

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Leiter: Prof. Dr. W. Schramm  
ehem. Leiter: Prof. Dr. W. Mempel

Evaluation einer Methode zur durchflußzytometrischen Bestimmung  
des Retikulozytenchimärismus nach KMT oder PBST

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Oliver Rautenberg

aus  
Giessen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Mempel

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Neth

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Poley

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 2010

In Liebe meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung und Fragestellung

- 1.1 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen
  - 1.1.1 Entwicklung des Verfahrens
  - 1.1.2 Arten und Indikationen
  - 1.1.3 Klinischer Verlauf
  - 1.1.4 Monitoring
- 1.2 Der Chimärismus
  - 1.2.1 Chimärismusarten
  - 1.2.2 Etablierte Nachweismethoden
  - 1.2.3 Retikulozytenchimäsimus als alternative Methode
  - 1.2.4 Prognostische Aussagekraft
- 1.3 Fragestellungen

## 2. Materialien

- 2.1 Antikörper
- 2.2 Chemikalien und Reagenzien
- 2.3 Geräte

## 3. Methoden

- 3.1 Gewinnung von Vollblut
  - 3.1.1 Gesunde Probanden
  - 3.1.2 Patienten
- 3.2 Zellpräparation
  - 3.2.1 Retikulozytenzählung
  - 3.2.2 Präparation zur Retikulozyten- / Erythrozytenantigenbestimmung
- 3.3 Messung am FACScan
- 3.4 Auswertung
  - 3.4.1 Retikulozytenzählung
  - 3.4.2 Retikulozyten- / Erythrozytenantigenbestimmung
- 3.5 Kontrollen
- 3.6 Chimärismusbestimmung mittels STR-Methode
- 3.7 Statistische Methoden

## **4. Ergebnisse**

### 4.1 Methodische Entwicklung und Evaluierung

#### 4.1.1 Antikörper

##### 4.1.1.1. Wahl des geeigneten Primärantikörpers

###### 4.1.1.1.1. Antikörper aus der Routineblutgruppenbestimmung

###### 4.1.1.1.2. Versuch der IgG-Anreicherung

##### 4.1.1.1.3. Gewinnung von reinen IgG-Antikörpern

###### 4.1.1.1.3.1. Materialgewinnung

###### 4.1.1.1.3.2. Elution der Antikörper

###### 4.1.1.1.3.2.1. Prinzip der Elution

###### 4.1.1.1.3.2.2. Verfahren der Elution

##### 4.1.1.2. Ermittlung des geeigneten Antikörpervolumens

###### 4.1.1.2.1. Primärantikörper

###### 4.1.1.2.2. Sekundärantikörper

### 4.1.2 Bestimmung der geeigneten Zellpräparation

#### 4.1.2.1. Inkubation

#### 4.1.2.2. Waschvorgang

#### 4.1.2.3. Zentrifugation

#### 4.1.2.4. Farbstoffmarkierung

### 4.1.3 Wiederfindung

### 4.1.4 Präzision

### 4.2 Klinische Anwendung

#### 4.2.1 Chimärismusstatus der Erythrozyten und Retikulozyten im untersuchten Patientenkollektiv

#### 4.2.2 Darstellung einzelner Patienten

#### 4.2.3 Vergleich der Ergebnisse mit etablierten Nachweismethoden

#### 4.2.4 Chimärismusstatus im Vergleich zum klinischen Resultat

## **5. Diskussion**

### 5.1 Methode

### 5.2 Klinische Anwendung

## **6. Zusammenfassung**

## **7. Anhang**

## **8. Literaturverzeichnis**

**Verwendete Abkürzungen:**

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
CB	Cord blood (= dt. Nabelschnurblut)
CC	Complete chimerism (= dt. kompletter Chimärismus)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
DNA	Desoxyribosenucleic acid (= dt. Desoxyribonucleinsäure)
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward scatter (= dt. Vorwärtsstreulicht)
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HLA	Human leukocyte antigen
HST	Hämatopoetischen Stammzelltransplantation
HSV	Herpes simplex Virus
KMT	Knochenmarktransplantation
MC	Mixed chimerism (= dt. gemischter Chimärismus)
MHC	Major histocompatibility complex (= dt. Haupthisto- kompatibilitätskomplex)
MRD	Minimal residual disease (= dt. minimale Resterkrankung)
PA	Prozentuale Abweichung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PBPC	Peripheral blood progenitor cells
PBPCT	Peripheral blood progenitor cells transplantation
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
RFLP	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus
RNS	Ribonucleic acid (= dt. Ribonucleinsäure)

SA	Standardabweichung
SAA	Schwere aplastische Anämie
SCID	Severe combined immunodeficiency (= dt. schwere kombinierter Immundefizienz)
SSC	Side scatter (= dt. Seitwärtsstreulicht)
STR	Short tandem repeats
VC	Variationskoeffizient
VNTR	Variable number of tandem repeats



# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur unbeschränkten Selbsterneuerung und zur Differenzierung in verschiedene Zellen des peripheren Blutes und Immunsystems. Nach Zerstörung des Knochenmarks, z.B. durch Hochdosischemotherapie oder Bestrahlung, ermöglichen diese Stammzellen die vollständige und permanente Rekonstruktion der Hämato- und Lymphopoese. Derzeit können hämatopoetische Stammzellen aus drei Quellen gewonnen werden [1]:

- durch multiple Punktionen aus dem Knochenmark
- durch Leukapherese aus dem peripheren Blut nach Mobilisation durch Gabe geeigneter Zytokine
- durch Nabelschnurpunktion nach Geburt aus dem Plazentablut

Klinisch werden Blutstammzellen für autologe und allogene Transplantation bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen, einigen soliden Tumoren und definierten nichtmalignen Erkrankungen (z.B. schweren Autoimmunerkrankungen) seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzt.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass sich aus adulten Stammzellen des Knochenmarks auch andere Zelltypen differenzieren können wie z.B. Myozyten oder Hepatozyten. Dies eröffnet die Perspektive des Einsatzes hämatopoetischer Stammzellen zur Zelltherapie bei vielfältigen Indikationen beispielweise zur Regeneration des Myokards nach Herzinfarkt [2].

### 1.1.1 Entwicklung des Verfahrens

Aufgrund des überwiegend progredienten Verlaufs hämatologischer Systemerkrankungen, die durch konservative Methoden meist nicht heilbar sind, bestand schon früh ein Interesse an der *Knochenmarktransplantation* (KMT) als kurativem Therapiekonzept. Der erste Versuch, mit i.v. Infusion von Knochenmark eine goldinduzierte Knochenmarkaplasie zu heilen, erfolgte bereits 1939 [3]. Doch

diese und weitere Bemühungen scheiterten bis in die frühen 1970er Jahre an der Abstoßungsreaktion oder dem Auftreten einer entzündlichen Erkrankung, die später *Graft-versus-Host Krankheit* (GvHD) genannt wurde. Die KMT als therapeutisches Prinzip zu etablieren, gelang erst nach der Entdeckung des *Haupthistokompatibilitätskomplexes* (MHC) [4]. Dieser findet sich beim Menschen auf dem Chromosom 6, an dem eng gekoppelt die vier verschiedenen HLA-Antigene A bis D liegen [5]. Diese Antigene stellen genetisch determinierte Merkmale an Oberflächen verschiedener kernhaltiger Zellen dar und erlauben dem Immunsystem die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd. Nur die Transplantation HLA-kompatibler Zellen ermöglichte die erste erfolgreiche allogene KMT 1975, wofür E. Donnall Thomas 1990 den Nobelpreis für Medizin erhielt [6,7]. Bei der KMT wird dem Spender unter Narkose durch Aspiration im Bereich der Crista iliaca Knochenmark entnommen. Nach mechanischer Reinigung wird dem Empfänger eine definierte Zellzahl intravenös injiziert.

Bereits 1909 vermutete Maximow auch im peripheren Blut zirkulierende Stammzellen [8]. Der Beweis hierfür gelang jedoch erst in den 1950er Jahren. Durch Weiterentwicklung der Apheresetechnik in den 1970er Jahren konnte man an eine klinische Anwendung der *Transplantation von peripheren Blutstammzellen* (PBPCT) denken. Bei der Apherese werden durch Zentrifugation die Blutbestandteile getrennt und bestimmte Zellpopulationen angereichert. Die geringe Anzahl an Stammzellen im peripheren Blut machte anfangs eine mehrfache Wiederholung der Apherese nötig. Der Einsatz von Zytokinen zur Mobilisierung der Blutstammzellen aus dem Knochenmark brachte 1988 den Durchbruch der Methode als eine echte Alternative zur Knochenmarktransplantation.

Im Vergleich zur KMT ist die Gewinnung peripherer Blutstammzellen weniger invasiv und benötigt keine Narkose. Ein weiterer Vorteil liegt in der bedingt durch Zytokinmobilisierung, Apheresetechnik und wiederholte Apherese-Sitzungen deutlich höheren Ausbeute der transplantierbaren Stammzellen. Somit ersetzt die PBPCT zunehmend die KMT [9,10].

Seit 1982 ist bekannt, dass auch Nabelschnurblut hämatopoetische Stammzellen enthält, die für eine Transplantation geeignet sind. Nabelschnurblut kann nach dem Abnabeln ohne jegliche Beeinträchtigung des Neugeborenen und der Mutter

gewonnen werden. 1988 erfolgte in Frankreich die erste Transplantation von Nabelschnurblut bei einem Patienten mit Fanconi-Anämie [11,12]. Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass das kindliche Restblut -international bezeichnet als *Cord Blood* (CB)- in aller Regel ausreichend Stammzellen enthält, um bei Kindern mit einem Körpergewicht von bis zu 40 kg eine hämatologische und immunologische Rekonstruktion zu erreichen. Ob das Poolen von zwei Spenden oder die Vermehrung der Stammzellen in Kultur auch eine Stammzelltransplantation bei Erwachsenen möglich macht, wird derzeit erforscht [13].

Aufgrund der zum Teil noch offenen Fragen ist eine CB-Transplantation gegenüber einer Stammzellspende mittels KMT und PBPCT bis zum Abschluss ausstehender prospektiver Studien sorgfältig abzuwägen [14,15].

### **1.1.2 Arten und Indikationen**

Die Transplantation der durch Knochenmarkaspiration, Apherese oder Plazentarblut gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen (HST) kann allogenen, syngenen oder autologen durchgeführt werden.

Die *allogene Transplantation* hämatopoetischer Stammzellen:

Dabei werden hämatopoetische Stammzellen eines gesunden, immungenetisch fremden Spenders auf den Empfänger übertragen. Die Transplantation erfolgt hierbei vorzugsweise von einem verwandten Spender, dessen HLA- Antigene mit denen des Transplantatempfängers kompatibel sind. Steht ein entsprechender Spender nicht zur Verfügung, so wird versucht, einen HLA-kompatiblen Fremdspender zu finden. Ca. 75% werden von HLA-kompatiblen verwandten Spendern und 25% von HLA-kompatiblen unverwandten Spendern transplantiert [16].

Die häufigsten Indikationen zur allogenen Stammzelltransplantation sind maligne hämatopoetischen Erkrankungen wie die *akute lymphatische Leukämie* (ALL), die *akute myeloische Leukämie* (AML), einzelne soliden Tumoren wie Hodentumoren, außerdem benigne Erkrankungen wie die *schwere aplastische Anämie* (SAA), Autoimmunerkrankungen, Thalassämie oder Fanconi Anämie [17,18,19].

Auch in der Behandlung der *chronischen myeloischen Leukämie* (CML) bleibt die allogenen Stammzelltransplantation trotz der seit einigen Jahren bestehenden Möglichkeit einer medikamentösen Therapie mittels Tyrosinkinase-Hemmern eine Option als Primärtherapie insbesondere für junge Patienten aufgrund der geringeren Transplantations-assoziierten Risiken und ihrer kurativen Wirkung oder als Sekundärtherapie bei suboptimalem Ansprechen auf die medikamentöse Therapie [20,21].

Die *syngene Transplantation* hämatopoetischer Stammzellen:

Im molekulargenetischen Sinne handelt es sich hierbei um eine autologe Transplantation, da der Spender ein eineiiges Zwillingsgeschwister ist.

Die *autologe Transplantation* hämatopoetischer Stammzellen:

Hierunter versteht man die Reinfusion des eigenen Knochenmarkes oder zuvor aus dem eigenen Blut separierter hämatopoetischer Stammzellen nach Durchführung einer intensiven Chemo- oder Strahlentherapie.

Dieses Verfahren wird meist dann durchgeführt, wenn das Knochenmark selbst nicht von der Erkrankung betroffen ist, aber die zugrundeliegende Erkrankung eine so aggressive Behandlung erfordert, dass die Blutbildung nachhaltig beeinflusst wird [4]. Autolog wird auch in Fällen transplantiert, bei denen eine aggressive Therapie bei betroffenem Knochenmark notwendig ist und kein allogener Spender zur Verfügung steht. Es werden dann Purgung-Verfahren angewendet, um die Retransfusion von Tumorzellen zu minimieren. Hierbei werden verschiedene Methoden zur in-vitro-Behandlung mittels spezifischer Antikörper oder zytotoxischer Substanzen eingesetzt. Dadurch kann das Rezidivrisiko gesenkt werden [22,23].

Häufige Anwendungsgebiete sind Lymphome und solide Tumore [19]. Abstoßungsreaktionen und GvHD treten naturgemäß nicht auf. Jedoch stellt das im Vergleich zur allogenen HST häufigere Wiederauftreten der Grunderkrankung ein wesentliches Problem dar. Verursacht wird dies einerseits durch Retransfusion von Tumorzellen, andererseits auch durch Ausbleiben des bei allogener HST zu beobachtenden Graft-versus-Leukemia-Effekts (GvL) [24,25,26].

### **1.1.3 Klinischer Verlauf**

Im Behandlungsablauf jeder Stammzelltransplantation kommt es direkt nach Transplantation zu einer Phase der Immunsuppression. Das körpereigene Immunsystem ist durch Chemo- und/ oder Strahlentherapie supprimiert und die transplantierten Spenderzellen sind noch nicht zu einem kompetenten Abwehrsystem herangereift. Dieser Zeitraum ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Verminderung der B- und T-Zellen. Es handelt sich um eine sowohl quantitative, als auch qualitative Störung, die auch bei unauffälligem Verlauf bis zu einem Jahr andauert. In diesem Zeitraum muss der Patient vor bakteriellen und viralen Infektionen, sowie Erkrankungen durch Pilze in besonderer Weise geschützt werden. Dazu dienen die Betreuung in speziellen keimarmen Räumen und die totale Dekontamination der Haut und Schleimhäute des Patienten.

Antibiotika, antivirale und fungizide Medikamente werden prophylaktisch und therapeutisch eingesetzt. Die Substitution von Thrombozyten und Erythrozyten kann bis zur Rückkehr der Knochenmarkfunktion notwendig sein. Die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen kann durch die Gabe stimulierender Faktoren unterstützt und beschleunigt werden [27,28]. Kommt es dennoch zu opportunistischen Infektionen können sie die Phase der Immunsuppression deutlich verlängern und gelten zusätzlich als Risikofaktor für das Auftreten einer GvHD. Sie sind somit in bedeutendem Maße entscheidend für den klinischen Verlauf [4,29].

Die biologischen Ereignisse nach einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen werden hauptsächlich bestimmt durch die drei verschiedenen transplantierten Zelltypen: haematopoetische Stammzellen, lymphoide Stammzellen und T-Lymphozyten des Spenders. Über den Erfolg der Stammzelltransplantation entscheidet das Anwachsen der haematopoetischen und lymphoiden Stammzellen. Die Normalisierung der Myelopoese zeigt sich im peripheren Blut durch Anstieg der verschiedenen Zellpopulationen, den sogenannten Take. Bei erfolgreichem Verlauf finden sich in der 3. Woche vermehrt Retikulozyten im Blut und wenig später folgt eine ansteigende Thrombopoese. Die Leukozyten im peripheren Blut haben bereits nach 3 bis 4 Wochen Normwerte erreicht, doch bis zur vollständigen Rekonstruktion des Immunsystems vergehen Monate [5,30].

Bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen werden je nach Methode in unterschiedlichem Prozentsatz auch Spender-T-Lymphozyten übertragen. Diese haben entscheidende Bedeutung sowohl bei der Abstossungsreaktion auf das Transplantat, als auch bei der Entstehung einer Graft-versus-Host Disease [31].

Wird das Mark abgestoßen, so geschieht dies meist während der ersten fünf Wochen. Spätabstoßungen, wie sie bei anderen Organtransplantationen zu beobachten sind, kommen nicht vor, da im Erfolgsfalle auch das Immunsystem vom Spender stammt [5]. Bei der Knochenmarkabstoßung handelt es sich entweder um ein primäres nicht Anwachsen der Stammzellen (Graft Failure) oder um deren Abstoßung (Graft Rejection) kurz nach Aufnahme ihrer Funktion.

Nach autologer, syngener oder allogener HST kann die Ursache eine inadäquaten Anzahl transplantierte Zellen, eine Beschädigung der Zellen bei der ex vivo Behandlung oder eine myelotoxische Therapie des Patienten posttransplantär sein. Auch Infektionen mit CMV oder HSV können zum verzögerten Anwachsen und evtl. zur Abstoßungsreaktion führen [32]. Die Therapie besteht aus der Elimination aller möglich myelotoxischen Substanzen und der Gabe knochenmarkstimulierender Wachstumsfaktoren. Eine erneute Infusion von Spenderstammzellen hat üblicherweise ohne erneute immunsuppressive Vorbereitung keinen Erfolg. Aufgrund kumulativ toxischer Wirkung wird eine erneute Immunsuppression jedoch häufig schlecht toleriert [33].

Die wichtigste Determinante einer Abstoßungsreaktion nach allogener Stammzelltransplantation stellt der genetische Unterschied zwischen Spender und Empfänger dar. Die Wahrscheinlichkeit für eine Abstoßungsreaktion liegt bei HLA-identischen Fremd Spendern bei bis zu 15%. Abstoßungsreaktionen werden von alloreaktiven T-Lymphozyten des Empfängers vermittelt, die die myeloablative Therapie im Vorfeld der Transplantation überstanden haben, auf den von Spenderstammzellen ausgehenden starken allogenen Stimulus proliferieren und hämatopoetische Elemente des Spenders zerstören [34]. Die Inzidenz der Abstoßungsreaktion kann durch Ganzkörperbestrahlung, durch selektive Bestrahlung des lymphatischen Gewebes oder durch Verabreichung von Cyclosporin A oder Methotrexat vermindert, aber nicht eliminiert werden.

Neben dieser vom Empfänger ausgehenden immunologischen Abstoßungsreaktion kann eine immunologische Reaktion des Transplantates gegen den Empfänger in Form einer GvHD auftreten. Diese akut oder chronisch verlaufende Erkrankung ist

eine lebensbedrohliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation. Der Begriff Graft-versus-Host-Disease wurde erstmalig 1958 von Simonsen in Tierstudien eingeführt und beschreibt eine T-Zell-vermittelte Reaktion gegen Zielgewebe des Empfängers [35]. Unter den verschiedenen im Knochenmark- oder Stammzelltransplantat enthaltenen Zellpopulationen, die unter anderem für das Anwachsen des Transplantats von großer Bedeutung sind, erkennen immunkompetente Spender-T-Zellen allogene Oberflächenantigene auf Empfängerzellen als fremd, werden aktiviert und reagieren mit klonaler Expansion, die die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (v.a. IL-1,IL-2,TNF- $\alpha$ ) zur Folge hat [36,37]. Das klinische Erscheinungsbild einer akuten GvHD zeigt sich innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation durch entzündliche Reaktionen der Zielorgane Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber, die je nach Grad der Gewebsinkompatibilität, der Zahl der transplantierten T-Zellen und des Alters des Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Im Gegensatz zur akuten Form der GvHD imponiert die chronische Variante durch ein autoimmunähnliches Syndrom, das ab Tag 100 nach Transplantation auftritt. Die chronische Form kann sowohl auf dem Boden einer akuten GvHD, als auch de novo entstehen [38].

Ein Ziel der Forschung ist es seit langem, eine effektive Prophylaxe für die GvHD zu entwickeln, die solange angewendet werden soll, bis sich eine T-Zell Toleranz eingestellt hat. Auf pharmakologischer Ebene haben sich verschiedene Immunsuppressiva etabliert, die einzeln oder in Kombination eingesetzt werden. Limitiert wird der Einsatz hauptsächlich durch deren generalisierten Effekt, der eine erhöhte Infektionsrate zur Folge hat.

Ein anderer präventiver Ansatz besteht in der Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat oder die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen spezifische Antigene der T-Zellen. Da diese Spender-T-Zellen jedoch auch für die Ausschaltung restlicher Leukämiezellen von Bedeutung zu sein scheinen (engl. „Graft-versus-leukemia effect“, GvL) und als Folge die Zahl der Leukämie rezidive sowie der Transplantatabstoßungen anstieg, wurde diese Therapiemöglichkeit inzwischen wieder weitgehend verlassen [39,4,40].

Der langfristige Erfolg einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen bei der Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen wird vom Rezidiv bestimmt, welches meist in den ersten 2 Jahren nach Transplantation auftritt [41]. Das Risiko

eines Rezidivs ist abhängig von Art und Stadium der Grunderkrankung und vom Auftreten oder Ausbleiben einer GvHD [42]. So zeigten verschiedene Studien eine reduzierte Rezidivrate nach akuter oder chronischer GvHD. Andererseits steigert das Auftreten einer GvHD die Mortalität [43].

Die Therapie und Prognose eines Rezidivs kann sehr unterschiedlich sein. Ausschlaggebend hierfür sind hauptsächlich die Art der Primärtherapie, der Ausbreitungsgrad und der Zeitpunkt des Auftretens des Rezidivs. Ein Rezidiv nach autologer Stammzelltransplantation zeigt gelegentlich ein Ansprechen auf eine erneute Chemotherapie besonders nach langer Remissionsphase [33]. Eine therapeutische Option bei allogener Stammzelltransplantation stellt die Infusion von Spenderlymphozyten dar (engl. Donor Lymphocyte Infusion, DLI), deren anti-leukämische Potenz anfänglich für Patienten mit rezidivierender CML nach allogener HST bewiesen wurde. Die DLI hat folgende Erfolge aufzuweisen: Komplette Remission in 75% der Patienten mit CML, 40% bei Myelodysplasien, 25% bei AML und 15% bei Myelomen [44]. Die prophylaktische DLI als präventive Gabe schien bei einer kleineren Gruppe pädiatrischer Hochrisikoleukämien ein Rezidiv verhindern zu können [45]. Die schwerste Komplikation nach DLI ist das Auftreten einer GvHD bei 40-70% der Patienten [44,46]. Signifikant seltener gegenüber der einmalig hochdosierten DLI tritt die GvHD nach Verabreichung in eskalierenden Zelldosen über mehrere Monate auf [46]. Eine frühe Gabe von DLI nach Transplantation sowie eine hohe kumulative Zelldosis erhöhen das Risiko. Eine Knochenmarkaplasie tritt bei 18-36% der Patienten nach DLI auf [47].

Um die Immunsuppression nach HST besser steuern zu können und eine Immuntherapie mit DLI zur Verhütung oder Behandlung von Rezidiven rechtzeitig einzuleiten, bedarf es einer regelmäßigen Überwachung der hämatologischen Veränderungen im peripheren Blut von Patienten nach einer Stammzelltransplantation.

#### **1.1.4 Monitoring**

Die hämatologischen Veränderungen im peripheren Blut nach einer HST werden genauestens beobachtet. Dazu dient die Untersuchung genetischer Marker mittels



verschiedener Methoden (siehe 1.2.2). Durch die Identifikation und Charakterisierung eines Nebeneinanders von Spender- und Empfängerstammzellen im Knochenmark oder im peripheren Blut nach Transplantation werden verschiedene Komplikationen im Posttransplantationsverlauf dokumentiert. Verschiedene genetische und molekularbiologische Methoden dienen der qualitativen als auch quantitativen Analyse [48]. Sie erlauben Aussagen zum Anwachsen des Transplantats, Versagen des Transplantats, zur Transplantatabstoßung und zum Auftreten eines Rezidivs, wenn nach längerer Zeit ein signifikanter Anstieg von Empfängerblutzellen nachweisbar ist [49,50,51,52]. Zudem tragen die Untersuchungen auch zu einem besseren Verständnis von Abstoßungsreaktionen und GvHD bei [53].

Um die Herkunft einzelner Zellen im Knochenmark oder peripheren Blut zu bestimmen, müssen die Zellen identifiziert, isoliert und dann auf Unterschiede zwischen Spender und Empfänger hin untersucht werden, die vor Transplantation evaluiert wurden. Zu den möglichen Methoden gehören die Erythrozyten-Antigen-Bestimmung, HLA-Typisierung, Leukozyten Isoenzyme, Immunglobulinallotypisierung, Barr-Körperchen-Analyse mit Karyotypisierung und DNA Sequenzpolymorphismus oder Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) (siehe auch 1.2.2). Die im klinischen Alltag gebräuchlichste Methode ist die Karyotypisierung nach Geschlechtschromosomen, jedoch finden weniger als die Hälfte aller HST zwischen Patienten unterschiedlichen Geschlechts statt und spezielle Karyotypisierungen (Satelliten, Bandenvariabilität) sind nur in erfahrenen Zentren möglich. Erythrozyten-Antigen-Bestimmung und Immunglobulinallotypisierung funktionieren durch die polymorphe Struktur der Oberflächenproteine. Aufgrund häufig nach HST durchgeführter Erythrozytentransfusionen und Gammaglobulin-Gaben können diese Techniken meist erst in einem späten Stadium nach Transplantation eingesetzt werden, wenn Reste der transfundierten Blutprodukte nicht mehr vorhanden sind.

Die HLA-Typisierung ist beschränkt auf MHC-mismatched Transplantationen. Im praktischen Alltag werden verschiedene dieser Techniken simultan angewendet; dabei wird die RFLP-Analyse als die aussagekräftigste Methode angesehen [54].

## 1.2 Der Chimärismus

In der griechischen Mythologie war Chimära (vgl. griechisch: Χίμαιρα) ein Nachkomme von Echidna und Typhon, eine Gestalt mit Löwenkopf, Ziegenkörper und Schlangenschwanz [55].

In der medizinischen Wissenschaft wird der Begriff für Organismen verwandt, in denen genetisch differente Gewebe toleriert werden [55]. Chimäre der Blutgruppen wurden 1945 erstmals durch Owen bei Kälbern entdeckt und kommen natürlicher Weise auch beim Menschen vor [56], wenn bei zweieiigen Zwillingen durch plazentare Gefäßanastomosen Blutkörperchen oder blutbildende Zellen von einem in den anderen Zwilling übertreten [59]. Ähnlich dieser Situation lässt sich auch nach der Transfusion hämatopoetischer Stammzellen von einem sich genetisch unterscheidenden Spender im peripheren Blut des Empfängers u.U. ein Chimärismus finden.

### 1.2.1 Chimärismusarten

Nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen entwickelt sich eine Koexistenz von Spender- und Empfängerzellen des lymphatischen und hämatopoetischen Systems beim Transplantatempfänger. Dieser nach erfolgreicher Transplantation meist vorübergehende Zustand wird *gemischter Chimärismus* (MC) genannt. Im Blut des Patienten finden sich Zellen mit genetischen Markern oder Antigenen sowohl des Spenders als auch des Empfängers [57,58,59,60]. Wenn alle Zelllinien von Spenderstammzellen stammen, spricht man vom *kompletten Chimärismus* (CC). Im Blut des Patienten lassen sich dann nur noch Zellen mit genetischen Markern oder Antigenen des Spenders und keine des Empfängers nachweisen [57,58,59].

### 1.2.2 Etablierte Nachweismethoden

Um einen Chimärismus nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen zu dokumentieren und zu charakterisieren wurden verschiedene Methoden entwickelt. Diese unterscheiden sich vor allem in Ihrer Sensitivität, aber auch im zeitlichen und finanziellen Aufwand.

Bei den *zytogenetischen Methoden* werden Lymphozyten des peripheren Blutes oder Knochenmarkzellen mittels Markierung einzelner Banden auf verschiedenen Chromosomen auf polymorphe Unterschiede untersucht. Bei Geschlechtsdifferenz zwischen Patient und Spender hilft die Detektion des Y- Chromosom, die Herkunft der Zellen zu bestimmen [61]. Für diese sogenannte Barr-Körperchen-Analyse nutzt man v.a. die *Fluoreszenz in-situ Hybridisierung* (FISH) [62,63], die aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit heute Standard bei der Chimärismusanalyse nach gegengeschlechtlicher Transplantation ist. Die FISH-Technik zeigt eine gute Korrelation mit den Ergebnissen der STR-PCR-Technik [48,64] (siehe unten), wird ihr aber aufgrund der Praktikabilität im klinischen Alltag vorgezogen. Die Sensitivität der Chromosomenuntersuchungen ist abhängig von der Anzahl der untersuchten Metaphasen. Um einen Chimärismus von 10% mit 95% Genauigkeit auszuschliessen, müssen 30 Metaphasen untersucht werden, bei einem Chimärismus von 5% bereits 59 [53]. So ist es oft schwierig, ausreichend Material zu erhalten, um einen gemischten Chimärismus sicher auszuschliessen.

Der Phänotyp der Erythrozyten ist ein individueller Marker. Die Expression der verschiedenen Antigen-systeme (ABO, Rh, MNSs, Duffy usw.) auf der Erythrozytenoberfläche unterscheidet sich so gut wie immer zwischen Spender und Empfänger [53]. Dies macht man sich bei der *Hämoagglutinationsmethode* zu nutze. Eine differente Population von Erythrozyten ist mittels Standardtechniken ab einem prozentualen Anteil von etwa 1% nachweisbar [65]. Problematisch hierbei sind jedoch die im Rahmen der Transplantation häufig notwendigen Erythrozytentransfusionen, die den Ausschluss eines gemischten Chimärismus für die Zeit von 4-6 Monaten unmöglich machen, weil sich transfundierte Erythrozyten bis zu 120 Tage nachweisen lassen [66].

Mittels Allotypisierung der von B-Lymphozyten produzierten Immunglobuline, der sogenannten *Immunglobulinallotypisierung*, lässt sich deren genetische Herkunft

bestimmen. Populationen ab 3% können hierbei entdeckt werden. Jedoch lassen sich bisher nur bei etwa 50% der Spender-/ Empfängerpaare die nötigen spezifischen Unterschiede nachweisen und auch hier ist nach Transfusionen das Ergebnis verfälscht sein [53,60,67,68,69].

Die *HLA-Typisierung* der Leukozyten beruht auf dem Nachweis mindestens eines zwischen Spender und Empfänger unterschiedlichen *human leukocyte antigen* (HLA). Diese sehr sensitive Methode ist bei hohem Zeitaufwand nur dann möglich, wenn es sich um eine sogenannte „mismatched transfusion“ handelte, bei der man einen Unterschied der HLA-Moleküle vor der Transplantation in Kauf genommen hatte [53].

Die genannten Ansätze haben jeweils ein oder mehrere Nachteile wie einen geringen Polymorphismusgrad, niedrige Sensitivität, die Notwendigkeit eines molekularen Markers oder einer Spender-Empfänger-Geschlechtsdifferenz [70]. Dem gegenüber haben *molekularbiologische Techniken* zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität der Chimärismusuntersuchungen geführt.

Bei der Methode des *DNA-Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus* (RFLP) wird aus Zellen des peripheren Blutes extrahierte DNA mit Endonuclease gespalten, wodurch sich individuelle DNA-Variationen zwischen Spender- und Empfängerzellen in verschieden langen Fragmenten zeigen. Diese werden durch Elektrophorese aufgetrennt und hybridisiert. Unterschiedliche DNA-Populationen von mindestens 1 bis 10% lassen sich mit dieser Methode nachweisen [53,71,72,73].

Neben den „variablen Anzahlen von Tandemwiederholungen“ (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR) werden v.a. kurze repetitive Mikrosatelliten (engl. *short tandem repeats*, STR) in einzelnen Leukozytensubpopulationen zum Nachweis eines gemischten Chimärismus bei geringen Zellzahlen und bei Fehlen spezifischer molekularer Marker eingesetzt. STR sind hochpolymorphe repetitive Di-, Tri- und Tetranukleotidsequenzen verschiedener Länge, die über das gesamte Genom verstreut in die DNA inseriert sind. Die Analyse mit STR wird möglich durch die Detektion der verschiedenen Längen der repetitiven Nukleotidsequenzen, in denen Spender und Empfänger differieren [64]. Interessierende Segmente (Short-Tandem-Repeat Gen Loci) der DNA werden bei dieser Methode mittels thermostabiler Polymerase vervielfacht und nach elektrophoretischer Auftrennung ausgewertet. Vorteile sind der hohe Polymorphismusgrad der verwendeten Marker, rasche Durchführbarkeit, die spezifische Untersuchung einzelner

Leukozytensubpopulationen, die geringe Zahl benötigter Zellen und die Unabhängigkeit von molekularen Krankheitsmarkern. Die Nachweisgrenze einer DNA-Populationen wird mit 0,1% angegeben [49,59,60,53,74,75].

Methode	Sensitivität	Vorteile	Nachteile
XY-FISH	0.1 %	quantitative, sensitive, standardisierte Technik	nur bei Geschlechtsdifferenz möglich
Hämoagglutinationsmethode	1 %	sensitiv, schnell	posttransplantare Transfusionen stören Ergebnis
Immunglobulinallotypisierung	3 %		unterschiedliche molekulare Marker nötig, Verfälschung durch Transfusionen
HLA-Typisierung	1 %	sensitiv	auf „mismatched transfusions“ beschränkt, zeitaufwendig
RFLP	1-10%	vergleichsweise wenig aufwendige molekularbiologische Technik	moderate Sensitivität
STR-/VNTR-PCR	1-5 %	schnell, geringe Zellzahl nötig	moderate Sensitivität
STR-PCR + Zellsortierung	0.1 %	sensitiv, zelllinienspezifisch	laborintensiv

Tab. 1: Etablierte Methoden der Chimärismusanalyse

### **1.2.3 Retikulozytenchimäsimus als alternative Methode**

Die Bestimmung des Retikulozytenchimärismus könnte als eine alternative Methode zur Chimärismusbestimmung nach Transplantation haematopoetischer Stammzellen herangezogen werden. Retikulozyten sind aus Normoblasten hervorgehende Proerythrozyten, die noch Reste von Zellorganellen und RNS enthalten. Diese "substantia reticulogranulofilamentosa" lässt sich durch Anfärben mit Thiazolorange darstellen, wodurch die Retikulozyten u.a. durchflußzytometrisch messbar werden. Die im Blut zirkulierenden Retikulozyten verlieren diese Substanz durch Autophagie und Exozytose innerhalb von 1-2 Tagen, womit die Reifung zum Erythrozyten beendet ist.

Die durchflußzytometrische Analyse der Retikulozyten nach KMT bzw. PBSCT wurde bisher nicht zur Chimärismusanalyse eingesetzt. Sie weist aber gegenüber etablierten Methoden mehrere Vorteile auf. Im Gegensatz zu Methoden, die Knochenmarkspunktionen erfordern, kann eine Untersuchung roter Blutzellen durch periphere Blutentnahme sehr einfach wiederholt durchgeführt werden. Anders als Erythrozyten-Antigen-Bestimmung und Immunglobulinallotypisierung, die durch Erythrozyteninfusionen und Gammaglobulin-Gaben beeinflusst sind, repräsentiert die Untersuchung der Retikulozyten die aktuelle Hämatopoese. Eine Verfälschung durch die bis zu 120 Tage vorhandenen Empfängererythrozyten erscheint ausgeschlossen. Zudem bietet die auf Durchflußzytometrie beruhende wenig laborintensive Methode gegenüber molekularbiologischen Methoden zeitliche und finanzielle Vorteile.

### **1.2.4 Prognostische Aussagekraft**

Viele wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre haben zu einem besseren Verständnis des Chimärismus nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen beigetragen. Inwieweit Patienten mit einem gemischten Chimärismus ein erhöhtes Risiko einer Transplantatabstoßung oder eines Rezidivs haben, konnte in klinischen Studien bisher jedoch nur teilweise geklärt werden. Es finden sich in der Literatur widersprüchliche Daten über die prognostische Aussagekraft [58,76,77,78,79,80]. So zeigten Bader et al. bei Patienten mit verschiedenen Leukämien, dass ein

ansteigender MC mit einer erhöhten Rezidivrate einhergeht [79,80]. Hingegen fanden Choi et al. keine Relevanz eines gemischten Chimärismus für die rezidivierende akute Leukämie [76].

Der Grund für die Diskrepanz der Studienergebnisse über die Relevanz der Chimärismusanalysen ist noch immer nicht endgültig geklärt. Möglicherweise sind es technische Gründe, wie die unterschiedliche Sensitivität oder verschiedene Untersuchungsprotokolle. Auch die Auswahl des Patientenkollektivs erscheint bedeutsam. Denn die meisten Studien, die eine prognostische Bedeutung des MC zeigen konnten, untersuchten pädiatrische Patienten. So bleibt die Frage nach der Aussagekraft des MC weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen und wird kontrovers diskutiert [49,77].

Zusätzlich konnte von Gyger einen möglichen Einfluss des Chimärismus nach allogener HST auf Graft failure und das Auftreten einer GvHD zeigen [81].

### **1.3 Fragestellungen**

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, den Retikulozytenchimärismus als eine alternative Methode zur Chimärismusbestimmung nach Transplantation haematopoetischer Stammzellen zu evaluieren. Sie besitzt wie oben beschrieben gegenüber etablierten Methoden mehrere Vorteile. In der ausgewählten Fragestellung soll die Richtigkeit und Sensitivität der Methode an genau definierten Blutgemischen gezeigt werden. Weiterhin soll in einer klinischen Untersuchungsreihe bei Patienten nach KMT oder PBPC die Nachweisbarkeit eines Chimärismus und der Stellenwert der Methode dokumentiert werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Antikörper

#### Biotest AG, Dreieich

Rh- Seren inkomplett

Anti-E (RH3)

Rh- Seren inkomplett

Anti-e (RH5)

#### Biotrend Chemikalien GmbH, Köln

Blood Group Rh related human IgG

Clone BRIC 69

#### Dianova AG, Hamburg

Fab anti-human IgG (H+L) R- Phycoerythrin- Konjugat

#### Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA

Goat Anti-Human IgG, Ph-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment

#### Serologicals Ltd, Livingston, Großbritannien

Anti-C Human IgG monoclonal Antibody

Clone MS-23

Anti-D Human IgG monoclonal Antibody

Clone MS-26

Anti-E Human IgG monoclonal Antibody

Clone MS-78

#### Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA

Goat Anti-Human Ig (H+L)-RPE

### 2.2 Chemikalien und Reagenzien

#### Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

HiTrap affinity columns Protein A

HiTrap affinity columns Protein G



Becton Dickinson, San Jose, USA

FACSSafe

FACSRinse

FACSFlow

CellWASH

Biochrom KG, Berlin

PBS-Dulbecco w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

Biologische Analysensystem GmbH, Lich

Anti-D monoklonal, saline (IgM)

BAG Elutions-System

Biotest AG, Dreieich

Rh-Serum inkomplett Anti-c (RH4)

Rh-Serum inkomplett Anti-C (RH8)

Rh-Serum inkomplett Anti-E (RH3)

Rh-Serum inkomplett Anti-e (RH5)

Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden

HiTrap™ Protein G HP 1ml

HiTrap™ Protein A HP 1ml

DiaMed SA, Cressier, Schweiz

ID-Card „Liss/Coonbs“

ID-DiaCell Testerythrozyten

ID-Diluent 2

LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland

Fetales Kälberserum

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Thiazol- Orange

## **2.3 Geräte**

### B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Einmalspritze 20ml

### Becton Dickinson, San Jose, USA

FACScan™, Flow Cytometer

FALCON 5ml Round-Bottom Tubes

### Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Standardtips 5µl, 20µl und 100µl

### Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich

Rundbodenröhrchen 12ml

### Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Rotanta P

Roto Silenta/KS

### Kabe, Nümbrecht

Primavette K3E

### Janke & Kunkel, Staufen

Vibrofix VF 1

### Süd-Laborbedarf GmbH, Starnberg

SL-Pette

### Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Einmal-Pasteurpipetten 3,5ml

Sysmex GmbH, Norderstedt

Sysmex KX-21

## **3. Methode**

### **3.1 Gewinnung von Vollblut**

#### **3.1.1 Gesunde Probanden**

Um die Genauigkeit und Sensitivität der neuen Methode zur Chimärismusbestimmung evaluieren zu können, wurde gesunden Spendern in der Abteilung für Transfusionsmedizin 2ml EDTA antikoaguliertes Blut peripher entnommen. Deren Blutgruppen im AB0- und Rhesus-System (CcD.Ee) waren im Rahmen der Spenderbestimmung im Routinelabor bestimmt worden.

#### **3.1.2 Patienten**

Zwischen Januar und Juni 2001 wurde 11 Patienten mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen an der Abteilung für Knochenmarktransplantation des Klinikum Grosshadern nach KMT bzw. PBPCT 2ml EDTA antikoaguliertes Blut entnommen. Hierfür lag ein positives Votum der Ethikkommission vor (siehe Anhang S. 65). Die Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt des Takes zwischen dem 24. und 79. Tag nach Transplantation. Mit der vorgestellten Methode wurde am selben Tag der Chimärismus im Rhesus- bzw. AB0-System, je nach bekannter Differenz zwischen Spender und Empfänger im Rahmen der Austestung vor Transplantation, bestimmt. Eine Zusammenstellung der Patienten, deren jeweilige Diagnose, Art der durchgeführten Stammzelltransplantation und das die Transplantation vorbereitende Konditionierungsschema findet sich in Tabelle 2.

Patient	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Transplantation	Konditionierungsschema
1	44/m	ALL	PBPCT	TBI,Cy,ATG,CyA
2	43/w	CML	BMT	TBI,Cy,ATG,CyA,MTX
3	46/w	ALL	PBPCT	TBI,Flu,Cy,ATG,CyA
4	27/m	AML	PBPCT	TBI,Flu,Amsa,AraC,Cy,ATG,CyA,MMF
5	42/m	CLL	PBPCT	TBI,Flu,Cy,ATG,CyA,MMF
6	61/m	CML	PBPCT	TBI,Flu,Amsa,AraC,Cy,ATG,CyA,MMF
7	37/m	MM	BMT	TBI,Flu,Cy,ATG,CyA
8	45/m	B-NHL	PBPCT	TBI,Flu,Cy,CyA
9	57/m	CML	BMT	TBI,Flu,Cy,ATG,CyA,MTX
10	24/m	NHL	BMT	TBI,Cy,ATG,CyA,MTX
11	26/w	CML	PBPCT	TBI,Cy,ATG,CyA,MTX

Tab. 2: Patientenkollektiv (TBI = total body irradiation, Cy = Cyclophosphamid, Flu = Fludarabin, Amsa = Amsacrin, AraC = Cytarabin, ATG = anti-thymocyte-globulin, CyA = Cyclosporin A)

## 3.2 Zellpräparation

In ein 5-ml-FALCON-Röhrchen wurden 500µl der EDTA-antikoagulierten Probe pipetiert und 3x mit CellWASH gewaschen. Dabei wurde jeweils 3 min mit 300g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die gewaschene Probe wurde mit optimiertem PBS Puffer auf ca.  $1 \times 10^6$  Erythrozyten/µl verdünnt. Die Zellzahl wurde mittels Durchflußzytometrie im Sysmex kontrolliert.

### 3.2.1 Retikulozytenzählung

Für die Retikulozytenzählung wurden 5µl der so präparierten Probe abpipetiert und in 800µl Thiazolorange gegeben. Gleichzeitig wurde von jeder Probe eine Negativkontrolle von 5µl in 800µl optimiertem PBS Puffer angesetzt. Die Messung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln am Durchflußzytometer.

### 3.2.2 Präparation zur Retikulozyten- / Erythrozytenantigenbestimmung

5µl der gewaschenen Blutprobe wurden der entsprechenden optimalen Menge an primärem Antikörper zugesetzt (Tab. 3) und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Weitere 5µl wurden als Negativkontrolle bereitgestellt, um später die unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers festzustellen.

Antikörper	Anti-D-Ak	Anti-C-Ak	Anti-c-Ak	Anti-A-Ak
Menge	20µl	30µl	60µl	60µl

Tab. 3: Eingesetzte Menge des primären Antikörpers

Nach zweimaligem Waschen mit CellWASH wurden 100µl des 1:100 mit PBS verdünnten R-PE markierten Goat Anti-Human IgG zugegeben. Dieser diente als Sekundärer Antikörper und wurde in gleicher Menge auch dem wie oben beschrieben bereitgestellten Blut zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln und einem weiteren Waschvorgang wurde beiden Proben 800µl Thiazolorange zupipetiert. Vor der durchflußzytometrischen Messung wurde jede Probe nochmals 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

### 3.3 Messung am FACScan

Die Messung erfolgte am FACScan Durchflußzytometer der Firma BD. Die Methode der Durchflußzytometrie dient der Charakterisierung gefärbter Einzelzellen in Suspension anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung und hat sich auch bei der quantitativen Bestimmung von Erythrozyten und Retikulozyten verschiedener Blutgruppen bewährt [82,83]. Zur Analyse wird die Zellsuspension in ein Probenröhrchen gegeben. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich eingeführt. Hier treten sie in eine Messküvette ein, die von einem fokussierten 488nm-Argon-Ionen-Laser durchstrahlt wird. Die Zellen können den Laser nur einzeln passieren. Die Streulicht-

und Fluoreszenzsignale werden durch optische Systeme auf die verschiedenen Photoverstärkerröhren geleitet. Das ungefilterte Spektrum des Vorwärts- bzw. Seitwärtskanals wird nach Ablenkungswinkel erfaßt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) ist proportional der Granularität der Zelle [84]. Je nach Kopplung der fluoreszenzmarkierten Antikörper geben sie über die entsprechenden Antigene Aufschluß. Zur Abgrenzung der Emissionsspektren von Thiazolorange und PE wurden Filter unterschiedlicher Wellenlänge verwendet [85]. Die Calibration erfolgte mittels standardisierter Proben der Firma Becton Dickinson (CaliBRITE). Die Auswertung erfolgte auf einem Macintosh-Computer mit Hilfe der „CELLQuest Research Software“ (Becton Dickinson) entweder als einparametrisches Histogramm oder als zweiparametrisches Diagramm (Dot-Plot), in dem jede Zelle als ein Punkt dargestellt wurde. Pro Ansatz wurden 100000 Ereignisse gemessen. Es wird jeweils der prozentuale Anteil der zu messenden Population angegeben.

### 3.4 Auswertung

In einem ersten Schritt der Auswertung wurden die roten Blutkörperchen insgesamt (Ery- und Retikulozyten) mittels ihrer spezifischen Zellgröße und Granularität identifiziert. Zur weiteren Auswertung wurde diese Population als Region R1 definiert (Abb. 1), wodurch unspezifische Signale und Zelldebris von der Auswertung ausgenommen wurden.

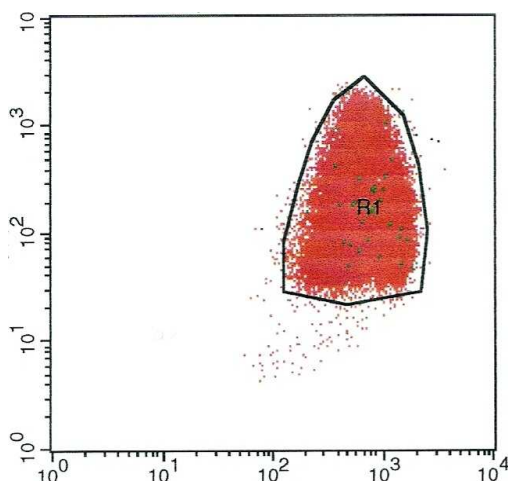


Abb. 1: Erythrozyten und Retikulozyten

### 3.4.1 Retikulozytenzählung

Die Abgrenzung der Retikulozyten von den Erythrozyten erfolgte anhand der Negativkontrolle ohne Zugabe der Fluoreszenzmarkierung durch Thiazolorange. Im einparametrischen Histogramm wurde die Region R2 so gesetzt, dass sie vom Ursprung der y-Achse exakt 99,9% der Ereignisse einschloss. Die Region R2 soll somit alle Thiazolorange negativen Ereignisse d.h. die Erythrozyten erfassen. Die Region R3 wurde anschliessend so gesetzt, dass sie mit dem linken Ende genau auf dem rechten Ende von R2 lag. Das rechte Ende von R3 wurde nun nach rechts geöffnet, bis 3/4 der x-Achse eingeschlossen wurden (Abb. 2 und 3). Das letzte Viertel der x-Achse sollte nicht in die Auswertung mit einbezogen werden, da hier ebenfalls fluoreszierende Leukozyten liegen könnten [86]. In der im Anschluss bei unveränderter Regioneinstellung durchgeführten Retikulozytenmessung erfasste die Region R3 nun möglichst alle Retikulozyten.

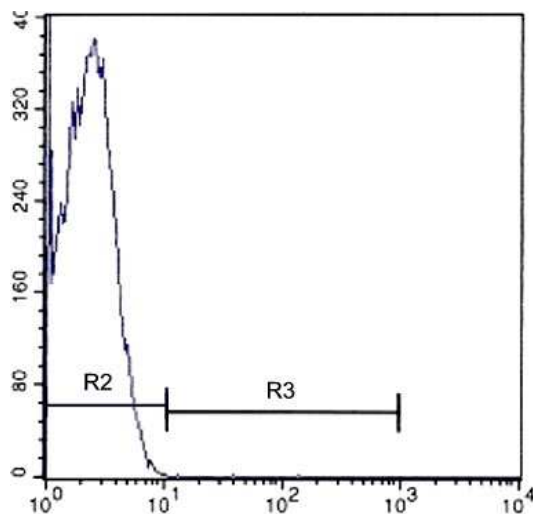


Abb. 2: Einstellung von R2 und R3 anhand der Negativkontrolle

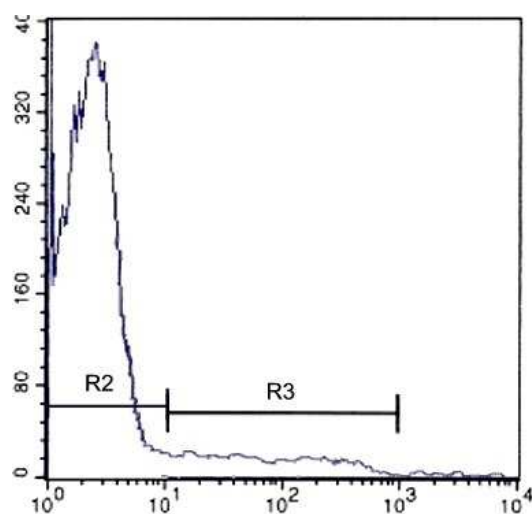


Abb. 3: Retikulozytenmessung

### 3.4.2 Retikulozyten- / Erythrozytenantigenbestimmung

Eine Negativkontrolle, die mit fluoreszenzmarkierten, aber nicht mit Oberflächenantigenen reagierenden Antikörpern gleichen Isotyps durchgeführt wurde, galt als Maß für unspezifische Bindungen und Autofluoreszenz. Anhand dieser



Negativkontrolle wurde eine waagerechte Linie positioniert, die negative von positiven Ereignissen der Erythrozyten- und der Retikulozytenpopulation trennt. Mindestens 99% der gezählten Ereignisse der Negativkontrolle sollten unterhalb der Linie liegen, um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten (Abb. 4).

Während der Messung erschienen nun die zuvor in R3 von den Erythrozyten abgegrenzten Retikulozyten in den Regionen R4 und R5. Die Ereignisse in R4 fluoreszierten sowohl orange (Thiazolorange) als auch rot (r-PE) entsprechend Antigen positiver Retikulozyten, die in R5 nur orange entsprechend Antigen negativer Retikulozyten. Bei den in den Regionen R6 und R7 erfassten Ereignissen handelte es sich um die Erythrozyten. Dabei beinhaltete R6 die rot fluoreszierenden und Region R7 alle nicht fluoreszierenden Erythrozyten (Abb. 5).

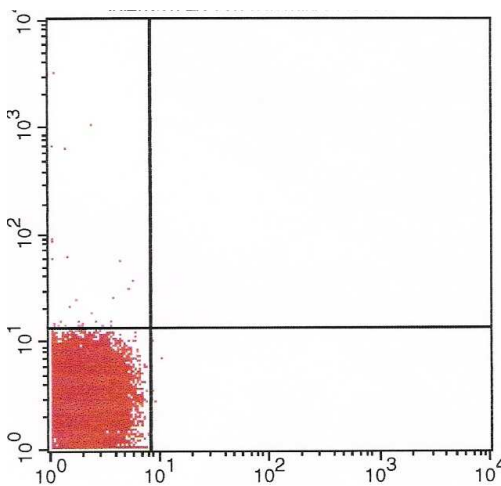


Abb. 4: Unspezifische Ereignisse

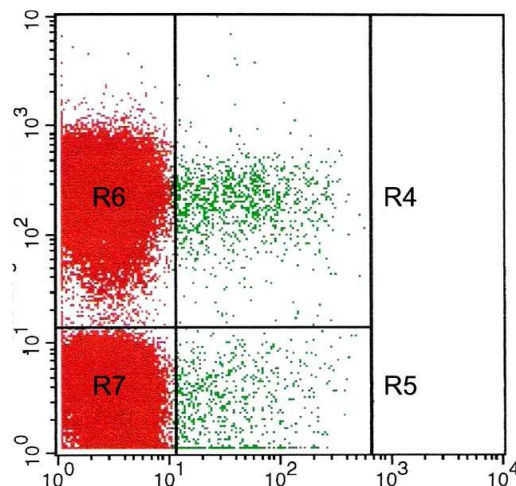


Abb. 5: Regionenzuordnung

### 3.5 Kontrollen

Zur Durchführung einer Spezifitätskontrolle wurde jeweils nur der Sekundärantikörper und nicht der Primärantikörper zugegeben. Dieses Vorgehen diene als Negativkontrolle.

Als weitere Spezifitätskontrolle wurde der primäre Antikörper bei den Präparaten eingesetzt, bei denen das entsprechende Antigen mit serologischen Methoden der Blutgruppenbestimmung nicht nachweisbar war.

Als Positivkontrollen bei der Untersuchung der Blutgruppenmerkmale wurden Präparate zum Vergleich mitgeführt, die das jeweils nachzuweisende Antigen in voller Ausprägung bekanntermaßen enthielten (Sensitivitätsnachweis).

### **3.6 Chimärismusanalyse mittels STR-Methode**

Die Chimärismusanalyse mittels STR-Methode wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität München durchgeführt. DNA von Spendern und Empfängern wurde hierfür aus Knochenmark oder peripherem Blut isoliert, die interessierenden STRs durch PCR kopiert und die PCR-Produkte ihrer Länge nach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt [87]. Freundlicherweise stellten uns die Kollegen ihre Resultate für die in unsere Untersuchung eingeschlossenen Patienten zur Verfügung, um einen Vergleich anzustellen.

### **3.7 Statistische Methoden**

Die Datenerfassung und Datenorganisation erfolgte mit Microsoft- Excel- Dateien für Windows, Version 1998 und 2000. Alle Angaben zu den Messergebnissen entsprechen dem jeweiligen Mittelwert (M) mit dazugehörigem Standardabweichung (SA). Bei durchflusszytometrischen Messungen wird jeweils der prozentuale Anteil der zu messenden Population angegeben. Zur Berechnung der Präzision diente der Variationskoeffizient (VC).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Methodische Entwicklung und Evaluierung

#### 4.1.1 Antikörper

##### 4.1.1.1 Wahl des geeigneten Primärantikörpers

##### 4.1.1.1.1 Antikörper aus der Routineblutgruppenbestimmung

Kommerziell erhältliche Rh-Seren enthalten in der Regel ein Gemisch aus IgM und IgG-Antikörpern, um z.B. bei der Blutgruppenbestimmung die Agglutinationsfähigkeit der IgM-Antikörper zu nutzen. Dieser Effekt war bei dieser Untersuchung hinderlich, da in der Durchflußzytometrie präzise Ergebnisse nur durch Messung von Einzelzellsuspensionen zu erhalten sind. Um während der Antikörperinkubation gebildete Agglutinationen wieder zu lösen, empfehlen einige Autoren, die Probe vor der Messung durch eine 25-gauge Nadel zu spritzen [88]. Die Genauigkeit dieser einfach durchführbaren mechanischen Methode wurde mit kommerziell erhältlichen inkompletten Rh- Seren Anti-e und Anti-E geprüft. Der Versuch wurde wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben durchgeführt und zusätzlich wurde die Probe vor der durchflußzytometrischen Messung durch eine 25g Nadel gezogen.

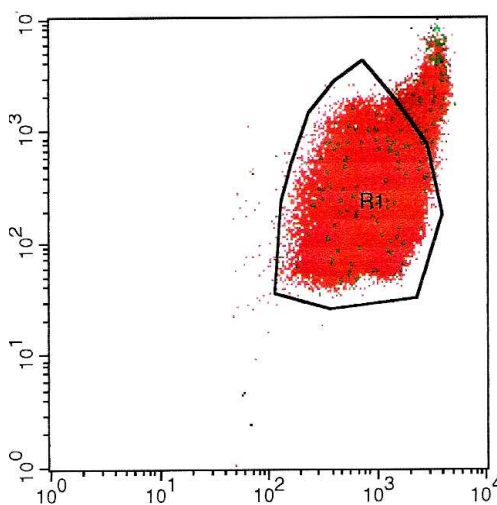


Abb. 6: Vor mechanischer Trennung

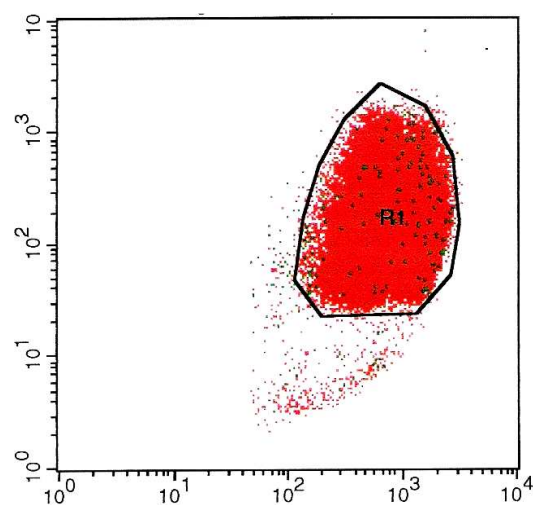


Abb. 7: Nach mechanischer Trennung

Vor mechanischer Trennung mittels 25G Nadel zeigten sich im Vorwärts-Seitwärtsdiagramm deutliche Agglutinationen in Form einer weiteren Population mit

höherer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung neben der normalen Erythrozyten- und Retikulozytenpopulation (Abb. 6). Die Agglutinate waren nach der mechanischen Trennung nicht mehr nachweisbar. Jedoch fanden sich jetzt Zellfragmente unterschiedlicher Größe und Granularität (Abb. 7).

Durch Agglutination bedingt konnten 8-10% der gemessenen Ereignisse nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die mechanische Trennung der agglutinierten Zellen mittels einer 25-gauge-Spritze reduzierte zwar diesen Fehler. Jedoch gingen nach mechanischer Trennung noch immer etwa 2% der Ereignisse für die Messung verloren. Vermutlich wurden die Zellen mechanisch beschädigt und daher nicht mehr durch ihre Granularität und Größe als Erythrozyten bzw. Retikulozyten im Durchflußzytometer erkannt d.h. sie lagen außerhalb der Region R1. In der Absicht Retikulozytenpopulationen von wenigen Prozent nachzuweisen, ist ein methodischer Fehler dieser Größe jedoch nicht tolerabel und daher wurde nach einem anderen Weg, um Agglutinate zu vermeiden, gesucht.

#### **4.1.1.1.2 Versuch der IgG-Anreicherung**

Kommerziell erhältliche Testseren enthalten sowohl IgG als auch IgM. Jedoch nur Antikörper der Gruppe IgM führen zur Agglutination. Es gibt aber die Möglichkeit IgG-Antikörper anzureichern. Dies wurde mit den Affinitätschromatographiesäulen HiTrap Protein G und Protein A versucht. Dabei wurden Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten eingesetzt. Eine elektrophoretische Überprüfung der Anreicherung der IgGs in der Abteilung für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern zeigte, dass die Elution mit der Lösung aus dem BAG-Elutionskid (pH 2,0) eine Anreicherung der IgG erbrachte. Weitere Versuche der Elution mit Zitronensäure unterschiedlicher Konzentrationen und Glycin-HCl brachten keine Verbesserung mehr. Durch den Anreicherungsprozess wurde jedoch die Affinität des Antikörpers zum Antigen herabgesetzt und konnte auch durch den Einsatz größerer Volumina des Primärantikörpers -eingesetzt wurden 50µl-800µl- nicht kompensiert werden (Abb. 8-11). Um wirklich befriedigende Ergebnisse zu erhalten, erscheint es notwendig reines IgG anzuwenden.

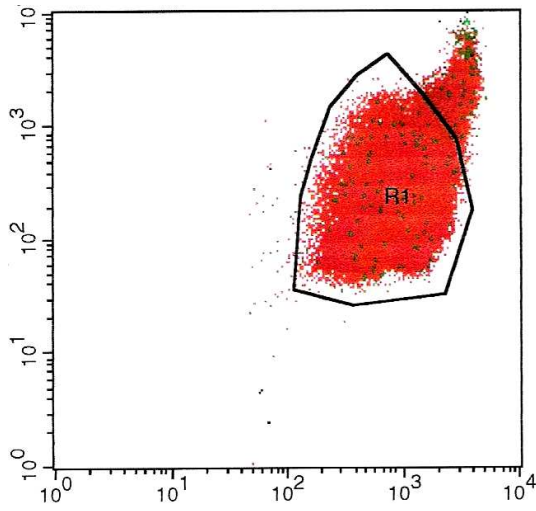


Abb. 8: Messung mit einem zu Agglutinationen fähigen IgG-/ IgM-Gemisches

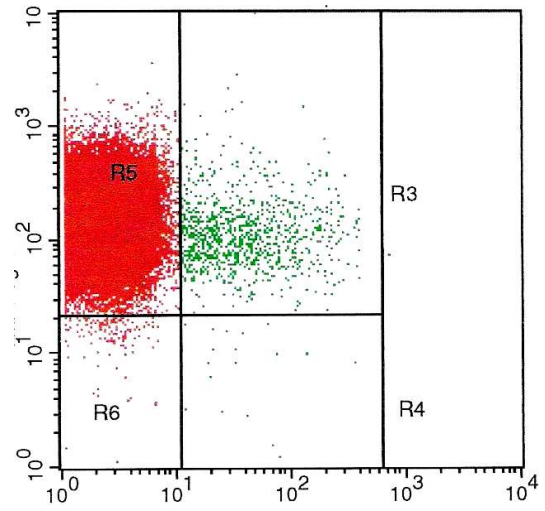


Abb. 9: Dazugehöriges Ergebnis mit merkmalspositiven Zellen

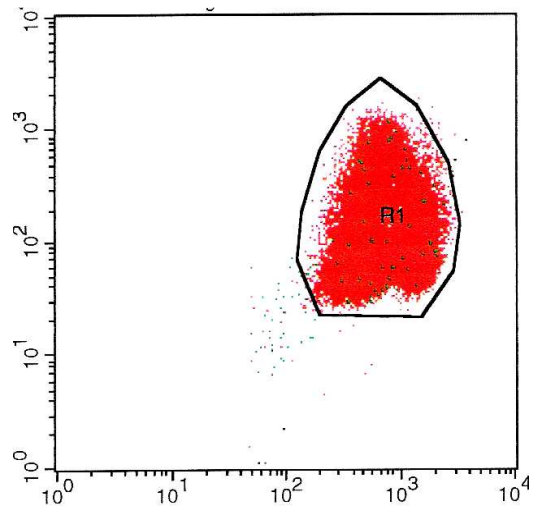


Abb. 10: Messung mit einem IgG angereicherten IgG-/ IgM-Gemisches

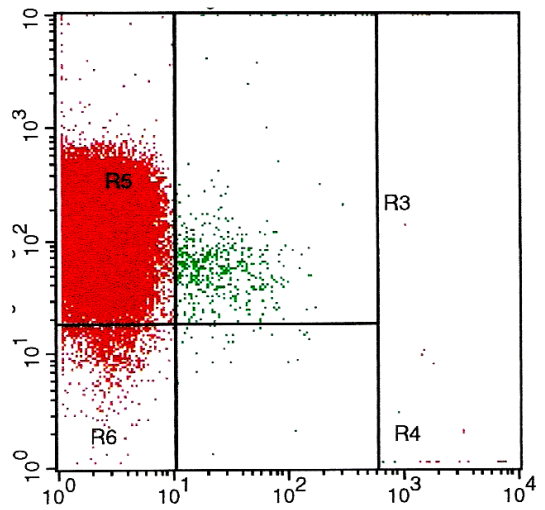


Abb. 11: Dazugehöriges Ergebnis mit merkmalspositiven Zellen

#### **4.1.1.1.3 Gewinnung von reinen IgG-Antikörpern**

In der Routinediagnostik werden gewöhnlich keine reinen IgG-Seren verwendet. Es mussten neue Wege der Gewinnung reiner IgG-Antikörper gesucht werden.

Die Plazentarschranke zwischen mütterlichem und kindlichem Blut stellt einen der effektivsten Filter für IgM dar, da diese ein zu großes Molekulargewicht aufweisen. Daher lag die Überlegung nahe, sich diesen Mechanismus durch Verwendung von Nabelschnurblut zu Nutze zu machen: Im Falle einer AB0-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind bildet die Mutter, die in einem solchen Fall Trägerin der Blutgruppe 0 ist, beim fetomaternalen Erythrozytenübertritt anti-A- bzw. anti-B-Antikörper je nach Blutgruppe des Kindes. Es handelt sich dabei um Immunglobuline der Klasse G, die somit Plazenta gängig sind und im kindlichen Blut zirkulieren. Postpartal lassen sich diese Antikörper auf den kindlichen Erythrozyten im Nabelschnurblut nachweisen und daraus eluieren.

##### **4.1.1.1.3.1 Materialgewinnung**

Auf der Geburtenabteilung des Klinikums Großhadern wurde bei Gebärenden mit der Blutgruppe 0 postpartal 10ml EDTA antikoaguliertes Nabelschnurblut entnommen. Die Abnahme setzte die informierte Zustimmung der Frau voraus. Fiel der mit dieser Probe durchgeführte direkte Coombstest positiv aus, wurden die Antikörper aus dem Nabelschnurblut eluiert.

##### **4.1.1.1.3.2 Elution der Antikörper**

###### **4.1.1.1.3.2.1 Prinzip der Elution**

Die Elution nutzt die Reversibilität einer Antigen-Antikörper-Reaktion: Da es sich bei der Ag-AK-Reaktion nicht um eine chemische Verbindung handelt, sondern die Moleküle lediglich über elektrostatische und van der Waalsche Kräfte gehalten werden, kann der Antikörper durch Änderung des Reaktions-Milieus (Erhitzung,

Ansäuerung) wieder von seinem spezifischen Antigen getrennt werden. Dieser Vorgang wird als Abspaltung oder Elution bezeichnet und dient der Gewinnung von spezifischen Antikörpern (Abb. 12).

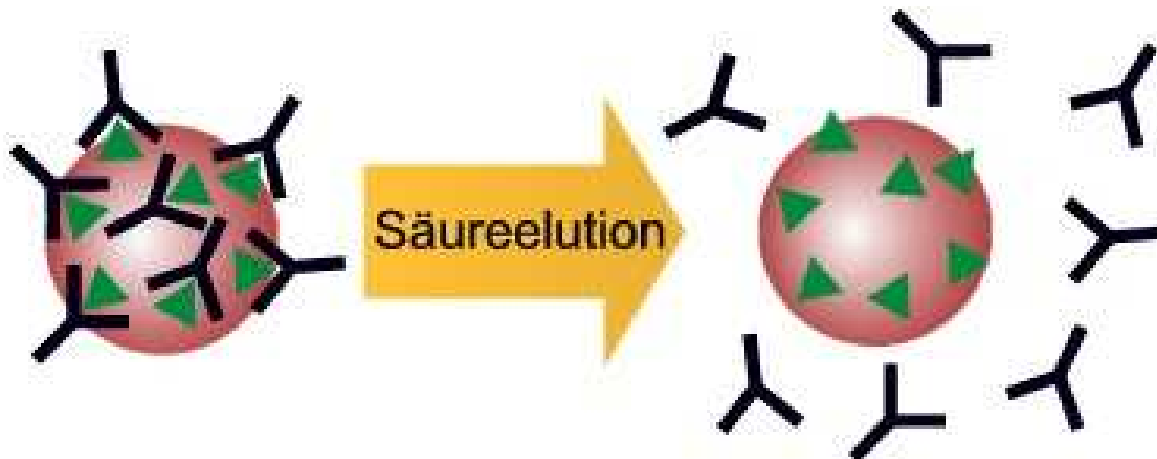


Abb. 12: Säureelution

#### 4.1.1.1.3.2.2 Verfahren der Elution

Die in vivo an Erythrozyten angelagerten Antikörper wurden in einem Säure-Elutionsprozeß dissoziiert und anschließend der Antikörpertiter des Eluats im modifizierten Coombstest bestimmt. Es wurde das BAG Elutions-System verwendet. 3ml des Nabelschnurvollbluts wurden einmal in NaCl gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert. Das Erythrozytenkonzentrat wurde mit der im Elutionssystem mitgelieferten Waschlösung 4x gewaschen. Die Waschlösung wurde zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und in einem verschlossenen Behälter auf 4°C abgekühlt, um die Gefahr einer Dissoziation der gebundenen Antikörper während des Waschvorgangs zu vermindern. Den gewaschenen Erythrozyten wurde Elutionslösung im Verhältnis 1:1 zugegeben, gut gemischt und 1 Minute bei 900g zentrifugiert. Der Überstand (Eluat) wurde in ein sauberes Teströhrchen überführt und die Erythrozyten verworfen. 5 Tropfen der Pufferlösung wurden gut mit dem Eluat vermischt und tropfenweise Pufferlösung zugegeben, bis eine blaue Färbung sichtbar wurde, welche einen pH-Wert von 6,5-7,5 anzeigt. Um eventuelle Zellreste zu entfernen wurde das Eluat erneut 1 Minute bei 900g zentrifugiert und der Überstand abpipetiert.

Der Antikörpertiter des Eluats wurde im modifizierten Coombstest bestimmt. Verwendet wurde die ID-Card „Liss/Coombs“ der Firma DiaMed. Das Eluat wurde im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64 mit NaCl verdünnt. Eine 0,8%ige Erythrozytensuspension wurde hergestellt, indem 1ml ID-Diluent 2 mit 10µl Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe A leicht gemischt wurde. Die Mikroröhrchen wurden mit jeweils 50µl der Erythrozytensuspension „ID-DiaCell“ bestückt. 25µl des verdünnten Eluats wurde in das entsprechend beschriftete Mikroröhrchen hinzugegeben und die ID-Karte während 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die ID-Karte 10 Minuten bei 900g zentrifugiert und die Reaktion abgelesen.

Auf diese Weise konnten wir anti-A-IgG gewinnen und diese für die weiteren Untersuchungen verwenden. Leider gelang dies nicht für anti-B-Antikörper, da in keiner der vorliegenden Proben anti-B-Antikörper in ausreichender Konzentration vorhanden war. Dies wäre gegebenenfalls bei Etablierung der Methode erneut zu versuchen.

Für das Rhesussystem scheint es noch schwieriger, geeignete Proben aus Nabelschnurblut zu gewinnen. Anti-c, anti-C, anti-e und anti-E werden auch bei Kontakt von mütterlichem und fetalem Blut selten stark genug ausgebildet, da die Merkmale c, C, e und E nur geringe Antigenität besitzen. Zudem wird die Ausbildung von anti-D-Antikörpern heutzutage durch die sogenannte Rhesusprophylaxe verhindert, um das Kind vor hämolytischen Prozessen zu schützen. Nur eine einzige Probe enthielt ausreichend anti-c-Antikörper, um in der beschriebenen Methode Anwendung zu finden.

Daher wurde alternativ nach kommerziellen und hochreinen IgGs gegen Rhesusblutgruppenmerkmale gesucht. Bei einer schottischen Firma Serologicals Ltd, die verschiedene humane, monoklonale Immunglobulinen der Klasse IgG entwickelte, konnten zumindest anti-C- und anti-D- und anti-E-Antikörper der Klasse IgG erworben werden. Diese Antikörper waren aber noch nicht für den klinischen Einsatz getestet. Die anti-E-Antikörper zeigten eine nicht ausreichende Bindungskapazität und konnten daher nicht eingesetzt werden.

Somit standen für unsere Untersuchungen anti-A-IgG, anti-c-IgG, anti-C-IgG und anti-D-IgG zur Verfügung.



#### 4.1.1.2 Ermittlung des geeigneten Antikörpervolumens

##### 4.1.1.2.1 Primärantikörper

Das geeignete Antikörpervolumen wurde mittels Titration bestimmt. Hierfür wurden in einem ersten Schritt die Antikörper in Mengen von 0,5µl; 1µl; 5µl; 10µl; 20µl; 50µl; 100µl und 200µl zu jeweils 5µl der wie unter 3.2 beschrieben vorbehandelten EDTA-Probe gegeben. Die EDTA-Probe enthielt das entsprechende Antigen in voller Ausprägung. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem unter Methode 3.2 beschriebenen Vorgehen. Der für eine gute Messung in Frage kommende Volumenbereich wurde weiter in kleineren Teilschritten untersucht. Als Kriterium für die Beurteilung der Ergebnisse diente die Zahl der unspezifischen Ergebnisse. Diese sank mit steigendem Volumeneinsatz des Antikörpers. Jedoch stieg damit auch der prozentuale Anteil agglutiniertes Zellen, die dadurch der Messung verloren gingen. Es galt also das Volumen einzusetzen, dass zu möglichst wenig unspezifischen Ereignissen führte und gleichzeitig ein Minimum an Agglutination aufwies. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die entsprechenden Antikörper dargestellt:

Anti-c	50µl	60µl	80µl	100µl
Auswertungsrate[%]	99,2	99,3	98,8	97,6
unspez. Ereignisse [Anzahl/ 100000 Ereignisse]	98	53	42	11

Tab. 4: Volumenbestimmung anti-c

Anti-C	20µl	25µl	30µl
Auswertungsrate[%]	98,63%	98,69%	98,55%
unspez. Ereignisse [Anzahl/ 100000 Ereignisse]	10	8	5

Tab. 5: Volumenbestimmung anti-C

Anti-A	20µl	30µl	40µl	50µl	60µl	100µl
Auswertungsrate[%]	99,78	99,61	99,63	99,52	99,07	95,14
unspez. Ereignisse [Anzahl/ 100000 Ereignisse]	9145	5246	1862	1759	612	538

Tab. 6: Volumenbestimmung anti-A

Anti-D	0,2µl	0,4µl	0,6µl	0,7µl	0,8µl	1,0µl	1,2µl
Auswertungsrate[%]	98,59	95,30	97,63	96,56	95,91	77,74	74,34
unspez. Ereignisse [Anzahl/ 100000 Ereignisse]	7498	1035	148	60	46	20	23

Tab. 7: Volumenbestimmung anti-D

Demzufolge wurden folgende Antikörpervolumina für die Methode festgelegt:

- anti-c: 60µl
- anti-C: 30µl
- anti-A: 60µl
- anti-D: 0,7µl

Um eventuelle Unterschiede des geeigneten Antikörpervolumens bei heterozygoten Trägern des entsprechenden Rhesusmerkmals auszuschliessen, wurde auch eine Antikörpervolumenbestimmung mit Blut der Rhesusanlage Cc durchgeführt.

Hierzu wurden artifizielle Blutgemische der Blutgruppe Rhesus CC mit Rhesus cc, bzw. Rhesus Cc mit Rhesus cc untersucht. Es wurde nach der unter 3.2 beschriebenen Methode vorgegangen und anti-C als Primärantikörper eingesetzt. In der folgenden Tabelle sind die Nachweisraten für C positive Zellen dargestellt.

Mischverhältniss	Gemisch CC/cc	Gemisch Cc/cc	Differenz
100% zu 0%	98,36%	97,98%	0,38%
90% zu 10%	86,38%	85,08%	1,30%
50% zu 50%	43,09%	41,29%	1,80%
0% zu 100%	0,22%	0,19%	0,03%

Tab. 8: Artifizielle Blutgemische

Die Blutgemische von homozygoten und heterozygoten C-Merkmalsträger mit Blutgruppe cc zeigen keine signifikanten Abweichungen bei der Messung und es erscheint daher gerechtfertigt, die Methode auch bei heterozygoten Merkmalsträgern anzuwenden.

#### 4.1.1.2.2 Sekundärantikörper

Um die geeignete Konzentration des Sekundärantikörpers zu bestimmen wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Dabei wurde der R-PE markierte Goat Anti-Human IgG-Antikörper 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 und 1:300 mit PBS versetzt. Der übrige Versuchsablauf wurde auf bereits beschriebene Weise durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 9:

Verdünnung	1:50	1:100	1:150	1:200	1:300
Positive Ereignisse [%]	99,40	99,79	92,10	86,29	76,77

Tab. 9: Sekundärantikörperverdünnung

Als Kriterium wurden die in einem Blut, welches das zu messende Merkmal in voller Ausprägung enthielt, gemessenen positiven Ereignisse angelegt. Die geringste den primären Antikörper absättigende Konzentration, also 1:100, wurde als Standardverdünnung festgelegt.

## 4.1.2 Bestimmung der geeigneten Zellpräparation

### 4.1.2.1 Inkubation

Der Versuch, die Oberflächen der Blutzellen in verschiedenen Milieus für die Antigen-Antikörper-Reaktion vorzubereiten, brachte keinen Vorteil: Sowohl die Vorinkubation mit fetalem Kälberserum (auch verdünnt mit PBS) als auch mit Magermilchpulver führten zu vermehrter Agglutination.

Um zu zeigen, ob die Inkubationszeit des Primärantikörpers Einfluss auf das Messergebnis hat, inkubierten wir ein artifizielles Blutgruppengemisch, welches zu 50% ein zu untersuchendes Merkmal trug, 5, 15 und 35 Minuten (Abb. 13-15, Tab. 10). Nach 5 Minuten war die Diskriminierung zwischen positiven und negativen Ereignissen weniger deutlich als nach 15 Minuten. Eine noch längere Inkubationszeit brachte keine Verbesserung:

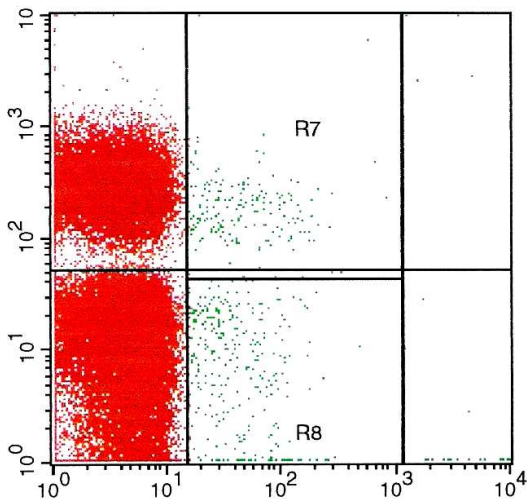


Abb. 13: Ergebnis nach 5 Minuten Inkubation

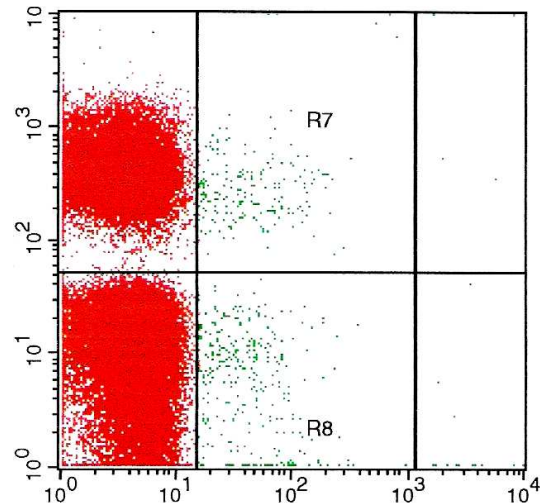


Abb. 14: Ergebnis nach 15 Minuten Inkubation

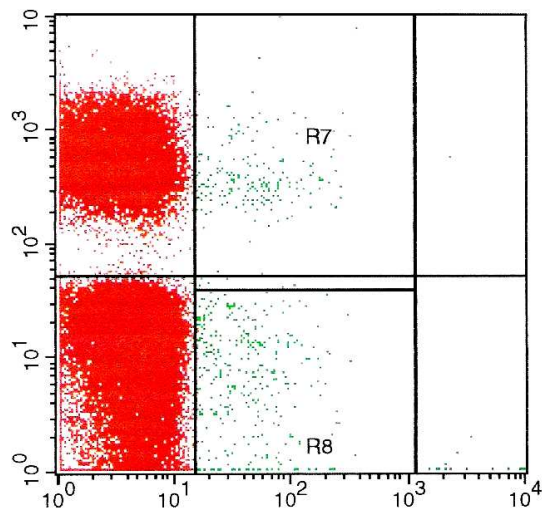


Abb. 15: Ergebnis nach 35 Minuten Inkubation

Inkubationszeit [Min]	5	15	35
Positive Ereignisse [%]	46,79	49,06	49,11

Tab. 10: Inkubationszeit

Bei der Inkubation des Sekundärantikörpers versuchten wir Zeiten von 20, 40 und 60 Minuten. Hier jedoch ergab sich kein Unterschied und wir entschieden uns für die in der Literatur allgemein angegebenen 20 Minuten.

Auch bei der Inkubation von Thiazolorange richteten wir uns nach der in der Literatur empfohlenen Zeit von einer Stunde [89]. Verlängerte Inkubationszeiten von 1,5 und 2 Stunden zeigten jedoch keine unterschiedlichen Ergebnisse.

#### 4.1.2.2 Waschvorgang

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde mit PBS gewaschen. Es wurde versucht, die Nachweisrate durch mehrfaches Waschen zu verbessern. Es zeigte sich jedoch, dass ein Waschen mit PBS häufiger als zweimal keine Verbesserung erbrachte (Tab. 11). Daher wurde zweimaliges Waschen gewählt:

	ohne	1mal	2mal	3mal	4mal
Auswertungsrate[%]	95,17	99,19	99,48	99,44	98,78

Tab. 11: Anzahl der Waschvorgänge nach Inkubation mit dem Primärantikörper

Die Durchführung eines Waschvorganges nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper bedeutete eine deutliche Reduktion der gemessenen unspezifischen Ereignisse. Zeigten sich ohne Waschen 7,94% unspezifische Ereignisse, waren es nach einem Waschvorgang nur noch 0,05% unspezifische Ereignisse. Ein weiterer Waschvorgang brachte keine Verbesserung mehr. Er hatte lediglich einen Zellverlust zur Folge.

#### 4.1.2.3 Zentrifugation

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeit bestimmt werden. Die Zentrifugation im unter 3.2 beschriebenen Ablauf wurde jeweils 3 Minuten mit 700 U/min, 800 U/min, 900 U/min und 1100 U/min durchgeführt.

	700 U/min	800 U/min	900 U/min	1100 U/min
Unspezifische Ereignisse [%]	0,12	0,08	1,14	3,10

Tab. 12: Zentrifugationsgeschwindigkeit

Wie Tabelle 12 zeigt, werden durch hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten Zellen zerstört, die durchflußzytometrisch als unspezifische Ereignisse gemessen werden. Daher wurde 800 U/min als Standardgeschwindigkeit zur Zellpräparation festgelegt.

#### 4.1.2.4 Farbstoffmarkierung

Die in Retikulozyten noch vorhandene RNS ermöglicht es, diese von Erythrozyten durchflußzytometrisch zu diskriminieren: Zellen die RNS enthalten, können mit Farbstoffen wie Thiazolorange angefärbt werden. Thiazolorange besitzt fluoreszierende Eigenschaften und kann daher durchflußzytometrisch nachgewiesen werden [90,91]. Eingesetzt wurden Mengen von 100µl, 200µl, 300µl, 500µl, 800µl und 1000µl. Erst beim Einsetzen von 800µl Thiazolorange ist es möglich die Erythrozytenpopulation von der Retikulozytenpopulation (Regionen R7 und R8) zu trennen (Abb. 16 und 17, Tab. 13). 1000µl brachte keine Verbesserung.

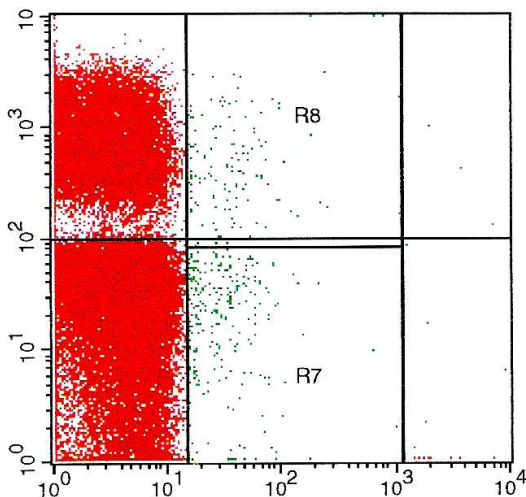


Abb. 16: Ergebnis bei 100µl Thiazolorange

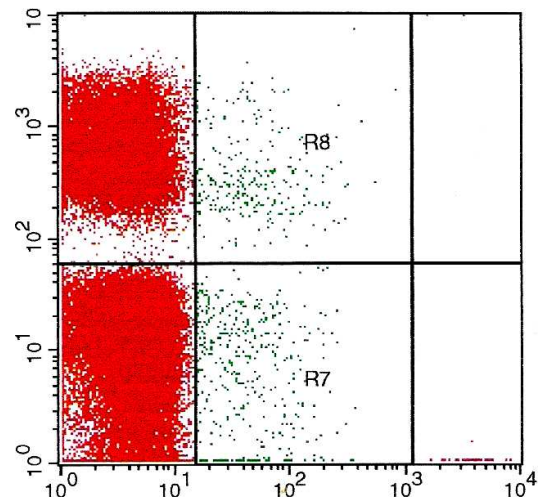


Abb. 17: Ergebnis bei 800µl Thiazolorange

	100µl	200µl	300µl	500µl	800µl	1000µl
Markierte Retikulozyten [%]	68,32	72,67	74,13	87,33	100	100

Tab. 13: Farbstoffmarkierung mit unterschiedlichen Mengen an Thiazolorange

#### 4.1.3 Wiederfindung

Um die Genauigkeit der neuen Methode zu evaluieren wurden Blutproben verschiedener Blutgruppen in folgenden Verhältnissen gemischt:

100:0, 98:2, 95:5, 90:10, 50:50, 10:90, 5:95, 2:98 und 0:100.

Es sollte eine möglichst genaue Messung der vorgelegten Zellen gezeigt werden.

	Erythrozyten		Retikulozyten	
100:0	100,0	0,0	99,4	0,6
98:2	97,3	2,7	96,9	3,1
95:5	93,3	6,7	95,1	4,9
90:10	87,2	12,8	90,0	10,0
50:50	45,6	54,4	49,4	50,6
10:90	8,9	91,1	9,7	90,3
5:95	4,3	95,7	5,0	95,0
2:98	2,1	97,9	2,8	97,2
0:100	0,1	99,9	0,4	99,6

Tab. 14: Wiederfindung anti-c

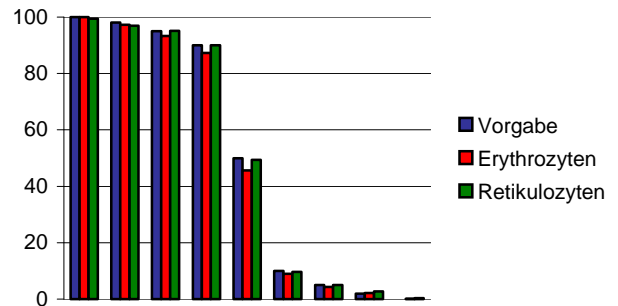


Abb. 18: Wiederfindung anti-c

	Erythrozyten		Retikulozyten	
100:0	99,8	0,2	98	2
98:2	97,6	2,4	96,7	3,3
95:5	94,4	5,6	95,4	4,6
90:10	88,5	11,5	91,8	8,2
50:50	47,9	52,1	49,3	50,7
10:90	11,4	88,6	10,2	89,8
5:95	6,3	93,7	5,9	94,1
2:98	2,6	97,4	2,3	97,7
0:100	0,3	99,7	1	99

Tab. 15: Wiederfindung anti-C

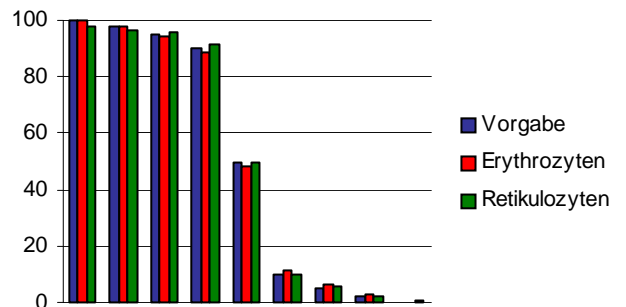


Abb. 19: Wiederfindung anti-C



	Erythrozyten		Retikulozyten	
100:0	99,8	0,2	99,1	0,9
98:2	97,5	2,5	96,6	3,4
95:5	94,5	5,5	94,9	5,1
90:10	89,1	10,9	87,2	12,8
50:50	49	51	50,3	49,7
10:90	7,7	92,3	9,2	90,8
5:95	3,7	96,3	4,3	95,7
2:98	1,6	98,4	2,1	97,9
0:100	0,1	99,9	1,1	98,9

Tab. 16: Wiederfindung anti-A

	Erythrozyten		Retikulozyten	
100:0	100	0	99,8	0,2
98:2	97,8	2,2	96,9	3,1
95:5	94,3	5,7	95,5	4,5
90:10	88,7	11,3	89,8	10,2
50:50	46,5	53,5	49,5	50,5
10:90	9,4	90,6	10,3	89,7
5:95	4,9	95,1	6,1	93,9
2:98	2,1	97,9	2,6	97,4
0:100	0,1	99,9	0,8	99,2

Tab. 17: Wiederfindung anti-D

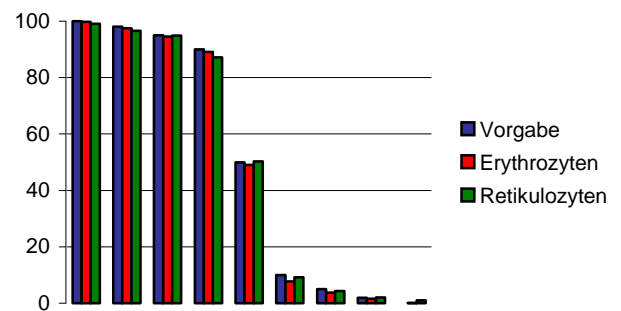


Abb. 20 : Wiederfindung anti-A

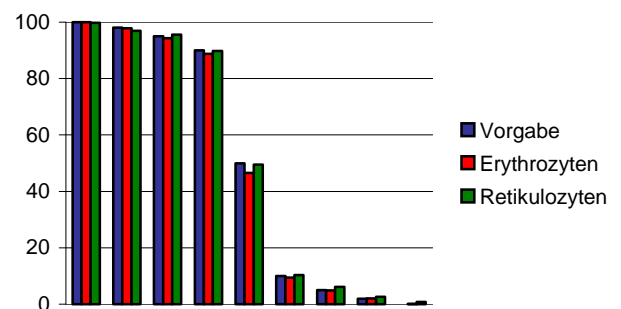


Abb. 21: Wiederfindung anti-D

Die oben dargestellten Tabellen zeigen die Genauigkeit der vorgestellten Methode zur Retikulozytenchimärismusbestimmung. Für jeden Antikörper wurde eine Wiederfindung durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Blutgruppe mit dem zu testenden Blutgruppenmerkmal mit einer Blutgruppe ohne dieses Merkmal in unterschiedlichem Verhältnis gemischt. Die gemessenen merkmalspositiven Erythrozyten und Retikulozyten wurden separat ausgewertet und als Prozentsatz an der Gesamtpopulation in die Tabellen eingetragen. Bei den Retikulozyten war die in den Ausgangsproben vorhandene unterschiedliche Anzahl zu berücksichtigen. So liessen sich bei dem Gemisch einer Blutgruppe mit dem Merkmal c und einer Blutgruppe ohne dieses Merkmal mit der beschriebenen Methode bei einem Mischungsverhältnis von 98:2 97,8% merkmalspositive Erythrozyten und 96,9% merkmalspositive Retikulozyten nachweisen. Bei einem Mischungsverhältnis von

95:5 fanden sich 93,3% bzw. 95,1%, bei 90:10 87,2% bzw. 90,0% der jeweiligen Zellpopulationen. Wurden die Blutgruppen zu gleichen Teilen vermischt wurden 45,6% der Erythrozyten und 49,4% der Retikulozyten als das Merkmal anti-c tragende Zellen erkannt. Bei einem Gemisch von 10:90 wurden 8,9% der Erythrozyten und 9,7% der Retikulozyten als merkmalspositiv gewertet, bei 5:95 waren es 4,3% bzw. 5,0% und bei 2:98 2,1% bzw. 2,8%. Die Interpretation der übrigen Tabellen verläuft entsprechend und zeigt bei allen Antikörpern eine hinreichend gute Wiederfindung der vorgelegten Blutgruppengemische. Retikulozytenpopulationen ab 5% aller Retikulozyten lassen sich mit ausreichender Genauigkeit nachweisen. Die Graphiken veranschaulichen die beschriebenen Daten.

#### 4.1.4 Präzision

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu zeigen, wurden für anti-D und anti-c jeweils 2 Vollblutproben verwendet, mit denen 6 Wiederfindungen an einem Tag bzw. je eine Wiederfindung an 6 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse sind nachfolgend für anti-D dargestellt:

##### Erythrozyten

Vorgabe	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
100	99,8	99,7	99,9	100	100	100
98	97,3	97,5	97,6	97,5	97,5	97,5
95	94,0	94,3	93,7	94,1	94,0	93,4
90	89,1	89,5	89,2	88,9	89,7	88,5
50	47,8	48,8	48,3	46,7	48,6	47,8
10	9,9	10,0	9,9	10,3	10,2	10,0
5	5,5	5,7	5,5	5,8	5,6	5,6
2	2,6	2,6	2,5	2,6	2,6	2,6
0	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4

Tab. 18: Präzision gezeigt durch 6 Wiederholung der Methode an einem Tag - Erythrozyten (anti-D)

## Erythrozyten

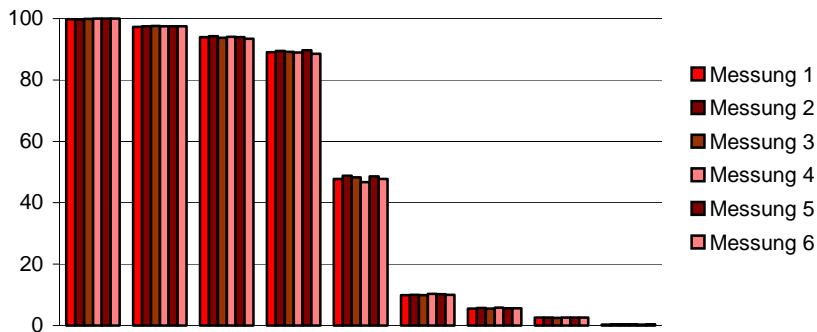


Abb. 22: Präzision gezeigt durch 6 Wiederholung der Methode an einem Tag - Erythrozyten (anti-D)

## Retikulozyten

Vorgabe	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
100	96,6	96,4	98,6	99,0	99,0	99,1
98	96,0	96,9	96,5	94,9	96,0	96,7
95	92,9	93,5	93,7	92,4	93,3	94,2
90	89,0	90,3	87,0	87,6	88,4	89,0
50	51,7	52,2	49,0	46,8	47,8	50,3
10	12,4	12,1	9,4	10,7	9,5	12,7
5	7,2	7,8	5,6	6,3	8,8	8,1
2	4,0	3,8	2,9	2,5	3,9	4,1
0	3,7	3,0	1,7	1,8	1,5	1,4

Tab. 19: Präzision gezeigt durch 6 Wiederholung der Methode an einem Tag - Retikulozyten (anti-D)

## Retikulozyten

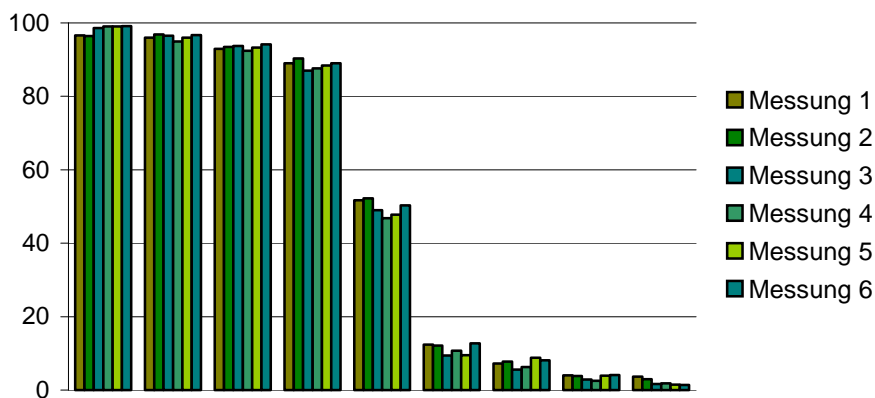


Abb. 23: Präzision gezeigt durch 6 Wiederholung der Methode an einem Tag - Retikulozyten (anti-D)

## Erythrozyten

Vorgabe	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
100	99,8	99,7	100	100	100	100
98	97,3	97,5	97,8	97,7	97,7	97,8
95	94,0	94,3	94,2	94,2	94,5	94,9
90	89,1	89,5	88,8	88,6	88,9	88,8
50	47,8	48,8	47,6	47,5	47,1	48,1
10	9,9	9,4	10,0	10,0	9,9	10,4
5	5,5	5,7	5,1	5,3	5,0	5,6
2	2,6	2,6	2,1	2,3	2,2	2,3
0	0,3	0,4	0,1	0,4	0,1	0,1

Tab. 20: Präzision gezeigt durch Wiederholung der Methode an 6 aufeinanderfolgenden Tagen  
- Erythrozyten (anti-D)

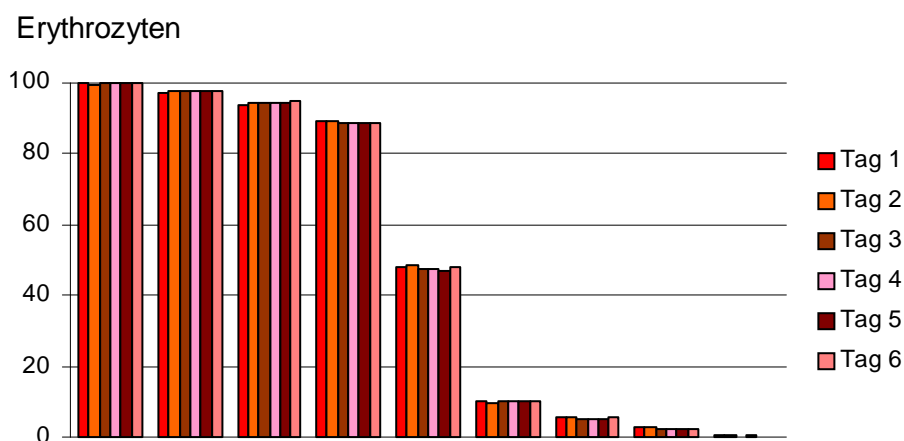


Abb. 24: Präzision gezeigt durch Wiederholung der Methode an 6 aufeinanderfolgenden Tagen  
- Erythrozyten (anti-D)

## Retikulozyten

Vorgabe	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
100	96,6	99,8	99,1	99,0	99,7	99,9
98	96,0	96,9	97,5	97,9	97,5	98,1
95	92,9	95,5	94,1	95,0	94,9	93,9
90	89,0	89,8	87,8	89,5	86,4	89,1
50	51,7	49,5	48,1	48,7	47,5	50,2
10	12,4	10,3	8,0	10,8	8,5	10,3
5	7,2	6,1	4,7	6,6	6,5	7,1
2	4,0	2,6	2,3	3,0	1,8	2,5
0	3,7	0,8	1,1	1,4	0,5	0,7

Tab. 21: Präzision gezeigt durch Wiederholung der Methode an 6 aufeinanderfolgenden Tagen  
- Retikulozyten (anti-D)

## Retikulozyten

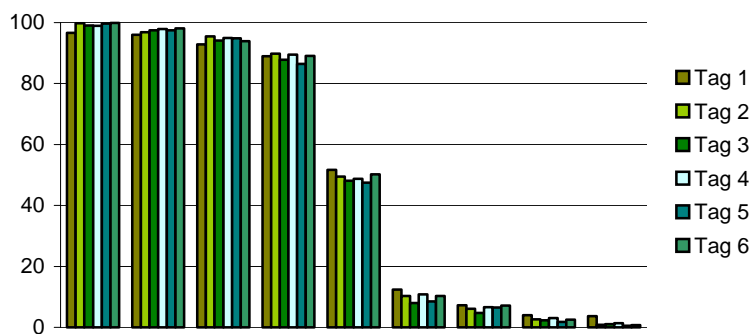


Abb. 25: Präzision gezeigt durch Wiederholung der Methode an 6 aufeinanderfolgenden Tagen - Retikulozyten (anti-D)

Nun wurden für die einzelnen Mischungsverhältnisse die Mittelwerte der 6 Wiederholungen der Methode an einem Tag, die Standardabweichung (SA) und der zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse dienenden Variationskoeffizient (VC) getrennt nach Erythrozyten und Retikulozyten berechnet. Die Versuchsreihen demonstrieren, dass die Messgenauigkeit bis zu einem Mischverhältnis einschließlich 10:98 - also 10% Anteil der nachzuweisenden Zellen - sehr gut und bis zu einem Mischverhältnis von 2:98 mit zufriedenstellender Präzision gegeben ist.

	Erythrozyten			Retikulozyten		
	Mittelwert	SA	VC	Mittelwert	SA	VC
100 :0	99,9	0,11	0,11	98,3	1,16	1,18
98 : 2	97,5	0,10	0,10	95,7	0,53	0,56
95 : 5	93,9	0,28	0,29	92,6	0,55	0,59
90 :10	89,1	0,38	0,43	87,3	0,81	0,93
50 :50	48,0	0,68	1,43	46,6	0,71	1,52
10 :90	10,0	0,16	1,61	9,9	0,85	8,58
5 : 95	5,6	0,11	1,92	6,5	0,95	14,6
2 : 98	2,6	0,04	1,47	3,1	0,42	13,6
0 :100	0,4	0,03	9,12	1,9	0,68	35,6

Tab. 22: Präzision gezeigt durch 6 Wiederholung der Methode an einem Tag

Die Werte der Wiederholung der Methode an 6 aufeinanderfolgenden Tagen wurden analog berechnet.

	Erythrozyten			Retikulozyten		
	Mittelwert	SA	VC	Mittelwert	SA	VC
100 :0	100,0	0,03	0,03	99,2	0,57	0,58
98 : 2	97,7	0,11	0,12	96,6	0,64	0,67
95 : 5	94,3	0,29	0,31	93,0	0,88	0,95
90 :10	88,8	0,16	0,18	85,8	1,09	1,27
50 :50	47,5	0,54	1,14	42,9	2,09	4,86
10 :90	10,0	0,29	2,94	7,9	0,99	12,6
5 : 95	5,2	0,29	5,45	5,1	0,76	14,9
2 : 98	2,2	0,17	7,65	2,1	0,51	24,5
0 :100	0,2	0,14	79,6	0,9	0,51	56,5

Tab. 23: Präzision gezeigt durch Wiederholung der Methode an 6 aufeinanderfolgenden Tagen

Die Ergebnisse der Präzisionsuntersuchung für anti-c sind vergleichbar; daher wird auf eine detaillierte Darstellung verzichtet.

## 4.2 Klinische Anwendung

### 4.2.1 Chimärismusstatus der Erythrozyten und Retikulozyten im untersuchten Patientenkollektiv

Im untersuchten Patientenkollektiv wurde zum Zeitpunkt des Takes der Chimärismusstatus nach der unter 3.2 beschriebenen Methode bestimmt.

In der nachfolgenden Tabelle sind neben dem Zeitpunkt der Bestimmung, Empfänger- und Spenderblutgruppe sowie die Blutgruppe transfundierter Zellen beschrieben. In Spalte 7 und 8 ist die Bestimmung des Chimärismus bei Erythrozyten und Retikulozyten dargestellt. AK steht hierbei für den verwendeten Antikörper anti-A, anti-c, anti-C oder anti-D.

Patient	Tage nach Transplantation	Retikulozyten (%)	Empfängerblutgruppe	Spenderblutgruppe	BG transfundierter Zellen	Erythrozyten- BG nach Transplantation			Retikulozyten-BG nach Transplantation			Retikulozyten-chimärismus
						AK	positiv (%)	negativ (%)	AK	positiv (%)	negativ (%)	
1 (E.S.)	34	27	A CcD.ee 1	B CcD.ee	0 CcD.ee	A	>99	<0,1	A	100	0	AR
2 (M.D.)	57	12	0 CcD.Ee	0 ccddee	0 ccddee	D	15	85	D	0	100	CC
3 (E.W.)	64	31	A CCD.ee 1	A CcD.ee 1	A CcD.ee	c	90	10	c	100	0	CC
4 (R.G.)	26	26	A ccddee 1	0 ccd.EE	0 ccd.EE/ ccddee	D	67	33	D	100	0	CC
5 (A.M.)	79	17	0 ccddee	A ccddee	0 ccddee	A	94	6	A	100	0	CC
6 (J.S.)	70	54	A ccddee	0 CCD.ee	0 CCD.ee	D	>99	<0,1	D	100	0	CC
7 (G.J.)	56	34	0 ccD.ee	0 ccddee	0 ccddee	D	14	86	D	0	100	CC
8 (O.K.)	24	92	A B CcD.ee 1	A CCD.ee 1	A/0 CCD.ee	c	36	64	c	0	100	CC
9 (F.S.)	30	17	B CcD.Ee	A CcD.Ee 1	0 CcD.Ee	A	2	98	A	84	16	MC
10 (A.L.)	35	16	0 CcD.ee	A ccddee 1	0 ccddee	D	44	56	D	0	100	CC
11 (T.S.)	37	19	B ccddee	A ccddee	0 ccddee	A	74	26	A	100	0	CC

Tab. 24: Chimärismusstatus im Patientenkollektiv

In 9 von 11 Fällen konnte ein kompletter Chimärismus (CC) der Retikulozyten gezeigt werden. In einem Fall bestand ein gemischter Chimärismus (MC) (Patient 9). In einem anderen Fall fand sich kein Chimärismus sondern nur Empfängererythropoese (AR=autologus recovery)

#### 4.2.2 Darstellung einzelner Patienten

Um die unter 4.2.1 dargestellten Daten zu verdeutlichen, werden nachfolgend Graphiken gezeigt, die von Patient 8 - exemplarisch für alle kompletten Chimärismen - und Patient 9 - gemischter Chimärismus - stammen.

Wie bereits unter 3.4.2 beschrieben liegen im unteren linken Quadranten merkmalsnegative Erythrozyten, im oberen linken für den jeweiligen Antikörper positive Erythrozyten, oben rechts die merkmalspositiven Retikulozyten und unten rechts die merkmalsnegativen Retikulozyten.

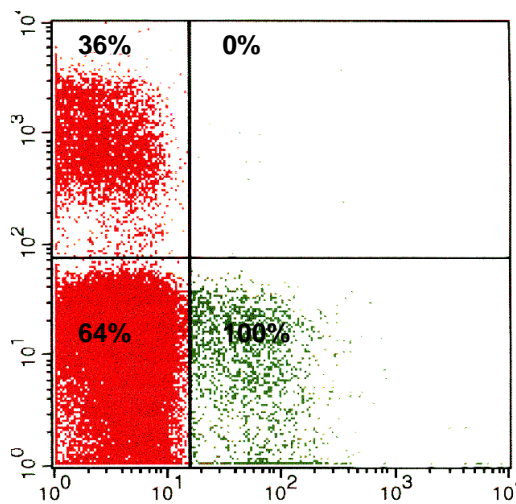


Abb. 26: kompletter Chimärismus (Pat. 8)-  
untersuchtes Merkmal: Anti-c

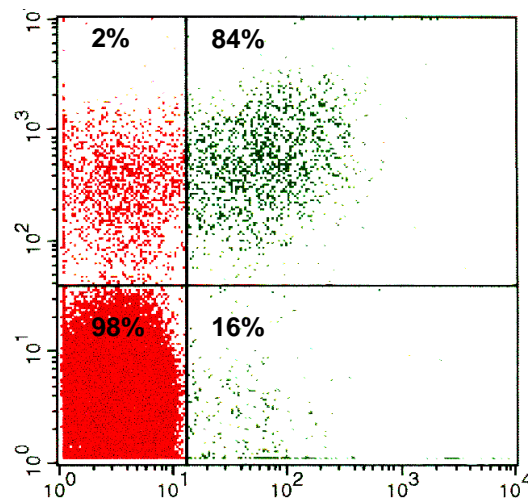


Abb. 27: gemischter Chimärismus (Pat.9)-  
untersuchtes Merkmal: Anti-A



### 4.2.3 Vergleich der Ergebnisse mit etablierten Nachweismethoden

Im Rahmen der Stammzelltransplantation wurde bei allen Patienten der Chimärismusstatus mittels STR bestimmt. Dies geschah an Zellen der Leukopoese, die mittels Knochenmarkspunktion oder durch Anreicherung peripherer T-Zellen gewonnen wurden. Diese Untersuchung ergab für die Patienten 1-8 sowie 10 und 11 einen kompletten Chimärismus. Bei Patient 9 wurde mittels dieser molekularbiologischen Methode, die wie die Bestimmung des Retikulozytenchimärismus am 30. posttransplantaren Tag erfolgte, ein gemischter Chimärismus festgestellt (4% anti-A positiv, 96% anti-A negativ). Eine erneute mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung durchgeführte Chimärismusanalyse am 98. posttransplantaren Tag zeigte einen kompletten Chimärismus.

### 4.2.4 Chimärismusstatus im Vergleich zum klinischen Resultat

Im Folgenden ist der klinische Zustand der einzelnen Patienten 6 Monate nach der Stammzelltransplantation tabellarisch dargestellt.

Patient	Chimärismusstatus mittels Retikulozyten- analyse	Chimärismusstatus mittels STR	Klinischer Status
1 (E.S.)	AR	AR	Rezidiv
2 (M.D.)	CC	CC	Remission
3 (E.W.)	CC	CC	Remission
4 (R.G.)	CC	CC	Remission
5 (A.M.)	CC	CC	Remission
6 (J.S.)	CC	CC	verstorben; V.a.GvHD
7 (G.J.)	CC	CC	Remission
8 (O.K.)	CC	CC	Remission
9 (F.S.)	MC	MC	Remission
10 (A.L.)	CC	CC	GvHD
11(T.S.)	CC	CC	Remission

Tab. 25: Klinischer Zustand nach Stammzelltransplantation

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung einer auf Durchflußzytometrie basierenden Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des Retikulozytenchimärismus nach KMT oder PBPCT untersucht. Chimärismusanalysen nach HST können in verschiedenen Situationen von entscheidender Bedeutung sein. So ist die Bestimmung einer verbleibenden Blutbildung von Empfängerstammzellen nach KMT von besonderem Interesse bei hämatologischen Erkrankungen, bei denen kein spezifischer Tumormarker vorhanden ist. Außerdem zeigten Formankova et al. bei 10 CML Patienten nach KMT eine Korrelation zwischen ansteigendem gemischtem Chimärismus und dem Auftreten von *minimal residual disease* (MRD) [92]. Auch weitere Studien zeigen, dass der Chimärismusstatus eng mit dem Krankheitsverlauf einhergeht und prognostische Bedeutung hat [93,94]. Weiterhin ist die Chimärismusbestimmung für neuere Therapieverfahren, wie der nichtmyeloablative Stammzelltransplantation [95], eine wesentliche Untersuchung, um die Beeinflussung des Anwachsens durch Veränderung der Immunsuppression und DLI zu monitoren. Die Bestimmung eines kompletten T-Zell-Chimärismus wird zudem als prognostischer Faktor für die Entstehung von GvHD und GvL herangezogen [96]. All diese klinischen Einsatzmöglichkeiten verlangen nach einer aussagefähigen, sensitiven und quantitativ akkuraten Methode zur Bestimmung des Chimärismus, die möglichst rasch ein Resultat liefert und im besten Fall noch kostengünstig ist.

### 5.1 Methode

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Durchflußzytometrie in Verbindung mit der Verwendung humaner monoklonaler IgG-Antikörper und standardisierter, kommerziell erhältlicher R-PE markierter Goat Anti-Human IgG-Antikörper sowie Thiazolorange eine geeignete Methode zur Bestimmung und Quantifizierung des Retikulozytenchimärismus bei Patienten nach Transplantation hämatologischer Stammzellen ist. Entscheidend bei der durchflußzytometrischen Messung ist das Vorhandensein einer Einzelzellsuspension, da ansonsten

agglutinierte Zellen als ein einziges Ereignis oder - falls sie aufgrund ihrer Größe aus dem Aquisitionsbereich herausfallen - gar nicht erfasst werden. So konnte man bei der Verwendung kommerziell erhältlicher AK Agglutinationen beobachten, die sich durchflußzytometrisch bei der Erfassung der Erythrozyten und Retikulozyten im Vorwärts-Seitwärtsdiagramm regelmäßig neben der normalen Population als eine weitere Population mit höherer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung zeigten. Diese Population machte zwischen 8 und 10% der Gesamtheit roter Blutkörperchen aus. Diese Problematik ist aus der Literatur bekannt und wurde bereits unter anderem von Berneman et al. [97], Wagner et al. [88] und Garratty et al. beschrieben. Letztgenannte Autorengruppe empfiehlt, die Probe vor der Messung durch eine 25-gauge Nadel zu ziehen, um die während der Antikörperinkubation gebildete Agglutinationen wieder zu lösen [88,98]. Jedoch führt die mechanische Trennung zur Beschädigung etwa 2% der Zellen, die dann für die Messung verloren gehen. In der Absicht Retikulozytenpopulationen von wenigen Prozent nachzuweisen, ist ein methodischer Fehler dieser Größe nicht tolerabel.

Für diese Methode wären also nicht agglutinierende Primärantikörper erforderlich, die gegen häufig unterschiedliche Blutgruppenmerkmale des Rhesus- oder AB0-Systems gerichtet sein sollten, da die Messung auf bekannten Blutgruppenunterschieden zwischen Spender und Empfänger basiert. Die Beschaffung solcher AK erwies sich als kompliziert, da die kommerziell erhältlichen monoklonalen oder polyklonalen Blutgruppenantikörper meist für Agglutinationstest produziert werden und in unterschiedlichem Masse IgM-Antikörper enthalten, die aufgrund ihrer Pentamerstruktur Bindungsbrücken zwischen Erythrozyten bilden können. Auch der Versuch der IgG-Anreicherung aus solchen zur Agglutination führenden Blutgruppenantikörpergemischen mittels Affinitätschromatographiesäulen führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Auf der Suche nach reinen monoklonalen IgG-Antikörpern mit niedriger Agglutinationspotenz waren jedoch lediglich anti-C- und anti-D-Antikörper kommerziell erhältlich und einsatzfähig. Anti-A- und anti-c-Antikörper konnte aus Nabelschnurblut gewonnen werden. Hierbei wurde die Blutgruppeninkompatibilität zwischen Müttern und Neugeborenen genutzt. Finden sich im Serum der Mutter Antikörper gegen Blutgruppenantigene des Neugeborenen, können die Antikörper der IgG-Klasse über die Plazenta in den kindlichen Kreislauf übergehen und sich dort an antigentragende Zellen anheften. Postpartal können diese aus dem Nabelschnurblut eluiert werden.

Zum Aufbau der Methode des Retikulozytenchimärismus wurden zunächst in Versuchsreihen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen und die geeignete Zellpräparation ausgetestet und optimiert.

Die Genauigkeit der Methode wurde anhand artifizieller Blutgemische bekannter Blutgruppen gezeigt. Retikulozytenpopulationen ab 2% aller Retikulozyten ließen sich mit ausreichender Genauigkeit nachweisen. Berücksichtigt man den Anteil der Retikulozyten von normaler Weise 1-3% an der Gesamtzahl roter Blutkörperchen, zeigten die Blutgemische einschließlich der Erythrozyten und Retikulozyten einen linearen Zusammenhang zwischen erwartetem und gemessenem Wert bis zu einer Schwelle von 0,1%. Während Blanchard et al. beim durchflußzytometrischen Nachweis roter Zellpopulationen nach KMT mittels monoklonaler Anti-A1, Anti-A, Anti-B und Anti-H-Antikörper eine Sensitivitätsgrenze von 1% beschrieben [99], konnten David et al. mit einer ähnlichen Methode mittels monoklonaler und polyklonaler Antikörper auf ABO-, Rhesus-, Kell-, Duffy- oder MNS-Blutgruppenantigene eine vergleichbare Population von 0,1% nachweisen [100].

Trotz der Möglichkeit durchflußzytometrisch noch kleinere Populationen zu messen, können Zelltrümmer das Ergebnis verfälschen. Während der aus Debris-Populationen entstehende Fehler in großen Populationen nur einen unwesentlichen Prozentsatz ausmacht, steigt er doch bei kleinen Populationen überproportional an. Es wurde deshalb auf die Identifikation von weniger als 5% aller Retikulozyten verzichtet. Durch das Verhältnis Retikulozyten / Debris wird somit die Sensitivität dieser Methode begrenzt. Doch konnten u.a. Bar et al. zeigen, dass ein gemischter Chimärismus dieser Größenordnung wahrscheinlich keinen Einfluss auf das klinische Outcome hat [66].

Um präparations- und geräteabhängige Variationen für die durchflußzytometrische Methode zu ermitteln, wurden aus zwei Vollblutproben sechsfach an einem Tag und an sechs aufeinanderfolgenden Tagen ein artifizielles Blutgemisch hergestellt und mit dem Durchflußzytometer gemessen. Mit diesen Versuchsreihen wurde demonstriert, dass bis zu einer Konzentration von 2% Messungen von zufriedenstellender Präzision durchführbar sind.

Die hier beschriebene Methode zur Bestimmung des Retikulozytenchimärismus bei Patienten nach Transplantation hämatologischer Stammzellen zeigte sich somit als genau, sensitiv und reproduzierbar. Im Gegensatz zu Methoden, die auf der alleinigen Messung von Erythrozyten beruhen, kommt es durch die separate

Antigenbestimmung auf Retikulozyten nicht zu Verfälschung durch die bis zu 120 Tage nach Transplantation vorhandenen eigenen Erythrozyten des Empfängers oder durch transfundierte Erythrozytenkonzentrate.

Allerdings ist die eingeschränkte kommerzielle Verfügbarkeit nicht zur Agglutination führender Antikörper mit der daraus resultierenden Notwendigkeit eventuell geeignete Antikörper aus dem Nabelschnurblut zu eluieren und der jeweiligen erneuten Konzentrationsbestimmung und Validierung der Antikörper nicht praktikabel für den klinischen Alltag. Um diese Methode in der Routinediagnostik anzuwenden bedarf es der industriellen Herstellung entsprechender Antikörper. Um eine breite Anwendbarkeit zu ermöglichen, wäre zudem die Ausweitung auf andere Blutgruppenmerkmale (Kell, Duffy, usw.) wünschenswert.

## **5.2 Klinische Anwendung**

Die klinische Evaluation erlaubte eine akurate quantitative Bestimmung des Chimärismus roter Blutkörperchen bei 11 Patienten nach KMT bzw. PBPCT mittels oben beschriebener Methode. Bei 9 der 11 Patienten ließen sich im peripheren Blut Erythrozyten sowohl der Empfänger - als auch der Spenderblutgruppe nachweisen. Wie in der Einleitung unter Absatz 1.2.2 bereits angesprochen lässt sich bei isolierter Betrachtung der Erythrozyten jedoch nicht auf die aktuelle Hämatopoese schliessen. Erythrozyten haben eine Lebenszeit von bis zu 120 Tagen [66], so dass hierbei noch vorhandene Empfängererythrozyten oder transfundierte Erythrozyten mitgemessen werden.

Die Blutanalyse eines Patienten (Nr. 1) ergab lediglich Erythrozyten mit seinen eigenen Blutgruppenmerkmalen. In seltenen Fällen kann es sich bei einem solchen Ergebnis um ein verzögertes Anwachsen der Spenderstammzellen handeln. Dies wird insbesondere bei - wie auch in diesem Fall durchgeführt - AB0-Blutgruppen inkompatibler HST beschrieben [65]. Dieser Zustand ließe sich von einem Transplantatversagen durch eine Wiederholung der bei diesem Patienten bereits am 34. Tag nach PBPCT durchgeführten Bestimmung unterscheiden, indem man entweder die Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt oder wie weiter unten ausgeführt zusätzlich die Retikulozyten betrachtet.

Ein weiterer Patient (Nr. 6) zeigte am 70. Tag nach PBPCT im Blut lediglich Erythrozyten mit Ausprägung des untersuchten Merkmals Anti-D. Da sowohl Spenderstammzellen als auch die gegebene Bluttransfusionen dieses Blutgruppenmerkmal trugen, lässt sich die Herkunft der Erythrozyten erst durch die im nächsten Absatz beschriebene Retikulozytenbestimmung eindeutig klären.

Die Gabe von Erythrozytenkonzentraten ist jedoch nicht nur bei der Auswertung des des Erythrozytenchimärismus zu beachten. In der Literatur ist auch eine transiente Erhöhung der Retikulozytenzahl nach Transfusion von frischen Erythrozytenkonzentraten beschrieben [101]. Die Bestimmung des Retikulozytenchimärismus erfolgte deshalb erst 48h nach Transfusion. Dann ist von einer kompletten Ausreifung der transfundierten Retikulozyten in Erythrozyten auszugehen [91]. Unter dieser Einschränkung lässt sich das Anwachsen der Spenderstammzellen frühzeitig anhand des Retikulozytenchimärismus zeigen.

9 der 11 untersuchten Patienten zeigten einen CC der Retikulozyten. Bei 9 dieser Patienten waren im peripheren Blut nur noch von Spenderstammzellen abstammende Retikulozyten nachweisbar. In diesen Fällen ist von einem erfolgreichen Anwachsen der Stammzellen auszugehen. Der bereits oben diskutierte Patient Nr. 1 zeigte wie auf den Erythrozyten auch auf den Retikulozyten lediglich Blutgruppenmerkmale der Empfängerstammzellen. Da ein Anstieg der Retikulozyten auf 27% zu verzeichnen war und der Retikulozytenchimärismus die aktuelle Hämatopoese widerspiegelt, ist von einem Transplantatversagen auszugehen. Der Patient ist nur wenige Monate nach Transplantation verstorben. Bei einem Patienten (Nr. 9) wurde am 30. Tag nach KMT ein gemischter Chimärismus der Retikulozyten beobachtet. Der klinische Zustand des Patienten war über den gesamten in unserer Untersuchung vorgesehenen Nachbeobachtungszeitraum von 6 Monaten stabil. Dieser Fall stützt Untersuchungen von Bar et al. und Petz et al., die in ihren Studienkollektiven ein teilweise langes rezidivfreies Überleben trotz fortbestehendem gemischtem Chimärismus zeigten [60]. Demnach bedeuten auch hohe Anteile (>10%) vom Empfänger stammender roter Blutzellen nicht zwingend ein Rezidiv [66]. In der Literatur finden sich Hinweise, dass das Fortbestehen von Empfängerzellen auch abhängig vom Alter der Patienten und dem Konditionierungsregime [57,77] ist. Hinweis auf die Abhängigkeit vom Konditionierungsregime geben insbesondere Beobachtungen an Patienten mit *schwerer kombinierter Immundefizienz* (SCID), die nach allogener KMT häufig keine roten oder weißen Blutzellen des Spenders zeigen.

Brady et al. postulieren als mögliche Ursache das mildere Konditionierungsschema, das dieses Patienten üblicherweise erhalten [102]. Aufgrund des kleinen Kollektivs lässt sich in dieser Untersuchung keine Aussage zur Abhängigkeit des gemischten Chimärismus vom Alter des Patienten oder dem Konditionierungsregime ableiten.

Diese Untersuchungsergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung mit der heute für diese Fragestellung am häufigsten eingesetzten STR-Methode [103], für die je nach Autor eine ähnliche Sensitivitätsgrenze zwischen 1 und 5% angegeben wird [104,105,106]. Als sensitivste Möglichkeit der Quantifizierung von Blutgruppenpopulationen nach HST werden PCR-basierte Methoden beschrieben. Die Sensitivität hier wird mit  $<0,1\%$  angegeben [105,107,108,109,110]. Der Vorteil der Durchflußzytometrie gegenüber diesen Methoden ist die schnelle Durchführbarkeit. Ein Analyseergebnis ist innerhalb weniger Stunden verfügbar. Die finanziellen Einsparungen durch durchflußzytometrische Messungen sind besonders bei wiederholten Langzeitbeobachtungen von Interesse.

Die Analyse mittels der oben beschriebenen Methode liefert schnelle Ergebnisse, jedoch sind die Aussagen auf eine Zelllinie beschränkt. Wie Schouten et al. und andere Autoren zeigten, kann ein gemischter Chimärismus in mehreren Zelllinien gleichzeitig auftreten [111]. Doch bisher bleibt in der Literatur umstritten, welche Zelllinie den frühesten und sensitivsten Indikator für ein Rezidiv darstellt. Möglicherweise ist dies abhängig von der Grundkrankheit [112]. So berichtete beispielsweise Roux et al. [113] von Rezidiven transplantierte CML-Patienten in myeloiden und erythrozytären Zelllinien. Andere Zellen, wie NK- oder B-Zellen wurden weiterhin von Spenderzellen gebildet. Auch andere Autoren nennen gute Korrelationen zwischen myeloiden und erythrozytären Zelllinien in der Vorhersage eines Rezidivs einer CML nach KMT. Ein Monitoring von Patienten mit CML nach T-cell-depleted BMT zeigte eine gute Korrelation zwischen dem Anteil autologer roter Blutkörperchen und der Häufigkeit Philadelphiachromosom-positiver Metaphasen während eines Rezidivs und nach DLI [114]. Ob die Phenotypisierung roter Blutzellen ähnlich der DNA-basierten Stammzellanalysen ein Anwachsen der Spenderstammzellen oder Rezidiv beweisen, bleibt weiter an einem weit größeren Patientenkollektiv abzuklären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beschriebene Methode zur durchflußzytometrischen Retikulozytenmessung nennenswerte Hilfe bei der

Beobachtung des Anwachsens der Spenderstammzellen und der Diagnose eines gemischten Retikulozytenchimärismus als möglichen Hinweis auf ein Rezidiv sowie ein Transplantatversagen nach KMT oder PBPC bietet, indem die Herkunft roter Blutzellen frühzeitig und schnell durch Messung aus dem peripheren Blut bestimmt werden kann. Die dargestellte Methode ermöglicht eine akurate und verlässliche Diagnose, die von Erythrozytentransfusionen sowie lang überlebenden Empfängerzellen weitestgehend unabhängig gestellt werden kann. Die Sensitivitätsgrenze der Methode ist vergleichbar mit STR-basierten Methoden. STR-Analysen werden von Thiede et al. basierend auf Literaturdaten und eigener Erfahrung in einer Übersichtsarbeit zur Chimärismusanalyse während des Anwachsens der Spenderstammzellen und der gesamten Periode eines Makrochimärismus (z.B. zwischen 3 und 97%) empfohlen. Erst wenn ein Chimärismuslevel im peripheren Blut von mehr als 97% Spenderzellen erreicht ist, sollten real-time PCR-Methoden zum weiteren Monitoring benutzt werden [103]. Die von uns untersuchte Methode erscheint in der Routinediagnostik der Retikulozyten der STR-Analyse vergleichbar einsetzbar. Ob die Untersuchung der roten Zelllinie alleine eine Aussage über ein leukämisches Rezidiv oder das Transplantatversagen liefern kann, ist noch immer Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion.



## 6. Zusammenfassung

Nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation oder einer peripheren Stammzelltransplantation sind Antigene roter Blutzellen hilfreiche Marker in der Verlaufskontrolle. Anders als Untersuchungen, die Knochenmarkspunktionen erfordern, kann eine Untersuchung roter Blutzellen durch periphere Blutentnahme sehr einfach wiederholt durchgeführt werden. Transfusionen von Erythrozyten, die häufig nach HST nötig werden, und deren lange Persistenz im Blut machen die Chimärismusanalyse durch Erythrozyten schwierig. Wir untersuchten daher Retikulozyten, die die aktuelle Hämatopoese repräsentieren. Die Untersuchung mittels Durchflußzytometrie lieferte uns quantitative Werte.

Die Methode beruht auf dem Unterschied mindestens eines Blutgruppenmerkmals zwischen Spender und Empfänger. Zu peripher entnommenem EDTA-antikoagulierten Blut wurden entsprechende monoklonalen IgG- Antikörper gegen Antigene der Rhesus- bzw. AB0- Blutgruppe hinzugegeben (anti-A, anti-D, anti-C, anti-c). Diese waren zum Teil kommerziell erhältlich oder wurden aus Plazentablut eluiert. Die Gegenfärbung erfolgte mittels PE markiertem sekundären Antikörper. Retikulozyten unterschieden wir von Erythrozyten durch Zugabe von spezifisch an DNA und RNA bindendes Thiazolorange. Aus jeder Probe wurden 100.000 Zellen mit dem Durchflußzytometer gemessen.

Um die Methode evaluieren zu können, wurden artifizielle Gemische verschiedener Blutgruppen gemäß folgendem Schema hergestellt: 100:0, 98:2, 95:5, 90:10, 50:50, 10:90, 5:95, 2:98, 0:100. Die tatsächlich gemessenen Werte korrelierten bis zu einer Konzentration von 2% gut mit den theoretisch erwarteten. Die wiederholte Messung (n=6) einer Probe zeigte die hohe Präzision in einer Serie und an aufeinander folgenden Tagen.

Elf Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen wurden zum Zeitpunkt des Takes untersucht. Die Ergebnisse stimmten mit denen parallel durchgeführter etablierter Methoden - z.B. short tandem repeats - überein. Neun der 11 Patienten zeigten einen kompletten Chimärismus der Retikulozyten. Nur ein Patient hatte einen gemischten Chimärismus der Retikulozyten und ein Patient zeigte ein Transplantatversagen.

Die Methode ermöglicht eine sinnvolle Verlaufskontrolle nach KMT oder PBPCT. Die Methode ist frühzeitig nach der Transplantation anwendbar und durch die Messung von Retikulozyten werden die Ergebnisse nicht signifikant durch Bluttransfusionen oder alte Empfängererythrozyten beeinflusst. Das Untersuchungsmaterial wird durch einfache periphere Blutentnahme gewonnen, bereits nach 3 Stunden liegt ein Ergebnis über die Art des Chimärismus vor. Durch Einsatz der Durchflußzytometrie sind nicht nur qualitative sondern auch sehr präzise quantitative Aussagen möglich. Eine Ausweitung auf weitere Blutgruppensysteme würde eine breite Anwendbarkeit ermöglichen.

## 7. Anhang

Ethikkommission der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität  
Vorsitzender: Prof. Dr. Gustav Paumgartner

Ludwig  
Maximilians  
Universität  
München

Marchioninstr. 15  
81377 München  
Tel: (089) 7095 4609  
Fax: (089) 7095 7609  
e-mail: Ethikkommission@  
med2.med.uni-muenchen.de  
16.02.2001

Klinikum der Universität München – Großhadern  
Marchioninstr. 15 81377 München

Frau  
Dr. S. Pohley  
Transfusionsmedizin. Abtl.  
Klinikum Großhadern

- im Hause -

### Projekt Nr. 023/01

#### Evaluierung des Retikulozytenchimärismus nach allogener Knochenmark- und peripherer Blutzstammzelltransplantation

Sehr geehrte Frau Kollegin Pohley,

die o.g. Studie hat den Mitgliedern der Ethikkommission (EK) der Medizinischen Fakultät unserer Universität zur Prüfung vorgelegen. Es wurden keine ethisch-rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie erhoben.

Die EK kann der o.g. Studie die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen. Sie weist jedoch darauf hin, dass in der Patientenaufklärungs- und Einverständniserklärung die Hinweise zum Datenschutz optisch hervorzuheben sind (z. B. durch Fettdruck).

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Sie werden gebeten, die EK über alle schwerwiegenden oder unerwartenden Ereignisse im Rahmen der Studie zu unterrichten.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. G. Paumgartner  
Vorsitzender der Ethikkommission

**Klinikum der Universität München**  
 Medizinische Klinik und Poliklinik III – Großhadern  
 Abteilung für Transfusionsmedizin  
 Leiter: Prof. Dr. med. Wolfgang Mempel

\_\_\_\_\_ **LMU**  
 Ludwig \_\_\_\_\_  
 Maximilians \_\_\_\_\_  
 Universität \_\_\_\_\_  
 München \_\_\_\_\_

Klinikum der Universität München • Abteilung für Transfusionsmedizin – Großhadern  
 Marchioninstraße 15 • D-81377 München

Rückfragen unter Tel.: 089-7095-3710

Etikett

### Einverständnis und Aufklärung zur Entnahme von EDTA-Blut zur Bestimmung des Retikulozytenchimärismus

**Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,**

um nach einer allogenen Knochenmark- oder peripherer Blutstammzelltransplantation den Erfolg zu kontrollieren, ist es notwendig die Herkunft der verschiedenen Zellen des Knochenmarks und Immunsystems zu bestimmen. Nach einer erfolgreichen Transplantation stammen alle Blutzellen vom Spender.

Ein informativer und schneller Marker ist eine unterschiedliche Blutgruppe zwischen Spender und Empfänger. Der Erfolg der Transplantation kann durch den Nachweis der Blutgruppe des Spenders auf den jungen roten Blutkörperchen, auch genannt Retikulozyten, bestimmt werden, wenn diese nach Transplantation wieder ansteigen.

Für die Austestung dieser neuen schnellen durchflußzytometrischen Methode benötigen wir 2 ml EDTA-Blut. Die Auswertung Ihrer Daten erfolgt in einer anonymisierten Form. Es werden keine persönlichen Daten weitergegeben.

Im **Aufklärungsgespräch** mit Frau/Herrn Dr. \_\_\_\_\_  
 wurde die zusätzliche Blutentnahme von 2 ml EDTA-Blut erörtert.

Ich, \_\_\_\_\_, geb. am \_\_\_\_\_

habe den obenstehenden Text verstanden und hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit beim Aufklärungsgespräch Fragen zu stellen. Meine Fragen wurden vollständig und für mich verständlich beantwortet

**Nach gründlicher Überlegung**

- willige ich in die zusätzliche Blutentnahme ein.  
**oder**  
 Ich lehne eine zusätzliche Blutentnahme ab.

München, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Patient/in (Unterschrift)

\_\_\_\_\_  
 Arzt/Ärztin (Name/Unterschrift)



Klinikum der Universität München  
 Medizinische Klinik und Poliklinik III – Großhadern  
 Abteilung für Transfusionsmedizin  
 Leiter: Prof. Dr. med. Wolfgang Mempel  
 Marchioninistraße 15  
 81377 München

Tel: 089-7095-3710  
 Fax: 089-7095-3707

\_\_\_\_\_ **LMU**  
 Ludwig \_\_\_\_\_  
 Maximilians \_\_\_\_\_  
 Universität \_\_\_\_\_  
 München \_\_\_\_\_

**Antrag auf Durchführung einer  
 Retikulozytenchimärismusbestimmung**

**Patientendaten:**

	Name Vorname Geb.Dat
	Etikett

**Diagnosen:**

.....  
 .....

- KMT       PBST

**Grund der  
 Chimärismusbestimmung:**

- Standardbestimmung am 30.Tag  
 V.a. Rezidiv  
 anderer: \_\_\_\_\_

**jetzige Klinik:**

Entzündung/Infektion: .....  
 .....  
 Rezidiv: .....  
 .....  
 GvH: .....  
 .....

- Der Aufklärungsbogen wurde ausgefüllt und liegt bei.

**Datum / Unterschrift:** .....

**Untersuchungsmaterial: 2ml EDTA-Blut**

Ansprechpartner Dr.Ochmann	Telefon 089-7095-6713	Telefax 089-7095-3707	E-Mail Oswin.Ochmann@tm.med.uni-muenchen.de
-------------------------------	--------------------------	--------------------------	--



**Klinikum Großhadern**

Abteilung für Transfusionsmedizin  
in der Medizinischen Klinik III  
Leiter: Prof. Dr. W. Mempel

*Klinikum Großhadern - Abt. f. Transfusionsmedizin - 81366 München*

**LMU**

**Ludwig** \_\_\_\_\_  
**Maximilians**  
**Universität** \_  
**München** \_

81377 München  
Marchioninistraße 15  
Durchwahl: (089) 7095 - 3710  
Fax: (089) 7095 - 3707  
Funk: 124 / 883

Station L21

12. März 2001

Name:	G.
Vorname:	R.
Geb.-Dat.:	12.08.73
Abn.-Dat.:	12.03.01
Analyse-Dat.:	12.03.01
Diagnose:	Z.n. KMT bei AML

**Chimärismus-Analyse von Erythrozyten und Retikulozyten**

<b>KM-Empfänger:</b>	A rh (negativ)
	ccddee
	Kell neg.

<b>KM-Spender:</b>	0 Rh (positiv)
	ccDEE
	Kell neg.

	Antigen-D pos.	Antigen-D neg.
<b>Erythrozyten:</b>	67,0%	33,0%
<b>Retikulozyten (26‰):</b>	98,5%	1,5%

**Beurteilung:**

Die durchflußzytometrische Chimärismus-Analyse des Rhesusantigen D zeigt, daß 67% der Erythrozyten und nahezu alle Retikulozyten dieses Antigen des Spendermarks exprimieren. Die 33% der Erythrozyten, die das Antigen D nicht exprimieren sind wahrscheinlich Reste bis zum 13.2. gegebener Erythrozytenkonzentrate.

Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einem kompletten Chimärismus.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. W. Mempel  
Leiter der Abteilung

Oliver Rautenberg  
Doktorand der Abteilung

## 8. Literaturverzeichnis

### 8.1 Alphabetisches Autorenverzeichnis

**Alizadeh, A.A. et al.:** Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 (2000)

**Anslinger, K. et al.:** Evaluation and application of the AmpF/STR profiler plus PCR amplification kit in a Bavarian population sample. *Int.J.Legal Med.* 114 (2001)

**Antin J. and Smith B.:** Bone Marrow Transplantation; *Blood: Principles and Practice of Hematology*, Handin R. (Hrsg.) (1995)

**Antin, J.H. et al.:** Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 7 (2001)

**Appelbaum F.R.:** Hematopoietic cell transplantation. In: Harrison's Principles of Internal Medicine, vol. 16th Edition. McGraw-Hill. (2005)

**Bader, P. et al.:** Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant.* 19 (1997)

**Bader, P. et al.:** Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 21 (1998)

**Bader, P. et al.:** Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 13 (1999)

**Bader, P. et al.:** Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J.Clin.Oncol.* 22 (2004)

**Bader, P. et al.:** Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant.* 33 (2004)

**Ballen, K.K. et al.:** Herpes simplex virus and neutropenia following bone marrow transplantation. *Transplantation* 54 (1992)

**Bar, B.M. et al.:** Host and donor erythrocyte repopulation patterns after allogeneic bone marrow transplantation analysed with antibody-coated fluorescent microspheres. *Br.J.Haematol.* 72 (1989)

**Bar, B.M. et al.:** Influence of the conditioning regimen on erythrocyte chimerism, graft-versus-host disease and relapse after allogeneic transplantation with lymphocyte depleted marrow. *Bone Marrow Transplant.* 10 (1992)

**Barker, J.N. et al.:** Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105 (2005)

**Berneman, Z.N. et al.:** Flow-cytometric analysis of erythrocytic blood group A antigen density profile. *Vox Sang.* 61 (1991)

**Blanchard, D. et al.:** Flow cytometry analysis of dual red blood cell populations after bone marrow transplantation. *Br.J.Haematol.* 89 (1995)

**Bosserman, L.D. et al.:** Mechanism of graft failure in HLA-matched and HLA-mismatched bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 4 (1989)

**Brady, K.A. et al.:** Circulating red cells usually remain of host origin after bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *Transfusion* 36 (1996)

**Bundschuh G. et al.:** Lexikon der Immunologie, 2.erweiterte Auflage. (1992)

**Cesaro, S.:** Role and cost efficacy of unrelated cord blood in adult hematopoietic stem transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 36 (2005)

**Childs, R. et al.:** Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 94 (1999)

**Choi, S.J. et al.:** Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.* 26 (2000)

**Clift, R.A. et al.:** Treatment of chronic myeloid leukemia by marrow transplantation. *Blood* 82 (1993)

**Cohena, Y. and Nagler,A.:** Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leuk.Lymphoma* 44 (2003)

**David, B. et al.:** Flow cytometric monitoring of red blood cell chimerism after bone marrow transplantation. *Transfus.Med.* 9 (1999)

**Dazzi, F. et al.:** Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood* 95 (2000)



- Drobyski, W.R. et al.:** Molecular remission occurring after donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 10 (1992)
- Dubovsky, J. et al.:** Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 13 (1999)
- Dunsford I et al.:** A human blood-group chimera. *Br Med J.* 2 (1953)
- Durnam, D.M. et al.:** Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood* 74 (1989)
- Eckhardt R.:** Retikulozytenzählung mit dem Coulter Epics Profile. *Coulter Electronics GmbH Firmenbroschüre.* (1993)
- Ehninger, G. et al.:** Bone marrow transplantation from unrelated donors in chronic myelogenous leukemia. *Semin.Hematol.* 30 (1993)
- Fehse, B. et al.:** Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 10 (2001)
- Ferrara, J.L. et al.:** Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 5 (1999)
- Formankova, R. et al.:** Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. *Leuk.Res.* 24 (2000)
- Frankel, W. et al.:** Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats. *Am.J.Hematol.* 52 (1996)
- Garratty, G. and Arndt,P.A.:** Applications of flow cytofluorometry to red blood cell immunology. *Cytometry* 38 (1999)
- Gengozian, N. et al.:** Bone marrow transplantation in a leukemic patient following immunosuppression with antithymocyte globulin and total body irradiation. *Transplantation* 15 (1973)
- Ginsburg, D. et al.:** Origin of cell populations after bone marrow transplantation. Analysis using DNA sequence polymorphisms. *J.Clin.Invest* 75 (1985)
- Goldman, J.M. et al.:** Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann.Intern.Med.* 108 (1988)
- Goldman, J.M. and Melo,J.V.:** Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N.Engl.J.Med.* 349 (2003)

- Gorin, N.C. et al.:** Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging. *Blood* 75 (1990)
- Greinix, H.T. et al.:** Factors affecting long-term outcome after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukaemia: a retrospective study of 172 adult patients reported to the Austrian Stem Cell Transplantation Registry. *Br.J.Haematol.* 117 (2002)
- Guglielmi, C. et al.:** Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood* 100 (2002)
- Gyger, M. et al.:** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease. *Exp.Hematol.* 26 (1998)
- Hochhaus, A. et al.:** Empfehlungen der DGHO für die Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen: Chronische myeloische Leukämie. (2006)
- Holler, E. et al.:** Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 75 (1990)
- Horowitz, M.M. and Rowlings, P.A.:** An update from the International Bone Marrow Transplant Registry and the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry on current activity in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr.Opin.Hematol.* 4 (1997)
- International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) Database.:** Current use and outcome of blood and marrow transplantation. (2003)
- Kessinger, A.:** Clinical Features of Autologous and Allogenic Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation. In: McLeod, B.C., Price T.H., Drew M.J. (Hrsg.): Apheresis: Principles and Practice. Bethesda. (1997)
- Kleihauer, E. (Hrsg.).** Hämatologie.Physiologie, Pathologie, Klinik, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. (1978)
- Knowlton, R.G. et al.:** Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 68 (1986)
- Kolb, H.J. et al.:** Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86 (1995)
- Kroger, N. et al.:** Kinetics of plasma-cell chimerism after allogeneic stem cell transplantation by highly sensitive real-time PCR based on sequence polymorphism and its value to quantify minimal residual disease in patients with multiple myeloma. *Exp.Hematol.* 34 (2006)
- Lee, L.G. et al.:** Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 7 (1986)

- Lion, T.:** Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical-biological situations. *Leukemia* 15 (2001)
- Lion, T. et al.:** Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 15 (2001)
- Maas, F. et al.:** Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 17 (2003)
- Macintyre, E.A.:** The use of the polymerase chain reaction in haematology. *Blood Rev.* 3 (1989)
- Mackinnon, S. et al.:** Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 83 (1994)
- Marmont, A.M. et al.:** T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 78 (1991)
- Martin, D.M. et al.:** IGF receptor function and regulation in autocrine human neuroblastoma cell growth. *Regul. Pept.* 48 (1993)
- Massenkeil, G. et al.:** Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. *Bone Marrow Transplant.* 31 (2003)
- Mathur, A. and Martin, J.F.:** Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 364 (2004)
- McGlave, P.B. et al.:** Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: results from eight transplant groups. *Lancet* 343 (1994)
- Meldgaard, K.L. et al.:** A comparative study of sequential priming and mobilisation of progenitor cells with rhG-CSF alone and high-dose cyclophosphamide plus rhG-CSF. *Bone Marrow Transplant.* 26 (2000)
- Nobes, P.R. and Carter, A.B.:** Reticulocyte counting using flow cytometry. *J. Clin. Pathol.* 43 (1990)
- Oberkircher, A.R. et al.:** Description of an efficient and highly informative method for the evaluation of hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 16 (1995)
- Ortola, J. et al.:** [Transient reticulocyte increase in patients undergoing bone marrow transplantation after erythrocyte concentrate transfusion]. *Sangre (Barc.)* 38 (1993)
- Osgood E. et al.:** Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow. Case report. *Ann. Intern. Med.* 13 (1939)
- Ostendorf P.C. et al.:** Knochenmarktransplantation. In P. C. Ostendorf & S. Seeber (Hrsg.), Hämatologie, Onkologie. München: Urban & Schwarzenberg. (1997)

**Parkman R.:** Transplantation biology. In: Hematology: Basic principles and practices, Hoffmann, R. (Hrsg.), New York u.a. (1995)

**Perry, E.S. et al.:** In vitro and in vivo persistence of reticulocytes from donor red cells. *Transfusion* 36 (1996)

**Petz, L.D. et al.:** Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 70 (1987)

**Petz L.D.:** Documentation of engraftment and characterization of chimerism following marrow transplantation. In: Bone marrow transplantation, Forman S. J. (Hrsg.), Blackwell scientific publications, Boston. (1994)

**Pinkel, D.:** Bone marrow transplantation in children. *J.Pediatr.* 122 (1993)

**Poley, S.:** Immunphänotypisierung von Lymphozyten. In: Rothe, G. und Schmitz, G.: Anwendungen der Durchflußzytometrie in der klinischen Zellsdiagnostik *Kursprogramm zum 12. Regensburger Kurs* (1999)

**Ratanatharathorn, V. et al.:** Prospective comparative trial of autologous versus allogeneic bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 84 (1994)

**Rocha, V. et al.:** Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N.Engl.J.Med.* 351 (2004)

**Rocha, V. et al.:** Umbilical cord blood transplantation. *Curr.Opin.Hematol.* 11 (2004)

**Roux, E. et al.:** Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukemia transplanted with T-cell-depleted bone marrow: involvement of different hematologic lineages before and after relapse. *Blood* 81 (1993)

**Sato, S. et al.:** Reticulocyte-gated flow cytometric analysis of red blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lab Hematol.* 12 (2006)

**Schaap, N. et al.:** Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br.J.Haematol.* 108 (2000)

**Schattenberg, A. et al.:** Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 73 (1989)

**Schmitz, N. et al.:** Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood* 100 (2002)

**Schouten, H.C. et al.:** Incomplete chimerism in erythroid, myeloid and B lymphocyte lineage after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 3 (1988)

- Seisenberger W.:** Veränderungen im Immunsystem durch Leukapherese. *Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der LMU München.* (2003)
- Serrano, J. et al.:** Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 95 (2000)
- Sharon, R. and Fibach, E.:** Quantitative flow cytometric analysis of ABO red cell antigens. *Cytometry* 12 (1991)
- Simonsen, M.:** Graft versus host reactions. Their natural history, and applicability as tools of research. *Prog. Allergy* 6 (1962)
- Sklar, J.:** Polymerase chain reaction: the molecular microscope of residual disease. *J. Clin. Oncol.* 9 (1991)
- Slavin, S. et al.:** Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 91 (1998)
- Sparkes, R.S. et al.:** Immunoglobulin synthesis following allogeneic bone marrow transplantation in man. Conversion to donor allotype. *Transplantation* 27 (1979)
- Stachel D.:** Stammzelltransplantation. *Monatsschrift für Kinderheilkunde.* 147 (1999)
- Sullivan K.M.:** Graft-versus-host disease. In: Bone Marrow Transplantation, Forman S. J. (Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh. (1994)
- Thiede, C. et al.:** Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* 23 (1999)
- Thiede, C. et al.:** Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 15 (2001)
- Thiede, C. et al.:** Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 112 (2004)
- Thomas, E. et al.:** Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N.Engl.J.Med.* 292 (1975)
- Thomas, E.D. et al.:** Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 292 (1975)
- Ugozzoli, L. et al.:** Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. *Blood* 77 (1991)

**Van Dijk, B.A. et al.:** Erythrocyte repopulation after allogeneic bone marrow transplantation. Analysis using erythrocyte antigens. *Transplantation* 44 (1987)

**van Leeuwen, J.E. et al.:** Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 83 (1994)

**Wagner, F.F. and Flegel, W.A.:** Analysis by flow cytometry of chimerism after bone-marrow transplantation and of erythrocyte antigen density. In: Gutensohn, K.; Sonneborn, H.H., Kühnl, P.. Heidelberg. Clin Lab Publications. (1997)

**Weisdorf, D. et al.:** Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 51 (1991)

**Wessman, M. et al.:** In situ hybridization using a Y-specific probe--a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 4 (1989)

**Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes.:** Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut. *Deutsches Ärzteblatt* . 96 (1999)

**Witherspoon R.P.:** Immunological reconstruction after allogeneic marrow, autologous marrow or autologous peripheral blood stem cell transplantation. In: *Clinical bone marrow transplantation*, Atkinson K. (Hrsg). (1990)

**Witherspoon, R.P. et al.:** Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. *Blood* 58 (1981)

**Yam, P.Y. et al.:** Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 43 (1987)

**Zittoun, R.A. et al.:** Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N.Engl.J.Med.* 332 (1995)

## 8.2 Verzeichnis der Zitate

- [1] Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes., Seite 1297 ff. 1304
- [2] Mathur A., Seite 183 ff. 192
- [3] Osgood E., Seite 357 ff.
- [4] Ostendorf P.C., Seite 222 ff. 236
- [5] Seite 25 ff. 26
- [6] Thomas E., Seite 832 ff. 843
- [7] Thomas E.D., Seite 895 ff. 902
- [8] Seisenberger W.,
- [9] Kessinger A., Seite 423 ff. 425
- [10] Schmitz N., Seite 761 ff. 767
- [11] Rocha V., Seite 375 ff. 385
- [12] Cohena Y., Seite 1287 ff. 1299
- [13] Barker J.N., Seite 1343 ff. 1347
- [14] Rocha V., Seite 2276 ff. 2285
- [15] Cesaro S., Seite 275 ff.
- [16] International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) Database.,
- [17] Ehninger G., Seite 49 ff. 50
- [18] Pinkel D., Seite 331 ff. 341
- [19] Stachel D., Seite 707 ff. 715
- [20] Hochhaus A.,
- [21] Goldman J.M., Seite 1451 ff. 1464
- [22] Gorin N.C., Seite 1606 ff. 1614
- [23] McGlave P.B., Seite 1486 ff. 1488
- [24] Clift R.A., Seite 1954 ff. 1956
- [25] Ratanatharathorn V., Seite 1050 ff. 1055

- [26] Zittoun R.A., Seite 217 ff. 223
- [27] Martin D.M., Seite 225 ff. 232
- [28] Meldgaard K.L., Seite 717 ff. 722
- [29] Weisdorf D., Seite 1197 ff. 1203
- [30] Witherspoon R.P., Seite 62 ff. 65
- [31] Parkman R.,
- [32] Ballen K.K., Seite 553 ff. 555
- [33] Appelbaum F.R., Seite 668 ff. 673
- [34] Bosserman L.D., Seite 239 ff. 245
- [35] Simonsen M., Seite 349 ff. 467
- [36] Ferrara J.L., Seite 347 ff. 356
- [37] Holler E., Seite 1011 ff. 1016
- [38] Sullivan K.M., Seite 339 ff. 362
- [39] Goldman J.M., Seite 806 ff. 814
- [40] Marmont A.M., Seite 2120 ff. 2130
- [41] Greinix H.T., Seite 914 ff. 923
- [42] Horowitz M.M., Seite 395 ff. 400
- [43] Antin J., Seite 2076 ff.
- [44] Kolb H.J., Seite 2041 ff. 2050
- [45] Bader P., Seite 2079 ff. 2086
- [46] Dazzi F., Seite 67 ff. 71
- [47] Guglielmi C., Seite 397 ff. 405
- [48] Thiede C., Seite 293 ff. 302
- [49] Bader P., Seite 697 ff. 702
- [50] Dubovsky J., Seite 2059, 2060 ff. 2059, 2069
- [51] Lion T., Seite 292 ff.
- [52] Lion T., Seite 307 ff. 310



- [53] Petz L.D., Seite 136 ff. 148
- [54] Antin J., Seite 2063 ff.
- [55] Bundschuh G.,
- [56] Dunsford I., Seite 81 ff. 81
- [57] Bar B.M., Seite 45 ff. 52
- [58] Schattenberg A., Seite 1367 ff. 1372
- [59] Drobyski W.R., Seite 301 ff. 304
- [60] Petz L.D., Seite 1331 ff. 1337
- [61] Petz L.D., Seite 136 ff. 148
- [62] Wessman M., Seite 283 ff. 286
- [63] Durnam D.M., Seite 2220 ff. 2226
- [64] Thiede C., Seite 1055 ff. 1060
- [65] Van Dijk B.A., Seite 650 ff. 654
- [66] Bar B.M., Seite 239 ff. 245
- [67] Witherspoon R.P., Seite 360 ff. 368
- [68] Gengozian N., Seite 446 ff. 454
- [69] Sparkes R.S., Seite 212 ff. 213
- [70] Antin J.H., Seite 473 ff. 485
- [71] Yam P.Y., Seite 399 ff. 407
- [72] Ginsburg D., Seite 596 ff. 603
- [73] Knowlton R.G., Seite 378 ff. 385
- [74] Macintyre E.A., Seite 201 ff. 210
- [75] Sklar J., Seite 1521 ff. 1524
- [76] Choi S.J., Seite 327 ff. 332
- [77] van Leeuwen J.E., Seite 3059 ff. 3067
- [78] Massenkeil G., Seite 339 ff. 345
- [79] Bader P., Seite 1696 ff. 1705

- [80] Bader P., Seite 815 ff. 821
- [81] Gyger M., Seite 426 ff. 434
- [82] Sharon R., Seite 545 ff. 549
- [83] Sato S., Seite 82 ff. 85
- [84] Seite 6 ff.
- [85] Poley S., Seite 5 ff.
- [86] Eckhardt R.,
- [87] Anslinger K., Seite 278 ff. 280
- [88] Wagner F.F., Seite 93 ff. 95
- [89] Nobes P.R., Seite 675 ff. 678
- [90] Lee L.G., Seite 508 ff. 517
- [91] Perry E.S., Seite 318 ff. 321
- [92] Formankova R., Seite 339 ff. 347
- [93] Bader P., Seite 487 ff. 495
- [94] Mackinnon S., Seite 3409 ff. 3416
- [95] Slavin S., Seite 756 ff. 763
- [96] Childs R., Seite 3234 ff. 3241
- [97] Berneman Z.N., Seite 265 ff. 274
- [98] Garratty G., Seite 259 ff. 267
- [99] Blanchard D., Seite 741 ff. 747
- [100] David B., Seite 209 ff. 217
- [101] Ortola J., Seite 339 ff. 340
- [102] Brady K.A., Seite 314 ff. 317
- [103] Thiede C., Seite 16 ff. 23
- [104] Frankel W., Seite 281 ff. 287
- [105] Ugozzoli L., Seite 1607 ff. 1615
- [106] Oberkircher A.R., Seite 695 ff. 702

- [107] Kroger N., Seite 688 ff. 694
- [108] Maas F., Seite 621 ff. 629
- [109] Alizadeh A.A., Seite 503 ff. 511
- [110] Fehse B., Seite 419 ff. 425
- [111] Schouten H.C., Seite 407 ff. 412
- [112] Serrano J., Seite 2659 ff. 2665
- [113] Roux E., Seite 243 ff. 248
- [114] Schaap N., Seite 116 ff. 125

**Mein Dank gilt...**

... Herrn Prof. W. Mempel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, eigenständig in seiner Abteilung zu arbeiten.

... Frau Dr. S. Poley für die ausgezeichnete Betreuung, Unterstützung bei der Bewältigung von anfallenden Problemen und die Korrektur

... Herrn Prof. H.- J. Kolb für die Möglichkeit, Patienten seiner Abteilung für die Studie zu gewinnen

... den Damen und Herrn im Labor der Abteilung für Transfusionsmedizin, die nicht nur liebevoll ihren Arbeitsplatz teilten, sondern mich nach Kräften unterstützten

... den Probanden, die trotz ihrer schweren Erkrankung bereit waren, an dieser Studie teilzunehmen

... Frau Peyerl und ihrem Hebammenteam für die Entnahme des Nabelschnurbluts

... Herrn Mc Gowen der Firma Serologicals Ltd., der die noch in Entwicklung befindlichen Antikörper zur Verfügung stellte

... meinen Eltern, die mir das Interesse und die Freude an der Welt beibrachten

... Perle, mit der ich glücklich durch die Welt gehen darf

## Lebenslauf

### Persönliches

27.08.1975	geboren in Giessen
14.08.2004	Eheschließung mit Waltraud Seisenberger
24.01.2010	Geburt der Tochter Valentina

### Schullaufbahn

1982 - 1986	Grundschule, Hamburg-Hausbruch
1986 - 1995	Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg-Harburg

### Weitere Ausbildungen

1995 - 1996	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz
1997 - 1998	Ausbildung zum Beruf des Rettungsassistenten

### Studium

1996 - 1999	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Sept. 1998	Ärztliche Vorprüfung
1999 - 2002	Studium der Humanmedizin an der LMU München
Aug. 1999	1. Staatsexamen
2002	Gastsemester an der Universität Wien
Sept. 2001	2. Staatsexamen
Okt. 2002	3. Staatsexamen

### Berufliche Tätigkeit

Jan. 2003 - Dez. 2004	Assistenzarzt / Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Glarus / Schweiz
Jan. 2005 - Mai 2007	Assistenzarzt / Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Frauenfeld / Schweiz
Seit Juni 2007	Oberarzt / Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Frauenfeld / Schweiz
Okt. 2008	Facharztprüfung in Gynäkologie und Geburtshilfe