

Widmungen

Meiner lieben Mutter.

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Hämatologie

QUALITÄTSKONTROLLE DES
DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN NACHWEISES DER
LEICHTKETTENEXPRESSION BEI PATIENTEN MIT
CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE
VOM B-ZELLTYP.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Gernold Schmidtke
aus Essen
2003

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Hans Grosse-Wilde
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Peter Meusers
2. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. med. Heinz-Gert Höffkes, Fulda

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 2003

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Schmidtke, G., Schmücker, U., Brittinger, G., Höffkes, H.G. (1999):
Comparative flow cytometric study of clonal excess in leukaemic peripheral blood from patients suffering from chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) by different antibodies, staining techniques and the effects of blood storage.

Clinical and Laboratory Haematology 21(2), 103-112

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	7
1.1 Einleitung.....	7
1.2 Struktur der Immunglobuline	9
1.3 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Typ (B-CLL).....	13
1.3.1. Therapie.....	16
Kapitel 2	19
2.1 Patienten, Material und Methoden	19
2.2 Durchflußzytometrie	20
2.3 Präparation der Leukozyten mittels Ficoll-Hypaque - Dichtegradientenzentrifugation.....	23
2.4 Blockade zytophiler Immunglobulin-Bindungen an Lymphozyten ...	24
2.5 Ansatz Probe „A“ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).....	26
2.5.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „A“	26
2.5.2 Antikörperpanel Probe „A“ (BD)	26
2.6 Ansatz Probe „B“ (Immuno Quality Products (IQP), Bad Nauheim, Deutschland)	27
2.6.1 Protokoll der Probenvorbereitung für Probe „B“	27
2.6.2 Antikörperpanel Probe „B“ (IQP)	28
2.7 Ansatz Probe „C“ (Coulter, Krefeld, Deutschland)	28
2.7.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „C“	28
2.7.2 Antikörperpanel Probe „C“ (Coulter).....	29
2.8. Ansatz Probe „D“ (DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland)....	29
2.8.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „D“	29
2.8.2. Antikörperpanel Probe „D“ (DAKO)	31
2.9. Ansatz Probe „E“ (Immunotech, Hamburg, Deutschland).....	31
2.9.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „E“	31
2.9.2 Antikörperpanel Probe „E“ (Immunotech)	32
2.10 Blutaufbewahrung	33
Kapitel 3	34
3.1 Statistische Analyse	34
3.2. Ergebnisse	34
3.2.1 Fluoreszenzintensität an Tag 0 für CD 19, CD 45, Kappa und Lambda - Antikörper	35
3.2.2 Untersuchung der Fluoreszenzintensität für CD 19, CD 45, Kappa, IgM auf Effekte bei Lagerung bei 24°C im Vergleich zu den MESF-Werten am Tag 0.	36

3.2.4 Untersuchung der Fluoreszenz Intensität für CD 19, CD 45, Kappa und IgM bei Lagerung bei 30°C bezüglich der MESF-Werte verglichen mit Tag 0.	36
3.2.5 Untersuchung der Fluoreszenzintensität für CD 19, CD 45, Kappa und IgM bei Lagerung bei 4°C bezüglich der MESF-Werte verglichen mit Tag 0.	37
Kapitel 4	38
4.1 Tabellen.....	38
Kapitel 5	42
5.1 Diskussion	42
Kapitel 6	46
6.1 Abbildungen	46
Kapitel 7	53
7.1 Zusammenfassung.....	53
Kapitel 8	54
8.1 Literaturverzeichnis	54
Anhang	71
Abkürzungsverzeichnis.....	71
Glossar	75
Gerät.....	79
Reagenzien	80
Danksagungen	81
Lebenslauf.....	82

Abbildungsverzeichnis

NUMMER	SEITE
Abbildung 1	10
Abbildung 2	46
Abbildung 3	47
Abbildung 4	47
Abbildung 5	48
Abbildung 6	48
Abbildung 7	49
Abbildung 8	49
Abbildung 9	50
Abbildung 10	50
Abbildung 11	51
Abbildung 12	51
Abbildung 13	52

Kapitel 1

1.1 Einleitung

Mittels multiparametrischer Durchflußzytometrie können Lymphozyten-Subpopulationen schnell und zuverlässig, mit geringem apparativen und personellen Aufwand, aus Vollblut oder Knochenmarkaspiraten immunologisch charakterisiert werden. Die Durchflußzytometrie ist Standard für die Quantifizierung und Charakterisierung von T-, B- und NK-Zellen [17, 36, 37, 83].

Die Proben werden erfahrungsgemäß oft an anderer Stelle abgenommen, als sie dann analysiert werden (z.B. Einsendelaboratorien). Dabei sind zum Teil längere Transportwege und unterschiedliche Temperaturbedingungen während des Transports nicht zu vermeiden. Außerdem existieren verschiedene Möglichkeiten zur Präparation (Vollblutlyse vs. Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation) und Färbung der Proben. Jeder dieser präanalytischen Faktoren hat Einfluß auf die Meßergebnisse und damit auf die Beurteilung der Befunde.

Aus diesen Gründen wurden bereits zahlreiche Studien im Rahmen der HIV-Epidemie durchgeführt, um diese präanalytischen Faktoren, die möglicherweise die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Messungen mittels Durchflußzytometrie beeinflussen, zu untersuchen. Als deren Resultate sind Richtlinien zur Aufbewahrung, für den Transport und die Präparation dieser Proben als „Standard“ definiert worden [25, 52, 53, 64, 70].

Dies wurde bislang nicht für die durchflußzytometrische Untersuchung abnormer B-Zellen durchgeführt, obwohl gerade bei diesen Krankheitsbildern die durchflußzytometrische Immunphäotypisierung zur Identifizierung des sog. „klonalen Exzeß“; d.h. der Leichtkettenrestriktion von abnormen B-Lymphozyten, eingesetzt wird [56, 57, 75]. Die Unterscheidung zwischen lokalisierter oder systemischer Krankheit oder Entscheidungen zu Behand-

lungsstrategien der NHL sind oft von den Untersuchungsergebnissen durchflußzytometrischer Untersuchungen abhängig.

In der Durchflußzytometrie hat die Arbeitstechnik der Vollblutlyse die Technik der Ficoll-Hypaque Dichtegradientenseparation ersetzt. Die Pathologie der NHL im Bereich der Durchflußzytometrie wurde jedoch durch den Einsatz der Dichtegradientenzentrifugation etabliert [17, 43, 49, 62, 93].

Es überrascht daher, daß es nur wenige Studien gibt, die die Ergebnisse beider Verfahren für die Pathologie vergleichen. Dabei resultieren die veröffentlichten Studien in unterschiedliche Empfehlungen [48, 64, 98]. Trotzdem wird die einfache und schnelle Methode der Vollblutlyse routinemäßig heutzutage in den meisten Laboratorien eingesetzt.

Die vorliegende Studie hat die Zielsetzung, die Veränderung der Meßergebnisse für die Oberflächenantigene CD 45, CD 19, IgM und insbesondere der Leichtkette Kappa unter verschiedenen physikalischen Einflußgrößen zu untersuchen.

Dies erfolgt mittels abnormer B-Lymphozyten von Patienten mit B-CLL. Dabei werden die Meßergebnisse in Hinblick auf unterschiedliche Präparationsmethoden, Antikörper und Lagerungsbedingungen untersucht. Die Meßergebnisse sind von grundlegender klinischer Bedeutung und zeigen, daß Richtlinien für die Aufbewahrung und den Transport von Proben mit abnormen Zellen etabliert werden sollten.

1.2 Struktur der Immunglobuline

Die Struktur der Immunglobuline wurde zunächst an Myelomproteinen untersucht, also an Produkten einzelner neoplastisch end-differenzierter B-Zellen, die große Mengen eines definierten Immunglobulins (Paraprotein) freisetzen. Die Analyse verschiedener dieser Myelomproteine ergab, daß alle Immunglobuline nach einem bestimmten Muster aufgebaut sind. Ein Antikörper besteht demnach aus zwei verschiedenen Typen von Polypeptidketten. Die kleinere „leichte“ Polypeptidkette („light chain“) hat ein Molekulargewicht von 25.000 Dalton und ist bei allen Klassen von Immunglobulinen gleich, während die größere „schwere“ Kette („heavy chain“) ein Molekulargewicht von 50.000 - 77.000 Dalton hat und in jeder Klasse oder Subklasse anders strukturiert ist. Die Polypeptidketten der Immunglobuline werden durch kovalente und nichtkovalente Kräfte zusammengehalten.

Die schwere, wie auch die leichte Kette, können in bestimmte Abschnitte, die „Domänen“, unterteilt werden. Jede Domäne wird dabei durch Disulfidbrücken stabilisiert und umfaßt ca. 110 Aminosäuren.

Die leichten Ketten existieren in zwei verschiedenen Formen, der Kappa- und Lambda-Form, die sich jeweils aus zwei Domänen aufbauen. Die karboxyterminalen Domänen der leichten Ketten eines Haupttyps sind untereinander nahezu identisch. Dieser Abschnitt des Proteins wird deshalb auch als konstante oder C-Region bezeichnet. Dagegen variiert die aminoterminal Domäne der leichten Ketten von Antikörper zu Antikörper. Diese Domäne bildet zusammen mit einer Domäne der schweren Kette die zweite Antigenbindungsstelle des Antikörpers. Wegen seiner hohen Variabilität heißt dieser Abschnitt variable oder V-Region. Diese Variabilität ist nicht gleichmäßig über den gesamten Proteinabschnitt verteilt, sondern konzentriert sich auf drei Regionen, die sog. hypervariablen Regionen oder CDR. Die CDR sind aus den Aminosäuren aufgebaut, die die Antigenbindungsstellen des Antikörpers auskleiden. Zwischen den CDR liegen Regionen, die einen wesentlich geringeren Grad an Variabilität aufweisen. Sie werden als framework region (fr) bezeichnet. Die leichten und schweren Ketten der

Antikörper können anhand der Strukturähnlichkeiten unter den framework regions in Gruppen eingeteilt werden [91].

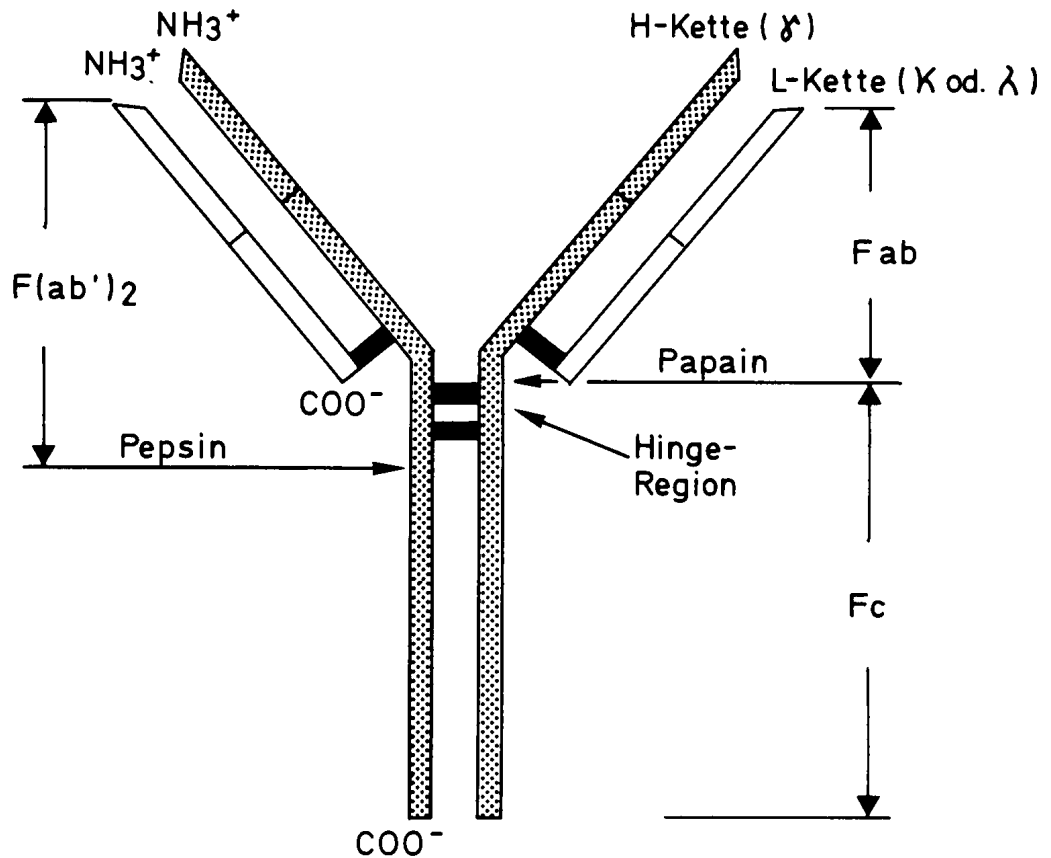


Abbildung 1

Diese beiden Formen werden aufgrund ihrer Antigeneigenschaften unterschieden - ein Antiserum gegen den einen Typ reagiert nicht mit dem anderen.

Jeder Typ der leichten Kette ist mit jedem der schweren Kette frei kombinierbar. In einem Molekül gehören aber beide Ketten zum selben Typ, entweder Kappa oder Lambda, und es werden keine Hybridmoleküle gebildet.

Da praktisch jede leichte Kette mit jeder schweren Kette kombinierbar ist, ist die Anzahl der möglichen Antigenbindungsstellen (combining sites) das Produkt aus der Anzahl der schweren und der leichten Ketten. Ein Teil der Variabilität der Immunglobulinstruktur leitet sich von der Interaktion zwischen diesen einzelnen Polypeptidketten ab. Wenn es z.B. 10^4 verschiedene leichte Ketten gibt, von denen jede eine Bindung mit einer der 10^4 verschiedenen schweren Ketten eingehen kann, können theoretisch 10^8 verschiedene Antikörperspezifitäten entstehen .

Bei gesunden Menschen exprimieren die meisten B-Zellen (mit Ausnahme der im Entwicklungsprozeß sehr frühen Vorläufer-B-Zellen und Plasmazellen) Immunglobuline der Klasse D (IgD) auf Ihrer Zelloberfläche, wobei jede Zelle jeweils nur einen Leichtkettentyp auf dem Fab'-Teil des Immunglobulins exprimiert, entweder den Typ Kappa oder Lambda. Im peripheren Blut und in Lymphknoten gesunder Personen findet sich eine Mischung aus Kappa- und Lambda-positiven Zellen, mit einem Anteil von 2/3 Kappa-positiv und 1/3 Lambda-positiv. Bei malignen Lymphomen des B-Zelltyps ist fast immer eine klonale Proliferation der B-Lymphozyten nachzuweisen. Diese Zellen produzieren und exprimieren u.a. Immunglobuline der Leichtkettenklasse auf ihrer Oberflächenmembran oder intrazytoplasmatisch, wobei ein Klon jeweils nur einen Typ der Leichtkettenklasse exprimiert - entweder Kappa oder Lambda. Weil NHL in der Regel eine klonale Expansion einer einzigen entarteten Zelle darstellen, exprimieren die Tumorzellen folglich auch denselben Leichtketten-Isotyp [10, 59].

Die uniforme Expression von Leichtketten-Immunglobulinen auf monoklonalen Zellpopulationen hat zur Entwicklung von Techniken in der Durchflußzytometrie geführt, die auch quantitativ geringe Populationen von monotypischen B-Lymphozyten nachweisen können. Das Vorliegen einer Kappa/Lambda-Leichtkettenrestriktion impliziert hierbei das Vorliegen einer monoklonalen B-Zellpopulation, definitionsgemäß liegt damit aber nachweisbar nur eine monotypische B-Zellpopulation vor [4, 56, 80, 101].

Die Analyse der Verteilung von Oberflächenimmunglobulinen der Leichtkettenklasse durch die Durchflußzytometrie liefert wichtige Aussagen hinsichtlich der Monoklonalität von B-Zellen und ermöglicht es, auch geringe Konzentrationen zirkulierender Tumorzellen bei Patienten mit NHL nachzuweisen.

1.3 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Typ (B-CLL)

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Typ (B-CLL) ist die häufigste Leukämie des Erwachsenen in der westlichen Welt. Das typische Alter für diese Erkrankung liegt bei über 50 Lebensjahren. Eine familiäre Häufung wird bei dieser Erkrankung beobachtet. So haben Kinder von Patienten mit B-CLL im Vergleich zur Normalbevölkerung ein dreifach erhöhtes Risiko, an einer B-CLL zu erkranken. Die B-CLL ist eine maligne Erkrankung der B-Lymphozyten. Sie gehört nach der Kiel-Klassifikation zu den niedrigmalignen NHL [55]. Viele Fragen zur Biologie dieser Erkrankung bleiben bis heute ungeklärt [22, 52, 89].

Im Entwicklungsprozess von der Stammzelle zum Lymphozyten kommt es bei der B-CLL aus bisher noch nicht geklärter Ursache dazu, daß sich eine unreife Zelle in den Zwischenstufen ihrer Entwicklung maligne verändert. Die nicht eintretende Apoptose („programmierter Zelltod“) dieser unreifen B-Zellen führt zu einer Verdrängung der übrigen Blutbestandteile bis zur vollständigen Verdrängung der normalen Blutzellbildung. Wie die meisten Tumorerkrankungen zeigt auch die B-CLL ein sehr breites Spektrum an klinischen Veränderungen bei Diagnosestellung [76]. Die Initialsymptomatik vor Diagnosestellung verläuft in der Regel schleichend [7, 45, 46]. Die auftretenden Beschwerden sind eher uncharakteristisch. Leitsymptome bei Diagnose einer B-CLL sind Lymphknotenschwellungen (meist zervikal), Leber- und Milzvergrößerungen sowie eine Leukozytose [24, 63, 67]. Bei ca. 20% der Patienten treten typische B-Symptome wie Nachtschweiß, fieberhafte Zustände im Sinne einer Grippe oder Bronchitis und Gewichtsverlust auf. Sehr häufig klagen die Patienten über Müdigkeit und Abgeschlagenheit und Schweißneigungen. Durch die unterschiedlich rasch zunehmende Tumorzellmasse und eine hämatopoetische und immunologische Insuffizienz kommt es im weiteren Krankheitsverlauf zu blauen Flecken, Zahnfleisch- bzw. Nasenbluten, schlecht heilenden Wunden sowie Knochen- und Gelenkschmerzen. Haupttodesursachen sind Infekte (Pneumonie und Sepsis) und Blutungen [31, 71]. In vielen Fällen wird die Krankheit jedoch in den frühesten Stadien im Rahmen von Routineuntersuchungen ohne klinische

Manifestation festgestellt [32, 45, 68]. Die durchschnittliche Latenzzeit zwischen Erstsymptomen und Diagnosestellung beträgt ca. 12-14 Monate [14, 45, 96].

Immunologische Marker haben die malignen Lymphozyten der B-CLL als unreife Vorstufen der Plasmazellen identifiziert [23]. Im Gegensatz zu anderen Tumoren der B-Zellreihe exprimieren die malignen B-Zellen der B-CLL wenig Immunglobulin (smlg) auf ihrer Oberflächenmembran [37, 40, 61, 62, 78, 95]. Der pan-T-Zellmarker CD 5 wird in einer kleinen Untergruppe von B-Lymphozyten gefunden und wird charakteristischerweise immer bei einer B-CLL exprimiert. [8, 19, 95]. In Ausnahmefällen sind auch Varianten der B-CLL mit einer Subpopulation von CD 5-negativen Zellen vertreten (bis zu einem Anteil von 36%) [6, 26, 37, 53, 62, 84].

Weiterhin finden sich auf den B-CLL-Zellen Rezeptoren für Mauserythrozyten, einem Marker für unreife B-Lymphozyten, wie auch Rezeptoren für das Fc Fragment des IgG und für Komplement [82]. Die B-Zelle der B-CLL ist damit eine intermediäre Zelle mit einigen, aber nicht allen morphologischen Merkmalen einer immunologisch kompetenten B-Zelle. Der Lymphozyt scheint in seiner normalen Entwicklung arretiert zu sein, ohne die letzten Stufen der B-Zellentwicklung zu durchlaufen.

Bei der B-CLL kommt es also zu einer monoklonalen Proliferation eines B-Lymphozyten [94], d.h. die Tumorzellen stammen von einer einzigen abnormen B-Zelle ab. Die Klonalität kann mit der Durchflußzytometrie über die Expression einer einzelnen Immunglobulin-Leichtkette, entweder Kappa oder Lambda, auf der Zelloberfläche identifiziert werden [2, 27, 75]. Es wird entweder Kappa oder Lambda exprimiert, niemals beide Leichtketten. Ein charakteristisches Merkmal der B-CLL ist die exzessive Produktion von freien Leichtketten, die sich auch intrazytoplasmatisch nachweisen lassen [11, 20, 28, 43]. Neben diesen für die B-CLL typischen Oberflächenmarkern lassen sich auch weitere Antigene wie CD 19, CD 20 und CD 23 nachweisen [37, 38, 69, 92].

Andere Analysetechniken haben die Klonalität durch identische Immunglobulin-Idiotypen-Spezifitäten [39, 44], gemeinsame Muster der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität [33, 90], klonale Chromosomen-Abnormitäten [35] oder Immunglobulin-Gen-Veränderungen nachgewiesen [51, 98].

Eine Hypogammaglobulinämie ist ein weiteres Merkmal der B-CLL, welche in bis zu 60% aller Patienten nachweisbar ist. Infektionen sind bei Patienten mit B-CLL ein häufiger Grund für Morbidität und Mortalität [18, 21, 50, 66, 97]. Die Pathogenese der Hypogammaglobulinämie ist noch nicht eindeutig geklärt.

B-CLL-Zellen fehlt die Fähigkeit, effizient Antigene präsentieren zu können, weil ihnen T-Zell-co-stimulierende Moleküle auf ihrer Zelloberfläche fehlen. Dieser Mangel des co-stimulierenden Signals kann die fehlende T-Zell-Antwort auf die Tumor-Antigene auf den B-CLL-Zellen erklären [29, 60, 85].

Bei fehlender T-Zell-Kontrolle können maligne B-Zellen Selbst-Antigene präsentieren und normale B-Zellen zur Produktion von polyklonalen Autoantikörpern anregen. Die korrespondierenden Antigene befinden sich auf Blutzellen und auf diesem Wege kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen. Dies führt bei der B-CLL im Gegensatz zu anderen B-Zelltumoren zur Entwicklung eines Immundefekts und einer Autoimmunerkrankung. Zehn bis 25% aller Patienten mit B-CLL entwickeln eine autoimmunologisch bedingte Anämie während ihres Krankheitsverlaufs [9, 16, 100].

Beim Auftreten der Erkrankung haben etwa 10-15% der Patienten keine Beschwerden. Bei etwa 60% der Patienten schreitet die Erkrankung nur langsam fort. Mit einer Behandlung wird dann begonnen, wenn erste Symptome auftreten. Fünfundzwanzig Prozent der Patienten zeigen einen rasch fortschreitenden Verlauf. Die Entscheidung über den Therapiebeginn muß individuell getroffen werden. Die Erkrankung ist bei einigen Patienten nicht behandlungspflichtig („smoldering leukemia“).

Durch die simultane Färbung der Leukozyten mit dem Oberflächen-B-Zellmarker CD 19, mit den Leichtketten Lambda bzw. Kappa und CD 5, lassen sich durch den durchflußzytometrischen Nachweis von CD 19/CD 5 und CD 19/Kappa bzw. Lambda doppelt positiven B-Zellen selbst minimale Residuen der Krankheit mit dieser Methode nachweisen [5, 58, 72, 88].

Die Analyse der Verteilung von Oberflächenimmunglobulinen der Leichtkettenklasse durch die Durchflußzytometrie ergibt wichtige Aussagen über die Verteilung von B-Lymphozyten, und so kann eine Population von weniger als 2% zirkulierender monoklonaler B-Zellen bei Patienten mit lymphoproliferativen Krankheiten nachgewiesen werden [56].

1.3.1. Therapie

Es gilt heute, dank verschiedener Therapiemöglichkeiten, einen individuellen Behandlungsplan zu entwickeln:

- reine Beobachtung ohne Therapie („watch & wait“)
- konventionelle Chemotherapie (z. B. Chlorambucil, Fludarabin)
- Hochdosischemotherapie (mit autologer oder allogener Stammzell-Transplantation)
- Immuntherapie (z. B. monoklonale Antikörper gegen das CD 20-Antigen bzw. das CD 52-Antigen)
- oder eine Kombination der genannten Optionen

Die Abwägung zwischen den therapeutischen Möglichkeiten erfolgt derzeit anhand verschiedener Kriterien:

- Alter und Komorbidität
- Stadium der Erkrankung
- Krankheitsaktivität (Progression, Vorhandensein ungünstiger Prognosefaktoren)

Der experimentelle Ansatz des Stellenwertes einer zellulären Therapie (allogene Stammzelltransplantation bzw. Knochenmarktransplantation) wird derzeit überprüft. Aufgrund ihrer hohen Toxizitätsraten wird diese Therapieoption nur bei ausgesuchten Patienten eingesetzt [15, 41, 65, 73].

Die Einstufung der B-CLL nach Schweregraden wird hauptsächlich für die Behandlungsplanung benutzt. Die am häufigsten benutzten Einstufungssysteme sind das Rai- und das Binet-System, vor allem weil sie einfach zu handhaben sind. Diese beiden Stadieneinteilungen unterscheiden drei wesentliche prognostische Untergruppen mit unterschiedlichem Überleben. In jeder Stufe ist die Behandlungsstrategie unterschiedlich für einen Krankheitsverlauf, der noch nicht auf eine Behandlung angesprochen hat (refraktärer Krankheitsverlauf), als für neu diagnostizierte und unbehandelte Krankheit [12, 13, 77, 78].

Die in Europa populärere Stadieneinteilung Einstufung der CLL nach Binet gegenüber der in den USA populäreren Einteilung nach Rai, ist folgendermaßen definiert:

Klinisches Stadium A – Die roten Blutzellen und Plättchen liegen im Normbereich und es gibt weniger als drei vergrößerte, der Palpation zugängliche lymphatische Regionen (zervikale, axilläre und inguinale Lymphknoten, Leber, Milz).

Klinisches Stadium B – Die roten Blutzellen und Plättchen liegen im Normbereich und es gibt drei oder mehr vergrößerte, der Palpation zugängliche lymphatische Regionen, die lymphoid involviert sind.

Klinisches Stadium C – Die roten Blutzellen liegen unter dem Normbereich (Anämie) und/oder die Plättchen liegen unter dem Normbereich (Thrombozytopenie), unabhängig von der Anzahl vergrößerter lymphatischer Regionen.

Kapitel 2

2.1 Patienten, Material und Methoden

Nach ausführlicher Aufklärung und Einverständniserklärung wurde 10 Patienten (5 Männer und 5 Frauen, medianes Alter 65 Jahre, 55-75 Jahre), die an einer B-CLL gemäß der Kiel-Klassifikation [55] erkrankt waren, venöses Blut (100 ml) entnommen.

Die Diagnose wurde durch die Untersuchung von Lymphknotenbiopsien (falls vergrößerte Lymphknoten vorhanden waren), Blutaussstrichen und Nachweis der Leichtkettenrestriktion mit Hilfe der APAAP-Methode und mit Hilfe der multiparametrischen Durchflußzytometrie (CD 19/CD 5 doppelt positive B-Zellen) gestellt [83]. Alle Patienten waren unbehandelt und befanden sich in einem stabilen Krankheitsstadium des Stadium Binet A.

Um den „klonalen Exzess“ der Leichtkettenrestriktion nachzuweisen, wurde die Analyse der abnormen B-Lymphozyten mit verschiedenen Klonen für CD 45 und CD 19 (Nachweis der B-Lymphozyten) bzw. die unterschiedlichen polyklonalen AK für die Immunglobuline („klonaler Exzess“ der B-Lymphozyten) durchgeführt (Tabelle 1). Die Probenpräparation wurde exakt nach den Herstellervorgaben durchgeführt.

Tabelle 1. Antikörper-Panel für die Analyse des „klonalen Exzeß“ in leukämischen peripheren Blutproben von Patienten mit B-CLL

Code	Probe A (BD)	Probe B (IQP)	Probe C (Coulter)	Probe D (DAKO)	Probe E (Immuno-tech)
1	Autofluoreszenz	Autofluoreszenz	Autofluoreszenz	Autofluoreszenz	Autofluoreszenz
2	Isotypen	Isotypen	Isotypen	Isotypen	Isotypen
3	CD 45-FITC/ CD 14-PE	CD 45-FITC/ CD 14-PE	CD 45-FITC/ CD 14-PE	CD 45-FITC/ CD 14-PE	CD 45-FITC/ CD 14-PE
4	Kappa-FITC/ CD 19-PE	Kappa-FITC/ CD 19-PE	CD 19-FITC/ Kappa-PE	Kappa-FITC/ CD 19-PE	Kappa-FITC/ CD 19-PE
5	N.D.	N.D.	N.D.	IgM-FITC/ CD 19-PE	N.D.

2.2 Durchflußzytometrie

Alle Blutproben wurden am Tag 0 direkt nach Probenentnahme aufgearbeitet und zur gleichen Zeit morgens (09.00 Uhr) am Tag 1, 2 und 3 gemessen. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Listmode Dateien wurden mittels der CellQuest Software (Becton Dickinson) erstellt.

Die zellulären Vorwärts- (FSC) und Seitwärts- (SSC) Detektorsignale sowie die Fluoreszenz der an den Zellmembranen gebundenen FITC- und PE-gebundenen Antikörper wurden untersucht, indem die Zellen in dem Fokusstrahl eines 15mW luftgekühlten Argon-Ionen-Lasers im Probengang des Durchflußzytometers illuminiert wurden. Die Instrumenteneinstellung wurde täglich mit Hilfe von fluoreszierenden Referenz-Kügelchen (FCSC, Research Triangle Park, USA) kontrolliert.

Die Kontrolle der Instrumenteneinstellung für Intensität und Farben-Kompensation erfolgte dreifach:

1. durch Einsatz der AUTOcomp Software (Becton Dickinson);
2. durch Zweifach-Färbung von peripherem Blut gesunder Personen mittels CD 4 (SK3)-FITC / CD 8 (SK1)-PE (Becton Dickinson) und schließlich
3. durch standardisierte Fluoreszenz-Partikel (FluoroSpheres, DAKO Diagnostika, Hamburg).

Die Fluoreszenz wurde in einem Frequenzbereich zwischen 512-547 nm und 572-591 nm in den FITC- und PE-Fluoreszenz-Kanälen gemessen. Die Fluoreszenzkomensation wurde durch Hardwareschaltkreise justiert. Die Verstärkung für die FSC- und SSC-Signale wurde linear aufgezeichnet, wohingegen die Fluoreszenzsignale mittels vier-Dekaden-Logarithmus verstärkt wurden.

Alle Daten wurden in List-Mode-Dateien gespeichert und auf MS-DOS-kompatible Datenträger gespeichert. Diese quantitativen Messdaten bestehen aus Fluoreszenzintensitäts-Werten (linearen Werten oder Kanal-Nummern). Um diese Fluoreszenzintensitäts-Werte quantifizieren zu können, müssen die Daten in kalibrierte MESF-Werte (Mean Equivalents of Soluble Fluorochrome) oder ABC-Werte (Antibody-Binding Capacity) transformiert werden. MESF-Werte werden durch einen Vergleich von Fluoreszenzintensitäts-Signalen einer Lösung von Mikro-Kügelchen gegen eine Lösung des gleichen Fluorochroms ermittelt. Die Anzahl der Bindungsstellen der eingesetzten Mikro-Kügelchen ist genau definiert. Um das Durchflußzytometer zu kalibrieren, werden die Messwerte jeder einzelnen Population von Mikrokügelchen gegen ihre MESF-Werte aufgetragen. Diese MESF-Werte werden von den Herstellern der jeweiligen Kalibrierungs-Kits mitgeliefert. Auf diese Weise kann man die Sensitivität des Durchflußzytometers bestimmen. Die MESF-Werte sagen also etwas über die Intensität („Helligkeit“) des Meßsignals der Probe im Vergleich zu einem Standard aus, nicht jedoch über die aktuelle Anzahl der Fluorochrom-Moleküle auf der Zelle. Es

besteht allerdings eine direkte Abhängigkeit zwischen dem MESF-Wert einer Zellpopulation und der Anzahl der gebundenen Antikörper.

Die Anzahl der gebundenen Antikörper kann folgendermaßen ermittelt werden: der MESF-Wert pro Antikörper wird durch den MESF-Wert der Zellen geteilt. Dann teilt man den ermittelten MESF-Wert durch die Anzahl der Bindungsstellen auf dem Mikro-Kügelchen. Der MESF-Wert ist also definiert als die „effektive Fluoreszenz zu Protein Relation“.

Um die Messwerte der Proben zu quantifizieren, werden diese mittels eines speziellen Softwareprogrammes (TallyCal[®], DAKO A/S, Dänemark) in entsprechende MESF-Werte umgerechnet [86].

Bei TallyCal[®] handelt es sich um eine Software für Microsoft Windows[®] zur Off-line Datenanalyse für Kalibrierung und Quantifizierung aller gängigen Durchflußzytometriesysteme. Das Programm ist in Verbindung mit Fluorochrom- oder Antikörper-beladenen Kalibrierungs-Kügelchen („beads“) für die Kalibrierung der Fluoreszenz-Kanäle und die Überwachung der Leistung des Durchflußzytometers bestimmt. Es präsentiert außerdem die durchflußzytometrisch erfaßten Immunfluoreszenz-Daten in absoluten Werten, z.B. MESF oder Antikörper-Bindungskapazität (ABC), welche mit der Antigen-Dichte korrelieren.

2.3 Präparation der Leukozyten mittels Ficoll-Hypaque - Dichtegradientenzentrifugation

Die leukämischen Zellen wurden in der Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation angereichert [64]. Die Proben wurden mit PBS in einem Verhältnis von 1:2 bei Raumtemperatur verdünnt.

20 ml der verdünnten Blutprobe wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon tube Blue Max, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) umgefüllt und mit 20 ml FH-Lösung (Ficoll-Hypaque Pharmacia; Biotechnology International AB, Uppsala, Sweden) unterschichtet. Nachdem die Spitze einer Pipette, die die Ficoll-Lösung enthielt, am Boden des Zentrifugenröhrchen positioniert worden war, wurde der hochdichte FH eingefüllt, wobei er durch die Schwerkraft an den Boden des Röhrchens sinkt. Wenn der Flüssigkeitsstand des FH in der Pipette die Oberfläche des Blutes erreicht hatte, wurde die Pipette langsam und vorsichtig hochgezogen, bis die Spitze die Trennlinie der beiden Flüssigkeiten erreichte. Dann wurde die Pipette langsam aus dem Röhrchen entfernt, wobei sie oben mit einem Finger verschlossen gehalten wurde, um ein Nachlaufen des FH zu verhindern.

Das Zentrifugenröhrchen wurde bei annähernd 800g für 25 Minuten bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurden alle mononukleären Zellen, die sich nun an der Trennlinie der beiden übereinandergeschichteten Flüssigkeiten befanden, vorsichtig entfernt, in einem frischen Zentrifugenröhrchen gesammelt, in 15 ml PBS resuspendiert und ein weiteres Mal bei 800g für 10 Minuten bei RT mit Bremse zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einer Pasteur-Pipette entfernt, in PBS resuspendiert und zweimal in der Zentrifuge erst bei 300 und dann bei 500g für 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Nach erneuter Resuspendierung wurden die Zellen gezählt (Hoechst Technicon H3, Frankfurt, Deutschland) und auf eine Konzentration von 5×10^3 Zellen/ μ l in PBS eingestellt. Die Zellvitalität wurde durch Anfärbung der Zellen mit Trypan Blau (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) untersucht.

2.4 Blockade zytophiler Immunglobulin-Bindungen an Lymphozyten

Im Blut befindet sich zytophiles Immunglobulin, welches an den Fc-Rezeptor auf der Zelloberfläche von Lymphozyten (besonders NK-Zellen) gebunden werden kann. Diese Immunglobuline besitzen sowohl Kappa als auch Lambda-Leichtketten. Die für die Analyse eingesetzten Kappa/Lambda Antikörper können sich an diese Immunglobuline binden und diese dann anfärben. Dies verursacht insofern Probleme, daß diese Zellen als falsch positiv gefärbte Population im Fluoreszenz-Plot erscheinen und damit die Analyseergebnisse verfälschen würden. Durch die Präparation der Probe mit diesem Verfahren wird diese Art der falsch-positiven Färbung unterdrückt [1, 34].

1. Venöses Blut wird in ein Sammelröhrchen gegeben.
Das Plasma wird durch Zentrifugation entfernt und die verbleibenden Zellen werden in ein sauberes 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben.
2. Das Röhrchen wird bei Raumtemperatur mit 2 ml PBS+0,1% NaN₃ versetzt, die Zellen werden gemischt und bei 300g 7-10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen.
3. Dieser Waschvorgang wird 3 x nach Punkt 2 wiederholt, es wird jedoch lediglich bei 200-250g zentrifugiert.
4. Das Zellpellet wird in PBS+0,1% NaN₃-haltigem, raumwarmen PBS aufgenommen, gut gemixt und die Zellvitalität mit Hilfe von Ethidiumbromid überprüft. Über 90% der Zellen sollten noch vital sein. Die Zellkonzentration wird bestimmt.
5. Die Zellen werden 5 Minuten bei 200-250g zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt und verworfen.

6. Das Pellpellet wird in NaN_3 -haltigem PBS, welches normales Kaninchenserum enthält, aufgenommen (die empfohlene Konzentration beträgt 1:5 – 1:10), die Zellen werden bis zu einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml resuspendiert.
7. Die Zellen werden für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.
8. Die Zellen werden aus dem Wasserbad entfernt, gut gemixt und 1×10^6 Zellen auf jedes Teströhrchen verteilt.
9. Es wird auf Eis für 30 Minuten inkubiert.
10. Mit kaltem 0,1% NaN_3 -haltigem PBS waschen und 5 Minuten bei 4°C bei 250g zentrifugieren, den Überstand absaugen und verwerfen, das Waschen wiederholen.
11. Die Zellen werden bei $2-8^\circ\text{C}$ im Dunkeln bis zur Analyse gelagert.

2.5 Ansatz Probe „A“ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Die Probe „A“ wurde nur mit Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Die Blockade der zytophilen Immunglobulin-Bindungen der Lymphozyten wurde nach den Vorschriften des „Monoclonal Antibodies Source Book“ (Becton Dickinson, Monoclonal Antibodies Source Book, 1/89, Source Book Section 2.15) durchgeführt.

2.5.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „A“

1. 100 µl Probe (WBC: $1 \times 10^5/\mu\text{l}$) werden zu 20 µl PE-konjugiertem Antikörper und 20 µl FITC-konjugiertem Antikörper zugefügt.
2. Die Probe wird bei langsamer Geschwindigkeit gemixt.
3. Inkubieren der Probe für 30 Minuten unter Lichtausschluß auf Eis.
4. Zufügen von 2 ml kaltem PBS (Azid) zu jedem Röhrchen.
5. Zentrifugieren bei 300g für 5 Minuten mit eingeschalteter Bremse.
6. Absaugen des Überstandes, so daß annähernd 50 µl Flüssigkeitsspiegel zurückgelassen werden, ohne dabei das Zellpellet zu zerstören.
7. Resuspendieren des Zellpellets in 500 µl PBS, welchem 1% Paraformaldehyd zugesetzt sind.
8. Bei 2-8°C bis Analysenbeginn lagern.

2.5.2 Antikörperpanel Probe „A“ (BD)

1. Autofluoreszenz
2. IgG₁ (Maus) – FITC / IgG₂ (Maus) – PE
3. CD 45 (IgG₁, 2D1) – FITC / CD 14 (IgG_{2b}, MøP9) – PE
4. Kappa (IgG, Maus, polyklonal, F_{(ab')₂}) – FITC / CD 19 (IgG₁, 4G7) - PE
5. Lambda (IgG, Maus, polyklonal, F_{(ab')₂}) – FITC / CD 19 (IgG₁, 4G7) – PE

2.6 Ansatz Probe „B“ (Immuno Quality Products (IQP), Bad Nauheim, Deutschland)

Peripheres Blut wurde für Probe „B“ mit beiden Methoden – Vollblutlyse und Dichtegradientenzentrifugation – analysiert

2.6.1 Protokoll der Probenvorbereitung für Probe „B“

1. Zufügen von 100 µl (WBC: $1 \times 10^4 / \mu\text{l}$) Probe zu 3 ml Reagenzröhrchen.
2. Zu jedem Röhrchen 10 µl der FITC- und PE-konjugierten Antikörper zuzufügen.
3. Mixen der Röhrchen, um Antikörper und Zellen sicher zu vermischen.
4. Röhrchen für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
5. Verdünnen der FACS-BRAND Lyselösung (BD) auf 1:10 mit demineralisiertem Wasser und Zufügen von 2 ml dieser Lösung zu den einzelnen Röhrchen.
6. Inkubieren der Röhrchen für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
7. Abzentrifugieren der Zellsuspension (2 Minuten bei 300g), Überstand verwerfen und Zufügen von 3 ml PBS, welches 0,001% Heparin enthält, Überführen der Zellen in Zentrifugenröhrchen zur durchflußzytometrischen Analyse.

2.6.2 Antikörperpanel Probe „B“ (IQP)

1. Autofluoreszenz
2. IgG (Maus – FITC / IgG₂ (Maus) – PE
3. IgG (Maus – FITC / IgM (Maus) – PE
4. CD 45 (IgG₁, ML2) – FITC / CD 14 (IgG_{2a}, UCHM1) – PE
5. CD 19 (IgG₁, B-C3) – FITC / Kappa (IgG, Kaninchen, polyklonal, F_{(ab')₂}) – PE
6. CD 19 (IgG₁, B-C3) – FITC / Lambda (IgG, Ziege, polyklonal, F_{(ab')₂}) – PE

2.7 Ansatz Probe „C“ (Coulter, Krefeld, Deutschland)

Peripheres Blut wurde nur nach Dichtegradientenzentrifugation analysiert

2.7.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „C“

1. Überführen von $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ mononukleärer Zellen in ein Röhrchen und Zentrifugieren bei 2-8°C (400-450g) für 4 Minuten und Verwerfen des Überstandes.
2. Zufügen von 200 μl Antikörper in das Röhrchen und Inkubieren bei 2-8°C für 30-35 Minuten.
3. Resuspendieren in 1 ml PBS und dreimaliges Waschen bei 2-8°C für 4 Minuten. Überstand verwerfen und Zellpellet gründlich mixen.
4. Resuspendieren der Zellen in 1 ml PBS und Überführen der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen zur durchflußzytometrischen Analyse.

2.7.2 Antikörperpanel Probe „C“ (Coulter)

1. Autofluoreszenz
2. IgG₁ (Maus) – FITC / IgG₂ (Maus) – PE
3. IgG₁ (Ziege) – FITC / IgG₂ (Maus) – PE
4. CD 45 (IgG₁, IMMU 19.2) – FITC / CD 14 (IgG_{2a}, RMO 52) – PE
5. Kappa (IgG, Ziege, polyklonal, F_{(ab')₂}) – FITC / CD 19 (IgG₁, J4.119) – PE
6. Lambda (IgG, Ziege, polyklonal, F_{(ab')₂}) – FITC / CD 19 (IgG₁, J4.119) – PE

2.8. Ansatz Probe „D“ (DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland)

Peripheres Blut wurde für Probe „D“ mit beiden Methoden – Vollblutlyse und Dichtegradientenzentrifugation – analysiert

2.8.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „D“

Direkte Immunfluoreszenzfärbung der Zelloberfläche mittels isolierter mononukleärer Zellen:

1. Isolieren und Waschen mononukleärer Zellen und Einstellen der Zellkonzentration auf annähernd 10×10^6 / ml.
2. Jedes Teströhrchen mit 10 µl des jeweiligen Antikörpers füllen und Zufügen von 100 µl Zellsuspension, welche bis zu 1×10^6 Zellen enthalten darf, gründliches Mixen der Lösung.
3. Inkubieren im Dunkeln bei 4°C für 30 Minuten.
4. Zweimal mit 2% Rinderserumalbumin enthaltenem PBS waschen.
5. Resuspendieren der Zellen in einer für Durchflußzytometrie geeigneten Flüssigkeit.
6. Fixation kann vollzogen werden.
7. Analyse im Durchflußzytometer.

Direkte Immunfluoreszenzfärbung der Zelloberflächenantigene mittels der Vollblutlyse:

1. Sammeln von venösem Blut in ein Röhrchen, welches ein Antikoagulanz enthält.
2. 50 µl antikoaguliertes Blut in Probenröhrchen überführen.
3. 2 ml 0,01M PBS, pH 7,4 hinzufügen, gründlich mixen.
4. 5 Minuten bei 300 g zentrifugieren, dann Überstand absaugen, wobei ca. 50 µl Flüssigkeit übrig bleiben sollte.
5. Wiederhole Punkt 3. und 4. weitere 2 Male.
6. Zufügen von 10µl Kaninchenserum für Blockade, gründlich mixen und im Dunkeln bei 37°C für 30 Minuten inkubieren.
7. 10 µl konjugierten Antikörper hinzufügen und gründlich mixen.
8. Ein Fluorochrom-negatives Kontrollreagens sollte zu jedem separaten Probenröhrchen zugefügt werden.
9. Bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubieren.
10. 1-2 ml Erythrozyten - Lyseagens (Ortho – Lyse, Ortho, Deutschland) zu jedem Röhrchen geben und gründlich mixen.
11. Bei 300g für 5 Minuten zentrifugieren.
12. Überstand absaugen und ca. 50 µl Flüssigkeit im Röhrchen übrig lassen.
13. 2 ml 0,01M PBS, pH 7,4, hinzufügen und gründlich mixen.
14. Punkte 11. und 12. einmal wiederholen.
15. Zellpellet in einer für die Durchflußzytometrie geeigneten Flüssigkeit resuspendieren; z.B. 0,3 ml 1%iges Paraformaldehyd (Fixiermittel) in 0,01M PBS, pH 4,7.

2.8.2. Antikörperpanel Probe „D“ (DAKO)

1. Autofluoreszenz
2. IgG₁ (Maus) – FITC / IgG_{2a} (Maus) – PE
3. IgG (Kaninchen, F_{(ab')2}) – FITC / Ig₁ (Maus) - PE
4. CD 45 (IgG₁, T29/33) – FITC / CD 14 (IgG_{2a}, TÜK 4) - PE
5. Kappa (IgG₁, Kaninchen, polyklonal, F_{(ab')2}) – FITC / CD 19 (IgG₁, HD 37) – PE
6. Lambda (IgG₁, Kaninchen, polyklonal, F_{(ab')2}) – FITC / CD 19 (IgG₁, HD 37) – PE
7. IgM (polyklonal, F_{(ab')2}) – FITC / CD 19 – PE

2.9. Ansatz Probe „E“ (Immunotech, Hamburg, Deutschland)

Peripheres Blut wurde sowohl nach Vollblutlyse und Dichtegradientenzentrifugation analysiert.

2.9.1 Protokoll der Probenvorbereitung Probe „E“

Direktes Färben mit der WBL-Methode:

1. Blut in Antikoagulanzen sammeln.
2. Leukozytenzahl bestimmen und, wenn notwendig, das Blut in einer isotonischen Lösung auf eine Konzentration von annähernd 5×10^6 Leukozyten/ml einstellen.
3. 100 µl des gut gemixten (oder verdünnten) Blutes in Probenröhrchen pipettieren.
4. 3 ml Salinelösung zufügen und vortexen.
5. Für 3 Minuten bei 400g zentrifugieren und den klaren Überstand verwerfen.
6. 2 ml der Lyselösung (Ortho – Lyse) zufügen, sofort mixen und die Zellen in der Lyselösung 10 Minuten inkubieren. Keine Fixierung nach der Lyse zugeben.

7. 3 Minuten bei 400g zentrifugieren, Überstand verwerfen und Zellen in 3 ml PBS resuspendieren.
8. Punkt 5. wiederholen und Zellen in 100 µl PBS resuspendieren.
9. 20 µl von jeder Antikörper-Lösung zu den Röhrcchen geben und sorgfältig mixen.
10. Die Zellen 15 Minuten bei 2-8°C inkubieren.
11. 2 ml PBS in jedes Röhrcchen zufügen.
12. Bei 400g zentrifugieren und die Zellen in 100 bis 500 µl PBS resuspendieren.
13. Bis zur Analyse bei 2-8°C in Dunkelheit aufbewahren.

Färben des peripheren Blutes, welches bei Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurde:

1. Zellsuspension auf annähernd 2×10^6 Zellen/ml einstellen.
2. 100 µl der Zellsuspension in die Probenröhrcchen pipettieren.
3. 20 µl Antikörperlösung zufügen und in das Kontrollröhrcchen 20 µl PBS pipettieren.
4. Für 15 Minuten bei 2-8°C in Dunkelheit inkubieren.
5. Zweimal mit PBS waschen.
6. Zellen in 100 bis 500 µl PBS resuspendieren.

2.9.2 Antikörperpanel Probe „E“ (Immunotech)

1. Autofluoreszenz
2. CD 45 (IgG₁, IMMU 19.2) – FITC / CD 14 (IgG₁, RMO52) – PE
3. Kappa (IgG, Ziege, polyklonal, F_{(ab)²}) – FITC / CD 19 (IgG₁, J4.119) – PE
4. Lambda (IgG, Ziege, polyklonal, F_{(ab)²}) – FITC / CD 19 (IgG₁, J4.119) – PE

2.10 Blutaufbewahrung

Für jede der beiden Präparationsmethoden (Dichtegradientenzentrifugation & Vollblutlyse) wurden jeweils 100 ml heparinisiertes Vollblut am Tag 0 abgenommen. Jeweils 10 ml hiervon wurden direkt am selben Tag mit den oben angegebenen Antikörperpanels analysiert. Das übrige Blut wurde unter drei verschiedenen Bedingungen aufbewahrt:

1. Je 30 ml wurden bei Raumtemperatur von 24°C aufbewahrt, was als normaler Transport-Umstand definiert wurde,
2. je 30 ml wurden bei höherer Temperatur von 30°C aufbewahrt, was im weiteren als sommerlicher Transport-Umstand definiert wurde,
3. und je 30 ml wurden bei tiefer Temperatur von 4°C aufbewahrt, was als winterlicher Transport-Umstand definiert wurde.

An Tag 0, 1, 2 und 3 wurden jeweils 10 ml der drei bei den unterschiedlichen Temperaturbedingungen aufbewahrten Proben zur gleichen Zeit morgens (09.00 Uhr) untersucht, daher wurden pro Präparationsmethode je 100 ml Probenmaterial benötigt, um 10 ml Blut jeden Tag zu analysieren.

Kapitel 3

3.1 Statistische Analyse

Für jede Probe, die sich als positiv für CD 45, CD 19, Kappa und IgM darstellte, wurden die MESF-Werte mit Hilfe der TallyCal-Software bestimmt. Alle MESF-Werte wurden dann korrigiert, indem die Werte für den Autofluoreszenz-Hintergrund abgezogen wurden. Die Mittelwerte dieser so errechneten Werte sowie die Standardabweichung (SD) wurden mittels der GraphPad Prism[®] Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) errechnet. Der Student t-Test wurde angewandt, um zu unterscheiden, ob die so erhaltenen Durchschnittswerte signifikant höher als der Autofluoreszenz Hintergrund ($p < 0,005$) waren.

Die Resultate dieser experimentell erhaltenen Werte wurden im folgenden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Signifikanzberechnung wurde mittels ANOVA durchgeführt.

3.2. Ergebnisse

Die Leichtkettenrestriktion Kappa wurde bei allen Patienten korrekt durch die Cell Quest Analyse diagnostiziert, unabhängig von der Präparations-technik mittels Dichtegradientenzentrifugation oder Vollblutlyse. Generell war der Parameter „Antigenintensität“, ausgedrückt in MESF-Werten, bei den Proben, die mit der Technik der Dichtegradientenzentrifugation präpariert worden waren, im Vergleich zu den mit der Technik der Vollblutlyse präparierten Proben, höher. Die bekannte Verminderung der Zellzahl, die durch die Präparationsmethode der Dichtegradientenzentrifugation auftritt, war für die Feststellung der Leichtkettenrestriktion irrelevant.

Die Isotypen Messungen wurden nicht ausgedruckt (die Daten werden hier nicht präsentiert), aber die IgG₂-Bindung wurde durch Dichtegradienten-

zentrifugation erhöht, besonders wenn PE-konjugierte Antikörper eingesetzt wurden.

3.2.1 Fluoreszenzintensität an Tag 0 für CD 19, CD 45, Kappa und Lambda - Antikörper

Folgende Systematik wird für die Bezeichnung der Proben verwendet:

Der erste Buchstabe bezeichnet den bereits in Tabelle 1 angegebenen Code für den Hersteller. Die Zusätze „D“ oder „V“ bezeichnen die Präparationsmethoden: D = Dichtegradientenzentrifugation oder V= Vollblutlyse.

Zuerst wurde das CD 19 Antigen als pan-B-Zell-Antigen für alle Antikörper untersucht. Unter Berücksichtigung der FITC und PE-Fluorochrome gab es verschiedene Ergebnisse: am Tag 0 zeigte die FITC-Konjugation niedrigere (C-D (FITC)) als auch höhere (A-D (FITC)) MESF-Werte als mit den PE-konjugierten Antikörpern (D-D (PE)). Für Details siehe Tabelle 2. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0,005$).

Das CD 45-Antigen, als allgemeines Leukozyten-Antigen, wurde nur für die FITC-Konjugation untersucht. Es gab statistisch signifikante Unterschiede der MESF-Einheiten für A-D, D-D, D-V, E-D und E-V-Präparationen verglichen mit den B-D und B-V-Werten ($p < 0,005$). Für Details siehe Tabelle 3.

Kappa Leichtketten sowie Lambda-Leichtketten (Daten nicht gezeigt) zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der MESF-Werte für die untersuchten Antikörper. Nochmals zeigten sich am Tag 0 sowohl niedrigere (B-D, B-V, E-D, E-V) als auch höhere (A-D, C-D) MESF-Werte, verglichen mit den PE-konjugierten Antikörpern (D-D, D-V). Für Details siehe Tabelle 4.

Die Untersuchung des Oberflächen-IgM wurde nur für den Antikörper eines Herstellers durchgeführt, und hier konnten keine Unterschiede zwischen den Präparationsmethoden entdeckt werden.

3.2.2 Untersuchung der Fluoreszenzintensität für CD 19, CD 45, Kappa, IgM auf Effekte bei Lagerung bei 24°C im Vergleich zu den MESF-Werten am Tag 0.

Für das bei 24°C gelagerte CD 19 Antigen (Abb. 3) wurden signifikante Unterschiede seit Tag 1 ($p < 0,005$) gefunden. Ohne Rücksicht auf die benutzten Antikörper gab es für 2 Tage eine stabile Antigenexpression mit einer leichten Verringerung. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Fluorochrom-Konjugation. Für Details siehe Tabelle 2.

Ein ähnliches Muster konnte für das CD 45 Antigen beobachtet werden (Abb. 6), welches signifikante Unterschiede, z.B. einen Abfall der CD 45 Antigen-Intensität, von Tag 1 an für A-D und E-V ($p < 0,005$) zeigte. Die übrigen untersuchten Antikörper zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu Tag 0. Für Details siehe Tabelle 3.

Die Analyse der Kappa-Leichtketten (Abb. 9) zeigte eine signifikante Minderung der MESF-Werte für die Hälfte der am Tag 1 benutzten Antikörper (ausgenommen C-D, D-D, E-D, E-V). Ab Tag 2 wurde ein Abfall der Kappa MESF-Werte für alle Antikörper beobachtet ($p < 0,005$), unabhängig von der Fluorochrom-Konjugation. Für Details siehe Tabelle 4.

Die IgM-Intensität (Abb. 12) war sowohl nach Vollblutlyse als auch nach Dichtegradientenzentrifugation vermindert am Tag 1.

3.2.4 Untersuchung der Fluoreszenz Intensität für CD 19, CD 45, Kappa und IgM bei Lagerung bei 30°C bezüglich der MESF-Werte verglichen mit Tag 0.

Für alle benutzten CD 19 (Abb. 4), CD 45 (Abb. 7) und IgM (Abb. 13) Antikörper wurde ein starker Abfall der MESF-Werte seit Tag 1 gefunden ($p < 0,005$). Für Details siehe Tabelle 2, 3 und 5.

Für die Analyse der Kappa-Leichtkette (Abb. 10) wurde ebenfalls eine Erniedrigung gefunden ($p < 0,005$), und am Tag 3 war es sehr schwierig, für einige Proben zwischen Autofluoreszenz und Mittelwert der Fluoreszenz zu unterscheiden. Für Details siehe Tabelle 4.

3.2.5 Untersuchung der Fluoreszenzintensität für CD 19, CD 45, Kappa und IgM bei Lagerung bei 4°C bezüglich der MESF-Werte verglichen mit Tag 0.

Es gab keine signifikanten Unterschiede der MESF-Werte für CD 19 (Abb. 2) und CD 45 (Abb. 5). Die Kappa-Leichtkette (Abb. 8) und SIgM (Abb. 11) zeigten einen leichten Abfall seit Tag 2. Für Details siehe Tabelle 2-5.

Kapitel 4

4.1 Tabellen

Tabelle 2. Fluoreszenzintensitäten in MESF-Werten (Mittelwert \pm Standardabweichung) verschiedener CD 19-Klone für Tag 0 bis 3, bei 24°C (RT), 30°C (Sommer) und 4°C (Winter), präpariert mit Vollblutlyse (V) oder Dichtegradientenzentrifugation (D), (n=10). Getestet mit ANOVA

CD 19	A-D (PE)	B-D (PE)	B-V (PE)	C-D (FITC)	D-D (PE)	D-V (PE)	E-D (PE)	E-V (PE)
Tag 0	12716 \pm 5892	6929 \pm 3244	5546 \pm 2697	3820 \pm 2547	10679 \pm 5107	9151 \pm 5389	4364 \pm 2740	4488 \pm 2876

24°C	A-D (PE)	B-D (PE)	B-V (PE)	C-D (FITC)	D-D (PE)	D-V (PE)	E-D (PE)	E-V (PE)
Tag 1	8502 \pm 3773*	5849 \pm 2776*	4051 \pm 2088*	4084 \pm 2135	6291 \pm 3727*	6196 \pm 3790*	3558 \pm 2812*	3105 \pm 2181*
Tag 2	8522 \pm 4218*	5050 \pm 2343*	3112 \pm 1500*	3344 \pm 2166*	7248 \pm 3842	5426 \pm 3008*	4102 \pm 3099	3532 \pm 2964*
Tag 3	8565 \pm 3561*	5829 \pm 2609*	3308 \pm 1541*	3004 \pm 1951*	7521 \pm 3501	5398 \pm 2526	3992 \pm 3807	2647 \pm 1286

30°C	A-D (PE)	B-D (PE)	B-V (PE)	C-D (FITC)	D-D (PE)	D-V (PE)	E-D (PE)	E-V (PE)
Tag 1	6157 \pm 2884*	4560 \pm 2162*	2697 \pm 1295*	4584 \pm 2705*	5056 \pm 2231*	3432 \pm 1449*	2863 \pm 1915*	2047 \pm 1178
Tag 2	5095 \pm 3096*	3274 \pm 1721*	1675 \pm 912*	2594 \pm 1661*	3441 \pm 2205*	3131 \pm 1183*	2864 \pm 2413*	2351 \pm 2432*
Tag 3	2721 \pm 1362*	2442 \pm 1229	1911 \pm 849*	2327 \pm 2210	2540 \pm 1309*	3433 \pm 1296*	2145 \pm 1958*	2197 \pm 2162*

4°C	A-D (PE)	B-D (PE)	B-V (PE)	C-D (FITC)	D-D (PE)	D-V (PE)	E-D (PE)	E-V (PE)
Tag 1	12736 \pm 5618	6605 \pm 3119	4857 \pm 2910	5232 \pm 2510	9147 \pm 4792	7932 \pm 3765*	4127 \pm 2568	3411 \pm 2325
Tag 2	11702 \pm 5022	6599 \pm 3007	5065 \pm 2180	4001 \pm 2357	9701 \pm 4664	8071 \pm 3878	4912 \pm 4082	4255 \pm 3813
Tag 3	11831 \pm 4429	6904 \pm 2135	5908 \pm 2418	3865 \pm 2455	10427 \pm 4122	7750 \pm 4126*	5581 \pm 4620	4834 \pm 4268

*p<0,005

Tabelle 3. Fluoreszenzintensitäten in MESF-Werten (Mittelwert \pm Standardabweichung) verschiedener CD 45-Klone für Tag 0 bis 3, bei 24°C (RT), 30°C (Sommer) und 4°C (Winter), präpariert mit Vollblutlyse (V) oder Dichtegradientenzentrifugation (D), (n=10). Getestet mit ANOVA

CD 45	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (FITC)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 0	18069 \pm 6117	45820 \pm 15474	38369 \pm 14243	32165 \pm 11632	23571 \pm 8243	20297 \pm 8190	20042 \pm 8627	20681 \pm 10899

24°C	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (FITC)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 1	16322 \pm 4828*	45028 \pm 12068*	41124 \pm 13184	39630 \pm 16447	26215 \pm 7550	22155 \pm 7000	21707 \pm 6166	17775 \pm 4360*
Tag 2	15184 \pm 4468*	40847 \pm 11700*	37173 \pm 10734	31361 \pm 10816	22414 \pm 8148	19623 \pm 6085	20044 \pm 7228	15484 \pm 7562*
Tag 3	16613 \pm 3565	41930 \pm 8970	40883 \pm 12409	35606 \pm 12275	23885 \pm 5908	20947 \pm 6867	21329 \pm 5695	14680 \pm 3030*

30°C	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (FITC)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 1	14026 \pm 5808*	38239 \pm 13372*	22148 \pm 12072*	28812 \pm 9987*	23505 \pm 8839	16826 \pm 7069*	19382 \pm 6547	16255 \pm 6240
Tag 2	13739 \pm 4325*	34824 \pm 9498*	19739 \pm 10047	27546 \pm 9235	18277 \pm 5949	15767 \pm 7822*	17108 \pm 4850	16537 \pm 7899
Tag 3	14625 \pm 4460	34606 \pm 6019	29249 \pm 12912*	30200 \pm 5899*	23185 \pm 9785	18714 \pm 7219*	19269 \pm 3702	20248 \pm 9482*

4°C	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (FITC)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 1	17860 \pm 5726	45648 \pm 13729	41124 \pm 13184	39158 \pm 12610	26269 \pm 9102	23009 \pm 6922	23969 \pm 6516	20217 \pm 6479
Tag 2	16939 \pm 5905	45097 \pm 16394	37137 \pm 10734*	37468 \pm 15896	24065 \pm 11520	21675 \pm 7426	21999 \pm 9657	17950 \pm 7889
Tag 3	17633 \pm 5207	46569 \pm 14067	40883 \pm 12409*	42728 \pm 16907	26310 \pm 8843	25796 \pm 8320	24243 \pm 8728	20014 \pm 9128

*p<0,005

Tabelle 4. Fluoreszenzintensitäten in MESF-Werten (Mittelwert \pm Standardabweichung) verschiedener F(ab')₂-Fragmente zur Analyse der Kappa-leichtketten für Tag 0 bis 3, bei 24°C (RT), 30°C (Sommer) und 4°C (Winter), präpariert mit Vollblutlyse (V) oder Dichtegradientenzentrifugation (D), (n=10). Getestet mit ANOVA.

Kappa	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (PE)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 0	4691 $\pm 1641^*$	1713 ± 1141	1082 ± 729	11809 ± 10076	2590 ± 2020	1162 ± 848	1584 ± 1183	1337 ± 1010

24°C	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (PE)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 1	2182 $\pm 1641^*$	1527 $\pm 887^*$	677 ± 286	10559 ± 8635	2262 ± 1593	814 $\pm 486^*$	1580 ± 1140	1055 $\pm 627^*$
Tag 2	1429 $\pm 947^*$	1204 $\pm 626^*$	711 $\pm 321^*$	6801 $\pm 5259^*$	1443 $\pm 894^*$	666 $\pm 363^*$	1043 $\pm 689^*$	886 $\pm 490^*$
Tag 3	490 $\pm 119^*$	615 $\pm 103^*$	375 $\pm 38^*$	1564 $\pm 530^*$	636 $\pm 136^*$	311 $\pm 40^*$	394 $\pm 99^*$	344 $\pm 68^*$

30°C	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (PE)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 1	1526 $\pm 1102^*$	1519 ± 868	971 $\pm 208^*$	7099 $\pm 5866^*$	1679 $\pm 1055^*$	586 $\pm 282^*$	1054 $\pm 798^*$	1893 ± 1816
Tag 2	301 ± 34	781 $\pm 347^*$	627 $\pm 190^*$	3446 $\pm 2662^*$	1345 $\pm 630^*$	608 $\pm 246^*$	572 $\pm 372^*$	498 $\pm 240^*$
Tag 3	392 $\pm 85^*$	470 $\pm 28^*$	459 $\pm 116^*$	1705 $\pm 631^*$	445 $\pm 97^*$	430 $\pm 48^*$	248 $\pm 34^*$	341 $\pm 42^*$

4°C	A-D (FITC)	B-D (FITC)	B-V (FITC)	C-D (PE)	D-D (FITC)	D-V (FITC)	E-D (FITC)	E-V (FITC)
Tag 1	2271 ± 1685	1868 ± 1131	871 $\pm 444^*$	10577 ± 8137	3154 ± 1705	961 $\pm 689^*$	1332 ± 975	1156 $\pm 729^*$
Tag 2	1826 $\pm 1334^*$	1479 $\pm 870^*$	850 $\pm 475^*$	8662 $\pm 6847^*$	1653 ± 1122	930 $\pm 605^*$	1086 $\pm 741^*$	973 $\pm 534^*$
Tag 3	559 $\pm 188^*$	1153 ± 144	366 $\pm 19^*$	1846 $\pm 637^*$	684 ± 197	350 $\pm 36^*$	567 $\pm 82^*$	352 ± 75

*p<0,005

Tabelle 5. Fluoreszenzintensitäten in MESF-Werten (Mittelwert \pm Standardabweichung) verschiedener polyklonaler F(ab')₂-Fragmente zur Analyse der schweren IgM-Ketten für Tag 0 bis 3, bei 24°C (RT), 30°C (Sommer) und 4°C (Winter), präpariert mit Vollblutlyse (V) oder Dichtegradientenzentrifugation (D), (n=10). Getestet mit ANOVA

IgM	D-D (FITC)	D-V (FITC)
Tag 0	7297 ± 3214	6233 ± 2727

24°C	D-D (FITC)	D-V (FITC)
Tag 1	6352 $\pm 2896^*$	4040 $\pm 1721^*$
Tag 2	4298 $\pm 1862^*$	3855 $\pm 1533^*$
Tag 3	2191 $\pm 1104^*$	1990 $\pm 743^*$

30°C	D-D (FITC)	D-V (FITC)
Tag 1	4684 $\pm 2111^*$	3335 $\pm 1407^*$
Tag 2	1956 $\pm 839^*$	1843 $\pm 676^*$
Tag 3	1497 $\pm 729^*$	1684 $\pm 616^*$

4°C	D-D (FITC)	D-V (FITC)
Tag 1	6655 ± 3005	4862 $\pm 2075^*$
Tag 2	5647 $\pm 2532^*$	5712 $\pm 2371^*$
Tag 3	4224 $\pm 2477^*$	2968 $\pm 1355^*$

Kapitel 5

5.1 Diskussion

Die Qualitätssicherung der durchflußzytometrischen Analyse von Zellproben ist von grundlegender Bedeutung. Obwohl prä-analytische Faktoren großen Einfluß auf die Meßergebnisse haben, sind diese nur teilweise untersucht worden. Aus diesem Grund haben wir bei Zellproben von Patienten mit einer B-CLL verschiedene prä-analytische Faktoren mituntersucht. Bislang liegen keine derartigen publizierten Daten vor, so daß derzeit auch keine Richtlinien für den Transport dieses Probenmaterials etabliert worden sind.

In der vorliegenden Untersuchung wurden folgende Faktoren berücksichtigt:

- i. Die Stabilität der in Heparin abgenommenen und mittels Vollblutlyse bzw. Dichtegradientenzentrifugation aufbereiteten Proben
- ii. Der Effekt von Temperaturveränderungen auf die Proben

Veränderungen, die während des Vorbereitungsprozesses und durch Verzögerungen während der Präparation bedingt sind, haben gezeigt, daß sie Einfluß auf die Meßergebnisse nehmen [30, 36, 37, 69, 99].

Der Vergleich der Lagerungsbedingungen (bei 24°C, 30°C und 4°C), zeigt die qualitativ besten Ergebnisse, d.h. den geringsten Abfall der MESF-Werte als ein Parameter der Antigen-Intensität gegenüber dem Ausgangswert, bei einer Lagerungstemperatur von 4°C. Obgleich die Ergebnisse der Lagerung bei 24°C nicht signifikant verändert für das CD 19 und CD 45 Antigen waren, zeigte im speziellen die Analyse der Kappa-Leichtkette und des IgM signifikante Unterschiede zwischen einer Lagerung bei 4°C und 24°C. Die Lagerung des Blutes bei 30°C war in jedem Fall für alle Proben von Nachteil. (Details siehe Tabelle 2-5.)

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Qualitätssicherung in der Durchflußzytometrie ist die Präparation der Proben. Die Methode der Färbung gefolgt von Lyse (anders als Lyse gefolgt von Färbung) ist heutzutage allgemeines Vorgehen [3]. Im Grunde ergaben aber alle Methoden der Vollblutlyse äquivalente Resultate im Sinne der absoluten Anzahl und prozentualen Verteilung der Lymphozyten [17]. Die Zellpräparation beeinflusst aber signifikant die Expression von Zelloberflächen-Markern auf Lymphozyten, unter Verwendung verschiedener Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper-Kombinationen [49].

Die Ergebnisse dieser Studie erbrachten durch den Vergleich der Vollblutlyse gegen die Dichtegradientenzentrifugation eine signifikant höhere Antigen-Expression und Antikörper-Fluoreszenzintensität nach Ficoll-Präparation. Der Nachweis schwach exprimierter Antigene war bei der Methode der Dichtegradientenzentrifugation sensitiver.

Es wurde gezeigt, daß T-Zellen eine größere Dichte als B-Zellen besitzen, was zu einem selektiven T-Zellverlust durch das FH-Interface führte. Dieser Effekt würde zu einer relativen Anreicherung von B-Zellen führen [3, 38, 42]. Die Zellerniedrigung bzw. -erhöhung durch die Dichtegradientenzentrifugation beeinflusste nicht die Klassifizierungsergebnisse in dieser Studie. Auch in einer anderen Studie wurde dies bereits belegt [25].

Weiterhin wurde die Stabilität humaner peripherer B-Lymphozyten und deren Immunglobulin untersucht. Die Möglichkeit, Blutproben über 3 Tage aufzubewahren, macht es möglich, diese Proben zu einem Referenzlabor einzusenden [87]. Die optimalen Bedingungen für die Lagerung dieser Proben sind nicht bekannt. Verschiedene Studien zeigten unterschiedliche Ergebnisse [30, 40, 47, 47, 54]. Jedoch wurden diese Studien mit Blut gesunder Spender oder von Patienten mit HIV-Infektion durchgeführt [58, 59, 74, 79, 81].

Es wurde Vollblut von Patienten mit B-CLL für diese Studie ausgewählt, da deren Lymphozyten, im Vergleich zu anderen niedrigmalignen NHL, die niedrigste Menge von schweren und leichten Ketten auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. B-CLL-Lymphozyten stellen deshalb die „sensitivsten“ Proben für die Untersuchung präanalytischer Faktoren in Bezug auf die durchflußzytometrische Analyse von oberflächlich exprimierten Immunglobulinen bei NHL dar [48, 50, 55, 56, 75]. Die Veränderung des Immunglobulinnachweises erlangt bei diesen Proben, die die häufigste Form eines leukämisch verlaufenden NHL darstellen, einen besonderen Stellenwert.

Diese Studie wurde nicht durchgeführt, um das beste Antikörperpanel zu ermitteln. Die Diagnose eines „klonalen Exzesses“ wurde, ungeachtet des verwendeten Antikörperpanels, korrekt ermittelt. Es wurde gezeigt, daß Unterschiede in der Probenaufbewahrung signifikante Veränderungen der Fluoreszenzintensität bewirken. Diese Befunde sind relevant für die Verlaufskontrolle der B-CLL mittels Durchflußzytometrie.

Besonderes Interesse kam dem Verhalten der Fluoreszenzintensität zu, weil die Klassifizierung von niedrigmalignen NHL auch nach ‚schwacher‘ oder ‚starker‘ Färbung (Antigenintensität) durch die monoklonalen Antikörper erfolgt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zweifelsfrei, daß die Fluoreszenzintensität, ausgedrückt in standardisierten Molekülen von äquivalenten löslichen Fluorochromen (MESF), stark von den Aufbewahrungsbedingungen und möglichen Verzögerungen bei der Probenverarbeitung abhängt.

Angaben einer ‚schwachen‘ oder ‚starken‘ Intensität sind nicht die beste Wahl für die Klassifizierung der Immunglobulinexpression von NHL, solange nicht Richtlinien für Transport und Aufbewahrung der Proben sowie die verwendeten Antikörper etabliert werden.

Auf Grund der vorliegenden Daten kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß für den Fall der durchflußzytometrischen Analyse von NHL eine sofortige Verarbeitung der Blutproben erforderlich ist. Der Transport solcher Proben zu Laboratorien muß deshalb im Sinne der Qualitätssicherung diskutiert werden. Insbesondere das Versenden bei RT, das momentan den „goldenen Standard“ darstellt, ist aufgrund der Ergebnisse dieser Studie nicht sinnvoll.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal für die Durchflußzytometrie die Rolle von präanalytischen Parametern bei der Untersuchung von abnormen B-Lymphozyten, am Beispiel der B-CLL, anhand der Antigen-Expression untersucht.

In Übereinstimmung mit den erhaltenen Ergebnissen sollten folgende wichtige Folgerungen gezogen werden:

- i. Abnorme B-Lymphozyten sollten unmittelbar nach Erhalt der Probe analysiert werden. Falls ein Versand der Proben notwendig ist, sollte eine Lagerung bei 4°C erfolgen, generell und unabhängig von den in dieser Studie verwendeten Antikörpern
- ii. Oberflächenimmunglobuline sind die empfindlichsten ‚Antigene‘ in Bezug auf die Lagerung [22].

Richtlinien und Präparationsbedingungen für abnorme B-Lymphozyten sind dringend erforderlich, weil die verschiedenen Antikörper zu unterschiedlicher Antigenexpression im Sinne der standardisierten Fluoreszenzintensität (MESF-Werte) führten. Die Änderungen können die korrekte Klassifikation der NHL verfälschen, insbesondere für den Fall der niedrigmalignen NHL, im besonderen der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Typ (B-CLL).

Kapitel 6

6.1 Abbildungen

Abbildung 2. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen PE- und FITC-konjugierten CD 19 Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 4°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

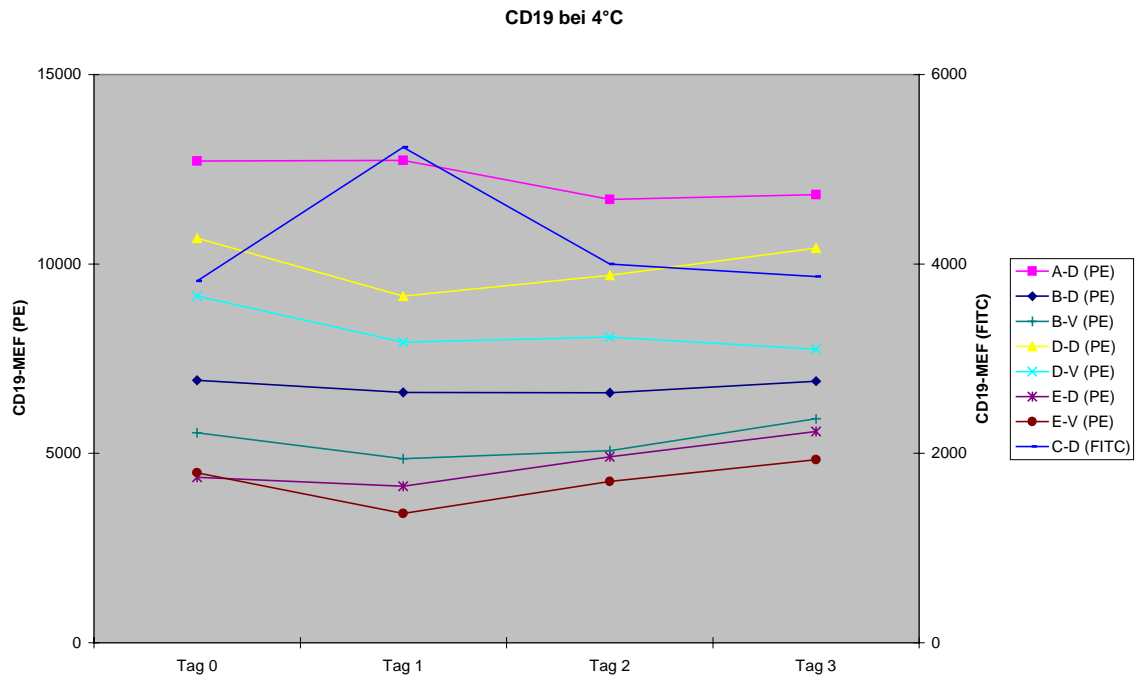


Abbildung 3. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen PE- und FITC-konjugierten CD 19 Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 24°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

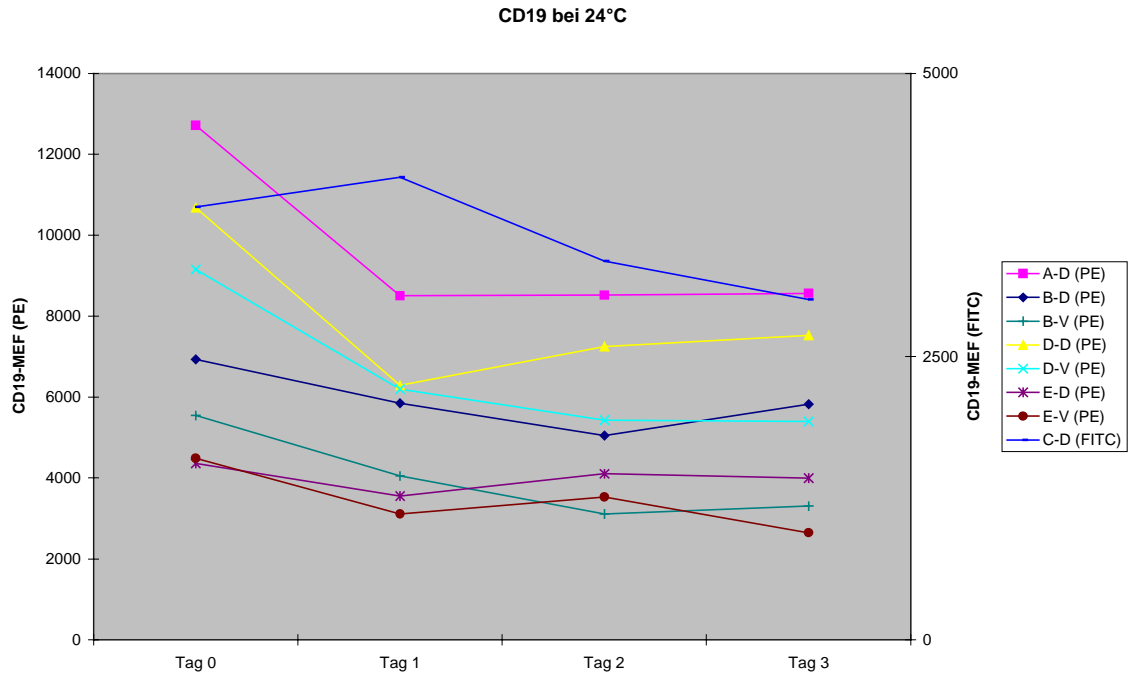


Abbildung 4. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen PE- und FITC-konjugierten CD 19 Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 30°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

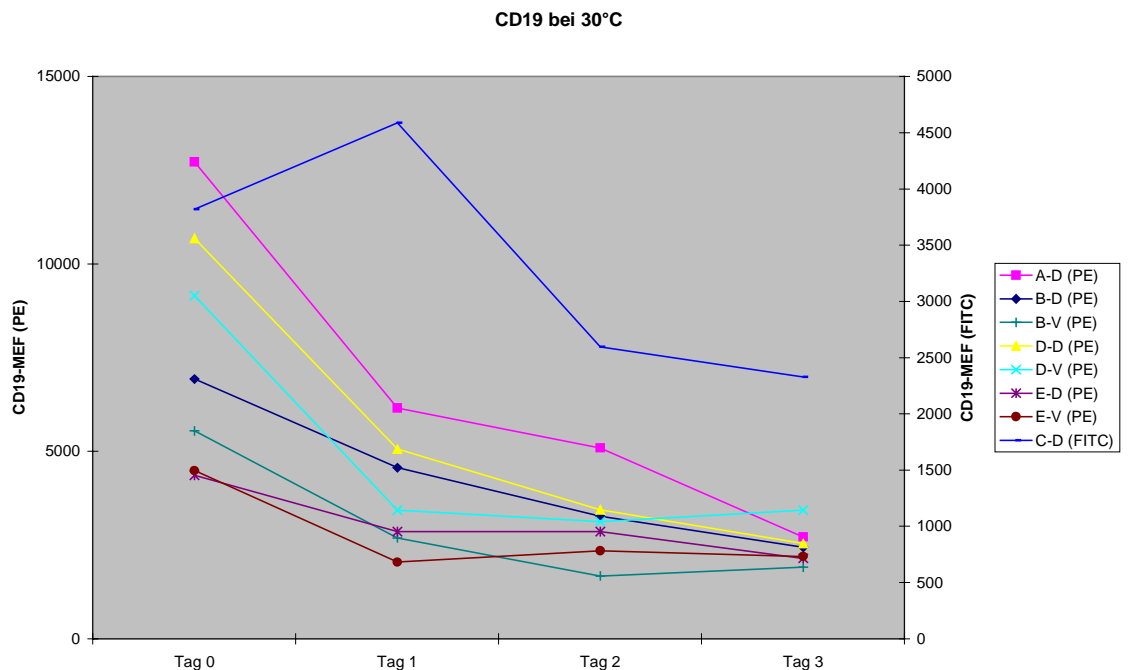


Abbildung 5. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen FITC-konjugierten CD 45 Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 4°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

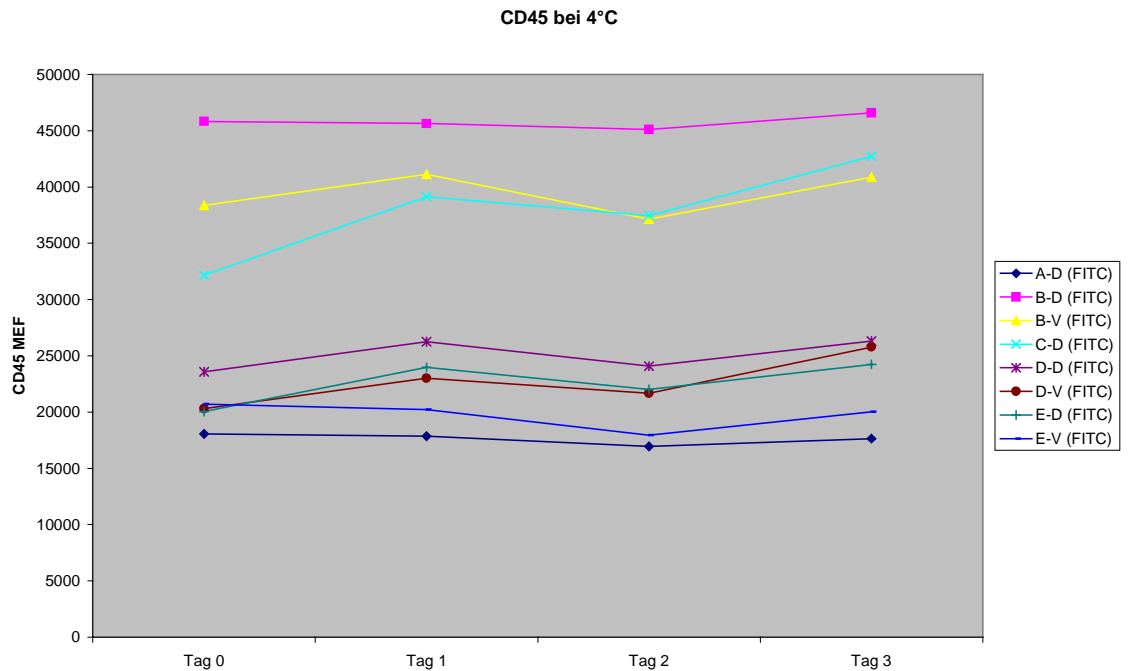


Abbildung 6. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen FITC-konjugierten CD 45 Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 24°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

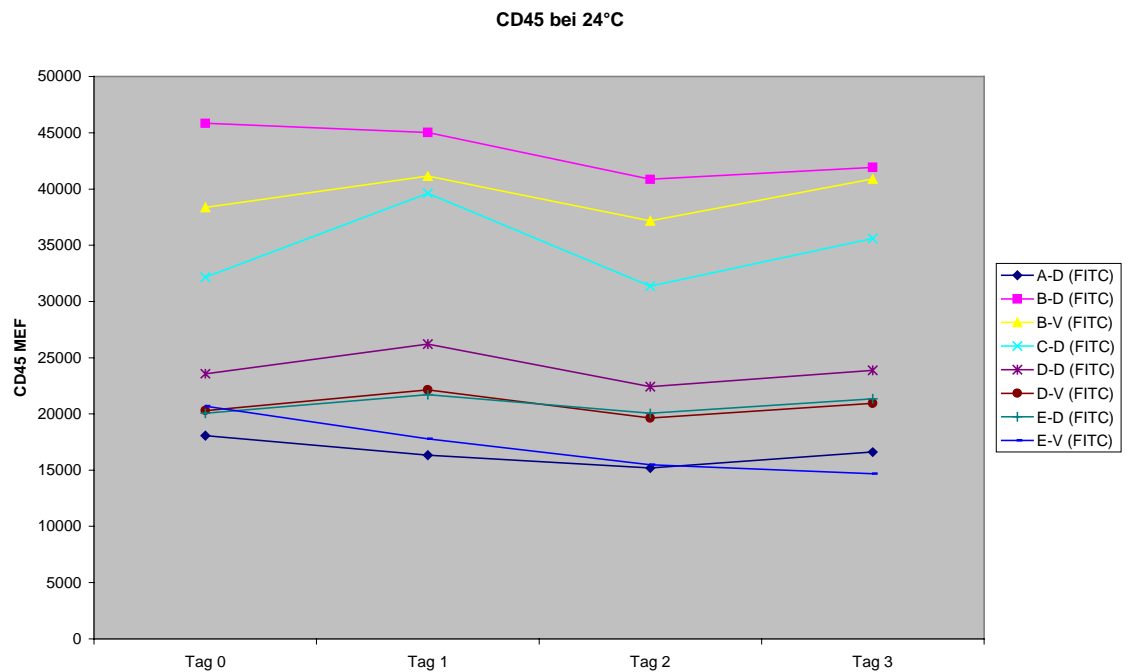


Abbildung 7. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen FITC-konjugierten CD 45 Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 30°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

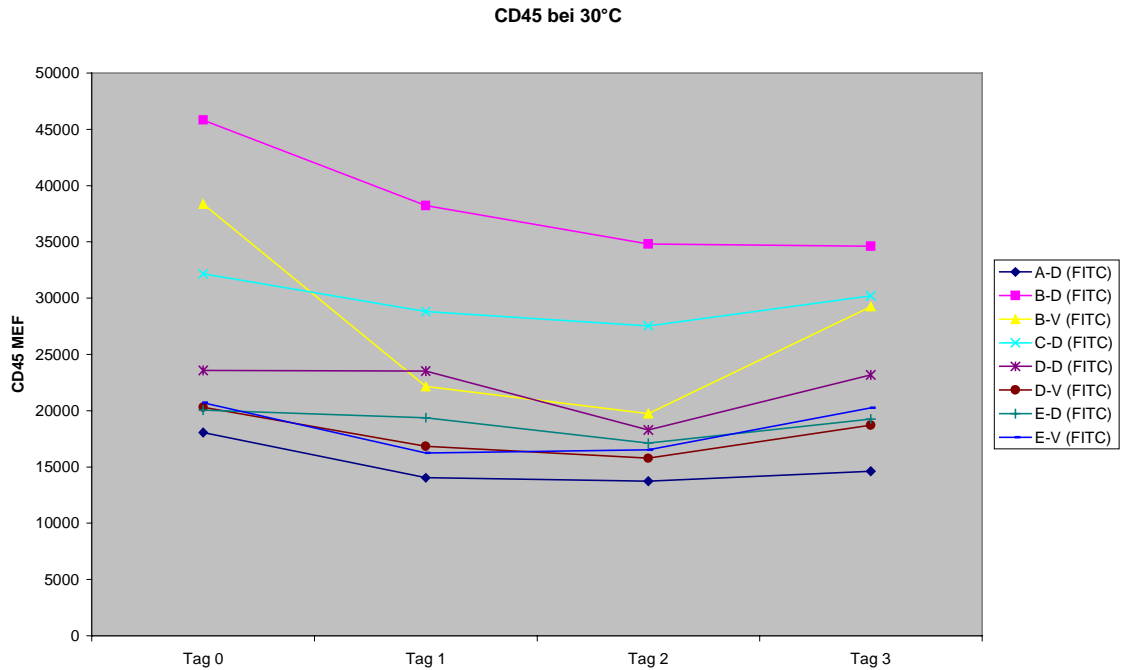


Abbildung 8. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen PE- und FITC-konjugierten Kappa Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 4°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

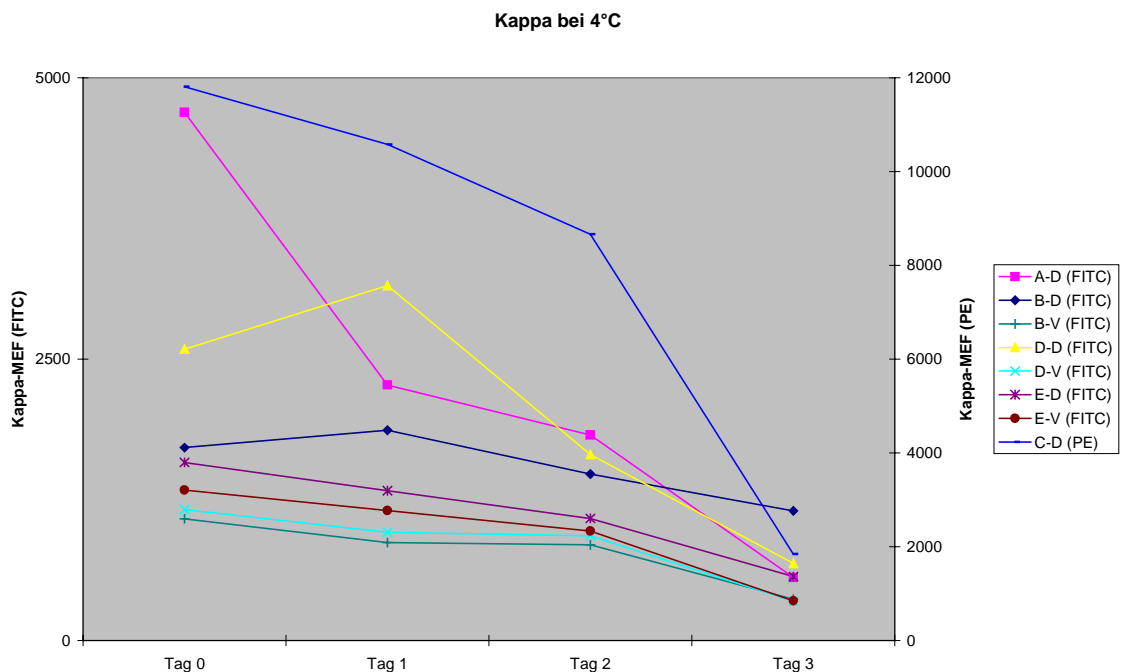


Abbildung 9. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen PE- und FITC-konjugierten Kappa Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 24°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

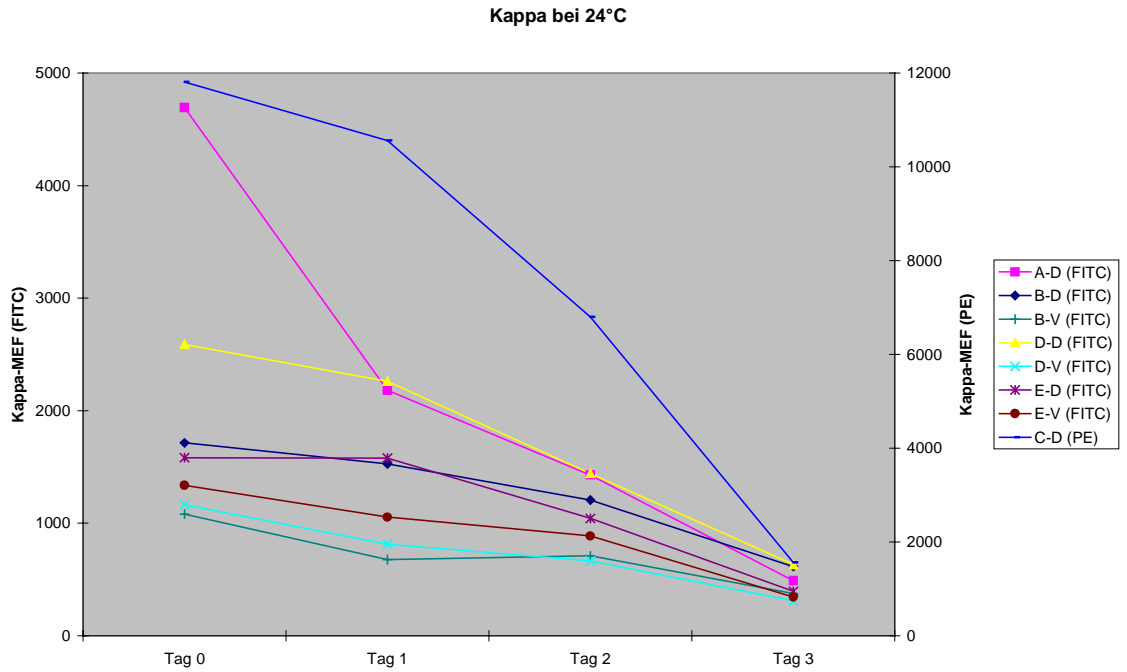


Abbildung 10. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen PE- und FITC-konjugierten Kappa Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 30°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

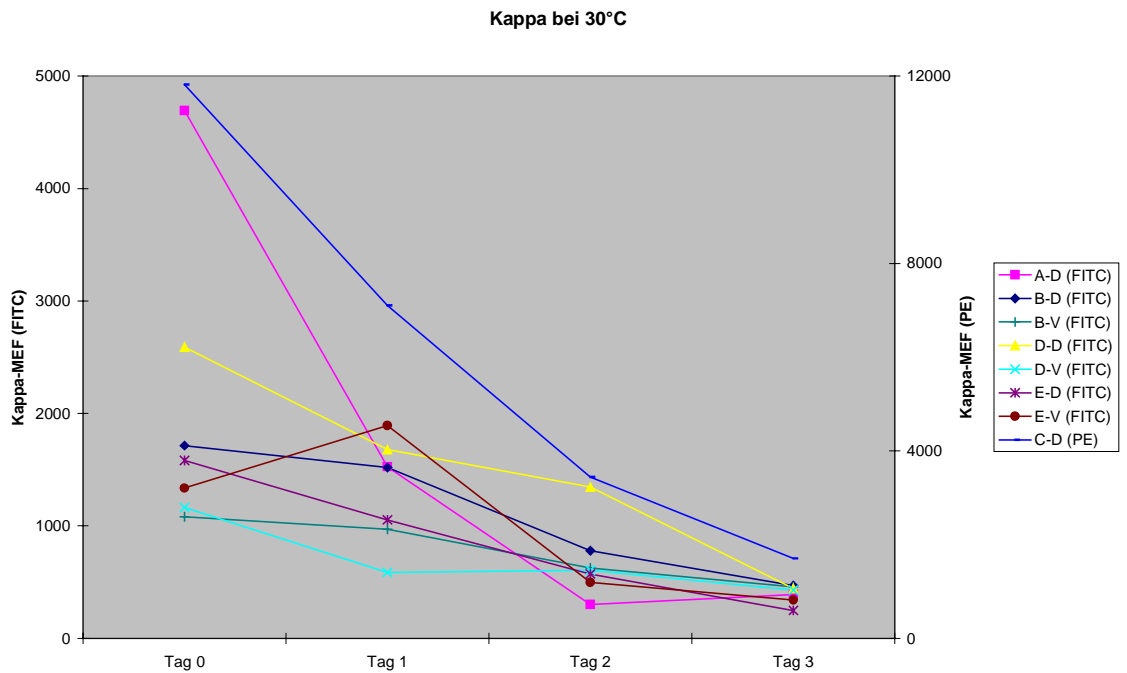


Abbildung 11. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen FITC-konjugierten IgM Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 4°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

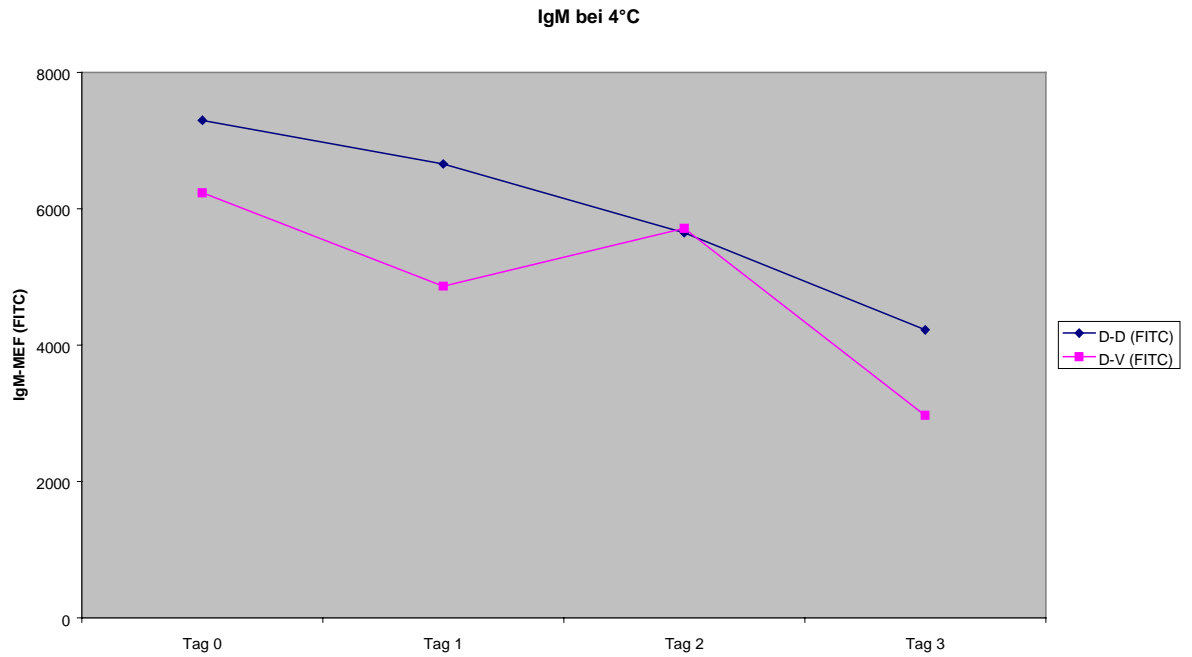


Abbildung 12. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen FITC-konjugierten IgM Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 24°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).

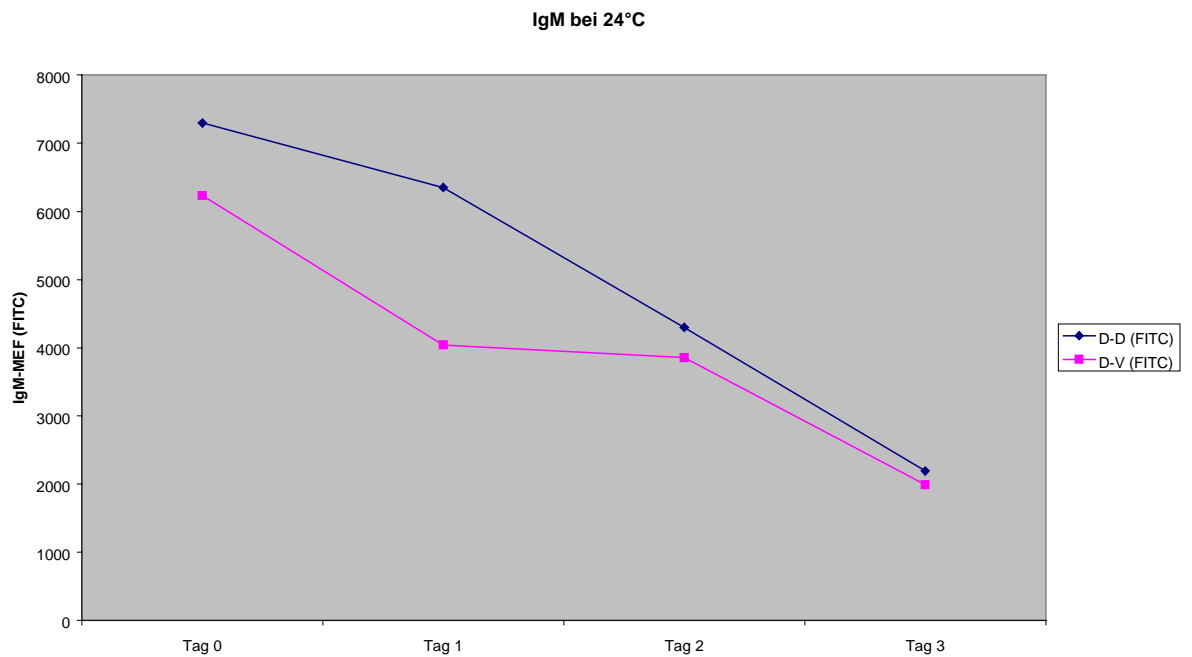
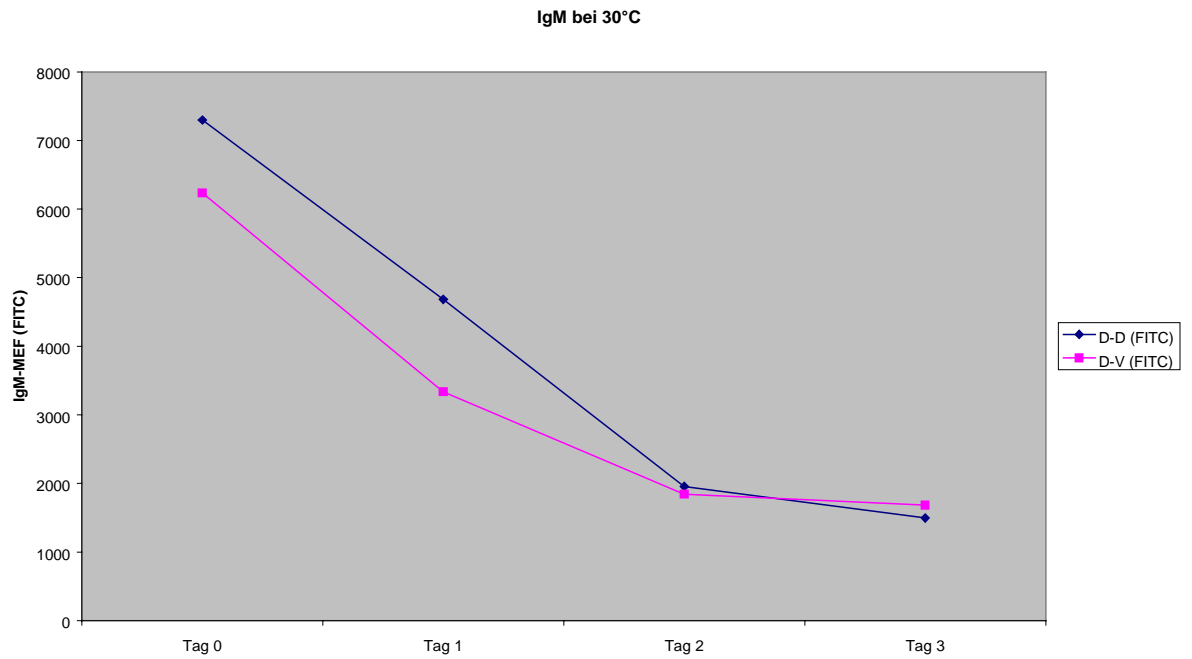


Abbildung 13. Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt als MESF-Werte für die verschiedenen FITC-konjugierten IgM Klone von Tag 0 bis Tag 3, gelagert bei 30°C und präpariert mit Vollblutlyse und Dichtegradienten Zentrifugation (n=10).



Kapitel 7

7.1 Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte die Effekte von verschiedenen Zell-Präparationsmethoden, Antikörper-Profilen und Aufbewahrungsbedingungen bei Blutproben von Patienten mit B-CLL auf die Antigenexpression abnormer B-Lymphozyten. Die heparinisierten Blutproben wurden mit der Technik der Dichtegradientenzentrifugation und Vollblutlyse aufbereitet und über 3 Tage bei 4°C, 24°C und 30°C gelagert.

Obwohl die Leichtkettenrestriktion Kappa für alle verwendeten Antikörperpanels korrekt diagnostiziert wurde, konnten signifikante Unterschiede unter den berechneten MESF-Werten beobachtet werden. Der Begriff der „schwachen“ und „starken“ Fluoreszenz ist vom verwendeten Antikörperpanel abhängig. Die Immunfluoreszenzwerte für CD 19 und CD 45 waren stabil bei 4°C und 24°C, jedoch wurden die besten Ergebnisse bei einer Lagerungstemperatur des Blutes bei 4°C beobachtet. Die Lagerung der Blutproben bei 30°C erbrachte unzuverlässige Ergebnisse.

Die bekannte Verminderung der Zellzahl durch die Technik der Dichtegradientenzentrifugation beeinflusste die Klassifizierungsergebnisse nicht.

Abnorme B-Lymphozyten sollten deshalb sofort nach der Probenentnahme analysiert werden. Wenn ein Versand notwendig ist, sollten die Blutproben bei 4°C gelagert werden. Oberflächenimmunglobuline sind die empfindlichsten Antigene in Bezug auf die Lagerungsbedingungen. Daher ist eine sofortige Verarbeitung und Analyse der Blutproben bei Patienten mit NHL unbedingt erforderlich. Für die Präparationsbedingungen, Aufbewahrung und den Transport solcher Proben sollten Richtlinien erarbeitet werden.

Kapitel 8

8.1 Literaturverzeichnis

1. [Anonym] (1989):
Monoclonal Antibodies Source Book.
1/89 edition; San Jose; Becton Dickinson Immunocytometry Systems.
2. Aisenberg, A.C., Bloch, K.J. (1972):
Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes.
N Engl J Med 287(6), 272-276.
3. Ashmore, L.M., Shopp, M., Edwards, B.S. (1989):
Lymphocyte subset analysis by flow cytometry.
J Immunol Methods 118(2), 209-215.
4. Bagwell, C.B., Lovett, E.J., Ault, K.A. (1988):
Localization of monoclonal B-cell populations through the use of Kolmogorov-Smirnov D-value and reduced Chi-Square contours.
Cytometry 9(5), 469-476.
5. Barcos, M., Minowada, J., Minato, K., Pollard, C., Cancino, M., Han, T., Henderson, E., Ozer, H. (1983):
Non-Hodgkin's lymphoma phenotyping: problems in the use of heterologous and monoclonal antibodies.
Leuk Res 7(4), 523-537.
6. Batata, A., Shen, B. (1992):
Immunophenotyping of subtypes of B-chronic (mature) lymphoid leukemia: a study of 242 cases.
Cancer 70(10), 2436-2443.

7. Begemann, H., Rastetter, J., Kaboth, W. (1970):
Klinische Hämatologie.
Stuttgart: Thieme.
8. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A.,
Gralnick, H.R. Sultan, C. (1989):
Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid
malignancies.
J Clin Pathol 42(6), 567-584.
9. Bergsagel, D.E. (1967):
The chronic leukemias: a review disease manifestations and the aims
of therapy.
Can Med Assoc J 96(25), 1615-1620.
10. Berliner, N. Ault, K.A., Martin, P., Weinberg, D.S. (1986):
Detection of clonal excess in lymphoproliferative disease by
kappa/lambda analysis and correlation with immunoglobulin gene DNA
arrangement.
Blood 67(1), 80-85.
11. Berrebi, A., Talmor, M., Borst, E., Resnitzky, P., Shtalrid, M. (1983):
IgM lambda globular cytoplasmic inclusions in in chronic lymphocytic
leukaemia resembling immunocytoma.
Scand J Haematol 30(1), 43-49.

12. Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S., Gremy, F. (1981):
A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis.
Cancer 48(1), 198-206.
13. Binet, J.L., Lepoprier, M., Dighiero, G., Charron, D., d'Athis, P., Vaugier, G., Beral, H.M., Natali, J.C., Raphael, M., Nizet, B., Follezou, J.Y. (1977):
A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance.
Cancer 40(2), 855-864.
14. Boggs, D.R., Sofferan, S.A., Wintrobe, M., Cartwright, G.E. (1966):
Factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leucemia.
Am J Med 40, 243-254.
15. Bosch, F., Perales, M., Cobo, F., Esteve, J., Rafael, M., Lopez-Guillermo, A., Ribera, J.M., Campo, E., Montserrat, E. (1997):
Fludarabine versus fludarabine and epirubicine in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia - preliminary results of a randomized phase III study.
Blood 90, (Supplement 1).
16. Caligaris-Cappio, F., Hamblin, T.J. (1999):
B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather.
J Clin Oncol 17(1), 399-408.

17. Carter, P.H., Rest-Ruiz, S., Washington, G.C. (1992):
Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants,
and five cell preparations.
Cytometry 13(1), 68-74.
18. Chapel, H.M., Bunch, C. (1987): Mechanisms of infection in chronic
lymphocytic leukemia.
Semin Hematol 24, 291-296
19. Cheson, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J.,
O'Brien, S., Rai, K.R. (1996):
National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for
chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and
treatment.
Blood 87(12), 4990-4997.
20. Clark, C., Rydell, R., Kaplan, M. (1973):
Frequent association of IgM lambda with crystalline inclusions in
chronic lymphocytic leukemic lymphocytes.
N Engl J Med 289(3), 113-117.
21. Cone, L., Uhr, J.W. (1964):
Immunologic deficiency disorders associated with chronic lymphocytic
leukemia and multiple myeloma.
J Clin Invest 43, 2241-2248.
22. Conley, C.L., Misiti, J., Laster, A.J. (1980):
Genetic factors predisposing to chronic lymphocytic leukemia and to
autoimmune disease.
Medicine 59(5), 323-334.

23. Cooper, M.D., Bertoli, L.F., Borzillo, G.V., et al. (1985):
Pathogenesis of B-cell malignancies.
In: Gale RP, Golde DW (Eds.): Leukemia: recent Advances in biology
and treatment.
S. 453-466, New York, Lissabon.
24. De Lima, M., O'Brien, S., Lerner, S., Keating, M.J. (1998):
Chronic lymphocytic leukemia in the young patient.
Semin Oncol 25, 107-116.
25. De Paoli, P., Reitano, M., Battistin, S., Castiglia, C., Santini, G. (1984):
Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies
and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mono-
nuclear cells separated by density gradient centrifugation.
J Immunol Methods 72(2), 349-353.
26. De Rossi, G., Mauro, F.R., Lo Coco, F., Caruso, R., Niscola, P., Pa-
squaletti, D., Mandelli, F. (1993):
CD 5 negative lymphocytosis mimicking typical B-chronic lymphocytic
leukemia: a description of 26 cases.
Nouv Rev Fr Hematole 35(4), 451-455.
27. den Ottolander, G.J., Schuit, H.R., Waayer, J.L., Huibregtsen, L., Hi-
jmans, W., Jansen, J. (1985) :
Chronic B-cell leukemias: relation between morphological and immu-
nological features.
Clin Immunol Immunopathol 35(1), 92-102.
28. Djaldetti, M. (1982):
Intracytoplasmatic inclusions in the peripheral blood lymphocytes of
patients with chronic lymphocytic leukemia.
Virchows Arch B Cell Pathol incl Mol Pathol 41(3), 301-305.

29. Dorfman, D., Schultze, J., Shahsafaei, A., Michalak, S., Gribben, J., Freeman, G., Pinkus, G.S., Nadler, L.M. (1997):
In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation.
Blood 90(11), 4297-4306.
30. Ekong, T., Kupek, E., Hill, A., Cark, C., Davies, A., Pinching, A. (1993):
Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry. The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets.
J Immunol Methods 164(2), 263-73.
31. Emmerich, B., Hallek, M. (1999):
Chronische lymphatische Leukämie.
In: Schmoll, H.J., Höffken, K., Possinger, K. (Eds.): Kompendium Internistische Onkologie.
3. Auflage, S. 208-242, Berlin u.a.: Springer.
32. Engelhard, M., Brittinger, G., Heinz, R., et al. (1991):
Chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and immunocytoma (LP-IC): clinical and prognostic relevance of this distinction.
Leuk Lymphoma Supplement 161-173.
33. Fialkow, P.J., Najfeld, V., Reddy, A., Singer, J., Steinmann, L. (1978):
Chronic lymphocytic leukemia: clonal origin in a committed B-lymphocyte progenitor.
Lancet 2(8087), 444-446.

34. Fukushima, P.I., Nguyen, P.K., O'Grady, P., Stetler-Stevenson, M. (1996):
Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia.
Cytometry 26(4), 243-252.
35. Gale, R.P., Zigelboim, J., Ossorio, R.C., Fahey, J.L. (1975):
A comparison of human lymphoid cells in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).
Clin Immunol Immunopathol 3(3), 377-384.
36. Garraud, O., Moreau, T. (1984) :
Effect of blood storage on lymphocyte subpopulations.
J Immunol Methods 75(1), 95-98.
37. Geisler, C.H., Larsen, J.K., Hansen, N.E., Hansen, N.M., Christensen, B.E., L und B., Nielsen, H., Plesner, T., Thorling, K., Andersen, E. et al. (1991):
Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood 78(7), 1795-802.
38. Gibson, J., Neville, S., Joshua, D., Kronenberg, H. (1989):
CD 23 antigen expression in CLL.
Br J Haematol 72(4), 598.
39. Godal, T., Funderud, S. (1982):
B-cell neoplasms in relation to normal B-cell differentiation maturation processes.
Adv Cancer Res 36, 211-255.

40. Gordon, J., Mellstedt, H., Aman, P., Biberfeld, P., Bjorkholm, M., Klein, G. (1983):
Phenotypes in chronic B-lymphocytic leukemia probed by monoclonal antibodies and immunoglobulin secretion studies: identification of stages of maturation arrest and the relation to clinical findings.
Blood 62(4), 910-917.
41. Gribben, J.G. (1999):
Stem-cell transplantation for indolent lymphoma.
Semin Hematol 36(4 Supplement 5), 18-25.
42. Grunow, J.E., Lubet, R.A., Ferguson, M.J., Gaulden, M.E. (1976):
Preferential decrease in thymus dependent lymphocytes during storage at 4C in anticoagulant.
Transfusion 16(6), 610-615.
43. Guglielmi, P., Preud'Homme, J.L., Gourdin, M.F., Reyes, F., Daniel, M.T. (1982):
Unusual intracytoplasmatic immunoglobulin inclusions in chronic lymphocytic leukaemia.
Br J Haematol 50(1), 123-134.
44. Hamblin, T.J., Abdul-Ahad, A.K., Gordon, J., Stevenson, F.K., Stevenson, G.T. (1980):
Preliminary experience in treating lymphocytic leukaemia with antibody to immunoglobulin idiotypes on the cell surfaces.
Br J Cancer 42(4), 495-502.
45. Hansen, M.M. (1973):
Chronic lymphocytic leukemia.
Scand J Haematol Supplement 18.

46. Harwerth, H.G., Schmitt, H.E., Obrecht, P. (1963): Akute und chronische Lymphadenose.
In: Handbuch der gesamten Hämatologie, Band IV.
München: Urban & Schwarzenberg.
47. Hensleigh, P.A., Waters, V.B., Herzenberg, L.A. (1983):
Human T lymphocyte differentiation antigens effects of blood sample storage on LEU antibody binding.
Cytometry 3(6), 453-455.
48. Höffkes, H.G., Schmidtke, G., Schmücker, U., Brittinger, G., Valet, G. (1995):
Computerized analysis of cells from patients with acute myelogenous leukemia prepared by density gradient centrifugation or erythrocyte lysis and measured by flow cytometry.
Laboratory Hematology 2, 126.
49. Islam, D., Lindberg, A.A., Christensson, B. (1995):
Peripheral blood cell preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry.
Cytometry 22(2), 128-134.
50. Jim, R.T., Reinhard, E.H. (1956):
Agammaglobulinemia in chronic lymphocytic leukemia.
Ann Intern Med 44, 790-796.
51. Korsmeyer, S.J., Heiter, P.A., Ravetch, J.V., et al. (1981):
Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 78(11), 7096-7100.

52. Kroft, S.H., Finn, W.G., Peterson, L.C. (1995):
The pathology of the chronic lymphoid leukemias.
Blood Rev 9(4), 234-250.
53. Kurec, A.S., Threatte, G.A., Gottlieb, A.J., Smith, J.R., Anderson, J., Davey, F.R. (1992):
Immunophenotypic subclassification of chronic lymphocytic leukemia (CLL).
Br J Haematol 81(1), 45-51.
54. Lambalgen, R.V., Meurs van, J.E. (1985) :
Lymphocyte subpopulations do not alter during blood storage at 40C.
J Immunol Methods 80, 39-43.
55. Lennert, K., Feller, A.C. (1992):
Histopathology of Non Hodgkin's lymphomas. 2. Ed.
Berlin: Springer; S. 300-308.
56. Letwin, B.W., Wallace, P.K., Muirhead, K.A., Hensler, G.L., Kashatus, W.H., Horan, P.K. (1990):
An improved clonal excess assay using flow cytometry and B-cell gating.
Blood 75(5), 1178-1185.
57. Levy, N., Nelson, J., Meyer, P., Lukes, R.J., Parker, J.W. (1983):
Reactive lymphoid hyperplasia with single class (monoclonal) surface immunoglobulin.
Am J Clin Pathol 80(3), 300-308.
58. Liendo, C., Danieau, L., Al Katib, A., Koziner, B. (1985):
Phenotypic analysis by flow cytometry of surface immunoglobulin light chains and B and T cell antigens in lymph nodes involved with non-Hodgkin's lymphoma.
Am J Med 79(4), 445-454.

59. Lindemalm, C., Mellstedt, H., Nilsson, B., Biberfeld, P., Bjorkholm, M., Christensson, B., Holm, G., Johansson, B. (1987):
Blood clonal B cell excess (CBE) at diagnosis in patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL). Relation to clinical stage, histopathology and response to treatment.
Eur J Cancer Clin Oncol 23(6), 749-753.
60. Linsley, P., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N., Ledbetter, J. (1991):
Binding of the B cell activation antigen B7 to CD 28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation.
J Exp Med 173(3), 721-730.
61. Ludescher, C., Gattringer, C., Weger, A.R., Drach, J., Thaler, J., Bitschmann, R., Huber, H. (1992):
Surface immunoglobulin density in the differential diagnosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma.
Leuk Res 16(2), 191-196.
62. Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., et al. (1994) :
The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL.
Leukemia 8(10), 1640-1645.
63. Mauro, F.R., Foa, R., Giannarelli, D., et al. (1999):
Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases.
Blood 94, 448-454.
64. McCoy, J.P., Carey, J.L., Krause, J.R. (1990):
Quality control in flow cytometry for diagnostic pathology. I. Cell surface phenotyping and general laboratory procedures.
Am J Clin Pathol 93(4 Supplement 1), 27-37.

65. Michallet, M., Archimbaud, E., Bandini, G., Rowlings, P.A., Deeg, H.J., Gahrton, G., Montserrat, E., Rozman, C., Gratwohl, A., Gale, R.P. (1996):
HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry.
Ann Intern Med 124(3), 311-315.
66. Miller, D.G. (1962):
Patterns of immunological deficiency in lymphomas and leukemias.
Ann Intern Med 57, 703-716.
67. Montserrat, E., Gomis, F., Vallespi, T., et al. (1991):
Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults.
Blood 78, 1545-1551.
68. Montserrat, E., Vinolas, N., Reverter, J.C., Rozman, C. (1993):
Chronic lymphocytic leukemia in early stage: "Smoldering" and "active" forms.
In: Cheson, B.D. (Eds.): Chronic lymphocytic leukemia. Scientific advances and clinical developments.
S. 281-296, New York: Marcel Dekker, Inc.
69. Nadler, L.M., Anderson, K.C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J.F., Schlossmann, S.F. (1983):
B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed in normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes.
J Immunol 131(1), 244-250.

70. Nicholson, J.K., Jones, B.M., Cross, G.D., McDougal, J.S. (1984):
Comparison of T and B cell analyses on fresh and aged blood.
J Immunol Methods 73(1), 29-40.

71. Oduncu, F., Nerl, C., Meinhardt, G., Danhauser-Riedl, S., Schneller, F., Langenmayer, I., Hallek, M., Emmerich, B. (2000): Lymphozytische Lymphome und Immunozytom.
In: Emmerich, B. (Ed.): Maligne Lymphome.
6. Auflage, S. 57-76, Schriftreihen des TZM.

72. Osterborg, A., Nilsson, B., Bjorkholm, M., Holm, G., Johansson, B., Lindemalm, C., Petterson, D., Ahre, A., Mellstedt, H. (1987):
Blood clonal B cell excess at diagnosis in multiple myeloma: relation to prognosis.
Eur J Haematol 38(2), 173-178.

73. Pavletic, Z.S., Arrowsmith, E.R., Bierman, P.J., Goodman, S.A., Vose, J.M., Tarantolo, S.R., Stein, R.S., Bociek, G., Greer, J.P., Wu, C.D., Kollath, J.P., Weisenburger, D.D., Kessinger, A., Wolff, S.N., Armitage, J.O., Bishop, M.R. (2000):
Outcome of allogeneic stem cell transplantation for B cell chronic lymphocytic leukemia.
Bone Marrow Transplant 25(7), 717-722.

74. Ponzio, A.D., Self, S.E., Runey, D.H., Burdash, N.M., La Via, M.F. (1984):
Are lymphocyte subset determinations affected by storage conditions?
Diagn Immunol 2(3), 188-190.

75. Preud´homme, J.L., Seligmann, M. (1972) :
Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative disease.
Blood 40(6), 777-794.
76. Rai, K., Rabinowe, S.N. (1993): Chronic lymphocytic leukemia.
In: Holland JF, et al. (Eds.):
Cancer Medicine.
3. edition, S. 1971-1988, Philadelphia: Lea & Febiger.
77. Rai, K.R., Han, T. (1990):
Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia.
Hematol Oncol Clin North Am 4(2), 447-456.
78. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N.,
Pasternack, B.S. (1975):
Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.
Blood 46(2), 219-234.
79. Renzi, P., Ginns, L.C. (1987):
Analysis of T cell subsets in normal adults.
J Immunol Methods 98(1), 53-56.
80. Reynolds, W.M., Williamson, A.M., Smith, G.J., Lane, A.C. (1992):
A simple technique for the determination of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression by B cells in whole blood.
J Immunol Methods 151(1-2), 123-129.
81. Romeu, M.A., Mestre, M., Gonzalez, L. (1992):
Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults.
J Immunol Methods 154(1), 7-10.

82. Ross, G.D., Polley, M.J. (1975):
Specificity of human lymphocyte complement receptors.
J Exp Med 141(5), 1163-1180.
83. Rothe, G., Schmitz, G. (1996):
Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of
hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and
Image Analysis.
Leukemia 10(5), 877.
84. Salomon-Nguyen, F., Valensi, F., Merle-Beral, H. (1995):
A scoring system for the classification of CD 5-B CLL versus CD 5+ B
CLL and B PLL.
Leuk Lymphoma 16(5-6), 445-450.
85. Schwartz, R.H. (1992):
Costimulation of T lymphocytes: the role of CD 28, CTLA-4, and
B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy.
Cell 71(7), 1065-1068.
86. Shapiro, H.M. (1994):
Practical Flow Cytometry. 3. Edition
New York: Wiley-Liss; S 173-174.
87. Shield III, C.F., Marlett, P., Smith, A., Gunter, L., Goldstein, G. (1983):
Stability of human lymphocyte differentiation antigens when stored at
room temperature.
J Immunol Methods 62(3), 347-352.
88. Smith, B.R., Weinberg, D.S., Robert, N.J., Towle, M., Luther, E.,
Pinkus, G.S., Ault, K.A. (1984):
Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma.
N Engl J Med 311(23), 1476-1481.

89. Soderberg, O. (1998):
Growth and survival of B-chronic lymphocytic leukaemia cells.
Med Oncol 15(2), 73-78.
90. Solanki, D.L., McCurdy, P.R., MacDermott, R.P. (1982):
Chronic lymphocytic leukemia: a monoclonal disease.
Am J Hematol 13(2), 159-162.
91. Spiegelberg, H.L. (1977):
The structure and biology of human IgD.
Immunol Rev 37, 23-24.
92. Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R., Schlossmann, S.F. (1980):
Characterization of a human B lymphocyte specific antigen.
J Immunol 125(4), 1678-1685.
93. Tamul, K.R., Schmitz, J.L., Kane, K., Folds, J.D. (1995):
Comparison of the effects of FicollHypaque separation and whole
blood lysis on results of immunophenotypic analysis of blood and bone
marrow samples from patients with hematologic malignancies.
Clin Diagn Lab Immunol 2, 337-342.
94. Tefferi, A., Li, C.Y., Phylipi, R.L. (1988):
Role of immunophenotyping in chronic lymphocytosis: review of the
natural history of the condition in 145 adults.
Mayo Clin Proc 63(8), 801-806.
95. Ternynck, T., Dighiero, G., Follezou, J., et al. (1974):
Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants
using peroxidase-labeled antibodies: I. Detection and quantitation of
light chain determinants.
Blood 43, 789-795.

96. Thelml, H. (1978):
Die chronische lymphatische Leukämie.
In: Begemann, H. (Ed.): Blut und Blutkrankheiten. Teil 6
S. 519-619, Berlin u.a.: Springer.

97. Ullmann, J.E., Fish, W., Osseirnmann, E., et al. (1959):
The clinical implications of hypogammaglobulinemia in patients with
chronic lymphocytic leukemia and lymphocytic lymphosarkoma.
Ann Intern Med 51, 501-516.

98. Waldmann, T.A., Korsmeyer, S.J., Bakshi, A., Arnold, A., Kirsch, I.R.
(1985):
NIH conference. Molecular genetic analyses of human lymphoid neo-
plasms. Immunoglobulin genes and the c-myc oncogene.
Ann Intern Med 102(4), 497-510.

99. Weiblen, B.J., Debell, K., Giorgio, A., Valeri, C.R. (1984):
Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage.
J Immunol Methods 70, 179-83.

100. Wintrobe, M., Lee, G.R., Boggs, D.R., et al. (1981): Chronic lympho-
cytic leukemia.
In: Clinical Hematology.
S. 1631-1647, Philadelphia: Lea & Febiger.

101. Wong, G.Y., Gebhard, D., Mittleman, A., Hancu, M., Koziner, B.
(1985):
Analysis of cell surface light chain immunoglobulin expression by flow
cytometry in normal controls: a new mathematical approach.
J Histochem Cytochem 33(2), 119-126.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	„Antibody-binding-capacity“, Antikörper-Bindungs-Kapazität
AK	Antikörper
ANOVA	„Analysis of Variance“, Analyse der Varianz
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase Methode
Apoptose	Programmierter Zelltod; Zelluntergang, der durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst reguliert wird
B	Abkürzung für Bursa: B-Lymphozyten der Säuger entstehen im Äquivalent der Bursa Fabricii des Vogels
BD	Becton Dickinson
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Typ
CD	„Cluster of differentiation“, international standardisierte Nomenklatur für Antigene auf Zelloberflächen. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen diese antigenen Determinanten können Zellpopulationen differenziert werden. Diese Klassifizierung hat andere, teilweise sehr uneinheitliche Bezeichnungen abgelöst.
CLL	Chronische lymphatische Leukämie

Fab	„Antigen binding fragment“, Sitz des antigenbindenden Anteils im Antikörpermolekül. Besteht aus der leichten Kette und einem Teil der schweren Kette des Immunglobulins. Entsteht nach enzymatischem Abbau von Immunglobulinen durch Papain.
Fc	„Fragment crystallizable“, Bestandteil des Immunglobulinmoleküls: über den Fc-Anteil binden Antikörper an Zellrezeptoren (FcR) und an Komplement.
FcR	Fc-Rezeptoren: Bindungsstellen, an die Antikörper mit ihrem Fc-Bereich binden können. Fc-Rezeptoren sind auf Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, basophilen und neutrophilen Granulozyten vorhanden.
FH	Ficoll-Hypaque
FITC	Fluoresceinisothiozyanat: Fluoresceinderivat, Farbstoff der zur Markierung von Antikörpern verwendet wird
FSC	„Forward-scatter“, Vorwärtsstreuung-Detektor des Durchflußzytometers
HIV	Humanes Immundefizienz Virus: seit 1983 bekannte Retrovirus, das in der Ätiopathogenese von HIV-Erkrankung und AIDS eine zentrale Rolle spielt.
Ig	Immunglobulin
IgD	Immunglobulin D: Dieses Ig befindet sich hauptsächlich auf den Membranen von zirkulierenden B-Lymphozyten und ist im Serum nur in geringen Mengen nachweisbar. Über die genaue biologische Funktion und Bedeutung ist bisher nicht viel bekannt, es spielt aber wahrscheinlich eine Rolle bei der antigeninduzierten Differenzierung von Lymphozyten.

IgG	Immunglobulin G: 70-75% der gesamten Antikörper im normalen menschlichen Serum bestehen aus IgG. Es ist ein monomeres Protein. IgG ist im intra- und extravaskulären Pool gleichmäßig verteilt und ist der wichtigste Antikörper der sekundären Immunantwort. IgG wird nach einer Erstinfektion erst nach ungefähr drei Wochen gebildet. Nach erneutem Auftreten derselben Infektion werden IgG Antikörper sehr schnell und in großer Menge produziert.
IgM	Immunglobulin M: IgM besitzt ein ungefähres Molekulargewicht von 900 kDa und liegt im Serum größtenteils als Pentamer vor. IgM ist der Antikörper der primären Immunantwort. Ein hoher Spiegel von spezifischem IgM im Serum weist auf eine akute Immunreaktion hin. Die Produktion von IgM sinkt einige Wochen nach Beginn einer Infektion ab. Inzwischen wird verstärkt IgG gebildet. Gerade durch diesen Mechanismus ist eine spezielle Labordiagnostik möglich, die gezielte Fragen eindeutig belegen kann. IgM kann die Plazenta nicht passieren, so daß erhöhte Serumspiegel im Nabelschnurblut oder während der ersten Lebenswoche für eine pränatale Infektion sprechen.
MA	Milliampere
MAK	Monoklonaler Antikörper: von einem Klon reaktiv (benigne) oder autonom (neoplastisch) proliferierter Plasmazellen gebildete bzw. gentechnisch mittels Hybridomzellklonen (meist murinen Ursprungs) synthetisierte, homogene und monospezifische Antikörper. MAK werden hauptsächlich in der Diagnostik zum qualitativen und quantitativen Antigen- und Antikörpernachweis, nach radioaktiver Markierung zur Tumorlokalisation und zum Teil auch therapeutisch verwendet.
MESF	“Molecules of equivalent soluble fluorochrome”, Moleküle von equivalentem löslichen Fluorochrom
MHz	Megahertz

MS-DOS	„Microsoft disk-operating system“, Betriebssystem für Personal Computer
n.d.	Nicht durchgeführt
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom: Neoplasma, das vom lymphatischen Gewebe der Lymphknoten, Tonsillen, Milz oder anderer Organe ausgeht.
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PE	Phycoerythrin, Farbstoff
PBS	„Phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Smlg	„Surface membrane immunoglobulin“, membranständiges Oberflächen-Immunglobulin
SSC	„Sideward scatter“, Seitwärtsstreulicht-Detektor des Durchflußzytometers

Glossar

Antigen

Substanz, die von einem Organismus als fremd erkannt wird und dadurch eine spezifische Immunantwort (Bildung von Antikörpern oder immunkompetenten Lymphozyten) auslöst. Ein Antigen verfügt in der Regel über mehrere antigene Determinanten (Teilstrukturen, die als Epitope bezeichnet werden), die mit den induzierten Immunprodukten reagieren (z. B. Antigen-Antikörper-Reaktion).

Antikörper

Zu den Gammaglobulinen gehörende heterogene Gruppe von Glykoproteinen (Immunglobuline), die als mögliche Antwort des Immunsystems nach Kontakt des Organismus mit Antigenen von B-Lymphozyten und Plasmazellen gebildet und in Körperflüssigkeiten sezerniert werden und mit dem entsprechenden Antigen spezifisch (selektiv) reagieren (Antigen-Antikörper-Reaktion). Antikörper besitzen zwei (bivalente Antikörper, z. B. IgG) bis zehn (sog. multivalente Antikörper, z. B. IgM) Antigenbindungsstellen; monovalente Antikörper kommen natürlicherweise nicht vor.

Funktion: als Träger der humoralen Immunität vor allem Bindung von fremden (vor allem pathogene Mikroorganismen) und körpereigenen Antigenen (z. B. Tumorzellen) mit Neutralisation (Präzipitationsreaktion) z. B. von Toxinen und Viren, Agglutination oder Lyse korpuskulärer Antigene durch Aktivierung von Komplement oder Stimulation der Phagozytose durch Opsonisierung der Antigene sowie Freisetzung biologisch wirksamer Mediatoren aus aktivierten Mastzellen (durch zytophile Antikörper). Antikörper können (häufig sekundär) auch nachteilige Auswirkungen auf den Organismus haben und spielen z. B. in der Pathogenese der Allergie vom Soforttyp, bei Immunkomplexkrankheiten, Autoimmunkrankheiten, Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation und Transfusionszwischenfällen.

len sowie bei Morbus haemolyticus fetalis und Morbus haemolyticus neonatorum eine Rolle.

Bone marrow (englisch) Knochenmark

Bursa Fabricii Lymphoretikuläres Organ bei Vögeln, das sich während der Embryonalentwicklung divertikelartig aus dem Enddarm ausstülpt und nach Erreichen der Geschlechtsreife involviert. Bildungsstätte Immunglobulin-produzierender Bursalymphozyten nach Ansiedlung zirkulierender Stammzellen in einer empfänglichen Periode der frühen Embryonalentwicklung. Die tierexperimentelle Entfernung der Bursa Fabricii führt zur Insuffizienz der humoralen bei erhaltener zellvermittelter Immunität. Bei Menschen und Säugetieren, die keine Bursa Fabricii besitzen, entwickeln sich die „Bursa-abhängigen“ B-Lymphozyten direkt aus lymphoiden Stammzellen in Inseln von blutbildendem Gewebe der fetalen Leber u. im fetalen und adulten Knochenmark (sog. Bursaäquivalent).

**Dichte-
gradienten-
Zentrifugation** Beruht auf den Dichteunterschieden von Lymphozyten im Vergleich zu Erythrozyten und Granulozyten und wird zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Blut verwendet.

Durch extrem hohe Rotordrehzahlen der Zentrifuge (ca. 70 000-100 000/min) ist die Auftrennung von Teilchen einer Dispersion (z. B. Lipoproteine) bzw. eines Homogenisats (z. B. Zellbestandteile, sog. Differentialzentrifugation) bei wesentlicher Verkürzung der Sedimentationszeit möglich. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist der Masse der Teilchen proportional.

Immunglobuline	Glykoproteine mit gemeinsamer Grundstruktur, die nach Kontakt des Organismus mit einem Antigen von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden und als Antikörper in Serum, Gewebeflüssigkeiten und Körpersekreten für die humorale Immunität wichtig sind (Ausnahme: Paraproteine). Ferner kommen Immunglobuline als Antigenrezeptoren auf der Zellmembran von B-Lymphozyten vor.
Kappa-Kette	Eine der beiden Isotypen der leichten Ketten der Immunglobuline.
Klon	Gruppe von genetisch identischen Zellen oder Organismen, die durch Teilung (ungeschlechtliche Fortpflanzung) aus einer einzigen Zelle oder einem einzelnen Organismus hervorgegangen sind.
Lambda-Kette	Eine der beiden Isotypen der leichten Ketten der Immunglobuline.
Monoklonal	Von einem einzigen Zellklon ausgehend bzw. produziert. Z.B. monoklonale Antikörper.
Myelom	Vom Knochenmark ausgehender Tumor. In der Regel ist das Plasmozytom gemeint.
Pathogen	Krankheitserregend, krank machend.
Plasmazelle	Ovale Zellen (Ø 14-20 µm) mit ungranuliertem Zytoplasma (reich an endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen), gut entwickeltem Golgi-Apparat und relativ kleinem, exzentrisch gelegenen Kern mit sog. Radspeichenstruktur des Chromatins. Differenzierungsform der B-Lymphozyten. Lebensdauer beim Menschen ca. vier Tage. Vorkommen: u. a. in der Umgebung kleinerer Blutgefäße, im lymphatischen System, Knochenmark, Stroma verschiedener Drüsen, in der Darmschleimhaut, während Menstruation und Schwangerschaft in der Uterusschleim-

haut. Vermehrt z. B. bei chronischen und schweren viralen Infekten, Plasmozytom, Leberzirrhose, vermindert bei Agammaglobulinämie. Funktion: als hauptsächliche Produzenten der Immunglobuline Träger der humoralen Immunität, wobei zu einem Klon gehörende Plasmazellen nur einen bestimmten Antikörper produzieren.

Polyklonal

Von mehreren verschiedenen Zelltypen abstammend.

Primäre lymphatische Organe

In den primären (zentralen) lymphoepithelialen Organen (Knochenmark, Thymus, Äquivalent der Bursa Fabricii) findet die Lymphozytopoese statt.

Rezeptor

In Zellmembran, Zytoplasma oder Zellkern lokalisierte Rezeptoren dienen zur Aufnahme bestimmter (endogener) Signale, die durch spezifische Liganden (z. B. Neurotransmitter, Hormone, Mediatoren, Antikörper, Antigene, auch Pharmaka) vermittelt werden. Eine Zelle besitzt häufig mehrere Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität. Bedeutung: Die über Rezeptoren gesteuerten physiologischen und biochemischen Prozesse sind vielfältig. Die Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern wird von Rezeptoren vermittelt.

Geräte

Durchflußzytometer

FACScan

Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg

Pipetten & Pipettenspitzen

Eppendorf Reference (Fixvolumen & Variabel)

Hersteller: Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg

Probenröhrchen

Zentrifugenröhrchen zur durchflußzytometrischen Bestimmung „Falcon“ 5 ml mit Rundboden, Art.-Bez.: Falcon Blue Max, Art.-Nr.: 352008

Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg

Spitzbodenröhrchen

Zentrifugationsröhrchen „Falcon“ 15 ml & 50 ml mit Spitzboden, Art.-Bez.: Falcon Blue Max, Art.-Nr. 352095 & 352073

Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Zentrifuge

Heraeus Minifuge RF

Hersteller: Heraeus Med GmbH, Heraeusstr. 12-14, 63450 Hanau

Reagenzien

Destilliertes Wasser

Ampuwa R, pyrogenfreies Aqua dest.
Hersteller: Fresenius, Bad Homburg

Ficoll-Hypaque

Ficoll-Hypaque
Hersteller: Pharmacia Biotechnology
Int., Uppsala, Schweden

PBS

ohne Ca, Mg, Na
Hersteller: GIBCO BRL, Eggenstein

Trypan Blau

Hersteller: GIBCO BRL, Eggenstein,
Deutschland

Lyse

FACS™ Lysing solution
Hersteller: Beckton-Dickinson, Heidel-
berg, Deutschland

Ortho-mune

Lysing reagent
Hersteller: Ortho-Clinical Diagnostics
GmbH, Neckargemünd, Deutschland

Danksagungen

Ich möchte mich bei allen denen bedanken, die mich mit Rat und Tat bei der Planung und Durchführung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Professor Dr. med. U. Dührsen für die Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Dissertation, sowie Herrn Professor Dr. med. P. Meusers für die Übernahme des Referates.

Herrn PD Dr. med. H.-G. Höffkes danke ich herzlich für die Überlassung des Themas. Seine wertvollen Ratschläge waren für die Durchführung der Versuche sowie für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit sehr hilfreich. Zu außerordentlichem Dank bin ich ihm für die zahlreichen Unterstützungen, die er mir bei der Einarbeitung in das Fachgebiet der Hämato-/Onkologie gewährt hat, verpflichtet.

Für die ausgiebige Unterstützung bei den Laboratoriumsarbeiten und die Einführung in die immunhämatologischen Untersuchungsmethoden möchte ich mich bei Frau Ute Schmücker ganz herzlich bedanken. Die freundliche Atmosphäre, die ich während unserer Zusammenarbeit genießen durfte, war für mich von großer Hilfe.

Lebenslauf

Vorname, Name:	Gernold Schmidtke
Geburtsdatum:	19.10.1967
Geburtsort:	Essen
Eltern:	Günther Schmidtke Elisabeth Schmidtke, geb. Hörnemann
8/74-7/78	„Bardeleben“-Grundschule in Essen
8/78-6/87	„Burggymnasium“ in Essen Abschluß: allgemeine Hochschulreife
10/87-3/90	Studium der Chemie an der Universität- Gesamthochschule in Essen
4/90-6/91	Zivildienst als Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst in Essen, Ausbildung als Rettungsassistent
4/92-3/94	präklinisches Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der „Heinrich-Heine“ Universität in Düsseldorf
4/94-3/98	klinisches Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Essen
11/98	Abschluß des Medizinstudiums mit dem 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
3/99–6/99	Arzt im Praktikum am Universitätsklinikum in Essen, Klinik für Immunologie
7/99-8/00	Arzt im Praktikum am St. Josef Hospital, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Klinik für Anästhesiologie
9/00-6/01	Berater im Gesundheitswesen beim debis Systemhaus, Solutions for Healthcare, Düsseldorf

07/01-12/01

Berater im Gesundheitswesen bei der
synaix Healthcare GmbH, Aachen

seit 01/02

freiberufliche Tätigkeit als Berater im
Gesundheitswesen