämatopoese (Krause et al. 1996).

Die reiferen, schon linienspezifischen, CD34⁺-Vorläuferzellen zeichnen sich zusätzlich durch eine Koexpression linienspezifischer Oberflächenantigene aus, während die CD34-Expression herunterreguliert wird, so daß primitive hämatopoetische Stammzellen mehr CD34-Antigene exprimieren als multipotente Progenitorzellen (Drénou 1996). Diese „down-regulation“ setzt vermutlich ein, sobald die hämatopoetischen Vorläuferzellen mit der Proliferation und nachfolgender Differenzierung beginnen. Die intrinsischen Mechanismen, die zu einem endgültigen Abschalten der CD34-Transkription führen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. (Knapp et al. 1995).

Die frühesten hämatopoetischen Stammzellen lassen sich zusätzlich durch das Fehlen linienspezifischer Oberflächenantigene weiter charakterisieren und zeigen folgenden immunologischen Phänotyp: CD34⁺CD33⁻CD38⁻CD71^{low}HLA-DR⁻CD45RA^{low} (Moore 1995).

1.3.2 Das CD41-Antigen

Als CD41-Antigen bezeichnet man das thrombozytenspezifische Glykoprotein (GP) IIb, eine Untereinheit des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa (CD41/CD61-Komplex), zu dessen Aufgaben die Bindung von Fibrinogen, Fibronectin und des von Willebrand-Faktors gehört, und der somit die Thrombozytenadhaesion und -aggregation vermittelt (Schlossmann et al. 1995). Antikörper gegen CD41 reagieren ausschließlich mit Thrombozyten und Megakaryozyten (Tomer et al. 1988). CD41 wird während der gesamten Zelldifferenzierung der Megakaryozyten präsentiert (Vainchenker et al. 1982) und gehört somit zu den linienspezifischen Oberflächenantigenen, die mit CD34 zusammen exprimiert werden, wobei der Prozentsatz der CD34⁺CD41⁺-Zellen in sorgfältig analysierten Knochenmarkproben Erwachsener unter 3 % der CD34⁺-Zellen liegt (Debili et al. 1992, Knapp et al. 1995).

1.3.3 Das CD45-Antigen

Das CD45-Antigen ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 180-220 kDa. Als Panleukozytenmarker wird CD45 auf den meisten kernhaltigen Blutzellen exprimiert (Thomas 1989). Ausgeschlossen sind dabei, wie schon von Dalchau et al. (1980) beschrieben, die (kernlosen) Erythrozyten und Thrombozyten. CD45 kann somit mit vielen anderen Antigenen gleichzeitig präsentiert werden. Dies wird in der Durchflußzytometrie (siehe Kapitel 1.6) bei der Messung von CD34⁺-Zellen zur Eingrenzung der zu untersuchenden Zellpopulation genutzt, um die Zählereignisse auszugrenzen, die für die gewünschte Analyse keine notwendigen Ereignisse darstellen (Gutensohn u. Serke 1996). Ebenso kann für die Messung der CD41-positiven Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen verfahren werden, die ebenfalls CD45 exprimieren (Qiao et al. 1996).

1.4 Selektion CD34+-Zellen

Aus den mononukleären Zellen (MNC) aus Knochenmark, peripheren Blutstammzellen oder auch Nabelschnurblut lassen sich CD34⁺-Zellen, deren Subpopulationen oder auch andere linienspezifische Progenitorzellen mit

verschiedenen Methoden zur experimentellen oder klinischen Weiterverwendung selektieren.

Eine sehr reine Selektion CD34⁺-Zellen kann mit sogenannten FACS-Geräten („Fluorescence activated cell sorting“) durchgeführt werden. Dabei werden, wie bei der in Kapitel 1.6 beschriebenen Durchflußzytometrie, die spezifischen Oberflächenantigene der zu selektierenden Zellen, also z.B. das CD34-Antigen zur Selektion hämatopoetischer Stammzellen, mit, mit Immunfluoreszenz-Farbstoffen gekoppelten, Antikörpern markiert und in dem Gerät entsprechend ihrer Fluoreszenz selektiert. Diese Methode eignet sich gut, um mit einer zweiten Färbung Subpopulationen z.B. von CD34⁺-Zellen zu selektieren, so beschreiben Debili et al. (1992) eine Selektion von menschlichen MNC in CD34⁻/Thrombozyten-Glycoprotein⁺-, CD34⁺/Thrombozyten-Glycoprotein⁻- und CD34⁺/Thrombozyten-Glycoprotein⁺-Zellen, wobei jeweils Reinheiten von über 90 % erreicht wurden. Winslow et al. (1994) berichten sogar von Reinheiten von 96-99 % nach CD34-Selektion mittels FACS, jedoch ist der zeitliche Aufwand mit 6-8 h von der Ficoll-Separation (Isolation der MNC aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripheren Blutstammzellen (siehe auch Kapitel 2.3.2)) bis zur endgültigen Sortierung gemessen an anderen Separationsmethoden (s.u.) relativ hoch.

Eine weitere Methode ist die Separation mit Ceprate LC-Säulen (CellPro, Biothel, WA, USA). Die MNC werden zuerst mit einem Anti-CD34-Antikörper und anschließend mit einem biotinkoppelten Antikörper gegen den Anti-CD34-Antikörper markiert. Anschließend durchlaufen die Zellen die Zellseparationssäule, wobei die markierten CD34⁺-Zellen durch einen Avidin-Biotin-Immunoaffinitätsprozeß in der Säule zurückgehalten werden und anschließend herausgewaschen werden können. Mit dieser Methode werden Reinheiten an CD34⁺-Zellen von 73 ± 14 % erreicht (Winslow et al. 1994). Spezielle Separationssäulen dieser Methode eignen sich auch zur klinischen CD34⁺-Anreicherung von gesamten Knochenmarkspenden.

Nach Vorversuchen mit CellPro-Separationssäulen und AIS MicroCELLector Flasks (wie beschrieben von De Wynter et al. (1995) und Cardoso et al. (1995), AIS, Santa Clara, CA, USA) wurde in dieser Arbeit die CD34⁺-Selektion mit MiniMACS Zellseparationssäulen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach der Methode von Miltenyi et al. (1994) durchgeführt. Nach

Markierung der CD34⁺-Zellen mit einem, mit einem paramagnetischen Teilchen gekoppelten, Antikörper kann eine Zellseparation über eine in einem Magneten platzierte Zellseparationssäule durchgeführt werden. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.3.3 im Abschnitt Material und Methoden. Der Vorteil dieser Selektion ist das Erreichen einer hohen Reinheit an CD34⁺-Zellen (95 - >99 % (Miltenyi et al. 1994)) bei geringem zeitlichem und finanziellem Aufwand.

1.5 Zellkulturen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Zur Untersuchung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen können grundsätzlich zwei Arten von Zellkulturtechniken unterschieden werden: Flüssigkulturen und Kulturen in semisoliden Zellkulturmedien.

1.5.1 Semisolide Zellkulturmedien

Semisolide Zellkulturmedien enthalten die zum Zellwachstum benötigten Substanzen, z.B. Iscove's Modified Dulbecco's Medium als Grundsubstanz, 2-Mercaptoethanol und fötales Kälberserum (FCS), Pferdeserum oder humanes Plasma. Durch Hinzufügen von 0,3% Agar oder 0,9 % Methylzellulose wird eine semisolide Konsistenz des Zellkulturmediums erreicht (Messner 1984), so daß sich die Zellen in einer Art Matrix befinden, in der sie ihre Kolonien bilden können. Je nach Fragestellung werden zu untersuchende Zytokine hinzugegeben, oder vorgegebene Zytokinkombinationen zur Evaluation der Klonogenität verschiedener Stamm-/Progenitorzell-Proben eingesetzt. Die Zellen werden anschließend 12 bis 20 Tage bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Auswertung erfolgt an einem Inversionsmikroskop, wobei die beobachteten Kolonien (BFU-E, CFU-E, CFU-MK, etc.; siehe Kapitel 1.2) morphologisch voneinander unterschieden und gezählt werden können.

Um einen möglichen Einfluß von in dem FCS oder humanem Plasma enthaltenen Substanzen auf das Wachstum der Zellen zu verhindern, können sogenannte serum-freie Zellkulturmedien verwendet werden, die statt FCS oder Plasma Albumin, Transferrin, Eisen, ungesättigte Fettsäuren, Lecithin, Cholesterol, etc. enthalten (Iscove 1980).

Zur Evaluation von Megakaryozyten-Progenitorzellen kann, da die Colony forming unit-Megakaryocyte (CFU-MK) und die Burst forming unit-Megakaryocyte (BFU-MK) schwer zu identifizieren sind, bei Zellkulturen in Agar nach Dehydrierung der Kulturschalen nach Versuchsende eine in-situ Färbung des megakaryozyten- und thrombozytenspezifischen CD41-Oberflächenantigens mittels alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase(APAAP)-Technik durchgeführt werden, wobei sich die CD41⁺-Zellen rot färben (Teramura et al. 1988), und eine genauere Auswertung der Kolonien möglich ist.

Eine weitere häufig verwendete Methode zur Kultur von Megakaryozyten-Progenitorzellen ist die „Plasma-clot“ Technik, beschrieben 1981 von Mazur et al. und modifiziert von Nagler et al. (1995). Das Zellkulturmedium besteht hier aus Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 2-Mercaptoethanol, 5 mM CaCl und verschiedenen Antibiotika zur Infektionsprophylaxe. Nach Zugabe der Zellen und der zu untersuchenden Zytokine wird das Medium mit 15 % humanem AB-Plasma zur „clot“-Bildung vermischt. Durch die Gerinnung des Plasmas, das initial durch Calcium-Chelatbildner ungerinnbar gemacht wurde, in Kombination mit dem CaCl entsteht hierbei eine semisolid Matrix, in der sich die Zellkolonien ausbilden können. Diese Methode kann auch als serum-freie Zellkultur, als sogenannter „Fibrin-clot“ durchgeführt werden. Ähnlich wie bei den serum-freien Zellkulturmedien wird das Plasma durch die o.g. Substanzen ersetzt. Der „Clot“ wird hier durch die Zugabe von Fibrinogen und Thrombin erreicht (Bruno et al. 1988).

Zur Auswertung werden die Zellkulturen nach 10-21 Tagen Inkubation fixiert und getrocknet und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen das CD41-Antigen, wie von Mazur et al. (1981) beschrieben, gefärbt und unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Cluster von drei oder mehr Megakaryozyten wurden als CFU-MK gezählt. BFU-MK bestehen aus zumindest drei nahe beieinander liegenden Wachstums-Foci mit mehr als 40 Zellen.

1.5.2 Flüssige Zellkulturmedien

Flüssige Zellkulturmedien entsprechen in ihrer Zusammensetzung weitestgehend den semisoliden Medien, nur daß auf eine Matrixbildung zur Züchtung von Kolonien verzichtet wird. Auch hier können wieder serum-haltige und serum-freie

Kulturen durchgeführt werden, wobei den serum-freien Kulturen anstatt Serum z.B. die von Iscove (1980) beschriebenen Substanzen hinzugefügt werden.

Nach Beendigung der Versuche werden die Zellen aus dem Kulturmedium gewaschen und mit verschiedenen Möglichkeiten untersucht. Die Zellen können zur Evaluation der Klonogenität erneut in semisoliden Medien angesetzt werden oder zur immunhistochemischen Färbung (z.B. APAAP-Färbung oder Immunfluoreszenzfärbung) oder morphologischen Auswertung auf Objektträgern fixiert werden (z.B. mittels Cytospin-Zentrifugen). Eine weitere Möglichkeit zur Auswertung der Zellen ist die in Kapitel 1.6 beschriebene durchflußzytometrische Messung.

1.6 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode mit der sich die Oberflächenantigene und die Viabilität von Zellen oder auch die Anzahl von Zellkernen in einer Zelle (Tomer et al. 1988), letzteres vor allem interessant bei der Erforschung von Megakaryozyten-Progenitorzellen, auf einfachem Wege bestimmen lassen.

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen passieren im Durchflußzytometer einen Laserstrahl, wodurch die Farbstoffe zu fluoreszieren beginnen. Gemessen wird das von der Zelle verursachte Streulicht und die Fluoreszenzintensität der Farbstoffe. Das Streulicht kann in zwei Ebenen als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC) und als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) in Richtung des Laserstrahls gemessen werden, wobei das SSC ein Maß für die Zelldichte und Granularität und das FSC ein Maß für die Größe der Zelle ist. Das in diesem Labor verwendete Epics XL-Gerät mit System II Software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) vermag mit einem Laser bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarben gleichzeitig messen, wodurch sich mehrere Antigene gleichzeitig und somit Subpopulationen von Zellpopulationen bestimmen lassen. Die Meßdaten werden mit einer Negativkontrolle abgeglichen, um unspezifische Antikörperbindungen aus der Messung auszuschließen. Die Auswertung erfolgt mit einer speziellen Software, in der die Intensitäten der Streulichter und der Farbstoffe in beliebigen Kombinationen graphisch in Koordinatensystemen aufgetragen werden. Die Konfiguration der Koordinatensysteme muß speziell auf die jeweilige Untersuchung zugeschnitten sein. Innerhalb der Koordinatensysteme

kann der Untersucher sich darstellende Zellpopulationen markieren, und erhält deren prozentualen Anteil an der gemessenen Gesamtzellzahl. Die in dieser Arbeit verwendeten Meßprotokolle werden in dem jeweiligen Kapitel im Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

1.7 Megakaryozytopoese

Megakaryozyten entstehen aus der hämatopoetischen Stammzelle und durchlaufen einen komplexen Entwicklungsprozeß, an dessen Ende die Bildung und Freisetzung von Thrombozyten steht. Dies geschieht in folgenden Schritten (Hoffman 1989):

1. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren in die megakaryozytäre Linie und erzeugen die frühen burst-forming unit-megakaryocyte (BFU-MK) und die späten colonie-forming unit-megakaryocyte (CFU-MK) Progenitorzellen mit konsekutiver Expansion der Megakaryozyten-Progenitorzellen.
2. Cytoplasmatische Reifung und endomitotische Zellteilung mit Kernvermehrung.
3. Ausschleusung von Thrombozyten in die Blutbahn

Dabei können nach Levine (1982) die vier in Tabelle 1.2 aufgeführten morphologisch unterscheidbaren Stadien unterschieden werden.

Stadium und Name	Zellgröße	Kern	Zytoplasma (Wright-Giemsa)	Granula	Polyploidie
I - Megakaryoblast	6 - 24 µm	gelappt, kompakt	basophil	sehr wenige	2N - 16N
II - Promegakaryozyt	14 - 30 µm	segmentiert	eosinophile Mitte	zunehmend	4N - 32N
III - Granulärer Megakaryozyt	16 - 56 µm	viellappig	zunehmend eosinophil	viele	8N - 32N
IV - Reifer Megakaryozyt	20 - 50 µm	kompakt, viellappig	eosinophil	gruppiert	> 16N

Tabelle 1.2: morphologisch unterscheidbare Reifungsstadien menschlicher Megakaryozyten (Levine 1982)

Aus fötalem Knochenmark läßt sich noch eine weitere Kolonief orm menschlicher Megakaryozytenvorläufer züchten, die CD34⁺ sogenannten high proliferative-potential cell-MK (HPPC-MK), die noch unreifer sind, als die BFU-MK und eine sehr hohe proliferative Kapazität besitzen.

Die CD34⁺HLA-DR⁻ BFU-MK ist die primitivste Megakaryozyten-Progenitorzelle, die aus (erwachsenem) Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripheren Blutstammzellen in Zellkulturen kultiviert werden kann, während die CD34⁺HLA-DR⁺ CFU-MK die differenzierteste Megakaryozyten-Progenitorzelle ist, die in vitro noch reine Megakaryozyten-Kolonien bilden kann. CFU-MK und BFU-MK exprimieren auf ihrer Oberfläche das CD34- und das CD41-Antigen. Während der Megakaryozyten-Differenzierung zeigt sich ein Verlust von CD34 bei 2N-Megakaryozyten-Vorläuferzellen mit verminderter Teilungsfähigkeit, vollständig abgeschaltet wird CD34 direkt vor der Polyploidisation. Bei der Endoreplikation, Zellkernteilung ohne Zellteilung, entstehen Zellen mit bis zu 128 N. (Hoffman 1989, Bridgell et al. 1989, Debili et al. 1992, Ellis et al. 1995, Bruno u. Hoffman 1998).

Während der megakaryozytären Reifung, manifestieren sich in den Zellen die Zellorganellen, wie z.B. endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat oder Alpha-Granula, und Membranmoleküle, wie z.B. CD36, CD42b oder CD61, die später die Thrombozyten charakterisieren und für viele ihrer biologischen Funktionen nötig sind (Hoffman 1989, Ellis et al. 1995, Ayala et al. 1996, Qiao et al. 1996).

Wie in der Entwicklung anderer Zelllinien wird dieser Prozeß der zellulären Proliferation und Differenzierung von verschiedenen Interleukinen, kolonie-stimulierenden Faktoren und Hormonen unterhalten (Kaushansky 1998). Dabei können wieder stimulierende, synergistisch wirkende und inhibierende Substanzen unterschieden werden, wobei die wichtigsten stimulierenden und synergistisch wirkenden Zytokine in Tabelle 1.3 aufgeführt sind. Weitere stimulierenden oder synergistisch wirkende Zytokine der Megakaryozytopoese sind: Erythropoietin (Epo), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 1 α (IL-1 α), leukemia inhibitory factor (LIF), GM-CSF/IL-3 fusion protein (PIXY 321), basic fibroblast growth factor (bFGF).

Als die Megakaryozytopoese inhibierende Substanzen seien hier Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interferon- α (IFN- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 4 (IL-4), human platelet factor-4 (PF-4), transforming growth factor- β (TGF- β), Thrombin, β -thromboglobulin (β -TG) und connective tissue activating peptide III (CTAP III) genannt (Hoffman 1989, Ellis et al. 1995, Hassan und Zander 1995).

Stammzell Faktor (SCF)	Avraham et al. 1992 Debili et al. 1993 Kobayashi et al. 1996 Angchaisuksiri et al. 1996 Young et al. 1996 Dolzhanskiy et al. 1997 Broudy 1997 Norol et al. 1998 Williams et al. 1998 Koizumi et al. 1998
Interleukin-3 (IL-3)	Teramura et al. 1988 Bruno et al. 1988 Hoffman 1989 Bridgell u. Hoffmann 1990 Debili et al. 1993 Nichol et al. 1994 Nagler et al. 1995 Kobayashi et al. 1996 Angchaisuksiri et al. 1996 Young et al. 1996 Dolzhanskiy et al. 1997 Norol et al. 1998 Williams et al. 1998 Koizumi et al. 1998
Interleukin-6 (IL-6)	Hoffman 1989 Debili et al. 1993 Norol et al. 1998 Williams et al. 1998
Interleukin-11 (IL-11)	Teramura et al. 1992 Du u. Williams 1997 Weich et al. 1997 Williams et al. 1998
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Bruno et al. 1988 Hoffman 1989 Bridgell u. Hoffmann 1990 Nagler et al. 1995 Williams et al. 1998
Thrombopoietin (TPO)	Debili et al. 1995 Banu et al. 1995 Choi et al. 1996 Kobayashi et al. 1996 Angchaisuksiri et al. 1996 Young et al. 1996 Dolzhanskiy et al. 1997 Gehling et al. 1997 Williams et al. 1998 Koizumi et al. 1998

Tabelle 1.3: Die wichtigsten stimulierend und synergistisch wirkenden Zytokine in der Megakaryozytopoese

Eine Übersicht darüber, in welchen Entwicklungsstufen der Megakaryozytopoese die jeweiligen verschiedenen Zytokine wirken ist in Abbildung 1.2 nach Kaushansky (1998) dargestellt.

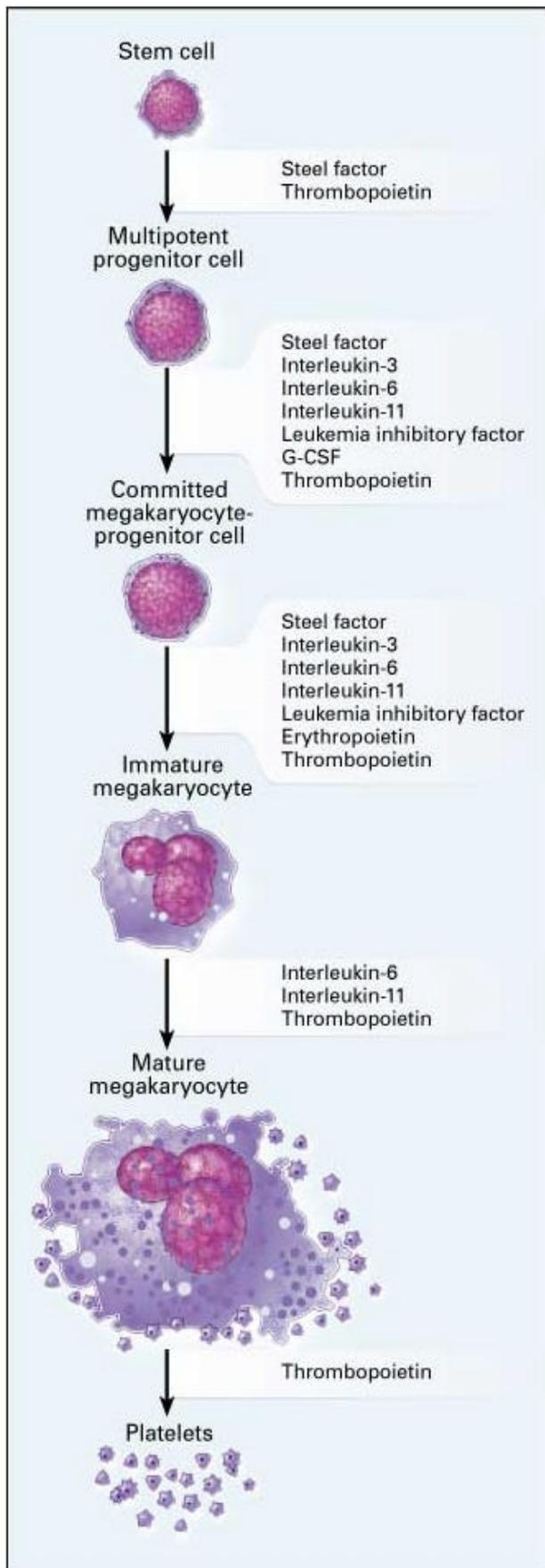


Abbildung 1.2: Die Rolle der Zytokine bei der Megakaryozytogenese nach Kaushansky 1998. Steel Factor = Stammzell Faktor

Zell-Zell Interaktionen spielen in der Regulation der Megakaryozytogenese, wie auch in der Entwicklung anderer Zellreihen, ebenfalls eine Rolle, die sowohl stimulierend als auch inhibierend sein kann (Gewirtz 1986, Hoffman 1989, Ellis et al. 1995). Auf die in dem experimentellen Teil dieser Arbeit benutzten Zytokine soll nun in den folgenden Abschnitten noch einzeln eingegangen werden.

1.7.1 Thrombopoietin (TPO)

Der Begriff Thrombopoietin wurde schon 1958, vor mehr als 40 Jahren, von Kelemen et al. (1958) benutzt. Seit dieser Zeit wurde nach einem Zytokin gesucht, das die Megakaryozytogenese linienspezifisch unterstützt. Eine solche Substanz wurde im Urin, Plasma und Serum thrombozytopenischer Menschen (z.B. bei Aplastischer Anämie oder in der Aplasie nach Knochenmarktransplantation) oder Tiere (z.B. nach subletaler Bestrahlung) vermutet, da dieses in vitro eine sehr viel stärkere megakaryozytogenese-stimulierende Wirkung zeigte als die bekannten Zytokine .

1990 wurde ein Zytokinrezeptor, kodiert durch ein Proto-Onkogen, mit Namen c-Mpl entdeckt, wobei sich der Name c-Mpl von dem homologen viralen Rezeptor auf der Oberfläche des „murine myeloproliferative leukemia virus“ (MPLV) v-Mpl ableitet. Messenger-RNA für c-Mpl konnte nur in CD34⁺ Progenitorzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden, so daß hier der Rezeptor für ein für die Megakaryozytopoese spezifisches Zytokin vermutet wurde. Mittels Antiseren gegen c-Mpl konnte in vitro eine selektive Hemmung der Megakaryozytopoese erreicht werden.

1994 wurde dann etwa gleichzeitig von verschiedenen Forschungsgruppen die Isolation und Klonierung von Thrombopoetin (TPO) als Ligand für den c-Mpl-Rezeptor beschrieben. Gebräuchliche Synonyme für TPO sind c-Mpl ligand, Mpl ligand oder megakaryocyte growth and development factor. Je nach Quelle besteht Thrombopoetin aus 332 bzw. 353 Aminosäuren und besitzt eine starke Ähnlichkeit mit Erythropoetin (EPO), dem linienspezifischen Zytokin der Erythropoese. Wie Abbildung 1.2 zeigt, unterstützt Thrombopoetin, in Kombination mit anderen Zytokinen, verschiedene Schritte der Megakaryozytopoese (Eaton und de Sauvage 1997, Levin 1997, Kaushansky 1995, Kaushansky 1998). In Flüssigkulturen mit Knochenmarkzellen von Mäusen und Menschen erhöht Thrombopoetin die Größe und Anzahl von Megakaryozyten, stimuliert ihre Expression von thrombozytenspezifischen Antigenen wie CD41 und CD61 und ist stärkste bekannte Stimulator der Endomitose und Polyploidisation in Megakaryozyten. Thrombopoetin ist ein potenter megakaryocyte colony-stimulating factor, der synergistisch mit anderen Faktoren (einschließlich Interleukin 3, Interleukin 11, Stammzell Faktor und Erythropoetin) wirkt. In Kombination mit Erythropoetin stimuliert TPO das Wachstum erythrozytärer Progenitorzellen, und in Kombination mit Stammzell Faktor und Interleukin 3 stimuliert es die Proliferation und Verlängert die Überlebenszeit hämatopoetischer Stammzellen und aller Typen von Blut-Progenitorzellen (Kaushansky 1998).

1.7.2 Stammzell Faktor (SCF)

Synonyme für SCF sind: kit ligand (KL), multipotent growth factor (MGF), mast cell growth factor (MGF), stem cell growth factor (SCGF oder steel factor (SLF). Stammzell Faktor ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der unter anderem

von den Stromazellen des Knochenmarkes gebildet. Es gibt zwei Formen von SCF, eine membrangebundene und eine lösliche Form. Diese ist ein hochgradig glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 45 kDa und besteht aus etwa 165 Aminosäuren. Es entsteht durch proteolytische Abspaltung aus der größeren membrangebundenen Form. Der genetische Code von SCF ist auf Chromosom 12 lokalisiert. SCF bindet an einen Klasse III Tyrosinkinase Proteinrezeptor mit Namen c-kit oder CD117.

Stammzell Faktor spielt eine Hauptrolle in der Hämatopoese, es wirkt auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, sowie auch auf reife Zellen. SCF alleine hat nur eine geringe kolonie-stimulierende Aktivität. In Kombination mit anderen Zytokinen nimmt sowohl die Anzahl, als auch die Größe von Zellkolonien nach Gabe von SCF zu.

Stammzell Faktor alleine ist kein potentes Stimulans der colony-forming unit-megakaryocyte (CFU-MK)-Proliferation oder Endoreplikation oder zytoplasmatischer Reifung in vitro. Dennoch vermag SCF synergistisch mit anderen Zytokinen (z.B. TPO, IL-3 oder GM-CSF) deren Fähigkeit zur Förderung des CFU-MK-Koloniewachstums und der Zunahme der Koloniegröße zu steigern (Ibelgaufts 1995, Glaspy 1996, Broudy 1997).

1.7.3 Interleukin-3 (IL-3)

Interleukin 3 ist ein aus 133 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Gewicht von 15-17 kDa. IL-3 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert, weitere Quellen sind Keratinozyten, NK Zellen, Mastzellen, Endothelzellen und Monozyten.

IL-3 unterstützt die Proliferation und Entwicklung nahezu aller Typen von hämatopoetischen Progenitorzellen sowie die Differenzierung von frühen, nicht linien-spezifischen hämatopoetischen Progenitorzellen in Granulozyten-, Makrophagen-, Erythrozyten-, Megakaryozyten- und Mastzell-Kolonien. Interleukin 3 stimuliert das klonale Wachstum von nicht-hämatopoetischen Stromazellen in Langzeit-Knochenmark-Kulturen (Ibelgaufts 1995).

1.7.4 Interleukin-11 (IL-11)

IL-11 ist ein nicht-glykosyliertes Protein aus 179 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 20 kDa. Sezerniert wird Interleukin-11 von Knochenmark–Stromazellen (Fibroblasten) und verschiedenen mesenchymalen Zellen.

IL-11 wirkt synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren in der Stimulation verschiedener Stadien und Zelllinien der Hämatopoese verschiedener Stammzelltypen (z.B. Nabelschnurblut, Knochenmark und periphere Blutstammzellen) in unterschiedlichen Zellkultursystemen (Ibelgaufts 1995, Du u. Williams 1997).

Interleukin 11 alleine kann das Wachstum von Megakaryozyten-Kolonien nicht stimulieren (Teramura et al. 1992, Weich et al. 1997), es wirkt jedoch synergistisch mit IL-3, TPO oder SCF in der Stimulation verschiedener Schritte der Megakaryozytopoese (Du u. Williams 1997, Weich et al. 1997).

1.8 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist bei vielen hämatologischen Erkrankungen, soliden Tumoren und auch Speicherkrankheiten Therapie erster Wahl mit kurativem Ansatz.

Grundsätzlich können dabei die allogene und die autologe Transplantation unterschieden werden. Bei der allogenen Transplantation werden Stammzellen eines Spenders einem Empfänger gleicher Spezies übertragen, der genetisch nicht identisch ist. Ein Sonderfall der allogenen Transplantation ist die syngene Transplantation, wo Spender und Empfänger genetisch identisch sind, bei eineiigen Zwillingen. Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten seine eigenen, vorher entnommenen Stammzellen retransplantiert.

Weitere Unterschiede liegen in der Auswahl der zu transplantierten Stammzellen, so können mobilisierte periphere Blutstammzellen, Knochenmark-Stammzellen oder Stammzellen aus Nabelschnurblut transplantiert werden.

Bei der allogenen Stammzell-Transplantation muß der Spender einen dem Empfänger möglichst ähnliches HLA (human leukocyte antigen)-Muster besitzen, um schwere Abstoßungsreaktionen, Transplantat gegen Wirt-Reaktion (graft

versus host disease (GvHD)), zu vermeiden. Aus diesem Grund wird zuerst nach Familienspendern gesucht und, wenn diese nicht verfügbar sind, nach möglichst ähnlichen, nicht-verwandten Spendern. HLA-Inkompatibilität ist mit einem verzögerten Engraftment, einem erhöhten Risiko einer Transplantatabstoßung sowie einem erhöhten Auftreten einer akuten GvHD, im Vergleich zu Transplantationen mit HLA-identischen Familienspendern, verbunden (Long and Blume 1995).

Die allogene Stammzell-Transplantation hat den Sinn, das „kranke“ Knochenmark des Patienten durch ein gesundes „fremdes“ Knochenmark zu ersetzen. Dazu werden mit einer sog. myeloablativen Therapie durch Zytostatika und/oder Ganzkörperbestrahlung die „kranken“ Knochenmarkszellen zerstört und anschließend die Spender-Stammzellen gegeben. Eine begleitende immunsuppressive Therapie verhindert die Abstoßung des Transplantats und reduziert das Risiko einer akuten GvHD.

Bei der autologen Stammzell-Transplantation werden die gesunden Stammzellen des Patienten aufbewahrt, um, z.B. bei einer Chemotherapie eines soliden Tumors, keine Rücksicht auf die knochenmarkdepressive Wirkung der Chemotherapie Rücksicht nehmen zu müssen, und auf diese Art eine höhere Dosierung benutzen zu können. Nach der Therapie können die Stammzellen dann retransfundiert werden. Ist bei solchen Erkrankungen das autologe Knochenmark mit malignen Zellen durchsetzt, kann versucht werden es in vitro vor Re-Transplantation durch geeignete „Purging“-Verfahren, z.B. CD34-Selektion, antikörpervermittelte Zellyse, etc., von den malignen Zellen zu befreien.

Wichtige Indikationen der allogenen und autologen Stammzell-Transplantationen sind in Tabelle 1.4 aufgelistet (Armitage 1994, Link et al. 1997, Link 1997).

1.9 Leukozyten- und Thrombozytenengraftment nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Als Engraftment bezeichnet man nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen den Zeitpunkt, an dem das Transplantat eine ausreichende Anzahl an Zellen (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) zu bilden vermag, um eine bestimmte Menge an peripheren Blutzellen aufrechtzuerhalten, ohne daß Zellkonzentrate gegeben werden müssen.

Von einem Leukozytenengraftment spricht man, wenn mehr als 500 Leukozyten/ μ l Blut gemessen werden, von einem Thrombozytenengraftment, wenn über mehrere Tage mehr als 20.000 Thrombozyten/ μ l Blut gemessen werden, und die letzte Thrombozyten-Substitution mehr als drei Tage zurückliegt.

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 1.4: Wichtige Indikationen zu allogenen und autologen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Das Engraftment ist im Verlauf der Behandlung aus vielen Gründen wichtig. Zum einen markiert es den Zeitpunkt des „Anwachsens“ des Knochenmarks, zum anderen sind die Patienten vor allem durch die Leukozytopenie (neben einem Zusammenbruch der Haut- und Schleimhautbarrieren etc.) besonders infektgefährdet gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen mit möglichem letalem Ausgang. Durch die Thrombozytopenie besteht zusätzlich die Gefahr lebensgefährlicher Blutungen.

In der Regel findet sich ein Engraftment nach 14 bis 28 Tagen, wobei sich durch Gabe von Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), Granulocyte macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) und Erythropoetin (Epo) die Zeitspanne zum Engraftment von Leukozyten bzw. Erythrozyten deutlich verkürzen läßt (Link et al. 1997, Link 1997). Die Zeit bis zum Engraftment wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, z.B. durch die verwendete myeloablative Therapie, die Anzahl der transplantierten Zellen, die o.g. HLA-Kompatibilität, die vor der Transplantation stattgefundenene Immunisierung des Empfängers gegen

Alloantigene auf den Spenderzellen, das Alter des Patienten, etc. (Long and Blume 1995, Drénou 1996, Hassan et al. 1997).

Bei der langen Lebensdauer der Erythrozyten und der Möglichkeit der Erythropoetin-Gabe stellt die Zeit bis zum Erythrozytenengraftment nur selten ein Problem dar, so daß in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

1.10 Problemstellung und Zielsetzung

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist für viele hämatologische oder onkologische Erkrankungen oder Speicherkrankheiten die Therapie erster Wahl.

Neben der Gefahr toxischer Nebenwirkungen durch die Chemotherapie und/oder Bestrahlung oder durch Abstoßungsreaktionen (Graft versus Host Reaction, Host versus Graft Reaction) bei allogenen Transplantationen, ist die Zeit bis zum Engraftment von Leukozyten und Thrombozyten eine für den Patienten sehr kritische Phase, da er nach Zusammenbruch der immunologischen Barrieren und während der Zeit massiver Leukozytopenie über keine funktionierenden körperlichen Abwehrmechanismen gegenüber Bakterien, Viren oder Pilzen verfügt und zusätzlich durch die Thrombozytopenie eine stark erhöhte Blutungsneigung besteht. Das Leukozytenengraftment kann durch Gabe von G-CSF oder GM-CSF deutlich beschleunigt werden. Da es bisher keine geeignete Möglichkeit zur Verkürzung der Thrombopenie in vivo gibt, müssen die Patienten bei Thrombozytenzahlen von $< 20.000/\mu\text{l}$ Thrombozytenkonzentrate erhalten, die nicht nur teuer sind, sondern auch Transfusionszwischenfälle auslösen können.

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin herauszufinden, ob es bei den allogenen Knochenmarktransplantationen, die zwischen Februar 1997 und März 1998 in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation der Universität Hamburg durchgeführt wurden, eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der dem Patienten pro Kilogramm Körpergewicht transplantierten Megakaryozyten-Progenitorzellen ($\text{CD34}^+\text{CD41}^+$ Zellen) und der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment gibt.

Das zweite Ziel der Arbeit bestand darin herauszufinden, durch welche Kombination von Thrombopoetin mit Stammzell Faktor, Interleukin 3 und/oder Interleukin 11 in Flüssigkulturen die größte Vermehrung an CD34^+ - und

CD41⁺-Zellen aus CD34-angereicherten Knochenmarkzellen im Sinne einer ex-vivo Expansion erreicht werden kann, wobei möglichst viele Kombinationen der Zytokine in einem Versuch untersucht werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Substanzen

Die hier genannten Substanzen wurden für die Durchführung der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Messungen und Experimente benötigt. Im Text werden dann nur die hier unterstrichenen Namen benutzt. In einzelnen Fällen werden die Hersteller direkt im Text aufgeführt.

1. Durchflußzytometrische Messungen

- Anti-CD45 FITC, Anti-CD34 PE, Anti-CD34 PE-Cy5, Anti-CD41 PE, IgG₁ PE und IgG₁ PE-Cy5 (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich)
- PBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium and Magnesium (Gibco Brl, Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland)
- BSA_P = Bovine Serum Albumin, Fraction V Powder (Sigma, St. Louis, MO, USA)

2. Zellseparation

- Ficoll-Paque Research Grade (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- PBS (s.o.)
- Trypan Blau = Trypan Blue Solution 0,4 % (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- BSA_S = Bovine Serum Albumin, Fraction V Solution, sterile (Sigma, St. Louis, MO, USA)

3. Zellkulturansätze

- IMDM = Iscove's Modified Dulbecco's Medium with Glutamax (Gibco Brl, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland)
- BSA_C = Bovine Serum Albumin, steril in IMDM (100 mg/ml) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)
- FCS = Fetal Calf Serum, heat-inactivated (Gibco Brl, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland)
- 2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- TPO = Recombinant Human Thrombopoietin, lyophilized (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) gelöst in PBS + 1 % BSA_S (5 µg/ml)
- SCF = Recombinant Human Stem Cell Factor, lyophilized (AMIMED Produkte AG, Allschwil, CH) gelöst in PBS + 1 % BSA_S (2 µg/ml)

- IL-3 = Recombinant Human Interleukin 3, lyophilized (AMIMED Produkte AG, Allschwil, CH) gelöst in PBS + 1 % BSA_S (2 µg/ml)
- IL-11 = Recombinant Human Interleukin 11, lyophilized (AMIMED Produkte AG, Allschwil, CH) gelöst in PBS + 1 % BSA_S (2 µg/ml)
- Aqua ad iniectabila (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)

2.2 Thrombozyten-Engraftment nach allogener Knochenmarktransplantation

2.2.1 Untersuchte Patienten

In die Untersuchung konnten 29 Patienten eingeschlossen werden, die zwischen dem 28.02.1997 und dem 16.03.1998 eine allogene Knochenmarktransplantation erhielten. Darunter waren 16 Frauen und 13 Männer zwischen 3 und 56 Jahren (Median: 37 Jahre). Die Transplantation wurde aufgrund unterschiedlicher hämatologischer Grunderkrankungen durchgeführt, davon 13x CML, 8x AML, 6x ALL, 1x MM und 1x AA. Die myeloablative Therapie bestand aus Chemotherapie, z.T. mit zusätzlicher Ganzkörperbestrahlung. Zur GvHD-Prophylaxe wurde Anti-Thymozyten-Globulin, Methotrexat und Cyclosporin A gegeben. Zur Beschleunigung des Leukozytenengraftments erhielten die Patienten G-CSF.

Routinemäßig wurde vor der Transplantation der prozentuale Anteil der CD34⁺-Zellen von den zu transplantierenden Knochenmark-Zellen (nach Lyse der Erythrozyten), sowie, neben anderen CD34-Subpopulationen, der prozentuale Anteil der CD34⁺CD41⁺-Zellen an den CD34⁺-Zellen mittels Durchflußzytometrie mit einem Epics XL mit System II Software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) bestimmt. Es wurden monoklonale Antikörper benutzt, die direkt an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrin-Cyanin (PE-Cy5) gebunden waren. Zur Messung der CD34⁺- und der CD34⁺CD41⁺-Zellen wurden die Zellen in PBS + 1 % BSA_P als Dreifachfluoreszenz mit jeweils 10 µl fluoreszenzkonjugiertem Antikörper nach folgendem Schema für 10 min inkubiert:

1. Anti-CD45 FITC + IgG₁ PE + IgG₁ PE-Cy5
2. Anti-CD45 FITC + IgG₁ PE + Anti-CD34 PE-Cy5
3. Anti-CD45 FITC + Anti-CD41 PE + Anti-CD34 PE-Cy5

Anschließend wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und bei 300 g und 21°C für 5 min zentrifugiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 500 ml PBS.

Die gefärbten Zellen wurden bis zur Messung mit einem EPICS XL mit System II Software (Coulter, Miami, FL, USA) in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte über „dot plot“-Grafiken. Nach Bestimmung der unspezifischen Bindungen konnte der prozentuale Anteil an CD34⁺-Zellen und der prozentuale Anteil der CD34⁺CD41⁺-Zellen an der CD34⁺-Population ermittelt werden. Hierzu wurden nach Darstellung der Zellen im Vorwärts- (FCS) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC) in Fenster 2 (CD45 FITC gegen SSC) die CD45⁺-Zellen in Region A markiert. Aus diesen wurde in Fenster 3 (CD34 PE-Cy5 gegen SSC) die CD34⁺-Population in Region B bestimmt, mit der in Fenster 4 (CD34 PE-Cy5 gegen CD41 PE) die Subpopulation der CD34⁺CD41⁺-Zellen gemessen wurde (Abb. 4.1).

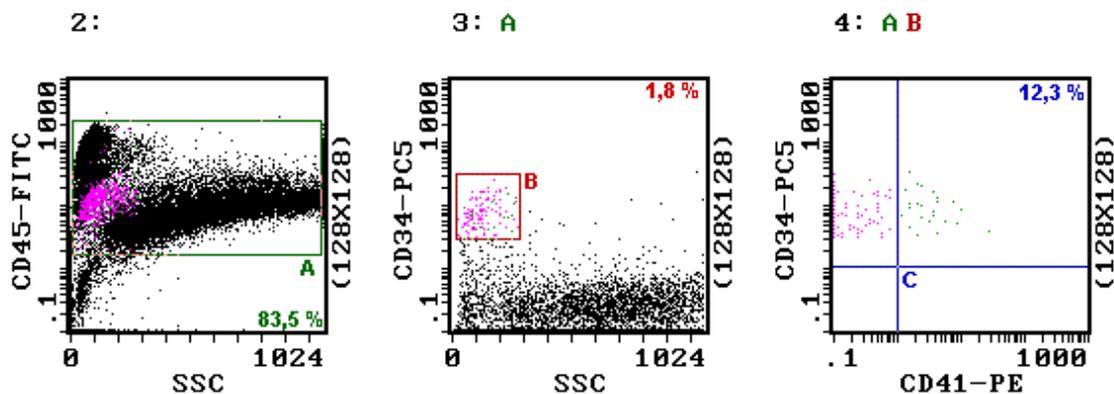


Abbildung 4.1: Messung CD34⁺-Zellen und der CD34⁺CD41⁺-Subpopulation im Transplantat als Beispiel für die im Text beschriebene durchflußzytometrische Messung. Der Anteil von CD34⁺-Zellen an den gemessenen Leukozyten (CD45⁺-Zellen) wäre hier 1,8 %, davon wären wiederum 12,3 % CD34⁺CD41⁺.

In Kenntnis der absoluten Anzahl der MNC im Transplantat und des Gewichtes des Patienten konnten so die Menge der pro kg Körpergewicht transplantierten CD34⁺-Zellen und CD34⁺CD41⁺-Zellen errechnet werden. Von Leukozytenengraftment wurde gesprochen, wenn die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut 500/µl überstieg; analog dazu mußte der Thrombozytenwert 20.000/µl überschreiten, wobei das Zeitintervall zum letzten Thrombozytenkonzentrat 3 Tage nicht unterschreiten durfte. Bei 17 der 29 Patienten war die Anzahl der bis zum Thrombozytenengraftment transfundierten Thrombozytenkonzentrate protokolliert.

14 weitere Patienten, die in diesem Zeitraum eine allogene Knochenmarktransplantation erhielten, konnten nicht in die Untersuchung aufgenommen werden, da sie vor dem Engraftment im Rahmen der Therapie an

einer GvHD oder aufgrund toxischer oder infektiöser Komplikationen verstarben, oder der Zeitpunkt des Thrombozytenengraftments nicht sicher zu bestimmen war.

2.2.2 Korrelation und statistische Auswertung der klinischen Daten

Aus den klinischen Daten wurden in Punktdiagrammen vier Korrelationen abgeleitet und eine Trendlinie hineingerechnet:

1. Leukozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen (n=29)
2. Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen (n=29)
3. Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺CD41⁺-Zellen (n=29)
4. Thrombozytenengraftment vs. erhaltene Thrombozytenkonzentrate (n=17)

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten zur Ermittlung der Abhängigkeit zweier Parameter. Der Wert des Korrelationskoeffizienten liegt zwischen -1 und $+1$, wobei ein Wert von -1 eine perfekte negative Beziehung, ein Wert von $+1$ eine perfekte positive Beziehung bezeichnet. Ein Wert von 0 zeigt, daß es keine lineare Beziehung gibt. Weiterhin wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der p-Wert als einseitige Signifikanz errechnet. Ein p-Wert von kleiner $0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

2.3 Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten-Progenitorzellen

2.3.1 Untersuchungsmaterialien

Untersucht wurde das Knochenmark von 7 gesunden Knochenmarkspendern, davon 3 weibliche und 4 männliche, die, zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme, zwischen 22 und 41 Jahre alt waren. Das für eine Transplantation vorgesehene Knochenmark wurde in Intubationsnarkose oder unter Spinalanästhesie aus dem Beckenkamm der Spender steril entnommen. Für wissenschaftliche Zwecke konnten 50 ml des Knochenmarkes benutzt werden, nachdem die Spender im Rahmen des Aufklärungsgespräches darüber informiert worden waren, und dem auch zugestimmt haben.

2.3.2 Anreicherung der mononukleären Zellen

Vor der immunomagnetischen Separation der CD34⁺ Stammzellen (siehe 2.3.3) müssen die die CD34⁺-Zellen enthaltenden mononukleären Zellen (MNC) mittels Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Paque aus dem Knochenmark isoliert werden, um so viele Erythrozyten, Thrombozyten und reife Granulozyten wie möglich aus der Probe zu entfernen. Hierbei lagert sich das Ficoll-Paque mit seiner Dichte von $1,0647 \pm 0,001$ g/ml beim Zentrifugieren zwischen die weniger dichten MNC und die dichteren Erythrozyten, Thrombozyten und reifen Granulozyten.

Sämtliche, die Zellkultur betreffenden Arbeitsschritte wurden bis zur Auswertung der Versuche unter sterilen Bedingungen und, soweit möglich, unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Als erstes wurden die ca. 50 ml Knochenmark mit PBS auf 200 ml verdünnt. Anschließend wurde diese Zellsuspension 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. Um eine erneute Vermischung der die MNC enthaltenden Phase mit dem darunter liegenden Ficoll-Paque bzw. dem Überstand zu vermeiden, wurde die Zentrifuge nach Ablauf der Zeit nicht abgebremst. Mit einer Pipette wurden die MNC aus den Ficoll-Paque-Röhrchen entfernt und zweimal mit PBS gewaschen, wobei die Pellettierung zwischen den Waschschritten durch Zentrifugation bei 300g und 21°C für 10 min erfolgte. Nach dem zweiten Waschschriff wurden das Zellpellet in 1 ml PBS + 0,5 % BSA_s resuspendiert und die Zellzahl nach Färbung mit Trypan Blau mikroskopisch mittels Neugebauer Zellzählkammer bestimmt und die Viabilität abgeschätzt. Ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen werden zur durchflußzytometrischen Bestimmung des Anteils der CD34⁺- und CD41⁺-Zellen aufbewahrt.

2.3.3 Anreicherung der CD34⁺-Zellen

Die Anreicherung der CD34⁺-Zellen erfolgte mittels MiniMACS Zellseparationssäulen und dem dazugehörigen CD34 Progenitor Zell Isolations-Set (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die MNC wurden, nach Zugabe eines sog. „blocking reagent“ zur Vermeidung unspezifischer

Bindungen an die Fc-Rezeptoren mit einem chemisch modifizierten Anti-CD34-Antikörper für 15 min bei 4 bis 8°C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, gewaschen. Der dabei verwendete QBEND/10-Antikörper war mit einem Hapten modifiziert. An dieses Hapten wurden in einem zweiten Inkubationsschritt, 15 min bei 6 bis 12°C, Anti-Hapten-MicroBeads gebunden. Dies sind Antikörper gegen das o.g. Hapten, die mit einem ca. 50 nm großen „superparamagnetischen Bead“ gekoppelt sind (Miltenyi Biotec Inc. 1997). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die so markierten Zellen auf die, in einem Magneten plazierte, MiniMACS Zellseparationssäulen gegeben. Beim Durchlaufen der Zellsuspension durch die Säule wurden die markierten CD34⁺-Zellen in dem magnetischen Feld zurückgehalten, während die CD34⁻-Zellen das Feld passieren und die Säule verlassen konnten. Nach Entfernen der Säule aus dem Magneten konnten die CD34⁺-Zellen elutriert werden. Um eine noch größere Reinheit an CD34⁺-Zellen zu erreichen, wurde dieser Separationsschritt noch ein zweites Mal wiederholt. Die Inkubation und die CD34⁺-Anreicherung erfolgten in PBS mit 0,5 % BSA_s (Abb. 2.2) (Miltenyi et al. 1994).

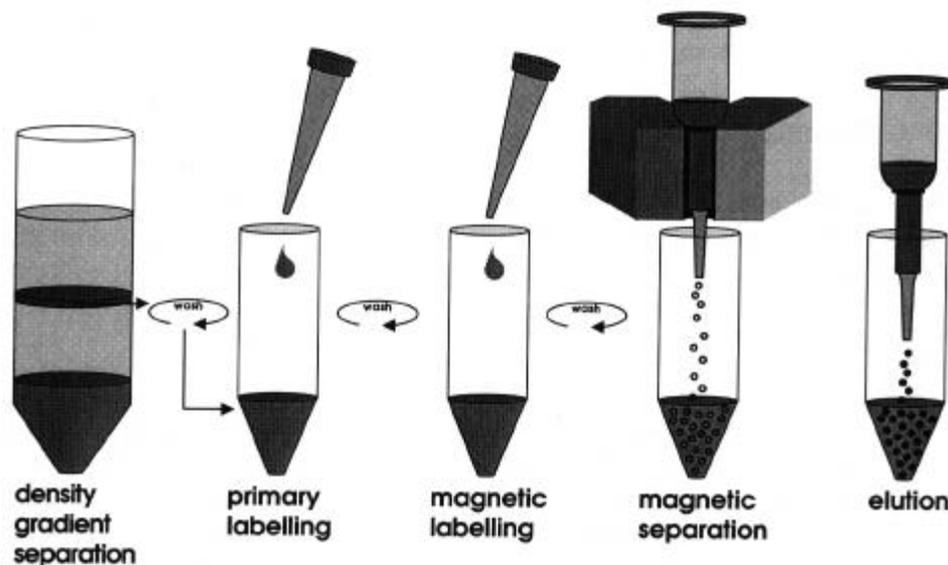


Abbildung 2.2: Magnetische Markierung und Separation mit dem CD34-Isolation Kit und MiniMACS. Mononukleäre Zellen werden mittels Dichtegradienten-Separation isoliert. Die CD34⁺-Zellen werden mit einem chemisch modifizierten CD34-Antikörper markiert, der mit spezifischen MACS Microbeads magnetisch gefärbt 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).

Nach Beendigung der CD34-Anreicherung wurden die so gewonnenen Zellen mikroskopisch (s.o.) gezählt, und mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen, zusammen mit den

zurückbehaltenen MNC, zur Bestimmung der Reinheit und der Ausbeute für die durchflußzytometrische Messung gefärbt (siehe Abschnitt 2.3.6 und 2.3.7).

2.3.4 Ansatz der Flüssigkulturen

Die zu untersuchenden Zytokine (TPO, SCF, IL-3 und IL-11) wurden in folgenden Kombinationen mit den unter 2. bis 5. genannten Konzentrationen untersucht:

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| 1. Kontrolle (keine Zytokine) | 7. TPO + IL-3 |
| 2. TPO (100 ng/ml) | 8. TPO + IL-11 |
| 3. SCF (50 ng/ml) | 9. TPO + SCF + IL-3 |
| 4. IL-3 (25 ng/ml) | 10. TPO + SCF + IL-11 |
| 5. IL-11 (50 ng/ml) | 11. TPO + IL-3 + IL-11 |
| 6. TPO + SCF | 12. TPO + SCF + IL-3 + IL-11 |

Je nach in der CD34-Anreicherung erhaltener Zellzahl wurden $5 \cdot 10^4$ bis $1 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml Zellkulturmedium bestehend aus IMDM mit 1 % BSA_C, 15 % FCS und $5 \cdot 10^{-5}$ M 2-Mercaptoethanol mit den o.g. Zytokinen in den o.g. Konzentrationen in zwei 12-well-plates (Costar, Cambridge, MA, USA) à 6 Parameter angesetzt. Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums wurde nach Haylock et al. (1994), Miyazaki et al. (1995) Piacibello et al. (1996) und Yonemura et al. (1997) modifiziert und nach Vorversuchen in o.g. Form festgelegt.

Die verbliebenen „wells“ wurden mit Aqua ad iniectabilia gefüllt, um eine Austrocknung der Kulturen zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank in Luft mit 5 % CO₂ bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 37°C für 10 Tage. An Tag 4 und 7 wurden die Zellen mit 1 ml Zellkulturmedium mit den entsprechenden Zytokinen gefüttert.

2.3.5 Zellzahlbestimmung nach Beendigung des Versuches

An Tag 10 wurden die Zellen aus den Zellkulturschalen in 15 ml Spitzröhrchen pipettiert und zweimal mit PBS + 1 % BSA_P gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS + 1 % BSA_P resuspendiert, so daß eine genügend hohe Zellkonzentration für die mikroskopische Zellzählung mittels Neugebauer Zellzählkammer, nach Färbung mit Trypan Blau, erreicht werden konnte.

2.3.6 Färbung der Zellen für die durchflußzytometrische Messung

Zur Bestimmung des Anteils der hämatopoetischen Progenitorzellen und des Anteils der zur megakaryozytären Linie gehörenden Zellen wurden Antikörper gegen das CD45-, CD34- und CD41-Oberflächenantigen (siehe 1.3.1 bis 1.3.3) benutzt.

Bei der durchflußzytometrischen Messung sind ausschließlich monoklonale Antikörper eingesetzt worden, die direkt an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder an Phycoerythrin (PE) gebunden waren. Dabei war der CD34-Antikörper mit PE und der CD45-Antikörper mit FITC gekoppelt (Gutensohn u. Serke 1996). Analog dazu wurde Anti-CD41 PE zur Bestimmung der Megakaryozyten-Progenitorzellen (Ayala et al. 1996), bzw. IgG₁-PE als Kontrollantikörper für unspezifische Bindungen benutzt.

Die nach der Zählung verbliebenen Zellen jedes Parameters wurden in drei gleiche Anteile in 5 ml-Durchflußzytometrie-Röhrchen pipettiert und mit PBS + 1 % BSA_p auf 100 µl aufgefüllt. Die Färbung mit jeweils 10 µl fluoreszenzkonjugiertem Antikörper erfolgte nach folgendem Schema:

1. Anti-CD45 FITC + Anti-CD34 PE
2. Anti-CD45 FITC + Anti-CD41 PE
3. Anti-CD45 FITC + IgG₁ PE

Nach 10 min Inkubation wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und bei 300 g und 21°C für 5 min zentrifugiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 500 µl PBS. Die gefärbten Zellen wurden bis zur Weiterverwendung in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

2.3.7 Durchflußzytometrische Messung von CD34 und CD41

Die durchflußzytometrische Messung erfolgte mit einem EPICS XL mit System II Software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Gemeinsam mit einem Repräsentanten der Firma Coulter/Immunotech wurde entsprechend der zu messenden Zellen und der Fragestellung ein Bildschirmaufbau entworfen und eine Kompensation (Eichung) des Gerätes durchgeführt, die nach einigen Versuchen wiederholt wurde, um auf veränderte Geräteeinstellungen zu reagieren.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte über „dot plot“-Grafiken. In Fenster 1 (Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC)) des Bildschirmaufbaus wurden die Zielzellen markiert, und, besonders bei den Kulturzellen, versucht, Zellfragmente mit Antikörperbindungen oder Verunreinigungen durch Zellkulturmaterialien von der Messung auszuschließen. Mit diesen in Region B markierten Zellen wurde die Messung fortgesetzt und erst beendet, wenn in Fenster 2 (CD45 FITC gegen SSC) 50.000 Ereignisse gezählt waren, bzw. eine Messzeit von 300 sec überschritten war. Hier wurden in Region A die CD45⁺-Zellen markiert, um aus dieser Population in Fenster 3 (CD34 PE gegen CD45 FITC) den prozentualen Anteil der CD34⁺-Zellen (Region C) an den CD45⁺-Zellen zu bestimmen. Diese Bildschirmeinstellungen wurden gespeichert, um nach Messung der unspezifischen Bindungen mit IgG₁ PE deren prozentualen Anteil an den CD45⁺-Zellen in der zu Region C identischen Region E von dem prozentualen Anteil der CD34⁺-Zellen abziehen zu können, und so eine höhere Meßgenauigkeit zu erreichen (Abb. 2.3). Die Messung des Anteils der CD41⁺-Zellen an den CD45⁺-Zellen erfolgte nach dem selben Schema.

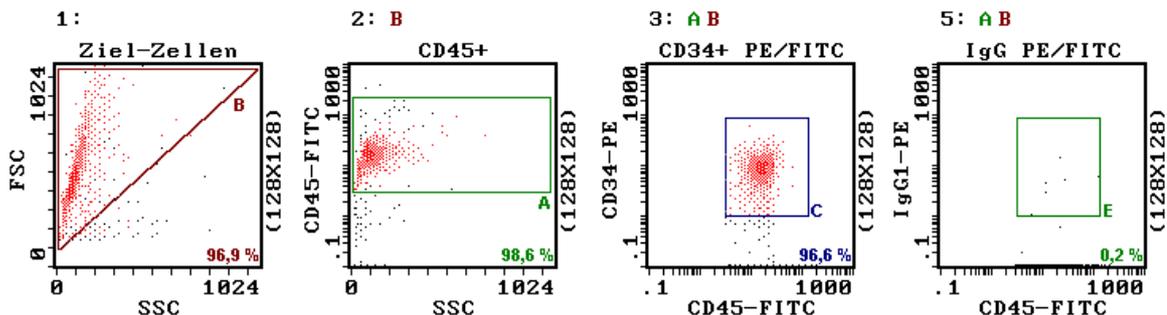


Abbildung 2.3: Messung CD34⁺-Zellen nach Separation mit MiniMACS Zellseparationssäule als Beispiel für die im Text beschriebene durchflußzytometrische Auswertung. Der Anteil von CD34⁺-Zellen an den gemessenen Leukozyten (CD45⁺-Zellen) wäre hier 96,6 % - 0,2 % = 96,4 %.

Die gewonnen Daten wurden auf 100 MB ZIP-Disks (Iomega, Roy, Utah, USA) gesichert.

2.3.8 Verarbeitung der Meßdaten und statistische Auswertung

Die erhobenen durchflußzytometrischen Daten wurden zum Teil zu einem späteren Zeitpunkt nachbearbeitet.

Insgesamt konnten Meßwerte von allen 7 Versuchen unterschiedlicher Knochenmarkproben ausgewertet werden.

Aus den ermittelten Zellzahlen und den gemessenen prozentualen Anteilen an CD34⁺- und CD41⁺-Zellen wurden die CD34⁺- und CD41⁺-Zellzahlen errechnet, ausgehend von einer an Tag 0 eingesetzten Zellmenge von $5 \cdot 10^4$ Zellen.

Untersucht wurde der Einfluß der verschiedenen Zytokinkombinationen auf Veränderungen der absoluten Zellzahl, den prozentualen Anteilen an CD34⁺- und CD41⁺-Zellen sowie der Anzahl der CD34⁺- und CD41⁺-Zellen. Die Daten wurden in Tabellen zusammengefaßt und jeweils für die graphische Darstellung der Median mit der entsprechenden Spannweite errechnet. Die statistische Auswertung wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt, um bei kleinen Stichproben zwei Meßreihen auf gleiche Verteilung zu prüfen. Zwei Meßreihen wurden als statistisch signifikant unterschiedlich bewertet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

Durchgeführt wurden alle statistischen Auswertungen mit folgenden Computerprogrammen: WinSTAT 3.1, SPSS 7.5 for Windows und MS Excel 97.

3. Ergebnisse

3.1 Thrombozyten-Engraftment nach allogener Knochenmarkstransplantation

Die untersuchten 29 Patienten hatten ein Leukozytenengraftment nach 10 bis 19 Tagen (Median: 15 Tage) nach Transplantation und ein Thrombozytenengraftment nach 16 bis 41 Tagen (Median: 25 Tage). Der Anteil von CD34⁺-Zellen im Transplantat lag zwischen 0,6 % und 4,5 % (Median: 1,4 %), von denen 1,4 % bis 28,6 % (Median: 6,3 %) CD34⁺CD41⁺-Zellen waren. In Kenntnis der absoluten Zellmenge im Transplantat und des Gewichtes des Patienten resultierte daraus eine transplantierte Zellzahl von $1,1 \cdot 10^6$ bis $7,4 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen/ kg Körpergewicht (Median: $3,5 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen/kg KG) und $3,0 \cdot 10^4$ bis $1,3 \cdot 10^6$ CD34⁺CD41⁺-Zellen/kg KG (Median: $2,4 \cdot 10^5$ CD34⁺CD41⁺-Zellen/kg KG).

Bei 17 der Patienten war die Anzahl der bis zum Thrombozytenengraftment transfundierten Thrombozytenkonzentrate bekannt. Diese Patienten erhielten zwischen 5 und 22 Thrombozytentransfusionen (Median: 13).

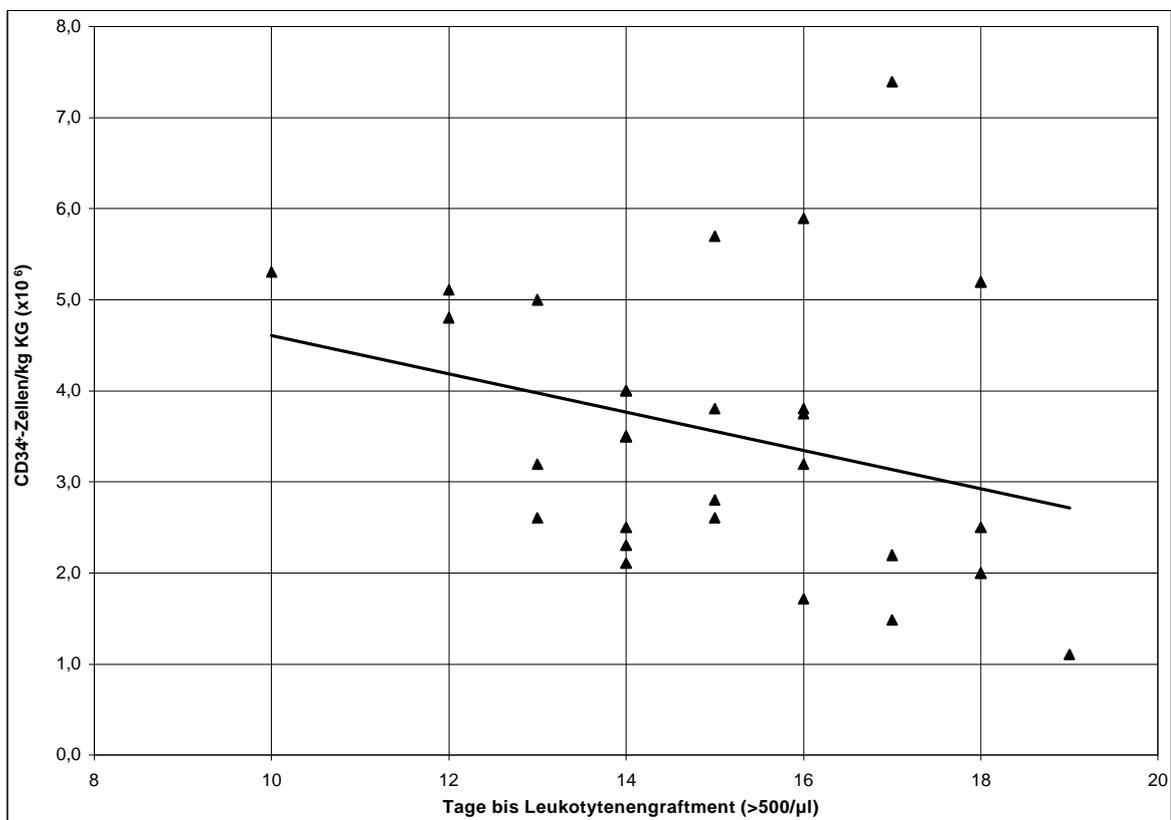


Abbildung 3.1: Leukozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen (n=29)
Trendliniengleichung: $y = -0,21x + 6,71$

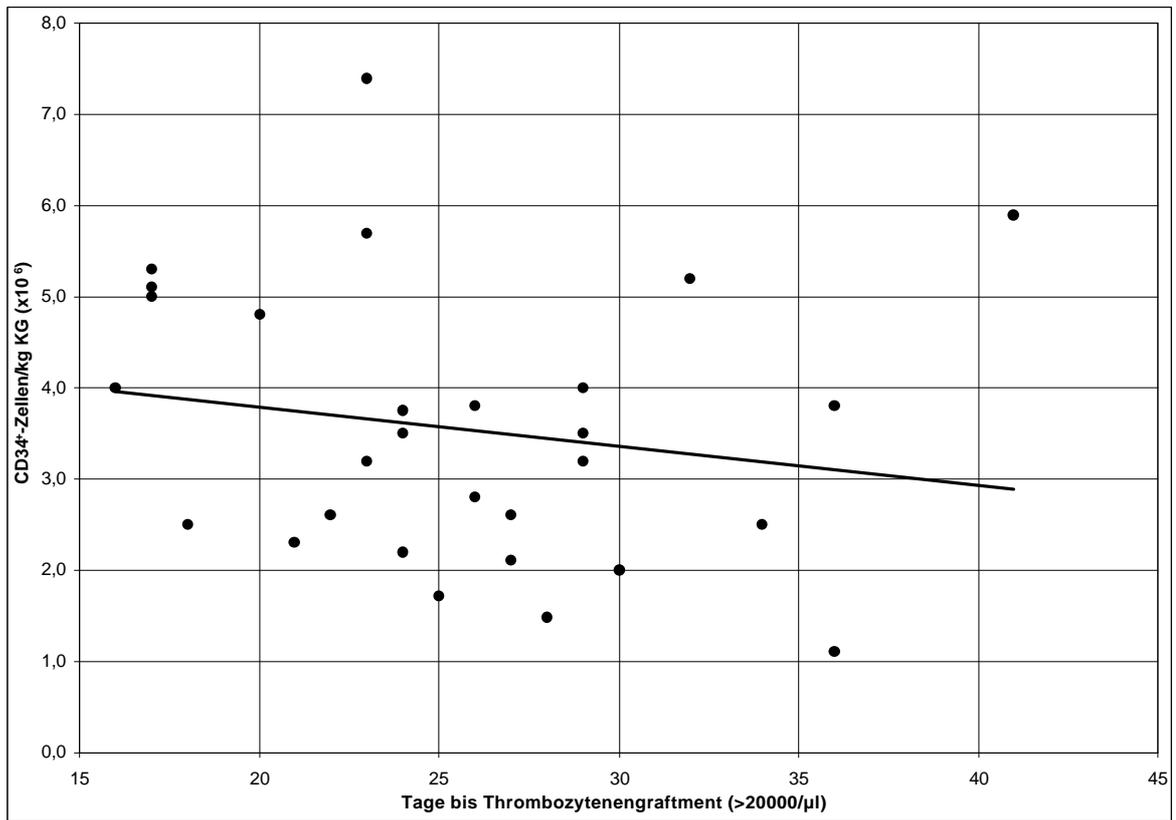


Abbildung 3.2: Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen (n=29)
Trendliniengleichung: $y = -0,04x + 4,65$

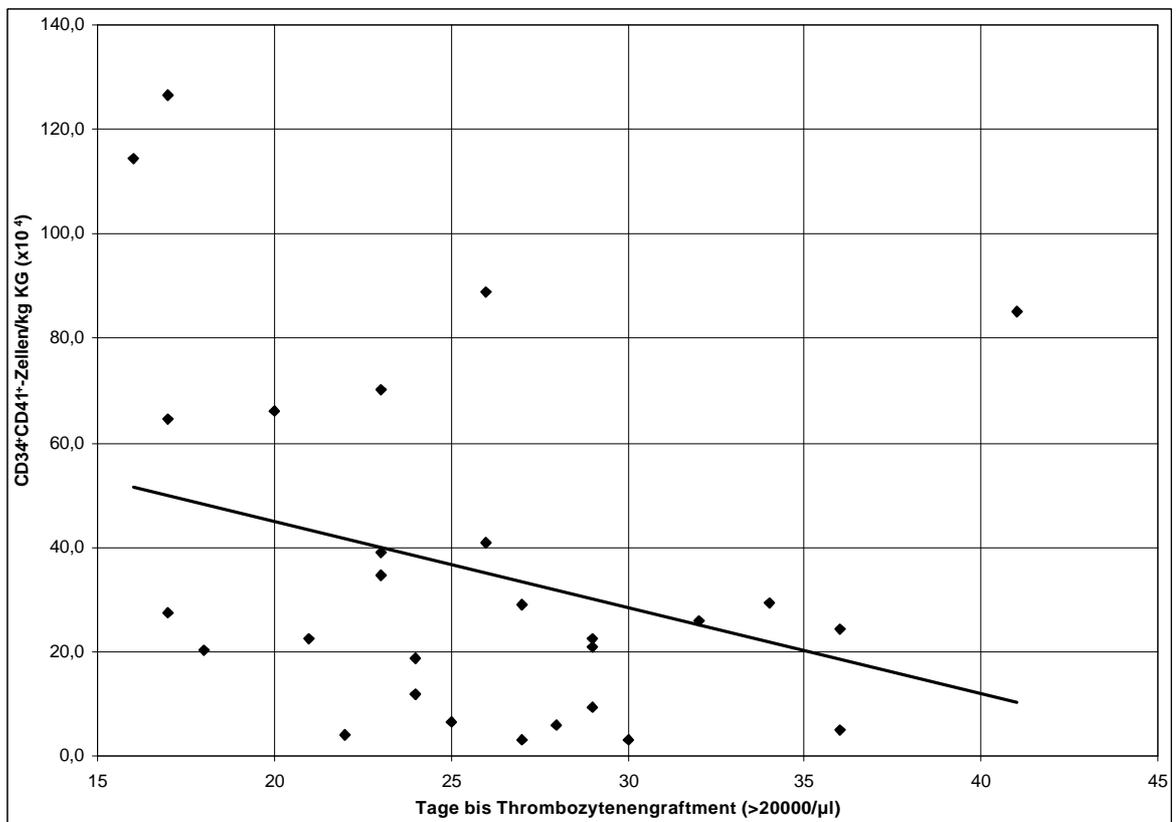


Abbildung 3.3: Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺CD41⁺-Zellen (n=29)
Trendliniengleichung: $y = -1,64x + 77,63$

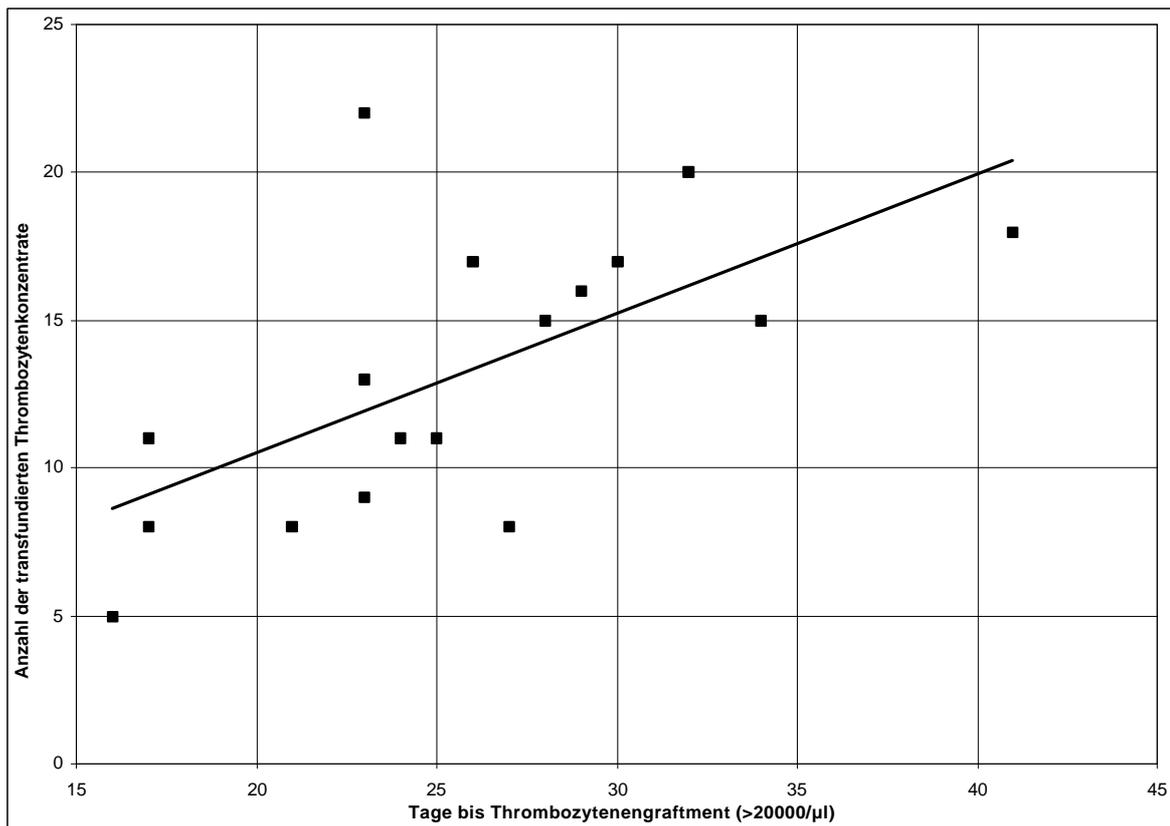


Abbildung 3.4: Thrombozytenengraftment vs. erhaltene Thrombozytenkonzentrate (n=17)
Trendliniengleichung: $y = 0,47x + 1,07$

Die graphische Darstellung der Korrelationen zwischen den transplantierten Zellmengen pro kg KG und der Dauer bis zum Leukozyten- bzw. Thrombozytenengraftment zeigen die in Abb. 3.1 bis 3.3 dargestellten Verteilungen und Trendlinien. Die Korrelation zwischen der Dauer bis zum Thrombozytenengraftment und der Anzahl der transfundierten Thrombozytenkonzentrate ist in Abb. 3.4 dargestellt.

Bei den drei Korrelationen, die die transplantierte Zellzahl betrafen, ergaben sich nach Anwendung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten folgende p-Werte und Korrelationskoeffizienten:

Leukozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen:

$p=0,045$; Korrelationskoeffizient $r = - 0,320$

Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen:

$p=0,086$; Korrelationskoeffizient $r = - 0,261$

Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺CD41⁺-Zellen:

$p=0,038$; Korrelationskoeffizient $r = - 0,335$

In allen drei Fällen zeigt sich ein negativer Korrelationskoeffizient als Hinweis auf eine, wie auch schon durch die Trendlinien in den Abb. 3.1 bis 3.3 dargestellt, negative Beziehung zwischen den korrelierten Daten.

Mit einem p-Wert von kleiner 0,05 sind die Korrelationen von Leukozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen und Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺CD41⁺-Zellen statistisch signifikant, was dahingehend interpretiert werden kann, daß sich mit zunehmender Anzahl transplanterter Zellen pro kg KG die Zeit zum Engraftment verkürzt.

Die Korrelation von Thrombozytenengraftment vs. transplantierte CD34⁺-Zellen zeigt zwar eine Tendenz, ist jedoch mit einem p-Wert von 0,086 nicht statistisch signifikant.

Die Korrelation der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment mit der Anzahl der verabreichten Thrombozytenkonzentrate ergab mit einem p-Wert von 0,002 eine statistische Signifikanz bei einer positiven Beziehung (Korrelationskoeffizienten von $r = +0,66$) zwischen den korrelierten Daten.

3.2 Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten-Progenitorzellen

Wenn in den folgenden Abschnitten statistische Signifikanzen beschrieben werden sind dies Werte, die mit dem Wilcoxon Test errechnet wurden. Dabei wird paarweise verglichen, ob die Meßwerte zweier Parameter die gleiche Verteilung aufweisen. Eine statistische Signifikanz besteht dann, wenn der p-Wert kleiner 0,05 ist. Die p-Wert-Tabellen finden sich im Anhang.

3.2.1 Die CD34⁺-Anreicherung

Eingesetzt wurden in die CD34⁺-Anreicherung mittels MiniMACS Zellseparationssäulen zwischen $9 \cdot 10^7$ und $2 \cdot 10^8$ (Median: $1,3 \cdot 10^8$) mononukleäre Zellen von denen 1,9 % bis 6,8 % (Median: 4,3 %) CD34⁺ und 4 % bis 23,6 % (Median: 13,9 %) CD41⁺ waren.

Die erhaltene Zellmenge nach der Selektion lag zwischen $1 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^6$ (Median: $1,4 \cdot 10^6$) CD34⁺-angereicherte Zellen mit einem prozentualen Anteil an

CD34⁺-Zellen zwischen 86,2 % und 96,4 % (Median: 91,1 %) und CD41⁺-Zellen zwischen 1,4 % und 28,2 % (Median: 14,4 %).

Die Ausbeute betrug an CD34⁺-Zellen 13,2 % bis 38,0 % (Median: 23,5 %), an CD41⁺-Zellen 0,3 % bis 2,8 % (Median: 0,8 %).

3.2.2 Die absolute Zellzahl

In Abb. 3.5 a ist erkennbar, daß sich das Wachstumsverhalten der Zellen bei den einzelnen Parametern sehr ähnlich verhält (siehe dazu p-Wert-Tabellen im Anhang). Weiterhin zeigt sich, daß es Knochenmarkproben gibt, die bei identischem Versuchsaufbau in nahezu allen Parametern ein stärkeres bzw. schwächeres Zellwachstum zeigen als andere Proben.

In Abb. 3.5 b ist dargestellt, daß die absolute Zellzahl im Median sowohl im Vergleich mit der eingesetzten Zellzahl als auch im Vergleich zur Kontrolle bei den Parametern signifikant zugenommen hat, die IL-3 in verschiedenen Kombinationen enthalten (4, 7, 9, 11 und 12). Die Parameter 4, 7 und 11 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, der Zellzahl-Anstieg im Vergleich zu den Parametern 9 und 12 ist jedoch signifikant und kann auf das Hinzufügen von SCF zurückgeführt werden. Eine Zugabe von IL-11 erbrachte keinen weiteren Benefit.

TPO spielt keine entscheidende Rolle in Bezug auf den Zellzahl-Anstieg, so zeigen nur die Parameterpaare 1 und 2 sowie 3 und 6 zwar einen statistisch signifikanten, jedoch absolut nur geringen Anstieg im Median.

Der Median der Parameter 9 und 12 zeigt in Bezug auf die eingesetzte Zellmenge (0) etwa eine Vermehrung um den Faktor 6,2, in Bezug auf die Kontrolle (1) etwa um den Faktor 12,9.

Bei den übrigen Parametern (2, 3, 5, 6, 8 und 10) hat die absolute Zellzahl im Vergleich zu der eingesetzten Zellzahl in fast allen Fällen etwas abgenommen, im Vergleich zur Kontrolle nur gering zugenommen (max. um den Faktor 2,5 bei Parameter 6).

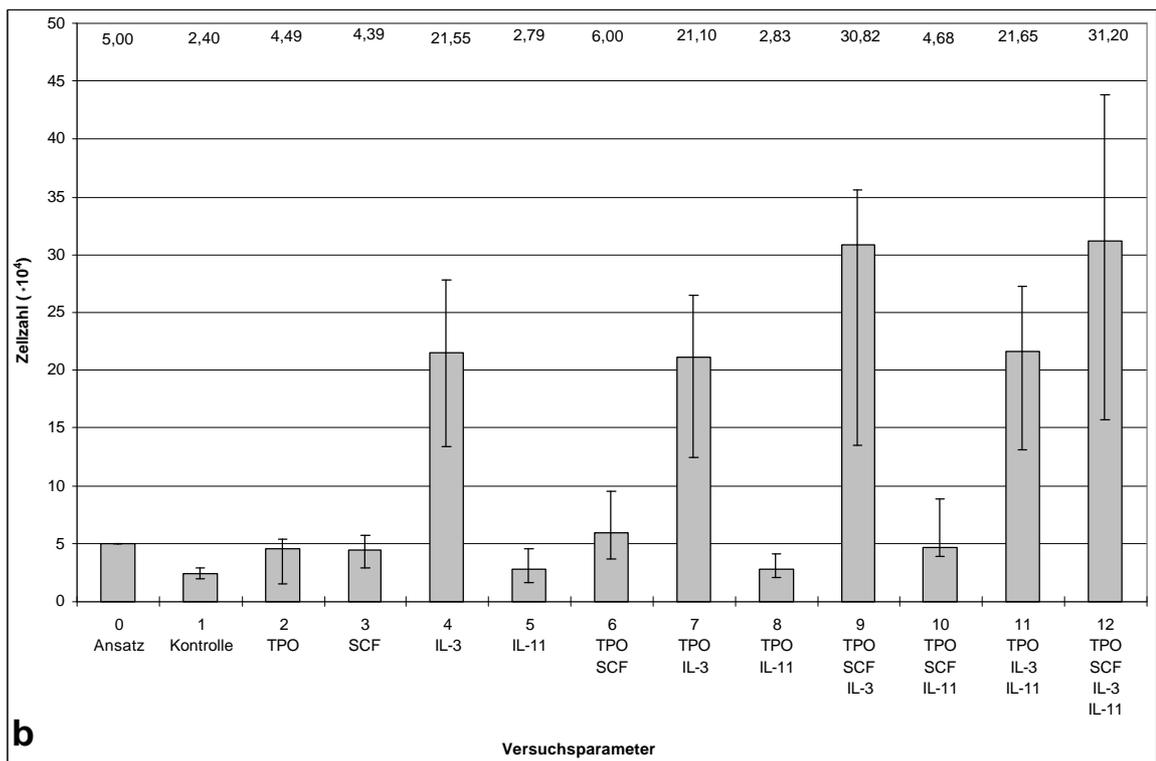
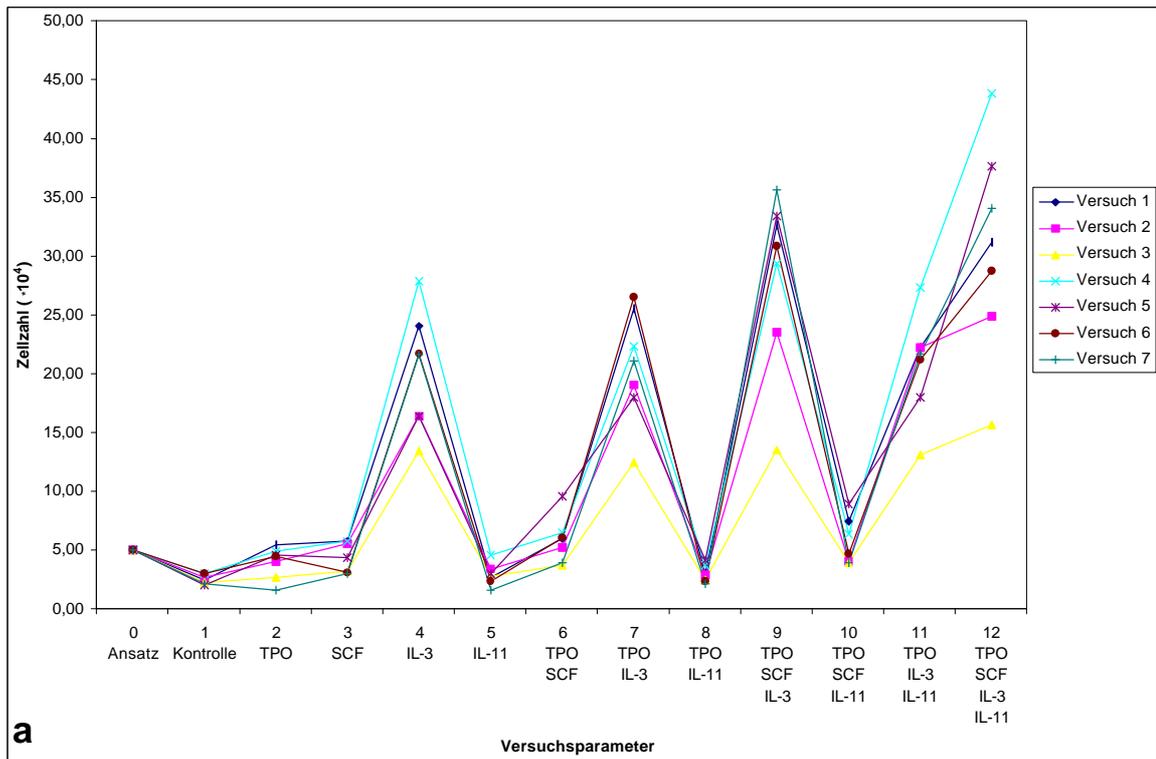


Abbildung 3.5: Die absolute Zellzahl der eingesetzten Zellmenge sowie der untersuchten Zytokinkombinationen nach Beendigung des Versuches. Darstellung als Linien-Diagramm der einzelnen Versuche (a) und als Säulendiagramm der Median-Werte mit Spannweite (b).

3.2.3 Der prozentuale Anteil an CD34⁺-Zellen an der absoluten Zellzahl

Im Vergleich zum Ansatz (0) mit einem prozentualen Anteil an CD34⁺-Zellen von 91,1 % im Median hat dieser bei allen Parametern signifikant abgenommen. Der geringste Anteil an CD34⁺-Zellen findet sich bei Parameter 8 mit 28,4 %, der größte Anteil bei Parameter 12 mit 48,1 %. In der ohne Zytokine durchgeführten Kontrolle fanden sich 31,8 % CD34⁺-Zellen. (Abb. 3.6 b).

In der Darstellung der prozentualen Anteile an CD34⁺-Zellen in den einzelnen Versuchen in Abb. 3.6 a sind keine sicheren Tendenzen erkennbar. Auch die Auswertung der errechneten p-Werte zeigt nur wenige signifikante Korrelationen, die auf keine eindeutigen Zytokinkombinationen zurückgeführt werden können (siehe p-Wert-Tabellen im Anhang). Es finden sich jedoch Versuche, deren prozentualer Anteil an CD34⁺-Zellen in nahezu allen Parametern höher ist als bei anderen Knochenmarkproben.

3.2.4 Der prozentuale Anteil an CD41⁺-Zellen an der absoluten Zellzahl

Wie schon bei dem prozentualen Anteil an CD34⁺-Zellen, finden sich hier erneut Versuche, in denen der Anteil an CD41⁺-Zellen bei den meisten Parametern höher ist als bei anderen Experimenten (Versuch 5 und 7). Insgesamt zeigt sich jedoch, daß sich hier der Prozentsatz an CD41⁺-Zellen bei den einzelnen Parametern in den verschiedenen Experimenten häufig sehr ähnlich verhält (Abb. 3.7 a).

Wie in Abb. 3.7 b erkennbar, gibt es in Bezug auf die eingesetzten Zellen (Parameter 0) keine Zytokinkombination, bei der es zu einem signifikanten Anstieg im prozentualen Anteil an CD41⁺-Zellen im Median gekommen ist.

In Bezug auf die Kontrolle (1) findet sich ein signifikanter Anstieg im Prozentsatz der CD41⁺-Zellen bei den Parametern 4,6,7,9,10,11 und 12, der mit einem Faktor von 1,6 bei Parameter 6 am niedrigsten und mit einem Faktor von 3,4 bei Parameter 9 am höchsten ist. IL-3 alleine (4) erreicht als einziges einzelnes Zytokin eine Vermehrung des prozentualen Anteiles an CD41⁺-Zellen um den Faktor 2,1 im Vergleich zu Kontrolle. Keine signifikanten Unterschiede finden sich zwischen den Parametern 7,9,11 und 12, die eine Vermehrung des prozentualen Anteiles an CD41⁺-Zellen um den Faktor 2,9 (11) bis 3,4 (9) im Median erreichen.

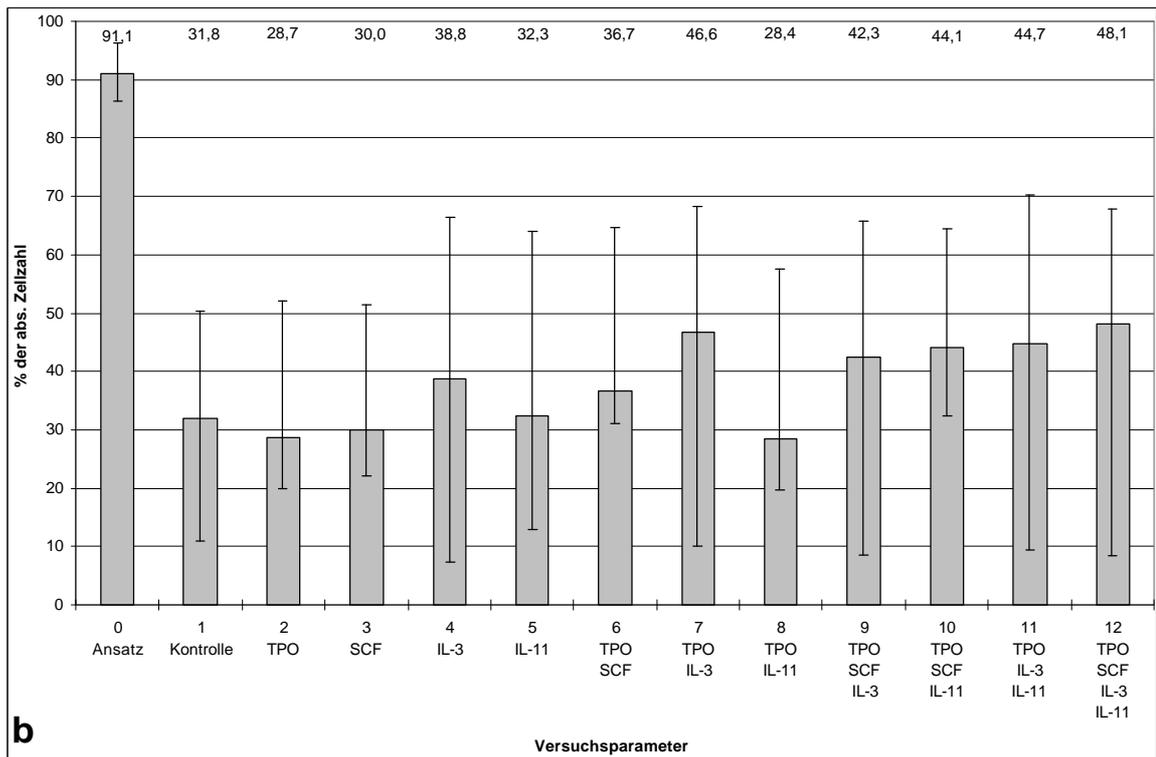
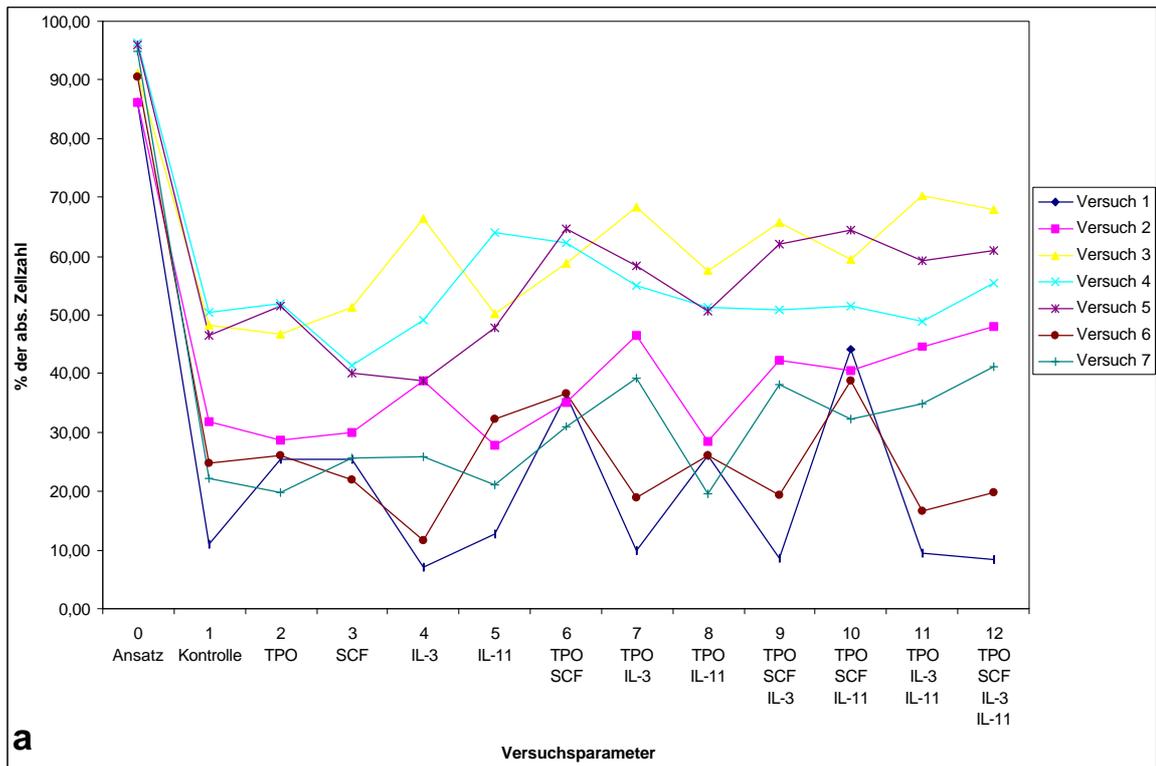


Abbildung 3.6: Der prozentuale Anteil an CD34⁺-Zellen der eingesetzten Zellmenge sowie der untersuchten Zytokinkombinationen nach Beendigung des Versuches. Darstellung als Linien-Diagramm der einzelnen Versuche (a) und als Säulendiagramm der Median-Werte mit Spannweite (b).

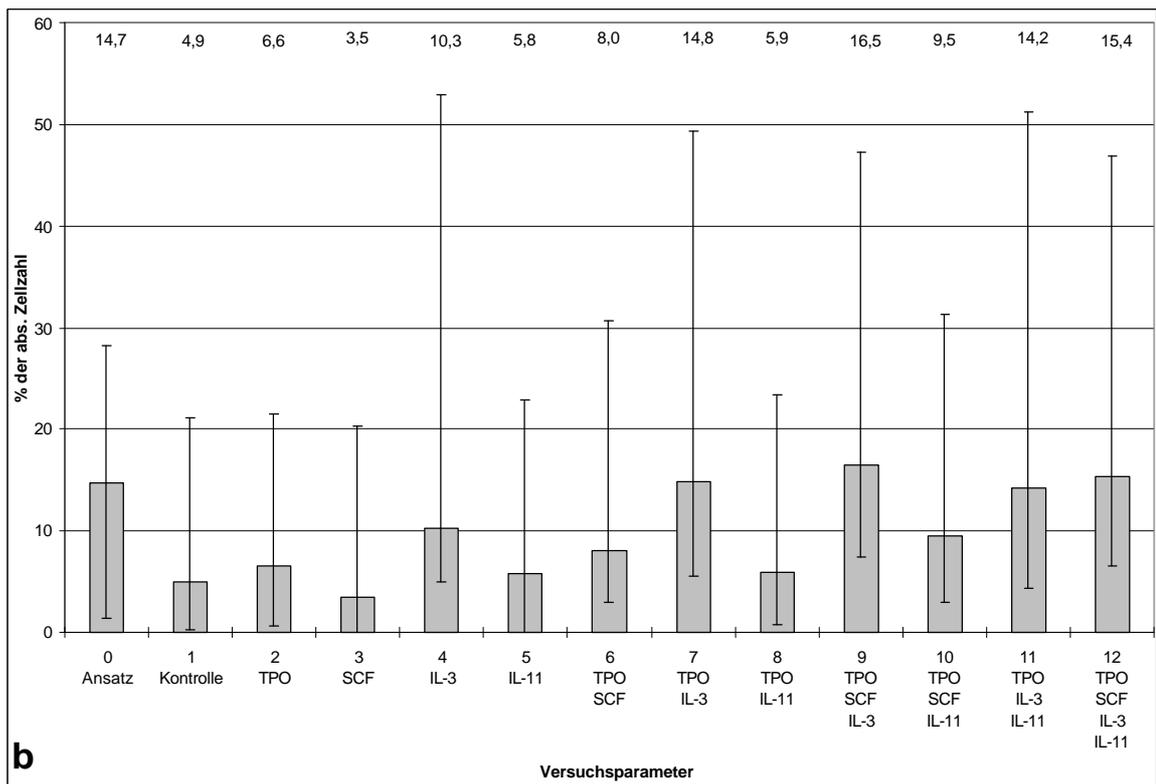
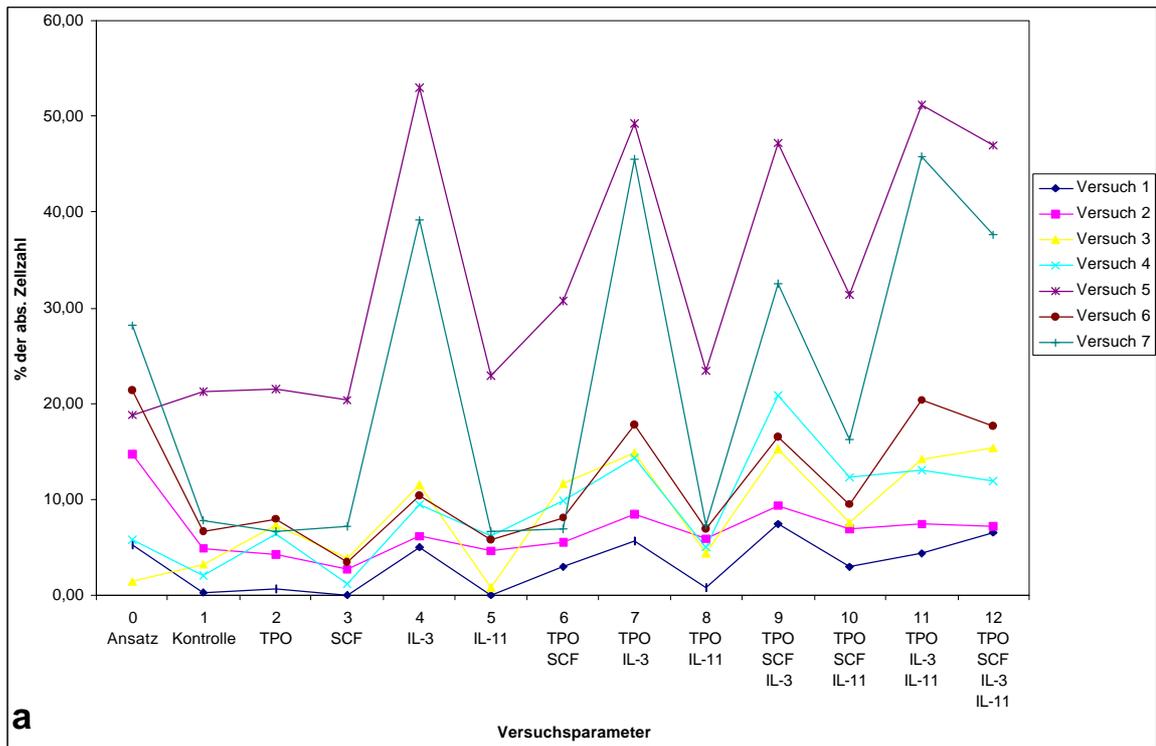


Abbildung 3.7: Der prozentuale Anteil an CD41⁺-Zellen der eingesetzten Zellmenge sowie der untersuchten Zytokinkombinationen nach Beendigung des Versuches. Darstellung als Linien-Diagramm der einzelnen Versuche (a) und als Säulendiagramm der Median-Werte mit Spannweite (b).

Alle diese Parameter enthalten eine Kombination aus TPO und IL-3 mit oder ohne SCF oder IL-11, die somit zu keinem weiteren signifikanten Anstieg im Prozentsatz der CD41⁺-Zellen führen.

TPO allein zeigt im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Anstieg im Anteil der CD41⁺-Zellen. Ein signifikanter Anstieg des Prozentsatzes der CD41⁺-Zellen im Median lässt sich mit der Kombination von TPO und SCF im Gegensatz zu SCF allein erreichen, der abgebildete Anstieg von IL-3 allein zu TPO mit IL-3 ist statistisch nicht signifikant, obwohl hier in sechs von sieben Versuchen ein Anstieg des Prozentsatzes an CD41⁺-Zellen erreicht wurde.

3.2.5 Anzahl der CD34⁺-Zellen

Die Anzahl der CD34⁺-Zellen errechnet sich aus der absoluten Zellzahl und dem prozentualen Anteil an CD34⁺-Zellen.

Die in Abb. 3.8 dargestellten Werte sind also „kumulative“ Werte der in Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen und in Abb. 3.5 und 3.6 dargestellten Ergebnisse. Wie in Abb 3.5 a zeigen die Zellen in Abb. 3.8 a ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten bei den verschiedenen Zytokinkombinationen. In Abb. 3.8 b finden sich dementsprechend im Median die höchsten CD34⁺-Zellzahlen erneut in den Parametern, die IL-3 enthalten (4, 7, 9, 11 und 12), wobei IL-3 alleine (4) die niedrigste Anzahl an CD34⁺-Zellen, die Kombination aus IL-3 mit TPO und SCF mit und ohne IL-11 (9 und 12) erneut die größte Anzahl an CD34⁺-Zellen hervorbringt. Die Zugabe von IL-11 zeigt hier ebenfalls keinen signifikanten Anstieg in der CD34⁺-Zellzahl.

Vergleicht man hier wiederum Parameter 7 mit 9 und 11 mit 12, so findet sich in beiden Fällen ein signifikanter Anstieg in der Anzahl der CD34⁺-Zellen, der sich, wie schon bei der absoluten Zellzahl, auf die Zugabe von SCF zurückführen lässt. Bezogen auf die Kontrolle lässt sich mit den Parametern 9 und 12 im Median eine Vermehrung der CD34⁺-Zellen um den Faktor 11,7 bzw. 14,1 erreichen, wobei der Unterschied zwischen diesen beiden Parametern mit einem p-Wert von 0,06, wie eingangs erwähnt, im strengen Sinne nicht statistisch signifikant ist, und sich hier dementsprechend ebenfalls kein Benefit durch die Zugabe von IL-11 erreichen lässt.

Bezogen auf die eingesetzte CD34⁺-Zellzahl findet sich mit den Parametern 9 und 12 eine Zellvermehrung um den Faktor 2,2 bzw. 2,6, so daß hier von einer ex-vivo Expansion der CD34⁺-Zellen gesprochen werden kann.

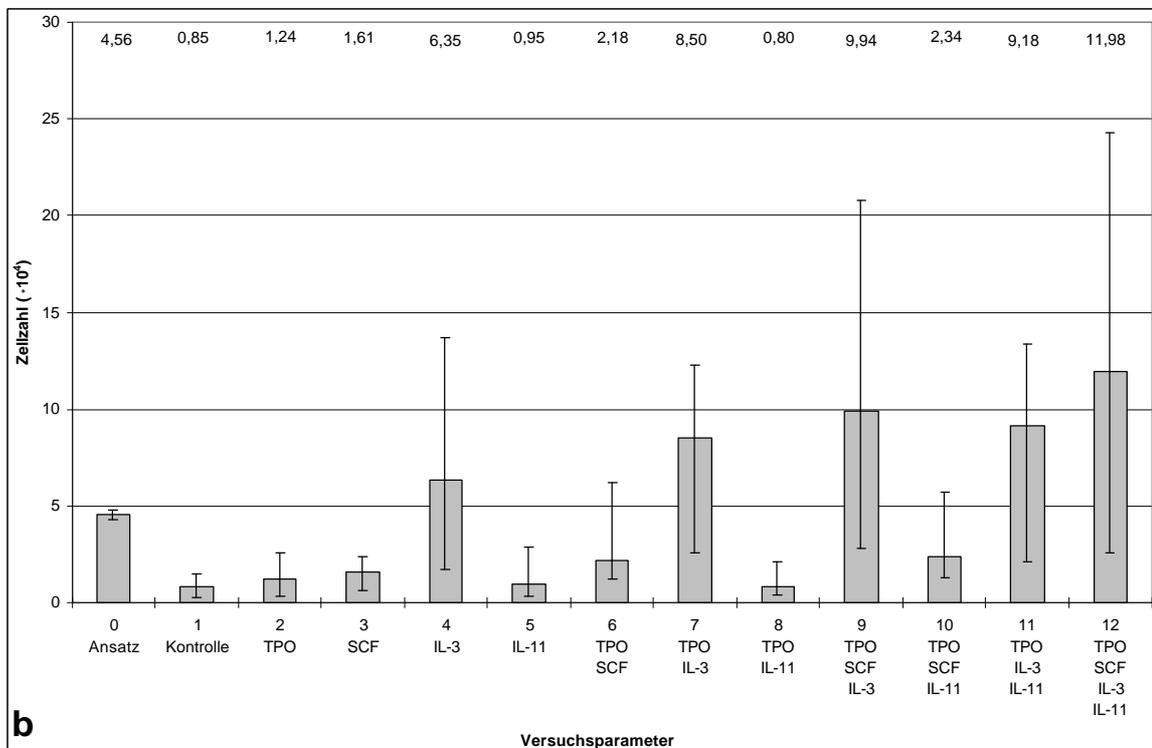
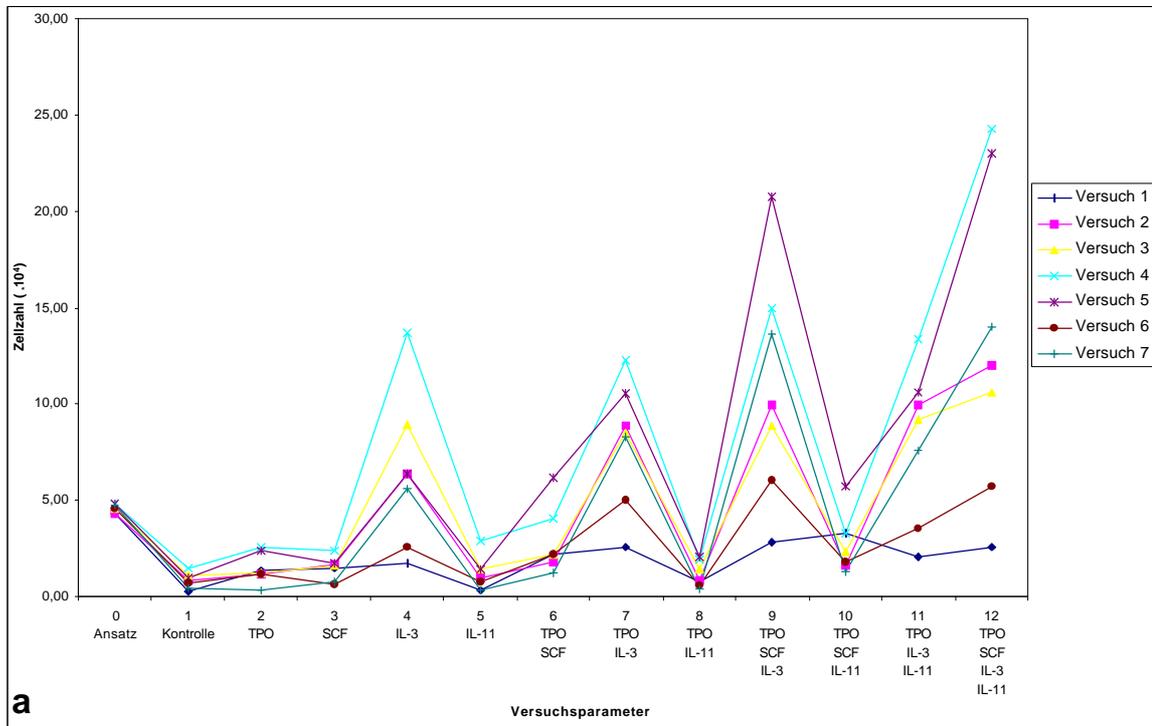


Abbildung 3.8: Die CD34⁺-Zellzahl der eingesetzten Zellmenge sowie der untersuchten Zytokinkombinationen nach Beendigung des Versuches. Darstellung als Linien-Diagramm der einzelnen Versuche (a) und als Säulendiagramm der Median-Werte mit Spannweite (b).

3.2.6 Anzahl der CD41⁺-Zellen

Wie auch die Anzahl der CD34⁺-Zellen ist auch die CD41⁺-Zellzahl ein errechneter Wert aus der absoluten Zellzahl und deren prozentualem Anteil an CD41⁺-Zellen.

Da sich der Anteil an CD41⁺-Zellen, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, durch einige Zytokinkombinationen vermehren läßt, ist hier der „kumulative“ Effekt ausgeprägter als bei den CD34⁺-Zellen.

Abb. 3.9 a zeigt das erwartungsgemäß ähnliche Wachstumsverhalten der CD41⁺-Zellen bei den verschiedenen Zytokinkombinationen.

Im Median sind es wieder die Parameter 4, 7, 9, 11 und 12, die die meisten CD41⁺-Zellen hervorbringen. Keine signifikanten Unterschiede nach IL-11-Gabe finden sich zwischen den Parametern 7 und 11 bzw. 9 und 12. Der statistisch signifikante Anstieg nach Zugabe von SCF ist bei den Parametern 7 und 9 bzw. 11 und 12 erneut dargestellt (Abb. 3.9 b und p-Wert-Tabellen im Anhang).

Mit einer Vermehrung der CD41⁺-Zellen im Median um den Faktor 6,9 in Bezug auf die eingesetzte CD41⁺-Zellzahl und um den Faktor 39,2 in Bezug auf die Kontrolle durch die Parameter 9 und 12 kann hier ebenfalls von einer ex-vivo Expansion der CD41⁺-Zellen gesprochen werden.

Bei der absoluten CD41⁺-Zellzahl läßt sich durch TPO nur ein signifikanter Anstieg in Kombination mit SCF, bei insgesamt nur sehr niedriger Zellzahl, und in Kombination mit IL-3 erreichen, TPO alleine führt im Vergleich zur Kontrolle im Median zu keiner wesentlichen Vermehrung der CD41⁺-Zellen.

3.2.7 Zusammenfassung

Insgesamt läßt sich durch die Parameter 4, 7, 9, 11 und 12 eine Vermehrung der absoluten Zellzahl, der CD34⁺-Zellzahl und der CD41⁺-Zellzahl sowohl in Bezug auf die eingesetzten Zellen (0) als auch in Bezug auf die Kontrolle (1) erreichen. IL-3 ist das einzige Zytokin, welches schon alleine einer ex-vivo Expansion der CD34⁺-Zellen und CD41⁺-Zellen fähig ist. Durch Zugabe von TPO (bedingt) und SCF läßt sich dieser Effekt zum Teil noch deutlich steigern. Keine signifikanten Unterschiede finden sich nach Zugabe von IL-11.

TPO ist als einzelnes Zytokin weder in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl noch in Bezug auf die Kontrolle fähig, eine signifikante Vermehrung der CD34⁺-Zellen oder CD41⁺-Zellen herbeizuführen und vermag beides erst in Kombination mit IL-3.

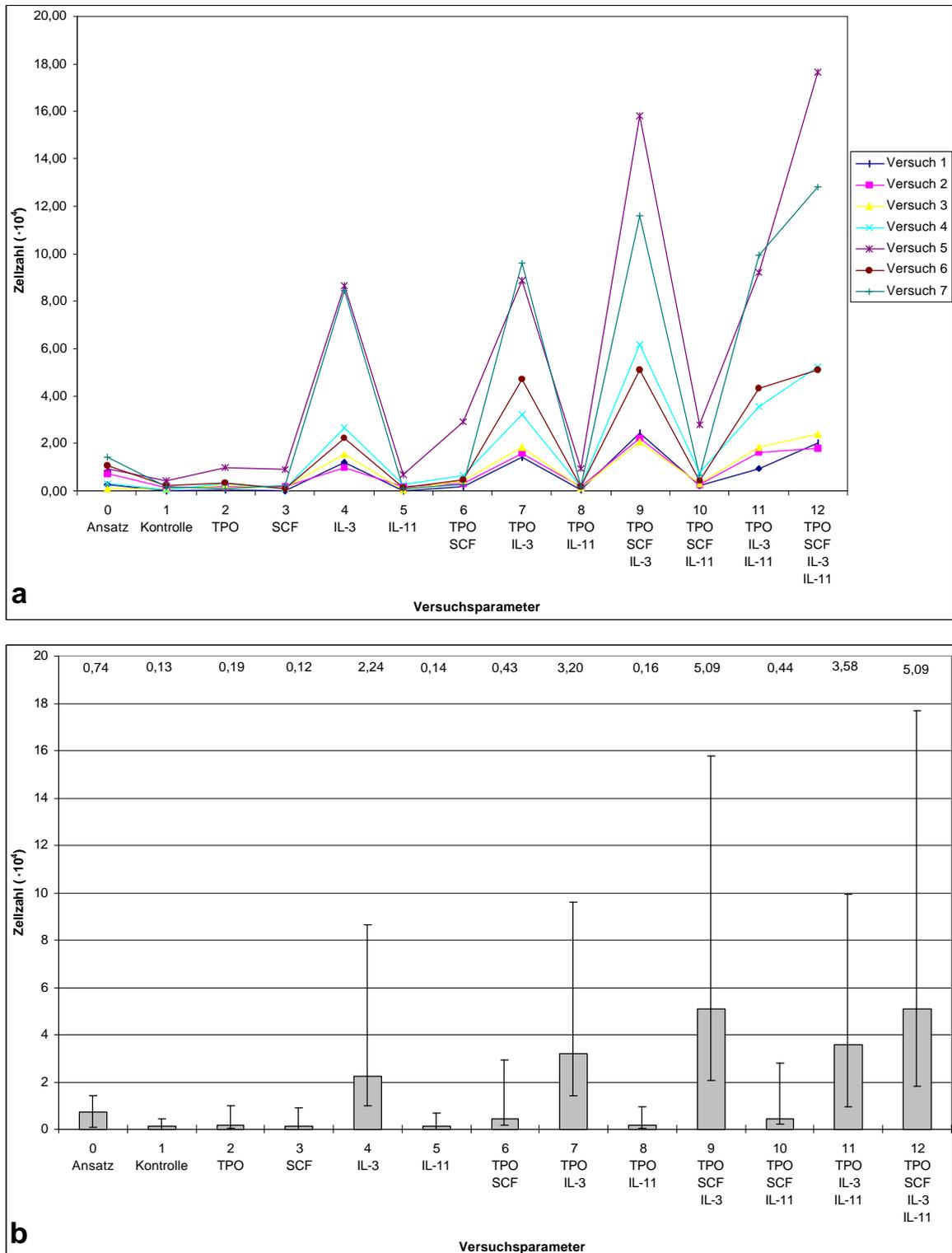


Abbildung 3.9: Die CD41⁺-Zellzahl der eingesetzten Zellmenge sowie der untersuchten Zytokin-kombinationen nach Beendigung des Versuches. Darstellung als Linien-Diagramm der einzelnen Versuche (a) und als Säulendiagramm der Median-Werte mit Spannbreite (b).

4. Diskussion

4.1 Thrombozyten-Engraftment nach allogener Knochenmarktransplantation

Knochenmark, das dem Empfänger einer Knochenmarktransplantation (KMT) nach myeloablativer Therapie infundiert wird, besteht aus Stammzellen, Vorläuferzellen und ausdifferenzierten Zellen verschiedener Zelllinien. Vor der Transplantation bzw. zeitgleich zur Transplantation werden Kolonie-Assays zur Bestimmung der Anzahl der klonogenen Zellen im Transplantat sowie, seit einigen Jahren, durchflußzytometrische Messungen zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung des Transplantats durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Daten sind häufig mit der Zeit bis zum Engraftment von Leukozyten und/oder Thrombozyten korreliert worden, um herauszufinden, ob es Faktoren gibt, mit denen sich die Dauer bis zum Engraftment besser voraussagen läßt, oder ob sich die verschiedenen Quellen hämatopoetischer Stammzellen -Knochenmark, periphere Blutstammzellen oder Nabelschnurblut- hinsichtlich des Engraftments voneinander unterscheiden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte für allogene Knochenmarktransplantationen gezeigt werden, daß es eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der pro Kilogramm Körpergewicht transplantierten Menge an CD34⁺-Zellen und der Zeit bis zum Leukozytenengraftment und der pro Kilogramm Körpergewicht transplantierten Menge an CD34⁺CD41⁺-Zellen und der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment gibt. Eine weitere signifikante Korrelation ergibt sich zwischen der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment und der Menge an verabreichten Thrombozytenkonzentraten. Anhand dieser Daten ist abzuleiten, daß sich aus der zellulären Zusammensetzung des Transplantats vermuten läßt, ob bei einem Patienten mit einer verlängerten Leuko- oder Thrombozytopenie zu rechnen ist und zusätzliche Maßnahmen zur Prävention von Komplikationen durchzuführen sind. Andererseits könnte eine ex-vivo Expansion oder Modulation des Transplantats durchgeführt werden, um bei zu geringer Anzahl von Stamm- oder Progenitorzellen eine größere Zellmenge transplantieren zu können und somit die Zeit bis zum Engraftment verkürzen und die Anzahl der zu verabreichenden Thrombozytenkonzentrate verringern zu können. Dies trifft

besonders für Transplantationen mit Nabelschnurblut zu, da hier die Zellmenge beschränkt ist.

Hassan et al. haben 1997 eine Arbeit veröffentlicht, in der das Engraftment von 66 Leukämie-Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation untersucht wurde. Dabei wurde herausgefunden, daß die Dauer bis zum Leukozytenengraftment abhängig ist von der Krankheit des Patienten (schnelleres Engraftment bei AML und ALL als bei CML), der Ausprägung der GvHD (schnelleres Engraftment bei GvHD Grad 0 und I als bei GvHD Grad II oder mehr), der Gabe von G-CSF und der Anzahl der CFU-GM pro Kilogramm Körpergewicht im Transplantat. Das Alter der Patienten, der Typ der myeloablativen Therapie und der Gebrauch von frischem oder gefrorenem Knochenmark hatten keinen Einfluß auf das Leukozytenengraftment. Das Thrombozytenengraftment war abhängig vom Grad der GvHD (wie oben) und der Anzahl der BFU-E im Transplantat pro Kilogramm Körpergewicht. Keinen Einfluß auf das Thrombozytenengraftment hatten das Alter des Patienten, die Grunderkrankung, die Benutzung von frischem oder cryopräserviertem Knochenmark, die myeloablativ Therapie oder die Gabe von G-CSF. Die Dauer bis zum Leukozytenengraftment von 17 Tagen im Median (9-27 Tage Spannweite) und bis zum Thrombozytenengraftment von 20 Tagen im Median (11-50 Tage Spannweite) unterscheidet sich geringgradig von den in dieser Arbeit erhobenen Daten von 10 bis 19 Tagen (Median: 15 Tage) bis zum Leukozytenengraftment und 16 bis 41 Tagen (Median: 25 Tage) bis zum Thrombozytenengraftment. Auf eine weitere Aufteilung des Patientengutes nach Krankheit oder Schweregrad der GvHD wurde aufgrund der recht kleinen Zahl der untersuchten Patienten verzichtet. Die Menge an pro Kilogramm Körpergewicht gegebenem G-CSF unterschied sich bei den untersuchten Patienten nicht, so daß hierauf keine weitere Rücksicht genommen werden mußte.

Ebenfalls nicht berücksichtigt wurde das eventuelle Auftreten von Infektionen, die einen Einfluß auf das Leukozyten- oder Thrombozytenengraftment haben könnten, so beschrieben Verdonck et al. (1985) ein verzögertes Thrombozytenengraftment bei CMV-positiven Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation bei unbeeinflusstem Leukozytenengraftment.

Eine weitere Korrelation wurde von Dercksen et al. 1995 beschrieben. Untersucht wurden 27 Patienten, die aufgrund verschiedener hämatologischer Erkrankungen

oder solider Tumoren eine autologen Transplantationen mit mobilisierten peripheren Blutstammzellen erhielten. Im Transplantat wurde durchflußzytometrisch die Koexpression von CD34 und verschiedenen Adhäsionsmolekülen (CD31, CD44, L-Selectin, β 1 und β 2 Integrins, etc.) gemessen. Die Autoren fanden dabei eine negative Korrelation zwischen der pro Kilogramm Körpergewicht transplantierten Menge an CD34⁺-Zellen und der Zeit bis zum Leukozyten- und Thrombozytenengraftment. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Koexpression von CD34 und L-Selectin eine statistisch signifikant bessere Korrelation zur Zeit bis zum Thrombozytenengraftment ergab als die Expression von CD34 alleine. Die Korrelation der Koexpression zum Leukozytenengraftment schien ebenfalls besser zu sein, war jedoch statistisch nicht signifikant. Die weiteren getesteten Koexpressionen von CD34 und Adhäsionsmolekülen zeigten keine verbesserte Korrelation im Vergleich zu CD34 alleine. Etwas später im gleichen Jahr veröffentlichten Dercksen et al. zwei weitere Artikel im Journal of Clinical Oncology (August 1995) und in Blood (November 1995). Erneut wurden Patienten untersucht, die aufgrund verschiedener hämatologischer Erkrankungen oder solider Tumoren eine autologen Transplantationen mit mobilisierten peripheren Blutstammzellen erhielten. Diesmal wurden, nach immunomagnetischer T-Zell- und Monozyten-Depletion im Transplantat linienspezifische Progenitorzellen (CD34⁺CD38⁺, CD34⁺HLA-DR⁺, CD34⁺CD71⁺, CD34⁺CD41⁺, CD34⁺CD61⁺, etc.) mittels Durchflußzytometrie gemessen, wobei die Messungen von CD41 und CD61 in Anwesenheit von EDTA durchgeführt wurden, um eine Thrombozytenadhäsion an die CD34⁺-Zellen zu verhindern. Die Menge der transplantierten Zellzahlen der Subpopulationen von CD34⁺-Zellen wurden erneut mit der Zeit bis zum Leukozyten- und Thrombozytenengraftment korreliert. In der im August veröffentlichten Arbeit wurde beschrieben, daß die Menge an CD34⁺CD33⁻-Zellen ($r = -0,74$) statistisch signifikant besser mit dem Leukozytenengraftment und die Menge an CD34⁺CD41⁺-Zellen ($r = -0,81$) statistisch signifikant besser mit dem Thrombozytenengraftment korrelieren, als die Anzahl der transplantierten CD34⁺-Zellen ($r = -0,55$ (Leukozytenengraftment) und $r = -0,56$ (Thrombozytenengraftment)). In der im November erschienenen Arbeit wurde erneut darauf hingewiesen, daß die Menge der pro kg Körpergewicht transplantierten CD34⁺CD41⁺-Zellen ($r = -0,83$) besser mit der Zeit bis zum

Thrombozytenengraftment korreliert als die Menge der CD34⁺-Zellen ($r = -0,55$). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit noch einmal sehr deutlich herausgearbeitet, daß sich die Meßgenauigkeit der CD34⁺CD41⁺-Zellen in der Durchflußzytometrie durch vorheriges Entfernen der Thrombozyten durch Dichtezentrifugation und durch Zugabe von EDTA in das Meßmedium zur Verhinderung der P-Selectin-vermittelten Aggregation von Thrombozytenmembranen und Membranfragmenten an die CD34⁺-Zellen steigern läßt. Die Autoren berichten hier von 0 bis 18 % (Median 6,3 %) der CD34⁺-Zellen, die zusätzlich CD41 exprimieren und postulieren damit höhere Werte als von Knapp et al. 1995 beschrieben (Siehe auch Kapitel 1.3.2). Diese Werte von Dercksen et al. decken sich annähernd mit den in dieser Untersuchung erhobenen Meßergebnissen von 1,4 bis 28,6 % (Median ebenfalls 6,3 %) der CD34⁺-Zellen, die zusätzlich CD41⁺ sind und sind geringradig niedriger als von Dercksen et al. im August 1995 beschrieben (Spannweite: 1,4 bis 17 %, Median: 8,1 %). Der in der Spannweite mit 28,6 %, im Vergleich zu den Untersuchungen von Dercksen et al., deutlich höher liegende obere Wert läßt sich möglicherweise durch die o.g. Zugabe von EDTA in den Meßpuffer erklären, die bei den in dieser Arbeit verwendeten, routinemäßig durchgeführten Messungen nicht erfolgte, eine T-Zell-Depletion wurde vor der CD34⁺CD41⁺-Bestimmung ebenfalls nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine negative Korrelation zwischen der pro kg Körpergewicht transplantierten Menge an CD34⁺-Zellen und der Zeit bis zum Leukozytenengraftment ($r = -0,32$) und zwischen der pro kg Körpergewicht transplantierten Menge an CD34⁺CD41⁺-Zellen und der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment ($r = -0,335$) hergestellt werden, die mit einem p-Wert von kleiner 0,05 beide statistisch signifikant waren. Eine zwar negative Korrelation zwischen der Menge an transplantierten CD34⁺-Zellen pro kg Körpergewicht und der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment ($r = -0,261$) war jedoch mit einem p-Wert von 0,086 nicht statistisch signifikant. Die Korrelationskoeffizienten waren in der hier durchgeführten Untersuchung deutlich niedriger als von Dercksen et al. beschrieben. Der entscheidende Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Transplantationsmodalität. Dercksen et al. untersuchten in ihrer Studie autologe periphere Blutstammzell-Transplantationen, während hier allogene Knochenmarktransplantationen ausgewertet wurden, bei denen das Thrombozytenengraftment durch unterschiedliche Ausprägungen von

Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen, durch die Gabe immunsupprimierender Medikamente oder durch begleitende Infektionen beeinflusst wird, und z.T. deutliche Varianzen aufweisen kann. Dennoch konnte hier entsprechend der Untersuchungen von Dercksen et al. für allogene Knochenmarktransplantationen gezeigt werden, daß die Messung von CD34⁺CD41⁺-Zellen besser mit dem Thrombozytenengraftment korreliert, als die Messung der CD34⁺-Zellen. Diese Korrelationen können auf der einen Seite dafür benutzt werden, abzuschätzen, ob bei Patienten mit einer längeren Zeit bis zum Leukozyten- oder Thrombozytenengraftment zu rechnen ist, zum anderen legen einem diese Korrelationen nahe, über eine ex-vivo Expansion bzw. Modulation des Transplantats nachzudenken, wenn darin nur sehr wenige CD34⁺- oder CD34⁺CD41⁺-Zellen enthalten sind. Dies trifft insbesondere auf Transplantationen mit Nabelschnurblut zu. Aufgrund der begrenzten Zellmenge konnten fast ausschließlich Kinder und Jugendliche eine allogene Nabelschnurblut-Transplantation erhalten. In einer 1996 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Arbeit von Kurtzberg et al. (1996) wurden 25 Patienten im Alter von 0,8 bis 23 Jahren (Median: 7 Jahre) untersucht, die eine allogene Nabelschnurblut-Transplantation, z.T. mit HLA-„Mismatches“, erhielten: 22 Patienten hatten ein Leukozytenengraftment nach 14 bis 37 Tagen (Median: 22 Tage), 16 Patienten ein Thrombozytenengraftment nach 35 bis 89 Tagen (Median: 56 Tage). Es fand sich ein, nicht statistisch signifikanter, Trend zwischen der Anzahl der transplantierten CD34⁺-Zellen und der Zeit bis zum Leukozyten- und Thrombozytenengraftment. Die Menge der pro kg Körpergewicht transplantierten CD34⁺-Zellen lag zwischen $0,05 \cdot 10^6$ und $8,93 \cdot 10^6$ (Median: $1,43 \cdot 10^6$) und damit deutlich unter den Werten der hier durchgeführten Untersuchung (Spannweite: $1,1 \cdot 10^6$ bis $7,4 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen pro kg Körpergewicht, Median: $3,5 \cdot 10^6$). Dieser Mangel an CD34⁺-Zellen und an CD34⁺CD41⁺-Zellen (Hassan et al. 1996) im Transplantat kann die verlängerte Zeit bis zum Leukozyten- und Thrombozytenengraftment nach Nabelschnurbluttransplantationen erklären. Eine selektive Expansion von CD34⁺- und CD34⁺CD41⁺-Zellen könnte helfen, die Zeit der Neutropenie und Thrombopenie nach autologen und allogenen Transplantationen mit Knochenmark, peripheren Blutstammzellen oder Nabelschnurblut zu verkürzen und somit Komplikationen durch Infektionen oder

Blutungen verringern, sowie die Kosten durch eine Verringerung der zu verabreichenden Thrombozytenkonzentrate zu senken.

4.2 Ex-vivo Expansion normaler menschlicher Megakaryozyten-Progenitorzellen

Seit es möglich, ist hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen außerhalb des tierischen oder menschlichen Körpers - ex-vivo – zu züchten und mit verschiedenen Techniken (Kolonie-Assays und später Durchflußzytometrie) ihre Zellienenzugehörigkeit und ihren Differenzierungsgrad zu bestimmen, ist versucht worden, mit den nach und nach entdeckten, purifizierten und später monoklonal hergestellten Zytokinen, die Hämatopoese ex-vivo zu simulieren, zu stimulieren und das Zusammenspiel der Zytokine zu verstehen. Dies hat dazu geführt, daß das G-CSF und GM-CSF nun schon seit mehreren Jahren zur Stimulation der Granulozytopoese und Erythropoetin zur Stimulation der Erythropoese in-vivo genutzt werden können.

Die Isolation und Herstellung von Thrombopoetin 1994 weckte die Hoffnungen, endlich das wichtigste Zytokin in der Regulation der Megakaryozytopoese gefunden zu haben, und damit die Möglichkeit zu haben, die Megakaryozytopoese ex- und in-vivo stärker und gezielter beeinflussen zu können, als es mit den bisher bekannten Zytokinen mit megakaryozyten-stimulierender Wirkung möglich war.

Auf der einen Seite konnte, zuerst in Tieren (Mäuse, Ratten, Hunde und nicht-menschliche Primaten), dann in klinischen Versuchen an Menschen ein deutlicher Anstieg der Thrombozytenzahlen nach der Gabe von Thrombopoetin bei Thrombopenie oder Panzytopenie nach myelosuppressiver Therapie erreicht werden, wogegen der Effekt nach myeloablativer Therapie und Stammzell-Transplantation weniger eindrucksvoll war. Im Gegensatz zu anderen Zytokinen mit megakaryozyten-stimulierender Wirkung traten hiermit keine schweren Nebenwirkungen, vor allem keine Akute-Phase-Reaktionen auf. Der Nutzen der in-vivo Applikation von Thrombopoetin liegt vor allem in der Reduktion der Transfusions-Reaktionen und der Kosten, die bei der Gabe von Thrombozytenkonzentraten nach iatrogenen oder natürlich auftretender Thrombozytopenie auftreten (Kaushansky 1998). Eine weitere

Anwendungsmöglichkeit liegt möglicherweise darin, die Thrombozytenzahlen von Thrombozytenspendern vor Leukapherese zu erhöhen (Levin 1997).

Auf der anderen Seite wurde Thrombopoetin von vielen wissenschaftlichen Gruppen genutzt, das Zusammenspiel der Zytokine der Megakaryozytopoese zu erforschen und herauszufinden, in welchen Schritten der Differenzierung Thrombopoetin wirkt und mit welchen Zytokinen es synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen zeigt.

In den hier durchgeführten Versuchen mußten zugunsten der Parametervielfalt viele Einschränkungen in den Möglichkeiten der Versuchsauswertung hingenommen werden. Aufgrund der begrenzten Zellmenge konnte nur die Zellzahl bestimmt werden und der prozentuale Anteil an CD34⁺- und CD41⁺-Zellen durchflußzytometrisch gemessen werden. Nicht erfaßt werden konnte der Anteil an CD34⁺CD41⁺-Zellen in einer durchflußzytometrischen Dreifachfärbung. Weiterhin gab es nicht genügend Zellen um von den hier durchgeführten Versuchen mikroskopische (Zytospin-)Präparate anzufertigen, um eine morphologische Beurteilung der Zellen vorzunehmen und so eventuell unterschiedliche Reifungsstadien der Megakaryozyten in Abhängigkeit von den verwendeten Zytokinen erkennen zu können.

Durch eine Kombination von Thrombopoetin, Stammzell Faktor und Interleukin-3 konnte in dieser Versuchsreihe eine ex-vivo Expansion der CD34⁺-Zellen um den Faktor 2,2 und der CD41⁺-Zellen um den Faktor 6,9 bezogen auf die initial eingesetzte Zellmenge an CD34⁺-angereicherten Zellen erreicht werden. Eine Zugabe von Interleukin-11 erbrachte keine weitere signifikante Zunahme der Zellzahlen. Es muß jedoch in weiteren Versuchen herausgefunden werden, in welchen Reifungsstadien sich die Zellen befinden, und inwieweit das Zellwachstum von dem in der Zellkultur vorhandenen fötalen Kälberserum (FCS) oder Rinderalbumin (BSA) beeinflusst wird.

Generell besteht jedoch die Möglichkeit der Zellvermehrung oder selektiven Stimulation einzelner Zelllinien in Knochenmark, peripheren Blutstammzellen oder auch Nabelschnurblut vor einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, was möglicherweise zu einer Verkürzung der Leukozytopenie oder Thrombozytopenie und damit zu einem geringeren Transplantationsrisiko für die Patienten genutzt werden kann.

In der Literatur finden sich einige Veröffentlichungen, in denen von erfolgreichen Transplantationen von ex-vivo expandierten hämatopoetischen Stammzellen an Mäusen (z.B. Holyoake et al. 1996) und Menschen (z.B. Chang et al. 1986, Brugger et al. 1995, etc.) berichtet wird.

Insgesamt entsprach die Wirkung von Thrombopoetin (TPO) nicht den Erwartungen. TPO alleine bewirkte einen zwar signifikanten, aber dennoch nur sehr geringen Anstieg in der Zellzahl um den Faktor 1,9 (bezogen auf den Median) im Vergleich zur Kontrolle und zeigt eine ebenfalls nur geringe, aber statistisch signifikante Abnahme (Faktor 0,9) im Vergleich zur eingesetzten Zellzahl. Diese Beobachtungen entsprechen weitestgehend den von Gehling et al. (1997) beschriebenen Ergebnissen, wo ebenfalls keine Expansion von CD34⁺-Knochenmarkzellen durch TPO erreicht werden konnte. Die Kombination von TPO und Stammzell Faktor (SCF) zeigt, ebenfalls in Einklang mit den Ergebnissen von Gehling et al. (1997), wiederum keine Expansion der Zellzahl. Betrachtet man den prozentualen Anteil von CD41⁺-Zellen der verschiedenen Versuchspare, so findet sich auch in den hier durchgeführten Versuchen die von TPO erwünschte Wirkung nicht. Mit einem Anteil von 6,6 % im Median bei Verwendung von TPO alleine liegen die CD41⁺-Zellen deutlich unter den abgebildeten Werten von Gehling et al. (1997) von > 20 %, auch die Kombination von SCF und TPO liegt mit 8 % unter den von Gehling et al. (1997) berichteten Werten (> 10 %). Auch wenn hier etwas unterschiedliche Flüssigkulturansätze verglichen wurden, so war dennoch eine höhere Zellzahl und ein höherer Prozentsatz an CD41⁺-Zellen erwartet worden, da Thrombopoetin, wie von diversen anderen Forschungsgruppen (z. B. Banu et al. 1995, Debili et al. 1995, Broudy et al. 1995, Broudy and Kaushansky 1995, Angchaisuksiri et al. 1996, Dolzhanskiy et al. 1997, Williams et al. 1998, etc.) in Versuchen mit menschlichen und murinen Knochenmark-, Stamm- und Megakaryozyten-Progenitorzellen beschrieben, sowohl ein proliferativ als auch ein differenzierend wirkender Wachstumsfaktor ist. Dabei sollte hier allerdings berücksichtigt werden, daß viele Versuche mit Megakaryozyten-Progenitorzellen durchgeführt wurden, und sich diese wiederum anders verhalten können als eine gesamte Population von CD34⁺-Zellen mit einem nur geringen Anteil von CD34⁺CD41⁺-Zellen. Eine weiterer Erklärungsansatz für die nur geringe Wirkung von Thrombopoetin in den hier

beschriebenen Versuchen könnte sein, daß in dem in den Experimenten benutztem fötalen Kälberserum (FCS) oder BSA Substanzen enthalten sein könnten, die die Wirkung von TPO inhibieren. Im Gegensatz zu TPO und den anderen benutzten Zytokinen ist nur eine einzige Charge FCS und BSA benutzt worden, so daß hier eine mögliche Fehlerquelle liegen könnte. Auch ein von Williams et al. (1998) vermuteter negativer Effekt von IL-3 auf die Differenzierung von Megakaryozyten ist nicht sicher auszuschließen.

Wie von Teramura et al. (1992) und Weich et al. (1997) beschrieben, läßt sich durch IL-11 allein kein Wachstum von Megakaryozyten-Kolonien erreichen. Ähnlich konnte auch in den hier durchgeführten Versuchen keine Vermehrung der absoluten Zellzahl oder der CD41⁺-Zellen durch IL-11 alleine erzielt werden. Leider sind jedoch auch keine synergistischen Wirkungen von IL-11 mit TPO, SCF oder IL-3, wie von Teramura et al. (1992), Du et al. (1997), Weich et al. (1997), Williams et al. (1998) etc. beschrieben, in dieser Versuchsreihe nachweisbar. IL-11 vermochte keinen signifikanten Anstieg von absoluter Zellzahl oder dem Prozentsatz an CD34⁺- oder CD41⁺-Zellen bewirken. Banu et al. (1995) vermuteten anhand ihrer Ergebnisse mit menschlichen CD34⁺-Zellen in „Fibrin clot“-Kulturen sogar einen möglichen Antagonismus zwischen IL-11 und TPO, da die Anzahl von CFU-MK in der Kombination von TPO und IL-11 geringer war als mit IL-11 alleine. In den in dieser Arbeit verwendeten Zytokinkombinationen, in denen IL-11 entweder alleine, oder in Kombination mit TPO mit oder ohne IL-3 und SCF verwendet wurde läßt sich der o.g. Effekt nicht nachweisen, ein Antagonismus jedoch auch nicht ausschließen. Wie beim TPO ist auch hier an möglich inhibierende Faktoren, die im FCS oder BSA enthalten sein können zu denken.

Aufgrund der zellzahlbedingten, fehlenden morphologischen Untersuchungen der CD41⁺-Zellen in dieser Versuchsreihe, muß berücksichtigt werden, daß sowohl TPO als auch IL-11 in diesen Versuchen eine Veränderung des Differenzierungsstadiums bewirkt haben könnten.

Interleukin-3 war in den hier durchgeführten Versuchen das einzige Zytokin, welches alleine sowohl im Vergleich zu Kontrolle als auch im Vergleich zur eingesetzten Zellzahl eine signifikante Zellvermehrung der absoluten Zellzahl induzierte, und darüber hinaus aber auch als einziges einzelnes Zytokin eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der CD41⁺-Zellen im Vergleich zur

Kontrolle bewirkte. In der errechneten CD41⁺-Zellzahl konnte durch IL-3 alleine somit eine signifikante Vermehrung der CD41⁺-Zellen um den Faktor 3,0 im Vergleich zur eingesetzten CD41⁺-Zellzahl erreicht werden. Dieses Ergebnis entspricht den von Teramura et al. (1988), Debili et al. (1993) und Broudy et al. (1995) veröffentlichten Daten. Die megakaryozyten-stimulierende Wirkung von IL-3 wurde auch von vielen weiteren Forschungsgruppen beschrieben (z.B. Bruno et al. 1988, Briddell et al. 1991, Nichol et al. 1994, Ellis et al. 1995, Kaushansky 1995, Debili et al. 1995, Young et al. 1996, Norol et al. 1998, etc.) und zeigt sich hier auch in der Kombination mit TPO und SCF.

Stammzell Faktor als einzelnes Zytokin bewirkt in dieser Versuchsreihe keine Vermehrung der CD41⁺-Zellen. Dieses Ergebnis entspricht den Veröffentlichungen von Briddell et al. (1991), Broudy et al. (1995), Dolzhanskiy et al. (1997) und Broudy (1997). Synergistische Wirkung von SCF auf die Megakaryozytopoese werden außer von den o.g. Gruppen noch von Avraham et al. (1992), Debili et al. (1995), Broudy and Kaushansky (1995), Angchaisuksiri et al. (1996), Norol et al. (1998), Williams et al. (1998), etc. beschrieben. In den hier durchgeführten Versuchen erwirkte SCF alleine jedoch eine geringe, aber signifikante Vermehrung der absoluten Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Weitere signifikante Anstiege in der absoluten Zellzahl finden sich wenn SCF mit TPO, TPO und IL-3, TPO und IL-11 oder TPO, IL-3 und IL-11 kombiniert wird. Zusammengefaßt führt SCF in allen Kombinationen zu einer Vermehrung der absoluten Zellzahl. Außer einem geringen, aber signifikanten Anstieg im prozentualen Anteil der CD41⁺-Zellen, wenn SCF zu TPO hinzugegeben wird, induziert SCF keine signifikanten Steigerungen des Prozentsatzes der CD34⁺- und CD41⁺-Zellen der gesamten Zellmenge. Werden jedoch die Zellzahlen der CD34⁺- und CD41⁺-Zellen errechnet, so finden sich wiederum signifikante Zellzahlvermehrungen, wenn SCF in Kombination mit anderen Zytokinen eingesetzt wird. Dementsprechend bestätigt sich in den hier durchgeführten Versuchen die synergistische Wirkung von SCF nicht nur in Bezug auf die Megakaryozytopoese, sondern SCF vermag zusätzlich eine Vermehrung der CD34⁺-Zellen unterstützen.

Insgesamt konnte mit der Kombination von TPO, SCF und IL-3 eine ex-vivo Expansion sowohl der CD34⁺-Zellen (Faktor 2,2) als auch der CD41⁺-Zellen (Faktor 6,9) im Vergleich zur eingesetzten Zellmenge erreicht werden. Die Zugabe von IL-11 erbrachte hier keinen signifikanten Benefit. Inwiefern die verschiedenen

Zytokine das Differenzierungsstadium der Zellen beeinflussen, muß in morphologischen Präparaten oder durchflußzytometrischen Messungen weiter untersucht werden, möglicherweise zeigt sich ja hier eine positive Wirkung von IL-11. Auch ein möglicher Einfluß von FCS oder BSA auf die Wirkung von TPO oder IL-11 sollte mittels serum-freier Kulturen abgeklärt werden.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist bei vielen hämatologischen Erkrankungen, einigen soliden Tumoren und Speicherkrankheiten Therapie erster Wahl mit kurativem Ansatz.

Neben der Gefahr toxischer Nebenwirkungen oder durch Abstoßungsreaktionen bei allogenen Transplantationen, ist die Zeit bis zum Engraftment der Thrombozyten eine für den Patienten sehr kritische Phase, da durch die Thrombozytopenie eine stark erhöhte Blutungsneigung besteht. Da es bisher keine geeignete Möglichkeit zur Verkürzung der Thrombopenie in vivo gibt, müssen die Patienten bei Thrombozytenzahlen von unter 20.000/ μ l Thrombozytenkonzentrate erhalten, die nicht nur teuer sind, sondern auch Transfusionszwischenfälle auslösen können.

In den hier durchgeführten Korrelationen zwischen der Menge der pro kg KG transplantierten CD34⁺CD41⁺-Zellen mit der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment und zwischen der Menge der pro kg KG transplantierten CD34⁺-Zellen mit der Zeit bis zum Leukozytenengraftment nach allogener Knochenmarktransplantation (n=29) fanden sich statistisch signifikante Beziehungen mit negativen Korrelationskoeffizienten. Zusätzlich fand sich eine positive Korrelation zwischen der Zeit bis zum Thrombozytenengraftment und den verabreichten Thrombozytenkonzentraten (n=17). Eine ex-vivo Expansion und anschließende Transplantation von CD34⁺-Zellen und CD34⁺CD41⁺-Zellen könnte daher die Zeit bis zum Engraftment verkürzen und Kosten senken.

In den ebenfalls hier beschriebenen Zellkulturen in serumhaltigen Flüssigmedien konnte mit der Kombination von TPO, SCF und IL-3 eine ex-vivo Expansion sowohl der CD34⁺-Zellen (Faktor 2,2) als auch der CD41⁺-Zellen (Faktor 6,9) im Vergleich zur eingesetzten Zellmenge erreicht werden. Die Zugabe von IL-11 erbrachte hier keinen signifikanten Benefit.

Nach weiteren Untersuchungen der Morphologie und der Reifungsstadien der ex-vivo expandierten Zellen, könnten die hier gewonnenen Erkenntnisse genutzt werden, um die Zellzahl in Transplantaten hämatopoetischer Stammzellen zu erhöhen und damit die Dauer der Leukozytopenie oder Thrombozytopenie zu verkürzen und z.B. Transplantationen mit Nabelschnurblut auch für alle erwachsenen Patienten möglich zu machen.

6. Literaturverzeichnis

Angchaisuksiri P, Carlson PL, Dessypris EN (1996) Effects of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte colony formation and megakaryocyte ploidy by human CD34⁺ cells in a serum-free system. *Br J Haematol* 93: 13-17

Armitage JO (1994) Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med* 330: 827-838

Avraham H, Vannier E, Cowley S, Jiang S, Chi S, Dinarello CA, Zsebo KM, Gropman JE (1992) Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. *Blood* 79: 365-371

Ayala IA, Tomer A, Kellar KL (1996) Flow cytometric analysis of megakaryocyte-associated antigens on CD34 cells and their progeny in liquid culture. *Stem Cells* 14: 320-329

Banu N, Wang J, Deng B, Gropman JE, Avraham H (1995) Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-mpl ligand. *Blood* 86: 1331-1338

Begemann H, Rastetter J (1993) *Klinische Hämatologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York: 171

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

Bridgell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srouf EF, Hoffman R (1989) Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 74: 145-151

Bridgell RA, Bruno E, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffmann R (1991) Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 78: 2854-2859

- Bridgell RA, Hoffmann R (1990) Cytokine regulation of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 76: 516-522
- Broudy VC (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90: 1345-1364
- Broudy VC, Kaushansky K (1995) Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *J Leukoc Biol* 57: 719-725
- Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K (1995) Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 85: 1719-1726
- Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L (1995) Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 333: 283-287
- Bruno E, Bridgell R, Hoffman R (1988) Effect of recombinant and purified hematopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation. *Exp Hematol* 16: 371-377
- Bruno E, Hoffman R (1998) Human megakaryocyte progenitor cells. *Semin Hematol* 35: 183-191
- Cardoso AA, Watt SM, Batard P, Li M-L, Hatzfeld A, Genevieve H, Hatzfeld J (1995) An improved panning technique for the selection of CD34⁺ human bone marrow hematopoietic cells with high recovery of early progenitors. *Exp Hematol* 23: 407-412
- 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

- Choi ES, Hokom MM, Chen J-L, Skrine J, Faust J, Nichol J, Hunt P (1996) The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br J Haematol* 95: 227-233
- Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR (1987) Antigenic analysis of hematopoiesis VI. Flow cytometric characterization of My-10 positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 15: 10
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defines by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133: 157-165
- Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980) Monoclonal antibody to a human leucocyte specific membrane glycoprotein probably homologous to the leucocyte-common antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10:737-744
- De Wynter 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
- Debili N, Issaad C, Massé J-M, Guichard J, Katz A, Breton-Gorius J, Vainchenker W (1992) Expression of CD34 and platelet glycoproteins during megakaryocytic differentiation. *Blood* 80: 3022-3035
- Debili N, Massé J-M, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W (1993) Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34⁺ cells. *Blood* 82: 84-95

- Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, Vainchenker W (1995) Thr mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 86: 2516-2525
- Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirkson MKA, Slaper-Cortenbach ICM, Schaasberg WP, Pinedo HM, Von dem Borne AEGKr, van der Schoot CE (1995) Expression of adhesion molecules on CD34⁺ cells: CD34⁺ L-selectin⁺ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 85: 3313-3319
- Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MKA, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, Slaper-Cortenbach ICM, Pinedo HM, Von dem Borne AEGKr, van der Schoot CE, Gerritsen WR (1995) Subsets of CD34⁺ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood-stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 13: 1922-1932
- Dercksen MW, Weimar IS, Richel DJ, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Slaper-Cortenbach ICM, Pinedo HM, Von dem Borne AEGKr, Gerritsen WR, van der Schoot CE (1995) The value of flow cytometric analysis of platelet glycoprotein expression on CD34⁺ cells measured under conditions that prevent P-selectin-mediated binding of platelets. *Blood* 86: 3771-3782
- Dexter TM (1989) Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies. *Leukemia* 3/7: 469-474
- Dolzhanskiy A, Basch RS, Karpatkin S (1997) The development of human megakaryocytes: III. development of mature megakaryocytes from highly purified committed progenitors in synthetic culture media and inhibition of thrombopoietin-induced polyploidization by interleukin-3. *Blood* 89: 426-434
- Drénou B (1996) Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts. *Hematol Cell Ther* 38: 505-512

- Du X, Williams DA (1997) Interleukin-11: review of molecular, cell biology and clinical use. *Blood* 89: 3897-3908
- Eaton DL, de Sauvage FJ (1997) Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. *Exp Hematol* 25: 1-7
- Ellis MH, Avraham H, Groopman JE (1995) the regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood Reviews* 9: 1-6
- Gehling UM, Ryder JW, Hogan CJ, Hami L, McNiece I, Franklin W, Williams S, Helm K, King J, Shpall EJ (1997) ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors: effect of various growth factor combinations on CD34⁺ progenitor cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 25: 1125-1139
- Gewirtz AM (1986) Human megakaryocytopoiesis. *Semin Hematol* 23: 27-42
- Glaspay J, Davis MW, Parker WRL, Foote MA, McMiece I (1996) Biology and clinical potential of stem-cell factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 (Suppl): S53-S57
- Gutensohn K u. Serke S (1996) Durchflußzytometrische Analyse CD34-exprimierender hämatopoetischer Zellen in Blut und Zytaphereseprodukten. *Infusionsther Transfusionsmed* 23/Suppl 2: 2-23
- Hassan HT, Begemann Ph, Schleimer B, Zander AR (1996) The delayed platelet recovery after allogeneic cord blood transplantation could be due to an inadequate number of CD34⁺CD41⁺ cells in allografts. (Abstract) *Exp Hematol* 24: 1072
- Hassan HT, Krog C, Stockschräder M, Zeller W, Krüger W, Erttmann R, Zander AR (1997) Factors influencing haematological recovery after allogeneic bone marrow transplantation in leukaemia patients treated with methotrexate-containing GVHD prophylaxis. *Support Care Cancer* 5: 299-306

- Hassan HT, Zander A (1995) Human normal and leuemic megakaryocytopoiesis. *Cancer J* 8: 170-172
- Haylock DN, To LB, Dowse TL, Makino S, Trimboli S, Niutta S, Juttner CA, Simmons PJ (1994) Ex vivo expansion of purified stem cells. *Hematopoietic Stem Cells: The Mulhouse Manual 1994*: 291-301
- Hoffman R (1989) Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* 74: 1196-1212
- 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
- Ibelgaufts H (1995) Dictionary of cytokines. Editiones Roche, Basel, Switzerland: 389-393, 419-420, 643-647
- 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
- Kaushansky K (1995) Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 86: 419-431
- Kaushansky K (1998) Thrombopoietin. *N Engl J Med* 339: 746-754
- Kelemen E, Cserhati I, Tanos B (1958) Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocytothemic sera. *Acta Haematol (Basel)* 20: 350
- Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Majdic O (1995) Molecular characterization of CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 70: 281-296

- Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M (1996) Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood* 88: 429-436
- Koizumi K, Sawada K, Yamaguchi M, Notoya A, Tarumi T, Takano H, Fukada Y, Nishio M, Katagiri E, Yasukouchi T, Sato N, Sekiguchi S, Koike T (1998) In vitro expansion of CD34⁺/CD41⁺ cells from human peripheral blood CD34⁺/CD41⁻ cells: role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors. *Exp Hematol* 26: 1140-1147
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1-13
- Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocci 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
- Levin J (1997) Thrombopoietin – clinically realized. *N Engl J Med* 336: 434-436
- Levine RF (1982) The origin, development and regulation of megakaryocytes. *Br J Haematol* 52:173-180
- Link H (1997) Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. *Onkologe* 3 (Suppl 1): S1-S11
- Link H, Kolb H-J, Ebell W, Hossfeld DK, Zynder A, Niethammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, Schaefer UW (1997) Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen Teil I: Definitionen, prizielle Anwendungsmöglichkeiten, Komplikationen. *Medizinische Klinik* 92: 480-491

- Link H, Kolb H-J, Ebell W, Hossfeld DK, Zynder A, Niethammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, Schaefer UW (1997) Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen Teil II: Indikationen zur Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen nach myeloablativer Therapie. *Medizinische Klinik* 92: 534-545
- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI (1987) Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70: 1316-1324
- Long GD, Blume KG (1995) Allogeneic and autologous marrow transplantation. In: Beutler, Lichtman, Collier, Kipps (ed) *Hematology*, 5th edition, McGraw-Hill Inc., New York, p: 172-194
- Mazur EM, Hoffman R, Chasis J, Marchisi S, Bruno E (1981) Immunofluorescent identification of human megakaryocyte colonies using antiplatelet glycoprotein antiserum. *Blood* 57: 277
- Messner HA (1984) Human stem cells in culture. *Clinics in Haematology* 13: 393-404
- Metcalf D (1977) *Hematopoietic colonies*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Miltenyi Biotec Inc. (1997): *Instruments and Reagents for Magnetic Cell Sorting 97 Catalog*
- Miltenyi 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
- Miyazaki H, Horie K, Shimada Y, Kokubo A, Maeda E, Inoue H, Kato T (1995) A simple and quantitative liquid culture system to measure megakaryocyte growth using highly purified CFU-MK. *Exp Hematol* 23: 1224-1228

- Moore MAS (1995) Hematopoietic Reconstruction: New Approaches. *Clinical Cancer Research* 1: 3-9
- Nagler A, Eldor A, Naparstek E, Mumcuoglu M, Slavin S, Deutsch VR (1995) Ex vivo expansion of megakaryocyte precursors by preincubation of marrow allografts with interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vitro. *Exp Hematol* 23: 1268-1274
- Nichol JL, Hornkohl AC, Choi ES, Hokom MM, Ponting I, Schuening FW, Hunt P (1994) Enrichment and characterization of peripheral blood-derived megakaryocyte progenitors that mature in short-term liquid culture. *Stem Cells* 12: 494-505
- Norol F, Vitrat N, Cramer E, Guichard J, Burstein SA, Vainchenker W, Dedili N (1998) Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34⁺ cells. *Blood* 91: 830-843
- Piacibello W, Garetto L, Sanavio F, Severino A, Fubini L, Stacchini A, Dragonetti G, Aglietta M (1996) The effects of human FLT3 ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol* 24: 340-346
- Qiao X, Loudovaris M, Unverzagt K, Walker DE, Smith SL, Martinson J, Schilling M, Lee W, Williams SF, Van Epps DE, Cohen I, Bender JG (1996) Immunocytochemistry and flow cytometry evaluation of human megakaryocytes in fresh samples and cultures of CD34⁺ cells. *Cytometry* 23: 250-259
- Schlossmann SF et al. (eds.) (1995) „Leucocyte typing V“: Proceedings of the 5th int. conference on white cell differentiation antigens, Boston 1993. Oxford University Press
- Sieff CA (1994) Hematopoietic cell proliferation and differentiation. *Current Opinion in Hematology* 1:310-320

- Strauss L, Rowley S, La Russa S, Stuart R, Civin C (1986) Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 14: 878
- Teramura M, Katahira J, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H (1988) Clonal growth of human megakaryocyte progenitors in serum-free cultures: effect of recombinant human interleukin 3. *Exp Hematol* 16: 843-848
- Teramura M, Kobayashi S, Hoshino S, Oshimi K, Mizoguchi (1992) Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 79: 327-331
- Thomas ML (1989) The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7: 339-369
- Tomer A, Harker LA, Burstein SA (1988) Flow cytometric analysis of normal megakaryocytes. *Blood* 71: 1244-1252
- Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, Guichard J, Titeux M, Breton-Gorius J, McMichael J (1982) Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in in vivo cells from normal and leukemic patients. *Blood* 59: 514-521
- Verdonck LF, Van Heugten H, De Gast GC (1985) Delay in platelet recovery after bone marrow transplantation: impact of cytomegalovirus infection. *Blood* 66: 921-925
- Weich NS, Wang A, Fitzgerald M, Neben TY, Donaldson D, Giannotti JA, Yetz-Aldape J, Leven RM, Turner KJ (1997) Recombinant human interleukin-11 directly promotes megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 90: 3893-3902
- Williams JL, Pipia GG, Datta NS, Long MW (1998) Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells. *Blood* 91: 4118-4126

- Winslow JM, Liesveld JL, Ryan DH, Dipersio JF, Abboud (1994) CD34⁺ progenitor cell isolation from blood and marrow: a comparison of techniques for small-scale selection. *Bone Marrow Transplantation* 14: 265-271
- Yonemura Y, Ku H, Lyman SD, Ogawa M (1997) In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* 89/6: 1915-1921
- Young JC, Bruno E, Luens KN, Wu S, Backer M, Murray LJ (1996) Thrombopoietin stimulates megakaryocytopoiesis, myelopoiesis and expansion of CD34⁺ progenitor cells from single CD34⁺Thy-1⁺Lin⁻ primitive progenitor cells. *Blood* 88: 1619-1631

Glossar

BFU	burst forming unit
BSA	bovine serum albumin
CFU	colony forming unit
CFU-GM	colony forming unit granulocyte-monocyte
c-Mpl	Humanes, homologes Korrelat des v-Mpl, eines Membranrezeptors des Murine myeloproliferative leukemia virus (MPLV)
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward light scatter, Vorwärtsstreulicht in der Durchflußzytometrie
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating Factor
GvHD	Graft-versus-Host Disease, Transplantat gegen Wirt-Reaktion
HLA	human leukocyte antigen
HLA-„Mismatches“	Unterschiede in der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MK	megakaryocyte
MNC	Mononukleäre Zellen
PE	Phycoerythrin
SCF	Stammzell Faktor
SSC	sideward light scatter, Seitwärtsstreulicht in der Durchflußzytometrie
TPO	Thrombopoietin
Zytokine	Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Danksagung

In erster Linie möchte ich Professor Dr. Axel Zander danken, der mir die Durchführung der Experimente in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation der Universität Hamburg ermöglichte und mich, wenn nötig, mit Rat und Tat unterstützte.

Ich danke Dr. H. T. Hassan für die Idee zu dieser Doktorarbeit und die Einführung in die Laborarbeit.

Besonderer Dank gilt auch Frau Birgit Biermann und Frau Lourdes Cortes, die mir im Labor bei der Erprobung, Durchführung und durchflußzytometrischen Messung der Versuche geholfen haben und, wann immer Probleme auftauchten, mit mir gemeinsam nach Lösungen gesucht haben. Weiterhin danke ich den übrigen MTAs, Doktoranden und Assistenten der Einrichtung für Knochenmarktransplantation und den Mitarbeitern der Abteilung für Transfusionsmedizin, die mich in ihren Kreis aufnahmen und auf diese Weise ein sehr angenehmes Arbeitsklima schufen.

Sehr geholfen haben mir auch Frau Dr. Varda Deutsch und Frau Marjorie Pick in Tel Aviv, die mich in ihrem Labor in die Arbeit mit Megakaryozyten und in die Geheimnisse der Megakaryozytenkulturen einführten und mir trotz der Distanz bei Fragen immer zur Verfügung standen.

Ich danke Dr. Pichelmeyer aus dem Institut für Mathematik und Datenverarbeitung in der Medizin (IMDM) der Universität Hamburg für seine Ratschläge zur statistischen Auswertung der Daten.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner jetzigen Frau für ihre vielfältigen Unterstützungen danken, die sie mir bis zur Fertigstellung dieser Arbeit haben zukommen lassen.

Lebenslauf

Name: Philipp Georg Christian Begemann

Geburtstag: 27. September 1969 in Worms

Eltern: Dr. med. Michael Begemann
Dr. med. Dr. phil. Monika Begemann-Deppe

Familienstand: verheiratet mit Ulla-Maarit Begemann geb. Holopainen

Grundschule 1975 – 1979 in Marburg/Lahn

Gymnasium 1979 – 1983 Gymnasium Philippinum in Marburg/Lahn
1986 – 1987 Strathallan School in Perthshire, Schottland
1983 – 1989 Wilhelm-Gymnasium in Hamburg

Abitur 1989

Zivildienst 1989 – 1990 im Israelitisches Krankenhaus in Hamburg

Medizinstudium Sommersemester 1991 bis Sommersemester 1998 an der
Universität Hamburg

Physikum August 1993

1. Staatsexamen August 1994

2. Staatsexamen März 1997

3. Staatsexamen Mai 1998

Arzt im Praktikum Juni 1998 – November 1999 in der Abteilung für Radiologische
Diagnostik am Universitätskrankenhaus Eppendorf

Approbation 2.12.1999

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.

Anhang

Im Anhang finden sich die Tabellen und Berechnungen, die im Text nicht eingefügt sind, auf die jedoch zurückgegriffen werden. Zusätzlich finden sich hier die wichtigsten „dot plot“-Grafiken der im experimentellen Teil durchgeführten durchflußzytometrischen Messungen.

	NAME	SEX	GEB. DAT.	ALT.	DIAGN.	TRANS. DAT.	GEW. (kg)	WBC >500/ μ l	PLT >20000/ μ l	Anzahl PLT-Konz.	CD34+ (%)	CD34+CD41+ (% d. CD34+)	CD34+ / kg KG ($\times 10^6$)	CD34+CD41+ / kg KG ($\times 10^4$)
1	A.W.	m	29.11.79	18	CML	28.02.97	60	14	29		0,9	2,3	4,0	9,2
2	R.B.	m	02.07.94	3	AML	10.03.97	12,5	17	23	13	2,1	5,3	7,4	39,0
3	J.P.	w	12.02.93	4	ALL	22.12.97	21	15	23	9	1,8	12,3	5,7	70,1
4	J-H.M.	m	04.08.86	12	ALL	27.08.97	44,6	17	24	11	1,2	5,4	2,2	11,9
5	C.B.	w	07.11.78	19	AML	20.11.97	60	14	29	16	1,9	6,0	3,5	21,0
6	D.M.	w	23.03.77	20	ALL	04.03.97	51,8	14	27		0,6	1,4	2,1	3,0
7	T.C.	m	15.04.76	22	ALL	15.07.97	86,5	18	32	20	4,5	5,0	5,2	26,0
8	I.P.	w	06.06.75	23	ALL	04.11.97	92	18	34	15	1,5	11,7	2,5	29,3
9	S.G.	w	08.03.58	29	CML	13.10.97	65	15	27	8	0,9	11,2	2,6	29,1
10	Y.A.	w	30.01.67	31	CML	15.04.97	93	16	26		1,3	23,6	3,8	88,8
11	C.S.	w	11.07.66	31	CML	22.09.97	58	13	17	8	1,4	5,5	5,0	27,5
12	J.R.	m	02.11.63	34	CML	29.07.97	84	14	18		2,5	8,1	2,5	20,2
13	C.F.	w	05.09.62	35	CML	19.08.97	45	12	17		0,8	12,6	5,1	64,4
14	C.B.	m	19.09.61	36	CML	16.03.98	82	14	16	5	1,1	28,6	4,0	114,4
15	R-J.M.	m	15.05.61	37	AML	25.06.97	76	18	30	17	1,3	1,6	2,0	3,2
16	S.R.	w	30.01.60	38	CML	14.07.97	56	14	24		1,2	3,5	3,5	11,9
17	L.P.	m	04.06.57	41	AA	06.06.97	100	19	36		1,1	4,5	1,1	5,0
18	G.R.	w	25.04.56	41	AML	03.11.97	47	14	21	8	0,8	9,8	2,3	22,5
19	R.B.	w	11.03.56	42	AML	24.07.97	48	15	36		2,0	6,3	3,8	24,2
20	F.M.	w	09.02.56	42	AML	09.09.97	62	16	25	11	1,4	3,7	1,7	6,4
21	M.F.	w	15.08.53	44	CML	10.06.97	57	12	20		1,4	13,8	4,8	66,2
22	M.P.	m	04.05.52	45	ALL	22.12.97	81	16	41	18	1,5	14,4	5,9	85,0
23	I.O.	w	12.06.51	46	CML	23.02.98	68	10	17	11	1,4	23,9	5,3	126,7
24	W.W.	w	14.06.51	46	MM	26.02.98	91	13	23	22	2,4	10,8	3,2	34,6
25	J.B.	m	09.01.49	49	AML	05.09.97	82	15	26	17	2,3	14,6	2,8	41,0
26	G.S.	m	12.02.43	52	CML	14.03.97	94,2	17	28	15	0,8	4,0	1,5	5,9
27	P.S.	m	13.01.46	52	CML	12.05.97	88	16	29		2,3	7,1	3,2	22,5
28	C.M.	w	15.10.44	53	CML	06.08.97	58	13	22		0,8	1,5	2,6	4,1
29	H-P.B.	m	12.12.41	56	AML	29.07.97	72	16	24		1,5	5,0	3,8	18,8
Median				37				15	25	13	1,4	6,3	3,5	24,2
Min.				3				10	16	5	0,6	1,4	1,1	3,0
Max				56				19	41	22	4,5	28,6	7,4	126,7

Tabelle I: Datentabelle zu den untersuchten Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation zur Korrelation der pro kg Körpergewicht transplantierten Zellmenge zum Zeit bis zum Zell-Engraftment

	Zellzahl ($\times 10^6$)		CD34+ (%)		CD41+ (%)		CD34+ ZZ ($\times 10^6$)		CD41+ ZZ ($\times 10^6$)		Ausbeute (%)	
	v.S.	n.S.	v.S.	n.S.	v.S.	n.S.	v.S.	n.S.	v.S.	n.S.	CD34+	CD41+
Versuch 1	150,0	1,1	4,8	86,2	10,6	5,2	7,2	0,9	15,9	0,1	13,2	0,4
Versuch 2	130,0	1,0	1,9	86,2	4,0	14,4	2,5	0,9	5,2	0,1	34,9	2,8
Versuch 3	90,0	1,4	4,3	91,1	6,9	1,4	3,9	1,3	6,2	0,0	33,0	0,3
Versuch 4	140,0	1,4	4,1	96,4	13,9	5,8	5,7	1,3	19,5	0,1	23,5	0,4
Versuch 5	200,0	2,0	4,8	95,8	22,6	18,8	9,6	1,9	45,2	0,4	20,0	0,8
Versuch 6	100,0	1,3	6,8	90,6	17,9	21,4	6,8	1,2	17,9	0,3	17,3	1,6
Versuch 7	100,0	1,6	4,0	94,9	23,6	28,2	4,0	1,5	23,6	0,5	38,0	1,9
Median	130,0	1,4	4,3	91,1	13,9	14,4	5,7	1,3	17,9	0,1	23,5	0,8
Min.	90,0	1,0	1,9	86,2	4,0	1,4	2,5	0,9	5,2	0,0	13,2	0,3
Max.	200,0	2,0	6,8	96,4	23,6	28,2	9,6	1,9	45,2	0,5	38,0	2,8

Tabelle II: Anreicherung CD34+-Zellen mit MiniMACS Zellseparationssäulen für die Zellkulturversuche. ZZ: Zellzahl. v.S.: vor Zellseparationssäule. n.S.: nach Zellseparationssäule

Zellzahl absolut (x10 ⁴)	Auswertung												
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11
Versuch 1	5,00	2,40	5,40	5,70	24,00	2,70	6,00	25,50	3,00	32,70	7,50	22,20	31,20
Versuch 2	5,00	2,67	4,08	5,58	16,42	3,42	5,17	19,00	2,83	23,50	4,00	22,25	24,92
Versuch 3	5,00	2,29	2,64	3,14	13,43	2,79	3,71	12,43	2,50	13,50	3,93	13,07	15,64
Versuch 4	5,00	2,94	4,88	5,76	27,82	4,53	6,53	22,35	3,71	29,41	6,41	27,29	43,82
Versuch 5	5,00	2,00	4,56	4,39	16,33	3,00	9,56	18,00	4,11	33,44	8,89	17,94	37,67
Versuch 6	5,00	2,97	4,49	3,04	21,71	2,34	6,01	26,52	2,34	30,82	4,68	21,14	28,73
Versuch 7	5,00	2,15	1,55	2,95	21,55	1,60	3,95	21,10	2,10	35,65	3,90	21,65	34,00
Max. Wert	5,00	2,97	5,40	5,76	27,82	4,53	9,56	26,52	4,11	35,65	8,89	27,29	43,82
Min. Wert	5,00	2,00	1,55	2,95	13,43	1,60	3,71	12,43	2,10	13,50	3,90	13,07	15,64
Median	5,00	2,40	4,49	4,39	21,55	2,79	6,00	21,10	2,83	30,82	4,68	21,65	31,20
Spannweite pos.	0,00	0,57	0,91	1,38	6,27	1,74	3,56	5,42	1,28	4,83	4,21	5,64	12,62
Spannweite neg.	0,00	0,40	2,94	1,44	8,12	1,19	2,29	8,67	0,73	17,32	0,78	8,58	15,56

Tabelle III: Auswertung der Zellkulturversuche. Die absolute Zellzahl

CD34+ in % der abs. Zellzahl	Auswertung												
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11
Versuch 1	86,20	10,90	25,50	25,50	7,20	12,80	36,40	10,00	26,10	8,60	44,10	9,40	8,30
Versuch 2	86,20	31,80	28,70	30,00	38,80	27,70	35,10	46,60	28,40	42,30	40,60	44,70	48,10
Versuch 3	91,10	48,20	46,80	51,30	66,30	50,30	58,80	68,40	57,50	65,80	59,50	70,20	67,80
Versuch 4	96,40	50,40	52,00	41,30	49,20	64,00	62,30	54,90	51,30	50,80	51,50	49,00	55,40
Versuch 5	95,80	46,60	51,50	40,10	38,90	47,80	64,60	58,50	50,70	62,10	64,40	59,20	61,00
Versuch 6	90,60	24,70	26,10	22,00	11,70	32,30	36,70	19,00	26,00	19,50	38,80	16,60	19,80
Versuch 7	94,90	22,30	19,90	25,60	25,90	21,10	31,10	39,30	19,60	38,20	32,40	34,90	41,20
Max. Wert	96,40	50,40	52,00	51,30	66,30	64,00	64,60	68,40	57,50	65,80	64,40	70,20	67,80
Min. Wert	86,20	10,90	19,90	22,00	7,20	12,80	31,10	10,00	19,60	8,60	32,40	9,40	8,30
Median	91,10	31,80	28,70	30,00	38,80	32,30	36,70	46,60	28,40	42,30	44,10	44,70	48,10
Spannweite pos.	5,30	18,60	23,30	21,30	27,50	31,70	27,90	21,80	29,10	23,50	20,30	25,50	19,70
Spannweite neg.	4,90	20,90	8,80	8,00	31,60	19,50	5,60	36,60	8,80	33,70	11,70	35,30	39,80

Tabelle IV: Auswertung der Zellkulturversuche. Der prozentuale Anteil an CD34⁺-Zellen an der absoluten Zellzahl.

CD41+ in % der abs. Zellzahl	Auswertung												
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11
Versuch 1	5,20	0,30	0,60	0,00	5,00	0,00	3,00	5,60	0,80	7,40	3,00	4,30	6,50
Versuch 2	14,70	4,90	4,20	2,70	6,10	4,60	5,50	8,40	5,90	9,40	6,90	7,40	7,20
Versuch 3	1,40	3,20	7,30	3,80	11,50	0,80	11,60	14,80	4,30	15,20	7,50	14,20	15,40
Versuch 4	5,80	2,00	6,40	1,20	9,50	6,10	9,80	14,30	5,00	20,90	12,30	13,10	11,90
Versuch 5	18,80	21,20	21,50	20,30	53,00	22,90	30,70	49,30	23,40	47,20	31,30	51,20	46,90
Versuch 6	21,40	6,60	7,90	3,50	10,30	5,80	8,00	17,80	6,90	16,50	9,50	20,40	17,70
Versuch 7	28,20	7,80	6,60	7,20	39,10	6,60	6,90	45,50	7,30	32,50	16,30	45,80	37,60
Max. Wert	28,20	21,20	21,50	20,30	53,00	22,90	30,70	49,30	23,40	47,20	31,30	51,20	46,90
Min. Wert	1,40	0,30	0,60	0,00	5,00	0,00	3,00	5,60	0,80	7,40	3,00	4,30	6,50
Median	14,70	4,90	6,60	3,50	10,30	5,80	8,00	14,80	5,90	16,50	9,50	14,20	15,40
Spannweite pos.	13,50	16,30	14,90	16,80	42,70	17,10	22,70	34,50	17,50	30,70	21,80	37,00	31,50
Spannweite neg.	13,30	4,60	6,00	3,50	5,30	5,80	5,00	9,20	5,10	9,10	6,50	9,90	8,90

Tabelle V: Auswertung der Zellkulturversuche. Der prozentuale Anteil an CD41⁺-Zellen an der absoluten Zellzahl.

CD34+ Zellzahl (x10 ⁶)	Tag0	Auswertung											
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11
Versuch 1	4,31	0,26	1,38	1,45	1,73	0,35	2,18	2,55	0,78	2,81	3,31	2,09	2,59
Versuch 2	4,31	0,85	1,17	1,68	6,37	0,95	1,81	8,85	0,80	9,94	1,62	9,95	11,98
Versuch 3	4,56	1,10	1,24	1,61	8,90	1,40	2,18	8,50	1,44	8,88	2,34	9,18	10,61
Versuch 4	4,82	1,48	2,54	2,38	13,69	2,90	4,07	12,27	1,90	14,94	3,30	13,37	24,28
Versuch 5	4,79	0,93	2,35	1,76	6,35	1,43	6,17	10,53	2,08	20,77	5,72	10,62	22,98
Versuch 6	4,53	0,73	1,17	0,67	2,54	0,76	2,21	5,04	0,61	6,01	1,82	3,51	5,69
Versuch 7	4,75	0,48	0,31	0,76	5,58	0,34	1,23	8,29	0,41	13,62	1,26	7,56	14,01
Max. Wert	4,82	1,48	2,54	2,38	13,69	2,90	6,17	12,27	2,08	20,77	5,72	13,37	24,28
Min. Wert	4,31	0,26	0,31	0,67	1,73	0,34	1,23	2,55	0,41	2,81	1,26	2,09	2,59
Median	4,56	0,85	1,24	1,61	6,35	0,95	2,18	8,50	0,80	9,94	2,34	9,18	11,98
Spannweite pos.	0,27	0,63	1,30	0,77	7,34	1,95	3,99	3,77	1,28	10,83	3,39	4,20	12,29
Spannweite neg.	0,25	0,59	0,93	0,94	4,63	0,61	0,96	5,95	0,39	7,13	1,07	7,09	9,40

Tabelle VI: Auswertung der Zellkulturversuche. Anzahl der CD34⁺-Zellen.

CD41+ Zellzahl (x10 ⁶)	Tag0	Auswertung											
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11
Versuch 1	0,26	0,01	0,03	0,00	1,20	0,00	0,18	1,43	0,02	2,42	0,23	0,95	2,03
Versuch 2	0,74	0,13	0,17	0,15	1,00	0,16	0,28	1,60	0,17	2,21	0,28	1,65	1,79
Versuch 3	0,07	0,07	0,19	0,12	1,54	0,02	0,43	1,84	0,11	2,05	0,29	1,86	2,41
Versuch 4	0,29	0,06	0,31	0,07	2,64	0,28	0,64	3,20	0,19	6,15	0,79	3,58	5,22
Versuch 5	0,94	0,42	0,98	0,89	8,66	0,69	2,93	8,87	0,96	15,79	2,78	9,19	17,67
Versuch 6	1,07	0,20	0,36	0,11	2,24	0,14	0,48	4,72	0,16	5,09	0,44	4,31	5,09
Versuch 7	1,41	0,17	0,10	0,21	8,43	0,11	0,27	9,60	0,15	11,59	0,64	9,92	12,78
Max. Wert	1,41	0,42	0,98	0,89	8,66	0,69	2,93	9,60	0,96	15,79	2,78	9,92	17,67
Min. Wert	0,07	0,01	0,03	0,00	1,00	0,00	0,18	1,43	0,02	2,05	0,23	0,95	1,79
Median	0,74	0,13	0,19	0,12	2,24	0,14	0,43	3,20	0,16	5,09	0,44	3,58	5,09
Spannweite pos.	0,68	0,29	0,79	0,77	6,42	0,55	2,50	6,40	0,80	10,70	2,34	6,34	12,58
Spannweite neg.	0,67	0,12	0,16	0,12	1,23	0,14	0,25	1,77	0,14	3,03	0,22	2,62	3,29

Tabelle VII: Auswertung der Zellkulturversuche. Anzahl der CD41⁺-Zellen.

0														
1	0,018													
2	0,043	0,043												
3	0,310	0,018	0,237											
4	0,018	0,018	0,018	0,018										
5	0,018	0,237	0,063	0,018	0,018									
6	0,398	0,018	0,018	0,043	0,018	0,018								
7	0,018	0,018	0,018	0,018	0,499	0,018	0,018							
8	0,018	0,176	0,063	0,018	0,018	0,917	0,018	0,018						
9	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018					
10	0,499	0,018	0,028	0,091	0,018	0,018	0,499	0,018	0,018	0,018				
11	0,018	0,018	0,018	0,018	0,866	0,018	0,018	0,866	0,018	0,018	0,018			
12	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,398	0,018	0,018	0,018	
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11	

Tabelle VIII: p-Wert Tabelle. Die absolute Zellzahl. p-Werte von kleiner 0,05 sind grau unterlegt

0													
1	0,018												
2	0,018	0,612											
3	0,018		0,600										
4	0,018	0,866	0,735										
5	0,018	0,176	0,735	0,735	0,612								
6	0,018	0,018	0,018	0,018	0,091	0,028							
7	0,018	0,091	0,237	0,128	0,018	0,237	0,735						
8	0,018	0,237	0,612	0,176	0,398	0,735	0,018	0,237					
9	0,018	0,128	0,310	0,237	0,028	0,176	0,398	0,176	0,398				
10	0,018	0,018	0,028	0,018	0,091	0,091	0,310	0,866	0,018	0,612			
11	0,018	0,176	0,499	0,176	0,028	0,499	0,310	0,128	0,612	0,612	0,447		
12	0,018	0,063	0,176	0,176	0,018	0,176	0,735	0,237	0,237	0,128		0,091	
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11

Tabelle IX: p-Wert Tabelle. Der prozentuale Anteil an CD34⁺-Zellen an der absoluten Zellzahl. p-Werte von kleiner 0,05 sind grau unterlegt.

0													
1	0,063												
2	0,237	0,237											
3	0,063	0,043	0,028										
4	0,499	0,018	0,018	0,018									
5	0,091	0,735	0,345	0,345	0,018								
6	0,612	0,043	0,018	0,028	0,063	0,018							
7	0,128	0,018	0,018	0,018	0,091	0,018	0,018						
8	0,176	0,052		0,018	0,018	0,108	0,063	0,018					
9	0,237	0,018	0,018	0,018	0,499	0,018	0,018	0,866	0,018				
10	0,735	0,018	0,018	0,018	0,151	0,018	0,249	0,018	0,018	0,018			
11	0,176	0,018	0,018	0,018	0,091	0,018	0,018		0,018	0,735	0,018		
12	0,176	0,018	0,018	0,018	0,353	0,018	0,018	0,128	0,018	0,612	0,043	0,176	
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11

Tabelle X: p-Wert Tabelle. Der prozentuale Anteil an CD41⁺-Zellen an der absoluten Zellzahl. p-Werte von kleiner 0,05 sind grau unterlegt.

0													
1	0,018												
2	0,018	0,043											
3	0,018	0,028											
4	0,310	0,018	0,018	0,018									
5	0,018	0,091	0,237	0,176	0,018								
6	0,043	0,018	0,018	0,018	0,063	0,018							
7	0,043	0,018	0,018	0,018	0,091	0,018	0,018						
8	0,018	0,176	0,063	0,063	0,018		0,018	0,018					
9	0,043	0,018	0,018	0,018	0,028	0,018	0,018	0,018	0,018				
10	0,028	0,018	0,018	0,028	0,063	0,018	0,499	0,028	0,018	0,028			
11	0,063	0,018	0,018	0,018	0,043	0,018	0,028	0,866	0,018	0,063	0,028		
12	0,043	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,028	0,018	0,063	0,028	0,018	
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11

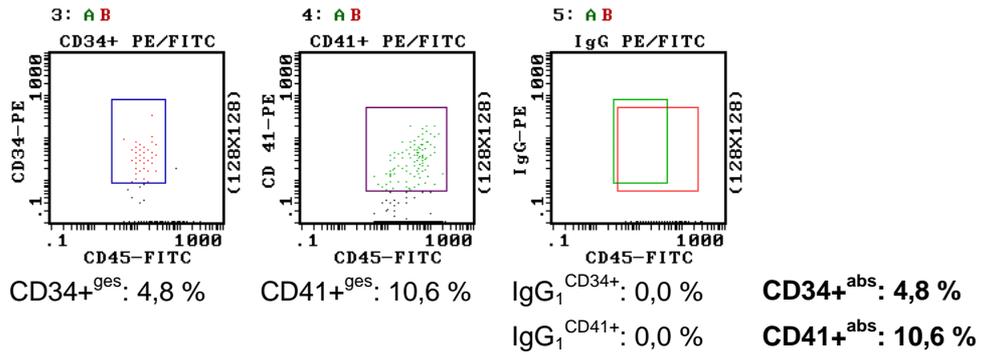
Tabelle XI: p-Wert Tabelle. Anzahl der CD34⁺-Zellen. p-Werte von kleiner 0,05 sind grau unterlegt

0													
1	0,028												
2	0,176	0,063											
3	0,028	0,237	0,128										
4	0,018	0,018	0,018	0,018									
5	0,018	0,866	0,028	0,753	0,018								
6	0,735	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018							
7	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018						
8	0,063	0,205	0,116	0,176	0,018	0,151	0,018	0,018					
9	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018				
10	0,866	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,753	0,018	0,018	0,018			
11	0,018	0,018	0,018	0,018	0,028	0,018	0,018	0,866	0,018	0,018	0,018		
12	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,753	0,018	0,018	
	0 Ansatz	1 Kontrolle	2 TPO	3 SCF	4 IL-3	5 IL-11	6 TPO SCF	7 TPO IL-3	8 TPO IL-11	9 TPO SCF IL-3	10 TPO SCF IL-11	11 TPO IL-3 IL-11	12 TPO SCF IL-3 IL-11

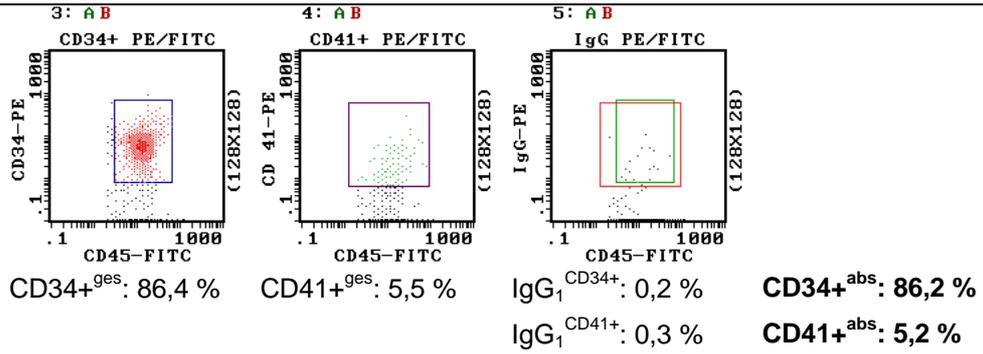
Tabelle XII: p-Wert Tabelle. Anzahl der CD41⁺-Zellen. p-Werte von kleiner 0,05 sind grau unterlegt.

Versuch 1 (LC970919) – Durchflußzytometrische Ergebnisse

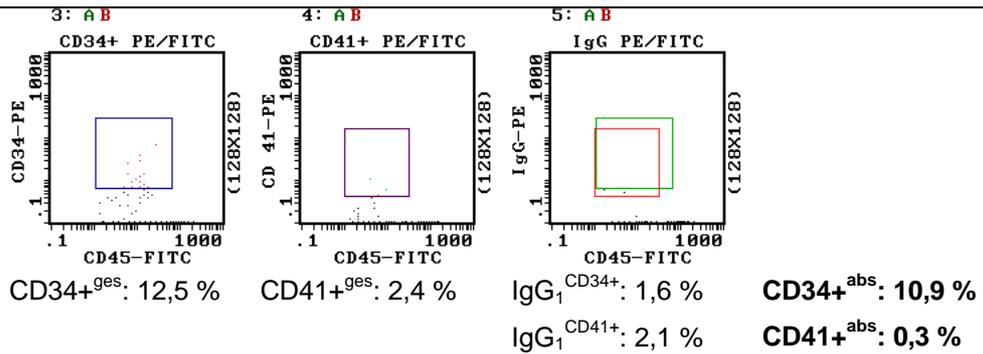
MNC



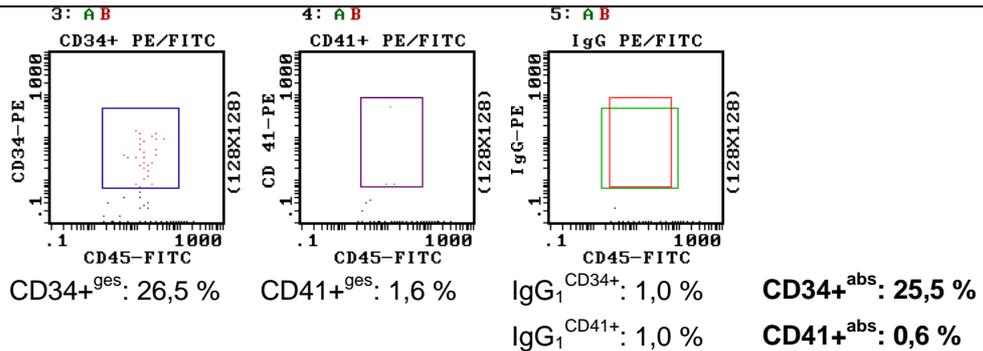
CD34^a



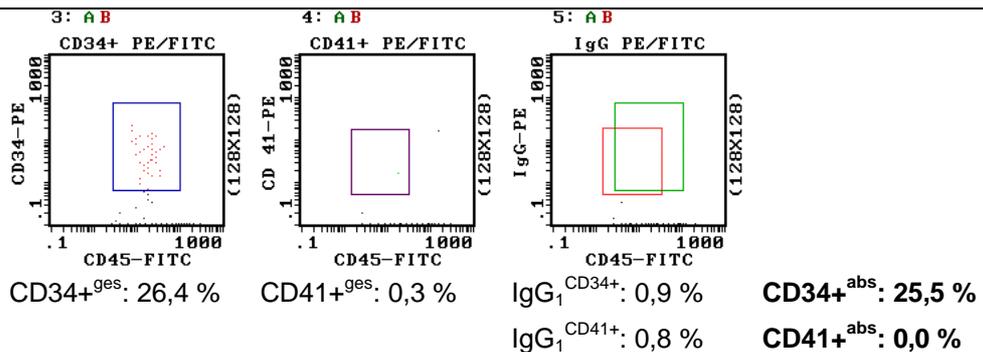
1

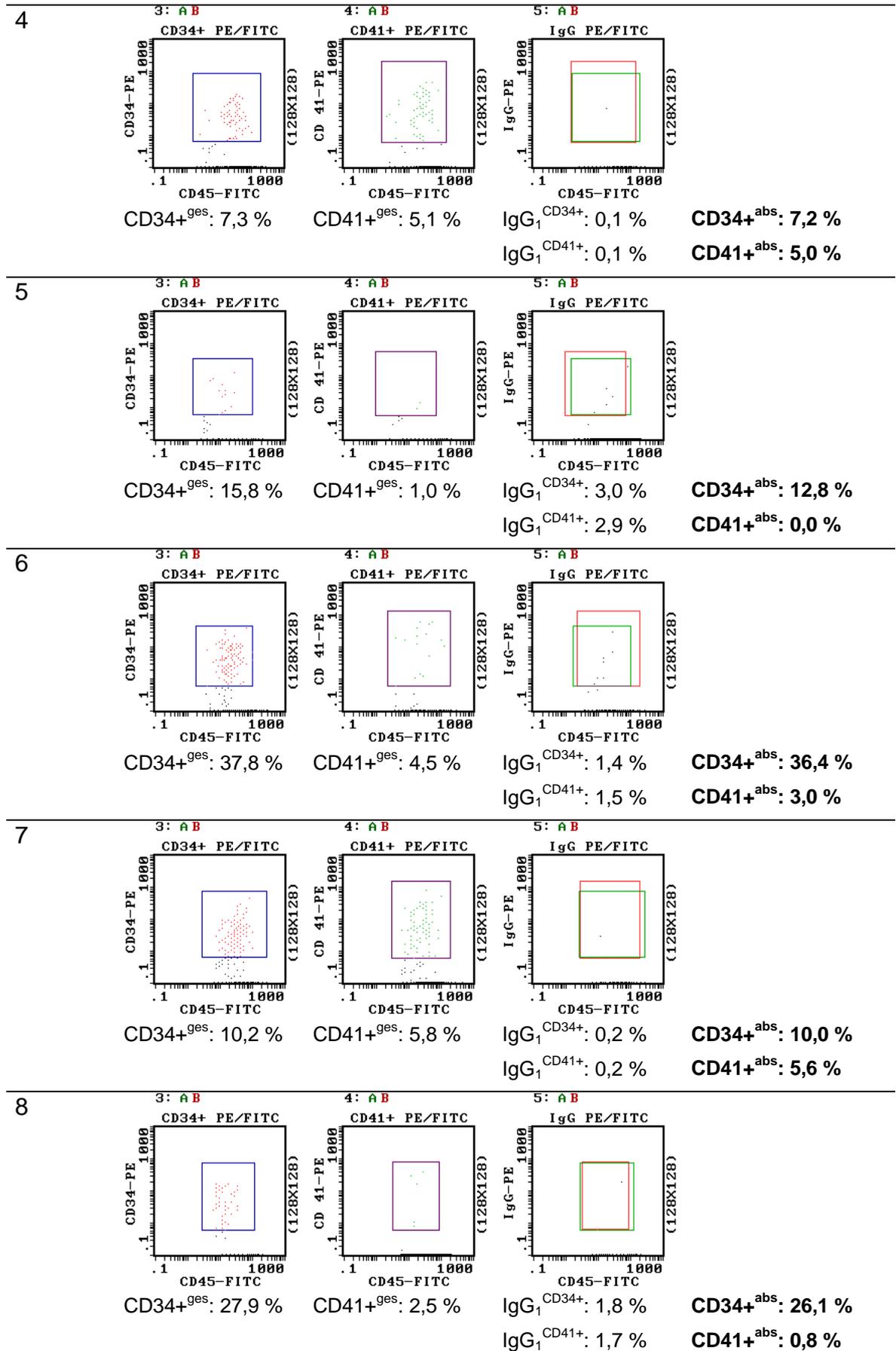


2

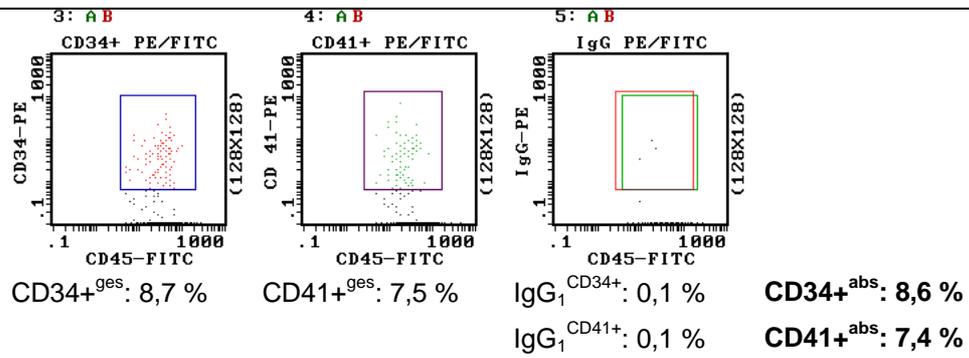


3

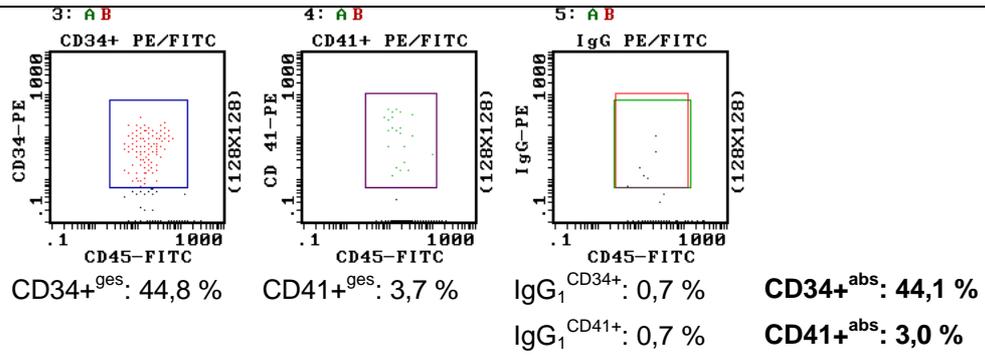




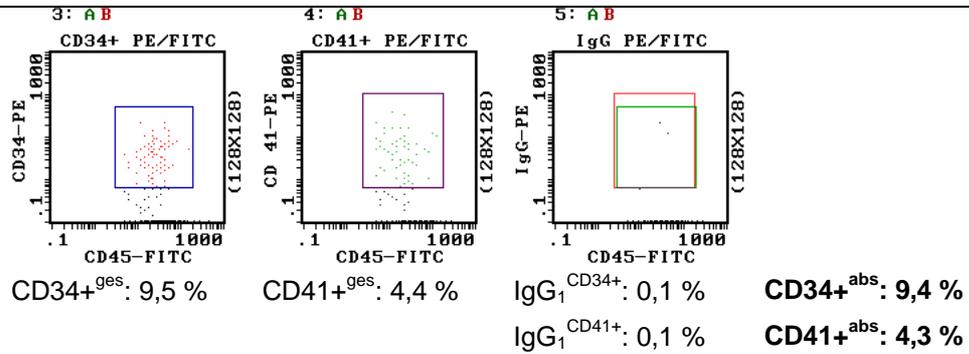
9



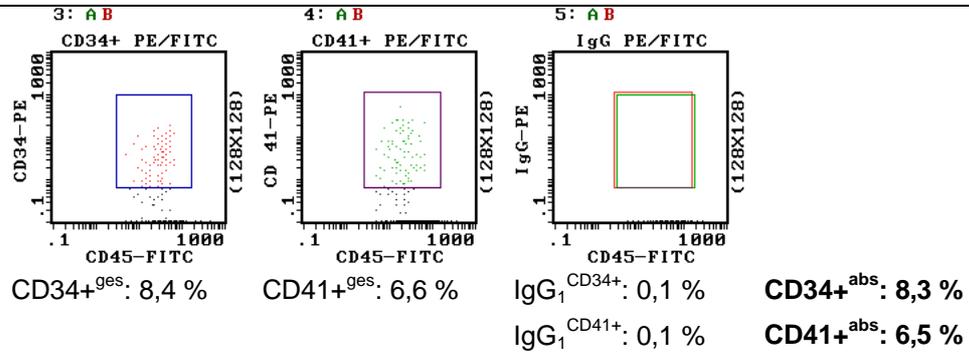
10



11

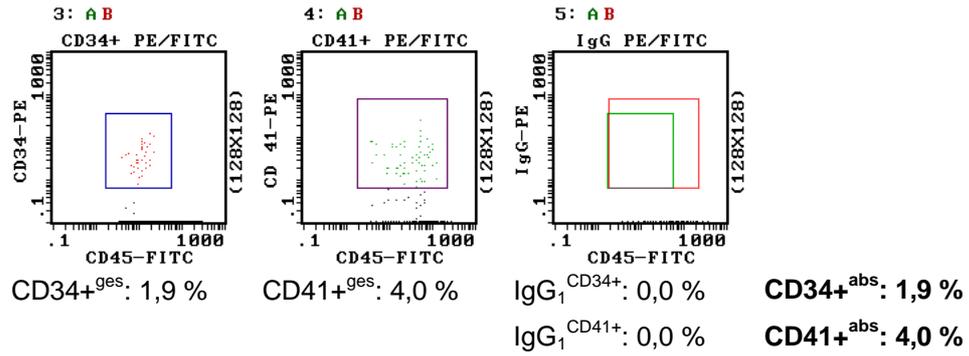


12

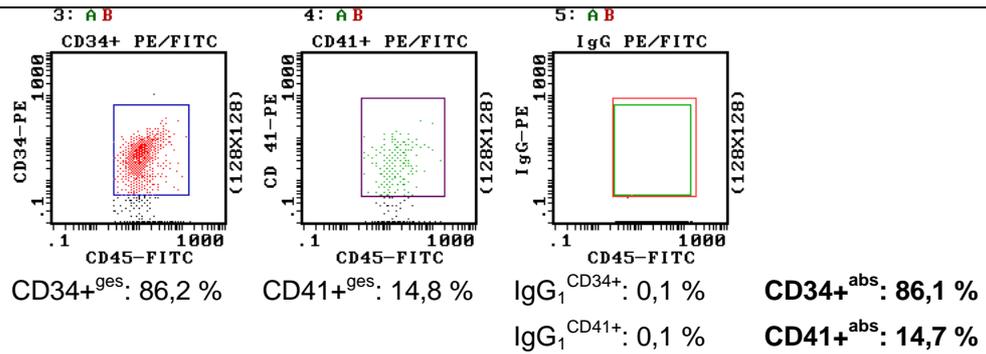


Versuch 2 (LC971020) - Durchflußzytometrische Ergebnisse

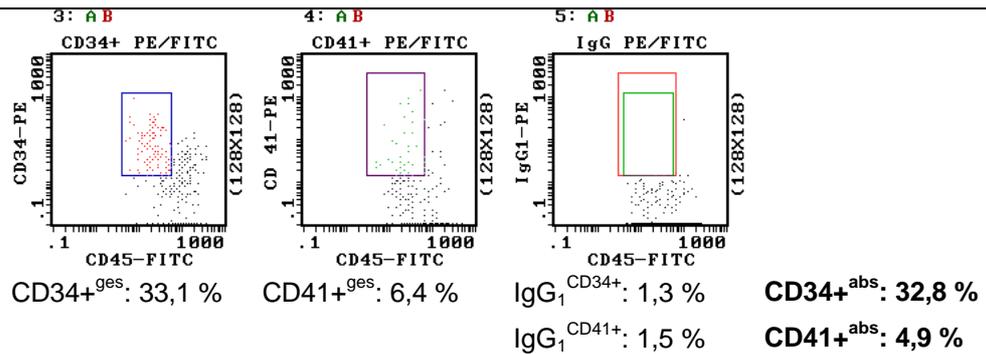
MNC



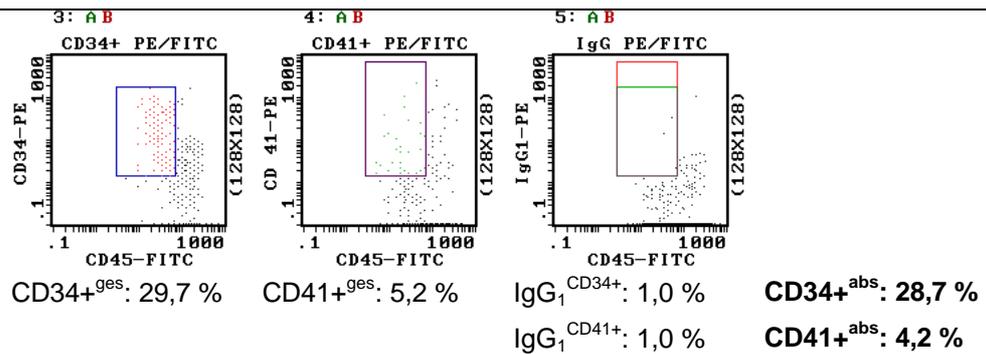
CD34^a



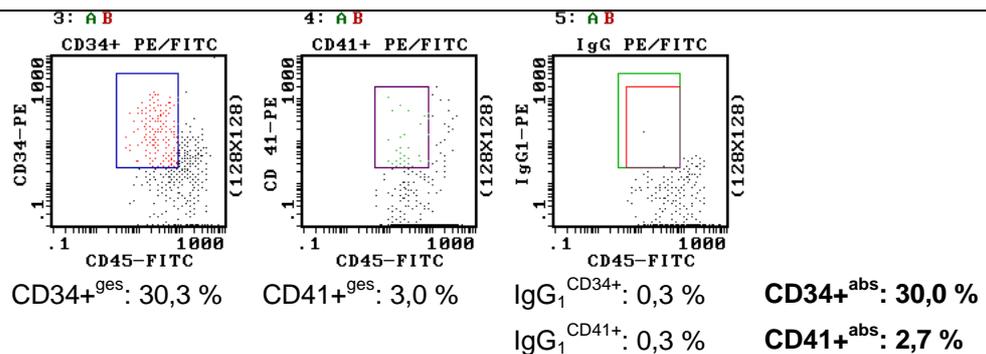
1

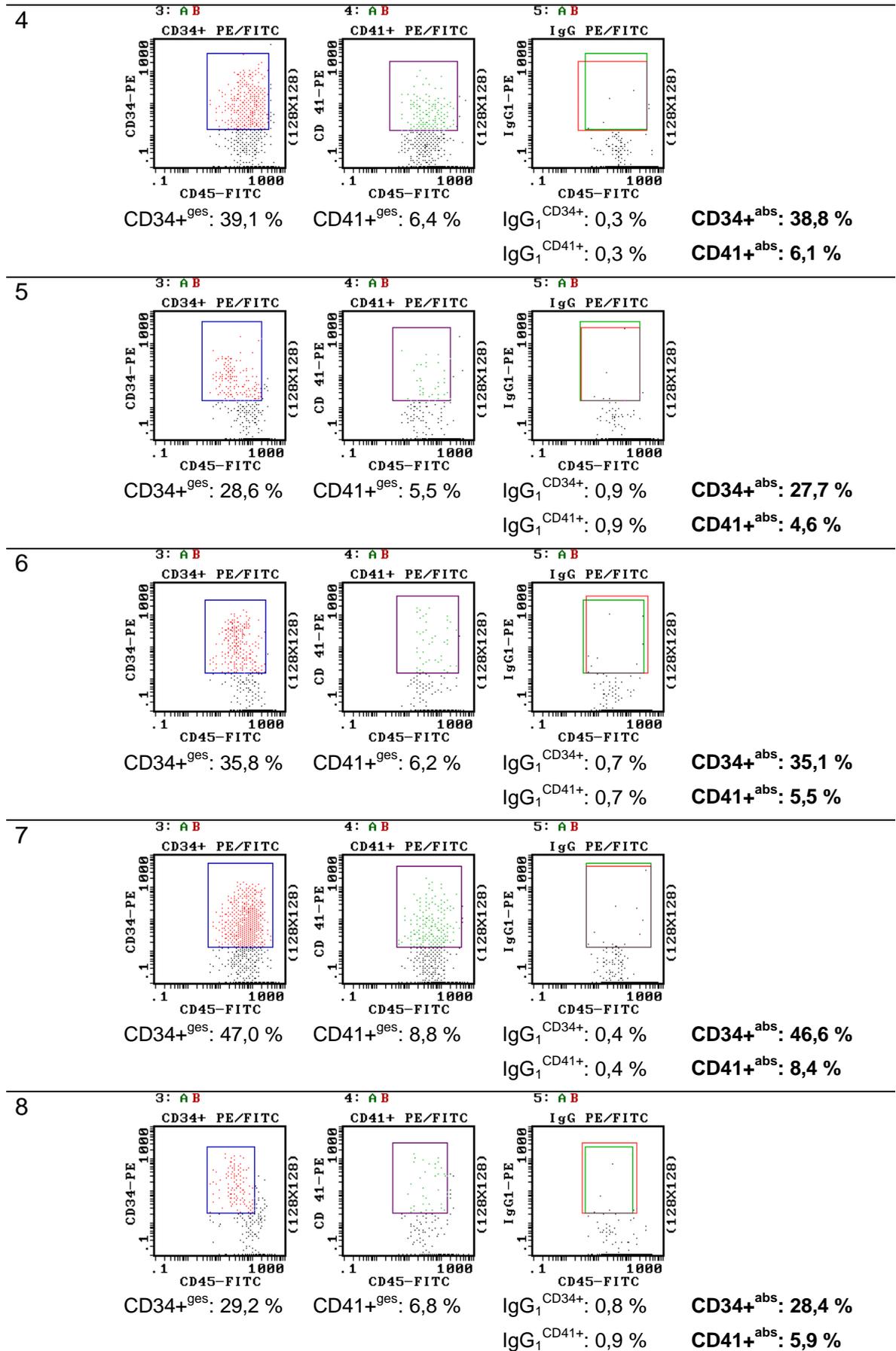


2

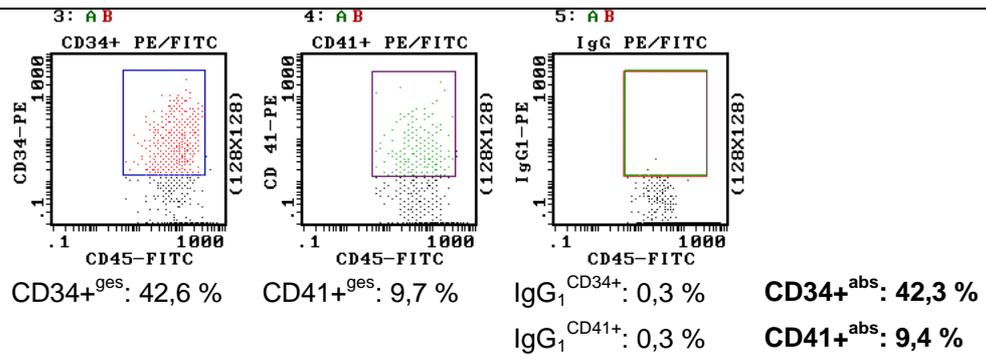


3

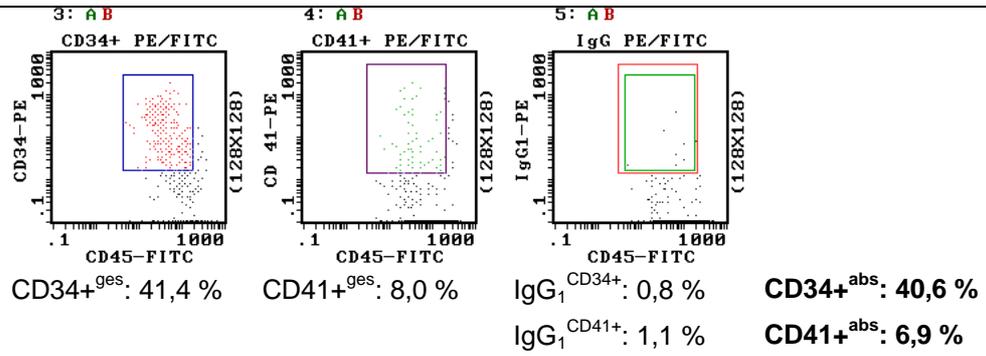




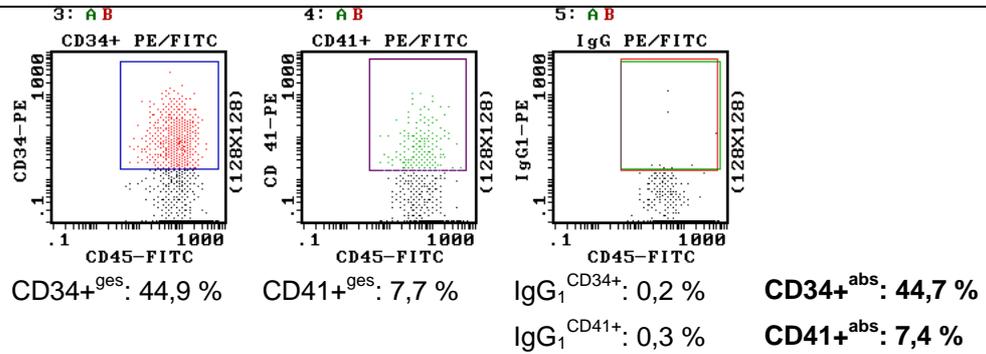
9



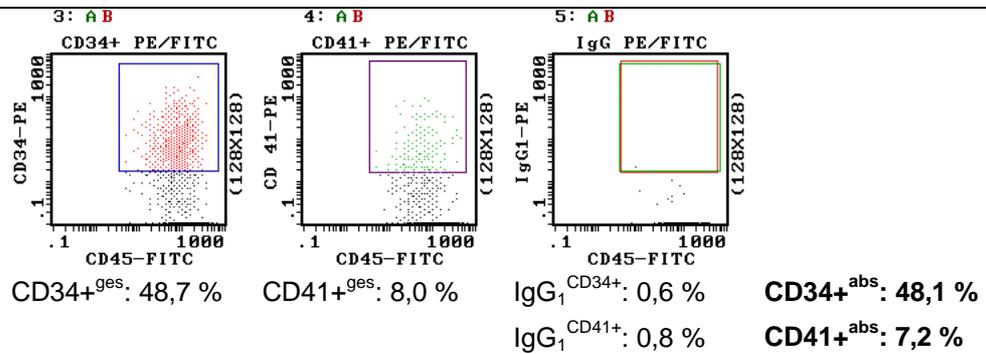
10



11

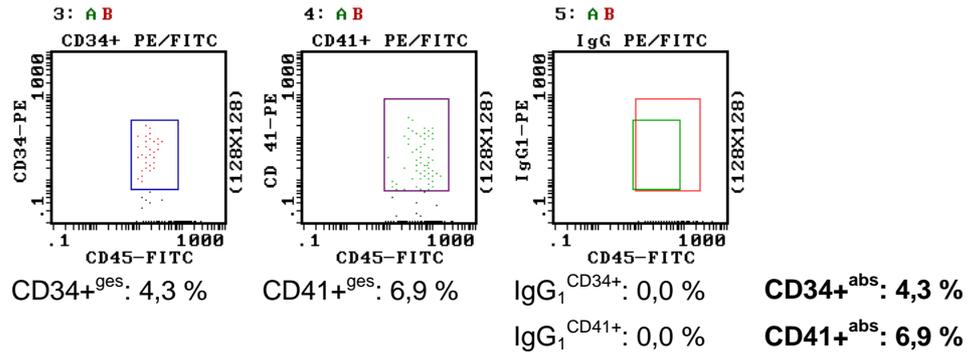


12

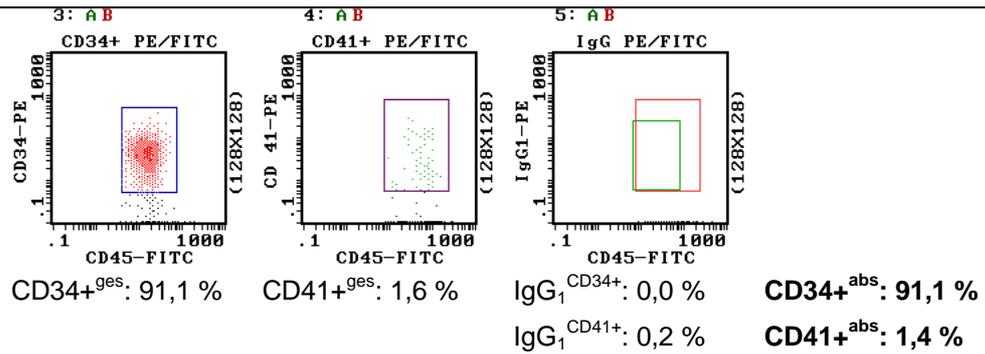


Versuch 3 (LC971103) - Durchflußzytometrische Ergebnisse

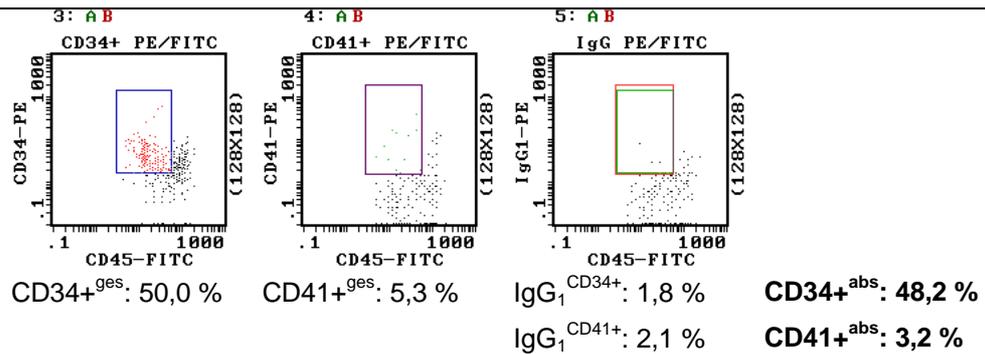
MNC



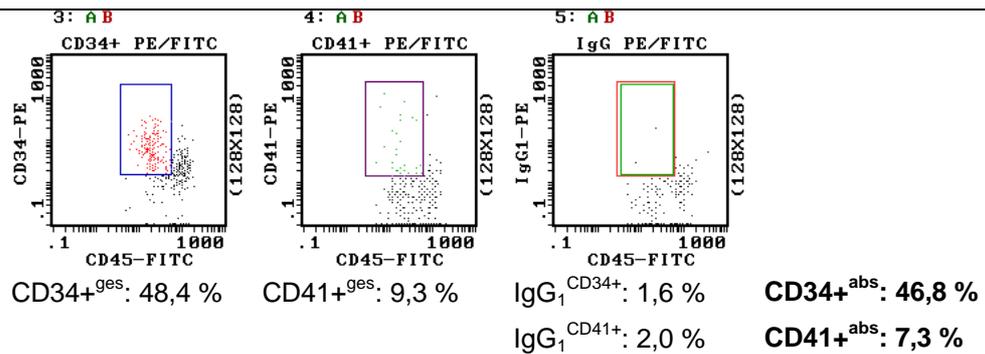
CD34^a



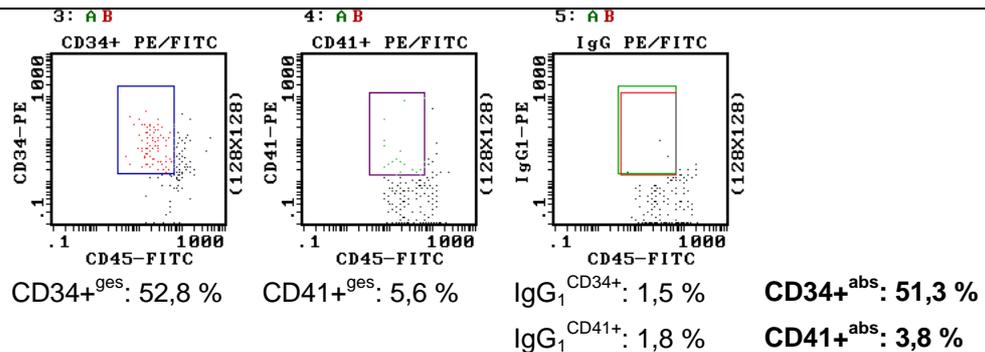
1

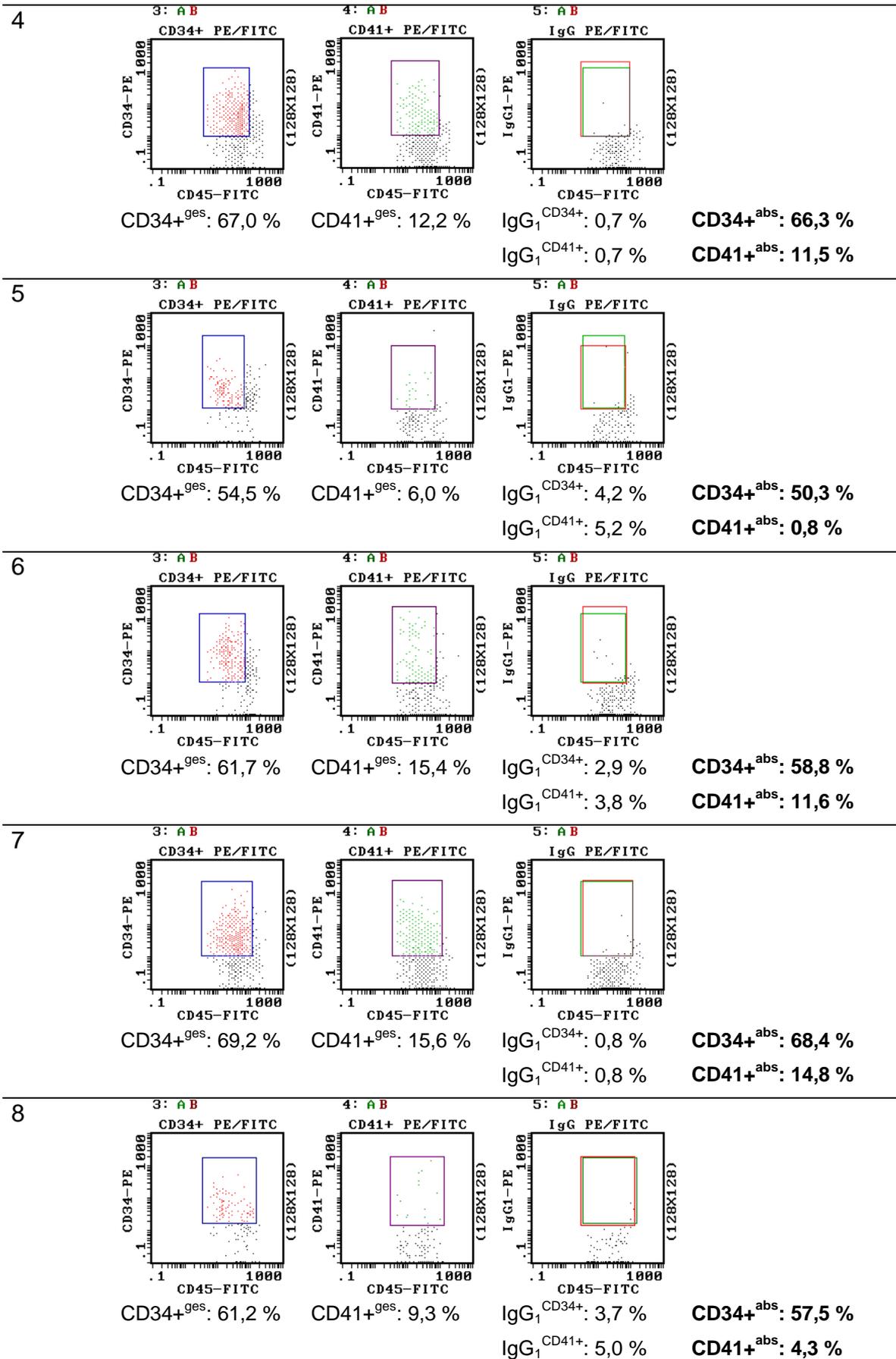


2

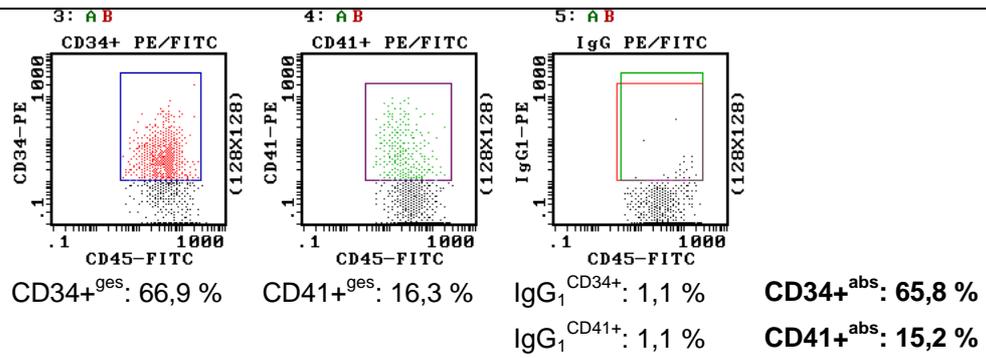


3

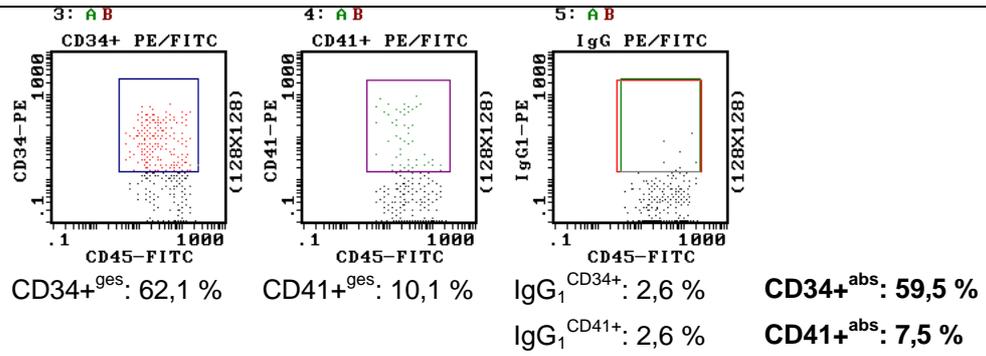




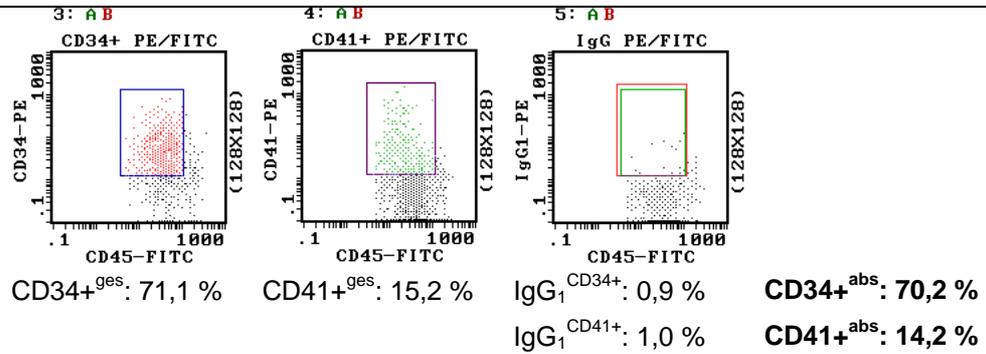
9



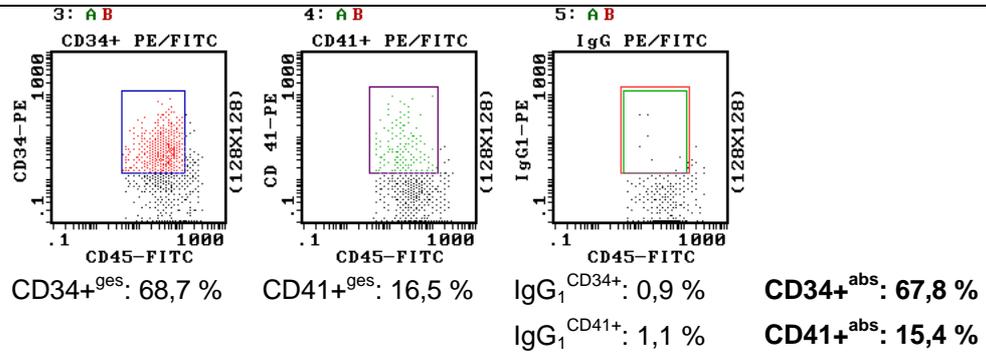
10



11

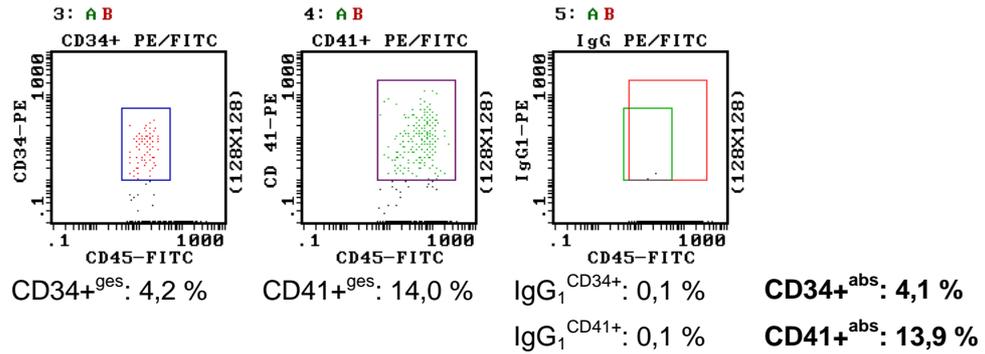


12

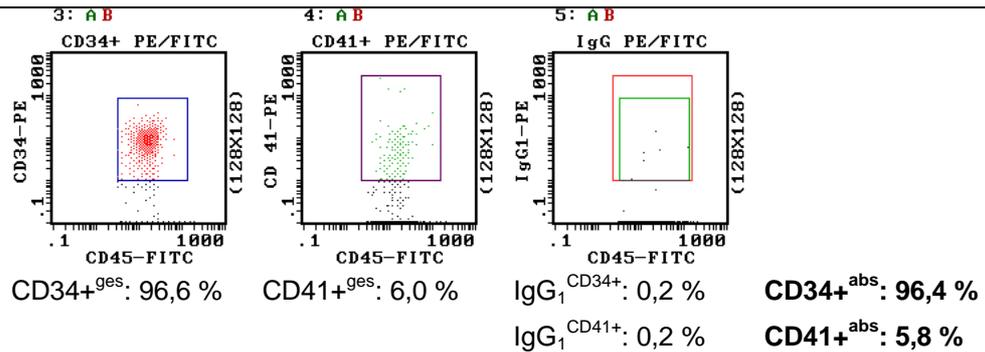


Versuch 4 (LC971110) - Durchflußzytometrische Ergebnisse

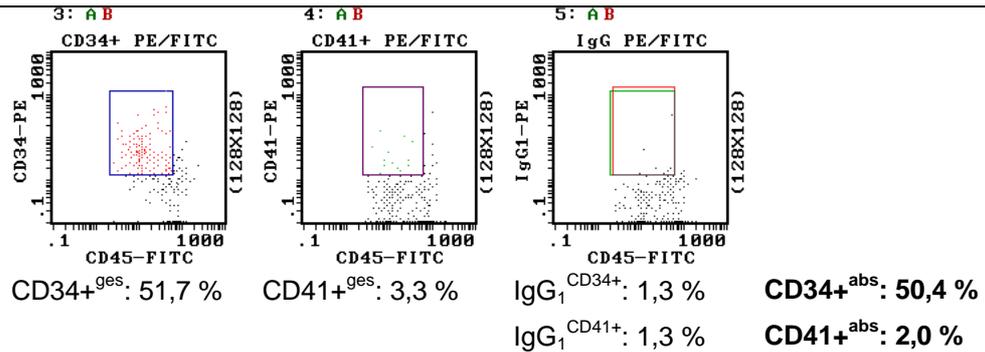
MNC



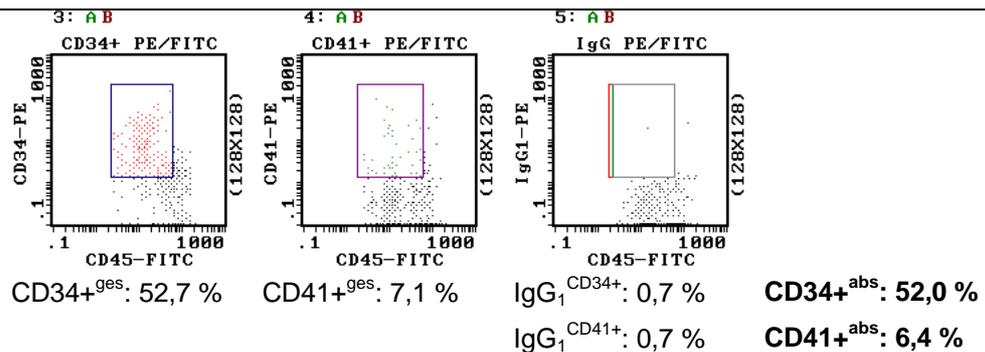
CD34+^a



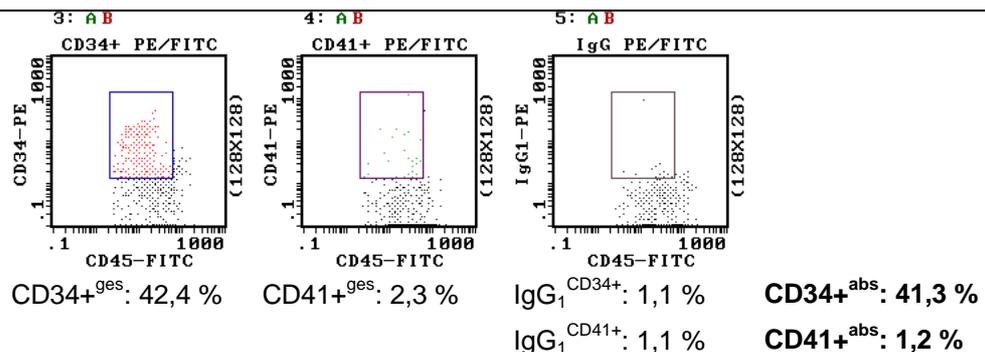
1

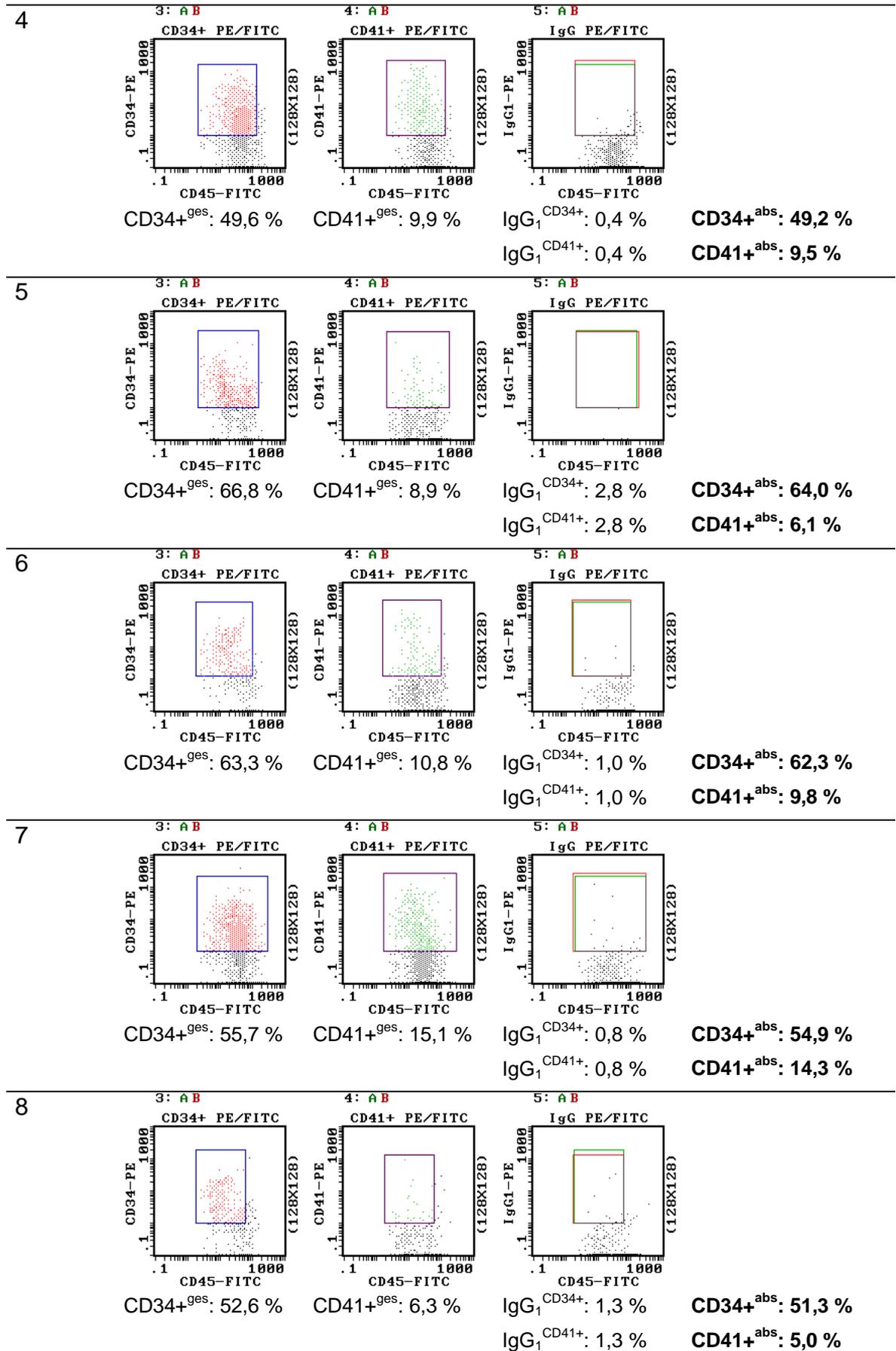


2

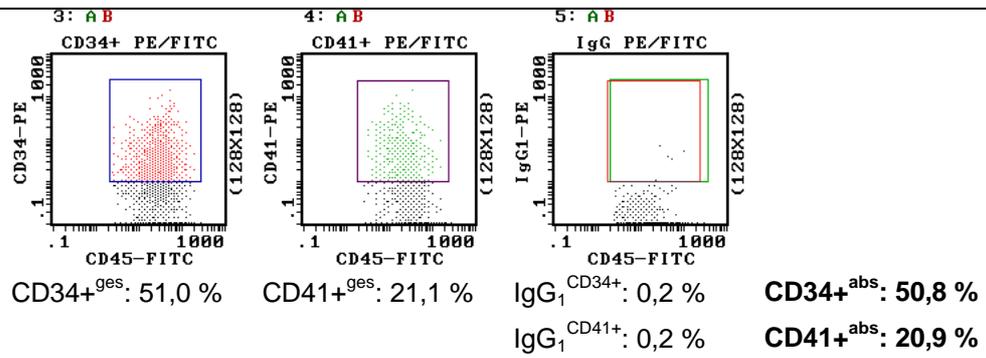


3

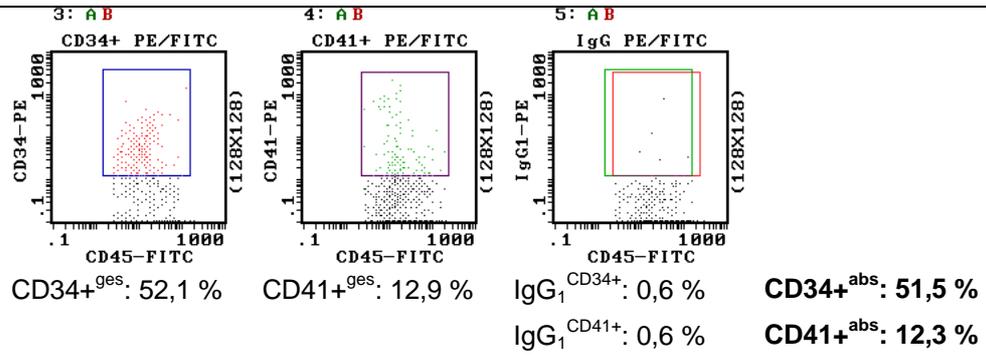




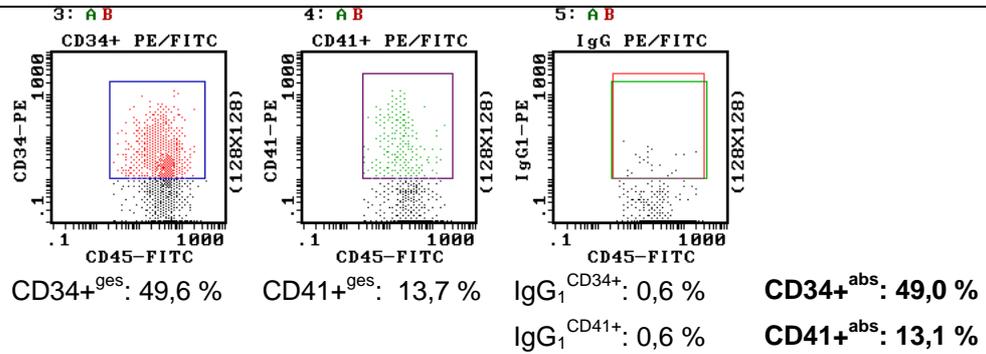
9



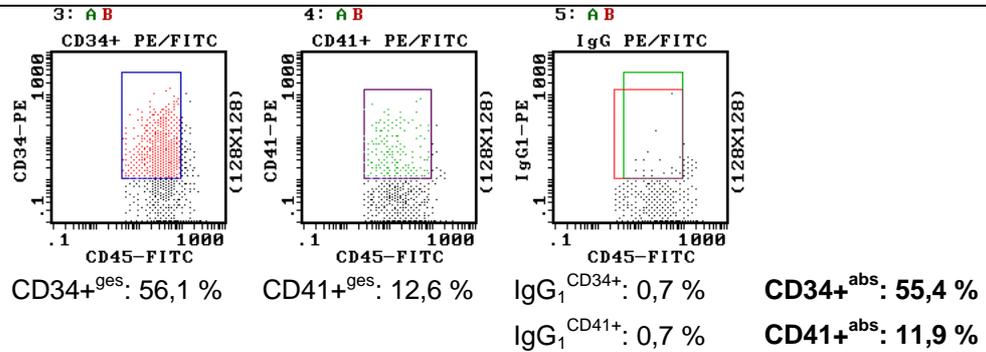
10



11

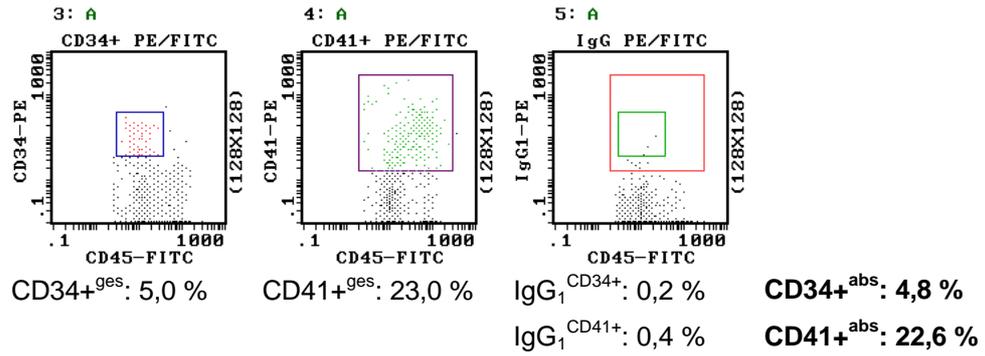


12

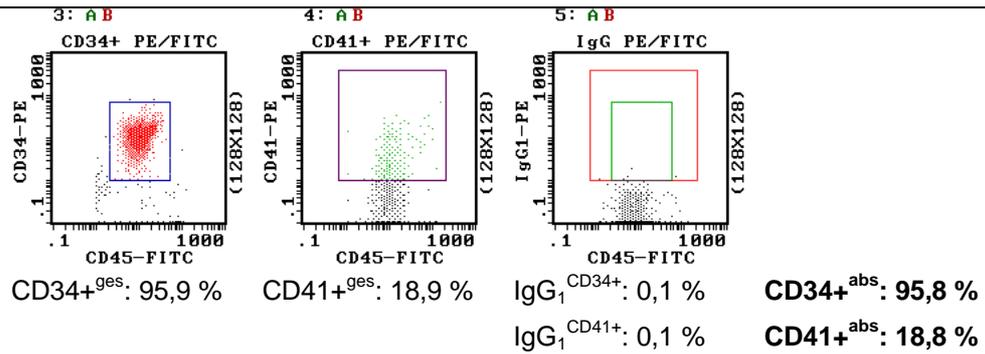


Versuch 5 (LC980123) - Durchflußzytometrische Ergebnisse

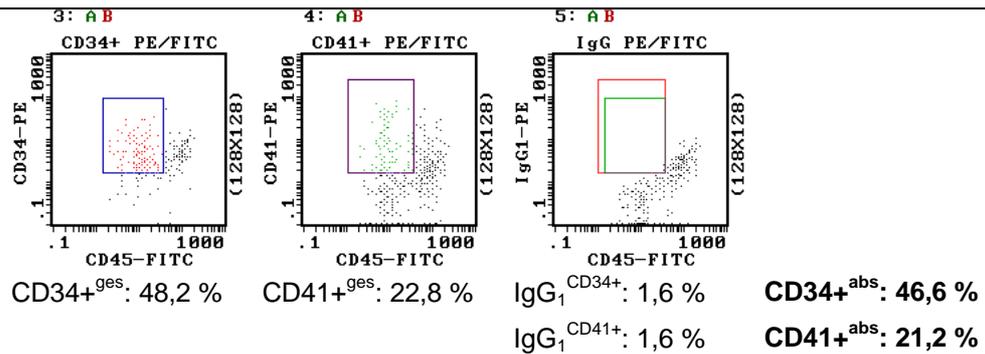
MNC



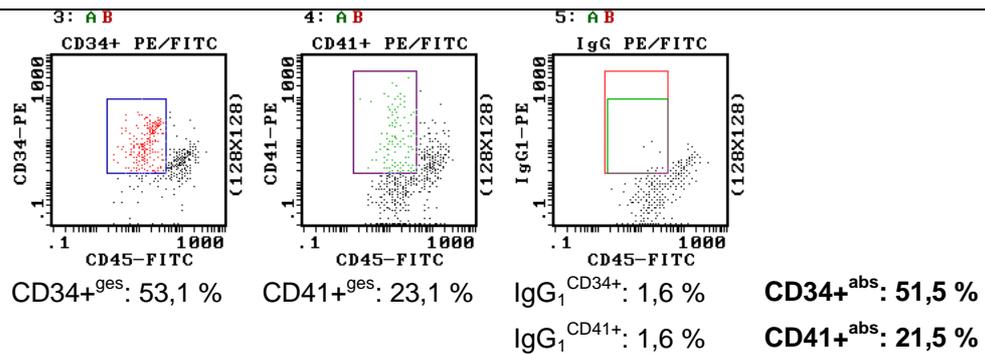
CD34^a



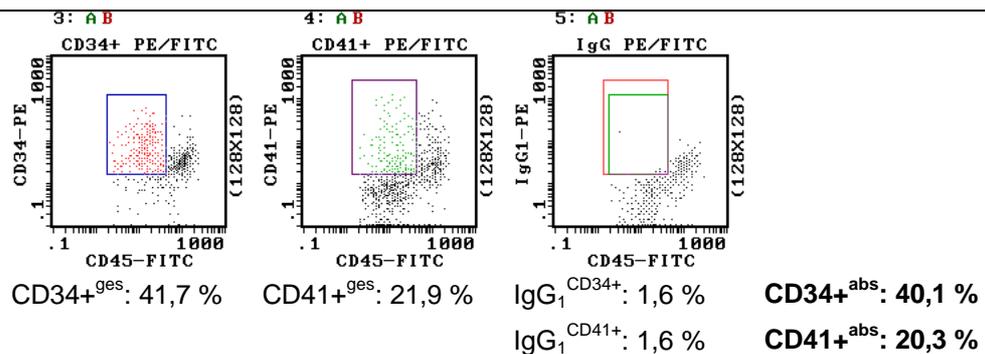
1

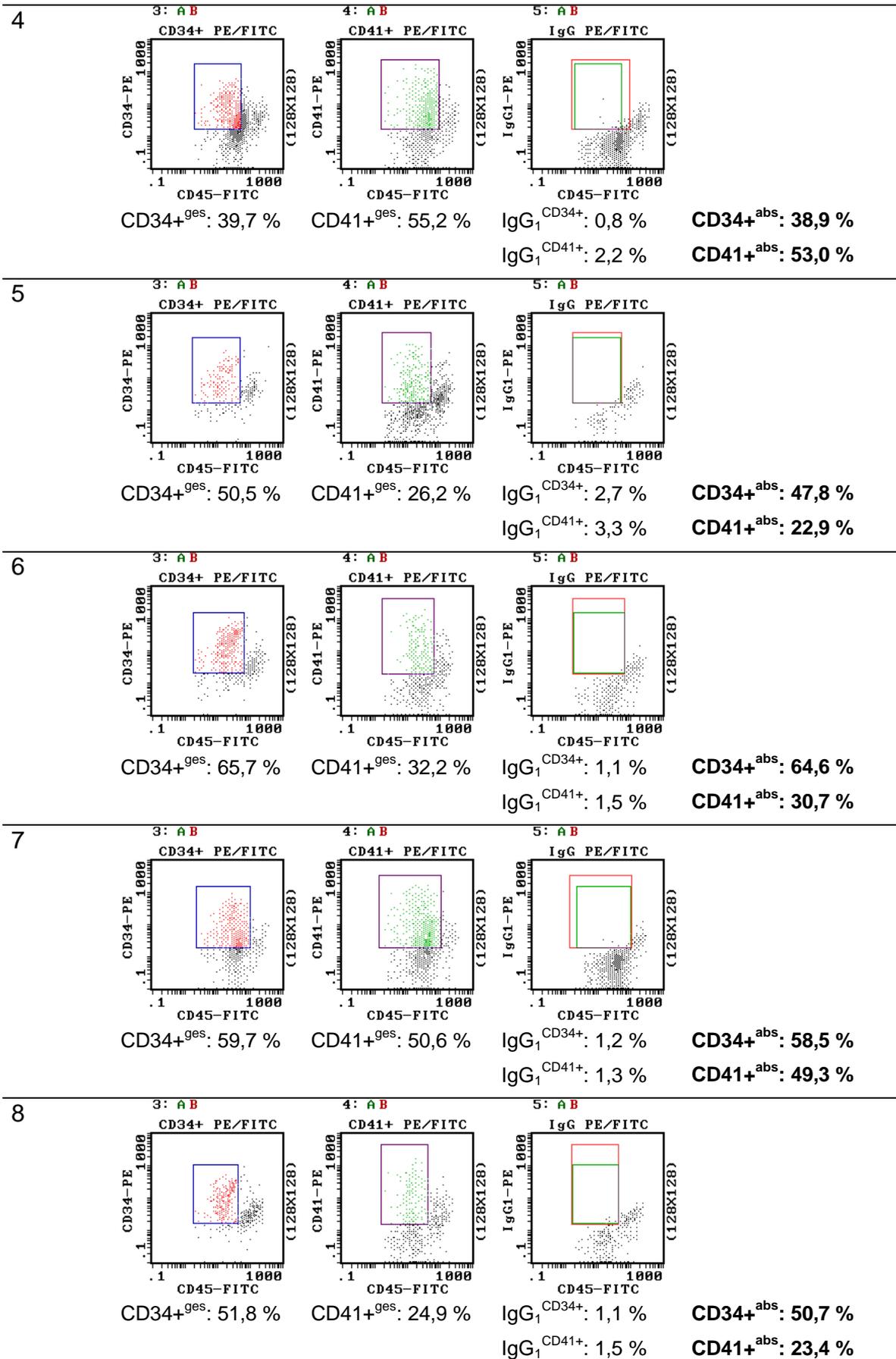


2

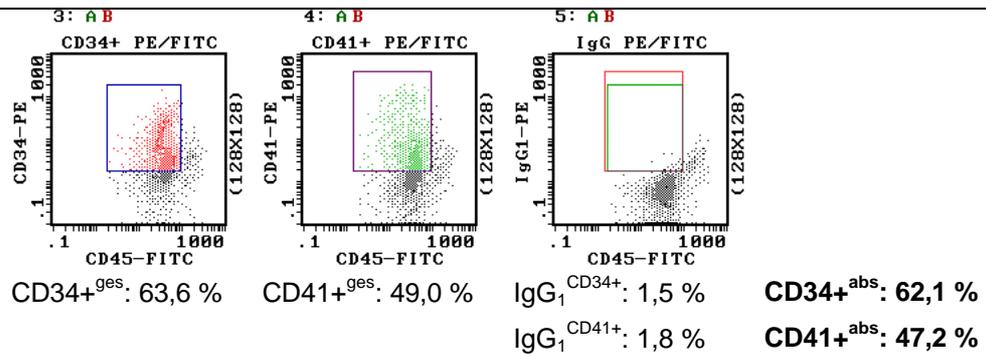


3

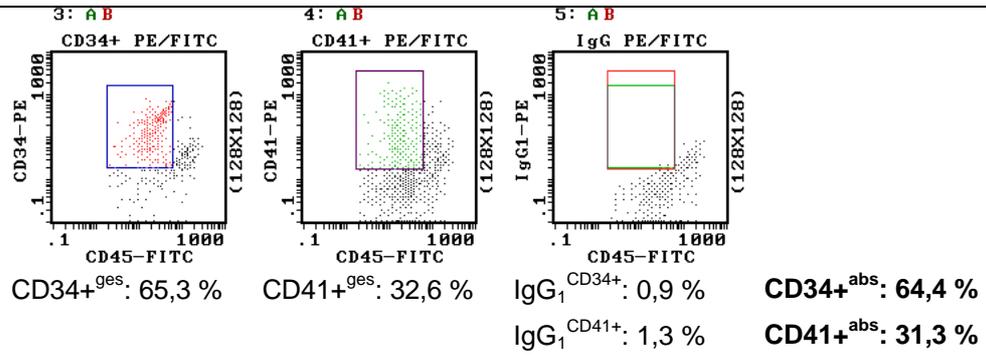




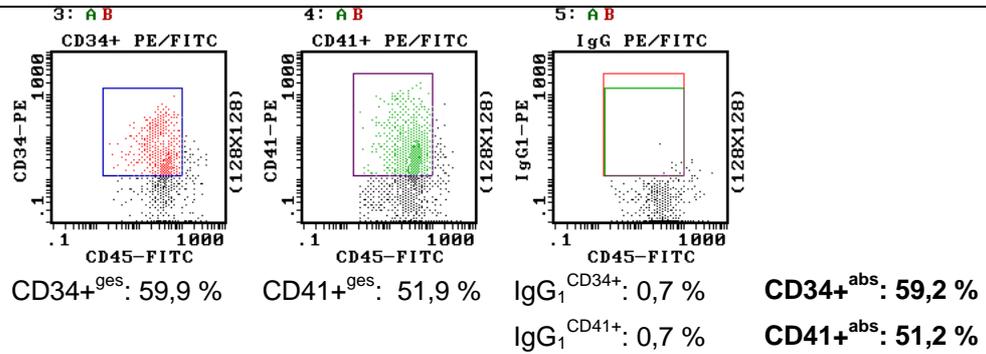
9



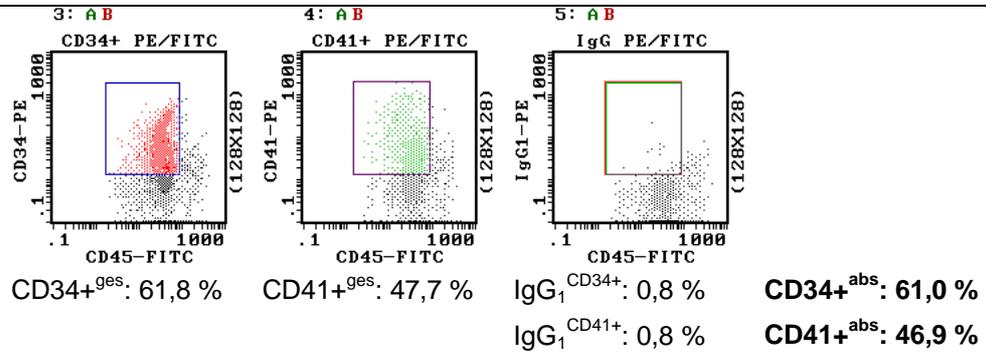
10



11

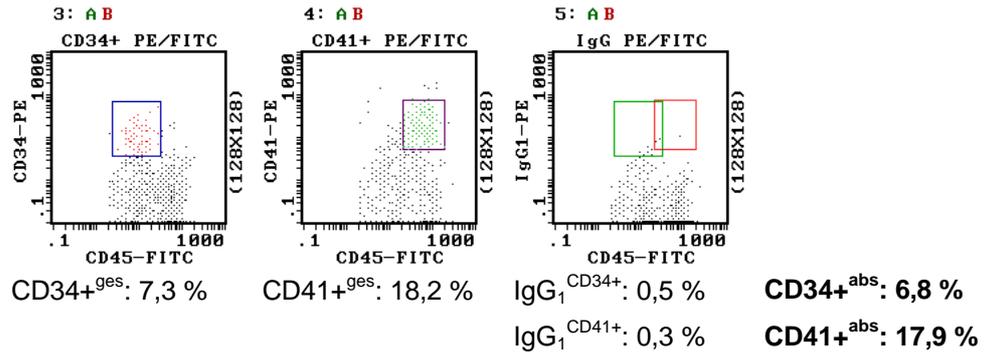


12

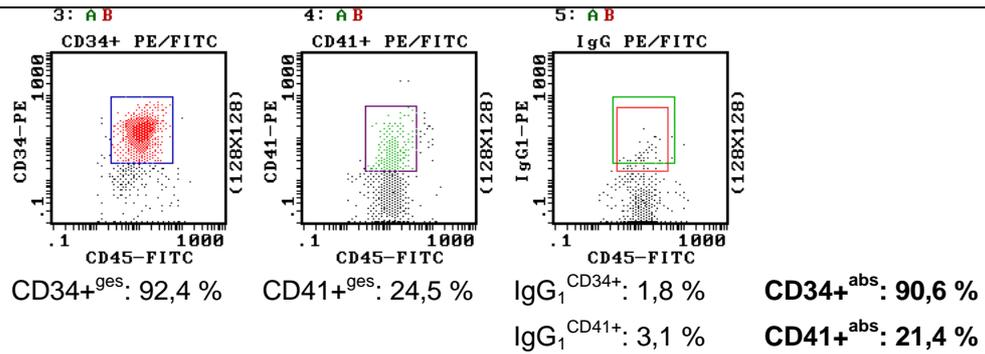


Versuch 6 (LC980130) - Durchflußzytometrische Ergebnisse

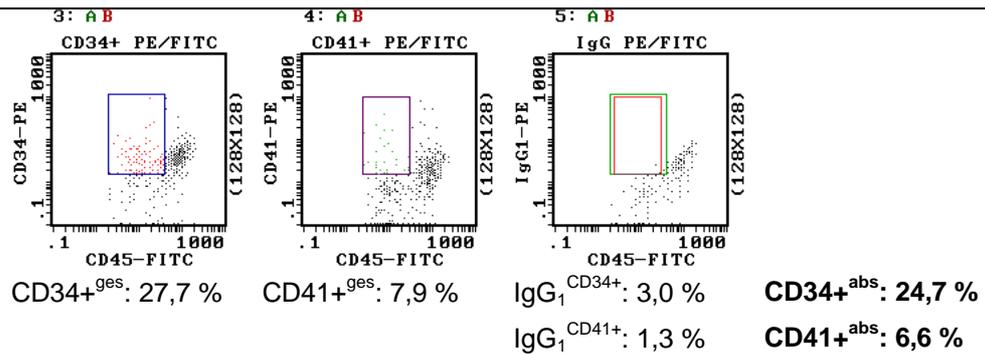
MNC



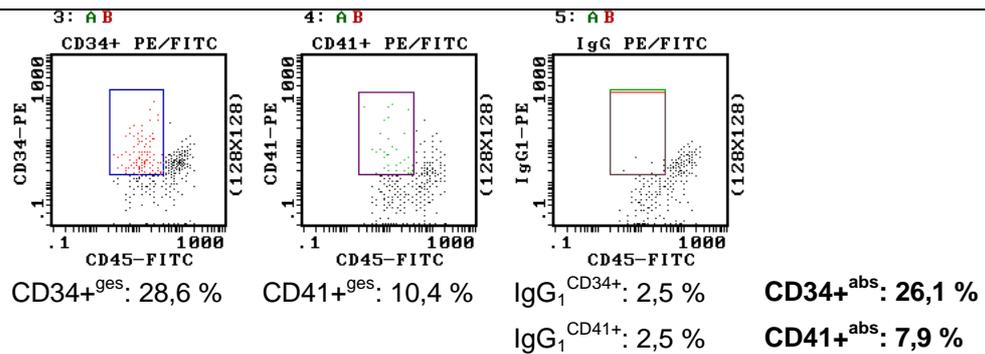
CD34^a



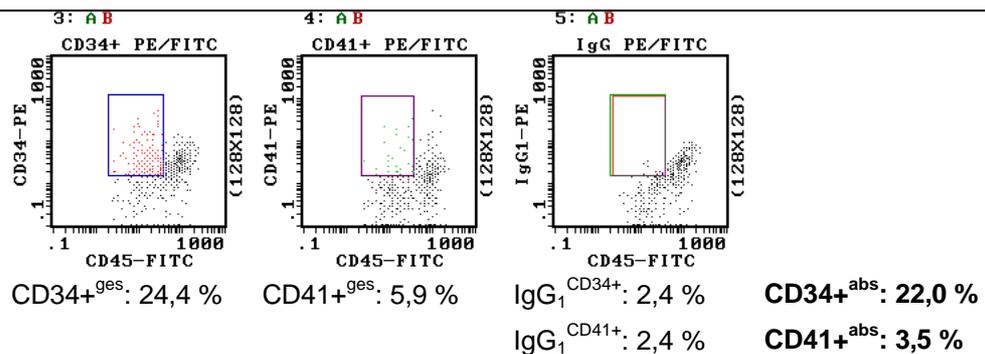
1

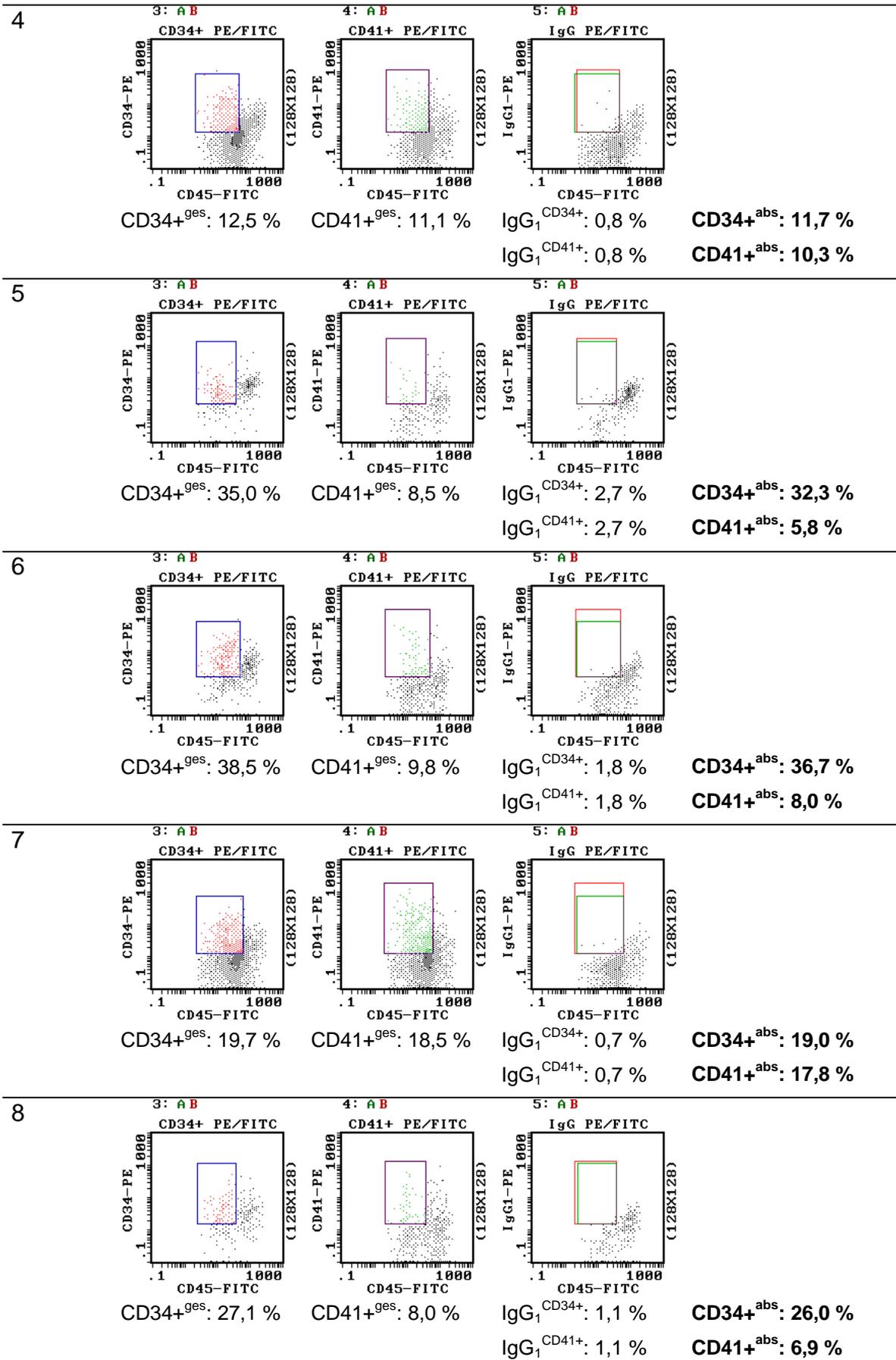


2

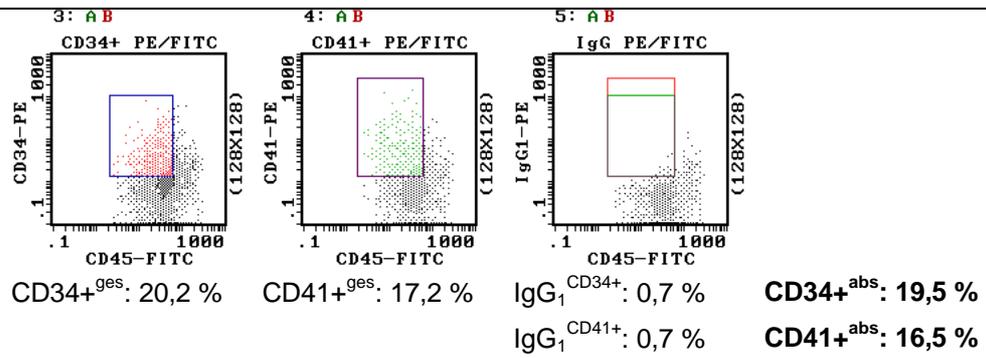


3

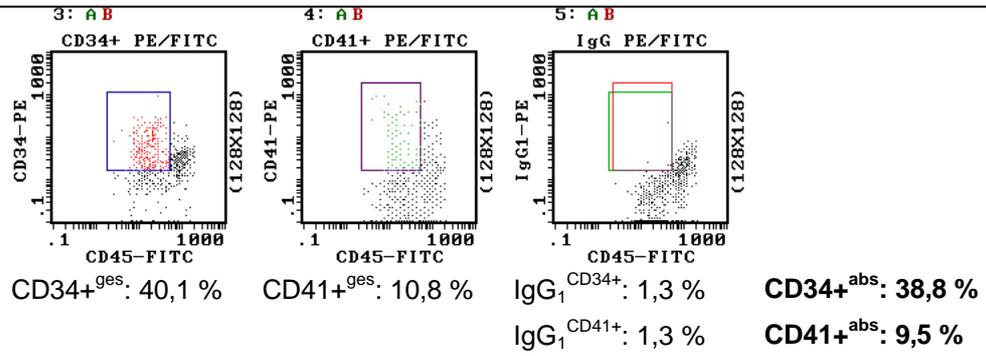




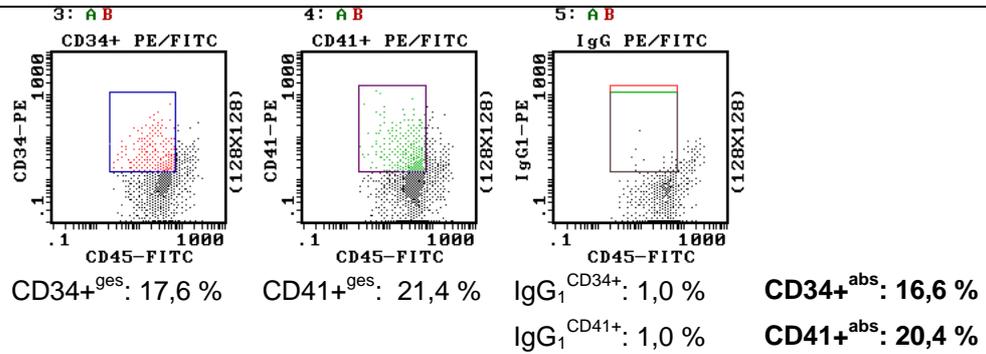
9



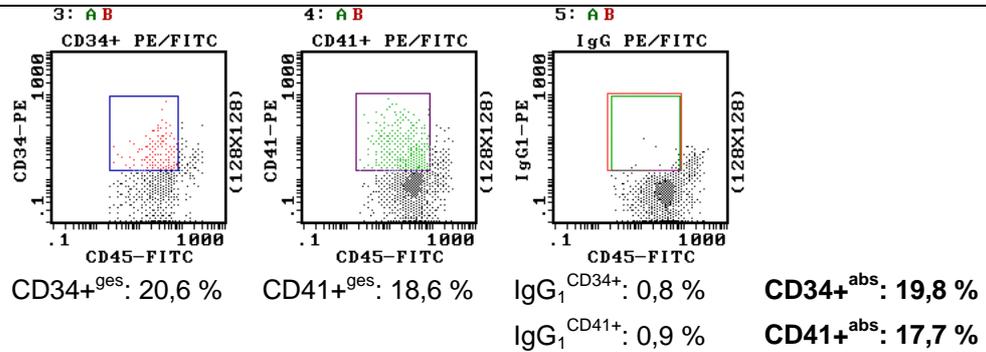
10



11

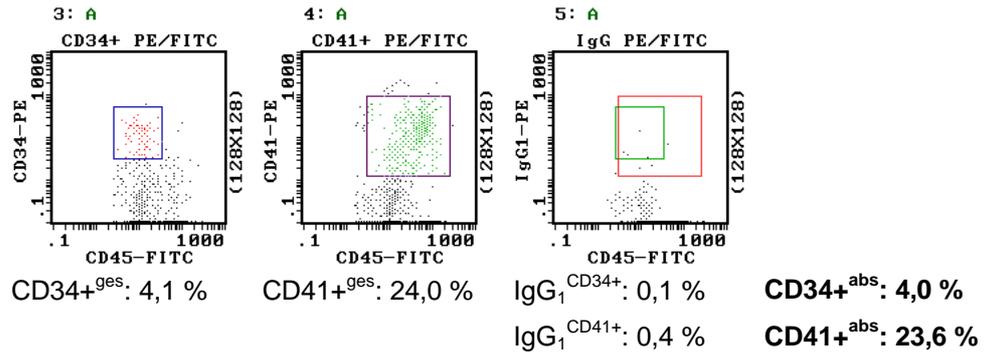


12

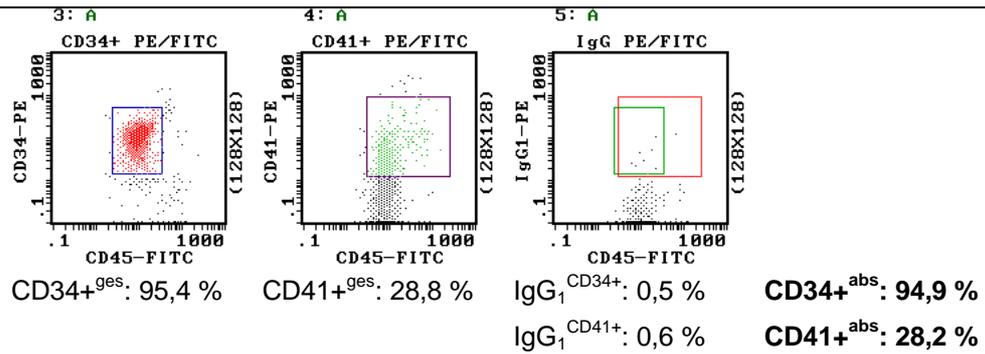


Versuch 7 (LC980213) - Durchflußzytometrische Ergebnisse

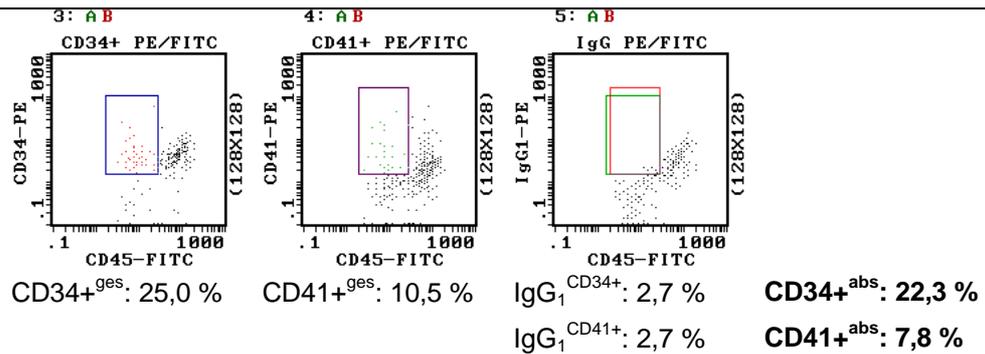
MNC



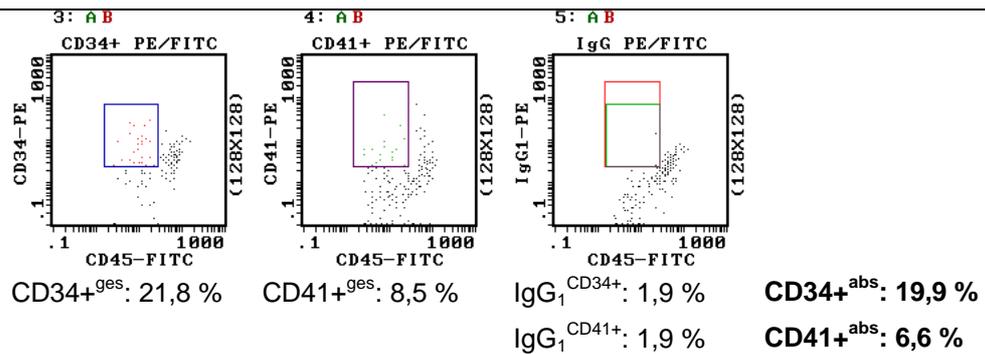
CD34^a



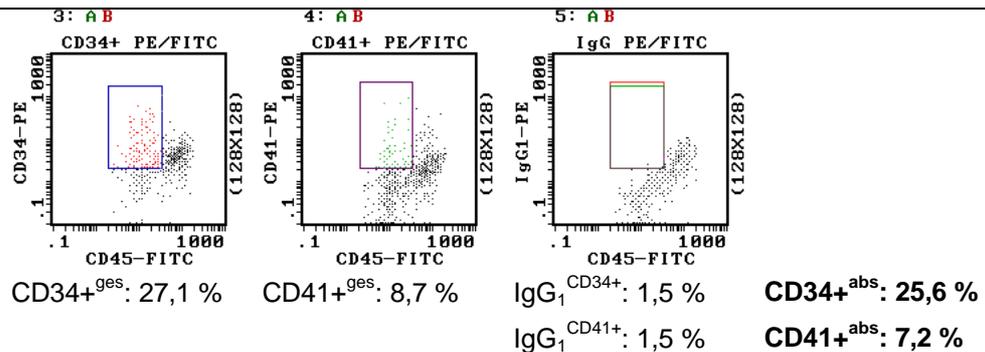
1

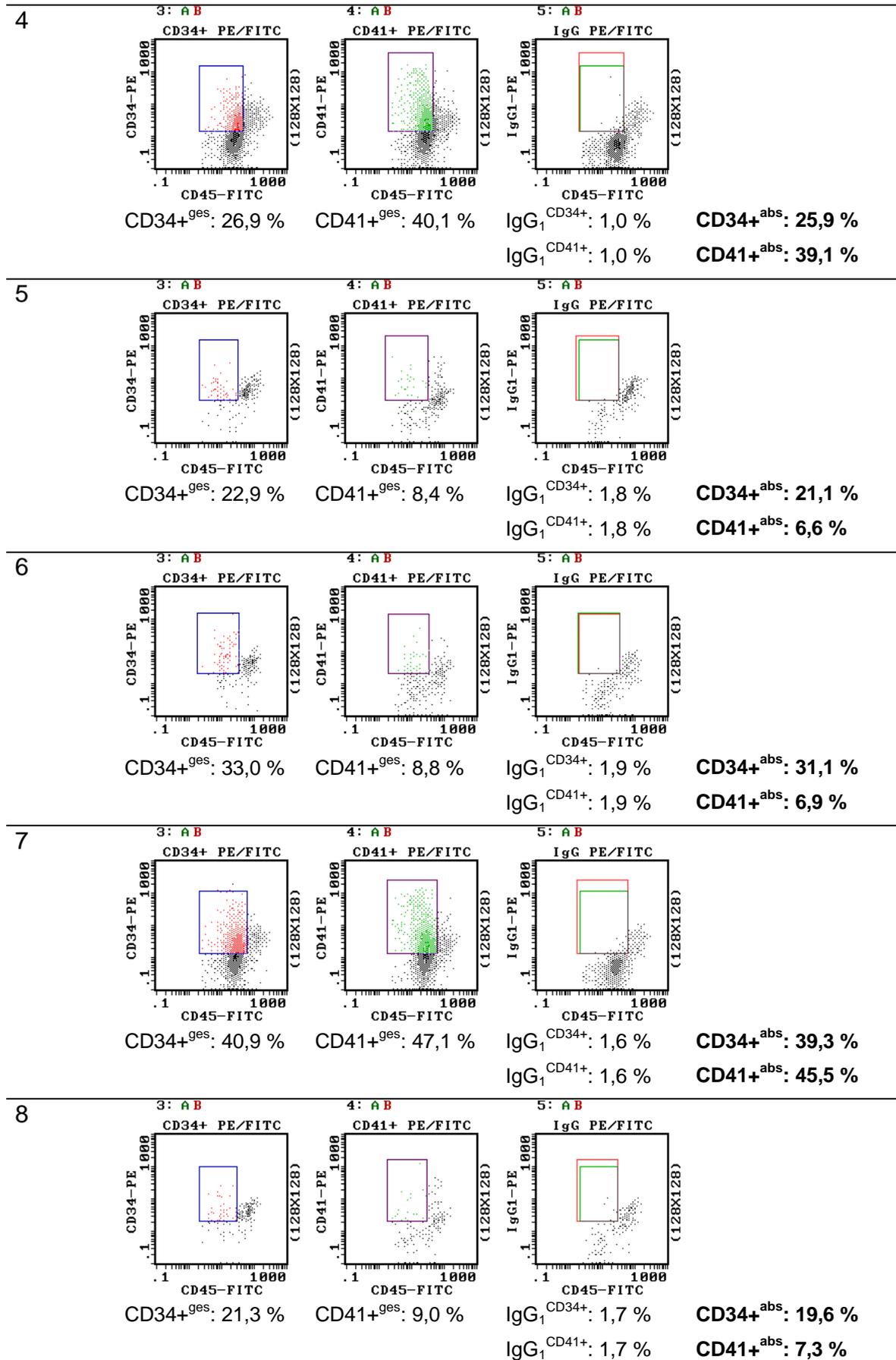


2

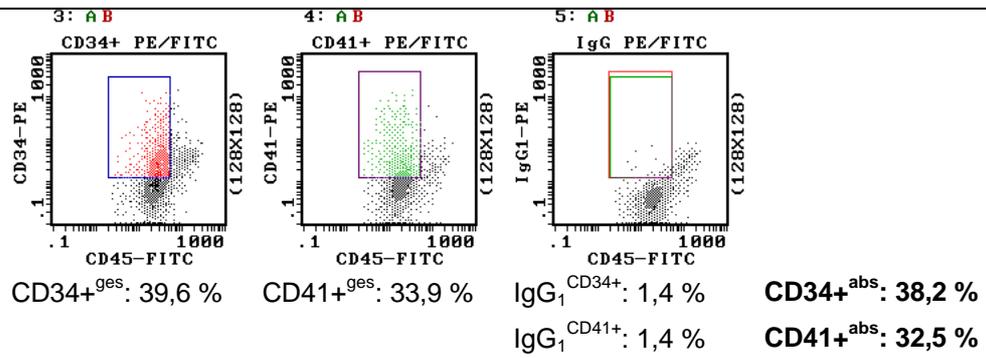


3

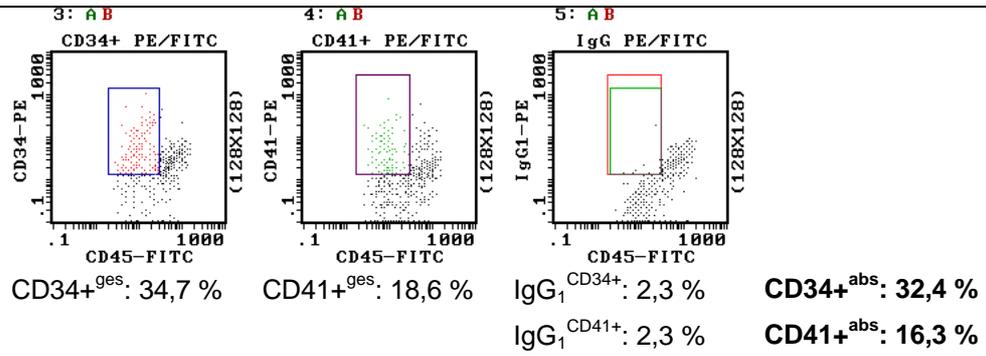




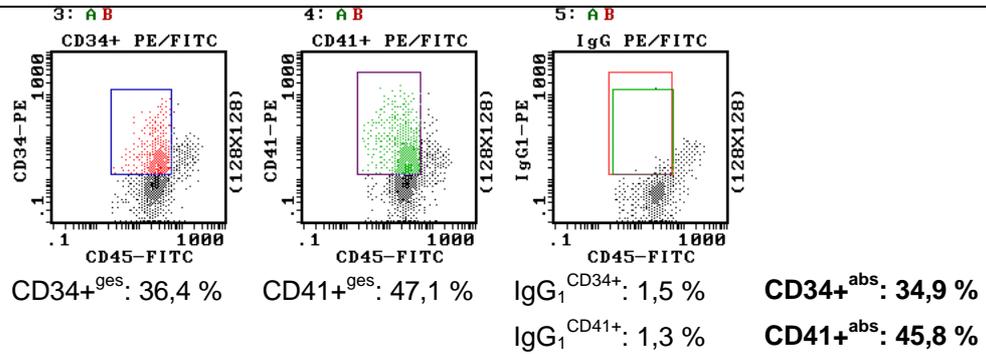
9



10



11



12

