

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Hämatologie
Zentrum für Innere Medizin

**Der Effekt von Interferon-Alpha
auf die Knochenmarkstromafunktion**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

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

Vorgelegt von
Anna Lübking
aus Münster
2003

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. U. Dühsen
2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. N. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 12.Mai 2004

Inhalt

Abkürzungen	5
1. Einleitung	7
1.1 Hämatopoese im Knochenmark	7
1.1.1 Struktur und Funktion des Knochenmarkstroma	8
1.2 Die chronische myeloische Leukämie	12
1.2.1 Zytogenetische Grundlagen	12
1.2.2 Klinik und Verlauf der chronischen myeloischen Leukämie	13
1.2.3 Therapiekonzepte der chronischen myeloischen Leukämie	15
2. Hintergrund der Arbeit	18
3. Materialien	19
3.1 Medien	19
3.2 Reagentien	19
3.3 Auswahl wichtiger Geräte	20
3.4 Sonstiges	21
4. Methoden	22
4.1 Zellaufbereitung	22
4.1.1 Gewinnung der Knochenmarkzellen	22
4.1.2 Erythrozytendepletion mittels Gravitäts-Sedimentation	22
4.1.3 Zellzahlbestimmung	22
4.1.4 Isolierung der mononukleären Zellfraktion	22
4.2 Knochenmarklangzeitkultur	23
4.2.1 Ansetzen der Kulturen	23
4.2.2 Behandlung mit Interferon-Alpha	23
4.2.3 Bestrahlung der Kulturen	24
4.2.4 Überschichtung mit mononukleären Zellen	24
4.3 Funktionelle Assays	25
4.3.1 Bestimmung der Kolonie-bildenden Zellen mittels Granulozyten-Makrophagen-Assay	25
4.3.2 Herstellen einer Stromazellsuspension aus dem adhärensten Stromalayer	26
4.4 Zytozentrifugenpräparate	28
4.5 Auswertung der Daten	28

5. Ergebnisse	29
5.1 Knochenmarklangzeitkulturen	29
5.1.1 Einmal wöchentliche Vorbehandlung mit Interferon-Alpha	29
5.1.2 Zweimal wöchentliche Vorbehandlung mit Interferon-Alpha	30
5.2 Zelldifferenzierung	34
6. Diskussion	42
6.1 Diskussion der Methode	42
6.2 Effekt von Interferon-Alpha auf das hämatopoetische Mikromilieu	44
6.2.1 Interferon-Alpha hemmt die Expression hämatopoetischer Zytokine	45
6.2.2 Interferon-Alpha verändert die Zusammensetzung des Knochenmarkstromas	46
7. Zusammenfassung	49
8. Literaturverzeichnis	50
Lebenslauf	61

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AL	Adhärenter Stromalayer
Ara-C	Cytosinarabinosid
BCR	Breakpoint Cluster Region
BFU-E	Kolonien früher erythropoetischer Vorläuferzellen (<i>Burst-forming unit-erythroid</i>)
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>Bovine serum albumin</i>)
CFU-E	Kolonie bildende erythropoetische Vorläuferzellen (<i>Colony-forming unit-erythroid</i>)
CML	Chronische myeloische Leukämie
E-CFC	Erythrozyten- Kolonien bildende Zellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Erythropoetin
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	Kolonien stimulierender Faktor
G-CFC	Granulozyten- Kolonien bildende Zellen
GM-CFC	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien bildende Zellen
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor
GVHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (<i>Graft-versus-host-disease</i>)
Gy	Gray
HLA	Menschliches Leukozytenantigen (<i>Human leucocyte antigen</i>)
HU	Hydroxyurea
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves Modified Dulbecco`s Medium
JÜR	Jahresüberlebensrate
kDa	kiloDalton
KMT	Knochenmarktransplantation
LTBMC	Knochenmarklangzeitkultur (<i>Long-term-bone-marrow-culture</i>)

LTCM	Langzeitkulturmedium (<i>Long-term-culture-medium</i>)
M-CSF	Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor
M-CFC	Makrophagen-Kolonien bildende Zellen
Meg-CFC	Megakaryozyten-Kolonien bildende Zellen
MegE-CFC	Megakaryozyten-Erythrozyten-Kolonien bildende Zellen
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Ph(+)	Philadelphia-Chromosom positiv
PDGF	Platelet-derived growth factor
s	Standardfehler
Tab	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin

1. Einleitung

1.1 Hämatopoese im Knochenmark

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen sind gekennzeichnet durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Neubildung ausreifender Blutzellen und sind bei gesunden Menschen fast ausschließlich im Knochenmark lokalisiert. Aus dieser Stammzellpopulation gehen für die unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien determinierte Vorläuferzellen mit begrenztem Teilungspotential hervor, die zu den verschiedenen Typen spezialisierter Blutzellen reifen (Metcalf et al. 1989, Torok-Storb et al. 1988). Frühere Beobachtungen einer nicht zufälligen räumlichen Verteilung der erythroiden sowie der myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark führten zu der Vermutung, dass hämatopoetisches Gewebe eine differenzierte Struktur besitzt, die eine wesentliche Bedeutung für die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen hat (Lambertsen et al. 1984, Lord et al. 1975). Die Entwicklung experimenteller Methoden wie *in vitro* – Assays für hämatopoetische Vorläuferzellen (Metcalf et al. 1979), *in vitro* – Knochenmarklangzeitkulturen (Dexter et al. 1984) sowie die Genklonierung für verschiedene hämatopoetische Zytokine (Olsson et al. 1992, Sieff et al. 1987) ermöglichte weitere umfassende Untersuchungen der strukturellen und physiologischen Eigenschaften des hämatopoetischen Milieus, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die auf diesem Weg gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Blutbildung über komplexe Interaktionen zwischen hämatopoetischen Zellen sowie den unterschiedlichen Stromazellen reguliert wird und der Funktion der Knochenmarkstromazellen hierbei eine entscheidende Rolle zukommt (Cashman et al. 1990, Eaves et al. 1991, Liesveld et al. 1989).

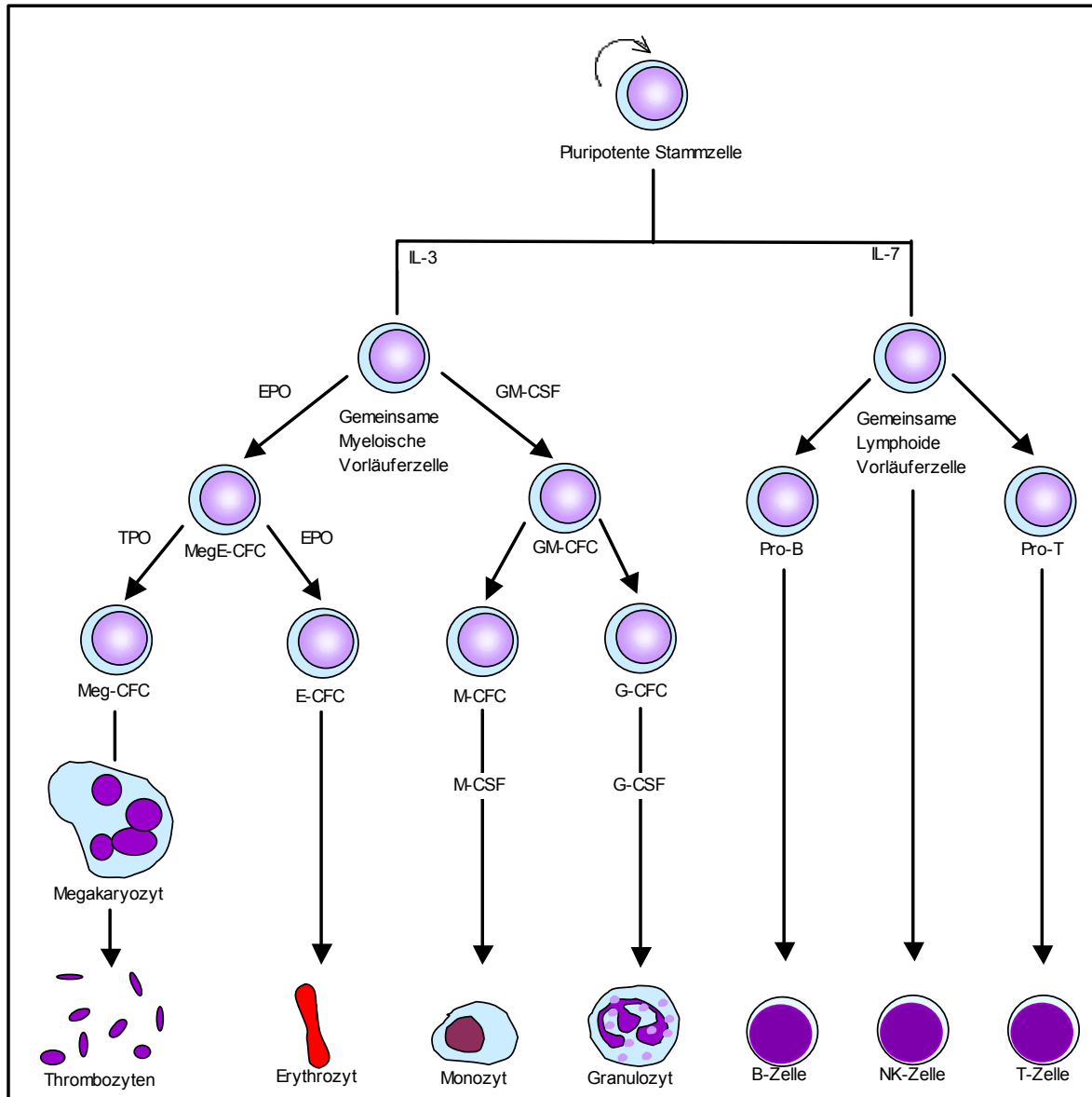


Abb. 1: Schematisches Modell der Hämatopoese. Dargestellt ist die Abstammung differenzierter Blutzellen aus einer gemeinsamen, pluripotenten Stammzelle. Verschiedene Regulations- und Selektionsmechanismen wie der Einfluss linienspezifischer Zytokine bestimmen den weiteren Ablauf: Über mehrere Zwischenschritte erfolgt die Reifung von Progenitorzellen der einzelnen Differenzierungsrichtungen hin zu den voll funktionstüchtigen zellulären Blutbestandteilen (nach Akashi et al. 2000).

1.1.1 Struktur und Funktion des Knochenmarkstroma

Knochenmarkstromazellen scheinen strukturell in hämatopoetischen Mikromilieus organisiert zu sein. Der Begriff des hämatopoetischen Mikromilieus beschreibt ein lokales Netzwerk, das in der Lage ist, durch komplexe Interaktionen die Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen beziehungsweise Vorläuferzellen zu beeinflussen.

Es setzt sich zusammen aus:

- verschiedenen Populationen von Stromazellen wie Fibroblasten, Makrophagen, Fettzellen und Endothelzellen,
- akzessorischen Zellen wie B- und T- Lymphozyten und Natürlichen Killer(NK)-Zellen,
- Stammzellen, definiert durch ihre Fähigkeit der stetigen Selbsterneuerung und Bildung von Vorläuferzellen aller verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien,
- Vorläuferzellen, die in ihrem Teilungs- und Differenzierungspotential auf eine bestimmte Zelllinie festgelegt sind und
- reifen Zellen.

(Dorshkind 1990, Mayani et al. 1992a, Torok-Storb et al. 1988).

Den größten Anteil der Knochenmarkstromazellen scheinen fibroblastäre Zellen auszumachen. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass diese weder von der hämatopoetischen Stammzellpopulation noch von phagozytären Zellen abstammen, sondern aus eigenen Kolonie-bildenden Fibroblasten, mesenchymalen Stammzellen, hervorgehen (Friedenstein et al. 1970, Castro-Malaspina et al. 1980). Es können zwei Typen fibroblastärer Zellen unterschieden werden:

1. Adventitielle Fibroblasten, die Endothelzellen auf der abluminalen Seite umgeben und unter anderem den Übertritt reifer Blutzellen in die Knochenmarksinus regulieren.
2. Fibroblasten, die innerhalb der blutbildenden Areale lokalisiert sind und durch ihre zytoplasmatischen Ausläufer sowohl ein stützendes Gerüst bilden als auch direkt mit den hämatopoetischen Zellen in einem Zell-Zell-Kontakt stehen (Lichtman 1984, Shaklai et al. 1979).

Makrophagen gehen dagegen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor (Bradley et al. 1966). Sie umgeben einerseits die perisinusoidalen Endothelzellen, sind zum anderen aber auch in erythroblastischen Arealen lokalisiert, wo einzelne Makrophagen von reifenden Erythroblasten umgeben werden. Diese „zentralen Makrophagen“ sind in der Lage, hämatopoetische Wachstumsfaktoren freizusetzen, und stehen außerdem über interzelluläre Verbindungen wie gap junctions mit den erythroblastischen Vorläuferzellen in direktem Kontakt (Campbell et al. 1987). Ihnen scheint daher eine Schlüsselrolle in der Reifung erythrozytärer Zellen zuzukommen (Shaklai et al. 1979, Lichtman 1984). Weniger eindeutig ist dagegen, welchen Einfluss Endothelzellen und Fettzellen auf die Blutbildung haben. Es konnte aber gezeigt werden, dass beide

Zellpopulationen ebenfalls zur Bildung hämatopoetischer Wachstumsfaktoren fähig sind (Lanotte et al. 1982, Quesenberry et al. 1987).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des hämatopoetischen Mikromilieus ist die extrazelluläre Matrix – eine Substanz mit hochorganisierter Struktur, die von verschiedenen Stromazellen, vor allem von Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet wird. Hauptbestandteile sind Kollagen, Proteoglykane sowie die Glykoproteine Fibronectin und Laminin (Campbell et al. 1986, Nathan et al. 1987, Owen et al. 1988). Diese Struktur hat nicht nur eine physikalisch stabilisierende Funktion, sondern ist auch an der Interaktion zwischen Stromazellen und hämatopoetischen Zellen beteiligt. So konnte beobachtet werden, dass Glykosaminoglykane als Bestandteil der Proteoglykane die von Stromazellen sezernierten Wachstumsfaktoren binden können (Gordon et al. 1987a). Weiterhin konnten für das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure spezifische Rezeptoren identifiziert werden, die eine Freisetzung von IL-1 β und IL-6 durch Makrophagen vermitteln (Khaldoyanidi et al. 1999).

Die Hämatopoese kann demzufolge durch verschiedenen Mechanismen auf positive oder negative Weise beeinflusst werden. Wesentlich sind hierbei direkte Zell-Zell-Kontakte, Produktion und Sekretion von löslichen oder membrangebundenen Zytokinen, Bildung der extrazellulären Matrix sowie Expression von Adhäsionsrezeptoren und ihren Liganden (Clark et al. 1987, Dexter 1982, Gordon et al. 1987a, Makgoba et al. 1988, Metcalf 1989).

Verschiedene Zytokine, die von entscheidender Bedeutung für die Regulation von Wachstum und Differenzierung hämatopoetischer Vorläufer- und Stammzellen sind, konnten bisher identifiziert werden. Sie werden zu einem großen Anteil von Stromazellen produziert und können einen stimulierenden oder hemmenden Einfluss auf die Hämatopoese ausüben (siehe Tab.1) (Cashman et al. 1990, Delwiche et al. 1985, Eaves et al. 1991, Mayani et al. 1992b, Sieff 1987).

Tab. 1: Beispiele für von Stromazellen produzierte Zytokine

Produzierende Zelle	Stimulatorische Zytokine	Inhibitorische Zytokine
Makrophagen	IL-1, IL-6 G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF	TGF- β , TNF- α , IFN- α
Fibroblasten	IL-1, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF	IFN- β
Endothelzellen	IL-1, G-CSF, GM-CSF	
T-Lymphozyten	IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF	IFN- γ , IFN- α

Die Wirkungsweise der Zytokine spiegelt die Komplexität der zellulären Interaktionen des hämatopoetischen Mikromilieus wieder. Vermittelt durch transmembranöse Rezeptoren oder zytokinbindende Proteine (Olsson et al. 1992) ist der Effekt sowohl von der Zytokinkonzentration als auch von der Art und dem Reifungsgrad der Zielzelle abhängig (Dorshkind et al. 1990). Die Zytokine - produzierenden Stromazellen unterliegen zudem selber der Regulation durch verschiedene – sowohl eigene als auch fremde – Zytokine (Pietrangeli et al. 1988). Es kann daher eine kontinuierliche, basale von einer induzierten, bedarfsabhängigen Zytokinproduktion unterschieden werden (Dorshkind et al. 1990, Mayani et al. 1992a). Beispielsweise kann TNF- α oder IL-1 sowie Endotoxin im Rahmen einer Entzündungsreaktion die Produktion von verschiedenen Kolonie-stimulierenden Faktoren, aber auch zusätzlich von IL-1 und anderen stimulatorischen Zytokinen durch Stromazellen wie Fibroblasten und Makrophagen induzieren. Diese Faktoren wirken dann einzeln oder aber in ihrer Summe additiv oder auch synergistisch auf myeloische Vorläuferzellen und hätten in diesem Fall eine Steigerung der Granulopoese zur Folge (Broudy et al. 1986, Metcalf 1989).

Die Situation in vivo ist noch weitaus komplexer als diese in vitro beobachteten Zusammenhänge. Es wird aber deutlich, dass die Produktion von Blutzellen im Knochenmark das Ergebnis eines Gleichgewichts aus stimulierenden und inhibierenden Faktoren ist und wesentlich von den Zellen des Mikromilieus beeinflusst wird (Toksöz et al. 1980).

1.2 Die chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung, der eine maligne Entartung einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle zugrunde liegt. Die Folge ist die unkontrollierte Expansion des neoplastischen Zellklons mit Auftreten myeloischer Zellen aller Reifungsstadien bis hin zu primitiven Stammzellen im peripheren Blut (Gordon et al. 1996). Zwar scheint radioaktive Strahlung die Inzidenz der CML zu erhöhen wie nach dem Atombombenabwurf von Hiroshima zu beobachten war (Brill et al. 1962), in der Mehrzahl der Fälle ist die Ursache jedoch unklar (Sawyers 1999).

1.2.1 Zytogenetische Grundlagen

Die Diagnose der CML basiert auf dem Nachweis des nach dem Ort seiner Entdeckung benannten Philadelphia-Chromosoms (Ph). Es handelt sich dabei um eine erworbene, somatische Chromosomenanomalie, die bei ca. 95% der Patienten mit CML zu finden ist (Kurzrock 2003) und erstmals im Jahre 1960 von Nowell und Hungerford als verkürztes Chromosom 22 bei Patienten mit CML beschrieben wurde (Nowell & Hungerford 1960). Dieses verkürzte Chromosom entsteht durch eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen von Chromosom 22 und Chromosom 9 $t(9;22)(q34;q11)$, bei der eine Verlagerung des zellulären Protoonkogens *c-abl* (ABL) von seiner normalen Lokalisation auf 9q34 nach 22q11 stattfindet (Rowley 1973, de Klein et al. 1982).

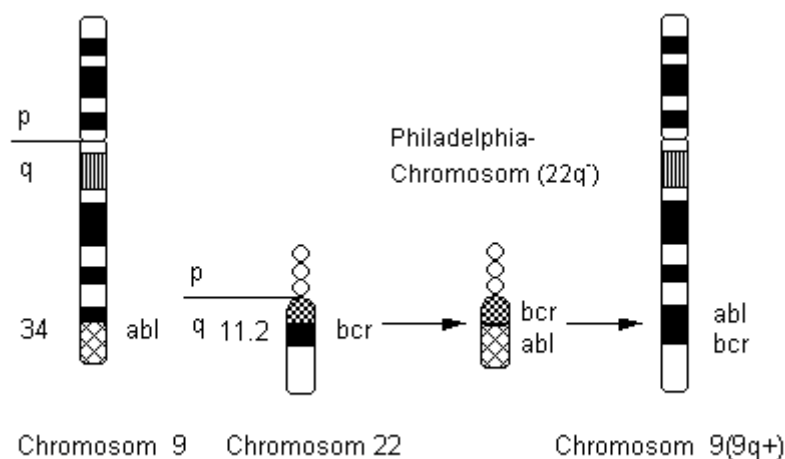


Abb. 2: Philadelphia-Translokation $t(9;22)(q34.1;q11.21)$

Diese monoklonale Stammzelltransformation lässt sich bei der CML sowohl für Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten als auch für Monozyten / Makrophagen und B – Lymphozyten nachweisen (Fialkow et al. 1977). T-Lymphozyten sind dagegen wahrscheinlich nicht betroffen (Bartram et al. 1987). Mit der Identifizierung des Philadelphia – Chromosomes als pathogenetisches Substrat war die CML die erste maligne Erkrankung, für die eine spezifische, reproduzierbare chromosomale Aberration erkannt wurde (Dreazen et al. 1988, Kurzrock et al. 2003). Durch die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden konnten in der folgenden Zeit wesentliche Erkenntnisse der Funktion dieser Chromosomenaberration gewonnen werden. Der Bruchpunkt auf Chromosom 9 liegt in der Region des c-abl-Protoonkogens, das normalerweise für eine Tyrosinkinase mit der Größe von 145kDa (p145ABL) kodiert. Die Verlagerung des verkürzten ABL-Gens in die Breakpoint Cluster Region (BCR) auf Chromosom 22 hat die Fusion der beiden Gene zum BCR-ABL-Fusionsgen zur Folge (de Klein et al. 1982, Lugo et al. 1990), das bei 98% aller Patienten mit CML nachweisbar ist (Dhingra et al. 1991). Das chimäre Fusionsgen ist abhängig von der Größe des translozierten ABL-Gens und führt zur Bildung eines Genproduktes von 210 kDa, welches eine deutlich erhöhte Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Die Funktion einer Tyrosinkinase besteht unter anderem in der zellulären Signalübertragung und der Wachstumsregulation. Daher stellt die Aktivitätserhöhung ein entscheidender Faktor für die maligne Transformation der hämatopoetischen Stammzelle in der Pathogenese der CML dar und bedingt eine Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege.

1.2.2 Klinik und Verlauf der chronischen myeloischen Leukämie

Der natürliche Verlauf der CML ist durch die unvermeidliche Progression von der symptomarmen chronischen Phase in eine aggressive, prognostisch ungünstige Blastenphase gekennzeichnet.

Aufgrund der initial meist uncharakterischen Allgemeinsymptome wie Leistungsabfall, Abgeschlagenheit und seltener Oberbauchbeschwerden, Gewichtsverlust und Fieber stellt die Diagnose in der chronischen Phase häufig einen Zufallsbefund dar (Hehlmann & Hochhaus 1998, Lengfelder et al. 2003, Sawyers 1999).

Typische Befunde während der chronischen Phase sind:

- Leukozytose mit Leukozytenzahlen bis über 600000 pro μl und einer kontinuierlichen Linksverschiebung bis zum Myeloblasten; Basophilie, Eosinophilie; meist Verminderung des alkalischen Leukozytenphosphatase-

meist Verminderung des alkalischen Leukozytenphosphatase-Index; Thrombozytose in 30% der Fälle,

- ausgeprägte Hyperplasie der Myelopoese, häufig auch der Megakaryopoese im Knochenmark; erhöhter Fasergehalt, der im Krankheitsverlauf weiter zunimmt; häufig Nachweis glycolipidspeichernder Makrophagen, den Pseudo-Gaucher-Zellen,
- Splenomegalie,
- Anämie durch Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark,
- essentiell das Vorliegen der Philadelphia-Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ oder Nachweis des BCR-ABL-Fusionsgens.

Nach einer Zeit von durchschnittlich 4 – 6, in einzelnen Fällen aber auch erst nach bis zu 10 Jahren geht die chronische Phase entweder direkt oder über eine akzelebrierte Phase allmählich in die Blastenphase über. Die Akzelerationsphase zeichnet sich durch eine Zunahme klinischer Symptome und steigende Leukozytenzahlen trotz Intensivierung der Therapie aus, und der Zeitpunkt des Auftretens ist für den Einzelfall nicht vorhersehbar.

Verantwortlich für die blastäre Transformation sind wahrscheinlich verschiedene, sekundär erworbene genetische Veränderungen, vermutlich auf der Grundlage einer durch das BCR-ABL-Gen ausgelösten genetischen Instabilität (Gordon 1996). Es kommt dabei sowohl zu Chromosomenanomalien, wie z.B. Ph-Duplikation oder Trisomie 8 (Bernstein 1988), als auch zu Mutationen oder Deletionen von Tumorsuppressorgenen wie p16 oder p53 (Sill et al. 1995, Ahuja et al. 1991). Von einer Blastenphase wird definitionsgemäß ab einem Blastenanteil von $\geq 20\%$ der Leukozyten im peripheren Blut oder der kernhaltigen Zellen im Knochenmark, bei extramedullärer Blastenproliferation oder größeren Blastensammlungen in der Knochenmarkbiopsie ausgegangen (Vardiman et al. 2002). Obwohl prinzipiell jede Zelllinie betroffen sein kann, ist der Verlauf in ca. 60% der Fälle myelo- oder monoblastisch und in 20 - 30% B-lymphoblastisch (Hehlmann & Hochhaus 1998).

Mit einer mittleren Überlebensrate von 3 bis 9 Monaten und schlechter therapeutischer Beeinflussbarkeit ist die Prognose der Blastenphase nach wie vor ungünstig.

1.2.3 Therapiekonzepte der chronischen myeloischen Leukämie

Die häufig stark erhöhten Leukozytenzahlen während der chronischen Phase erfordern meist initial eine zytoreduktive Therapie. Durch den Einsatz von Hydroxyurea (HU) ist bei guter Verträglichkeit eine wirksame und gut steuerbare Senkung der Leukozytenzahlen auf 3000 – 4500/ μ l möglich. Diese in bis zu 90% der Fälle beobachteten hämatologischen Remissionen sind nach Absetzen allerdings schnell reversibel und erfordern eine kontinuierliche Dauertherapie (Hehlmann & Hochhaus 1998, Sawyers 1999). Auf diesem Weg wird außerdem weder die Elimination des Ph⁺-Zellklons erreicht, noch die genetische Instabilität durch das BCR-ABL-Gen beeinflusst, die eine Progression zur Blastenphase bewirkt (Kurzrock et al. 2003, Sawyers 1999).

Bisher war Interferon-Alpha (IFN- α) Bestandteil der medikamentösen Therapie der CML. Es handelt sich um ein körpereigenes Zytokin, das physiologischerweise von Monozyten, Makrophagen sowie Lymphozyten gebildet wird und auf normale, aber auch auf leukämische Vorläuferzellen eine antiproliferative Wirkung hat (Balkwill & Oliver 1977, Brierley & Fish 2002). Der genaue Wirkmechanismus von IFN- α bei der Therapie der CML konnte bisher noch nicht geklärt werden. Im Gegensatz zu HU bewirkt es nicht nur stabile hämatologische Remissionen bei 70 – 80% der Patienten, sondern in wenigen Fällen (5 – 10%) zusätzlich auch dauerhafte zytogenetische Remissionen, das heißt eine völlige Elimination des Ph-Chromosoms (Ozer et al. 1993, Silver et al. 1999, Wetzler et al. 1995). Ein gutes zytogenetisches Ansprechen auf die IFN- α -Therapie, definiert als die Verringerung der Ph⁺-Metaphasen im Knochenmark auf \leq 35%, ist bei ca. 40% der Patienten zu beobachten und geht mit einer Verlängerung der Überlebenszeit um durchschnittlich ca. 20 Monate gegenüber einer konventionellen Chemotherapie mit HU einher. Die Verträglichkeit von IFN- α ist schlechter als die von HU. So kommt es zwar nur selten zu bedrohlichen Komplikationen, häufige Nebenwirkungen wie grippeähnliche Symptome, Übelkeit, Gewichtsverlust und depressive Reaktionen führen dennoch in bis zu 15% der Fälle zu einem Abbruch der Therapie (Silver et al 1999).

Im Gegensatz zu der weitgehend unspezifischen Wirkung von HU und IFN- α ist mit der Entwicklung von Imatinib (STI571) seit kurzer Zeit eine verhältnismäßig zielgerichtete medikamentöse Therapie auf molekularer Ebene möglich. Imatinib ist ein

spezifischer Inhibitor aller ABL-Tyrosinkinasen, darunter auch der 210kDa BCR-ABL-Tyrosinkinase, die, wie oben beschrieben, eine entscheidende Rolle bei der Transformation des neoplastischen Zellklons spielt (Druker et al. 2000). Erste Ergebnisse klinischer Studien zeigten bereits eine Rate hämatologischer Remissionen von 95% und zytogenetischer Remissionen von 41% in der chronischen Phase der CML – ein geringer Anteil der Patienten erreicht sogar eine molekulare Remission (Hughes et al. 2003). Der Einfluss von Imatinib auf das Gesamtüberleben kann jedoch noch nicht beurteilt werden (Kantarjian et al. 2002).

Für Patienten, die jünger als 60 Jahre sind und für die ein HLA-identischer Spender zur Verfügung steht, stellt daher die allogene Knochenmark- oder Stammzellentransplantation (KMT) als einzige kurative Option bislang die Standardtherapie der CML dar (Hehlmann & Hochhaus 1998, Lengfelder et al. 2003, Silver et al. 1999). Das Ziel besteht in der Eradikation des neoplastischen Zellklons durch eine Hochdosischemo- und Strahlentherapie, die auch zum Untergang der normalen Hämatopoese führt. Diese wird anschließend durch die Transplantation von Spenderstammzellen wiederhergestellt (Clift et al. 1982). Auf diesem Weg kann in Abhängigkeit des Risikoprofils des Patienten in bis zu 70% der Fälle eine Heilung erreicht werden. Das heißt, ein Ph-Chromosom oder ein BCR-ABL-Fusionsgen ist bei diesen Patienten im Verlauf nicht mehr nachweisbar (Gale et al. 1998, Lengfelder et al. 2003). Angestrebt wird eine Transplantation zum frühestmöglichen Zeitpunkt, da die besten Ergebnisse mit einer 5-Jahresüberlebensrate (JÜR) von 67% innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnosestellung erreicht werden. Das größte Risiko der allogenen KMT ist die nach wie vor hohe transplantationsassoziierte Mortalität in bis zu 20 – 40% der Fälle, vor allem durch Infektion oder Transplantatabstoßung (Sawyers 1999, Silver et al. 1999). Ein weiteres Problem ist die erhebliche therapiebedingte Morbidität durch akute und chronische Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GVHD), die bei 40 – 60% der Patienten auftritt und in 10% der Fälle tödlich verläuft. Durch Einführung von CML-Prognose- und KMT-Risikoscores zur Abschätzung des individuellen Risikos sowie erweiterter Möglichkeiten der Prävention opportunistischer Infektionen und schwerer GVHD konnte in den letzten Jahren eine Erhöhung der Erfolgsrate auf bis zu 70% 5-JÜR erreicht werden (Clift et al. 1982, Gratwohl et al. 1998). Die Verfügbarkeit von Spenderdateien ermöglicht in zunehmendem Maße die Transplantation HLA-kompatibler Stammzellen von nicht verwandten Spendern. Trotzdem besteht auf-

grund eines fehlenden Spenders oder des hohen Alters nur für ca. 30% der Patienten mit CML die Möglichkeit einer allogenen KMT (Sawyers 1999).

Durch die Weiterentwicklung lebensverlängernder und sogar kurativer Behandlungsstrategien befindet sich die Therapie der CML im Wandel und wird sich in Zukunft wahrscheinlich stärker am individuellen Risikoprofil des einzelnen Patienten ausrichten (Hehlmann et al. 2000). Für Patienten mit CML in erster chronischer Phase besteht zur Zeit im Rahmen der vierarmigen CML-IV-Studie die Möglichkeit einer Primärtherapie mit Imatinib in Kombination mit IFN- α oder niedrig dosiertem Cytosinarabinosid (Ara-C), Imatinib als Monotherapie oder einer IFN- α -Standardtherapie. Trotzdem sollte bei jedem Patienten, der jünger als 60 Jahre ist, direkt nach der Diagnosestellung mit der HLA-Typisierung und der Spendersuche begonnen werden (Sawyers 1999, Silver et al. 1999). Die erhebliche therapieassoziierte Morbidität und potentielle Mortalität erfordert aber vor allem bei älteren Patienten eine Risikoabwägung unter Berücksichtigung der Prognose- und Risikoscores.

2. Hintergrund der Arbeit

Aufgrund der oft bis zu Monaten dauernden Identifizierung HLA-identischer Spender kann eine allogene KMT nicht unmittelbar nach der Diagnosestellung der CML durchgeführt werden. Bisher erfolgte ein initialer Therapieversuch mit IFN- α , mit dem Ziel, durch eine komplette oder mindestens eine partielle zytogenetische Remission eine Lebensverlängerung zu erreichen.

Eine längere Vorbehandlung mit IFN- α scheint aber mit einem erhöhten Risiko transplantationsbedingter Komplikationen assoziiert zu sein und sich dadurch nachteilig auf das Ergebnis nach allogener KMT auszuwirken. In einer Arbeit von Beelen et al. konnte für Patienten, die länger als 12 Monaten mit IFN- α behandelt wurden, eine 2,5fach erhöhte transplantationsassoziierte Mortalität gezeigt werden. Diese war vor allem auf ein signifikant höheres Risiko für ein Auftreten schwerer Infektionen zurückzuführen. Darüber hinaus wurde nach einer IFN- α -Vorbehandlung eine deutlich verzögerte Wiederherstellung der Anzahl neutrophiler Leukozyten und Thrombozyten sowie eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung für Patienten mit HLA-nichtidentischen Spendern beobachtet (Beelen et al. 1995). Morton et al. beschreiben ebenfalls eine erhöhte transplantationsassoziierte Mortalität bei Patienten, die länger als 5 Monate mit IFN- α behandelt wurden. Es bestand kein Unterschied zwischen Patienten, die eine kürzere Therapie erhielten, und denjenigen, die nicht mit IFN- α behandelt wurden (Morton et al. 1998). Wird eine IFN- α -Therapie dagegen mindestens 3 Monate vor der KMT unterbrochen, ist kein nachteiliger Effekt auf das Ergebnis mehr zu beobachten (Hehlmann et al. 1999).

Diese Ergebnisse deuten auf einen von der kumulativen Dosis abhängigen nachteiligen Effekt von IFN- α hin, der nicht durch eine direkte Wirkung auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen zustande kommen kann. Vielmehr ergibt sich die Frage, inwieweit IFN- α zu einer Beeinträchtigung der Funktion des hämatopoetischen Mikromilieus führt, die die eingeschränkte Wiederherstellung der Hämatopoese zur Folge hat.

Dazu wurde in dieser Arbeit folgenden Fragen nachgegangen:

1. Hat IFN- α eine möglicherweise negative Wirkung auf die Funktion der Knochenmarkstromazellen, die Hämatopoese zu unterstützen?
2. Führt eine Behandlung mit IFN- α zu einer veränderten Zusammensetzung des Knochenmarkstromas, die einen nachteiligen Effekt auf die Wiederherstellung der Hämatopoese hat?

3. Materialien

3.1 Medien

IMDM, 350 mOsm

17,66 g Iscoves Modified Dulbecco`s Medium

(IMDM)

GibcoBRL, Paisley, GB

805 ml Ampuwa-H₂O

Fresenius Kabi, Bad Homburg

35 ml Sodium Bicarbonate Solution 7,5%

Sigma, Steinheim

10 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung

GibcoBRL, Paisley, GB

Langzeitkulturmedium

800 ml IMDM 350mOsm (s.o.)

100 ml fetales Kälberserum (FCS)

Greiner, Frickenhausen

100 ml Pferdeserum (HS)

PAA Laboratories, Linz, CH

500 µl Hydrocortison ad 5x10⁻⁷ M

Sigma, Steinheim

Granulozyten-Makrophagen-Assay-Medium

20 ml deionisiertes bovines Serumalbumin (BSA)

Sigma, Steinheim

60 ml fetales Kälberserum

Greiner, Frickenhausen

20 ml IMDM 320 mOsm

1 ml G-CSF (3 µg/ml)

Amgen, München

1 ml GM-CSF (2,5 µg/ml)

Behringwerke, Marburg

StemPro 2,3% Methylzellulose - IMDM mit

Supplements (pro 40ml):

GibcoBRL, Paisley, GB

Natrium-Selenit

Sigma, Steinheim

Monothioglycerol

Sigma, Steinheim

3.2 Reagentien

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Sigma, Steinheim

Interferon-Alpha

Intron A, Essex Pharma, München

Lymphoprep, 1077g/ml

Nycomed Pharma AS, Oslo, N

Methylzellulose

Sigma, Steinheim

May-Grünwald-Giemsa-Färbung:

May-Grünwald

Sigma, Steinheim

Giemsa Stain Stock Solution 0,4%	Sigma, Steinheim
PBS (Phosphat buffered saline) pH 7,2; ohne Ca, Mg	Klinikumapotheke, Essen
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt
Trypsin EDTA Solution, 10fach	GibcoBRL, Paisley, GB

3.3 Auswahl wichtiger Geräte

Bestrahlungsanlage:

IBL 437C, Cäsium, Gammastrahlung	CIS Bioindustries, F
----------------------------------	----------------------

Inkubatoren:

CO ₂ -Inkubator Modell MCO-17A	Sanyo, J
CO ₂ -Inkubator	Forma Scientific, Ohio, USA

Mikroskope:

- 2124739	Zeiss, Oberkochen
- Invert-Mikroskop Diavert	Leitz (Leica), Wetzlar
- Invert-Mikroskop DMIL	Leica, Wetzlar

Pipetten:

- Pipetto	
- Falcon Pipetten, steril (2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml)	
- Finnpipette (0,5 – 10 µl, 40 –200 µl, 200 – 1000 µl)	Labsystems Oy, Helsinki, FIN
- Eppendorf (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Sicherheitswerkbank:

- KL2, NV440-400E	NuAire, Plymouth, USA
-------------------	-----------------------

Videokamera:

- TK C 1360	JVC, J
-------------	--------

Bilddatenbank:

- Dhs Bilddatenbank V4.01, Version 4.0	Dietermann und Heuser Solution GmbH
--	-------------------------------------

Zentrifugen:

- Sorvall RT6000B Kühlzentrifuge	Sorvall Products, DuPont Company, USA
- Minifuge RF	Heraeus, Hanau

- Allegra GKR Centrifuge

Beckmann Coulter, Krefeld

3.4 Sonstiges

Blunt Needles „Monoject“

Sherwood Medical Company,
St. Luis, USA

Cryo Vials, steril

Greiner, Frickenhausen

Cytofunnel

Shandon Inc., Pittsburgh, USA

Filter cards

Filter:

- 0,45 µm, 0,22 µm
- Pharm Assure Syringe Filters

Greiner, Frickenhausen

Pall Corporation, Michigan,
USA

Zellkulturflasche mit Gasaustauschkappe

Greiner, Frickenhausen

Zellkulturplatten Multiwell

Becton Dickinson, Franklin
Lakes, USA

4. Methoden

4.1 Zellaufbereitung

4.1.1 Gewinnung der Knochenmarkzellen

Die Gewinnung der Knochenmarkzellen erfolgte nach vorheriger Einverständniserklärung im Rahmen einer Knochenmarkspende zur allogenen Knochenmarktransplantation.

Unter aseptischen Bedingungen wurden dazu 5 – 10 ml Knochenmarkzellen aus dem Beckenkamm gesunder Spender in eine heparinisierte Spritze aspiriert.

4.1.2 Erythrozytendepletion mittels Gravitäts-Sedimentation

Hohe Erythrozytenzahlen wirken sich ungünstig auf die Entwicklung der Knochenmarklangzeitkultur aus und erschweren das Zählen der Kolonien in Granulozyten-Makrophagen-Assays. Deshalb folgte eine Erythrozytendepletion in 0,1% Methylzellose über Gravitäts-Sedimentation bei Raumtemperatur für 30 – 40 Minuten (Coutinho et al. 1993). Der Überstand, der die kernhaltigen Zellen enthielt, wurde anschließend abpipettiert und gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension einmal mit Iscoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM) ohne fetales Kälberserum (FCS) versetzt und 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert.

4.1.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zahl der kernhaltigen Zellen zu bestimmen, wurden 0,01ml der Zellsuspension abpipettiert und mit 0,09ml Türks-Lösung versetzt. Dies bewirkte eine Lyse der verbliebenen Erythrozyten.

Anschließend erfolgte die Zählung in einer Neubauer-Kammer.

4.1.4 Isolierung der mononukleären Zellfraktion

Die Isolierung der mononukleären Zellfraktion (MNC) wurde als Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde das Knochenmark mit 50vol% IMDM verdünnt. Diese Lösung wurde langsam über die entsprechend gleiche Menge Ficoll (Lymphoprep, Dichte 1077 g/ml) als Trennlösung geschichtet und für 25 Minuten bei 400g zentrifugiert. Das Plasma und die die mononukleären Zellen enthaltende Interphase wurden abpipettiert und das gewonnene Material in IMDM gewaschen.

Um die Fraktion der adhären-ten Zellen zu eliminieren, erfolgte danach eine adhären-te Zelldepletion. Die Zellen wurden dazu in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in 5 ml IMDM+15% FCS in einer Zellkulturflasche über 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus dem Überstand in IMDM gewaschen und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt.

4.2 Knochenmarklangzeitkultur

4.2.1 Ansetzen der Kulturen

Nach der Methode von Coutinho et al. (1993) wurden die Knochenmarkzellen eines Spenders in einer Konzentration von $1,5 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml in 10 ml Langzeitkultur-medium (LTCM) pro Kulturflasche bei 33°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Anzahl von LTBMK eines Ansatzes war demnach von dem Zellgehalt des jeweiligen Knochenmarkaspirates abhängig. Es dauerte etwa 3 – 5 Wochen bis sich ein konfluentes Stromalayer ausgebildet hatte. Während dieser Zeit wurden die Kulturflaschen einmal wöchentlich gefüttert, indem 5ml des Überstandes durch frisches Medium ersetzt wurden.

4.2.2 Behandlung mit Interferon-Alpha

Nach Ausbildung eines konfluenten Stromalayers folgte die Behandlung der LTBMK mit IFN- α über 4 Wochen. Dazu wurden den Kulturen eines Ansatzes, das heißt eines Spenders, je nach Anzahl der Kulturen verschiedene Dosen IFN- α zugeteilt. In jedem Ansatz war eine unbehandelte Kontrolle sowie eine Dosis von 1000 U IFN- α vorhanden. Abhängig von der Anzahl der weiteren Kulturen desselben Ansatzes wurden diesen folgende IFN- α -Dosen zugeordnet: 100U, 10000U, 15000U und 100000U. Die ersten 11 Ansätze wurden einmal wöchentlich bei der Fütterung mit der entsprechenden IFN- α -Dosis behandelt. Eine therapeutische IFN- α -Gabe erfolgt aber mindestens zweimal wöchentlich. Deshalb wurden die Kulturen der folgenden 18 Ansätze ebenfalls zweimal wöchentlich behandelt, indem nach 3 – 4 Tagen erneut die entsprechende IFN- α -Dosis zugegeben wurde. Ein Mediumaustausch fand dabei nicht statt, und auch die Kontrolle wurde aus dem Inkubator genommen (Göllner et al, 1995; Santucci et al, 1993).

Tab. 2: Anzahl der mit verschiedenen Dosierungen von Interferon – Alpha behandelten Kulturen

1xIFN wöchentlich: 11 Ansätze

IFN- α	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	AL
Kontrolle	10	9	10	10	9	8
100U	4	3	4	3	4	3
1000U	10	10	11	11	10	9
10000U	7	7	7	8	7	8
15000U	1	1	1	1	0	0

2xIFN wöchentlich: 18 Ansätze

IFN- α	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	AL
Kontrolle	18	16	16	16	16	16
100U	11	11	11	11	11	11
1000U	15	15	15	15	15	15
10000U	16	16	16	16	16	16
15000U	4	4	4	4	4	4
100000U	2	2	2	2	2	2

4.2.3 Bestrahlung der Kulturen

Nach vierwöchiger Behandlung mit IFN- α erfolgte die Bestrahlung aller Kulturen eines Ansatzes mit Gammastrahlung in einer Blutbestrahlungsanlage mit Cäsiumquelle. Dabei wurde jeder Kultur eine Dosis von 15 Gy appliziert, die zu einer Vernichtung der hämatopoetischen Zellen unter Erhalt der Funktion der Knochenmarkstromazellen führte (Coutinho et al.1993).

4.2.4 Überschichtung mit mononukleären Zellen

Nach der Bestrahlung wurde der Überstand der Kulturen abpipettiert und die nicht adhärennten Zellen mit 10ml PBS ohne FCS abgewaschen. Es folgte die Überschichtung des adhärennten Stroma-Layers mit 1×10^5 Zellen/ml der isolierten mononukleären Zellen in 10 ml LTCM. Dabei stammten die für die Kulturen eines Ansatzes eingesetzten mononukleären Zellen immer von einem einzigen Knochenmarkspender.

Überzählige mononukleäre Zellen wurden eingefroren. Die Zellsuspension wurde dazu 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert und das Sediment in FCS+10vol% Dimethyl Sulfoxid (DMSO) in einer Zellkonzentration von $0,5 - 1 \times 10^7$ /ml resuspendiert. In Piloten-Röhrchen wurden anschließend jeweils 1 ml der Zellsuspension für 2 – 3 Tage bei -80°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert werden konnten.

4.3 Funktionelle Assays

4.3.1 Bestimmung der Kolonie-bildenden Zellen mittels Granulozyten-Makrophagen-Assay

Nach Bestrahlung und Überschichtung mit mononukleären Zellen wurde die Entwicklung der Hämatopoese durch Ermittlung der Anzahl Kolonie-bildender Zellen erfasst. Aufgrund der geringen Zellzahl war die Bestimmung der Kolonie-bildenden Zellen in Woche 0, das heißt nach Überschichten der LT BMC mit MNC, nicht möglich. Während der wöchentlichen Fütterung wurden über 5 Wochen 1×10^5 mononukleäre Zellen aus dem Überstand in 1 ml GM-Medium + 1,35vol% Methylzellulose gegeben. Mit Hilfe einer Kanüle (Blunt Needle) wurden insgesamt 0,75 ml der Suspension auf 3 Wells einer 24 Loch-Platte verteilt und die umliegenden Vertiefungen mit sterilem destillierten Wasser gefüllt, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Nach einer 14-tägigen Inkubation bei 37°C in 5% CO_2 und wasserdampfgesättigter Raumluft erfolgte die Zählung der Granulozyten-Makrophagen-Kolonien (GM-CFC) mit Hilfe eines Invertoskops. Dabei galt eine Zellansammlung von mindestens 50 Zellen als eine Kolonie. Diese konnten als Granulozyten-Kolonie (G-CFC) aus kleinen, kompakt formierten Zellen bestehen oder als Makrophagen-Kolonie (M-CFC) größere, weit gestreute Zellen enthalten. Eine GM-CFC besaß entsprechend beide Merkmale.

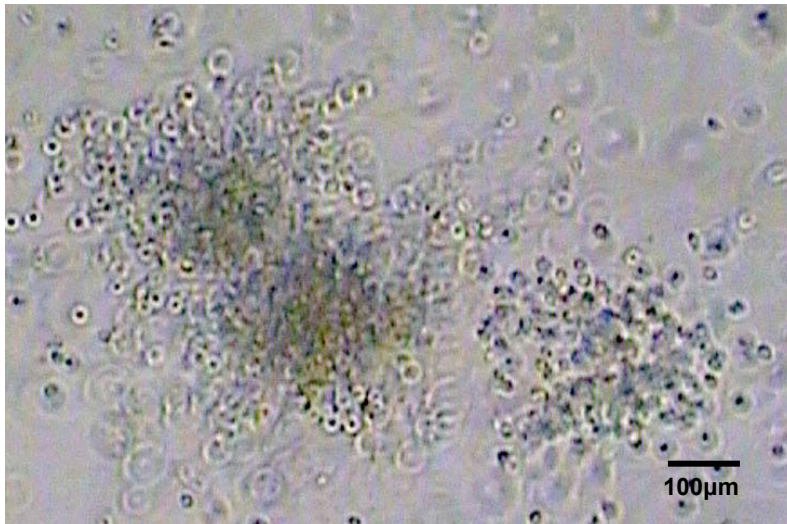


Abb. 4: Abgebildet sind unterschiedliche Typen von Granulozyten-Makrophagen-Kolonien.

Auf den Zusatz von Erythropoetin (EPO) in das GM-Medium wurde verzichtet, so daß keine Kolonien früher oder später erythropoetischen Vorläuferzellen (Burst-forming unit-erythroid, BFU-E, bzw. Colony-forming unit-erythroid, CFU-E) gezählt werden konnten.

4.3.2 Herstellen einer Stromazellsuspension aus dem adhärennten Stromalayer

In Woche 5 wurde zusätzlich die Anzahl koloniebildender Zellen des adhärennten Stroma-Layer mittels Granulozyten-Makrophagen-Assay ermittelt.

Dazu wurden der Überstand der Kulturen abpipettiert und durch Zugabe von 10ml PBS Serumrückstände abgewaschen. 1 – 2ml einfach konzentriertes Trypsin (0,25%) wurden auf den Stroma-Layer gegeben und die Kultur für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen durch mehrfaches Pipettieren in Suspension gebracht, und es erfolgte eine Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von fetalem Kälberserum (5 ml IMDM+15%FCS).

Nach dem Waschen in IMDM wurde die Zahl der Zellen in der Neubauer-Kammer bestimmt.

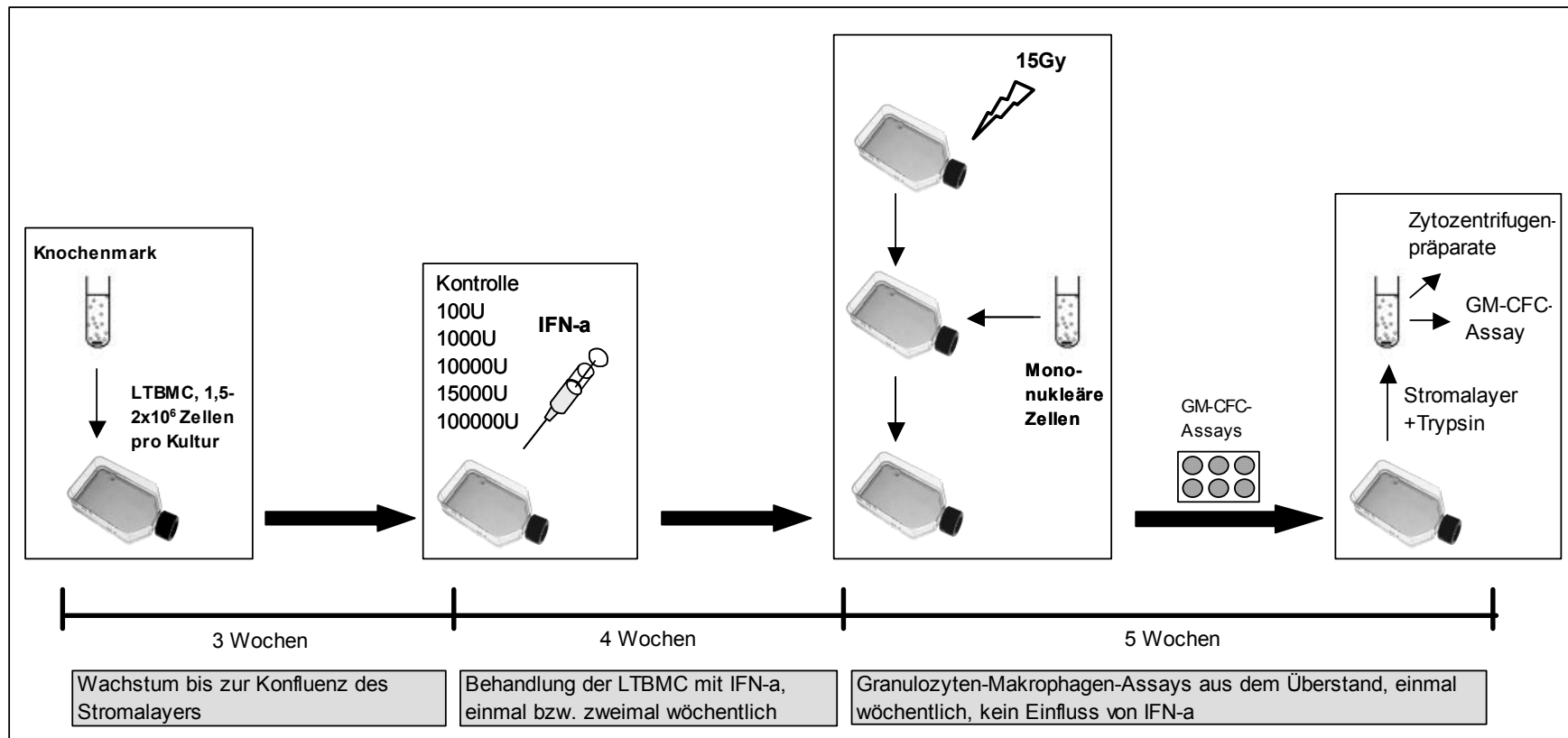


Abb. 3: Experimenteller Ablauf des in-vitro-Modells der zweistufigen Knochenmarklangzeitkultur.

4.4 Zytozentrifugenpräparate

Um die Zusammensetzung des adhärennten Stromalayers (AL) genauer zu bestimmen, wurden von einigen LTBM-Änsätzen Zytozentrifugenpräparate jeder Kultur hergestellt.

Dazu wurde die nach dem Ansatz der GM-Assays verbliebene Menge der Stromazellsuspension jeweils in eine entsprechende Menge LTCM gegeben, so dass ein Endvolumen von 200µl mit einer maximalen Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml entstand. Eine höhere Konzentration erschwert die genaue Differenzierung im Zytozentrifugenpräparat. Diese Zellsuspension wurde jeweils in einen, auf einen Objektträger gespannten Cytofunnel gegeben und 5 Minuten bei 200g in einer Zytozentrifuge zentrifugiert.

Die luftgetrockneten Präparate wurden mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt, um die Zellen der myeloischen und lymphoiden Reihe darzustellen. Nach einer Inkubation der Präparate für 3 Minuten in May-Grünwald wurden sie dazu mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 30 Minuten in 5%iger Giemsa-Lösung inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Zytozentrifugenpräparate luftgetrocknet.

Tab. 3: Anzahl der mittels Zytopins ausgewerteten Stromalayer

IFN- α -Dosis	Kontrolle	100U	1000U	10000U	15000U
Anzahl LTBM	14	9	9	11	5

4.5 Auswertung der Daten

Alle Berechnungen (Mittelwert, Standardfehler, Berechnung der unterschiedlich vorbehandelten Kulturen im Verhältnis zu den Werten der Kontrollkulturen nach einer Woche) wurden mit Hilfe des Computerprogramms Excel (Microsoft Office 2000) durchgeführt.

Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Origin (Microcal, Version 6.0).

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen IFN- α -Dosierungen der Vorbehandlung zu den Werten der Kontrolle wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ($p \leq 0.05$) angewendet. Diese statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms WinSTAT, Version 3.0, Kalmia Co. Inc. durchgeführt.

5. Ergebnisse

Die Hämatopoese im Knochenmark wird durch komplexe Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Zellen des Knochenmarkstromas reguliert. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Interferon- α auf die hämatopoetische Funktion der Knochenmarkstromazellen zu untersuchen. Daher interessierte zunächst die Entwicklung der Hämatopoese in den mit IFN- α vorbehandelten und anschließend mit mononukleären Zellen (MNC) überschichteten Knochenmarklangzeitkulturen. Diese wurde anhand der Anzahl von Granulozyten-Makrophagen-Kolonien (GM-CFC) als Ausdruck der hämatopoetischen Stromafunktion über einen Zeitraum von fünf Wochen erfasst.

5.1 Knochenmarklangzeitkulturen

5.1.1 Einmal wöchentliche Vorbehandlung mit Interferon-Alpha

Im folgenden werden die Ergebnisse der ersten 11 Ansätze von LTBMK dargestellt, die einmal wöchentlich mit IFN- α in den Dosen von 100U, 1000U und 10000U behandelt wurden.

Zunächst ist der Verlauf der GM-CFC-Anzahl in den unbehandelten Kontrollkulturen von Bedeutung. Abb. 5 zeigt für diese einen Anstieg der absoluten Kolonienanzahl in Woche 2 mit einem darauffolgendem kontinuierlichen Abfall bis in Woche 5 auf durchschnittlich 28% der Anzahl nach der ersten Woche. Dieser Verlauf entspricht dem der normalen Hämatopoese einer LTBMK.

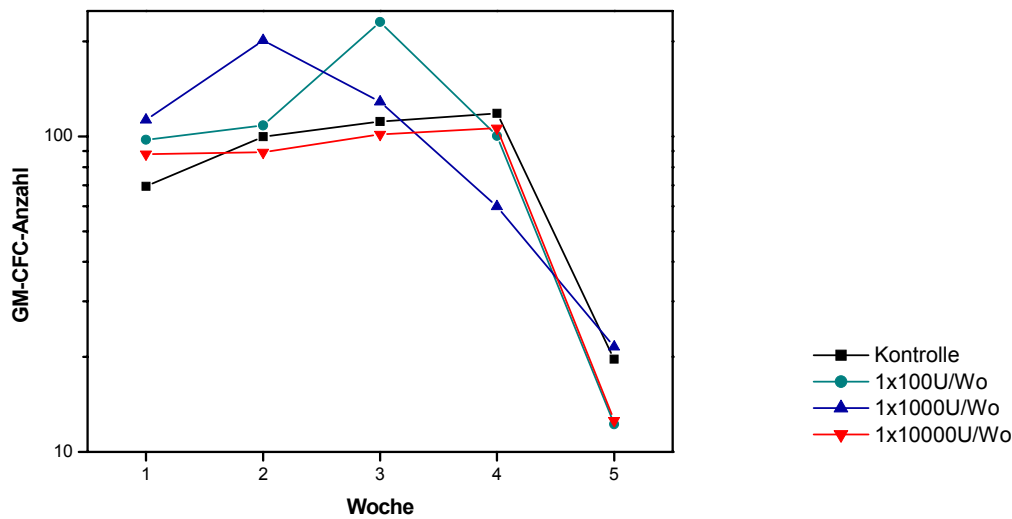


Abb. 5: Mittelwerte der absoluten Anzahl Kolonie bildender Zellen in den LTBMK über 5 Wochen. Die Vorbehandlung mit IFN- α erfolgte einmal wöchentlich.

Eine ähnliche Entwicklung konnte auch für die mit 1x100U und für die mit 1x1000U IFN- α wöchentlich vorbehandelten Kulturen beobachtet werden. Hier lag die durchschnittliche Anzahl der GM-CFC in den ersten drei Wochen oberhalb der Kolonienzahl der Kontrollkulturen. Nach vier Wochen fiel die durchschnittliche absolute GM-CFC-Anzahl unter die der Kontrollen.

Für die mit der höheren Dosis von 1x10000U IFN- α wöchentlich behandelten Kulturen war ein Verlauf der GM-CFC-Anzahl ab der zweiten Woche kontinuierlich unterhalb der Kontrollen zu beobachten.

Die nach fünf Wochen angefertigten GM-CFC-Assays zeigten eine deutliche Verminderung der Kolonienanzahl sowohl bei einer Vorbehandlung mit 1x100U als auch nach 1x10000U IFN- α wöchentlich im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollkulturen: Nach 100U betrug die GM-CFC-Anzahl noch $62\% \pm 44\%$, nach 10000U noch $64\% \pm 74\%$ der Kontrolle zum selben Zeitpunkt.

5.1.2 Zweimal wöchentliche Vorbehandlung mit Interferon-Alpha

Da die therapeutische Gabe von IFN- α bei Patienten mit CML mindestens zweimal pro Woche erfolgt, wurden weitere 18 Ansätze mit insgesamt 66 LTBMK zweimal wöchentlich mit den entsprechenden IFN- α -Dosierungen behandelt. Darüber hinaus wurden in einigen Ansätzen zusätzlich höhere Dosierungen von 2x15000U und

2x100000U wöchentlich eingesetzt. Die Ergebnisse der einmal wöchentlich und der zweimal wöchentlich behandelten Kulturansätze wurden getrennt ausgewertet.

Die folgenden Darstellungen beziehen sich auf die zweimal wöchentlich behandelten Kulturansätze. Die absolute GM-CFC-Anzahl dieser Kulturen zeigt Abb. 6.

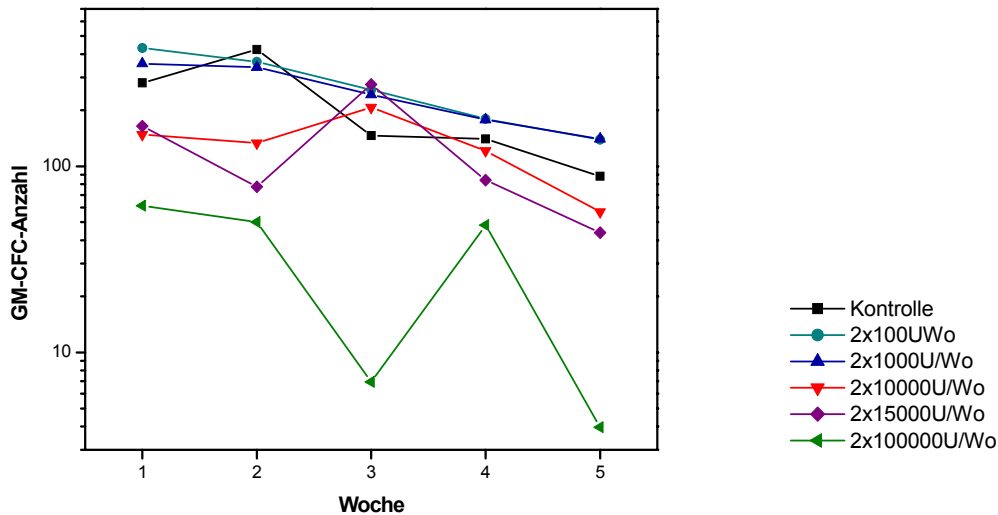


Abb. 6: Mittelwerte der absoluten GM-CFC-Anzahl über 5 Wochen. Die Vorbehandlung der LTBMCM mit IFN erfolgte zweimal wöchentlich.

Allerdings fielen bei der Auswertung der absoluten Anzahl von GM-CFC zum Teil beträchtliche Schwankungen der Kolonienanzahl zwischen verschiedenen Ansätzen auf. Um die Entwicklung der Hämatopoese in verschiedenen Ansätzen, das heißt unterschiedlichen Knochenmarkspendern, vergleichen zu können, erwies sich die Betrachtung der relativen GM-CFC-Anzahl deshalb am sinnvollsten. Dafür wurde jeder Wert innerhalb eines Kulturansatzes relativ zu der entsprechenden Kontrolle in Woche 1 berechnet. Im folgenden wird deshalb auf die relative GM-CFC-Anzahl eingegangen.

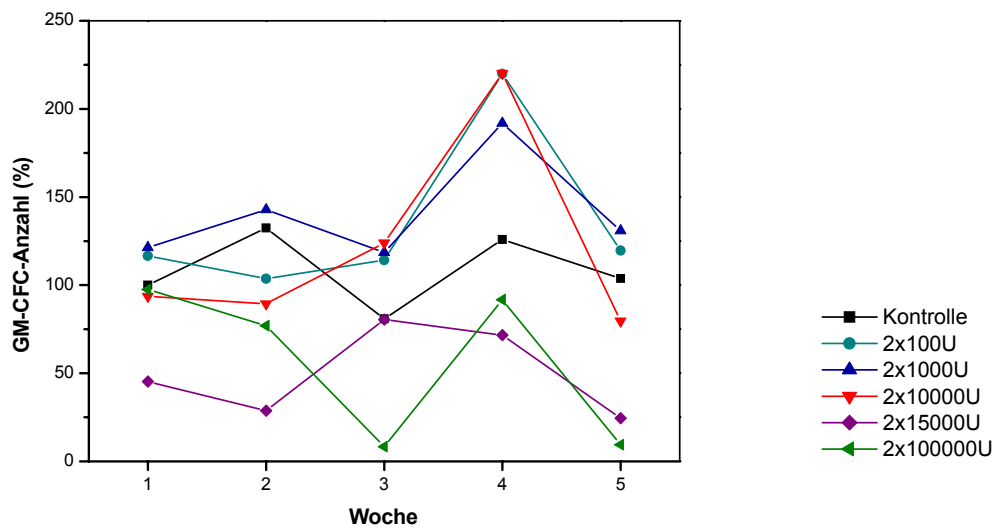


Abb. 7: Mittelwerte der relativen GM-CFC-Anzahl. Berechnet wurde diese im Verhältnis zu der Kolonienzahl in der entsprechenden Kontrolle nach Woche 1. Die Vorbehandlung der LTBMK mit IFN erfolgte zweimal wöchentlich.

In Abb. 7 fällt auf, dass die durchschnittliche GM-CFC-Anzahl bereits in der ersten Woche stark von der Kolonienzahl der unbehandelten Kontrolle abweicht. So liegen die relativen Zellzahlen der zweimal mit 100U (n=11) sowie mit 1000U (n=15) behandelten Kulturen mit 116% bzw. 121% oberhalb der Kontrolle von 100% (absolute Zellzahl $m=288,58$). Die relative GM-CFC-Anzahl der mit höheren IFN- α -Dosen vorbehandelten Kulturen lagen dagegen mit 94% bei 2x10000U (n=16), 45% bei 2x15000U (n=4) sowie 97% bei 2x100000U (n=2) unterhalb der Kontrollkulturen.

Zum Zeitpunkt der Überschichtung mit mononukleären Zellen (MNC) in Woche 0 war eine Erfassung der GM-CFC-Anzahl aufgrund der geringen Zellzahl nicht möglich. Bei dem beobachteten Effekt handelt es sich daher wahrscheinlich um einen frühen Effekt von IFN- α auf die Funktion des Knochenmarkstroma.

Die GM-CFC-Anzahlen der Kulturen, die zweimal wöchentlich mit 10000U, 15000U und 100000U IFN- α behandelt wurden, lagen mit Ausnahme von Woche 3 und 4 kontinuierlich unterhalb der Kolonienzahl der Kontrollkulturen.

Hämatopoese nach 5 Wochen

Deutlicher wird dieser Trend aber noch nach einer Entwicklung der Hämatopoese über fünf Wochen ohne direkten Einfluss von IFN- α (Abb. 8). Zu diesem Zeitpunkt unterschied sich die relative GM-CFC-Anzahl der Kontrolle mit $m = 103\%$ ($n = 16$) nicht wesentlich von dem Wert nach der ersten Woche. Eine Vorbehandlung mit IFN- α in höheren Dosierungen hatte dagegen eine Verminderung der durchschnittlichen relativen GM-CFC-Anzahl zur Folge: Mit Mittelwerten von $79,59\%$ bei $2 \times 10000\text{U}$ IFN, $24,56\%$ bei $2 \times 15000\text{U}$ IFN und $9,48\%$ bei $2 \times 100000\text{U}$ lagen diese erheblich unterhalb der Kolonienzahl der jeweiligen Kontrollkulturen nach der ersten Woche.

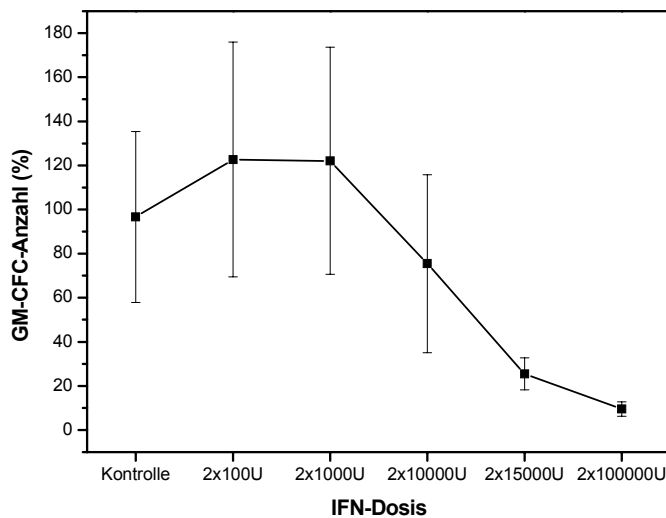


Abb. 8: Dargestellt ist die Abhängigkeit der durchschnittlichen GM-CFC-Anzahl von der Dosis der IFN- α -Vorbehandlung nach 5 Wochen einschliesslich des Standardfehlers. Die Vorbehandlung mit IFN erfolgte zweimal wöchentlich.

Ein gegenteiliger Effekt zeigte sich bei geringeren Dosierungen von IFN- α . Nach 5 Wochen konnte ein Anstieg der GM-CFC-Anzahl auf 119% nach $2 \times 100\text{U}$ und auf 130% nach $2 \times 1000\text{U}$ wöchentlich beobachtet werden.

Kumulative GM-CFC-Produktion

Die in Abb. 9 dargestellte kumulative GM-CFC-Produktion über einen 5-wöchigen Inkubationszeitraum veranschaulicht den beobachteten Trend. Geringere IFN- α -Dosierungen von 2x100U und 2x1000U hatten auch hier eine leichte Erhöhung der GM-CFC-Anzahl zur Folge. Ebenfalls bestätigte sich aber die Beobachtung, dass eine Vorbehandlung mit IFN- α ab 2x10000U wöchentlich zu einer dosisabhängigen Verminderung der Kolonienanzahl führte.

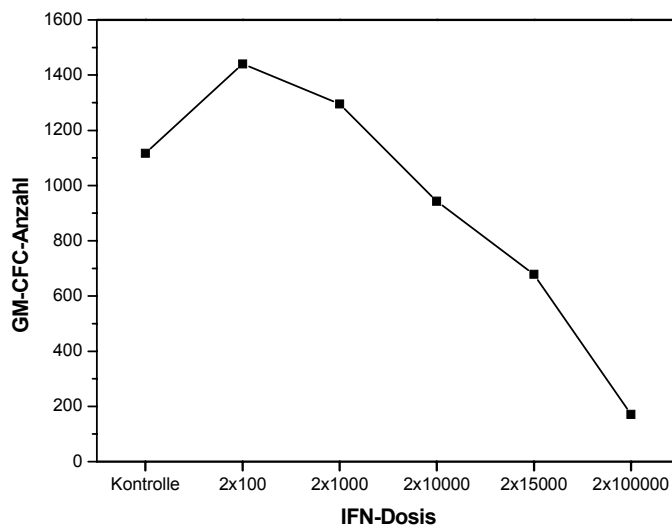


Abb.9: Kumulative GM-CFC-Produktion in 5 Wochen, berechnet für die absolute GM-CFC-Anzahl pro LT BMC. Die Vorbehandlung mit IFN erfolgte zweimal wöchentlich. Für die Berechnung wurden die absoluten GM-CFC-Werte unter einer IFN- α -Dosis innerhalb eines Ansatzes summiert und aus den Summen der Mittelwert der jeweiligen Dosis gebildet. Auf diesem Weg ist eine zusammenfassende Darstellung des hämatopoetischen Verlaufs in allen Kulturen möglich, in der die Bedeutung der starken Schwankungen der GM-CFC-Anzahl im Verlauf der fünf Wochen verringert wird.

5.2 Zelldifferenzierung

Mikroskopisch fielen bereits während der Behandlung mit IFN- α dosisabhängige morphologische Unterschiede der LT BMC auf. Es bestand der Eindruck eines insgesamt zellärmeren Stromalayers unter hohen Dosierungen IFN- α . Die Anzahl und Größe der hämatopoetischen Areale sowie die Anzahl der makrophagozytären Zellen schien mit zunehmender Dosis abzunehmen. Die Anzahl der Fettzellen schien dagegen eher zuzunehmen, während der Fibroblastenanteil nicht wesentlich beeinflusst wurde.

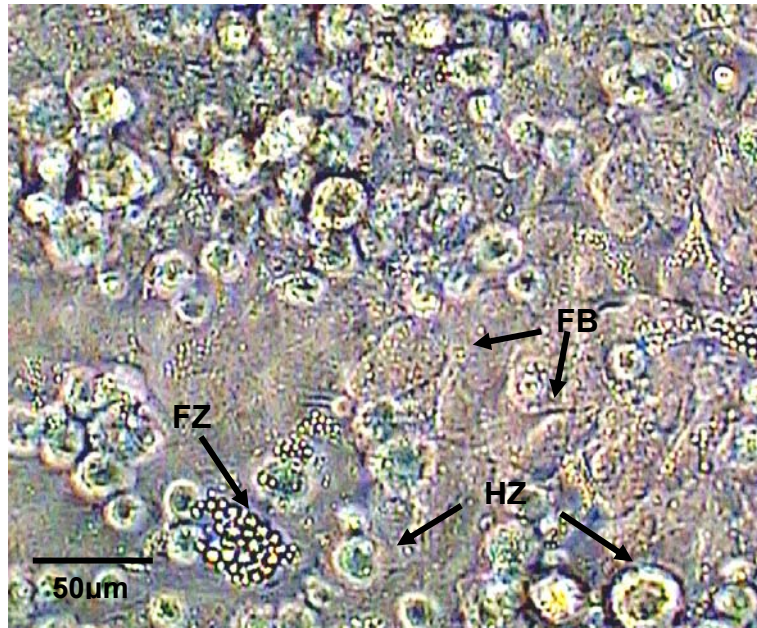


Abb.10: Adhärenter Stromalayer einer LT BMC, 5 Wochen nach Überschichtung mit MNC, Vorbehandlung mit 2×10^6 IU IFN pro Woche. Aufnahme durch ein Invertoskop, 40fache Vergrößerung. Es sind verschiedene Populationen von Stromazellen zu erkennen. Das Grundgerüst bilden Fibroblasten. Aufgrund der hohen Dichte an Zellen können diese nur anhand der zytoplasmatischen Ausläufer identifiziert werden (FB). Fettzellen (FZ) sind durch zytoplasmatische Fettkügelchen gekennzeichnet. Bei den restlichen Zellen handelt es sich überwiegend um hämatopoetische Zellen. Diese fallen durch ihre runde Form und die Doppelkontur auf (HZ).

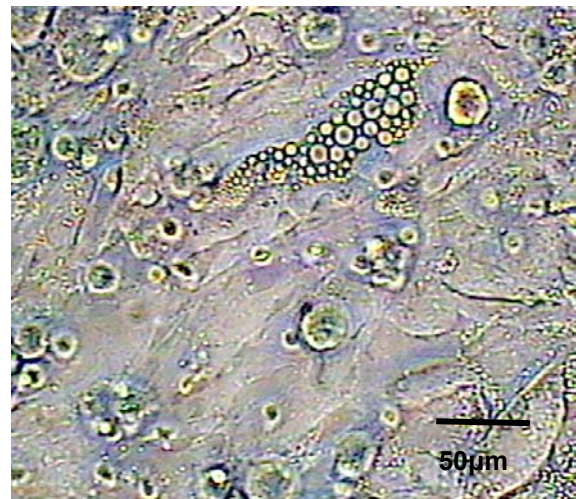
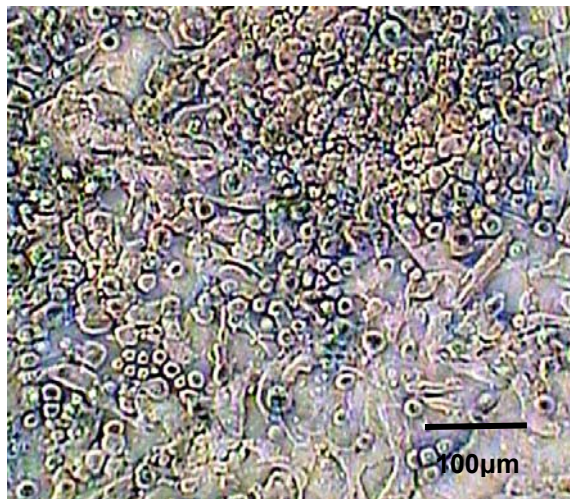


Abb. 11: Adhärenter Stromalayer von zwei LT BMC desselben Ansatzes, 5 Wochen nach Überschichtung mit MNC. Aufnahme durch ein Invertoskop. Dem Stromalayer der Kontrolle links ist auf der rechten Seite die Abbildung des Stromalayers der mit 2×10^6 IU IFN- α vorbehandelten LT BMC gegenübergestellt.

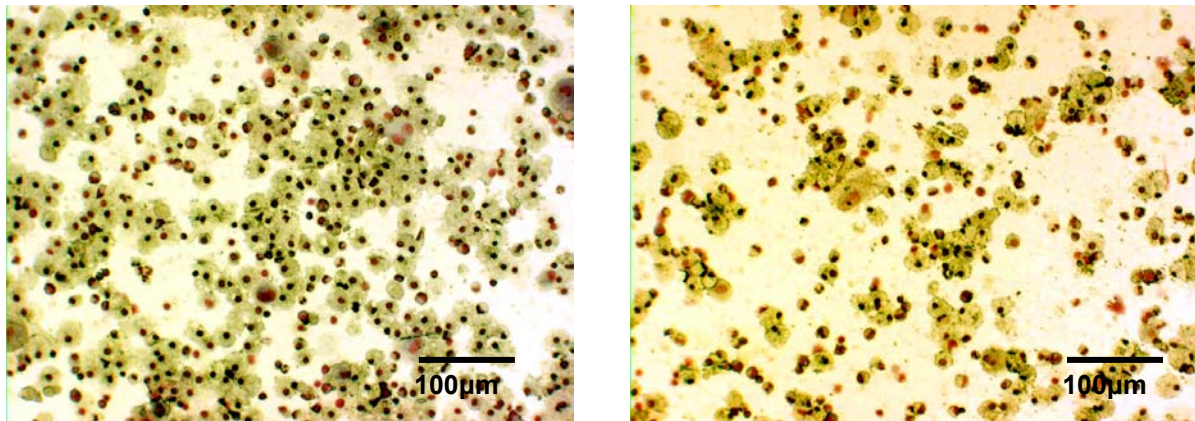


Abb. 12: Zytozentrifugenpräparate des adhärenen Layers von zwei LTBMCM desselben Ansatzes, 5 Wochen nach Überschichtung mit MNC. 32fache Vergrößerung. Links ist die Kontrolle abgebildet, der Stromalayer des Präparates auf der rechten Seite wurde mit 2x15000U IFN- α wöchentlich vorbehandelt.

Die Auswertung der Zytozentrifugenpräparate des adhärenen Stromalayers in Woche 5 ermöglichte eine objektive Beurteilung des Effekts von IFN- α auf die Zusammensetzung des Knochenmarkstromas.

Die Zellen wurden dafür in 6 Populationen (makrophagozytäre, monozytäre, granulozytäre, fibroblastäre, blastäre sowie lymphoide Zellen) differenziert. Eine Beurteilung der Fettzellenanzahl war mit dieser Methode nicht möglich. Auf diesem Weg ließ sich eine Abhängigkeit der absoluten Zellzahl verschiedener Populationen im Knochenmarkstroma von der Dosis IFN- α bestätigen, die im folgenden dargestellt werden soll.

Makrophagozytäre Zellen

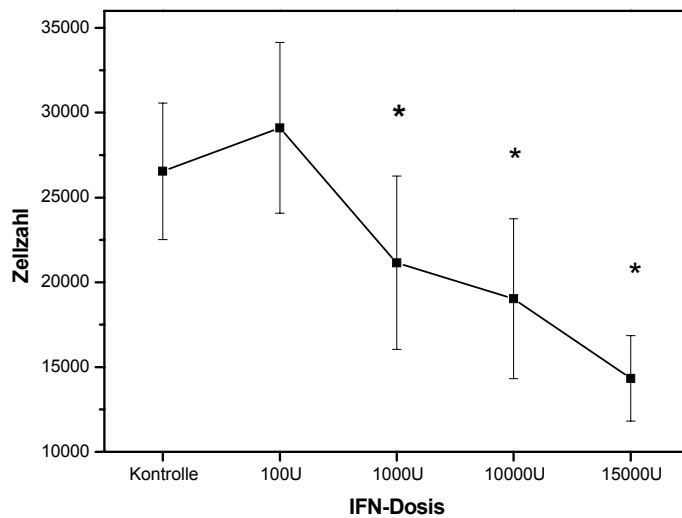


Abb. 13: Mittelwert der Anzahl makrophagozytärer Zellen im Stromalayer nach 5 Wochen ohne IFN-Einfluss. Die Vorbehandlung mit IFN- α erfolgte in den angegebenen Dosierungen. Signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ($\star p \leq 0,05$). Standardfehler.

In der makrophagozytären Zellpopulation zeigte sich zunächst ein leichter Anstieg der absoluten Zellzahl bei einer Dosis von 100U IFN- α ($n=9$) um 10% der Kontrolle mit $m=2,65 \times 10^4$; $s=1,5 \times 10^4$, $n=14$. Eine weitere Erhöhung der IFN- α -Dosis hatte eine signifikante Abnahme der makrophagozytären Zellen zur Folge ($p \leq 0,05$): eine Vorbehandlung mit 1000U IFN- α führte zu einer Verminderung der absoluten Zellzahl auf $2,12 \times 10^4$, mit 10000U auf $1,91 \times 10^4$ Zellen. Nach 15000U nahm die Zellzahl bis auf einen Wert von $m=1,43 \times 10^3$; $s=0,798 \times 10^4$, das heißt 53,96% der Kontrolle zum selben Zeitpunkt ab.

Monozytäre Zellen

Da sich die Wirkung einer IFN- α -Vorbehandlung auf die monozytären Zellen offenbar von der auf die makrophagozytären Zellen unterschied und außerdem die Zellzahl der monozytären Zellen deutlich geringer war, wurde diese Population getrennt ausgewertet. Unter Berücksichtigung der insgesamt geringen Zellzahl zeigt sich in Abb. 14, dass eine Vorbehandlung mit IFN- α keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl monozytärer Zellen im Stromalayer hatte.

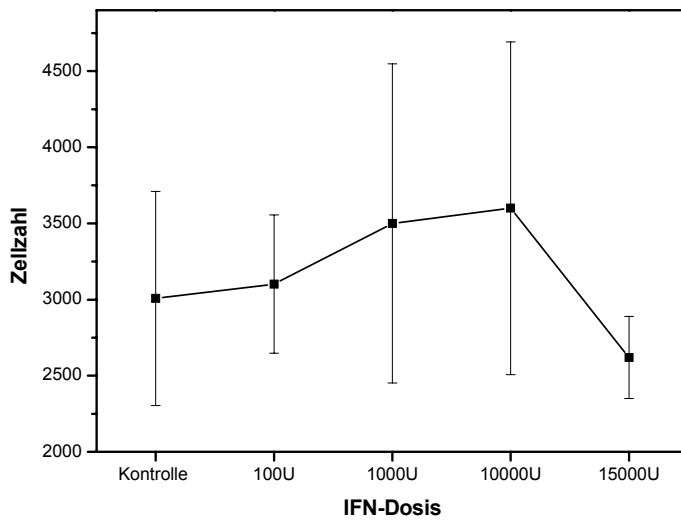


Abb. 14: Durchschnittliche Anzahl monozytärer Zellen in den mit entsprechenden IFN-Dosierungen vorbehandelten Stromalayern nach 5 Wochen ohne IFN-Einfluss. Standardfehler.

Granulozytäre Zellen

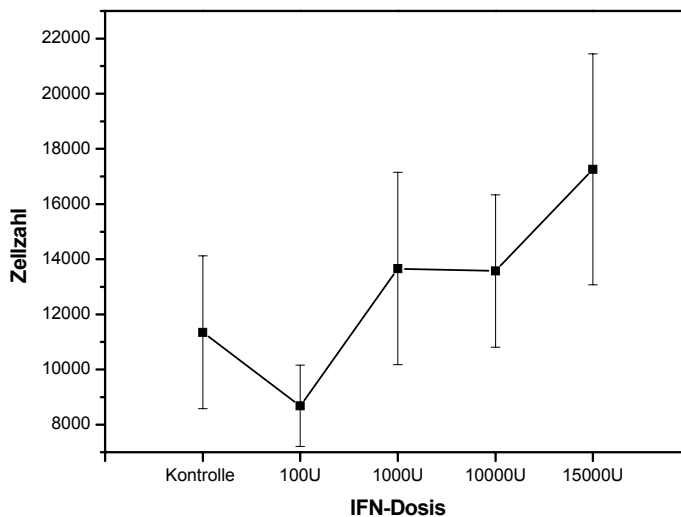


Abb. 15: Durchschnittliche Anzahl granulozytärer Zellen in den mit entsprechenden IFN-Dosierungen vorbehandelten Stromalayern nach 5 Wochen ohne IFN-Einfluss. Standardfehler.

In der Population der granulozytären Zellen zeigte sich ein Anstieg der absoluten Zellzahl mit zunehmender IFN- α -Dosis: Nach einem Abfall um 23,52% zur Kontrolle mit $m=11,35 \times 10^3$; $s=10,38 \times 10^3$ stieg die absolute Zellzahl mit zunehmender IFN- α -Dosis auf $m=17,26 \times 10^3$; $s=13,89 \times 10^3$ bei 15000U. Eine Signifikanz dieses Anstieges konnte nicht gezeigt werden.

Lymphoide Zellen

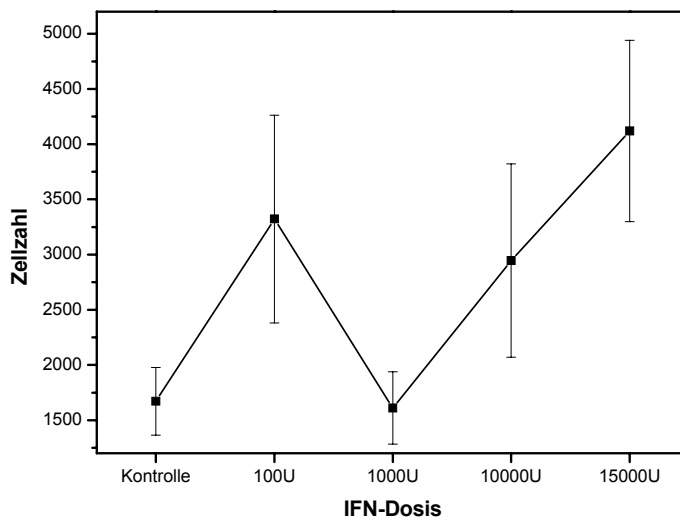


Abb.16: Mittelwert der Anzahl lymphoider Zellen im Stromalayer nach 5 Wochen ohne IFN-Einfluss. Die Vorbehandlung mit IFN- α erfolgte in den angegebenen Dosierungen. Standardfehler.

Die in der Population der lymphoiden Zellen beobachtete Schwankung der Zellzahl unter verschiedenen IFN- α -Dosen stellte sich als nicht signifikant dar. Bei geringer Gesamtzellzahl handelt es sich daher am ehesten um zufällige Schwankungen.

Blastäre Zellen

Eine Aussage über eine mögliche Wirkung einer IFN- α -Vorbehandlung auf die blastären Zellen war aufgrund der noch geringeren Gesamtzellzahl ebenfalls nicht möglich.

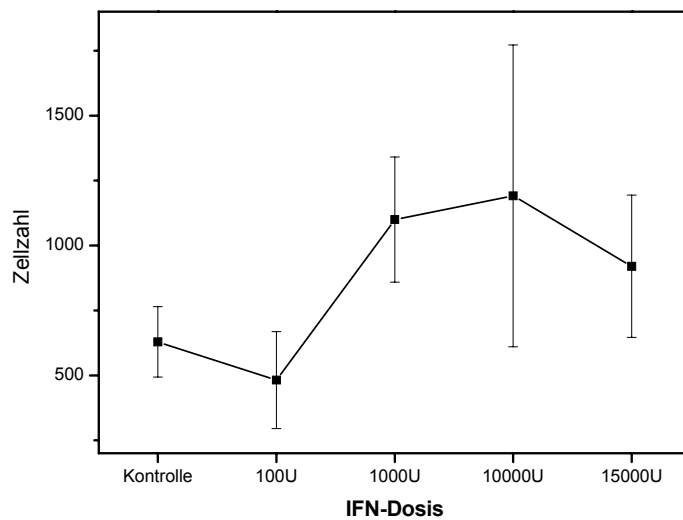


Abb. 17: Mittelwert der Anzahl blastärer Zellen im Stromalayer nach 5 Wochen ohne IFN-Einfluss. Die Vorbehandlung mit IFN- α erfolgte in den angegebenen Dosierungen. Standardfehler.

Fibroblastäre Zellen

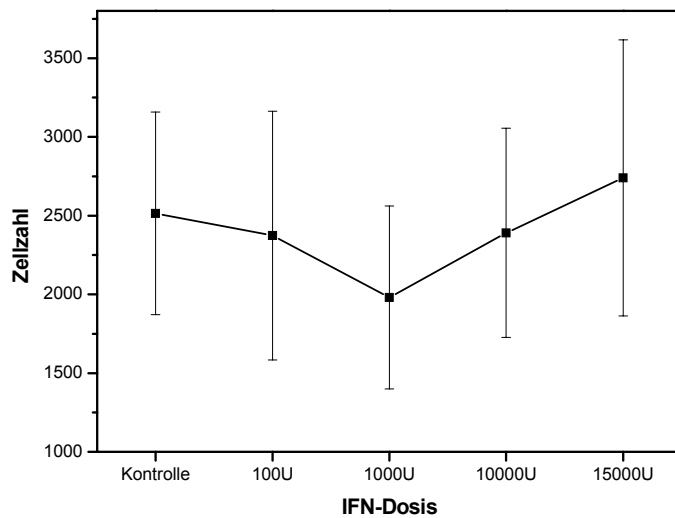


Abb. 18: Durchschnittliche Anzahl fibroblastärer Zellen in den mit entsprechenden IFN-Dosierungen vorbehandelten Stromalayern nach 5 Wochen ohne IFN-Einfluss. Standardfehler.

Auch bei der Betrachtung der fibroblastären Zellen im Knochenmarkstroma konnte unter Berücksichtigung der insgesamt geringen Zellzahl kein signifikanter Effekt der IFN- α -Dosis auf die absolute Zellzahl beobachtet werden.

6. Diskussion

Für Patienten mit CML in erster chronischer Phase und einem passenden Knochenmarkspender stellt die allogene Knochenmarktransplantation zur Zeit wahrscheinlich die einzige kurative Therapie dar. Die Zeit zur Suche eines histokompatiblen Spenders macht initial eine zytoreduktive Therapie, z. B. den Einsatz von IFN- α erforderlich (Silver et al 1999).

Bei längerer Vorbehandlung mit IFN- α vor einer allogenen KMT konnte allerdings ein erhöhtes Risiko transplantationsbedingter Komplikationen, insbesondere eines fehlenden Angehens der Spenderhämatopoese sowie eines häufigeren Auftretens schwerer Infektionen beobachtet werden (Beelen et al. 1995; Morton et al. 1998).

Es liegt also die Vermutung nahe, dass IFN- α einen negativen Effekt auf die Funktion der die Hämatopoese unterstützenden Knochenmarkstromazellen hat, der in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde.

6.1 Diskussion der Methode

Für die heutigen Kenntnisse über die Regulation der normalen Hämatopoese sowie über Veränderungen, die bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen auftreten, war die 1977 von Dexter et al. etablierte Methode des Knochenmarklangzeitkulturmodells von wesentlicher Bedeutung. Dabei ermöglichte es die in-vitro-Kultivierung zunächst muriner, später auch menschlicher hämatopoetischer Zellen erstmals, frühe Stadien der Entwicklung hämatopoetischer Zellen und Interaktionen von hämatopoetischen und Stromazellen zu analysieren. Bis zu diesem Zeitpunkt war mittels klonaler Assays nur die Proliferation und Differenzierung innerhalb einer Population reiferer, Kolonie-bildender Zellen wie GM-CFC, CFU-E oder Meg-CFU möglich (Coutinho 1993, Dexter et al. 1984). Dagegen erlaubt das System der Knochenmarklangzeitkulturen die Proliferation pluripotenter Stammzellen mit großer Selbsterneuerungskapazität, die Kolonie-bildende Zellen (CFC) sowie reife Zellen produzieren (Dexter et al. 1984).

Entscheidend für die Aufrechterhaltung des Wachstums hämatopoetischer Zellen über mehrere Monate sind die adhärenenten Zellpopulationen in diesem System, zu denen phagozytäre monozytäre Zellen, Fibroblasten und Fettzellen zählen, die eine extrazelluläre Matrix sowie Zytokine produzieren. So konnte beobachtet werden, dass es bei fehlendem Stromalayer nach 1 – 3 Wochen zu einer starken Abnahme der hämatopoetischen Aktivität kommt, während die Hämatopoese bei intaktem

Stromalayer über Monate aufrechterhalten werden kann (Dexter et al. 1977, Friedenstein et al. 1970). Dieser adhärenzte Stromalayer ist folglich in seiner Struktur und Funktion dem Knochenmarkstroma in vivo sehr ähnlich. Das System der Knochenmarklangzeitkultur stellt daher eine Methode dar, mit der sich die Verhältnisse in vivo bestmöglich reproduzieren lassen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich eine Behandlung der Knochenmarkstromazellen mit IFN- α auf ihre die Hämatopoese unterstützende Funktion auswirkt. Dafür erwies sich das Modell der zweistufigen Knochenmarklangzeitkultur deshalb am sinnvollsten, weil hier ein konfluenten und durch Bestrahlung von der endogenen Hämatopoese befreiter Stromalayer als funktionelles Standardmilieu dient, um nach Überschichtung mit neuen hämatopoetischen Stammzellen isoliert die Funktion der Stromazellen oder der hämatopoetischen Zellen untersuchen zu können (Coutinho et al. 1993). Auf diesem Weg war es möglich, erstmalig den Effekt einer Vorbehandlung des konfluenten Stromalayers mit IFN- α sowohl auf die Knochenmarkstromafunktion als auch auf die Stromazusammensetzung zu beobachten.

Dafür wurden insgesamt 119 Langzeitkulturen von 29 verschiedenen Knochenmarkspendern ausgewertet. Die dabei zu erwartende Inhomogenität der Ansätze verschiedener Knochenmarkspender zeigte sich vor allem in einer Differenz der absoluten GM-CFC-Anzahl der verschiedenen Ansätze mit allerdings konstantem Niveau und ähnlichem Verlauf der Hämatopoese innerhalb des Ansatzes eines Spenders. Es schien für den Vergleich der Wirkung verschiedener IFN- α -Dosen deshalb am sinnvollsten, die GM-CFC-Anzahl unter verschiedenen IFN-Dosen im Verhältnis zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle in Woche 1 zu berechnen. Diese Art der Auswertung von LT BMC wird in der Literatur als bewährtes Verfahren angewendet (Chen et al. 1993, Galvani et al. 1990, Santucci et al. 1993).

Da bereits in anderen Zusammenhängen verschiedene Effekte von IFN- α in Dosen von 10U/ml bis 10000U/ml wöchentlich auf LT BMC beschrieben wurden (Aman et al. 1994, Galvani et al. 1990, Santucci et al. 1993), erfolgte die Behandlung der ersten 11 Kulturansätze einmal wöchentlich mit IFN- α -Dosen von 10U/ml, 100U/ml, 1000U/ml und 1500U/ml. Abweichend von den genannten Studien erfolgt die therapeutische IFN- α -Gabe allerdings mindestens zweimal wöchentlich. Deshalb erschien

es sinnvoll, die Kulturen der folgenden 18 Ansätze entsprechend zweimal wöchentlich mit gleichen IFN- α -Dosen zu behandeln.

Die Therapie eines Patienten mit CML erfolgt üblicher Weise in einer Dosis von $5 \times 10^6 \text{U} / \text{m}^2$ IFN- α täglich. Ausgehend von einem Körpergewicht von 70kg und einer Körperoberfläche von 2m^2 erhielte dieser entsprechend $70 \times 10^6 \text{U}$ IFN- α pro Woche. Bei einer Verteilung im extrazellulären Raum von 45% des Körpergewichts würde wöchentlich kumulativ eine IFN- α -Konzentration von ca. $2500 \text{U} / \text{ml}$ erreicht werden. Diese Konzentration entspricht weitgehend den IFN- α -Dosen, bei denen in dieser Arbeit ein Effekt auf die Hämatopoese der LT BMC zu beobachten war. Diese Überlegung setzt allerdings voraus, dass das Schicksal von IFN- α im Gesamtorganismus und in den Knochenmarklangzeitkulturen ähnlich ist, was bisher experimentell nicht untersucht wurde.

6.2 Effekt von Interferon-Alpha auf das hämatopoetische Mikromilieu

IFN- α hat eine bekannte antiproliferative Wirkung sowohl auf leukämische als auch auf normale hämatopoetische Zellen. Der genaue Wirkmechanismus bei Patienten mit CML konnte bislang allerdings noch nicht vollständig geklärt werden. Die direkte Wirkung auf die hämatopoetischen Zellen, vermittelt über den Typ I IFN-Rezeptor und die darauffolgende Aktivierung verschiedener Tyrosinkinase ist dabei wahrscheinlich von wesentlicher Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) zu einer Suppression der klonalen Expansion BCR-ABL-positiver Zellen von CML-Patienten in vitro führt (Mayer et al. 2000). Dieser Mechanismus scheint ebenfalls für die wachstumshemmende Wirkung von IFN- α auf normale hämatopoetische Vorläuferzellen verantwortlich zu sein, die sowohl bei myeloischen als auch bei erythroiden Vorläuferzellen beobachtet werden kann (Verma et al. 2002).

In dieser Arbeit hatte die Überschichtung eines mit IFN- α in Dosen von $1000 \text{U} / \text{ml}$ bis $10000 \text{U} / \text{ml}$ vorbehandelten Stromalayer mit MNC eine deutliche, dosisabhängige Abnahme der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildenden Zellen (GM-CFC) im gesamten Verlauf von 5 Wochen zur Folge. Bereits in vorhergehenden experimentellen Arbeiten wurde eine antiproliferative Wirkung von IFN- α auf hämatopoetische Vorläuferzellen beschrieben, wobei ein maximaler Effekt bei Dosen von $1000 \text{U} / \text{ml}$ bis

10000U/ml wöchentlich beobachtete wurde (Broxmeyer et al. 1983, Galvani et al. 1990, Greenberg et al. 1977, Santucci et al. 1993). In allen diesen Fällen fand allerdings entweder durch Behandlung der isolierten hämatopoetischen Zellen oder aber der unbestrahlten Knochenmarklangzeitkulturen ein direkter Einfluss von IFN- α auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen statt. Wurde IFN- α (in Dosen von 10 – 100U/ml) bereits vor Konfluenz des Stromalayers zugesetzt, konnte außerdem eine wachstumshemmende Wirkung auf die Stromazellen beobachtet werden (Santucci et al. 1993, Galvani et al. 1990). In dem hier verwendeten zweistufigen Knochenmarklangzeitkulturmodell wurde dagegen erst der voll ausgebildete und damit funktionsfähige Stromalayer mit IFN- α behandelt. Dadurch konnte seine Funktion nach Eliminierung der endogenen Hämatopoese mittels der MNC eines Spenders innerhalb eines Kulturansatzes ohne weiteren Einfluss von IFN- α untersucht werden. Neben der in vorhergehenden Arbeiten beschriebenen direkten Wirkung von IFN- α lässt die hier beobachtete Verminderung der hämatopoetischen Aktivität daher zusätzlich auf einen durch die Stromazellen vermittelten Effekt von IFN- α schliessen.

6.2.1 Interferon-Alpha hemmt die Expression hämatopoetischer Zytokine

Die Modifikation der Freisetzung verschiedener Zytokine und hämatopoetischer Wachstumsfaktoren durch die Stromazellen scheint dabei von wesentlicher Bedeutung zu sein. Interleukin-1 (IL-1) wurde neben weiteren Zytokinen wie IL-3 und IL-6 als wesentlicher stimulierender Faktor der hämatopoetischen Aktivität identifiziert (Eaves 1991, Ogawa et al. 1989). So führt die Zugabe von IL-1 zu konfluenten Stromalayern zu einer erheblichen Steigerung der Produktion von G-CSF und M-CSF, die auch nach Beendigung der IL-1-Zugabe bestehen bleibt. Anschliessend ist eine Unterdrückung der G-CSF- bzw. M-CSF-Produktion durch ein Anti-IL-1-antiserum möglich, was auf eine endogene IL-1-Produktion durch die Knochenmarkstromazellen hindeutet (Fibbe et al. 1988).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Knochenmarkstromazellen mit IFN- α sowohl eine verminderte Expression der mRNA von GM-CSF und IL-1 β als auch einen erniedrigten Proteingehalt von GM-CSF und IL-1 β zur Folge hat (Göllner et al., 1995). Die verminderte Expression der Zytokine führt zu einer Abnahme der hämatopoetischen Aktivität der Knochenmarkstromazellen. Weiterhin induziert IFN- α die Produktion eines IL-1-Rezeptorantagonisten durch die Stromazellen (Aman et al.

1994). Diese Effekte treten dosisabhängig mit einem Maximum bei einer IFN- α -Dosis von 1000U/ml auf.

6.2.2 Interferon-Alpha verändert die Zusammensetzung des Knochenmarkstromas

Die CML ist häufig mit einem erhöhten Retikulinfasergehalt im Knochenmark assoziiert, der im Verlauf der Erkrankung weiter zunimmt. Das Ausmaß der Myelofibrose hat weiterhin einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Erkrankung (Kvasnicka et al. 2000). In diesem Zusammenhang erscheint es wesentlich, dass eine Monotherapie mit IFN- α bei Patienten mit CML in chronischer Phase eine fibrogene Wirkung besitzt (Thiele et al. 2000, Facchetti et al. 1997). Diese tritt innerhalb des ersten Jahres, meistens bereits nach sechs Monaten auf und ist durch eine Proliferation der Fibroblasten sowie eine verstärkte Bildung und Ablagerung von extrazellulärer Substanz gekennzeichnet. Bei der Entstehung der Myelofibrose scheinen Megakaryozyten als Mediatoren vor allem durch die Expression der mitogenen und fibrogenen Faktoren PDGF und TGF- β eine entscheidende Rolle zu spielen (Martyré 1995, Reilly 1992). Experimentelle Studien zeigten außerdem eine Beteiligung der Monozyten/Makrophagen, die ebenfalls PDGF, TGF- β sowie IL-1 produzieren (Rameshwar et al. 1996). Das in dieser Arbeit benutzte in-vitro-Modell bietet keine optimalen Bedingungen für das Wachstum von Megakaryozyten. Der Einfluss von IFN- α auf die Population der Megakaryozyten konnte daher nicht erfasst werden, die Ergebnisse in dieser Arbeit wurden somit allerdings auch nicht von einer eventuellen Zytokinproduktion durch Megakaryozyten beeinflusst.

Anhand von Zytozentrifugenpräparaten des Stromalayer in Woche 5 wurde näher analysiert, ob bei dem beobachteten Effekt auf die Hämatopoese möglicherweise eine durch IFN- α veränderte Zusammensetzung des Knochenmarkstromas von Bedeutung war. Tatsächlich zeigte sich hierbei eine deutliche, dosisabhängige Wirkung von IFN- α auf die verschiedenen Zellpopulationen des Stromalayer, die besonders ausgeprägt bei den Populationen der makrophagozytären und der granulozytären Zellen beobachtet werden konnte.

In der makrophagozytären Zellpopulation konnte ab einer Dosis von 1000U/ml eine signifikante Abnahme der absoluten Zellzahl auf 54% der Kontrolle bei 1500U/ml beobachtet werden. Eine ähnliche Reaktion wurde von Chen & Najor (1987) beschrie-

ben, die die Wirkung von IFN- α und - β auf adhärenzte und nicht adhärenzte Makrophagen im Knochenmark untersuchten. Die antiproliferative Wirkung von IFN- α zeigte sich hierbei ebenfalls dosisabhängig und bestand bei hohen Dosen sowie bei einer langen Expositionsdauer auch nach Absetzen von IFN- α weiter. Die Wirkung niedriger Dosen oder einer kurzen Behandlungsdauer war dagegen nach kurzer Zeit reversibel. Bemerkenswert ist, dass die wachstumshemmende Wirkung von IFN mit einer ebenfalls dosisabhängigen Steigerung der phagozytären und zytotoxischen Aktivität der Makrophagen assoziiert war (Chen & Najor 1987).

Makrophagozytären Zellen scheint in der Regulation der Hämatopoese eine entscheidende Funktion zuzukommen. So konnten sie als eine Quelle von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder M-CSF (Chen et al. 1993, Fibbe et al. 1988, Rich 1986, Wang et al. 1990) und Zytokinen wie IL-1 (Lovhaug et al. 1986) identifiziert werden und fungieren dabei als Bestandteil komplexer Interaktionen zwischen verschiedenen Typen von Knochenmarkstromazellen, die ihrerseits zur Produktion von Zytokinen und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren fähig sind (Chen et al. 1993).

IFN- α führt demnach sowohl zu einer Hemmung der parakrinen Expression hämatopoetischer Wachstumsfaktoren als auch zu einer Verminderung der Anzahl Zytokine produzierender Makrophagen. Es kann deshalb angenommen werden, dass diese Veränderungen eine Beeinträchtigung des hämatopoetischen Mikromilieus zur Folge haben, die auch nach Beendigung der IFN- α -Behandlung fortbesteht. Dieser potentiell reversible Effekt könnte weiterhin erklären, dass bei einer Unterbrechung der IFN- α -Therapie von Patienten mit CML mindestens drei Monate vor einer allogenen KMT kein negativer Effekt des IFN- α mehr beobachtet werden kann (Hehlmann et al. 1999).

Die in der Arbeit von Beelen et al. beobachtete erhöhte transplantationsassoziierte Mortalität nach einer längeren Vorbehandlung mit IFN- α wurde hauptsächlich auf ein signifikant höheres Risiko für ein Auftreten schwerer Infektionen nach einer allogenen KMT zurückgeführt (Beelen et al. 1998).

Verschiedene Faktoren könnten dabei von Bedeutung sein:

Einerseits könnte eine Verminderung der Makrophagenanzahl im Knochenmark selber zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führen. Andererseits kann eine Störung der die Abnahme der durch Makrophagen produzierten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL-1 zu einer Störung der Hämatopoese führen. Dies wür-

de durch die Beobachtung einer deutlich verzögerten Regeneration der neutrophilen Leukozyten und Thrombozyten nach allogener KMT bestätigt (Beelen et al. 1998). In jedem Fall aber scheint die Funktion des hämatopoetischen Mikromilieus von wesentlicher Bedeutung für die Vermittlung des Effektes einer IFN- α -Vorbehandlung zu sein.

7. Zusammenfassung

Für Patienten mit CML in erster chronischer Phase wurde bei einer längeren Vorbehandlung mit IFN- α vor einer allogenen Knochenmarktransplantation ein erhöhtes Risiko transplantationsassoziiierter Komplikationen beobachtet. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit IFN- α einen negativen Effekt auf die Funktion der Knochenmarkstromazellen hat, der sich nachhaltig auf die Entwicklung der Hämatopoese auswirken könnte.

Das in - vitro - Modell der zweistufigen Knochenmarklangzeitkulturen ermöglichte die Beurteilung der mit IFN- α vorbehandelten Stromazellen ohne den direkten Einfluss von IFN- α auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen. Dazu wurden aus dem Knochenmark gesunder Spender in 29 Ansätzen insgesamt 119 Knochenmarklangzeitkulturen angelegt. Die konfluenten Stromalayer wurden innerhalb eines Ansatzes über 4 Wochen mit IFN- α in verschiedenen Dosierungen behandelt, anschließend bestrahlt und mit mononukleären Zellen überschichtet. Im folgenden wurde die Entwicklung der Hämatopoese durch wöchentliche GM-CFC-Assays erfasst. Mittels Zytocentrifugenpräparaten wurde nach 5 Wochen zusätzlich die Zusammensetzung der Stromalayer untersucht.

Eine Vorbehandlung der Knochenmarklangzeitkulturen mit IFN- α in höheren Dosierungen führte in dieser Arbeit zu einer deutlich verminderten Anzahl koloniebildender Zellen. So verringerte sich die Anzahl der GM-CFC nach 5 Wochen bei 2×10^4 U auf 80%, bei 2×15000 U auf 25% und bei 2×100000 U IFN- α wöchentlich auf 10% der jeweiligen Kontrollkulturen in der ersten Woche. Dabei zeigte sich ein Einfluss von IFN- α auf die Zusammensetzung des Knochenmarkstromas in Form einer signifikanten dosisabhängigen Abnahme der Anzahl makrophagozytärer Zellen im Stromalayer. IFN- α scheint demnach ab einer Dosis von 2×10^4 U zu einer nachhaltigen Beeinträchtigung des hämatopoetischen Mikromilieus zu führen. Die Verminderung der makrophagozytären Zellen als wesentliche Quelle hämatopoetischer Zytokine und Wachstumsfaktoren spielt dabei möglicherweise eine entscheidende Rolle und könnte das klinisch beobachtete erhöhte Infektionsrisiko sowie die deutlich verzögerte Regeneration der Leukozyten und Thrombozyten nach allogener Transplantation erklären.

8. Literaturverzeichnis

1. Ahuja, H., Bar-Eli, M., Arlin, Z., Advani, S., Allen, S., Goldman, J., Snyder, D., Foti, A., Cline, M. (1991):
The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia.
J. Clin. Invest. 87, 2042-2047
2. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. (2000):
A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.
Nature 404, 193-197
3. Aman, M.J., Keller, U., Derigs, G., Mohamadzadeh, M., Huber, C., Peschel, C. (1994):
Regulation of cytokine expression by interferon- α in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist.
Blood 84, 4142-4150
4. Balkwill, F.R., Oliver, R.T. (1977):
Growth inhibitory effects of interferon on normal and malignant human hematopoietic cells.
Int. J. Cancer 20, 500-505
5. Bartram, C.R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., van Kessel, A.G., Bootsma, D. Grosveld, G., Ferguson-Smith, M.A., Davies, T., Stone, M., et al. (1983):
Translocation of c-abl1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukaemia.
Nature 306, 277-280
6. Beelen, D.W., Graeven, U., Elmaagacli, A.H., Niederle, N., Kloke, O., Opalka, B., Schaefer, U.W. (1995):
Prolonged administration of interferon- α in patients with chronic-phase Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia before allogeneic bone marrow transplantation may adversely affect outcome.
Blood 85, 2981-2990
7. Bernstein, R. (1988):
Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia.
Sem. Hematol. 25, 20-3
8. Bhatia, R., McGlave, P.B., Verfaillie, C. M. (1995) :
Treatment of marrow stroma with Interferon- α restores normal β 1 Integrin-dependent adhesion of chronic myelogenous leukaemia hematopoietic progenitors.
J. Clin. Invest. 96, 931-939

9. Bradley, T.R., Metcalf, D. (1966):
The growth of mouse bone marrow cells in vivo.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287-300
10. Brierley, M.M., Fish, E.N. (2002):
Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry.
J. Interferon Cytokine Res. 22, 835-845
11. Brill, A.B., Tomonaga, M., Heysell, R.M. (1962):
Leukemia in man following exposure to ionizing radiation.
Ann. Intern. Med. 56, 590-609
12. Broudy, V.C., Kaushansky, K., Segal, G.M., Harlan, J.M., Adamson, J.W. (1986):
Tumor necrosis factor type α stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7467-7471
13. Broxmeyer, H.E., Lu, L., Platzer, E., Feit, K., Juliano, L., Rubin, B.Y. (1983):
Comparative analysis of the influence of human gamma, alpha and beta interferons on human multipotential (GFU-GEMM), erythroid (BFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells.
J. Immunol. 131, 1300-1305
14. Campbell, A.D., Long, M.W., Wicha, M.S. (1987):
Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of the granulocytic lineage.
Nature 329, 744-746
15. Cashman, J.D., Eaves, A.C., Raines E.W., Ross, R., Eaves, C.J. (1990):
Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF- β .
Blood 75, 96-101
16. Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiareri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E., Moore, M.A.S. (1980):
Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.
Blood 56, 289-301
17. Chen, B.D., Najor, F. (1987):
Macrophage activation by interferon alpha + beta is associated with a loss of proliferative capacity: role of Interferon alpha + beta in the regulation of macrophage proliferation and function.
Cell. Immunol. 106, 343-354

18. Chen, L.Y., Hsu, M.L., Ho, C.K., Wang, S.Y. (1993):
Cell source and biological characteristics of murine bone marrow-derived colony-promoting activity.
Exp. Hematol. 21, 1219-1226
19. Clark, S.C., Kamen, R. (1987):
The human hemopoietic colony-stimulating factors.
Science 236, 1229-1237
20. Clift, R.A., Buckner, C.D., Thomas, E.D. et al. (1982):
Treatment of chronic granulocytic leukaemia in chronic phase by allogenic marrow transplantation.
Lancet 2, 623-625
21. Coutinho, L.H., Gilleece M.H., de Wynter, E.A., Will, A. & Testa, N.G. (1993):
Long term cultures using human bone marrow.
In: Testa, N.G. & Molineux, G. (Eds.):
Haemopoiesis: a practical approach
Oxford, UK: Oxford University Press
22. De Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Hagemeyer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J.R. (1982):
A cellular oncogene is translocated to the philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.
Nature 300, 765-767
23. Delwiche, F., Raines, E., Powell, J., Ross, R., Adamson J. (1985):
Platelet-derived growth factor enhances in vitro erythropoiesis via stimulation of mesenchymal cells.
J. Clin. Invest. 76, 137-142
24. Dexter, T.M., Allen, T.D., Lajtha L. (1977):
Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro.
J. Cell. Physiol. 91, 335-344
25. Dexter, T.M. (1982):
Stromal cell associated haemopoiesis.
J. Cell. Physiol. Suppl. 1, 87-94
26. Dexter, T.M., Spooncer, E., Simmons, P., Allen, T.D. (1984):
Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience.
New York: Alan R. Liss Inc. 57-96
27. Dhingra, K., Talpaz, M., Kantarjian, H., Ku, S., Rothberg, J., Gutterman, J.U., Kurzrock (1991):
Appearance of acute leukemia-associated p190bcr-abl in chronic myelogenous leukemia may correlate with disease progression.
Leukemia 5, 191-195

28. Dorshkind, K. (1990):
Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products.
Annu. Rev. Immunol. 8, 111-137
29. Drezzen, O., Canaani, E., Gale, R.P. (1988):
Molecular biology of chronic myelogenous leukemia.
Sem. Hematol. 25, 35-49
30. Druker, B.J., Lydon, N.B. (2000):
Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia.
J. Clin. Invest. 105, 3-7
31. Eaves, C.J., Cashman, D.J., Kay, R.J., Dougherty, G.J., Otsuka, T., Gaboury, L.A., Hogge, D.E., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C., Humphries, R.K. (1991):
Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer.
Blood 78, 110-117
32. Facchetti, F., Tironi, A., Marocolo, D., Capucci, A., Ruggeri, G., Bellotti, D., Rossi, G. (1997):
Histopathological changes in bone marrow biopsies from patients with chronic myeloid leukaemia after treatment with recombinant alpha-interferon.
Histopathology 31, 3-11
33. Fialkow, P.J., Jacobson, R.J., Papayannopoulou, T. (1977):
Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage.
Am. J. Med. 63, 125-130
34. Fibbe, W.E., van Damme, J., Billiau, A., Goselink, H.M., Voogt, P.J., van Eeden, G., Ralph, P., Altrock, B.W., Falkenburg, J.H.F. (1988):
Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor.
Blood 71, 430-435
35. Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Lalykina, K.S. (1970):
The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen colonies.
Cell. Tissue. Kinet. 3, 393-40
36. Gale, R.P., Hehlmann, R., Zhang, M.-J., Hasford, J., Goldman, J.M., Heimpel, H., Hochhaus, A., Klein, J.P., Kolb, H.-J., McGlave, P.B., Passweg, J., R., Rowlings, P.A., Sobocinski, K.A., Horowitz, M.M. & German CML Study Group (1998):
Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia.
Blood 91, 1810-1819

37. Galvani, D.W., Cawley, J.C. (1990):
The effects of α interferon on human long-term bone marrow culture.
Leuk. Res. 14, 525-531
38. Gordon, M.Y., Dowding, C.R., Riley, G.P., Goldman, J.M., Greaves, M.F. (1987):
Altered adhesive interactions with marrow stroma of hematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia.
Nature 328, 342-344
39. Gordon, M.Y. (1996):
Cellular and molecular mechanisms in chronic myeloid leukemia: biology and treatment.
Br. J. Hematol. 95, 10-20
40. Göllner, G., Aman, M.J., Steffens, H.P., Huber, C., Peschel, Derigs, G. (1995):
Interferon- α inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression at the post-transcriptional level in murine bone marrow stromal cells.
Br. J. Haematol. 91, 8-14
41. Gratwohl, A., Hermans, J., Goldman, J.M., Arcese, W., Carreras, E., Devergie, A., Frassoni, F., Gahrton, G., Kolb, H.J., Niederwieser, D., Ruutu, T., Vernant, J.P., de Witte, T., Apperley, J. (1998):
Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogenic blood or marrow transplantation.
Lancet 352, 1087-1092
42. Greenberg, P.L., Mosny, S.A. (1977):
Cytotoxic effects of interferon in vitro on granulocytic progenitor cells.
Cancer Res. 37, 1794-1799
43. Hehlmann, R., Hochhaus, A. (1998):
Diagnostik und Therapie der CML.
Onkologie 4, 789-807
44. Hehlmann, R., Hochhaus, A., Kolb, H.-J., Hasford, J., Gratwohl, A., Heimpel, H., Siegert, W., Finke, J., Ehninger, G., Holler, E., Berger, U., Pfirrmann, M., Muth, A., Zander, A., Fauser, A.A., Heyll, A., Nerl, C., Hossfeld, D.F., Löffler, H., Pralle, H., Queißer, W., Tobler, A. (1999):
Interferon- α before allogenic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia does not affect outcome adversely, provided it is discontinued at least 90 days before the procedure.
Blood 94, 3668-3677
45. Hehlmann, R., Hochhaus, A., Berger, U., Reiter, A. (2000):
Current trends in the management of chronic myelogenous leukemia.
Ann. Hematol. 79, 345-354

46. Hughes, T.P., Kaeda, J., Branford, S., Rudzki, Z., Hochhaus, A., Hensley, M.L., Gathmann, I., Bolton, A.E., van Hoomissen, I.C., Goldman, J.M., Radich, J.P. (2003):
Frequency of major molecular responses to Imatinib or Interferon alpha plus Cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukaemia.
N. Engl. J. Med. 349, 1423-1432
47. Kantarjian, H.M., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., Druker, B.J. (2002):
Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia.
N. Engl. J. Med. 346, 645-652
48. Khaldoyanidi, S., Moll, J., Karakhanova, S., Herrlich, P., Ponta, H. (1999):
Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: two different receptors trigger the release of interleukin-1 β and interleukin-6 from bone marrow macrophages.
Blood 94, 940-949
49. Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., Druker, B.J., Talpaz, M. (2003):
Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics.
Ann. Intern. Med. 138, 819-830
50. Kvasnicka, H.M., Thiele, J., Schmitt-Graeff, A., Diehl, V., Zankovich, R., Niederle, N., Leder, L.-D., Schaefer, H.E. (2000):
Prognostic impact of bone marrow erythropoietic precursor cells and myelofibrosis at diagnosis of Ph1+ chronic myelogenous leukaemia – a multicentre study on 495 patients.
Br. J. Hematol. 112, 727-739
51. Lambertsen, R.H., Weiss, L. (1984):
A model of intramedullary hematopoietic microenvironments based on stereologic study of the distribution of endocloned marrow colonies.
Blood 63, 287-297
52. Lanotte, M., Metcalf, D., Dexter, T.M. (1982):
Production of monocyte/macrophage colony-stimulating factor by preadipocyte cell lines derived from murine marrow stroma.
J. Cell. Physiol. 112, 123-127
53. Lengfelder, E., Berger, U., Reiter, A., Hochhaus, A., Hehlmann, R. (2003):
Chronische myeloproliferative Erkrankungen.
Der Internist 8, 1011-1026
54. Lichtman M. A. (1984): The relationship of stromal cells to hemopoietic cells in marrow.
In: Wright, D.G., Greenberger, J.S. (Eds.): Long-term Bone marrow culture. Kroc Foundation series Vol. 18; S.3-29
New York: Alan R. Liss, Inc.

55. Liesveld, J.L., Abboud, C.N., Duerst, R.E., Ryan, D.H., Brennan, J.K., Lichtman, M.A. (1989):
Characterisation of human marrow stromal cells: role in progenitor cell binding and granulopoiesis.
Blood 73, 1794-1800
56. Lord, B.I., Testa, N.G., Hendry, J.H. (1975):
The relative spatial distribution of CFU-S and CFU-C in the mouse femur.
Blood 46, 65-72
57. Lovhaug, D., Pelus, L.M., Nordlie, E.M., Boyum, A., Moore, M.A. (1986):
Monocyte-conditioned medium and interleukin-1 induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor product the adherent cell layer of murine bone marrow cultures.
Exp. Hematol. 14, 1037-1042
58. Lugo, T.G., Pendergast, A.-M., Muller, A.J., Witte, O.N. (1990):
Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.
Science 247, 1079-1082
59. Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Luce, G.E.G., Dustin, M.L., Springer, T.A., Clark, E.A., Mannoni, P., Shaw, S. (1988):
ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B-, T- and myeloid cells.
Nature 331, 86-88
60. Martyré, M.C. (1995):
TGF-beta and megacaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders.
Leuk. Lymphoma 20, 39-44
61. Mayani, H., Guilbert, L.J., Janowska-Wieczorek, A. (1992a):
Biology of the hemopoietic microenvironment.
Eur. J. Hematol. 49, 225-233
62. Mayani, H., Guilbert, L.J., Sych, I., Janowska-Wieczorek A. (1992b):
Production of tumor necrosis factor- α in human long-term bone marrow cultures from normal subjects and patients with acute myelogenous leukemia: Effect of recombinant macrophage colony stimulating factor.
Leukemia 6, 1148-1154
63. Mayer, I.A., Verma, A., Grumbach, I.M., Uddin, S., Lekmine, F., Ravandi, F., Majchrzak, B., Fujita, S., Fish, E.N., Plataniias, L.C. (2001):
The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon- α in BCR-ABL-expressing cells.
J. Biol. Chem. 276, 28570-28577
64. Metcalf, D., Johnson, G.R., Mandel, T.E. (1979):
Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells.
J. Cell. Physiol. 98, 401-412

65. Metcalf, D (1989):
The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in hematopoietic cells.
Nature 339, 27-30
66. Morton, A.J., Gooley, T., Hansen, J.A., Appelbaum, F.R., Bruemmer, B., Bjerke, J.W., Clift, R., Martin, P.J., Petersdorf, E.W., Sanders, J.E., Storb, R., Sullivan, K.M., Woolfrey, A., Anasetti, C. (1998):
Association between pretransplant interferon- α and outcome after unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase.
Blood 92, 394-401
67. Nathan, C.F. (1887):
Secretory products of macrophages.
J. Clin. Invest. 79, 319-326
68. Novell, P.C., Hungerford, D.A. (1960):
A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia.
J. Natl. Cancer Inst. 25, 85-109
69. Ogawa, M. (1989):
Effects of hemopoietic growth factors on stem cells in vitro.
Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 3, 453-64
70. Olsson, I., Gullberg, U., Richter, L.M. (1992):
The receptors for regulatory molecules of hematopoiesis.
Eur. J. Haematol. 48, 1-9
71. Owen, M. (1988):
Marrow stromal stem cells.
J. Cell. Sci. 10, 63-76
72. Ozer, H., George, S.L., Schiffer, C.A., Rao, K., Rao, P.N., Wurster-Hill, D.H., Arthur, D.D., Powell, B., Gottlieb, A., Peterson, B.A., et al. (1994):
Prolonged subcutaneous administration of recombinant alpha 2b interferon in patients with previously untreated philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myelogenous leukemia: effect on remission duration and survival: cancer and leukemia group B study 8583.
Blood 82, 2975-2984
73. Pietrangeli, C.E., Hayashi, S.I., Kincade, P.W. (1988):
Stromal cell lines which support lymphocyte growth: Characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors.
Eur. J. Immunol. 18, 863-872
74. Quesenberry, P. J., McNiece, I. K., Robinson, B. E., Woodward, T. A., Baber, G. B., McGrath, H. E., Isakson, P.C. (1987):
Stromal cell regulation of lymphoid and myeloid differentiation.
Blood Cells 13, 137-146

75. Rameshwar, P., Chang, V.T., Gascón, P. (1996):
Implication of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF- β and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis.
Br. J. Hematol. 93, 22-29
76. Reilly, J.T. (1992):
Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: role of growth factors.
J. Clin. Pathol. 45, 461-464
77. Rich, I.N. (1986):
A role for the macrophage in normal hemopoiesis. I. Functional capacity of bone-marrow-derived macrophages to release hemopoietic growth factors.
Exp. Hematol. 14, 738-745
78. Rowley, J.D. (1973):
A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by Quinacrine fluorescence and Giemsa staining.
Nature 243, 290-293
79. Santucci, M.A., Soligo, D., Pileri, S., Zuffa, E., Testoni, N., Tura, S. (1993):
Interferon-alpha effects on stromal compartment of normal and chronic myeloid leukemia hematopoiesis.
Leuk. Lymph. 11, 113-118
80. Sawyers, C.L. (1999):
Chronic myeloid leukemia.
N. Engl. J. Med. 340, 1330-1340
81. Shaklai, M., Tavassoli, M. (1979):
Cellular relationship in the rat bone marrow studied by freeze-fracture and lanthanum impregnation thin sectioning electron microscopy.
J. Ultrastruc. Res. 69, 343-361
82. Sieff, C.A. (1987):
Hematopoietic growth factors.
J. Clin. Invest. 79, 1549-1557
83. Sill, H., Goldman, J.M., Cross, N.C. (1995):
Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukaemia.
Blood 85, 2013-2016
84. Silver, R.T., Woolf, S.H., Hehlmann, R., Appelbaum, F.R., Anderson, J., Bennett, C., Goldman, J.M., Guilhot, F., Katarjia, H.M., Lichtin, A.E., Talpaz, M., Tura, S. (1999):
An evidence-based analysis of the effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology.
Blood 94, 1517-1536

85. Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Schmitt-Graeff, A., Diehl, V., Zankovich, R., Niederle, N., Leder, L.-D. (2000):
Effects of interferon and Hydroxyurea on bone marrow fibrosis in chronic myelogenous leukaemia: a comparative retrospective multicentre histological and clinical study.
Br. J. Hematol. 108, 64-71
86. Toksöz, D., Dexter, T.M., Lord, B.I., Wright, E.G., Lajtha, L.G. (1980):
The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation.
Blood 55, 931-936
87. Torok-Storb, B. (1988):
Cellular interactions.
Blood 72, 373-385
88. Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D. (2002):
The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.
Blood 100, 2292-2302
89. Verma, A., Deb, D.K., Sassano, A., Uddin, S., Varga, J., Wickrema, A., Platanias, L.C. (2002):
Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase mediates the suppressive effects of type I interferons and transforming growth factor-beta on normal hematopoiesis.
J. Biol. Chem. 277, 7726-7735
90. Wang, S.Y., Su, C.Y., Hsu, M.L., Chen, L.Y., Tzeng C.H., Ho, C.K. (1991):
Effect of lipopolysaccharide on the production of colony-stimulating factors by the stromal cells in long-term bone marrow culture.
Exp. Hematol. 19, 122-127
91. Wetzler, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R., Talpaz, M. (1995):
Interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia.
Am. J. Med. 99, 402-411

Danksagung

Herrn Professor Ulrich Dührsen, Direktor der Klinik für Hämatologie am Universitätsklinikum Essen, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Besonders bedanke ich mich aber für die vielen wertvollen und ermutigenden Ratschläge und seine große Hilfe bei der Auszählung der Zytozentrifugenpräparate.

Für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Knochenmarktransplantation, insbesondere Professor Dietrich W. Beelen und Frau Tanja Olschewski, die diese Arbeit durch die Vermittlung der Knochenmarkzellen erst möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christoph Kasper für die Überlassung des Themas und die Einarbeitung im Labor. Ohne seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, seine kompetenten Ratschläge und die freundschaftliche Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Marion Skubatz und Katja Halfmeyer, die mir bei jeder Frage im Labor behilflich waren. Weiterhin danke ich Dr. Jan Dürig und Dr. Andreas Hüttmann für die Bereitschaft, verschiedenste grundsätzliche Fragen zu diskutieren.

Meinen Freunden bin ich sehr dankbar für das Verständnis und die nötige Abwechslung in den letzten Jahren.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte und die mir immer mit konstruktiver Kritik und Ermutigung zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anna Lübking
Geburtsdatum 11.07.1976 in Münster
Wohnort Essen

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschule in Gütersloh
1987 - 1988 Anne - Frank - Gesamtschule in Gütersloh
1988 - 1996 Gesamtschule Gartenstadt in Dortmund
Juni 1996 Abitur

Hochschulbildung

1996 - 2003 Studium der Medizin
an der Universität Duisburg-Essen
August 1998 Ärztliche Vorprüfung
September 1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2003 Praktisches Jahr
am Stadtspital Waid, Zürich, Schweiz
am Sunderby sjukhus, Luleå, Schweden und
Wahlfach Anästhesie am Alfried Krupp-Krankenhaus,
Essen
Mai 2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

Seit August 2003 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum am Zentrum für Innere
Medizin, Klinik für Hämatologie, der Universität Duis-
burg-Essen