

**Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Holger Kirchner**

**Die Rekonstitution der Hämatopoese und des Immunsystems
nach autologer peripherer Stammzelltransplantation
unter besonderer Berücksichtigung der Megakaryopoese**

Inauguraldissertation

zur

**Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-**

**vorgelegt von
Sara Sheikhzadeh
aus Teheran/Iran
Lübeck 2004**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
1.1 Einführung	5
1.2 Stammzellbiologie	6
1.3 Stammzelltransplantation	8
1.3.1 Hochdosischemotherapie	8
1.3.2 Stammzellmobilisierung	10
1.3.2 Stammzellgewinnung	11
1.3.3 Stammzellweiterverarbeitung und Qualitätskontrollen	11
1.4 Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation	12
1.4.1 B-Zell-Entwicklung	12
1.4.2 T-Zell-Entwicklung	13
1.4.3 NK-Zell-Entwicklung	14
1.5 Hämatopoetische Erholung nach Stammzelltransplantation	14
1.6 Thrombozytopenie nach Stammzelltransplantation	15
1.7 Megakaryopoese	16
1.8 Ex-Vivo-Expansion	18
1.9 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Hämatopoetische Erholung und Immunrekonstitution	20
2.1.1 Patienten	20
2.1.2 Hämatologische Analysen	20
2.1.3 Allgemeine Durchflusszytometrie	22
2.1.4 Immunphänotypisierung	23
2.1.5 Detektion intrazellulärer Zytokine	23
2.1.6 Statistische Analysen	24
2.2 Megakaryopoetische Flüssigkultur	24

2.2.1	Material und CD34-Aufreinigung	24
2.2.2	Ex-Vivo-Expansion	26
2.2.3	Durchflusszytometrische Analysen	27
2.2.4	Ploiditätsmessung	27
2.2.5	Megakaryozyten-Kurzzeitkultur	29
2.2.6	Statistische Analysen	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Hämatopoetische Erholung	30
3.2	Immunrekonstitution	33
3.3	Intrazelluläre Zytokinmessung	35
3.4	Megakaryopoetische Flüssigkultur	37
3.4.1	Oberflächenexpression megakaryozytärer Antigene	39
3.4.2	Megakaryozyten-Kurzzeitkultur	42
3.4.3	Ploidität megakaryozytärer Vorläuferzellen	42
4.	Diskussion	45
4.1	Hämatopoetische Erholung	45
4.2	Immunrekonstitution	47
4.3	Megakaryopoetische Flüssigkultur und Ex-Vivo-Expansion	54
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	65
7.	Danksagung	76
8.	Lebenslauf	77

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
BFU-E	Burst-forming unit-erythrocyte
CD	Cluster of differentiation
CFU-G	Colony-forming unit-granulocyte
CFU-GM	Colony-forming unit-granulocyte/macrophage
CML	Chronische myeloische Leukämie
EDTA	Ethylendiaminetetraacid
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
GP	Glykoprotein
HDC	Hochdosischemotherapie
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IL	Interleukin
IFN	Interferon
KMT	Knochenmarktransplantation
MACS	Magnetic cell sorter
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12Myristat-13Acetat
SCF	Stem cell factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPO	Thrombopoetin

1. Einleitung

1.1 Einführung

Patienten, die an hämatologischen Erkrankungen oder soliden Tumoren leiden, erhalten zum Teil eine Hochdosismotherapie (HDC) und/oder eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung. Bei dieser myeloablativen Therapie werden sowohl das hämatopoetische als auch das lymphatische System stark geschädigt, so dass der Patient durch die daraus resultierende Leuko- und Thrombozytopenie und Anämie stark gefährdet ist. Der Patient kann insbesondere an Blutungen und Infektionen lebensbedrohlich erkranken, soweit die Hämatopoese nicht durch eine Stammzelltransplantation ersetzt wird (Paulin et al. (1987), Sullivan et al. (2001)). Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen hat in den letzten zwei Jahrzehnten die Behandlungsmöglichkeiten schwerer Krankheiten des blutbildenden Systems und onkologischer Erkrankungen erweitert und signifikant verbessert (Thomas (1983), Kessinger et al. (1988), Armitage (1994), Attal et al. (1996), Tyndall und Gratwohl (1997), To et al. (1997)). Bei der Stammzelltransplantation wird grundsätzlich eine autologe von einer allogenen Transplantationsform unterschieden. Das Prinzip der autologen Stammzelltransplantation besteht darin, dass der Patient nach einer myeloablativen Therapie seine eigenen, zuvor gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen zurück erhält. Im autologen Verfahren tritt die periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) an die Stelle der klassischen Knochenmarktransplantation (KMT) (Kessinger et al. (1988), Ottinger et al. (1996), Beelen et al. (1997), Hernandez et al. (1998), Gratwohl et al. (1999)). Dagegen stammen bei der allogenen Transplantation die Zellen von einem möglichst HLA-identischen Familien- oder freiwilligen Fremdspender, um das Risiko einer Abstoßung bzw. Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion zu minimieren. In den Statistiken des „International Bone Marrow Transplant Registry“ wurde die Anzahl der weltweit durchgeführten allogenen Transplantationen am Ende des 20. Jahrhunderts auf siebzehntausend pro Jahr geschätzt, während die der autologen Transplantationen über dreißigtausend betrug (Horowitz (2002)). Die "European Group for Blood and Marrow Transplantation" veröffentlichte ferner, dass bei allogenen Transplantationen nur 30% periphere Blutstammzellen (PBSZ), während bei autologen Transplantationen zu mehr als 90% PBSZ eingesetzt wurden (Abbildung 1). Im Vergleich zu 1991 zeigt die Statistik von 1997 eine Verdoppelung der allogenen und eine Vervierfachung der autologen Transplantationen.

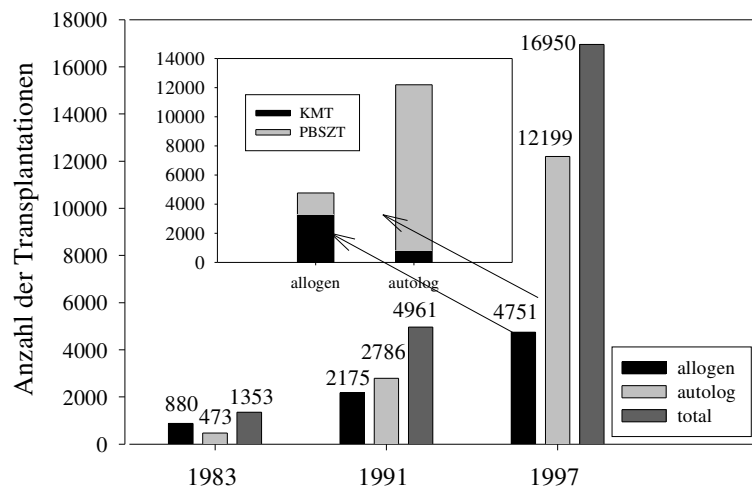


Abbildung 1: Vergleich der jährlichen KMT und PBSZT der "European Group for Blood and Marrow Transplantation" der Jahre 1983, 1991 und 1997 (nach Gratwohl et al. (1999)).

1.2 Stammzellbiologie

Pluripotente Stammzellen besitzen zum einen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und zum anderen die der Differenzierung in Zellen der erythropoetischen, myelomonozytären, megakaryozytären und lymphozytären Reihe (Abbildung 2) (Mauch et al. (1989)).

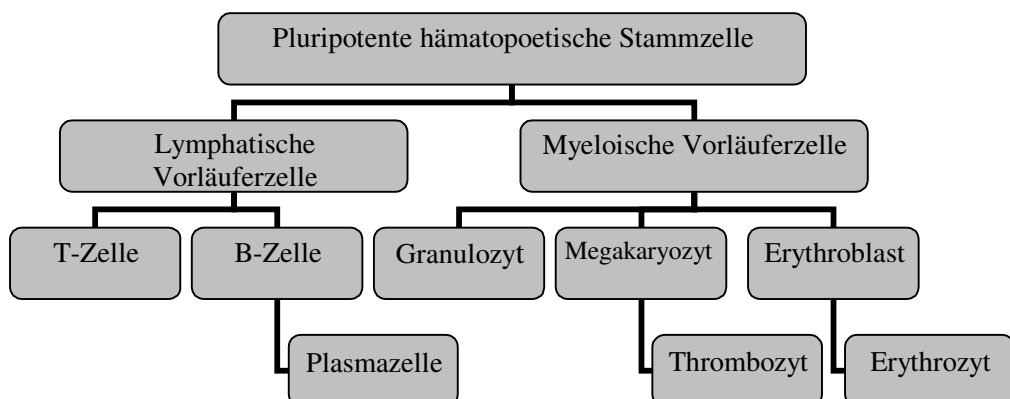


Abbildung 2: Die Stammzellhierarchie. Entwicklung von pluripotenten Stammzellen zu reifen Zellen des peripheren Blutes.

Im Modell wird davon ausgegangen, dass sich pluripotente Stammzellen einer asymmetrischen Zellteilung unterziehen (Abbildung 3). Bei einer solchen Zellteilung erneuert sich die Hälfte der Stammzellen selbst und produziert Tochterzellen, die identisch mit der ursprünglichen pluripotenten Stammzelle sind. Diese bewahren ihre Pluripotenz und treten in den Zellarrest ein. Die andere Hälfte bringt Zellen hervor, die in die weitere Reifung der hämatopoetischen Reihen mit Ausbildung spezifischer Zellfunktionen eingehen. Die asymmetrische Zellteilung ist wahrscheinlich ein genetisch festgelegter Vorgang. Eine Amplifikation pluripotenter Stammzellen ist nicht mehr möglich (Potten und Loeffler (1990), Ogawa (1993)).

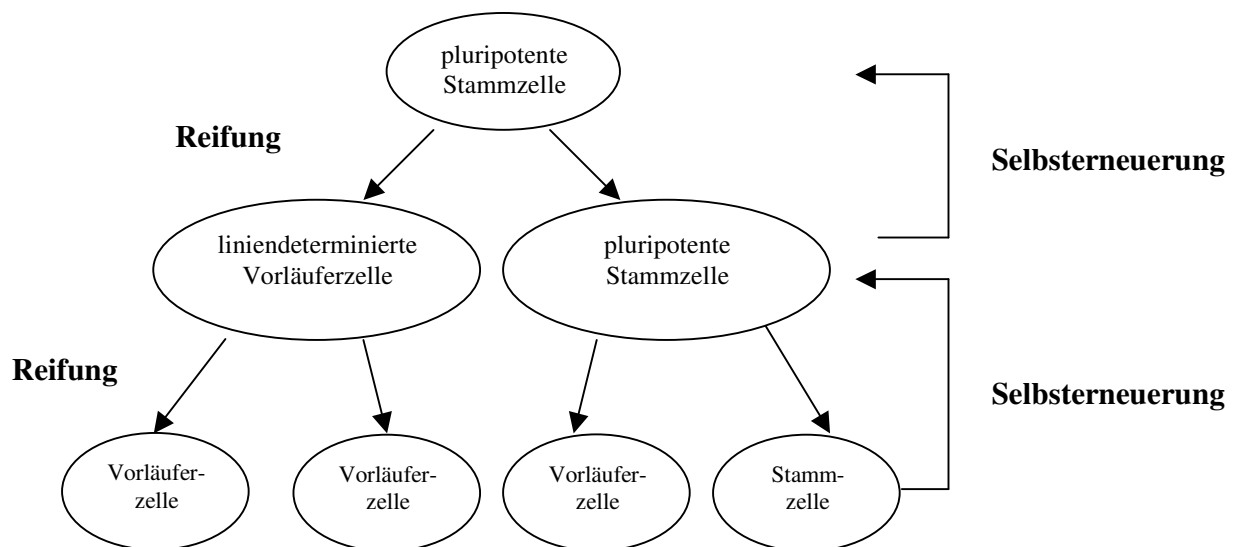


Abbildung 3: Modell der asymmetrischen Zellteilung. Bei einer asymmetrischen Zellteilung ist die Stammzelle sowohl zur Selbsterneuerung des Stammzellpools als auch zur Differenzierung fähig.

Ein Merkmal hämatopoetischer Stammzellen ist die Expression eines bestimmten Oberflächenantigens, des CD34-Antigens (CD = „cluster of differentiation“), dessen Expression mittels monoklonaler Antikörper bestimmt werden kann (Simmons und Torok-Storb (1991), Krause (1996), Serke und Huhn (1996), Sutherland et al. (1996)). Das CD34-Antigen ist ein transmembranes Glykoprotein von 110 kDa, das auch auf Gefäßendothelzellen vorkommt und dessen Funktion nicht sicher geklärt ist (Fina et al. (1990)). Der Anteil CD34+ Zellen im Blut gesunder Individuen beträgt circa 0,1-0,2%. Im Knochenmark beträgt der Anteil der Zellen, die dieses CD34-Antigen tragen, 1-4%. Noch ist kein physiologischer „Faktor“ bekannt, der für die Regulierung der CD34-Expression in Stammzellen

verantwortlich ist. Das Differenzierungspotential der hierarchisch strukturierten hämatopoetischen Vorläuferzellen ist durch die Koexpression unterschiedlicher Oberflächenantigene (z.B. CD33, CD38, CD61, CD90, CD117) gekennzeichnet, während mit zunehmender Reifung das CD34-Antigen verloren geht. Ein weiteres funktionelles Charakteristikum der CD34+ Zellen ist ihre Fähigkeit, in-vitro klonal proliferierende Zellen zu bilden. Myeloische und erythrozytäre Vorläuferzellen zeigen morphologisch unterschiedliche Kolonien von Zellen, die als „colony-forming unit-granulocyte/macrophage“ (CFU-GM) und „burst-forming unit-erythrocyte“ (BFU-E) differenziert werden (Abbildung 4).

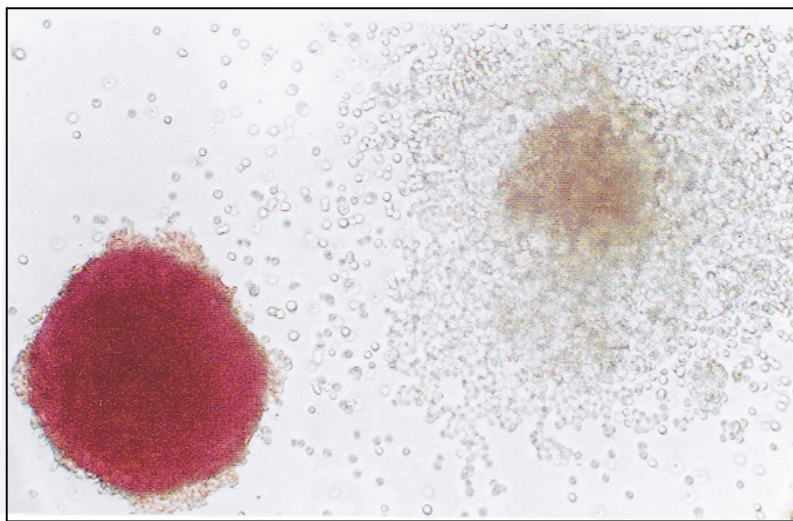


Abbildung 4: Koloniebildung in einer semisoliden Kurzzeitkultur auf Methylzellulosebasis nach zweiwöchiger Inkubation. Die transparenten, heterogen verteilten Zellen gehören zu einer CFU-GM. Die dicht gepackten Hämoglobin-produzierenden Zellen werden einer BFU-E zugeordnet. (Lichtmikroskopie, 40 fache Vergrößerung, Sheikhzadeh et al. (2002)).

1.3 Stammzelltransplantation

1.3.1 Hochdosischemotherapie

In der Tumorthherapie konnten Hinweise für eine Abhängigkeit des Therapieerfolges von der Dosisintensität (verabreichte Dosis eines Zytostatikums in einem bestimmten Zeitraum) gefunden werden. Der Schaden, den das Knochenmark hierbei nimmt, wirkt Dosis limitierend. Bereits konventionelle Zytostatikadosen bewirken eine vorübergehende Suppression der Hämatopoese. Eine moderate Dosissteigerung führt zu einer Wachstumsstörung im Knochenmark mit länger andauernder Agranulozytose, substituionspflichtiger

Thrombozytopenie und Anämie (Frei und Canellos (1980)). Der eigentliche Hochdosisbereich einer Chemotherapie ist dadurch gekennzeichnet, dass eine irreversible Myeloablation erzeugt wird.

Mit Hilfe der Transplantation von Stammzellen nach HDC kann innerhalb von zwei Wochen der Zustand der Agranulozytose und der ausgeprägten Thrombozytopenie im Empfänger überwunden werden. Als klinisch wichtige Kenngrößen, die ein Anwachsen des Stammzelltransplantats erkennen lassen, gelten mehr als 500 neutrophile Granulozyten/ μ l und Thrombozytenzahlen $> 20/nl$ im peripheren Blut des Patienten. Für den Zeitraum der Agranulozytose werden Schutzmassnahmen (z.B. Schleusenzimmer und eine medikamentöse Prophylaxe gegen virale, bakterielle und fungale Infektionen) ergriffen, sowie Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate zur Substitution gegeben (Paulin et al. (1987)).

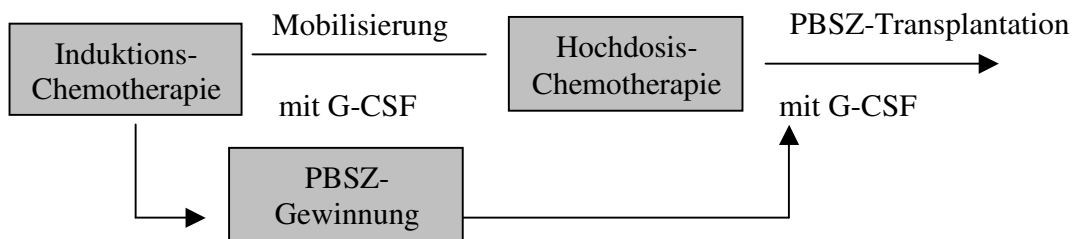


Abbildung 5: Schematische Darstellung der autologen peripheren Stammzelltransplantation. Nach einer zyto reduktiven Induktionschemotherapie und der Applikation von G-CSF werden die mobilisierten peripheren Blutstammzellen gewonnen, weiterverarbeitet, tiefkühl gelagert und nach der HDC dem Patienten transplantiert.

Vor Durchführung einer HDC muss die Tumorlast durch geeignete Chemotherapieprotokolle gesenkt werden. Die Stammzellgewinnung erfolgt meist nach mehreren Chemotherapiezyklen und möglichst in einem Zustand der Vollremission, da zu Therapiebeginn eine hohe Tumorzellkontamination des autologen Stammzellapheresates zu befürchten ist. Die Indikationen der HDC mit anschließender autologer Stammzelltransplantation sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Erkrankung	Stadium/Risiko	Stellenwert HDC	Alternativen
Akute myeloische Leukämie	1.Vollremission (Standardrisiko)	Standard	HLA-identische Geschwister- Transplantation
Akute myeloische Leukämie	1.Vollremission (Hochrisiko)	Standard	HLA-identische oder partiell identische Geschwister-Transplantation
Akute lymphatische Leukämie	1.Vollremission (Hochrisiko), 2.Vollremission	Standard	HLA-identische oder partiell identische Geschwister-Transplantation
Morbus Hodgkin	Therapieversager Rezidive (nicht Spätrezidive)	Standard	Konventionelle Chemotherapie, HLA-identische Geschwister-Transplantation
Hochmaligne Lymphome	Hochrisiko, Therapieversager Rezidive	Standard	Konventionelle Chemotherapie, HLA-identische Geschwister-Transplantation
Niedrigmaligne Lymphome	Fortgeschrittene Stadien, junges Patientenalter	Standard	Konventionelle Chemotherapie
Plasmozytom	Fortgeschrittene Stadien	Standard	Konventionelle Chemotherapie
Ovarialkarzinom	Fortgeschrittene Stadien	Offen	Konventionelle Chemotherapie
Keimzelltumor, nicht seminomatös	Therapieversager Rezidive	Standard	Konventionelle Chemotherapie

Tabelle 1: Indikationen zur Hochdosischemotherapie mit autologer peripherer Stammzelltransplantation (nach Wagner et al. (1999)).

1.3.2 Stammzellmobilisierung

Seit Entdeckung hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, wie z.B. G-CSF (Neupogen®) und GM-CSF, kann man die Proliferation und Mobilisierung CD34+ Stammzellen steigern. Unter Mobilisierung wird die Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation durch transendotheliale Migration verstanden. Die genauen biologischen Mechanismen dieses Vorgangs sind noch nicht vollständig verstanden (Kronenwett et al. (2000)). Die Mobilisierung der CD34+ Zellen mittels G-CSF zeigt eine dosisabhängige Wirkung (Hoglund et al. (1996)). Trotz einer Altersabhängigkeit und

interindividuellen Variabilität ist bei gesunden Individuen nach einer mehrtägigen Gabe ein bis zu hundertfacher Anstieg an CD34+ Zellen im peripheren Blut zu beobachten (Teshima et al. (1992)). Bei Patienten mit onkologischen und hämatologischen Grunderkrankungen ist der Mobilisationserfolg abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung und der vorangegangenen Chemo- und/oder Bestrahlungstherapie. Unter Verwendung von Chemotherapien und deren Kombination mit rekombinanten Wachstumsfaktoren kommt es durch die Synchronisation der Zellteilung in Verbindung mit einem starken Proliferationsreiz zu einer vermehrten Stammzellmobilisation (Richman et al. (1976), Socinski et al. (1988)).

1.3.3 Stammzellgewinnung

Nach Durchschreiten des Leukozytennadirs (>1000 Leukozyten/ μl) oder einem Nachweis von mindestens 10 CD34+ Zellen/ μl können hämatopoetische Stammzellen im peripheren Blut über eine Zytapherese gewonnen werden (Richman et al. (1976), Lasky et al. (1982), Schlenke (1999)). Hierbei werden Zellseparatoren eingesetzt, die auf dem Prinzip der Auftrennung von Vollblut in Bestandteile unterschiedlicher Dichte durch Zentrifugation beruhen. Die hämatopoetischen Stammzellen werden innerhalb der mononukleären Zellfraktion gesammelt, während die anderen Blutbestandteile dem Patienten zurückgegeben werden. Für ein sicheres Anwachsen der Hämatopoese bei einer autologen PBSZT wird nach heutigen Kenntnissen ein Minimum von $2,0 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht benötigt und ein Optimum von $4,0 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg Körpergewicht angestrebt (Schulman et al. (1999)).

1.3.4 Stammzellweiterverarbeitung und Qualitätskontrollen

Die Stammzellen werden zur weiteren Verwendung in Stickstoff gelagert. Hierbei wird eine sichere Aufrechterhaltung der Zellvitalität und Zellfunktion angestrebt. Zur Sicherstellung eines Transplantationserfolges im Empfängerorganismus werden Stammzelltransplantationen einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die präzise Quantifizierung von CD34 exprimierenden Stamm- und Vorläuferzellen erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Zusätzlich haben sich Kurzzeitkultursysteme bewährt, die die Fähigkeit hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen zur Koloniebildung untersuchen. Die Zellen wachsen in semisoliden Kulturmedien auf Methylzellulosebasis mit definierten Wachstumsfaktoren und werden nach einem Zeitraum von 14 Tagen Inkubation mikroskopisch ausgewertet. Der relative Anteil der Kolonie bildenden Vorläuferzellen, insbesondere der CFU-GM, kann mit der Konzentration

der CD34+ Stammzellen und der Qualität der hämatopoetischen Rekonstitution korreliert werden (Bender et al. (1992)). Diese Funktionsteste können somit als indirektes Maß (Surrogatmarker) für das hämatopoetische Proliferations- und Differenzierungspotential eines Transplantates angesehen werden.

1.4 Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation

Den Reifungsprozess von transplantierten hämatopoetischen Stammzellen und liniendeterminierten Vorläuferzellen zu Zellen der unspezifischen und spezifischen Abwehr bezeichnet man als Immunrekonstitution. Hierbei muss zwischen den einzelnen Populationen immunkompetenter Zellen differenziert werden. Denn B-, T- und NK-Zellen zeigen aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft und Entwicklungswege nicht die gleiche Rekonstitutionskinetik.

1.4.1 B-Zell-Entwicklung

B-Zellen wachsen im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen heran und benötigen Lymphfollikel, um als reife B-Lymphozyten zu überleben. Zur Bereitstellung eines breiten Spektrums von Antigenrezeptoren durchlaufen sie während der Differenzierung eine Serie von Schritten, die durch eine sequentielle Immunglobulin-Segmentumordnung gekennzeichnet ist (Abbildung 6).

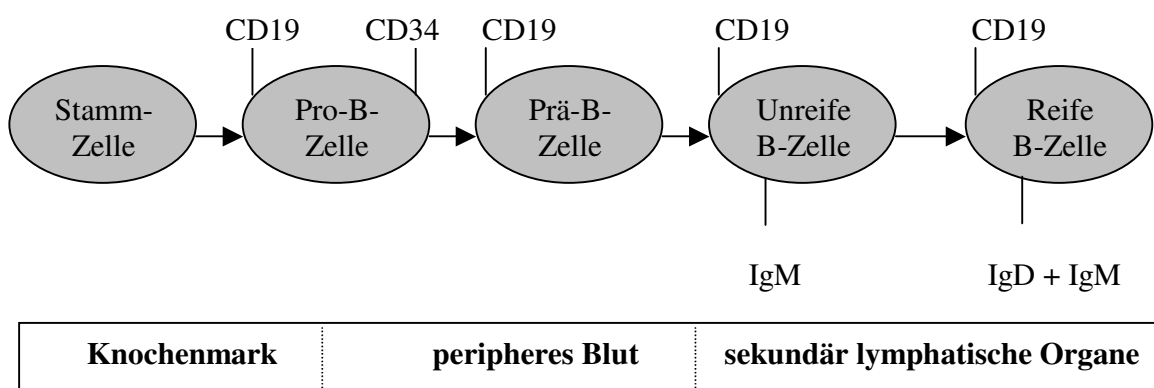


Abbildung 6: Schema der B-Zell-Entwicklung. Die B-Zelle entwickelt sich von pluripotenten Stammzellen zu B-Vorläuferzellen, um dann als reife B-Zelle IgM und IgD auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (modifiziert nach Janeway und Travers, 1997).

Das Repertoire der B-Zellen, die in den Pool langlebiger reifer B-Zellen eingehen, stellt das Ausgangsmaterial für die klonale Selektion der Immunantwort dar. Reife B-Zellen, die IgM und IgD auf ihrer Oberfläche koexprimieren, zirkulieren durch lymphatische Organe bis sie ihrem spezifischen Antigen begegnen. Nach der Interaktion mit einem Antigen und einer T-Helferzelle teilt sich die B-Zelle. Sie differenziert sich entweder weiter zur Plasmazelle, die große Antikörpermengen freisetzt, oder zur langlebigen Gedächtniszelle (Janeway und Travers, Immunologie (2.Aufl.), Pedrazzini et al. (1989), Small et al. (1990), Schlenke et al. (2001)).

1.4.2 T-Zell-Entwicklung

T-Vorläuferzellen wandern, nachdem sie das Knochenmark verlassen haben, in den Thymus. Hier durchlaufen sie eine Reihe von Reifungsstadien. Wenn naive T-Zellen ein spezifisches Antigen auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle antreffen, wird eine MHC („major-histocompatibility-complex“) vermittelte Immunantwort ausgelöst.

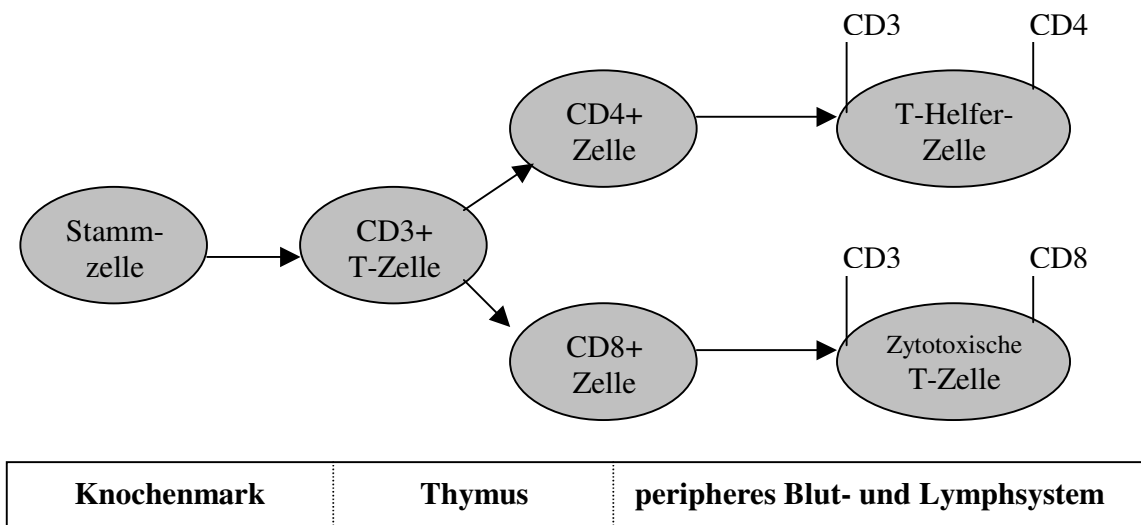


Abbildung 7: Schema der T-Zell-Entwicklung. Die T-Zellen entwickeln sich von der pluripotenten Stammzelle zur CD3+ T-Zelle, die dann entweder als CD4+ T-Zelle zur Helferzelle oder als CD8+ Zelle als zytotoxische Zelle heranreift (modifiziert nach Janeway und Travers, 1997).

1.4.3 NK-Zell-Entwicklung

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sind Zellen mit zellulären Granula, die einen kleinen Teil der peripheren lymphatischen Blutzellen ausmachen. Sie wurden aufgrund ihrer Fähigkeit entdeckt, ohne vorangegangene Immunisierung oder Aktivierung bestimmte lymphatische Tumorzelllinien in-vitro abzutöten. Bei der Immunabwehr erfüllen sie darüber hinaus ihre Abwehrfunktion in der frühen Phase einer Infektion durch intrazelluläre Krankheitserreger (Aglietta et al. (1998)). Sie können unter anderem durch das Fehlen von CD3 und mittels der Differenzierungsmarker CD16 und CD56 charakterisiert werden (Abbildung 8).

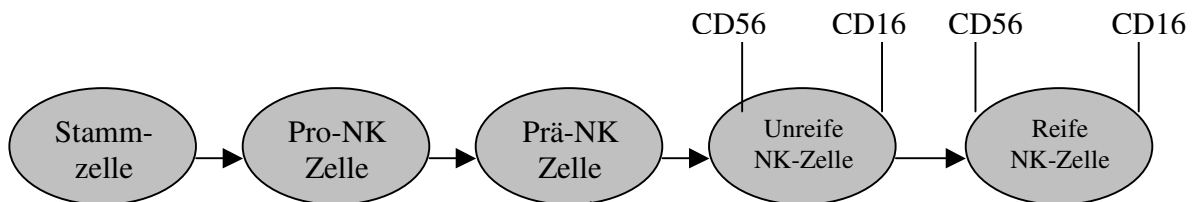


Abbildung 8: Schema der NK-Zell-Entwicklung. Die pluripotente Stammzelle entwickelt sich über die Zwischenschritte der Pro- und Prä-NK-Zelle von der unreifen zur reifen Zelle (modifiziert nach Janeway und Travers, 1997).

1.5 Hämatopoetische Erholung nach Stammzelltransplantation

Unter Hämatopoese wird das fein ausbalancierte System der Blutzellbildung verstanden, die durch gleichmäßige Produktion reifer Blutzellen und deren Abbau charakterisiert ist. Die Erholungsphase der Hämatopoese nach einer Stammzelltransplantation wird häufig als hämatopoetische „recovery“ bezeichnet. Die hämatopoetische Erholung basiert auf einem komplexen Zusammenspiel der transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen, der Knochenmarkstromazellen und der von diesen produzierten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Darüber hinaus sind die zugrunde liegende Erkrankung, insbesondere eine Knochenmarkbeteiligung und die Intensität der vorangegangenen Chemotherapie wichtige Einflussgrößen.

Damit Stammzellen das hämatopoetische System erneuern können, müssen sie mit Hilfe von molekularen Erkennungssystemen, wie zum Beispiel der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen in das Knochenmark-Kompartiment

zurückfinden. Die Ansiedlung von zirkulierenden Stammzellen im Knochenmark wird als „homing“ bezeichnet (Gordon und Greaves (1989)). Die im Transplantat enthaltenen Vorläuferzellen sind in der Lage, eine schnelle, jedoch kurz anhaltende Erholung der Hämatopoese im Empfänger zu sichern (Bender et al. (1992)). Im Transplantat existieren darüber hinaus pluripotente Stammzellen mit Langzeithämatopoesepotential, die eine permanente und vollständige Nachbildung aller Blutzellreihen gewährleisten sollen.

1.6 Thrombozytopenie nach Stammzelltransplantation

Nach einer HDC mit anschließender autologer PBSZT kommt es häufig zu einer verzögerten Erholung der Hämatopoese. Zu 10-15% ist insbesondere eine ausgeprägte und lang andauernde Thrombozytopenie zu beobachten (First et al. (1985), Hermouet et al. (1997)). Zur Vermeidung von Blutungskomplikationen (z.B. gastrointestinale oder zerebrale Blutung), werden Patienten regelmäßig zur Blutbildkontrolle einbestellt und nötigenfalls die Thrombozyten prophylaktisch substituiert. Neben Restrisiken (wie z.B. die der Kontamination und Transmission viraler und bakterieller Erreger) können im weiteren Behandlungsverlauf transfusionsassoziierte Nebenwirkungen wie z.B. Allo-Antikörper-Bildung mit Thrombozytenrefraktärität oder die sehr seltene, jedoch besonders gefürchtete Spender-gegen-Wirt-Reaktion im Empfänger auftreten.

Um einer verzögerten Thrombopoese nach Transplantation entgegenzuwirken oder die Zeit einer schweren Thrombozytopenie mit Substitutionspflicht zu verkürzen, ist man auf der Suche nach alternativen Transplantationsmodellen, die die klassische Thrombozyten-Substitution überflüssig macht. Eine Erfolg versprechende Möglichkeit könnte die Gabe von Megakaryopoese-induzierenden Zytokinen sein, die nach HDC die Megakaryopoese direkt in-vivo beschleunigen soll. Hierbei stehen besonders IL-11 und Thrombopoietin (TPO) zur Diskussion (Molineux et al. (1996), Tepler et al. (1996)). Erste klinische Studien zeigen jedoch keine signifikante Verkürzung der Thrombozytopenie-Phase.

Eine andere Strategie beruht darauf, patienteneigene, ex-vivo zu megakaryozytären Vorläufern expandierte Stammzellen zusammen mit dem Stammzellprodukt zu transplantieren. Die Kotransplantation von megakaryozytären Vorläufern könnte bei schneller Ausreifung in-vivo den Schweregrad und die Dauer der Thrombozytopenie minimieren (Drayer et al. (2002)).

1.7 Megakaryopoese

Die Megakaryopoese ist ein mehrstufiger Entwicklungsprozess. Die pluripotente hämatopoetische Stammzelle differenziert zur megakaryozytären Vorläuferzelle, die eine hohe Proliferationskapazität besitzt und zur Koloniebildung (CFU-MK) befähigt ist. Im Anschluss erfolgt die Entwicklung zum Promegakaryoblasten. Der weitere Reifungsprozess führt über den Megakaryoblasten zum postmitotischen Megakaryozyten (Abbildung 10). Die Megakaryozyten verlieren im Laufe ihrer Entwicklung ihr Proliferationspotential und beschränken sich auf die Ausdifferenzierung. Dabei vermag sich ihr Kern zu teilen, ohne dass eine Zellteilung stattfindet. Dieser Vorgang wird als Endomitose oder Endoreduplikation bezeichnet (Abbildung 9). Als Konsequenz beobachtet man eine Erhöhung der DNA-Ploidität von bis zu 64N. Mit Ploidität beschreibt man die Anzahl der Chromosomensätze innerhalb des Zellkerns, die einfach oder ganzzahlig mehrfach sein können

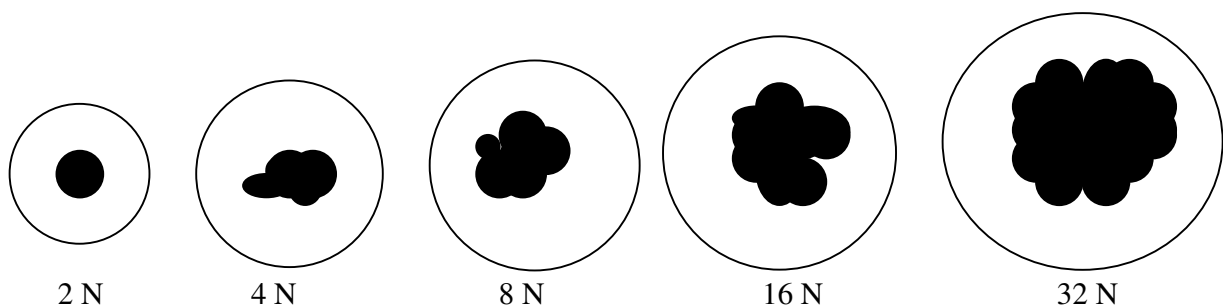


Abbildung 9: Schema der Endoreduplikation (N = Anzahl der Chromosomensätze oder „Ploidität“).

Polypleide Zellen der megakaryozytären Reihe sind in der Lage, Demarkationsmembranen zu bilden und Thrombozyten abzuschneiden. Die zytoplasmatische Reifung findet durch Synthese von spezifischen Proteinen (Plättchenfaktor-4 (PF- 4) und dem Glykoprotein IIb (GP IIb)) als auch durch die Entwicklung von Organellen statt. Die gesamte Megakaryopoese wird durch ein kompliziertes, ineinander übergreifendes Netzwerk von Signalen unter der Beteiligung von Zytokinen, zellständigen Rezeptoren, extrazellulären Matrixproteinen oder durch die Transkriptionsaktivierung von Megakaryozyten-spezifischen Genen reguliert. Insbesondere Zytokine steuern sowohl die Proliferation der megakaryozytären Vorläufer als auch den Reifungsprozess. Interleukin 3 (IL-3) und der Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF) agieren in-vitro besonders in der frühen Phase der

Megakaryozyten-Entwicklung als starke Proliferationsstimulatoren. Dagegen sind Zytokine, wie z.B. IL-6 und IL-11 insbesondere an der Ausreifung und der Polyploidität beteiligt (Tabelle 2).

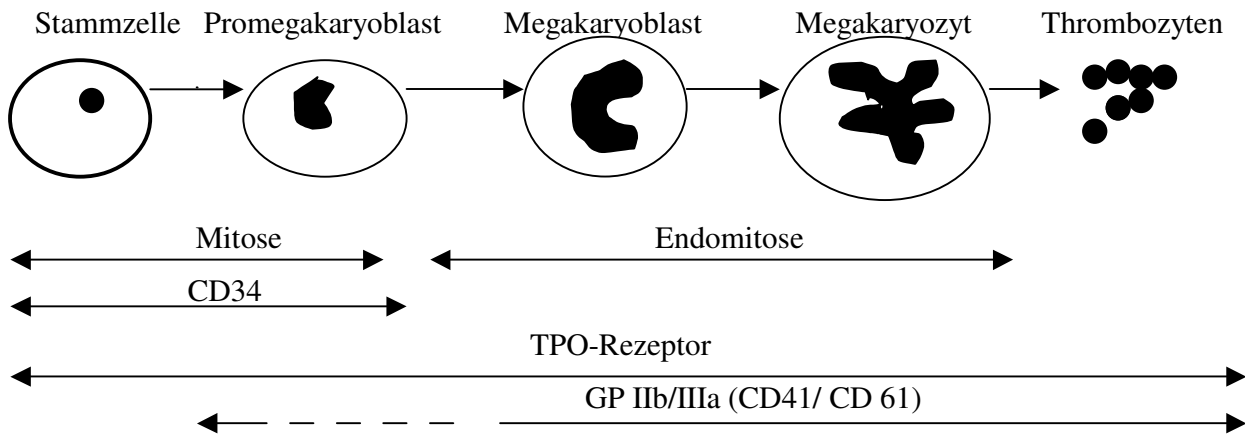


Abbildung 10: Die Phasen der Megakaryopoese. Die Stammzelle differenziert über Zwischenschritte zum reifen Megakaryozyten, um anschließend Thrombozyten abzuschneiden.

Die ersten experimentellen megakaryopoetischen Ex-Vivo-Expansionen, bei denen Megakaryozyten außerhalb eines lebenden Organismus gezüchtet und vermehrt werden konnten, fanden 1994 durch die Entdeckung von Thrombopoetin (TPO) statt. Zu diesem Zeitpunkt isolierten voneinander unabhängige Forschungsgruppen (u.a. Kaushansky et al. (1994), de Sauvage et al. (1994)) die Struktur des Megakaryopoese-typischen Wachstumsfaktors, damals auch „megakaryocytic growth and development factor“ (MGDF) genannt. In nahezu jedem Schritt der Entwicklung nimmt das TPO eine Schlüsselrolle ein. Sowohl die initiale Proliferation als auch die terminale Reifung und Endomitose werden von TPO beeinflusst und gesteuert (Kaushansky (1995)). Hämatopoetische Vorläuferzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten exprimieren den TPO-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Die Megakaryozyten und ihre Vorläufer können mittels Oberflächenproteine identifiziert werden. Sie bilden Antigene auf ihrer Oberfläche, wie z.B. CD41, CD42 und CD61. CD41 und CD61 bilden beide einen Teil des GP IIb/IIIa auf megakaryozytären Zellen. Dieses Protein ist ein Rezeptor für Fibrinogen, Fibronectin und für den von-Willebrand-Faktor, sowie ein Mediator

der Thrombozytenadhäsion und –aggregation. Der Oberflächenmarker CD42 existiert als Teil eines anderen Rezeptors auf der Megakaryozytenoberfläche und kann in CD42a und CD42b unterteilt werden. Das CD42a ist ein einzelkettiges Membran-Glykoprotein, bekannt auch unter der Bezeichnung GP IX, dessen Expression von TPO induziert wird. Es bildet einen nicht-kovalenten Komplex mit anderen Glykoproteinen. Das CD42b, der von-Willebrand-Faktor-Oberflächenrezeptor, ist für die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel von verletzten Blutgefäßen verantwortlich.

Zytokin	Funktion in der Megakaryopoese
IL-6	Kern- und Zytoplasmareifung, Einfluss auf Anzahl, Größe und Ploidität
IL-3	Megakaryozytenproliferation, kein Einfluss auf die Reifung
IL-11	Terminale Differenzierung, Einfluss auf Größe und Ploidität
IL-1 β	Proliferation, Einfluss auf die Bildung von IL-6
SCF	Proliferation, mit anderen Zytokinen synergistisch, Koloniebildung
TPO	Unabhängig vom Effekt anderer Zytokine, wirkt auf allen Ebenen der Megakaryopoese, bei Proliferation, Endomitose und Thrombozyten-Abschnürung

Tabelle 2: Übersicht über wichtige Zytokine der Megakaryopoese

1.8 Ex-Vivo-Expansion

Die Ex-Vivo-Expansion pluripotenter Stammzellen hat noch nicht das Stadium der klinischen Anwendung erreicht. Experimentelle Ansätze verfolgen unterschiedliche Ziele. Einerseits werden Kultivierungsbedingungen gesucht, die zu Vermehrung unreifer Stammzellen mit hohem pluripotenten Differenzierungspotential führen. Andererseits werden Ex-Vivo-Expansionen mit der Intention durchgeführt, in-vitro eine zielgerichtete Differenzierung von CD34+ Zellen zu liniendeterminierten Vorläuferzellen z.B. der myeloischen oder megakaryopoetischen Reihe einzuleiten. Die Expansion und Kotransplantation von megakaryozytären Vorläuferzellen soll einer verzögerten Thrombopoese nach einer Stammzelltransplantation mit lang andauernder Thrombozytensubstitutionspflicht

entgegenwirken. Zahlreiche Flüssigkulturmodelle werden derzeit erprobt, um eine optimale Proliferation und Reifung der Megakaryozyten zu erreichen. Als Stammzellquelle eignen sich aufgereinigte Stammzellen aus menschlichem Knochenmark, aus peripherem Blut nach Mobilisation, Nabelschnurblut oder aus fetalen Leberzellen. Die Kombination und Konzentration der Zytokine ist eine wichtige Einflussgröße in publizierten Studien (Maurer et al. (2000)). Weitere wichtige Parameter zur Optimierung der Zellkultur sind unter anderem die geeignete Zellkonzentration, die Kulturdauer, der Einfluss eines Stromazellen-Layers, die Bebrütungstemperatur und der Sauerstoffpartialdruck.

1.9 Fragestellung

Die Transplantation von autologen PBSZ nach HDC zielt auf die Sicherstellung einer schnellen und stabilen hämato- und lymphopoetischen Rekonstitution im Empfänger-Organismus. Im ersten Teil der Arbeit wurde prospektiv die hämatopoetische Erholung und Immunrekonstitution der Lymphozytenpopulationen in 24 Patienten nach einer autologen PBSZT ausgewertet. Um zusätzlich Daten über die Funktion der untersuchten T-Lymphozyten und deren Immunkompetenz zu gewinnen, wurde die Kinetik der von den Zellen produzierten Zytokine, wie das IFN γ , IL-2, und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), in den Subpopulationen der CD3+CD4+ T-Helferzellen und CD3+CD8+ T-Lymphozyten untersucht. Die intrazelluläre Zytokinproduktion nach in-vitro Stimulation ergibt verwendbare Hinweise zur funktionellen Integrität der untersuchten Zellen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Phänomen einer eingeschränkten Erholung der Hämatopoese nach Transplantation. Sowohl wir als auch andere Gruppen konnten eine ausgeprägte, zum Teil lang andauernde Thrombozytopenie beobachten. Dieses ist aus stammzellbiologischer Sicht von allgemeinem Interesse und auch klinisch relevant, da eine kostenintensive Thrombozytensubstitution zur Prophylaxe Thrombozytopenie-bedingter Blutungen indiziert ist. Die zusätzliche Kotransplantation in-vitro expandierter megakaryozytärer Vorläuferzellen könnte die Thrombozytopenie infolge HDC und PBSZT verhindern. Zu diesem Zweck wurden anhand zweier Flüssigkulturen mit unterschiedlichen Zytokin-Zusammensetzungen die Proliferation und Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu megakaryozytären Vorläufern in einem Ex-Vivo-Expansionsmodell untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Hämatopoetische Erholung und Immunrekonstitution

2.1.1 Patienten

Im ersten Teil der Studie sind Daten von 24 Patienten, 12 weiblichen und 12 männlichen, ausgewertet worden, die sich im Universitätsklinikum Lübeck (UKL) einer autologen PBSZT unterzogen haben. Ein Patient ist während der Studienzeit verstorben. Das mittlere Alter der Patienten belief sich auf 51 (25 bis 65) Jahre. Die Anzahl der Patienten, die während der Nachbeobachtungsphase, die Poliklinik der Hämatologie am UKL aufsuchten, betrug im ersten Monat 24, im dritten Monat 21, 17 nach sechs Monaten und 16 nach einem Jahr. Die Patienten litten an unterschiedlichen hämatologischen und onkologischen Erkrankungen. Die detaillierten Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Je nach zugrunde liegender Erkrankung erhielten die Patienten unterschiedliche HDC-Schemata und/oder eine Ganzkörperbestrahlung mit nachfolgender autologer PBSZT. In allen Fällen wurde den Patienten G-CSF (Neupogen®, Amgen, München, Deutschland) in einer Dosierung von ca. 5µg/kg Körpergewicht/Tag nach der PBSZT subkutan verabreicht. Alle Stammzellapheresen wurden mit dem Zellseparator CS3000plus (Baxter, München, Deutschland) durchgeführt. Im Durchschnitt belief sich die Anzahl der transplantierten CD34+ Zellen/kg Körpergewicht auf $4,33 \pm 1,86 \times 10^6$ Zellen. Plasmozytom-Patienten erhielten nach der PBSZT INFα. Patienten mit einem nicht-metastasierten Mamma-Karzinom wurden anschließend radiotherapiert (am Thorax, im axillären und im supraklavikulären Bereich). Bei den anderen Patienten wurden im Verlauf keine weiteren Therapien durchgeführt.

2.1.2 Hämatologische Analysen

Die Blutproben der Patienten wurden in Monovetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) mit 1,6 mg/ml EDTA gewonnen und ein, drei, sechs und zwölf Monate nach PBSZT untersucht. Das Differentialblutbild wurde nach Anweisungen des Herstellers an einem automatischen Blutbildanalysegerät Coulter Counter STKS Zellzähler (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) durchgeführt.

Patient	Diagnose	CD34 x 10 ⁶ / kg KG	Hochdosis- chemotherapie	Anzahl der Apheresen
1	Mamma-Karzinom	2,80	CTM	2
2	NHL	3,14	3 x mBEAM	2
3	Plasmozytom	5,16	2 x MEL	2
4	NHL	4,20	2 x mCHOEP1 1 x mCHOEP2	2
5	Mamma-Karzinom	9,25	CTM	1
6	Sarkom	3,86	2 x MEL/VEP	2
7	Mamma-Karzinom	4,71	CTM	2
8	NHL	3,31	2 x mCHOEP1 1 x mCHOEP2	1
9	Plasmozytom	4,12	2 x MEL	2
10	Mamma-Karzinom	4,90	CTM	2
11	Plasmozytom	9,32	2 x CP, 1x CM	2
12	Plasmozytom	3,65	2 x MEL	2
13	Plasmozytom	4,63	2 x MEL	2
14	Plasmozytom	4,94	MEL, MEL+TBI	3
15	AML	1,71	Bu/VP/Cy	1
16	Plasmozytom	4,03	MEL, MEL+TBI	1
17	NHL	3,53	BEAM	3
18	M. Hodgkin	2,69	CVP	1
19	Mamma-Karzinom	5,57	CTM	1
20	Plasmozytom	2,30	MEL, MEL+TBI	3
21	Plasmozytom	3,14	MEL, MEL+TBI	2
22	Plasmozytom	5,50	MEL	2
23	Plasmozytom	2,51	MEL, MEL+TBI	3
24	Mamma-Karzinom	2,41	BEAM	2

Tabelle 3: Patientencharakteristika, NHL= Non-Hodgkin-Lymphom, AML= Akute myeloische Leukämie. **Hochdosischemotherapien:** BEAM= BCNU 300 mg/m², Etoposid 2 x 150 mg/m² x 4, Zytarabin 2 x 200 mg/m² x 4, Melphalan 140 mg/m²; mBEAM= BCNU 125 mg/m², Etoposid 2 x 300 mg/m² x 4, Zytarabin 2 x 600 mg/m² x 4, Melphalan 90 mg/m²; Bu/VP/CY= Cyclophosphamid 60 mg/kg x 2, Busulfan 4mg/kg x 4, Etoposid 45 mg/kg; mCHOEP1= Cyclophosphamid 2250 mg/m² x 2, Adriamycin 35 mg/m² x 2, Vincristin 2 mg, Etoposid 2 x 160 mg/m² x 3, Prednison 100 mg x 5; mCHOEP2= Cyclophosphamid 3000 mg/m² x 2, Adriamycin 34 mg/m² x 2, Vincristin 2 mg, Etoposid 2 x 185 mg/m² x 3, Prednison 100 mg x 5; CM= Carboplatin, Melphalan 140 mg/m², CP= Carboplatin, Paclitaxel 250mg/m²; CTM= Cyclophosphamid 1500mg/m² x 4, Thiotepa 150 mg/m² x 4, Mitoxantrone 10 mg/m² x 4; CVP= Cyclophosphamid 1800 mg/m² x 4, Etoposid 2 x 250 mg/m² x 4, BCNU 150 mg/m² x 3; MEL= Melphalan 200 mg/m²; MEL+TBI= Melphalan 140 mg/m², fraktionierte Ganzkörper-Bestrahlung bis zu einer kumulativen Dosis von 850 cGy, MEL/VP= Melphalan 35 mg/m² x 4, Etoposid 450 mg/m² x 4.

2.1.3 Allgemeine Durchflusszytometrie

Die Phänotypisierung der Lymphozytenpopulationen wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen am EPICS XL MCL (Beckman Coulter) durchgeführt. Das Messprotokoll basiert auf der Darstellung der Streulichteigenschaften der Zellen mit Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, die ein Maß für die Zellgröße und Zellgranularität darstellen. Die Detektion der Oberflächenmarker erfolgt bei der Durchflusszytometrie mittels dreier Fluoreszenzkanäle. Die verwendeten Fluorochrome (Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Cytochrom 5 (CY5)) werden durch einen Argonlaser bei 488nm angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge (525, 575 und 650 nm). Mittels eines optischen Detektionssystems werden die erzeugten Emissionen erfasst, nachfolgend amplifiziert und in elektrische Signale konvertiert (Abbildung 11).

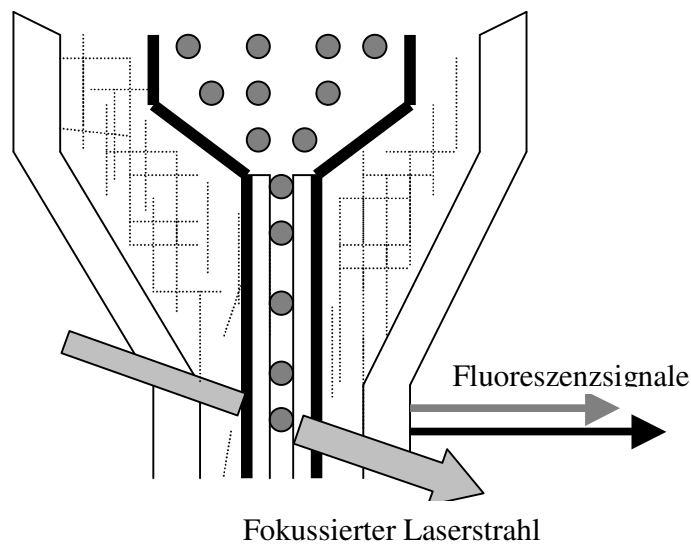


Abbildung 11: Aufbau des Durchflusszytometers. In einem Durchflusskanal werden die Zellen hintereinander aufgereiht und nacheinander durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt. Die dadurch erzeugte Fluoreszenz und die Streulichtemissionen werden mit Hilfe eines Detektionssystems erfasst und an einen Rechner weitergeleitet (modifiziert nach Robinson et al. (1992)).

Im Allgemeinen werden Streulichteigenschaften auf einer linearen Skala dargestellt, während die Fluoreszenzsignale auf einer logarithmischen Skala abgelesen werden. Die Verstärkung und Kompensation der einzelnen Fluorochrome erfolgte analog zu den Herstellerangaben und auf Basis von Kompensationsprotokollen. Für die Datengenerierung und Weiterverarbeitung

wurde die System II Software (Version 2.1) benutzt. Teilweise wurden Histogramme und „dot-plot“-Diagramme in der WIN-MDI Software (Version 8) weiterverarbeitet.

2.1.4 Immunphänotypisierung

100 µl des EDTA-antikoagulierten Blutes wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit einem Fluorochrom-konjugierten Antikörper inkubiert. Hierbei waren anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA/RO und anti-HLA-DR sowie anti-CD25 Antikörper für die Phänotypisierung von T-Lymphozyten, anti-CD19 für B-Lymphozyten und anti-CD16/56 für die Erkennung von NK-Zellen in Gebrauch. Alle Antikörper waren mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) markiert. Die Antikörper-Kombinationen CD45RA-PE/CD4-FITC, CD45RA-PE/CD8-FITC, CD45RO-PE/CD8-FITC und CD45RO-PE/CD4-FITC wurden vom Hersteller BD PharMingen (Hamburg, Deutschland) erstanden und in einer Konzentration von 20 µl benutzt, während die restlichen Antikörper von der Firma Beckman Coulter erworben und in einer Konzentration von 10 µl eingesetzt wurden. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit geeigneten Isotypkontrollen berücksichtigt. Die Erythrozyten wurden mit Essigsäure lysiert und alle Proben mit Paraformaldehyd (Immunoprep, Beckman Coulter) fixiert. Das Auswertefenster für Lymphozyten wurde in einem linearen Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Diagramm festgelegt, um nicht-lysierte Erythrozyten, Plättchenaggregate und Zelldebris von der Analyse auszuschließen.

2.1.5 Detektion intrazellulärer Zytokine

Zusätzlich wurde bei zehn Patienten die Zytokinproduktion der T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Nach Isolierung mononukleärer Zellen aus heparinisiertem Vollblut mit Hilfe einer Standard-Gradiententechnik (Ficoll-Hypaque, Seromed Biochrome, Berlin, Deutschland) (Dichte 1,077 g/ml), wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 (Seromed Biochrome, Berlin) resuspendiert und mit 10 ng/ml Phorbol-12Mystrat-13Acetat (PMA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 1 µM Ionomycin (Sigma) für fünf Stunden stimuliert. Um die Freisetzung im Überstand von de-novo synthetisierten Zytokinen aus dem Golgi-Apparat zu vermeiden, wurde Monensin (2,5µM (Sigma)) hinzu gegeben. Anschließend wurden die Zellen in 4°C kaltem „Hank's balanced salt solution“ (HBSS, Sigma) gewaschen und mit 4% PFA (Riedel-de-Haen AG, Seelze,

Deutschland) für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen für die Permeabilisierung in Saponin-Puffer resuspendiert (HBSS mit 0,1% Saponin und 0,01 M HEPES Puffer (Seromed Biochrome)). Gleichzeitig fand eine Färbung der Zellen mit direkt konjugierten Zytokin- und Oberflächenmarkern statt. Für die Detektion von Oberflächenepitopen wurden anti-CD3-Cy5, anti-CD8-FITC und monoklonale Antikörper für IFN γ und TNF α (alle PharMingen) eingesetzt. Um die T-Lymphozytensubpopulationen unterscheiden zu können, wurde ausschließlich anti-CD8-FITC verwendet, weil die CD4 Antigene durch Stimulation deutlich herunterreguliert werden. Zur Vereinfachung der Nomenklatur werden im weiteren Verlauf und im Ergebnis-Teil der intrazellulären Zytokinmessung CD8 negative Zellen als CD4+ Zellen bezeichnet.

Neben der Berechnung des relativen Anteils Zytokin produzierender Zellen wurde auch der „mean fluorescence intensity shift“ (MFI-Shift) als Maß für die Zytokinproduktion von Einzelzellen angegeben. Als Kontrolle diente die Zytokinexpression der Lymphozyten einer Gruppe von 50 gesunden Blutspendern.

2.1.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen für diese Studie sind mit der kommerziell erhältlichen Software von Sigma Plot durchgeführt. Es wurde bei nachgewiesener Normalverteilung der unverbundene t-Test angewendet. Die Ergebnisse sind deskriptiv mit Mittelwert und Standardabweichung im Text angegeben. Häufig sind Daten in Histogrammen in einem so genannten „Box-and-Whiskers-Plot“ zusammengefasst. Die Box wird durch das 25%- und das 75%-Quantil begrenzt. In der Mitte des Rechteckes wird der Median eingezeichnet, an das obere und untere Ende schließen sich die so genannten Whiskers („Schnurhaare“) an, womit Linien bezeichnet werden, deren Länge bis zum 5%- bzw. 95%-Quantil reicht. Außerhalb dieses Bereiches liegende Extremwerte wurden als separate Punkte in die graphische Darstellung aufgenommen.

2.2 Megakaryopoetische Flüssigkultur

2.2.1 Material und CD34-Aufreinigung

Die erhobenen Daten wurden aus dem Leukapheresematerial von 12 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen und onkologischen Erkrankungen nach ihrer schriftlichen

Einwilligung gewonnen. Die Patienten wurden zuvor mit unterschiedlichen Chemotherapien behandelt. In allen Fällen wurde G-CSF (Neupogen® (5µg/kg Körpergewicht/Tag)) subkutan appliziert. Um die mononukleären Zellen des Leukapheresproduktes zu isolieren, wurde eine Standard-Gradiententechnik mittels Ficoll-Hypaque durchgeführt (Seromed Biochrome). Nach einem Waschvorgang mit PBS-Puffer (Phosphatpuffer, „phosphate buffered saline“ (BioWhittaker, Walkersville, USA)) wurde eine magnetische CD34+ Zellaufreinigung mit einer MACS-Säule (Magnetic Cell Sorter CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Bei einer MACS-Zellisolierung werden Zellen einer Suspension mittels ihrer Oberflächenmarker aufgereinigt (Abbildung 12).

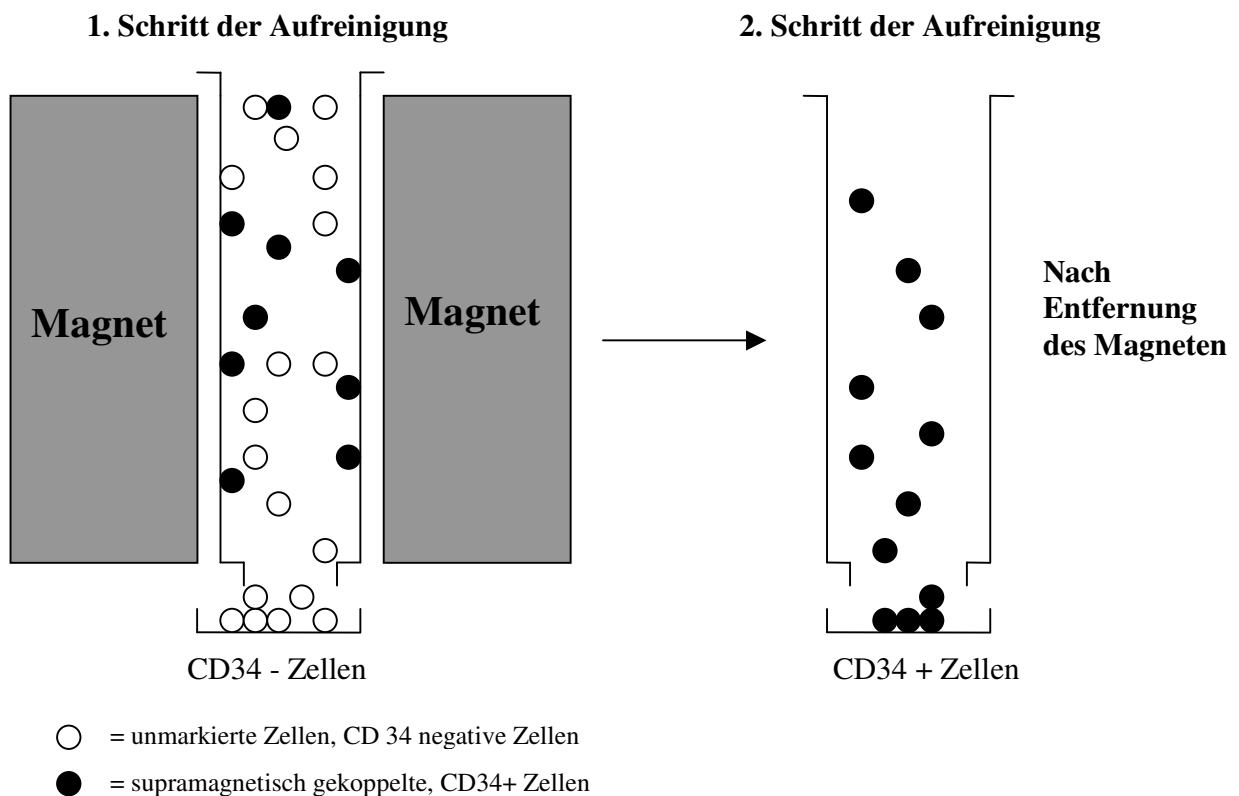


Abbildung 12: Schema der magnetischen Zell-Separation (MACS). Die supramagnetisch gekoppelten Zellen (schwarz) fließen durch die von Magneten umgebene Säule und bleiben in der magnetisch aufgeladenen Matrix aus Stahlwolle hängen (1. Schritt der Aufreinigung). Die unmarkierten Zellen (weiß) fallen hindurch. Nach der Wegnahme des Magneten, finden auch die supramagnetisch gekoppelten Zellen keinen Halt mehr und können aus der Matrix heraus gewaschen werden (2. Schritt der Aufreinigung).

Die Oberflächenrezeptoren werden mit spezifischen Antikörpern, im Falle von Stammzellen mit anti-CD34, markiert. Diese monoklonalen Antikörper sind zusätzlich mit supramagnetischen Partikeln, MACS „Microbeads“, gekoppelt. Nach dieser Oberflächenmarkierung passieren die Zellen eine Auftrennungssäule. Die aus Stahlwolle bestehende Matrix innerhalb der Säule hat sich durch ein magnetisches Feld aufgeladen. Die markierten Zellen werden vom Magneten angezogen und bleiben in dieser Säule hängen, während die unmarkierten Zellen der Suspension vom Magneten nicht beeinflusst werden und hindurchfließen. Nach der Entfernung des Magneten finden die aufgereinigten Zellen in der Auftrennungssäule keinen Halt mehr und können von der Matrix heraus gewaschen werden. Die Reinheit und die Wiederfindungsrate der aufgereinigten Zellen werden mit Hilfe von Durchflusszytometrie oder mittels eines Fluoreszenzmikroskopes erfasst (Abbildung 12).

2.2.2 Ex-Vivo-Expansion

Die aufgereinigten CD34+ Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen, auf eine Dichte von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt und in das Nährmedium IMDM („Iscove’s modified Dulbecco’s Medium“, BioWhittaker) mit einem Zusatz von 5%igem Ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen, Deutschland) eingebracht. Die Zellsuspension wurde in Sechs-Loch-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit jeweils 2 ml gefüllt. Im Anschluss wurden Zytokine hinzu gegeben.

Zytokin	Flüssigkultur 1	Flüssigkultur 2
SCF	10 ng/ml	20 ng/ml
IL-3	10 ng/ml	10 ng/ml
IL-6	10 ng/ml	25 ng/ml
IL-11	10 ng/ml	25 ng/ml
TPO	10 ng/ml	100 ng/ml
FLT-3	20 ng/ml	
MIP-1 α	20 ng/ml	
IL-1 β		10 ng/ml

Tabelle 4: Übersicht über die Zytokinkombinationen und ihre jeweilige Konzentration der Flüssigkulturen 1 und 2 zur Ex-Vivo-Expansion von Megakaryozyten

Die Zytokinkombination für die Flüssigkultur 1 umfasste die Zytokine SCF („stem cell factor“), IL-3, IL-6, IL-11 und TPO in einer Konzentration von 10 ng/ml und die Zytokine FLT-3 („fms-like tyrosin kinase“ 3) und MIP-1 α („macrophage inflammatory protein“) in einer Konzentration von 20 ng/ml. Die Zytokinkonzentrationen für Flüssigkultur 2 betrug 20 ng/ml SCF, 25 ng/ml IL-6 und IL-11, jeweils 10 ng/ml IL-1 β und IL-3 und 100 ng/ml TPO (Tabelle 4). Die Flüssigkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂ Anteil von 5% jeweils für 12-14 Tage inkubiert. Die durchflusszytometrischen Analysen der Oberflächenmarker-Expression und der Zellexpansion erfolgten ausgehend von Tag 1, an dem sie in Kultur gebracht wurden, an den Tagen 4, 8, 10 und 12. Die DNA-Gehaltsanalysen erfolgten zum Nachweis von polyploiden megakaryozytären Vorläuferzellen ausschließlich an Tag 10 im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Tag 1).

2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen

Um die Expression der megakaryozytären Oberflächenmarker CD41, CD61 und CD42 und deren Verlauf zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen am EPICS XL MCL durchgeführt. Nach einer Waschprozedur wurden 100 μ l der Zellsuspension mit 20 μ l des direkt-konjugierten monoklonalen Antikörpers bei 4°C für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, wurden Isotyp-spezifische Kontrollen durchgeführt. Alle Antikörper waren mit FITC oder PE markiert. Zur Identifizierung der Stammzellpopulation wurde das CD34-Antigen stets mit anti-CD34-PE nachgewiesen. Zur Bestimmung der Koexpression megakaryozytärer Antigene wurden anti-CD41a-, anti-CD42b- und anti-CD61-FITC eingesetzt (PharMingen). Nach einer Waschprozedur erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Tote Zellen und Zelldebris wurden mit Hilfe eines linearen Vorwärts-Seitwärts-Diagrammes sowie mittels Propidiumiodid (PI), einem DNA-interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff, ausgeschlossen.

2.2.4 Ploiditätsmessung

Für die Ploiditätsmessung wurde die Zellzahl mit Hilfe des Durchflusszytometers auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Ein Milliliter der Zellsuspension wurde an den Tagen 1 und 10 in ein Eppendorf-Gefäß überführt, zentrifugiert und gewaschen. Danach fand die Fixierung der Zellen mit Ethanol statt. Ein Milliliter eiskalter 80%iger Ethanolösung wurde tröpfchenweise und unter ständigem Schütteln hinzu gegeben. Nach einer Stunde Fixierung im Eisbad bei

4°C, wurde die Suspension zentrifugiert und in 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl Volumen aufgenommen, mit 50 µl des Antikörpers CD41-FITC markiert, um die megakaryozytären Vorläufer zu detektieren, und bei 4°C im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 50 µl RNase (Ribonuklease, (Sigma)) hinzu gegeben, gemischt und nachfolgend die gleiche Menge an Propidiumiodid in einer Konzentration von 50µg/ml hinzugefügt.

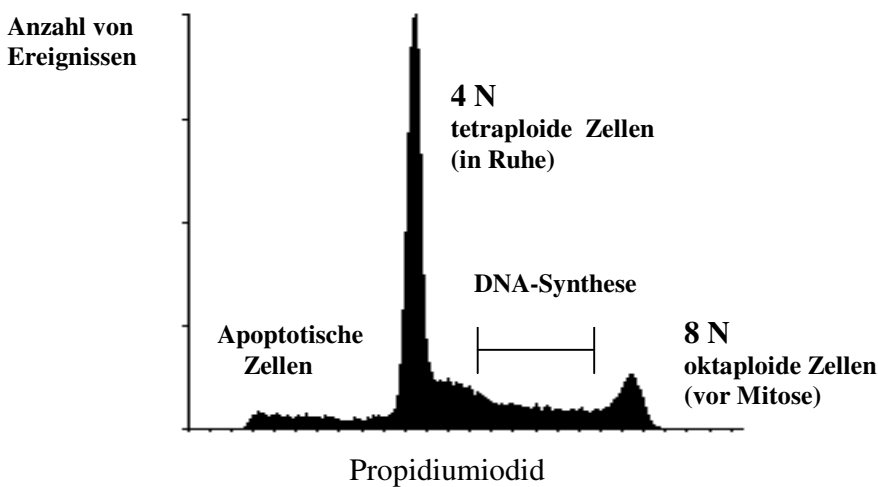


Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung einer Ploiditätsmessung von MOLT 4 -Zellen. Die Methode wurde mit Hilfe dieser tetraploiden Modellzelllinie entwickelt. Als interkalierender DNA-Farbstoff wurde Propidiumiodid verwendet.

Nach einer Stunde Inkubation im Dunkeln wurde die Ploidität erfasst. Zellaggregate (Doubletten), die fälschlicherweise als polyploide Ereignisse erfasst werden könnten, wurden durch ein Auswertefenster (DNA-Gehalt versus DNA-Peak) ausgeschlossen. Durch ein weiteres Auswertefenster wurden die CD41+ Zellen von übrigen Zellen unterschieden und mittels Propidiumiodid der DNA-Gehalt bestimmt. Als Analysenkontrolle und zur Optimierung der Auswertefenster-Einstellung wurden Zellen der Zellreihe MOLT 4 ausgewählt, deren Zellen polyploide Kerne mit 4N und 8N besitzen (Abbildung 13).

2.2.5 Megakaryozyten-Kurzzeitkultur

Um die Klonogenität der megakaryozytären Vorläuferzelle zu untersuchen, wurde die Bildung von megakaryozytären Kolonien mit Hilfe einer semisoliden Kurzzeitkultur untersucht. Es wurde das MegaCult-C Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) auf Kollagenbasis nach Angaben des Herstellers verwendet. Die aufgereinigten CD34+ Zellen und die ex-vivo generierten megakaryozytären Vorläuferzellen wurden in einer Konzentration von 1 bis 2×10^5 Zellen/ml resuspendiert, mit Kollagen vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Das Nährmedium enthielt eine vom Hersteller angegebene Kombination an Zytokinen (TPO, IL-6, IL-3). Die Objektträger wurden für 12 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einer Dehydration und Fixation mit Ethanol wurden die Zellkolonien mit Antikörpern gegen das CD41-Antigen mit APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase Komplex) gefärbt.

2.2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen für diese Studie sind mit Sigma Plot Software durchgeführt worden. Es wurde der gebundene t-Test angewendet. Die Ergebnisse in den Histogrammen sind in einfachen Fehler-Diagrammen („simple error bars“) zusammengefasst, bei denen das Rechteck die Mittelwerte angibt, während oberhalb davon die einfache Standardabweichung als Linie eingezeichnet ist.

3. Ergebnisse

3.1 Hämatopoetische Erholung

In der durchgeführten Studie wurde die hämatologische Rekonstitution bei 24 Patienten nach HDC mit autologer PBSZT untersucht. Die mittlere Zeit, bis mehr als 500 neutrophile Granulozyten/ μ l im peripheren Blut nachzuweisen waren, betrug 10 ± 1 Tage (8-12 Tage). Der Anstieg der Thrombozyten auf 20 Zellen /nl erfolgte nach 13 ± 3 Tagen (7-18 Tagen).

Patient	Neutrophile >500/ μ l (Tage)	Thrombozyten >20/nl (Tage)	Erythrozyten- Konzentrate	Thrombozyten- Konzentrate
1	9	18	6	4
2	9	7	4	3
3	10	10	10	nicht bekannt
4	10	13	10	4
5	10	13	2	2
6	8	8	6	5
7	9	12	9	8
8	9	14	2	5
9	11	13	3	2
10	9	16	2	2
11	10	10	4	2
12	10	11	4	2
13	9	10	6	1
14	12	18	4	11
15	10	17	4	5
16	9	11	4	3
17	8	12	6	2
18	9	8	6	1
19	9	12	8	5
20	9	9	2	4
21	9	17	8	3
22	11	14	4	7
23	10	17	6	6
24	10	9	4	3

Tabelle 5: Ergebnisse der hämatopoetischen Erholung nach PBSZT. Es werden die Tage bis zum Anstieg der neutrophilen Granulozyten auf über 500 Zellen/ μ l und der Thrombozyten auf über 20 Zellen/nl im peripheren Blut für jeden einzelnen Patienten angegeben. In den letzten beiden Spalten ist die Anzahl der transfundierten Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate während der Erholungszeit aufgeführt.

In den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT wurden die Differentialblutbilder der rekrutierbaren Patienten hinsichtlich einer dauerhaften hämatopoetischen Erholung analysiert. Die initiale Leukozytenzahl von $5510 \pm 589/\mu\text{l}$ im ersten Monat fiel nach 12 Monaten auf einen Wert von 4100 ± 243 Zellen/ μl ab. Die am Anfang beobachtete leichte Monozytose von $15,7 \pm 1,1\%$ verschwand im Verlauf des ersten Monats. Der relative Anteil an Granulozyten blieb stabil mit einem Anteil von $60,2 \pm 3,3\%$ nach einem und $59,4 \pm 2,5\%$ nach 12 Monaten. Für Lymphozyten betrug der Anteil $21,1 \pm 2,9\%$ im ersten und $27,6 \pm 2,6\%$ im 12. Monat nach PBSZT (Abbildung 14).

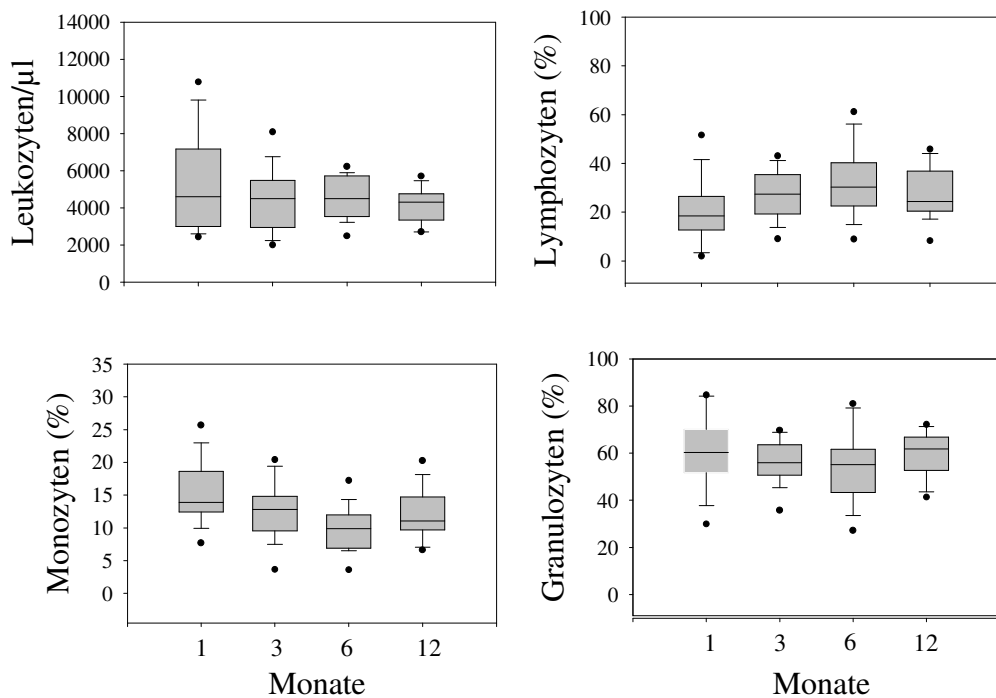


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Erholung der Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten nach PBSZT. Für die Darstellung sind Box-Plot-Diagramme gewählt worden. Die Box wird durch das 25%- und das 75%-Quantil begrenzt, während der Median in der Mitte des Rechtecks eingezeichnet ist. Die sich an das obere und untere Ende des Rechtecks anschließenden Linien sind bis zum 5%- (95%) Quantil eingezeichnet und die Extremwerte als separate Punkte in die Darstellung mit aufgenommen.

Einen Monat nach PBSZT betrug der mittlere Hämoglobingehalt bei bereits vollständiger Transfusionsfreiheit $11,1 \pm 0,3$ g/dl und stieg ein Jahr nach Transplantation auf $12,0 \pm 0,4$ g/dl an. Zum ersten Zeitpunkt rekonstituierten sich die Thrombozyten im Mittel auf 149 ± 20 /nl und fielen leicht auf einen Wert von 119 ± 12 /nl im 12. Monat nach PBSZT ab (Abbildung 15).

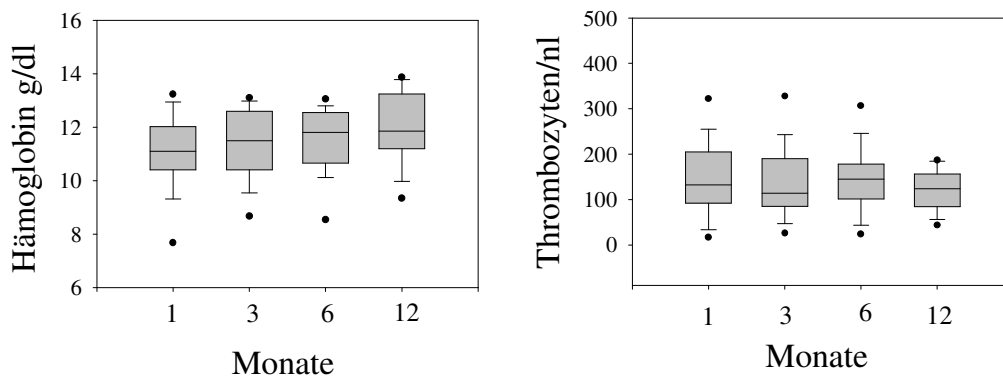


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Hämoglobinwerte (in g/dl) und der Thrombozytenzahlen (in Zellen/nl) in den Monaten 1, 3, 6, und 12 nach PBSZT.

Bei allen Patienten erholte sich die Thrombopoese im Vergleich zur Myelopoese verzögert. Bei sieben von 24 Patienten konnte eine deutlich verzögerte Thrombopoese und eine längere Thrombozytensubstitutionsphase festgestellt werden, wie in Tabelle 6 dargestellt.

Patienten-Nr.	Thrombozyten>20/nl (Tage)	Thrombozyten-Konzentrate
1	18	4
7	12	8
10	16	2
14	18	11
15	17	5
21	17	3
23	17	6

Tabelle 6: Übersicht über die Patienten mit einer verzögerten Thrombozyten-Regeneration und verlängerter Transfusionspflichtigkeit. Bei zwei Patienten dauerte der Anstieg der Thrombozyten auf 20 Zellen/nl 18 Tage, wobei ein Patient 11 Thrombozytenkonzentrate benötigte.

3.2 Immunrekonstitution

Die Immunrekonstitution wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu den gegebenen Zeitpunkten bestimmt. Die NK-Zellen zeigten eine schnelle Rekonstitution mit einem normalen Absolutwert von $236 \pm 39/\mu\text{l}$, gepaart mit einer relativen NK-Lymphozytose von $23,7 \pm 2,8\%$ im ersten Monat nach PBSZT. Zwölf Monate nach PBSZT sank die NK-Zellkonzentration auf $153 \pm 20/\mu\text{l}$ und entsprechend $14,3 \pm 2,1\%$ aller Lymphozyten.

Die B-Lymphozyten hingegen wiesen eine deutlich verspätete Erholung auf. Im ersten Monat nach Transplantation war keine nennenswerte B-Lymphozytenregeneration zu erkennen ($0,9 \pm 0,2\%$). Im Gegensatz hierzu konnten reife B-Lymphozyten drei bzw. sechs Monate nach PBSZT mit einem relativen Anteil von $12,8 \pm 3,8\%$ bzw. $21,5 \pm 3,2\%$ durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

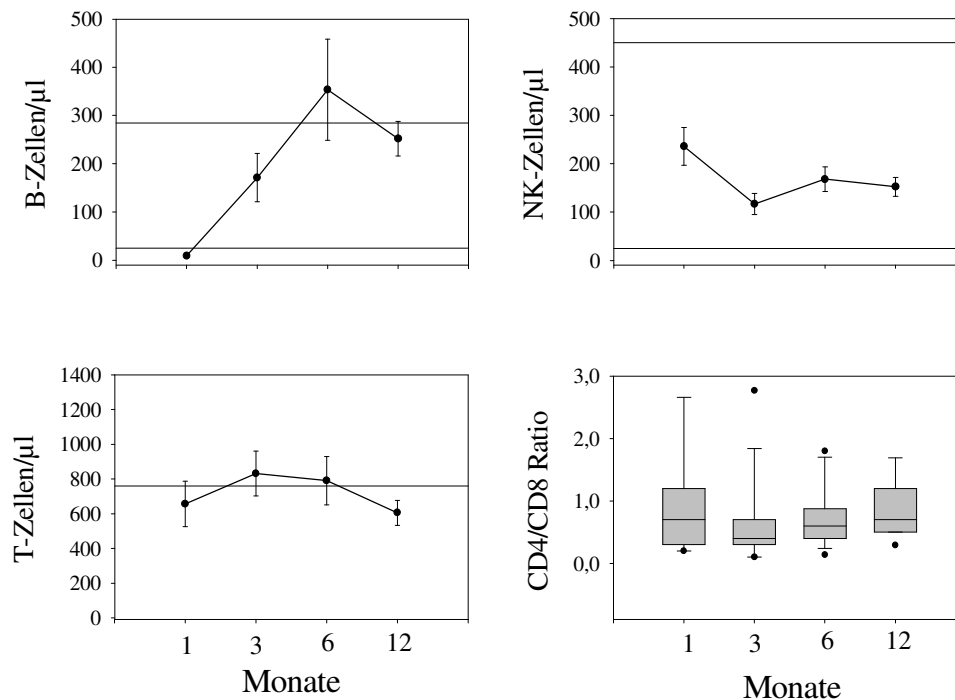


Abbildung 16: Die Immunrekonstitution der B-, NK- und T-Zellen in den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT. Die horizontalen Linien stellen die Grenzen der oberen und unteren hausinternen Normwerte dar. Zusätzlich ist in dieser Abbildung die CD4/CD8 Ratio dargestellt, die das Verhältnis der CD4+ und CD8+ T-Zellsubpopulationen zueinander aufzeigt.

Der Anteil der T-Zellen an allen Lymphozyten betrug $54,8 \pm 3,8\%$ mit einer absoluten Zellzahl von 656 ± 130 Zellen/ μl im ersten Monat nach PBSZT (Abbildung 16). Als Aktivierungsmarker wurde die simultane Expression der IL2-Rezeptors und von HLA-DR Molekülen untersucht. Die CD25 (IL2-R α)-Koexpression blieb mit weniger als 10% niedrig, während initial nach PBSZT $44,0 \pm 20,0\%$ der CD3+ Zellen HLA-DR positiv waren. Sechs Monate nach PBSZT fiel der Wert der CD3+HLA-DR+ Zellen auf $21,0 \pm 15,0\%$ ab (Abbildung 17).

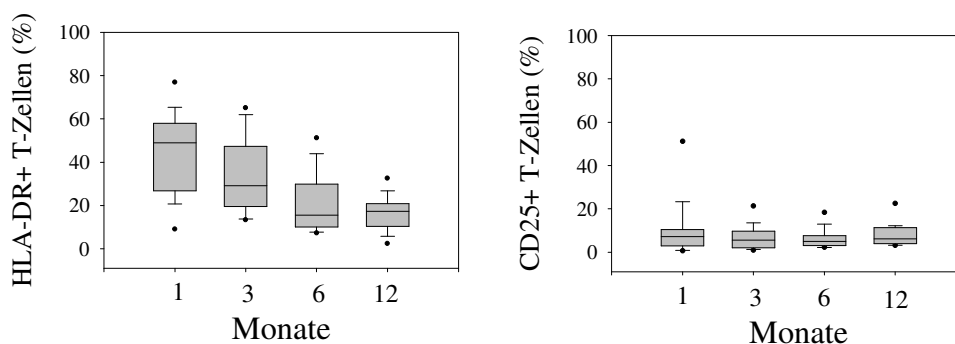


Abbildung 17: Die Darstellung der CD25+ und HLA-DR+ aktivierten T-Zellen in % in den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT.

Die Regeneration zytotoxischer CD3+CD8+ T-Zellen lag im ersten Zeitintervall mit einer Konzentration von $331 \pm 91/\mu\text{l}$ bereits im Normbereich. Nach zwölf Monaten konnten im Mittel $279 \pm 57/\mu\text{l}$ nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die CD3+CD4+ T-Helfer-Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraumes mit $121 \pm 18/\mu\text{l}$ im ersten und $174 \pm 33/\mu\text{l}$ im 12. Monat nach PBSZT sehr deutlich erniedrigt (Abbildung 18). Dieses Phänomen wurde auch durch eine inverse CD4/CD8 Ratio mit $1,0 \pm 0,2$ im ersten und $0,8 \pm 0,1$ im 12. Monat nach Transplantation deutlich (Abbildung 16).

Zusätzlich wurde die Koexpression der CD45RA/R0-Isoformen der T-Lymphozytensubpopulationen untersucht. Insbesondere die naiven CD4+CD45RA+ Zellen waren während der gesamten Untersuchungszeit mit einem Prozentanteil von 4 bis 7% niedrig und stiegen auch im weiteren Verlauf nicht weiter an (keine Abbildung).

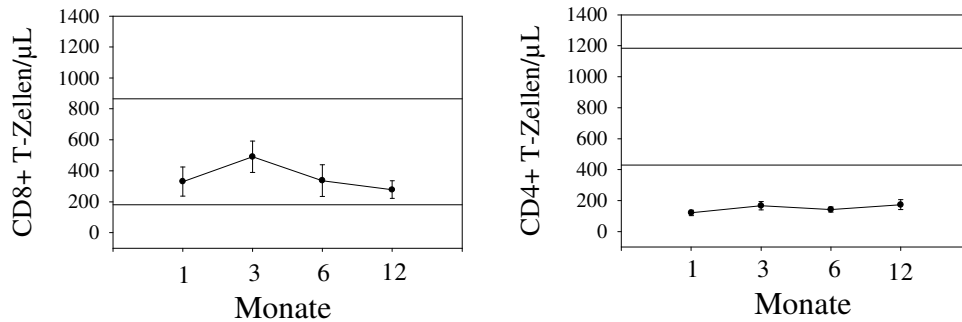


Abbildung 18: Schematische Darstellung der CD8+ und CD4+ T-Zellen in den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT. Durch die waagerechten Linien sind die jeweiligen hausinternen Normbereiche eingegrenzt.

3.3 Intrazelluläre Zytokinmessung

Um nicht nur die Anzahl sondern auch die Funktion der rekonstituierten T-Zellen zu erfassen, wurde die Produktion der intrazellulären Zytokine IL-2, IFN γ und TNF α durch die T-Subpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen.

Der Vergleich der Produktion von IFN γ durch CD3+ Zellen zwischen den Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe zeigte eine signifikant erniedrigte IFN γ -Produktion ($16,4 \pm 3,3\%$ (versus $25,2 \pm 1,9\%$ ($P=0,05$)). Nach einem Zeitraum von zwölf Monaten erhöhte sich die Kapazität, IFN γ zu produzieren, auf $31,0 \pm 5,7\%$ ($P=0,26$) und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Ereignissen der Kontrollgruppe. Die Analyse der T-Lymphozytensubpopulation zeigte, dass IFN γ bevorzugt durch CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen produziert wurde ($22,6 \pm 4,7\%$ (MFI-Shift: $12,3 \pm 3,4$)). Dieser Einmonatswert erholte sich zwölf Monate nach PBSZT auf $34,9 \pm 5,9\%$ (MFI-Shift: $21,6 \pm 3,1$). Die angegebenen mittleren Fluoreszenzintensitätswerte (MFI-Shifts) weisen daraufhin, dass der einzelne T-Lymphozyt die IFN γ -Produktion bei gleicher Stimulation zwölf Monate im Vergleich zu einem Monat nach PBSZT verdoppelt hat. Im Gegensatz hierzu zeigte die CD3+CD4+ T-Helfer-Population eine erheblich eingeschränkte IFN γ -Produktion; ihr Ausgangswert betrug zunächst im ersten Monat lediglich $12,6 \pm 3,1\%$ (MFI-Shift: $12,4 \pm 2,4$), jedoch konnte zum letzten Beobachtungszeitpunkt von zwölf Monaten ein Anstieg auf $20,8 \pm 4,3\%$ (MFI-Shift: $18,7 \pm 2,6$) verzeichnet werden (Abbildung 19).

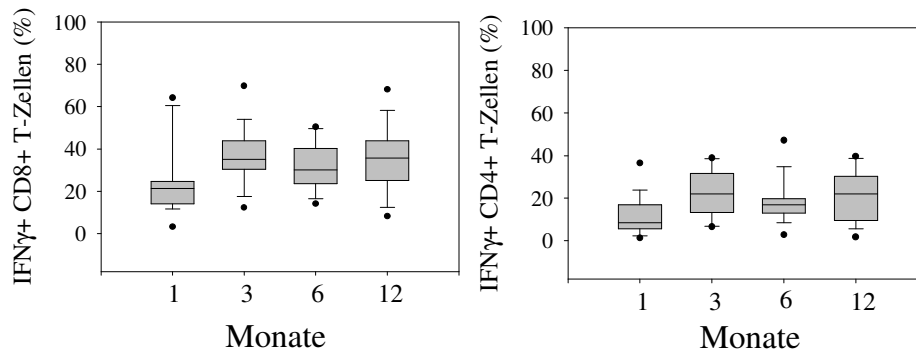


Abbildung 19: Darstellung der IFN γ -Produktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen nach PMA/Ionomycin-Stimulation in den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT.

Die TNF α -Produktion nach PBSZT war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Werten von $24,9 \pm 4,0\%$ ($P = 0,05$) im ersten Monat und $31,6 \pm 4,8\%$ ($P < 0,01$) im 12. Monat im Vergleich zur Kontrollgruppe ($18,7 \pm 1,2\%$) signifikant erhöht. Bei einer detaillierten Betrachtung der TNF α -Produktion begann die CD8+ Subpopulation mit einem Anteil von $21,8 \pm 3,3\%$ (MFI-Shift: $7,3 \pm 0,5$) und erzielte nach einem Jahr einen Wert von $29,7 \pm 4,8\%$ (MFI-Shift: $7,1 \pm 0,8$). CD3+CD4+ Zellen produzierten $29,3 \pm 4,8\%$ (MFI-Shift: $8,8 \pm 1,2$) TNF α nach einem und $39,9 \pm 4,9\%$ (MFI-Shift: $7,8 \pm 0,7$) nach zwölf Monaten (Abbildung 20).

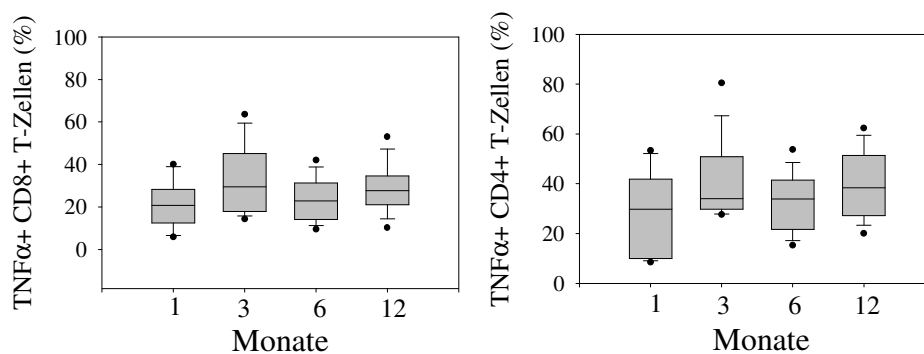


Abbildung 20: Die TNF α -Produktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen in den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT.

In Bezug auf die IL-2-Produktion zeigten die Subpopulationen der T-Lymphozyten kein einheitliches Bild. Der Anteil an CD3+ IL2+ Zellen betrug $17,0 \pm 6,0\%$ ($P = 0,34$) nach einem

Monat und stieg auf $25,4 \pm 4,5\%$ ($p=0,3$) nach zwölf Monaten ohne signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe ($21,2 \pm 1,5\%$) an. Der relative Anteil der IL-2-produzierenden CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen war initial im ersten Monat weitgehend gleich ($16,8 \pm 6,6\%$ (MFI-Shift: $11,4 \pm 1$) versus $22,1 \pm 6,3\%$ (MFI-Shift: $11,4 \pm 1$)). Die IL-2-Produktion in CD3+CD8+ zytotoxischen Zellen nahm im Verlauf mit einem Anteil von $10,6 \pm 3,4\%$ (MFI-Shift: $11,8 \pm 1,1$) deutlich ab, während $42,2 \pm 5,3\%$ (MFI-Shift: $11,7 \pm 1,3$) der CD3+CD4+ T-Lymphozyten in der Lage waren IL-2 zu produzieren (Abbildung 21).

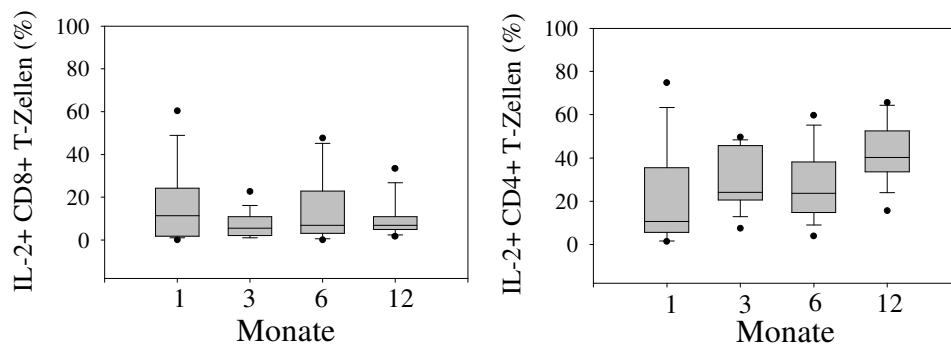


Abbildung 21: Darstellung der IL-2+ CD8+ und IL-2+CD4+ T-Zellen in den Monaten 1, 3, 6 und 12 nach PBSZT.

3.4 Megakaryopoetische Flüssigkultur

Nach der magnetischen Zellisolierung wurden die aufgereinigten CD34+ Stammzellen mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Kultur gebracht. Hierfür wurden 6-Lochplatten mit 2 ml Zellsuspension beschichtet. Zwei unterschiedliche Differenzierungsmedien (siehe Material und Methoden) wurden nachfolgend vergleichend untersucht. Im Ausgangsmaterial und nach vier, acht, zehn und zwölf Tagen Inkubation wurden die Zellzahl und die Expression der Antigene CD41, CD42 und CD61 gemessen. Als Ausgangswert wurde nach der CD34-Aufreinigung die Anzahl der CD34+CD41+ Zellen bestimmt, die jeweils unter 3% lag. In Flüssigkultur 1 betrug die absolute Zellzahl am vierten Tag $9,2 (\pm 2,7) \times 10^5$ Zellen/ml und erhöhte sich am achten Tag auf $15,8 (\pm 4,4) \times 10^5$ Zellen/ml (Abbildung 22).

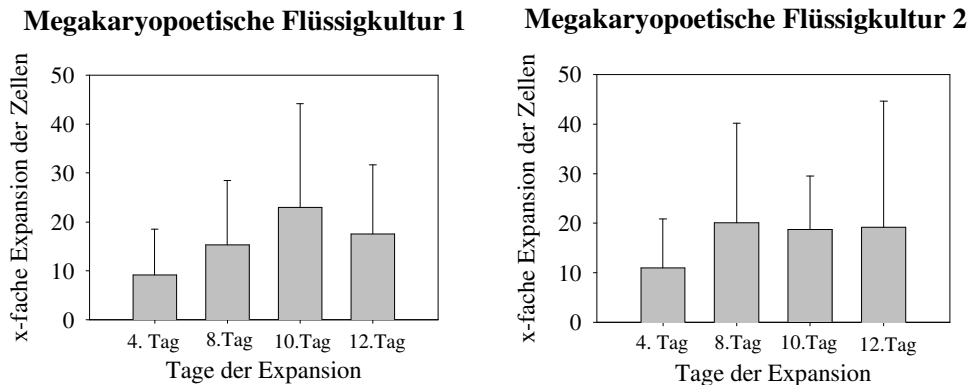


Abbildung 22: Daten der Expansionsrate von zwei megakaryopoetischen Flüssigkulturmodellen (n=10) an den Tagen 4, 8, 10 und 12. Darstellung der Ergebnisse als Säulendiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung.

Am zehnten Tag stieg die Anzahl auf $22,9 (\pm 6,4) \times 10^5$ Zellen/ml, während am zwölften Tag der Wert auf $17,5 (\pm 4,3) \times 10^5$ Zellen/ml herab fiel. Die Flüssigkultur 2 zeigte eine ähnliche Kinetik mit Werten von $10,9 (\pm 2,9) \times 10^5$ Zellen/ml nach vier, $20,1 (\pm 6,7) \times 10^5$ Zellen/ml nach acht, $18,7 (\pm 3,3) \times 10^5$ Zellen/ml nach zehn und $19,2 (\pm 7,7) \times 10^5$ Zellen/ml nach zwölf Tagen.

In Abhängigkeit zum heterogenen Ausgangsmaterial wurde eine hohe Variabilität der Expansionsrate beobachtet. Deswegen wurde eine gesonderte Auswertung von ausgewählten Flüssigkulturen (n=6) vorgenommen, die eine hohe Wachstumsrate bis zum 12. Kultivierungstag aufwiesen und deren Beobachtungszeit auf 14 Tage verlängert wurde.

Im Vergleich der beiden Flüssigkulturmodelle fällt die kontinuierliche Zellvermehrung in Flüssigkultur 1 über den gesamten Beobachtungszeitraum auf (Expansionsrate am 4. Tag $11,8 \pm 4,9$, an Tag 8 $17,5 \pm 11,8$ fach, $22,9 \pm 21,1$ fach an Tag 10, $17,5 \pm 13,9$ fach an Tag 12 und $99,6 \pm 61,1$ fach am 14. Tag). Die Flüssigkultur 2 hingegen proliferiert im Mittel um den Faktor 45 bis zum 8. Tag und erreicht ihr „steady state“ (Abbildung 23).

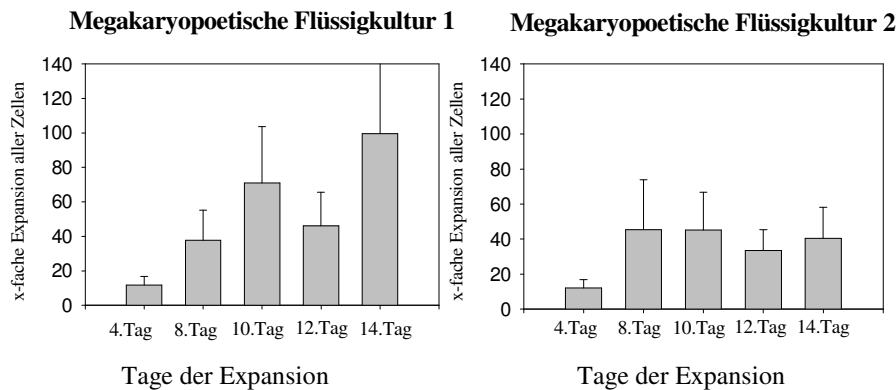


Abbildung 23: Darstellung von sechs megakaryopoetischen Flüssigkulturen mit hohem Expansionspotential bis zum 14. Kultivierungstag mit den gleichen Flüssigkulturmodellen.

3.4.1 Oberflächen-Expression megakaryopoetischer Antigene

Der Prozentsatz CD41+ Zellen der ersten Flüssigkultur betrug nach vier Tagen $13,4 \pm 2,1\%$; in Flüssigkultur 2 wurden nach den ersten vier Tagen Kultivierung $14,8 \pm 2,5\%$ CD41+ Zellen gemessen. Innerhalb der ersten Flüssigkultur stieg dieser Wert am achten Tag auf $23,9 \pm 5,5\%$, und am zehnten auf $36,1 \pm 10,2\%$. Am letzten Messzeitpunkt von 12 Tagen stabilisierte sich der Anteil von CD41+ Zellen auf $32,3 \pm 12,7\%$. Die Flüssigkultur 2 zeigte eine parallele Entwicklung mit $27,2 \pm 5,5\%$ am achten und $36 \pm 8,1\%$ am zehnten Tag. Dieser Wert fiel leicht am letzten Untersuchungszeitpunkt von zwölf Tagen auf $30,6 \pm 9,8\%$ zurück (Abbildung 24).

In Ergänzung zur Expansionsrate aller Zellen wurde auch die Expansion der megakaryozytären Vorläuferzellen anhand der CD34+CD41+ Zellen bestimmt ($n=10$). Dabei wurde vom Ausgangsmaterial von maximal 3% an CD34+CD41+ ($3 \times 10^3/\text{ml}$) Zellen an Tag 0 ausgegangen. Für die erste Flüssigkultur erhöht sich die absolute Zahl CD34+CD41+ Zellen auf $1,2 \times 10^5$ Zellen/ μl an Tag 4 mit einer Expansion um den Faktor 40. Für Tag 8 ergibt sich eine absolute Zellzahl von $3,8 \times 10^5$ Zellen/ml mit einer 127 fachen Expansion, respektive $8,3 \times 10^5/\text{ml}$ und eine 276 fache Expansion für Tag 10. An Tag 12 reduziert sich die absolute Anzahl an CD34+CD41+ Zellen auf $5,8 \times 10^5/\text{ml}$ und ergibt eine 188 fache Expansion. Die zweite Flüssigkultur weist ähnliche Zahlen auf mit $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml an Tag 4 mit einer entsprechend 53 fachen Expansion. Die ursprünglich eingesetzten Zellen vermehren sich um

den Faktor 182 auf eine absolute Zellzahl von $5,5 \times 10^5$ Zellen/ml an Tag 8 und $6,7 \times 10^5$ Zellen/ml an Tag 12 mit einer 224 fachen Expansion. Auch hier reduziert sich die absolute Zellzahl auf $5,9 \times 10^5$ Zellen/ml, entsprechend einer Expansionsrate von 195.

Zusätzlich wurde die Koexpression des CD61-Antigens untersucht. Periphere Blutstammzellen, die als Ausgangsmaterial benutzt wurden, koexprimieren am Tag ihrer Gewinnung und Aufreinigung nur geringfügig das CD61 Antigen ($< 3\%$). Die Daten der Messungen sind in Abbildung 24 zusammengefasst. An Tag 4 der Ex-Vivo Expansion exprimierten $8,4 \pm 0,9\%$ in Flüssigkultur 1 und $11,2 \pm 2,2\%$ der Zellen in Flüssigkultur 2 CD61. In Flüssigkultur 1 trugen am achten Tag $15,9 \pm 3,5\%$ der Zellen CD61 und erreichten die maximale CD61-Expression mit $19,6 \pm 6,4\%$ am zehnten Tag. Unter den Bedingungen der zweiten Flüssigkultur stieg der relative Anteil kontinuierlich an mit Werten von $11,2 \pm 2,2\%$ für Tag 4, $22,1 \pm 5,6\%$ für Tag 8, $25,3 \pm 5,1\%$ für Tag 10 und $26,1 \pm 4,6\%$ für Tag 12 der Expansion.

Die Expression des Oberflächenmarkers CD42 zeigte einen Prozentsatz von $5,3 \pm 1,2\%$ am vierten, $15,5 \pm 3,8\%$ am achten, $32 \pm 10,2\%$ am zehnten und $21,8 \pm 11,1\%$ am zwölften Tag der Flüssigkultur. Ähnliche Entwicklungen wies auch die zweite Flüssigkultur mit $4,9 \pm 1,1\%$, $27,3 \pm 12,7\%$, $26,5 \pm 7,1\%$ und $19,5 \pm 8,8\%$ am vierten, achten, zehnten und zwölften Tag der Flüssigkultur auf (Abbildung 24).

Zusammenfassend differenzieren sich periphere Blutstammzellen in beiden Flüssigkulturmodellen anteilig zu megakaryozytären Vorläuferzellen und koexprimieren die megakaryozytären Antigene CD41, CD61 und CD42 bereits an Tag 10 zwischen 20 und 36%.

Megakaryopoetische Flüssigkultur 1 Megakaryopoetische Flüssigkultur 2

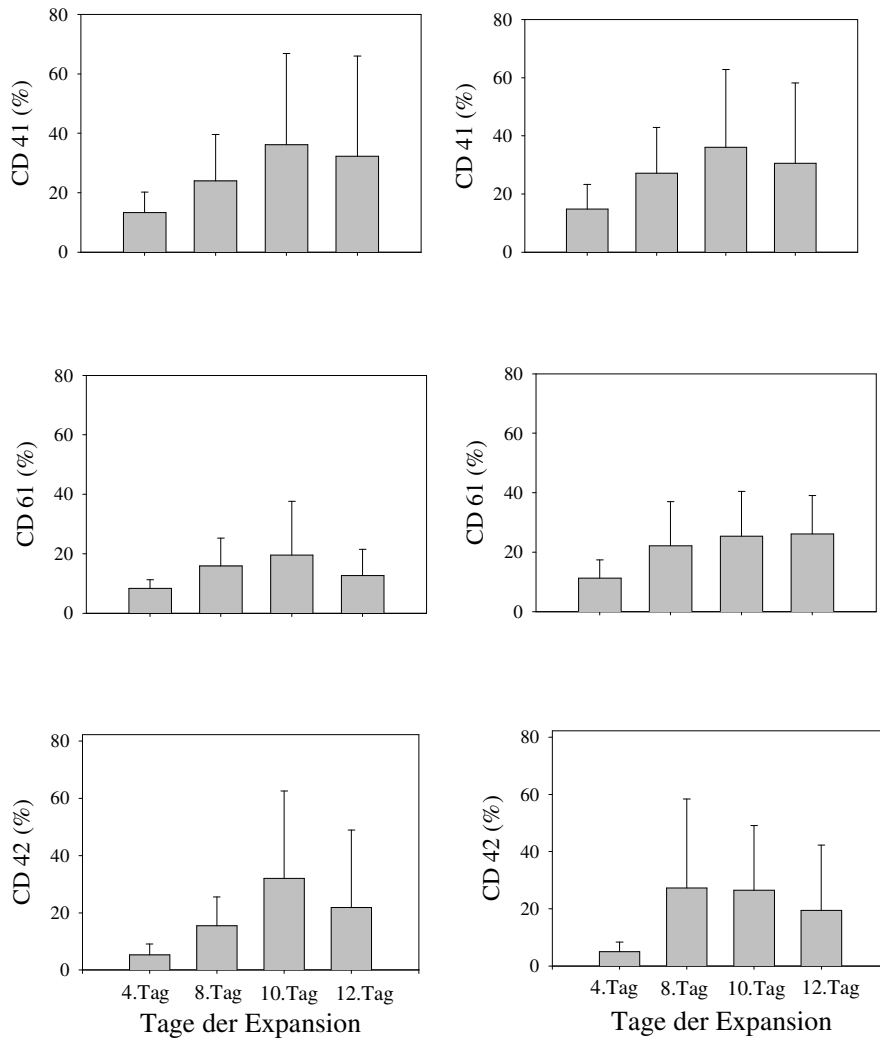


Abbildung 24: Übersicht über die Oberflächenexpression der megakaryozyten-typischen Antigene CD41, CD61 und CD42 der Flüssigkulturen 1 und 2 am Tag 4, 8, 10 und 12 der Expansionskultur.

Eine beispielhafte durchflusszytometrische Messung der CD42-Expression ist in Abbildung 25 dargestellt. In dieser Verlaufsdarstellung ist die CD42-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen und megakaryozytären Vorläuferzellen eines Patienten unter den Bedingungen der Flüssigkultur 2 mit Dot-plot-Diagrammen aufgezeichnet. Die Auswahlfenster wurden mit jeweiligen Isotypkontrollen festgelegt und stellen Grenzen für CD34+ oder CD34- (bzw. CD42+/-) Zellen dar.

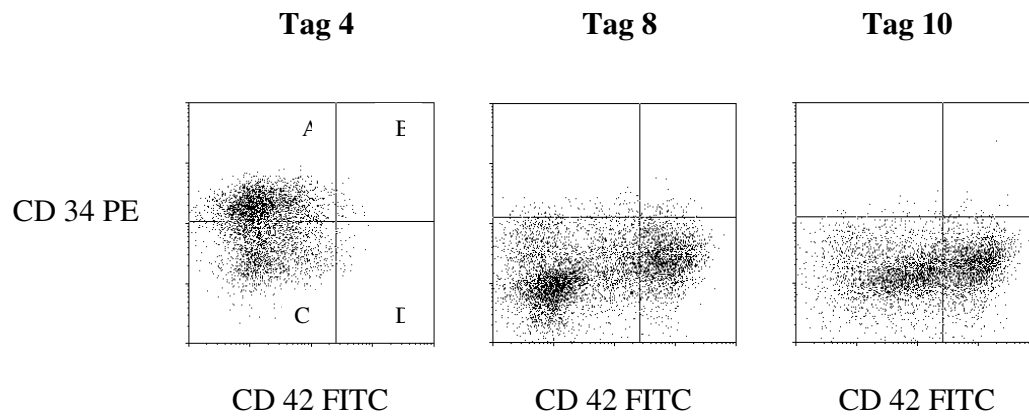


Abbildung 25: Darstellung der CD42-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen während der megakaryozytären Differenzierung (Patient Nr. 4) in Flüssigkultur 2 mit Dot-Plot-Diagrammen. Die Expression von CD42 nimmt auf der x-Achse nach rechts hin zu, während die CD34-Expression auf der y-Achse nach unten abnimmt. Feld A enthält CD34+CD42- Zellen, Feld B CD34+CD42+ Zellen, in Feld C die CD34-CD42- Zellen und in Feld D befinden sich die CD34-CD42+ Zellen.

3.4.2 Megakaryozyten-Kurzzeitkultur

Um die Klonogenität der megakaryozytären Vorläuferzellen untersuchen zu können, wurde versucht, die Bildung von Kolonien der megakaryozytären Reihe mit Hilfe einer semisoliden Kurzzeitkultur zu untersuchen. Vorversuche konnten die Ausreifung von typischen megakaryozytären Kolonien aufzeigen, die in der APAAP-Färbung positiv für CD41 waren. Aufgrund technischer Probleme, wie z. B. das Ablösen der Kolonien nach Fixierung und einer fehlenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war eine quantitative und vergleichende Auswertung nicht möglich.

3.4.3 Ploidität megakaryozytärer Vorläuferzellen

Die Ploidität der Zellen wurde am ersten und zehnten Tag der Kultivierung bestimmt. Um die megakaryozytären Vorläuferzellen unter allen Zellen erfassen zu können, wurden die Zellen zunächst mit einem CD41-Antikörper und nachfolgend mit Propidiumiodid gefärbt. Die Unterscheidung der CD41+ Zellen von restlichen Zellen der Zellsuspension wurde durch ein elektronisches Auswertefenster vorgenommen. Mittels Propidiumiodid-Emission wurde der DNA-Gehalt bestimmt (Abbildung 26).

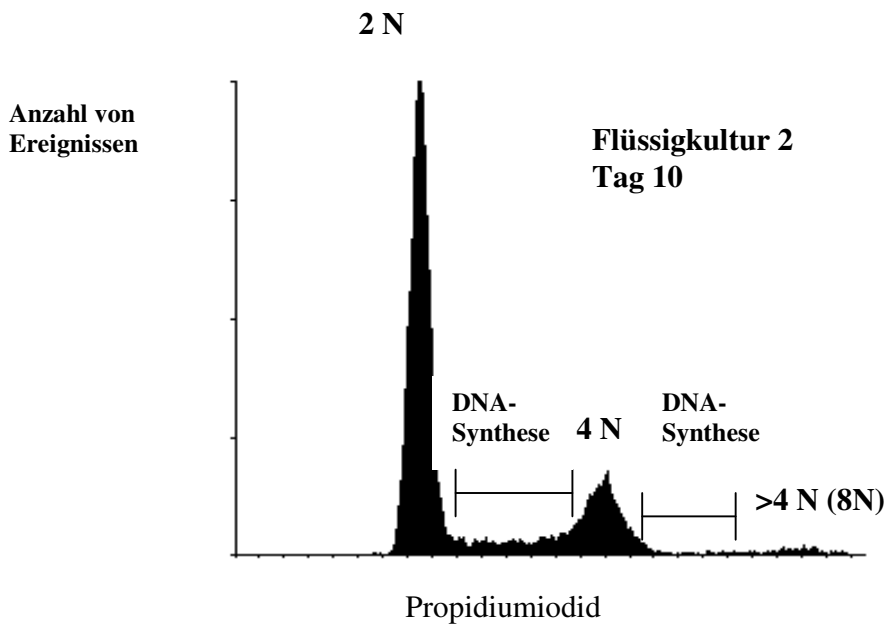


Abbildung 26: Exemplarische Abbildung einer Ploiditätsmessung von megakaryozytären Vorläuferzellen der zweiten Flüssigkultur. Uniparametrische Darstellung des DNA-Gehaltes (linear) nach PI-Färbung. Diploider Chromosomensatz (2 N) mit $G_{0/1}$ -Zellen, Tetraploider Chromosomensatz (4 N) G_{2M} -Phase vor Mitose/Endomitose. Polyploider Chromosomensatz mit >8 N.

Bei den Messungen am Tag 10 betrug der Anteil der Zellen, die eine Ploidität von 2N (entsprechend der $G_{0/1}$ -Phase) besaßen, in der ersten Flüssigkultur $55 \pm 3\%$; bei $22 \pm 6\%$ betrug die Ploidität 4N ($3 \pm 2\%$ größer als 4N). Der restliche Anteil der Zellen sind apoptotische Zellen, bzw. Zellen mit einem intermittierenden Zell-Gehalt (DNA-Synthese), die von der Zählung ausgeschlossen wurden.

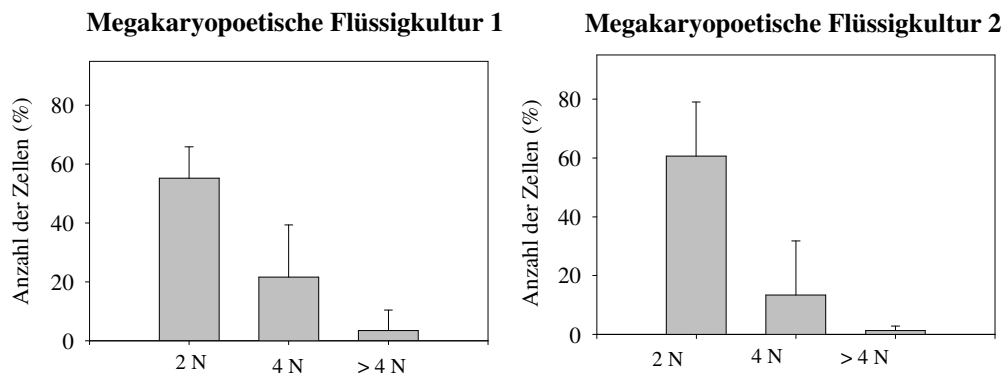


Abbildung 27: Ergebnisse der Ploiditätsanalyse von ex-vivo expandierten Stammzellen in Flüssigkultur 1 und 2 zum Nachweis polyploider megakaryozytärer Vorläuferzellen an Tag 10.

Ähnlich verhielt es sich mit der zweiten Flüssigkultur am 10. Tag. $60,6 \pm 6,1\%$ der Zellen wiesen eine Ploidität von $2N$, $13,4 \pm 6,1\%$ von $4N$ auf und nur $1,3 \pm 0,5\%$ besaßen eine Ploidität, die größer war als $4N$ (Abbildung 27).

Zusammenfassend konnte unter Verwendung beider Kulturbedingungen nur ein sehr geringer Anteil von Zellen mit einer Ploidität $>4N$ nachgewiesen werden. Die Induktion der Endomitose gelang nur unzureichend, so dass das Charakteristikum von reifen Megakaryozyten, eine hohe Ploidität bis $32N$ aufzuweisen, in-vitro nicht erreicht werden konnte.

4. Diskussion

4.1 Hämatopoetische Erholung

Für Patienten mit fortgeschrittenen hämatologischen Erkrankungen ist die autologe PBSZT nach HDC als eine der Behandlungsmöglichkeiten fest etabliert. Im Vergleich zur KMT verfügt sie über den Vorteil einer rascheren hämatopoetischen Regeneration mit einer kürzeren Phase der Leuko- und Thrombozytopenie und ist mit einer geringeren Komplikationsrate assoziiert (Chao et al. (1993), Beguin et al. (1998)). Im Vergleich zur KMT wird auch eine höhere Anzahl mononukleärer und hämatopoetischer Zellen im autologen Stammzellapheresat erreicht, die das hämatopoetischen Anwachsen erleichtern (Roberts et al. (1993), Ottinger et al. (1996)). Es wird angenommen, dass die dauerhafte Immunrekonstitution und Erholung des hämatopoetischen Systems nach Myeloablation neben den liniendeterminierten Vorläuferzellen zu einem großen Teil auf das regenerative Potential pluripotenter Stammzellen zurückgeführt werden kann (To et al. (1997)). Pluripotenten Stammzellen wird die Eigenschaft zugesprochen, nach Einnistung in das Knochenmarkstroma, neben der Befähigung zur Selbsterneuerung, das Potential zu besitzen, zu unterschiedlichen Vorläuferzellen sowohl der erythrozytären, myeloischen als auch der lymphatischen Reihe zu differenzieren (Waller et al. (1997)).

In der Vergangenheit wurde das Anwachsen im Knochenmark empirisch mit der absoluten Anzahl der transfundierten mononukleären Zellen korreliert. Heute lässt die Konzentration an CD34+ Zellen/kg Körpergewicht prädiktive Aussagen zur hämatopoetischen Rekonstitution nach HDC mit PBSZT zu (Juttner et al. (1998), Kessinger et al. (1988)). Um einen ausreichenden Wiederaufbau des Blut- und Immunsystems zu gewährleisten, wird für eine autologe Transplantation eine Stammzellkonzentration von mindestens 2×10^6 CD34+ Zellen/kg Körpergewicht empfohlen (Bender et al. (1992), Pecora (1999)). Das Anheben der Konzentration an CD34+ Zellen/kg Körpergewicht über die Mindestanzahl hinaus (z. B. 4×10^6 CD34+ Zellen/kg Körpergewicht) ist mit einer schnelleren Rekonstitution korreliert (Olivieri et al. (1998), Pecora (1999)). Neben der Transplantationsdosis sind unter anderem die zugrunde liegende Diagnose des Patienten, die vorher verwendete Therapie und der Remissionsstatus als Einflussgrößen für den Erfolg der Transplantation wichtig (Bensinger et al. (1995), To et al. (1997)).

Alle Patienten dieser Studie wiesen nach HDC eine schwere Neutro- und Thrombozytopenie auf, die in einem Zeitraum von zirka zwei Wochen nach PBSZT überwunden werden konnte. Die neutrophilen Granulozyten stiegen am 10. Tag (± 1) über die kritische Grenze von 500 Zellen/ μl . Die Megakaryozyten regenerierten sich nach Einnisten im Knochenmark und führten zu einem initialen Anstieg der Thrombozyten am 13. Tag (± 3) nach PBSZT auf mehr als 20/nl im peripheren Blut mit einer weitgehenden Transfusionsfreiheit. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit denen anderer Gruppen und zeigen, dass nach einer autologen PBSZT die initiale hämatopoetische Erholung verglichen mit der KMT früher erfolgt (Henon et al. (1992), Ottinger et al. (1996), Martinez et al. (1999)).

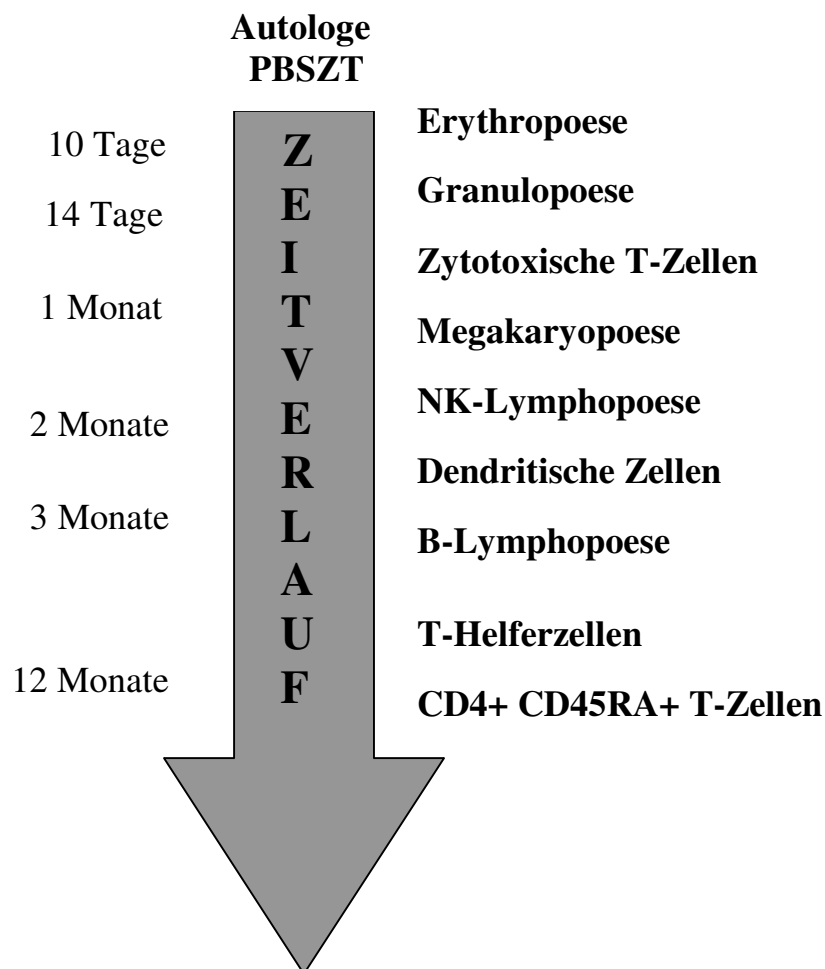


Abbildung 28: Kinetik der hämatopoetischen Erholung und Immunrekonstitution nach einer HDC mit nachfolgender PBSZT.

Die Erholung des hämatopoetischen Systems in einem kurzen Zeitraum von 14 Tagen lässt auf das Anwachsen und die Ausreifung von liniendeterminierten Vorläuferzellen schließen, die zumindest eine Kurzzeit-Hämatopoese gewährleisten. Für die Langzeit-Hämatopoese hingegen, die nachfolgend eine permanente Nachbildung aller Blutzellreihen gewährleisten soll, sind transplantierte pluripotente hämatopoetische Stammzellen verantwortlich (Olivieri et al. (1998), Pecora (1999)).

In unserer Studie wiesen einzelne Zellreihen der Hämatopoese eine unterschiedliche Kinetik ihrer Erholung auf. Bei den Leukozyten konnte nach einem kurzen Zeitraum von zwei Wochen eine stabile Erholung mit einer initialen Leukozytenzahl von $5510 \pm 589/\mu\text{l}$ beobachtet werden. Gerade in den ersten Wochen der Transplantations-assoziierten Immunsupprimierung spielt die Erholung dieser Zellen eine große Rolle in der ersten Abwehrfront gegenüber Krankheitserregern. Die initiale Monozytose einen Monat nach PBSZT kann durch Myelostimulation durch das post-transplantationem applizierte G-CSF verursacht worden oder durch Transfusion sehr hoher Monozyten-Zellkonzentrationen während der PBSZT bedingt sein (Ottinger et al. (1996)).

Der initiale Thrombozytenanstieg auf über 20 Zellen/nl erfolgte nach 13 ± 3 Tagen. Die dauerhafte Erholung der Thrombozyten erreichte bereits einen Monat nach PBSZT den unteren Normbereich, fiel im Mittel jedoch leicht auf $119 \pm 12/\text{nl}$ im 12. Monat zurück. Bei einer differenzierteren Datenanalyse fallen sieben Patienten mit einem verzögerten Anstieg der Thrombozyten auf über 20/nl am 17. bzw. am 18. Tag nach PBSZT auf, die darüber hinaus zum Teil einen erhöhten Thrombozytensubstitutionsbedarf aufwiesen. Die Beobachtung einer teilweise gestörten Mega- bzw. Thrombozytopoese nach PBSZT wird auch durch Ergebnisse anderer Gruppen bestätigt (First et al. (1985), Hermouet et al. (1997)).

4.2 Immunrekonstitution

Durch verschiedene Entwicklungswege sowohl während der Ontogenese als auch in Individuen nach HDC und PBSZT, ist die Rekonstitution der B-, T- und NK-Zellen einzeln zu bewerten (Charbonnier et al. (1997), Parkman und Weinberg (1997), Bomberger et al. (1998), Divine et al. (1999)).

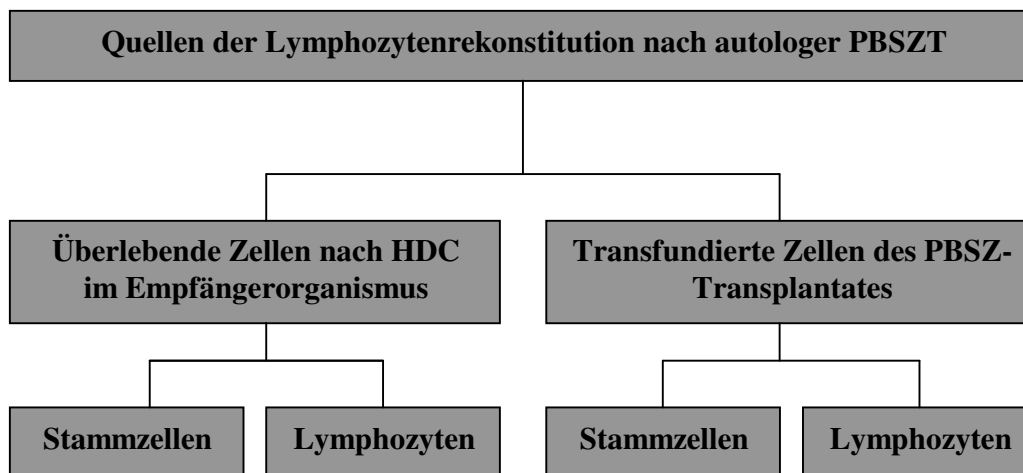


Abbildung 29: Verschiedene Quellen der Lymphozytenrestitution. Immunkompetente Lymphozyten können sich aus Stammzellen oder Lymphozyten im Transplantat oder aus residuellen Zellen nach HDC entwickeln.

In dieser Studie stiegen die NK-Zellen, definiert als CD3-CD56+ Zellen, im ersten Monat schnell auf Absolutzahlen von über 200/ μ l mit einer relativen NK-Zell-Lymphozytose an und wiesen nur geringe Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe auf. Eine Möglichkeit für die prompte und überschießende Regeneration der NK-Zellen ist deren Entwicklung aus Vorläuferzellen mittels weniger Zellteilungen nach Transplantation. Weiterhin können NK-Zellen des Stammzelltransplantates nach Transfusion in der peripheren Zirkulation überleben und auf diesem Wege zu einem schnellen NK-Zellanstieg führen, eine Möglichkeit, die auch Kook et al. (1996) in Erwägung gezogen haben. In der ersten Phase nach PBSZT stellen somit die NK-Zellen die numerisch größte Gruppe der lymphatischen Zellen dar, da zu dieser Zeit die B- und T-Lymphozyten in nur geringer Anzahl im peripheren Blut vorhanden sind. Die Aufgabe der NK-Zellen besteht darin, in der frühen Infektionsphase die Immunabwehr insbesondere gegen intrazelluläre Erreger aufrechtzuerhalten. Während der frühen Post-Transplantationszeit spielen die NK-Zellen anhand ihrer MHC-unabhängigen Zytotoxizität eine signifikante Rolle in der antiviralen Immunität und in der Tumorbekämpfung, bis sich die humorale und zelluläre Abwehr durch B- und T-Lymphozyten erholt hat (Aglietta et al. (1998)).

In dieser Studie wiesen die B-Lymphozyten eine verlängerte Rekonstitutionsphase auf. Im ersten Monat nach PBSZT konnten sie mit einem Anteil von < 1% nicht sicher nachgewiesen

werden. Erst in den darauf folgenden drei bis sechs Monaten konnten die B-Zellen durchflusszytometrisch mit einem Anteil von $12,8 \pm 3,8\%$ und $21,5 \pm 3,2\%$ detektiert werden. Eine fehlende Rekonstitution der B-Lymphopoese in den ersten Monaten nach der PBSZT, die zu einer erhöhten Infektanfälligkeit der Patienten in der frühen Phase nach Transplantation beiträgt, könnte auf eine lang andauernde oder beeinträchtigte B-Zellreifung im Knochenmark hinweisen. Eine unzureichende Zytokinproduktion könnte zusätzlich zu einem erschwerten „homing“ der für die B-Zell-Rekonstitution verantwortlichen Stammzellen beitragen (del Canizo et al. (1999)). Weiterhin ist das Knochenmarkstroma durch die HDC angegriffen und der Zell-Zell-Kontakt erschwert. Es kommt zu einer verspäteten Proliferation und Differenzierung der Stammzellen zu B-Vorläuferzellen. Wir konnten nachweisen, dass sich nach autologer PBSZT die B-Lymphozyten innerhalb eines Jahres erholen und zu einer normalen Konzentration ansteigen. Zwei weitere Studien, die die B-Zell-Entwicklung anhand der Expression von CD19 oder CD20 verfolgt haben, berichten, dass diese nach der Transplantation bis zu drei Monate erniedrigt sind. Nach allogener KMT konnten Kook et al. (1996) und nach einer CD34-Positivselektion Divine et al. (1999) das gleiche Phänomen beobachten.

Der verspäteten humoralen Antwort liegt nicht nur eine unzureichende und langsame Produktion an Immunglobulinen mit erniedrigten Immunglobulin-Serumspiegeln zu Grunde. Es wird diskutiert, dass auch das Isotyp-Switching, die sequentielle Reanrangierung der Leicht- und Schwereketten, die in der frühen Vorläuferzelle stattfindet und ein großes Repertoire an Antigenrezeptoren produziert, nicht nur durch ungenügend funktionierende unreife B-Zellen sondern auch durch unzureichende Unterstützung der T-Zellen beeinträchtigt sein kann (Small et al. (1990), Storek et al. (1993)).

Der prozentuale Anteil der T-Zellen betrug in dieser Studie bereits einen Monat nach PBSZT $54,8 \pm 3,8\%$ und war während des gesamten Beobachtungszeitraums stabil. Abgesehen von der Entwicklung aus Stammzellen können das Überleben von patienteneigenen T-Zellen während der HDC, sowie eine Transfusion der Lymphozyten im Transplantat zur raschen T-Zell-Rekonstitution beitragen. Die Rekonstitution der T-Lymphozyten fand mit normalen Werten der CD3+CD8+ T-Zellen statt, während CD3+CD4+ T-Zellen eine deutlich verzögerte Erholung aufwiesen. Die inverse CD4/CD8 Ratio spiegelt die ungleiche Entwicklung der T-Lymphozytensubpopulationen wieder.

Während einer normalen T-Zell-Entwicklung wandern Vorläufer-T-Zellen aus dem Knochenmark in den Thymus, wo sie sich einer Positiv- und einer Negativ-Selektion unterziehen müssen. Diese Selektion gewährleistet ein nicht autoreaktiv-reagierendes peripheres T-Zellrepertoire, das darauf spezialisiert ist, eine Vielzahl fremder antigener Strukturen zu erkennen (Janeway und Travers, 1997). Die Heranreifung im Thymus ist ein wichtiger Entwicklungsschritt der T-Zellen. Eine HDC- und/oder Bestrahlung greift auch den Thymus an und kann diesen Entwicklungsschritt beeinträchtigen. Darüber hinaus muss die altersbedingte Involution des Thymus berücksichtigt werden, die die Reifung der T-Zellen erschwert. Die verspätete Rekonstitution der CD3+CD4+ T-Lymphozyten lässt auf einen eingeschränkten Thymus-abhängigen Regenerationsweg schließen (Mackall et al. (1997), Sanders et al. (1998)). Nach autologer KMT ist eine verlangsamte Rekonstitution der CD3+CD4+ T-Zellen bereits in früheren Studien beschrieben worden (Henon et al. (1992), Koehne et al. (1997)). Durch eine solche Einschränkung ist eine Thymus-unabhängige Heranreifung der T-Zellen aus pluripotenten Stammzellen nach PBSZT eine wichtige Alternative.

Auch andere Gruppen fanden heraus, dass nach dem Verlust reifer T-Zellen durch die Myeloablation die T-Zellregeneration auf verschiedenen Wegen stattfinden kann (Storek et al. (1995), Sharp et al. (2000)). Weaver et al. (1994) bestätigten, dass das erste Aufkommen der T-Zellen nach PBSZT auf reife T-Zellen aus dem Transplantat zurückgeführt werden kann. Solche Zellen mit einer limitierten Diversität ihrer Rezeptoren können lange im peripheren Blut überleben, wenn sie bestimmten Interaktionen, wie zum Beispiel der Triggerung durch Antigene, ausgesetzt werden. (Roux et al. (1995), Tanchot und Rocha (1998)).

In dieser Arbeit findet die Rekonstitution der CD3+CD8+ T-Lymphozyten sehr rasch statt. Durch die Kenntnis, dass der Thymus nach einer HDC beschädigt ist, wird eine von hämatopoetischen Zellen ausgehende, rasche extrathymische Entwicklung der CD3+CD8+ T-Zellen angenommen. Studien anderer Gruppen untermauern diese Hypothese (Mackall et al. (1995), Heitger et al. (1997)). Darüber hinaus bestätigen Hakim et al. (1997) diese Annahme durch tierexperimentelle Versuche, in denen CD8+ T-Zellen in lymphoiden Organen athymischer Mäuse gefunden worden sind. Sie haben daraus die Existenz einer extrathymischen Generierung von zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten abgeleitet. Andere Gruppen konnten eine Korrelation zwischen der Entwicklung der CD4+ T-Zellen mit dem Alter der Patienten und der Thymusverkleinerung nach Chemotherapie feststellen, was jedoch

für die CD8+ T-Zellen nicht nachzuweisen war (Villers et al. (1994), Mackall et al. (1995) und (1997)) (Abbildung 30).

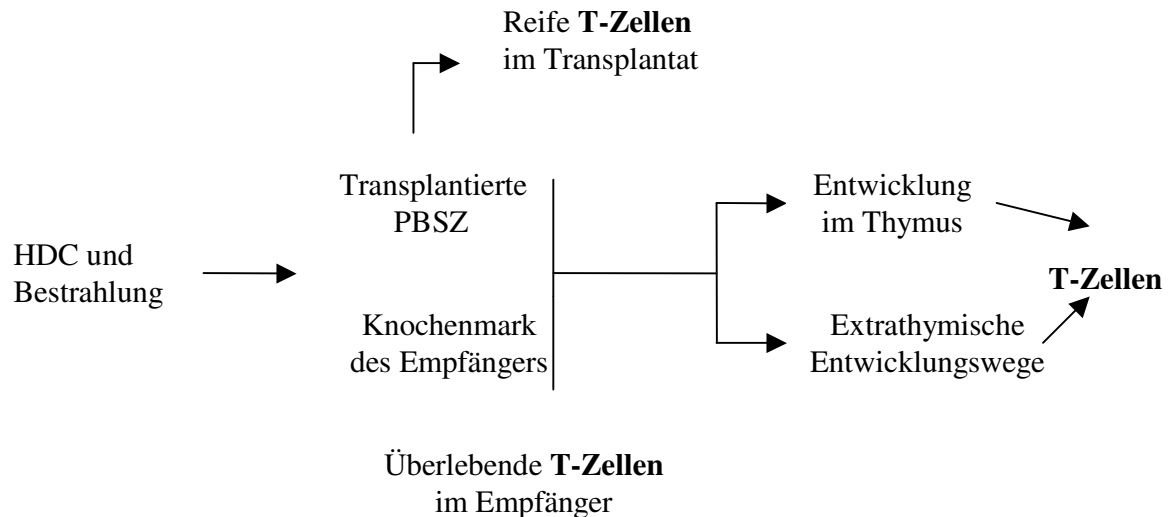


Abbildung 30: Herkunft der T-Zellen in Patienten nach PBSZT (modifiziert nach Guillaume et al. (1998))

In dieser Studie fand die Regeneration der CD3+CD8+ T-Lymphozyten mit einem überwiegenden Anteil der CD45RO+ Subpopulation sehr rasch statt, während sich die CD45RA+ Zellen verspätet entwickelten. T-Zellen exprimieren unterschiedliche Isoformen des CD45-Antigens. Sie können in die CD45 RO+ „Gedächtniszellen“ unterteilt werden, die direkt in-vitro durch Antigene aktiviert werden, und in CD45RA+ Zellen, die eine frühere T-Zell-Subpopulation darstellen und direkt aus dem Thymus ausgeschleust werden. Kurz im Anschluss an die Transplantation koexprimiert der überwiegende Anteil der T-Zellen das CD45RO-Antigen, während der Anteil der CD4+CD45RA+ T-Lymphozyten bis zu zwei Jahren stark erniedrigt ist, was im Einklang mit unseren Beobachtungen steht (Storek et al. (1995)). Heitger et al. (1997) haben gezeigt, dass eine residuelle Thymusfunktion unerlässlich für eine ausreichende Regeneration der naiven CD4+CD45RA+ T-Helferzellen ist.

Um einen Anhalt für die funktionelle Kapazität der T-Lymphozyten nach PBSZT zu erhalten, wurde in dieser Studie die intrazelluläre Zytokinproduktion der T-Lymphozytensubpopulationen gemessen. Einen Überblick über die Zytokine gibt Tabelle 7.

Zytokin	T-Zellen, die das Zytokin produzieren	Wirkung auf verschiedene Zellen
IL-2	TH-0 und TH-1 Zellen, einige zytotoxische Lymphozyten	T-Zell-Proliferation, NK-Zell-Proliferation
IFN γ	TH-1 Zellen, zytotoxische Lymphozyten	B-Zell-Differenzierung, aktiviert NK-Zellen, Makrophagen-Aktivierung
TNF α	TH-1-Zellen, einige TH-2-Zellen, zytotoxische Lymphozyten	Makrophagen-Aktivierung, Induktion der NO-Bildung

Tabelle 7: Überblick über die Herkunft und die Funktion der untersuchten Zytokine

Um die Kapazität der de-novo Zytokinsynthese beurteilen zu können, wurde auf eine in-vitro Stimulation der Zellen zurückgegriffen. Wir konnten zeigen, dass kurz nach PBSZT die IFN γ -Produktion der CD3⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war. Sie konnte sich jedoch während der zwölfmonatigen Beobachtungszeit normalisieren. Im ersten Monat betrug die IL-2-Produktion der untersuchten Patienten einen Anteil von $17,0 \pm 6,0\%$ an CD3⁺IL-2⁺ Zellen, der im weiteren Verlauf stabil blieb. Diese Beobachtung steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen der bisher publizierten Studien. Miller et al. (1991) berichten über eine gestörte IL-2-Produktion früh nach Transplantation, wobei man bedenken sollte, dass sie eine ELISA-Technik bei Patienten nach autologer KMT angewendet haben.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte eine signifikant gesteigerte TNF α -Produktion von $29,4 \pm 4,0\%$ festgestellt werden, die auf eine ungestörte Produktion durch die T-Zellen hinweist. Die Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion der T-Lymphozyten zeigt eine ausreichende funktionelle Integrität mit der Ausnahme des signifikant erniedrigten Anteils der IFN γ -produzierenden T-Lymphozyten. Abgesehen von der Beeinflussung der Zytokinproduktion durch die zellschädigende Wirkung der HDC, könnte die unzureichende IFN γ -Produktion auch durch die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit der T-

Lymphozytensubpopulationen, insbesondere der signifikant erniedrigten CD3+CD4+ Zellen erklärbar sein.

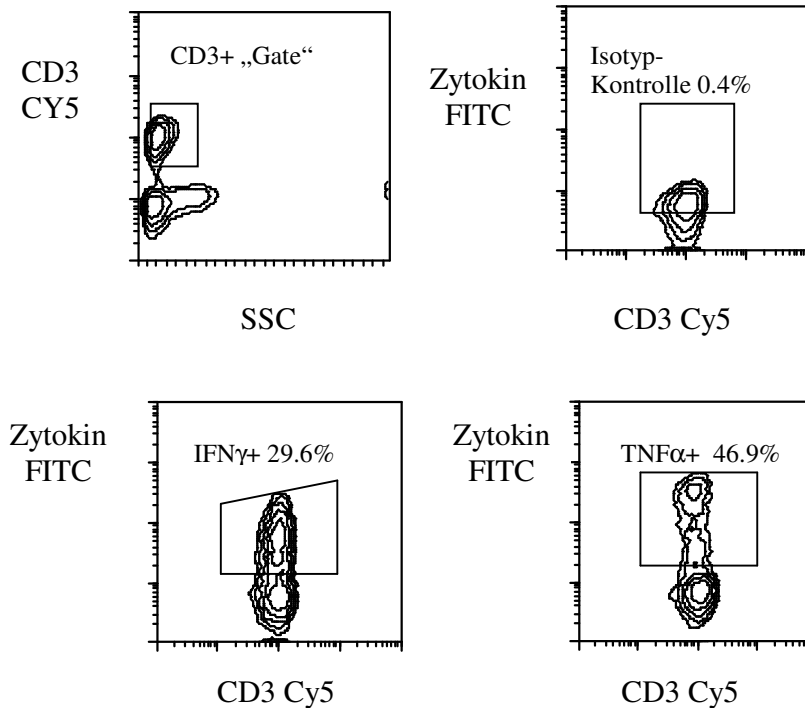


Abbildung 31: Ein repräsentatives Beispiel einer intrazellulären durchflusszytometrischen Analyse der von T-Lymphozyten nach einer PMA/Ionomycin Stimulation produzierten Zytokine.

Im Gegensatz zur raschen CD8+ T-Zell-Regeneration stellten wir einen limitierten Anteil von CD3+CD4+ T-Helferlymphozyten fest. Die verspätete Regeneration der CD3+CD4+ T-Lymphozyten und ihre verminderte IFN γ -Produktion stehen im Einklang mit einer erhöhten Infektanfälligkeit, an der Patienten nach Stammzelltransplantation häufig leiden. In einer multivariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass in Patienten nach PBSZT eine Anzahl an CD4+ Zellen von weniger als 200/ μ l mit einem erhöhten Infektionsrisiko assoziiert ist, wie z.B. das Risiko an einer Varizella-Zoster-Infektion zu erkranken. (Offidani et al. (2001)). Bei diesen Ergebnissen wurde auf eine in-vitro Stimulation der Zellen zurückgegriffen. Es muss jedoch bedacht werden, dass eine solche in-vitro-Stimulation der Zellen nicht die in-vivo herrschenden Bedingungen widerzuspiegeln vermag. Die Ergebnisse dienen als Surrogatmarker für die Funktion der Zellen (Jung et al. (1993)). Eine beispielhafte durchflusszytometrische Analyse der Zytokine ist in Abbildung 31 dargestellt.

4.3 Megakaryopoetische Flüssigkultur und Ex-Vivo-Expansion

Für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen ist nach einer HDC mit nachfolgender PBSZT eine verlängerte und ausgeprägte Thrombozytopenie eine mögliche Komplikation (First et al. (1985), Hermouet et al. (1997)). Dieses Phänomen konnte bei sieben der 24 Patienten der Rekonstitutionsstudie festgestellt werden. Eine verlängerte Thrombozytopenie weist einerseits auf einen Stammzelldefekt mit einer gestörten hämatopoetischen Erholung hin. Andererseits wird das Knochenmarkstroma durch die vorangegangene myeloablative HDC in Mitleidenschaft gezogen. Durch die verminderte Produktion an Zytokinen und dem angegriffenen zellulären Stromabett kann es zu einer gestörten Einnistung der Zellen in das Knochenmark kommen. Die unzureichende Produktion an megakaryozytären Wachstumsfaktoren durch das Knochenmarkstroma trägt zur verzögerten Megakaryopoese bei.

Eine ausgeprägte, zur Blutungskomplikation neigende Thrombozytopenie wird durch Thrombozytenkonzentrate behandelt, die eine schnelle, relativ komplikationslose Anwendung erlauben. Seit den 70er Jahren stehen hoch aufgereinigte, maschinell gewonnene Thrombozytenkonzentrate zur Substitutionstherapie zur Verfügung. Im Gegensatz zu einem sehr niedrigem Restrisiko der Transmission von infektiösen Erkrankungen und nur in Einzelfällen beschriebenen Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, bilden manche Patienten bei wiederholter Thrombozytensubstitution Allo-Antikörper, die die Überlebenszeit der transfundierten Thrombozyten beeinträchtigen und zu einer Refraktärität der Substitution führen.

Im Rahmen der HDC und PBSZT werden zurzeit Präventivstrategien entwickelt, die das Auftreten einer lang andauernden und substitutionspflichtigen Thrombozytopenie zu verhindern vermögen. Eine Möglichkeit, die Thrombozytopenie zu minimieren, könnte die Gabe von Zytokinen, wie z. B. IL-11 und TPO sein. Von diesen Zytokinen wird erhofft, dass sie die Thrombopoese direkt in-vivo stimulieren können (Molineux et al (1996), Tepler et al. (1996)). Aber bis jetzt haben Studien gezeigt, dass TPO sich nicht als effektiv erweist, die durch Myeloablation hervorgerufene Thrombozytopenie zu verhindern. Obwohl TPO die Megakaryozytenreifung in-vitro induziert, scheint es in-vivo die Megakaryozytenentwicklung nicht signifikant zu beschleunigen (Nash et al. (2000)).

Als weitere Maßnahme zur Vorbeugung einer verlängerter Thrombozytopenie nach PBSZT wird die Kotransplantation von ex-vivo expandierten megakaryozytären Vorläuferzellen zum Stammzellprodukt diskutiert. Es wird angenommen, dass kotransplantierte megakaryozytäre Vorläuferzellen in der Lage sind, durch Proliferation und Differenzierung die Zeit der Thrombozytopenie zu überbrücken. Untermuert wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass bei Patienten mit einem hohen Anteil an CD41 koexprimierenden CD34+ Zellen im Stammzelltransplantat die Zeit bis zur Thrombozyten-Erholung deutlich verkürzt ist (Begemann et al. (2002)). Aus den oben angeführten Gründen haben wir uns für die experimentelle Ex-Vivo-Expansion von megakaryozytären Vorläuferzellen aus peripheren Blutstammzellen interessiert.

In unserer Studie sind für die megakaryopoetischen Flüssigkulturen mit peripheren Blutstammzellen als Quelle zwei Zytokinkombinationen gegenübergestellt worden. Der Unterschied liegt sowohl in der Zytokinkonzentration als auch in der Zusammensetzung. Bei der zweiten Flüssigkultur wurden SCF, IL-6 und IL-11 jeweils in einer höheren Konzentration (20 bzw. 25ng/ml) als bei Flüssigkultur 1 (10 ng/ml) eingesetzt. Auch wurde statt MIP-1 α und FLT3-Ligand in der zweiten Kultur zur Proliferationsinduktion IL1- β eingesetzt. TPO wurde im Gegensatz zu der Flüssigkultur 1 in einer zehnfach höheren Konzentration von 100ng/ml eingebracht, um die Ausreifung zu megakaryozytären Vorläuferzellen zu optimieren.

Die erste Zytokin-Kombination ist einer Publikation von Bertolini et al. (1997) entnommen. Die Arbeitsgruppe untersuchte erstmalig den Effekt einer Kotransplantation von ex-vivo expandierten Megakaryozyten auf die Hämatopoese und insbesondere auf die megakaryozytäre Regeneration nach autologer PBSZT. Es gelang Bertolini et al., die CD34+CD61+ Zellen und die absolute Anzahl an CD61+ Zellen in-vitro stark zu vermehren. Die Thrombozytopenie wurde bei Patienten, die ex-vivo expandierte Megakaryozyten erhielten, nicht verhindert, jedoch der Schweregrad reduziert, so dass bei zwei von vier Patienten, die die höchste Dosis an expandierten Megakaryozyten erhielten, eine Thrombozytensubstitutionen nicht benötigt wurde. Auch traten keine ernsthaften Nebenwirkungen oder Komplikationen bei der Transfusion von ex-vivo expandierten megakaryozytären Vorläufern auf.

In unserer Studie wurde Serum-freies Medium verwendet. Serum enthält inhibitorische Zytokine, die das Wachstum der Megakaryozyten supprimieren. Darunter fallen TGF- β , β -

Thromboglobulin oder PF-4, die physiologisch im Serum vorhanden sind oder von aktivierten Thrombozyten ausgeschleust werden (Poloni et al. (1997)). Bei der Suche nach den optimalen Kulturbedingungen ist die Wahl anderer Parameter, wie die angemessene Kultivierungszeit, die Biokompatibilität der verwendeten Materialien oder die Sauerstoffkonzentration und die Temperatur im Brutschrank ebenfalls von Bedeutung.

Die Zytokinzusammensetzung gehört zu den größten Variablen in Flüssigkulturen zur megakaryozytären Ausreifung und wird kontrovers diskutiert. Die Rolle von MIP-1 α wird unterschiedlich bewertet. Es besitzt auf der einen Seite einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Vorläuferzellen, kann in Kombination mit IL-3 aber gleichzeitig einige Subpopulationen der Vorläuferzellen in ihrem Wachstum unterstützen. IL-6 besitzt einen positiven Einfluss auf die nukleäre und zytoplasmatische Reifung der Megakaryozyten. Gemeinsam mit IL-11 kann IL-6 einen positiven Effekt im letzten Reifungsstadium der Megakaryopoese ausüben, in dem sie die Differenzierung der megakaryozytären Vorläuferzellen unterstützen (van den Oudenrijn et al. (1999)). IL-3 induziert die Vermehrung der absoluten Anzahl der megakaryozytären Vorläuferzellen (Dolzhanskiy et al. (1997)). Abgesehen von TPO, ist IL-3 das einzige Zytokin, das die Expression des Glykoproteins CD41 beschleunigen kann. Für IL-1 β wurde ein synergistischer Effekt mit IL-3 festgestellt.

Als Auswertesysteme zum Nachweis megakaryozytärer Vorläuferzellen dienten in unserer Studie Koloniebildungen in semisoliden Kurzzeitkulturen, durchflusszytometrische Analysen von Oberflächen-Antigenen und der Nachweis von Endoreduplikationen mittels DNA-Färbungen nach Permeabilisierung der Zellen.

Bei der Megakaryozyten-Kurzzeitkultur auf Kollagenbasis wurden sowohl noch nicht in Kultur gebrachte aufgereinigte Stammzellen wie auch Zellen aus der megakaryozytären Flüssigkultur eingebracht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit wurden statistisch nicht verwertet. Zunächst ergaben sich technische Probleme, wie die mehrmalige Änderung des Testsystems vom Hersteller, Ablösen der Kolonien auch nach Fixierung und eine fehlende Linearität bei Verdünnungsreihen. Weiterhin zeigte sich eine starke intra- und interindividuelle Varianz, die bei solchen Testsystemen bereits mehrmals beschrieben wurde (Lumley et al. (1997) Sheikhzadeh et al. (2002)).

Die FACS-Ergebnisse konnten mittels APAAP-Färbungen, die vereinzelt durchgeführt wurden, bestätigt werden. Abbildung 32 zeigt große Zellen mit einem gelappten und

unterteilten Kern. Aufgrund des hohen Probendurchsatzes wurde die Koexpression von Megakaryozyten-Antigenen nur mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

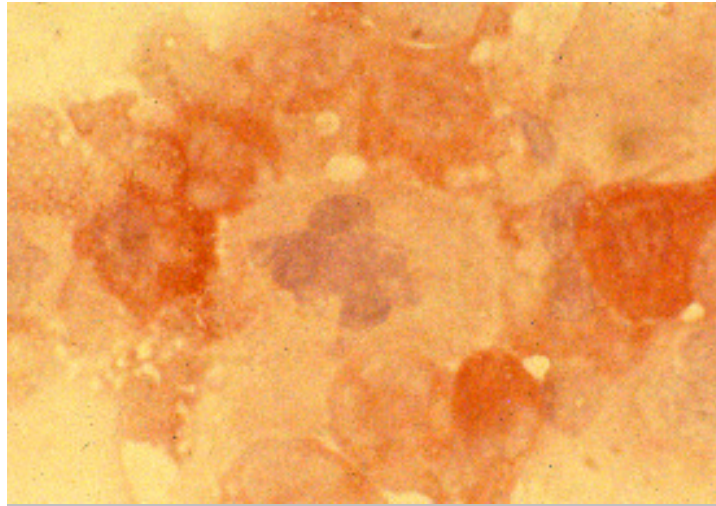


Abbildung 32: APAAP-Bild einer megakaryozytären Vorläuferzelle. In der Mitte des Bildes ist eine megakaryozytäre Vorläuferzelle zu erkennen, die einen großen gelappten Kern aufweist und sich durch ihre Größe von den sie umgebenden Zellen unterscheidet. Die Zellen stammen aus der Flüssigkultur 2, sind auf Objektträger gebracht, fixiert und schließlich mittels einer APAAP-Färbung gegen das CD41-Antigen gefärbt worden.

Zur Analyse der Megakaryozyten-Expansion und Oberflächenexpression der spezifischen Membranrezeptoren CD41, CD61 und CD42 wurde die Zwei-Farb-Durchflusszytometrie anhand von Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern angewendet. Für die Bestimmung des Zellwachstums wurde eine Gesamtzellzählung durchgeführt. In beiden Flüssigkulturen expandierten die eingebrachten CD34+ Stammzellen innerhalb von 10 Tagen um den Faktor 20 (23 fach versus 19 fach). Bei der Auswertung aller Versuchsreihen (n=10) konnte im Mittel keine weitere Expansion aller Zellen nachgewiesen werden. Grundsätzlich konnte in Abhängigkeit zum heterogenen Ausgangsmaterial eine hohe interindividuelle Variabilität der Proliferation aufgezeigt werden.

In sechs von 10 Ex-Vivo-Expansionen gelang es uns, eine extrem hohe Proliferation der Gesamtzellen zu induzieren. Hierbei wurden die an Tag 0 eingebrachten CD34+ Zellen im Mittel um den Faktor 71 (in Flüssigkultur 1) bzw. 45 (Flüssigkultur 2) expandiert. Während unter den Bedingungen der Flüssigkultur 2, mit dem Fehlen von MIP-1 α und FLT3 und der höheren Konzentration an TPO, die Expansion nach Tag 8 nicht gesteigert werden konnte,

zeigte die Flüssigkultur 1 mit Vorhandensein der Zytokine MIP-1 α und FLT3 einen kontinuierlichen Anstieg der Expansion und hatte sich im Mittel um den Faktor 100 an Tag 14 vermehrt. Nach unseren Daten reicht eine niedrige Konzentration von SCF, IL-6, IL-11 und TPO für eine Induktion der Megakaryozytenwachstums aus. MIP-1 α und FLT3 scheinen einen weiteren positiven Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung auszuüben. IL1 β konnte in Flüssigkultur 2 jedoch die Proliferation nicht nennenswert steigern.

Es zeigt sich, dass bei Ex-Vivo-Expansionen große Qualitätsunterschiede im Ausgangsmaterial existieren. Das Stammzellmaterial einiger Patienten ist in der Lage, eine hohe Expansionsrate aufzuweisen, während bei gleichen Kultur- und Untersuchungsbedingungen Stammzellen anderer Patienten eine schlechte Vermehrungs- und Differenzierungskapazität besitzen. Wichtige Einflussgrößen sind hierbei das Alter, die zugrunde liegende Diagnose und die Dauer der Erkrankung sowie auch die Therapie. Diese Daten legen nahe, dass bei ausreichender Vermehrung eine klinische Anwendung am Patienten möglich wäre und man mit geeignetem Material genügend Zellen für eine Kotransplantation von megakaryozytären Vorläuferzellen zum Stammzelltransplantat generieren könnte.

Abgesehen von den oben erwähnten individuellen Einflussgrößen, spielen auch äußere Faktoren für einen mangelnden Proliferationsanstieg während der späteren Untersuchungszeitpunkte eine Rolle. Ohne Medienwechsel und einer weiteren Zytokingabe ist das Wachstum der Zellen stark beeinträchtigt. Gleichzeitig erzeugt eine zu starke Zellkonzentration in den 2 ml fassenden Böden der Sechs-Loch-Platte eine Kontaktinhibierung. Ein Medienwechsel mit einer Semidepopulierung der Kultur kann dieses Problem lösen. Auch in dieser Studie wurde eine Versuchsreihe mit Medienwechsel und Teilung der Kultur durchgeführt, bei denen gute Ergebnisse erzielt worden sind. Wenn auch die Expansion der Zellen nicht stark gesteigert werden konnte, wurde bei einigen Patienten eine CD41-Expression von über 90% erreicht.

Beide Flüssigkulturmodelle sind geeignet, neben der oben besprochenen Proliferation, auch die Differenzierung zu megakaryozytären Vorläuferzellen zu induzieren. An Tag 10 exprimieren die ex-vivo expandierten megakaryozytären Vorläuferzellen in beiden Flüssigkulturen im Mittel 36% das CD41-Antigen. Ein vergleichbares Expansionsmuster konnte für das Oberflächenantigen CD61 mit 20 versus 25% und für das CD42-Antigen mit 30 versus 27% an Tag 10 beobachtet werden.

Über diesen Beobachtungszeitraum hinaus zeigten die Antigene CD41 und CD61 eine ähnliche Expressionskinetik in beiden Flüssigkulturen. Ein Grund hierfür könnte daran liegen, dass beide einen Teil des Glykoproteins (GP) IIb/IIIa, auf der Megakaryozyten-Membran bilden.

Währenddessen begannen bemerkenswerter Weise die eingebrachten Vorläuferzellen in Flüssigkultur 2 unter 100ng TPO/ml wesentlich früher das Oberflächenantigen CD42 zu exprimieren (Tag 8: 16% versus 27%).

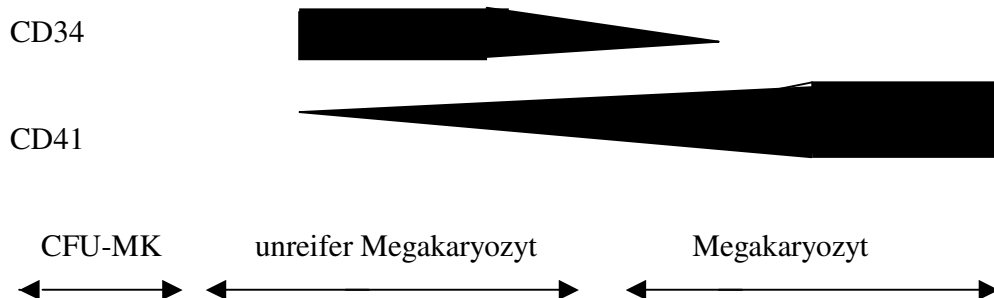


Abbildung 33: Anteil der CD34-Expression während der Megakaryopoese

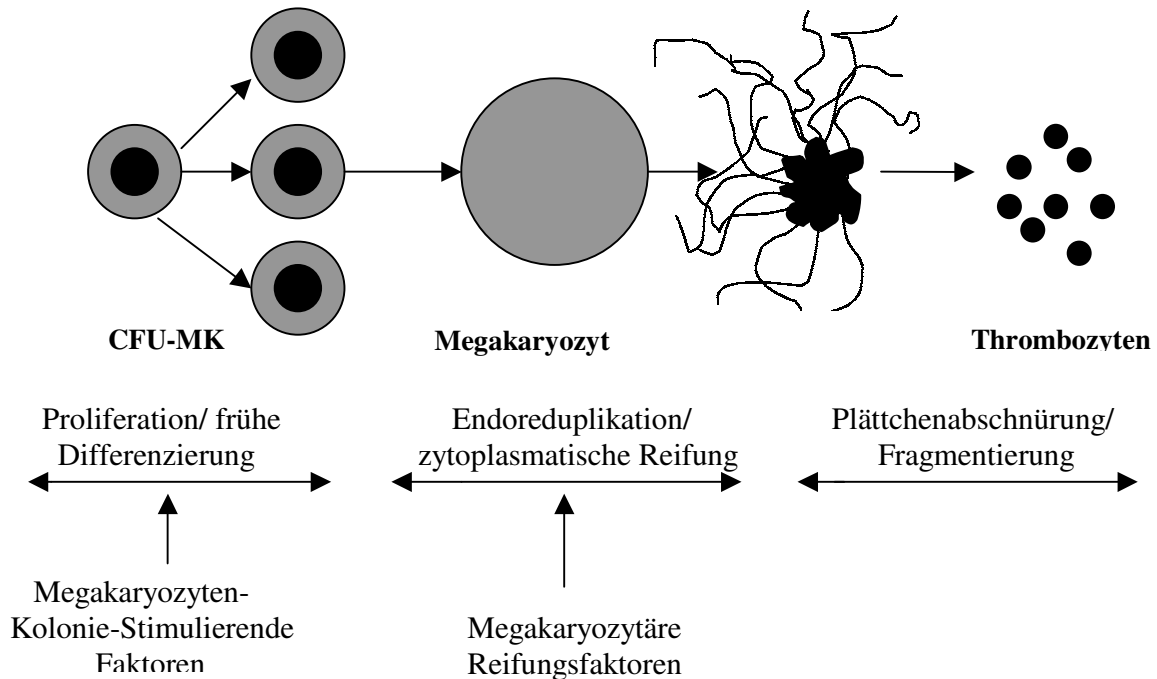
Die zehnfach höhere Dosierung des TPO in Flüssigkultur 2 könnte dazu beitragen, da es als Induktor der CD42-Expression gilt. Der Oberflächenmarker CD42 existiert als Teil eines anderen Rezeptors auf der Megakaryozyten-Membran, der in einer späteren Phase der Megakaryozyten-Differenzierung exprimiert wird. Dolhanskiy et al. untersuchten 1997 den Einfluss, den IL-3 auf die Expression von CD42 ausübt, und stellten fest, dass die TPO-induzierte Entwicklung des CD42 vom IL-3 fast vollständig unterdrückt werden kann. Die verspätete Expression des CD42 in dieser Studie läge damit nicht nur an der physiologisch späteren Entwicklung, sondern auch an der Verwendung von IL-3 in der Zytokinkombination beider Kultursysteme.

Im Laufe ihrer physiologischen Entwicklung im Knochenmark verlieren die megakaryozytären Vorläuferzellen ihr Expansionspotential und beschränken sich auf ihre Ausdifferenzierung. Hierbei findet typischerweise eine Kernteilung ohne eine Zellteilung statt (Endomitose oder Endoreduplikation), die zu einer Erhöhung der Ploidität führt. Polyploidität ist ein Charakteristikum reifer Megakaryozyten und deren Nachweis wichtiger Bestandteil einer vollständigen Megakaryozyten-Analyse. Da sich bereits im Vorfeld die Detektion der Ploidität als schwierig gestaltete, mussten bei der Etablierung der Methode mehrere Punkte

berücksichtigt werden. Bei Vorversuchen zur Optimierung der Fixierung hat sich die Fixierung mit Ethanol im Vergleich zu unterschiedlichen PFA-Konzentrationen unter Zuhilfenahme von Triton X als exakteste und einfachste Methode durchgesetzt.

In beiden Flüssigkulturen konnten am 10. Tag lediglich 1-3% megakaryozytäre Vorläuferzellen mit polyploiden Kernen ($>4N$) nachgewiesen werden (3% in Flüssigkultur 1 und 1% für Flüssigkultur 2). Unter Berücksichtigung der CD41-Koexpression und der Ploiditätsanalyse sind die verwendeten Flüssigkulturen bezüglich der Induktion von megakaryozytären Vorläuferzellen als gleichwertig einzustufen. Im Gegensatz zu unseren Erwartungen konnte unter hoher TPO-Konzentration keine verstärkte Ausreifung zu polyploiden Megakaryozyten beobachtet werden. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen versagte somit die Ausreifung zu polyploiden Megakaryozyten. Auch anderen Studien gelang es selten, Ploiditätswerte > 4 bzw. $8N$ zu erreichen (Debili et al. (1993), Dolzhanskiy et al. (1997)). Auch bei Kratz-Albers et al. (2000) weist die Mehrzahl der ex-vivo generierten CD61+ Zellen eine Ploidität von $4N$ und $8N$ auf. Bis jetzt ist es sehr wenigen Gruppe gelungen, die Ausreifung der Megakaryozyten mit Bildung von Demarkationslinien bis hin zur Plättchenabschnürung beschreiben zu können.

In Widerspruch dazu berichten Tajika et al. (2000), dass die Hinzugabe einer hohen Konzentration an TPO die Endomitose steigert. Während einer 48h-Inkubation unreifer Megakaryozyten mit 100ng/ml TPO (zusammen mit SCF und/oder IL-6 in der gleichen Konzentration) konnten sie Zellen mit einem DNA-Gehalt von $32N$ und $64N$ generieren. Auch in unserer Versuchsreihe wurde TPO in der zweiten Flüssigkultur in gleich hoher Konzentration eingesetzt. Dadurch sollte der Effekt einer zehnfach höheren Dosierung von TPO auf die Megakaryopoese beurteilt werden. Im Gegensatz zu unserer zweiten Flüssigkultur bestand die Zytokinkombination jedoch aus einer wesentlich höheren Anzahl an weiteren Zytokinen. Unter diesen befand sich auch IL-3 mit einem inhibitorischen Einfluss auf die Megakaryozytenreifung (Dolzhanskiy et al. (1997)), während Tajika et al. sich ausschließlich auf die zusätzlichen Zytokine SCF und IL-6 beschränkten. Die Rolle, die TPO in der Megakaryopoese spielt, ist in der Abbildung 34 dargestellt.



Einfluss des TPO

Expression des c-MPL (TPO-Rezeptors)

Abbildung 34: Rolle des TPO in der Megakaryopoese. Das TPO übt seinen Einfluss in allen Phasen der Megakaryopoese aus. Der TPO-Rezeptor wird in einer sehr frühen Phase der Megakaryopoese auf den Zellen exprimiert.

Tomer et al. (1988) konnten bei einigen Zellen der Megakaryopoese eine Polyploidität von 32N und 64N verzeichnen, jedoch betrug der Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt bis zu 8N über 80%.

Zusammenfassend kann man während einer Ex-Vivo-Expansion einen Stillstand der Megakaryozytendifferenzierung beobachten. In-vitro kommt es zu einem Verlust der Zell-zu-Zell-Kontakte aus der Umgebung, die während einer Reifung im Knochenmark gegeben sind. Zukünftige Versuchsreihen werden sich mit der Zugabe eines Stroma-Layers zur Flüssigkultur befassen und sich mit der Ausweitung auf die megakaryozytäre Ausreifung beschäftigen.

5. Zusammenfassung

Bei der Behandlung von Patienten, die an hämatologischen und onkologischen Erkrankungen leiden, hat sich die periphere Blutstammzelltransplantation nach einer Hochdosischemotherapie als eine Behandlungsalternative durchgesetzt. Die Rekonstitution der Langzeithämatopoese und des angeborenen und erworbenen Immunsystems ist eine richtige Voraussetzung für die nachhaltige Akzeptanz einer hochdosierten myeloablativen Chemotherapie und eng vergesellschaftet mit möglichen Komplikationen, insbesondere der Komorbidität durch Infektionen. Um die Entwicklung der Hämatopoese und Lymphopoese nach einer autologen peripheren Blutstammzelltransplantation aufzeigen zu können, wurde diese bei 24 Patienten mit verschiedenartigen hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren an unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von einem Jahr untersucht.

Nach einer kurzen Periode einer schweren Neutro- und Thrombozytopenie von weniger als vierzehn Tagen, rekonstituierte sich das hämatopoetische System rasch und ging im weiteren Verlauf in eine stabile Langzeit-Hämatopoese über. Bei einigen Patienten zeigte sich jedoch eine leicht verzögerte Erholung der Thrombopoese mit längerer Thrombozytensubstitutionspflicht. Die Ergebnisse zur Rekonstitution des Immunsystems sind komplexer. Ein Monat nach PBSZT konnte eine relative Monozytose (16%) und NK-Lymphozytose (24%) beobachtet werden. Dieses Phänomen kann durch die hohe Konzentration von transfundierten mononukleären und NK-Zellen ausreichend erklärt werden. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist die nach einem Monat nachgewiesene fehlende Rekonstitution der B-Lymphozyten (<1%). Diese ausgeprägte Defizienz steht im Einklang mit der Beobachtung niedriger Immunglobulinspiegel und erklärt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen Erregern, die klinisch nach PBSZT und KMT beschrieben wurden. Nach Ergebnissen unserer Studie rekonstituieren sich die B-Lymphozyten drei Monate nach PBSZT mit einem Anteil von 13 % aller Lymphozyten.

Während die CD3+CD8+ T-Lymphozyten eine ausreichende Rekonstitution zeigten, zeigten die T-Helfer-Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraumes signifikant erniedrigte Werte. Dieser Unterschied erklärt sich durch die extrathymische Entwicklung der CD3+CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten, die von der Schädigung der Thymus durch die Hochdosischemotherapie unbeeinflusst bleibt.

Um einen Einblick in die funktionelle Kapazität der T-Lymphozyten nach PBSZT zu erhalten, wurden mittels einer in-vitro Stimulation mit Phorbol-12Myristat-13Acetat und Ionomycin die von ihnen produzierten Zytokine durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich eine suffiziente Zytokinproduktion mit der Ausnahme von erniedrigten IFN γ -Werten.

Ein Ansatz, Thrombozytensubstitutionen mit dem Restrisiko von Allo-Antikörperbildung, Spender-gegen-Wirt-Reaktionen und Transmission von Infektionen nach Hochdosisschemotherapien mit Stammzelltransplantationen zu minimieren, ist die Generierung und Transplantation von megakaryozytären Vorläufern aus patienteneigenen Stammzellen. Mit der Kotransplantation megakaryozytärer Vorläuferzellen soll die Zeit bis zur Thrombozyten-Erholung überbrückt werden. Mittels zweier Flüssigkulturen mit verschiedenen Zytokinkombinationen wurde im zweiten Teil der Arbeit die Kinetik der Megakaryopoese in-vitro untersucht. Durchflusszytometrisch wurde der Anteil der Megakaryozyten-typischen Oberflächenmerkmale CD41, CD42 und CD61 gemessen. Bei beiden Flüssigkulturen konnte ein Anstieg der CD41+ und CD61+ Zellen bereits nach vier Tagen festgestellt werden.

Eine differenzierte Auswertung von sechs Flüssigkulturen mit überdurchschnittlichem Wachstum und einer fast hundertfachen Expansion der Flüssigkultur 1 am 14. Tag konnte einen Hinweis darauf geben, dass bei der Ex-Vivo-Expansion große Qualitätsunterschiede im Ausgangsmaterial vorhanden sind, die die Proliferation und Differenzierung von Megakaryozyten in Ex-Vivo-Expansionsversuchen signifikant beeinflussen. Man kann daraus schließen, dass mit geeignetem Material genügend Zellen für eine Kotransplantation von megakaryozytären Vorläuferzellen zum Stammzelltransplantat generierbar wären. Weiterhin konnte durch ein Medienwechsel an Tag 7 ein Anteil von über 90% CD41+ Zellen gemessen werden. Die Generierung von Megakaryozyten aus Stammzellen mittels einer Flüssigkultur und deren Kotransplantation zum Stammzellprodukt könnte in Zukunft zu einer Verkürzung der Thrombozytopenie führen und die Zeit bis zum Anstieg der Thrombozytenzahlen überbrücken.

6. Literaturverzeichnis

1. Aglietta M, Bertolini F, Carlo-Stella C, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Olivieri A, Siena S, Zanon P, Tura S: Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use. *Haematologica* 83, 824-848 (1998)
2. Armitage JO: Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330, 827-838 (1994)
3. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Falcon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 335, 91-97 (1996)
4. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S: Identification and cloning of megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77, 1117-1124 (1994)
5. Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA: Binding of L-Selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262, 436-438 (1993)
6. Beelen DW, Ottinger HD, Elmaagacli A, Scheulen B, Basu O, Kremens B, Havers W, Grosse-Wilde H, Schaefer UW: Transplantation of filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells from HLA-identical sibling or alternative family donors in patients with hematologic malignancies: A prospective comparison on clinical outcome, immune reconstitution and hematopoietic chimerism. *Blood* 90, 4725-4735 (1997)
7. Begemann PG, Hassan HT, Kroger N, Kruger W, Kabisch H, Zander AR: Correlation of time to platelet engraftment with amount of transplanted CD34+CD41+ cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 11, 321-326 (2002)
8. Beguin Y, Baudoux E, Sautois B, Fraipont V, Schaaf-Lafontaine N, Pereira M, Paulus JM, Sondag D, Fillet G: Hematopoietic recovery in cancer patients after transplantation of autologous peripheral blood CD34+ cells or unmanipulated peripheral blood stem and progenitor cells. *Transfusion* 38, 199-208 (1998)

9. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS: Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 1, 329-341 (1992)
10. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, Storb R, Bruckner CD: Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 85, 1655-1658 (1995)
11. Bensinger WI, Appelbaum FR, Rowley S, Storb R, Sander J, Lilleby K, Gooley T, Demirer T, Schiffman K, Weaver CH: Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 13, 2547-2555 (1995)
12. Bertolini F, Battaglia M, Pedrazzoli P, Da Prada GA, Lanza A, Soligo D, Caneva L, Sarina B, Murphy S, Thomas T, della Cuna GR: Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood* 89, 2679-2688 (1997)
13. Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, Guerriero A, Yeager AM, Fleming WH, Holland HK, Waller EK: Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 91, 2588-2600 (1998)
14. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi CM, Horning SJ, Brown SL, Miller L, Blume KG: Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81, 2031-2035 (1993)
15. Charbonnier A, Sainty D, Faucher C, Arnoulet C, Chabannon C, Blaise D: Immune reconstitution after blood cell transplantation. *Hematol Cell Ther* 39, 261-264 (1997)
16. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-165 (1984)
17. Debili N, Masse JM, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W: Effects of 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 (1993)
18. del Canizo MC, Lopez N, Vazquez L, Fernandez ME, Ana B, Caballero MD, Amigo ML, Mateos MV, Gutierrez N, San Miguel JF: Hematopoietic damage prior to PBSCT and its influence on hematopoietic recovery. *Haematologica* 84, 511-516 (1999)
 19. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ: Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533-538 (1994)
 20. Divine M, Boutolleau D, Delfau-Larue MH, Beaujean F, Jouault H, Reyes F, Kuentz M, Bensussan A, Farcet JP, Baumsell L: Poor lymphocyte recovery following CD34-selected autologous peripheral stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 105, 349-360 (1999)
 21. Dolzhanskiy A, Basch RS, Karpatkin S: 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, 426-431 (1997)
 22. Drayer AL, Smit Sibinga CT, Esselink MT, de Wolf JT, Vellenga E: In vitro megakaryocyte expansion in patients with delayed platelet engraftment after autologous stem cell transplantation. *Ann Hematol* 81, 192-197 (2002)
 23. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426 (1990)
 24. First LR, Smith BR, Lipton J, Nathan DG, Parkman R, Rapoport JM: Isolated thrombocytopenia after allogeneic bone marrow transplantation: existence of transient and chronic thrombocytopenic syndromes. *Blood* 65, 368-374 (1985)
 25. Frei E, Canellos GP: Dose: A critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 69, 585-594 (1980)

26. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J: Blood and Marrow transplantation activity in Europe 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), *Bone Marrow Transplant* 24, 231-245 (1999)
27. Gordon MY, Greaves MF: Physiological mechanisms of stem cell regulation in bone marrow transplantation and haemopoiesis. *Bone Marrow Transplant* 4, 335-338 (1989)
28. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M: Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 92, 1471-1490 (1998)
29. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, Cowan K, Gress RE: Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 90, 3789-3798 (1997)
30. Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D, Niederwieser D, Fink FM: Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 90, 850-857 (1997)
31. Henon PR, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann JC, Lepers M, Wunder E, Kandel G: Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 9, 285-291 (1992)
32. Hermouet S, Niaussat AE, Briec A, Pineau D, Robillard N, Bataille R, Milpied N, Harrousseau JH, Mahe B: Analysis of platelet recovery after autologous transplantation with G-CSF mobilized CD34+ cells purified from leukapheresis products. *Hematol Cell Ther*, 39, 1177-1181 (1997)
33. Hernandez MD, del Canizo MC, Gonzalez M, Caballero MD, Lopez-Berges MC, Vazquez L, Orfao A, Corral M, Nieto MJ, San Miguel JF: Immune reconstitution after autologous progenitor hematopoietic cell transplantation. A study comparing autologous bone marrow and autologous peripheral blood transplantation. *Med Clin (Barc)* 110, 768-773 (1998), (Abstract)

34. Hoglund M, Smedmyr B, Simonsson B, Totterman T, Bengtsson M: Dose-dependent mobilisation of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF. *Bone Marrow Transplant* 18, 19-27 (1996)
35. Horowitz MM: Report on state of the art in blood and marrow transplantation-The IBMTR/ABMTR summary slides with guide. IBMTR/Abmtr newsletter (2002)
36. Janeway CA, Travers P: Teil II: Die Entwicklung des Lymphozytenrepertoires, Teil IV: Die adaptive Immunantwort. In: *Immunologie*, 2. Aufl., 173, 241, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997
37. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159, 197-202 (1993)
38. Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ: Circulating autologous stem cells collected in a very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete hematopoietic reconstitution after high-dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol* 61, 739-745 (1985)
39. Kaushansky K: Thrombopoietin: The primary regulator of platelet production. *Blood* 86, 419-431 (1995)
40. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS: Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369, 568-571 (1994)
41. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Smith DM, Weisenburger DD: Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 71, 723-727 (1988)
42. Koehne G, Zeller W, Stocksclaeger M, Zander AR: Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 19, 149-156 (1997)
43. Kook H, Goldman F, Padley D, Giller R, Rumelhart S, Holida M, Lee N, Peters C, Comito M, Huling D, Trigg M: Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in

- children: Immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery. *Blood* 88, 1089-1097 (1996)
44. Kratz-Albers K, Scheding S, Möhle R, Bühring HJ, Baum CM, Mc Kern JP, Büchner T, Kanz L, Brugger W: Effective ex vivo generation of megakaryocytic cells from mobilized peripheral blood CD34 (+) cells with stem cell factor and promegapoeitin. *Exp Hematol* 28, 335-346 (2000)
 45. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS: CD 34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* 87, 1-13 (1996)
 46. Kronenwett R, Martin S, Haas R: The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem cells* 18, 320-330 (2000)
 47. Lasky LC, Ash RC, Kersey JH, Zanjani ED, McCulloch J: Collection of pluripotential hematopoietic stem cells by cytopheresis. *Blood* 59, 822-827 (1982)
 48. Lumley MA, Burgess R, Billingham LJ, McDonald DF, Milligan DW: Colony counting is a major source of variation in CFU-GM results between centres. *Br J Haematol* 97, 481-454 (1997)
 49. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Horowitz ME, Magrath IT, Shad AT, Steinberg SM: Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 332, 143-149 (1995)
 50. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE: Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 89, 3700-3707 (1997)
 51. Martinez C, Urbano-Ispizua A, Rozman C, Marcin P, Rovira M, Sierra J, Montfort N, Carreras E, Montserrat E: Immune reconstitution following allogenic peripheral blood progenitor cell transplantation: Comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. *Exp Hematol* 27, 561-568 (1999)
 52. Mauch P, Ferrara J, Hellman S: Stem cell self-renewal considerations in bone marrow transplantations. *Bone Marrow Transplant* 4, 601-607 (1989)
 53. Maurer AM, Liu Y, Caen JP, Han ZC: Ex vivo expansion of megakaryocytic cells. *Int J Hematol* 71, 203-210 (2000)

54. Metcalf D: Hematopoietic regulators. Redundancy or subtlety? *Blood* 82, 3515-3523 (1993)
55. Miller RA, Daley J, Ghalie R, Kaizer H: Clonal analysis of T-cell deficiencies in autotransplant recipients. *Blood* 77, 1845-1850 (1991)
56. Molineux G, Hartley C, McElroy P, McCrea C, McNiece IK: Megakaryocyte growth and development factor accelerates platelet recovery in peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood* 88, 366-376 (1996)
57. Nash RA, Kurzrock R, DiPersio J, Vose J, Linker C, Maharaj D, Nademanee AP, Negrin R, Nimer S, Shulman H, Ashby M, Jones D, Appelbaum FR, Champlin R: A phase I trial of recombinant human thrombopoietin in patients with delayed platelet recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 25 (2000)
58. Offidani M, Corvatta L, Olivieri A, Mele A, Brunori M, Montanari M, Rupoli S, Scalari P, Leoni P: A predictive model of varicella-zoster virus infection after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Clin Infect Dis* 32, 1414-1422 (2001)
59. Ogawa M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853 (1993)
60. Olivieri A, Offidani M, Montanari M, Ciniero L, Cantori I, Ombrosi L, Masia CM, Centurioni R, Mancini S, Brunori M, Leoni P: Factors affecting hematopoietic recovery after high-dose therapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a single center experience. *Haematologica* 83, 329-337 (1998)
61. Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H: Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 88, 2275-2279 (1996)
62. Parkman R, Weinberg KI: Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. *Immunol Rev* 157, 73-78 (1997)
63. Paulin T, Ringden O, Nilsson B, Lonnqvist B, Gahrton G: Variables predicting bacterial and fungal infections after allogeneic and autologous marrow engraftment. *Transplantation* 43, 393-398 (1987)

64. Pecora AL: Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 23 Suppl 2, S7-S12 (1999)
65. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J: Anti-B-Cell monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation for B-Cell non-Hodgkin's lymphoma: phenotypic reconstitution and B-cell function. *Blood* 74, 2203-2211 (1989)
66. Poloni A, Giarratana MC, Firat H, Kobari L, Gorin NC, Douay L: The ex vivo expansion capacity of normal human bone marrow is dependent on experimental conditions: role of the cell concentration, serum and CD34+ cell selection in stroma-free cultures. *Hematol Cell Ther* 39, 49-58 (1997)
67. Porrata LF, Litzow MR, Markovic SN: Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Mayo Clin Proc* 76, 407-412 (2001)
68. Potten CS, Loeffler M: Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lesson for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020 (1990)
69. Richman CM, Weiner RS, Yankee RS: Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47, 1031-1039 (1976)
70. Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner CA: Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 12, 469-475 (1993)
71. Robinson JP, Maguire D, King G, Kelley S, Durack G: Integration of a barcode reader with a commercial flow cytometer. *Cytometry* 13, 193-197 (1992)
72. Roux E, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E: T-cell repertoire complexity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Immunol* 48, 135-138 (1996)
73. Sanders ME, Makgoba MW, Shaw S: Human naïve and memory T-cells: Reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* 9, 195-201 (1988)
74. Schlenke P: Gewinnung, Prozessierung und Qualitätskontrolle von Blutstammzellprodukten zur autologen Transplantation. *Focus MUL* 16, Heft 4, 290-298 (1999).

75. Schlenke P: Transfusionsmedizinische und immunologische Aspekte der Charakterisierung, Prozessierung und Transplantation von peripheren Blutstammzellen. Med. Habil. Schr. Lübeck (2002)
76. Schlenke, P, Sheikhzadeh S, Weber K, Wagner T, Kirchner H: Immune reconstitution and production of intracellular cytokines in T lymphocyte populations following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28, 251-257 (2001)
77. Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH: Effect of CD34 (+) cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol* 17, 1227-1233 (1999)
78. Serke S, Huhn D: Expression of class I, II and III epitopes of the CD34 antigen by normal and leukemic hemopoietic cells. *Cytometry* 26, 154-160 (1996)
79. Sharp JG, Kessinger A, Lynch JC, Pavletic ZS, Joshi SS: Blood stem cell transplantation: factors influencing cellular immunological reconstitution. *J Hematother Stem Cell Res* 9, 971-981 (2000)
80. Sheikhzadeh S, Hammers HJ, Hartwig D, Kirchner H, Schlenke P: Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow cytometry-based standardization of short-term culture assays. *J of Hematother* 10, 881-885 (2001)
81. Simmons PJ, Torok-Storb B: CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78, 2848-2853 (1991)
82. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N: B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: A recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 76, 1647-1656 (1990)
83. Socinski MA, Cannistra AS, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haematopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1, 1194-1198 (1988)
84. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A: B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: Recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 12, 387-398 (1993)

85. Storek J, Witherspoon RP, Storb R: T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 16, 413-425 (1995).
86. Sugita K, Soiffer RJ, Murray C, Schlossman SF, Ritz J, Morimoto C: The phenotype and reconstitution of immunoregulatory T cell subsets after T-cell-depleted allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* 57, 1465-1473, (1994)
87. Sullivan KM, Dykeicz CA, Longworth DL, Boeckh M, Baden LR, Rubin RH: Preventing opportunistic infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America, and American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines and beyond. *Hematology (Am Soc Hematol Education Programme)* 392-421 (2001)
88. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I: The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow-cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft engineering. J Hematother* 5, 213-226 (1996)
89. Tajika K, Nakamura H, Nakayama K, Dan K: Thrombopoietin can influence mature megakaryocytes to undergo further nuclear and cytoplasmic maturation. *Exp Hematol* 28, 203-209 (2000)
90. Tanchot C, Rocha B: The organization of mature T-cell pools. *Immunol Today* 19, 575-579 (1998)
91. Tao H, Gaudry L, Rice A, Chong B: Cord blood is better than bone marrow for generating megakaryocytic progenitor cells. *Exp Hematol* 27, 293-301 (1999)
92. Tepler I, Elias L, Smith JW, Hussein M, Rosen G, Chang AY, Moore JO, Gordon MS, Kuca B, Beach KJ, Loewy JW, Garnick MB, Kaye JA: A randomised placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy. *Blood* 87, 3607-3614 (1996)
93. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y, Makino K, Taniguchi S, Inaba S, Kondo S, Tanaka T, Akashi K, Minamishima I: Cytotoxic drug and cytotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. *Bone Marrow Transplant* 10, 215-220 (1992)

94. Thomas ED: Marrow transplantation for malignant diseases. *J Clin Oncol* 1, 517-531 (1983)
95. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA: The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89, 2233-2258 (1997)
96. Tomer A, Harker LA, Burstein SA: Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood* 71, 1244-1252 (1988)
97. Tyndall A, Gratwohl A: Blood and marrow stem cell transplantation in autoimmune disease: A consensus report written on behalf of the European League against Rheumatism (EULAR) and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 19, 643-645 (1997)
98. van den Oudenrijn S, de Haas M, Calafat J, van der Schoot CE, von dem Borne AEGK: A combination of megakaryocyte growth and development factor and interleukin-1 is sufficient to culture large numbers of megakaryocytic progenitors and megakaryocytes for transfusion purposes. *Br J Haematol* 106, 553- 563 (1999)
99. Villers D, Milpied N, Gaschet J, Davodeau F, Hallet MM, Bonneville M, Vie H: Alteration of the T cell repertoire after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 13, 19-26 (1994)
100. Wagner T, Feyerabend T, Schultz C, Bucsky P, Peters SO, Weber K, Lopens A, Strik D: Hochdosischemotherapiekonzepte und Stammzelltransplantation in Hämatologie und Onkologie. *Focus MUL* 16, Heft 4 , 278-289 (1999).
101. Waller CF, von Kalle C, Henschler R, Schulz G, Mertelsmann R, Lange W: Blutstammzellen. Derzeitige Einsatzmöglichkeiten und Perspektiven. *Arzneimitteltherapie* 15. Jahrgang , Heft 8 (1997)
102. Weaver CH, Longin K, Buckner CD, Bensinger W: Lymphocyte content in peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 13, 411-415 (1994)

7. Danksagung

Herrn PD Dr. med. Peter Schlenke danke ich sehr für die langjährige wissenschaftliche Anleitung und konstruktive Zusammenarbeit nicht nur im Rahmen dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Holger Kirchner bin ich nicht nur für die Bereitstellung des Themas sondern auch für wissenschaftliche und persönliche Förderung und Unterstützung, sowie konstruktiven Anregungen während der gesamten Zeit dankbar.

Frau Petra Koritke danke ich für das Engagement, die tatkräftige Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der Dissertation und den jeweiligen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin, die mir bei wissenschaftlichen Fragestellungen zu Seite standen, für die motivierende Zusammenarbeit.

Nicht zu letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung und Motivierung bedanken, mit der sie mich immer begleitet haben.

8. Lebenslauf

Name: Sara Sheikhzadeh

Geburtstag: 19. Februar 1977 in Teheran/Iran

Adresse: Rebeccaweg 9
22043 Hamburg

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule, Bad Segeberg/Lübeck
Persische Grund- und Hauptschule, Hamburg
1988-1996 Gymnasium Katharineum zu Lübeck
Preisträgerin der Katharinen- und der Hermann-Baethke-Stiftung,
Leistungskurse Biologie und Chemie
Abitur (Note:1,6)

Studium: seit 1996 Studium der Humanmedizin,
Medizinische Universität zu Lübeck
1998 Physikum
1999 1. Staatsexamen
2001 2. Staatsexamen
2003 3. Staatsexamen

Famulaturen: 1998 Pflegepraktikum , Kardiologie
Royal Brompton Hospital, London
Grossbritannien
1998-2001 Famulaturen: - Angiologie (1 Monat)
Allgemeines Krankenhaus Wien
- Kardiologie (1 Monat)
Rotes-Kreuz-Krankenhaus, Berlin
- Innere Medizin (1 Monat)
The Erne Hospital, Enniskillen,
Nordirland
- Internistische Aufnahmestation (1 Monat)

Medizinische Universität zu Lübeck
 - internistische Intensivstation (1 Monat)
 Städtisches Krankenhaus Süd, Lübeck
 - Kardiologie (1 Monat)
 The Royal Brompton Hospital
 Imperial College of Science, Technology
 and Medicine, London

Praktisches Jahr : 2002-2003 -Chirurgie: Kantonsspital Basel, Schweiz
 -Anästhesie: Medizinische Universität Lübeck
 -Innere Medizin: Medizinische Universität Lübeck
 The Mayo Clinic,
 Rochester, Minnesota, U.S.A.
 Kantonsspital Basel, Schweiz

Tätigkeit : seit August 2003 Ärztin im Praktikum
 Abteilung für Kardiologie, Herzzentrum
 Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Promotionsarbeit:

seit 1998 „Die Rekonstitution der Hämatopoese und des Immunsystems
 nach autologer peripherer Stammzelltransplantation unter
 besonderer Berücksichtigung der Megakaryopoese“
 2003 INSTAND-Doktorandenpreis 2003

Veröffentlichungen:

- Sheikhzadeh S, Hammers HJ, Hartwig D, Kirchner H, Schlenke P:
 Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow
 cytometry-based standardization of short-term culture assays. J of
 Hematotherapy 10, 881-885 (2001)
- Schlenke P, Sheikhzadeh S, Weber K, Wagner T, Kirchner H: Immune
 reconstitution and production of intracellular cytokines in T lymphocyte

populations following autologous peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 28, 251-257 (2001).

- Schlenke P, Sheikhzadeh S, Kirchner H: Laboratory parameters for monitoring hematopoietic engraftment and immune reconstitution after autologous stem cell transplantation. J Lab Med 26, 399-407 (2002).
- Hammers HJ, Saballus M, Sheikhzadeh S, Schlenke P: Introduction of a novel proliferation assay for pharmacological studies allowing the combination of BrdU detection and phenotyping. J Immunol Meth (2002)

Sprachen:

- Deutsch, Persisch, Englisch,
- Französisch,
- Kleines Latinum