



Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Einflüsse von Zytokinen auf humane hämatopoetische  
CD34-positive Stammzellen**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Tobias Schertlin  
aus Nürnberg  
Würzburg, Juli 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Florian Weissinger

Korreferent: Professor Dr. M. Böck

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2009

Der Promovend ist Arzt

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | IV  |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....   | VII |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....   | IX  |
| <br>   |     |
| <b>1. EINFÜHRUNG</b> .....   | 1   |
| 1.1. Hämatopoetische Stammzellen .....   | 1   |
| 1.2. <i>In vitro</i> Proliferation und Differenzierung von<br>hämatopoetischen Stammzellen .....               | 2   |
| 1.3. Chronisch Myeloische Leukämie (CML) .....   | 3   |
| 1.4. Dendritische Zellen und Monozytäre Zellen.....  | 7   |
| <br>   |     |
| <b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....   | 10  |
| <br>   |     |
| <b>3. MATERIALIEN</b> .....  | 11  |
| 3.1. Verwendete Zellen .....   | 11  |
| 3.2. Plastik- und Glasmaterialien für Zellkultur und Analysen .....  | 11  |
| 3.3. Medien, Zusätze, Chemikalien, Waschpuffer und Lösungen .....  | 12  |
| 3.4. Monoklonale Antikörper (mAK) für die<br>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....                         | 12  |
| 3.5. Materialien für die immunomagnetische Anreicherung<br>von Zellen .....                                    | 13  |
| 3.6. Zytokine und Vitamine für die Stimulation von CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....                             | 14  |
| 3.7. Sonstige Geräte .....   | 15  |
| <br>   |     |
| <b>4. METHODEN</b> .....   | 16  |
| 4.1. Ermittlung der Zellzahl .....   | 16  |
| 4.2. Durchflusszytometrie .....  | 16  |
| 4.2.1. Prinzip .....   | 16  |
| 4.2.2. Durchführung der Messung .....  | 17  |
| 4.3. Aufreinigung von CD34 <sup>+</sup> -Zellen mittels immunomagnetischer<br>Selektion (MACS-Verfahren) ..... | 18  |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.1. Prinzip .....   | 18        |
| 4.3.2. Durchführung der Aufreinigung .....   | 18        |
| 4.4. Stimulation von CD34 <sup>+</sup> -Zellkulturen mit Wachstumsfaktoren .....   | 20        |
| <b>5. ERGEBNISSE .....</b>   | <b>23</b> |
| 5.1. Anreicherung von CD34 <sup>+</sup> - Stammzellen durch das<br>MACS-Verfahren .....  | 23        |
| 5.2. Amplifikation und Differenzierung von hämatopoetischen<br>Stammzellen mittels Stimulation durch verschiedene<br>Zytokine .....                              | 24        |
| 5.2.1. Stimulation von CD34 <sup>+</sup> -Stammzellen mit dem Ziel einer<br>hohen Amplifikation bei geringer Differenzierungsinduktion ....                      | 25        |
| 5.2.1.1. Stimulation von Stammzellen unter Verwendung<br>einzelner Zytokine .....  | 25        |
| 5.2.1.2. Stimulation von Stammzellen mit Zweifach-<br>zytokinkombinationen .....   | 26        |
| 5.2.1.3. Stimulation von Stammzellen mit Mehrfach-<br>zytokinkombinationen .....   | 28        |
| 5.2.1.4. Überblick über die durchgeführten Amplifikations-<br>versuche .....   | 31        |
| 5.2.2. Differenzierung von Stammzellen unter dem Einfluß<br>verschiedener Zytokine .....   | 35        |
| 5.2.2.1. Oberflächentypisierung der, für die Differenzierung<br>verwendeten Stammzellen (Ausgangsprofil) .....   | 35        |
| 5.2.2.2. Gezielte monozytäre Differenzierung .....   | 37        |
| 5.2.2.3. Gezielte Differenzierung in dendritische Zellen .....   | 39        |
| 5.2.2.4. Zusammenfassung und Überblick über die<br>Durchgeführten Differenzierungsversuche .....   | 45        |
| 5.3. Unterschiede bezüglich des Verhaltens von benignen Stamm-<br>zellen im Vergleich zu CML-Stammzellen in Bezug auf<br>Amplifikation und Differenzierung ..... | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3.1. Stimulation von CD34 <sup>+</sup> -CML-Zellen mit dem Ziel einer hohen Amplifikation und geringer Differenzierungsinduktion;<br>Unterschiede zum Verhalten benigner Stammzellen ..... | 46        |
| 5.3.2. Gezielte monzytäre Differenzierung von CML-Stammzellen;<br>Unterschiede zum Verhalten benigner Stammzellen .....  | 49        |
| 5.3.2.1. Versuch der monzytären Differenzierung von CML-<br>Stammzellen mit Hilfe von Vitamin D <sub>3</sub> .....   | 52        |
| 5.3.3. Gezielte Differenzierung von CML Stammzellen in<br>dendritische Zellen .....  | 55        |
| 5.3.4. Zusammenfassung und Überblick über die CML-<br>Stammzellversuche .....  | 57        |
| <b>6. DISKUSSION .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>69</b> |

***Danksagung***

***Lebenslauf***

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                |   |
|----------------|---|
| AK             | Antikörper  |
| ALP            | Alkalische Leukozytenphosphatase  |
| APC            | Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)                               |
| bcr            | breakpoint-cluster-region (Bruchpunktregion)  |
| BFU-E          | burst-forming unit-erythroid  |
| <CC6>          | Zytokinkombination mit 6 Wachstumsfaktoren (SCF, EPO, IL-3, IL-6, G-CSF und GM-CSF) |
| CD             | Cluster of Differentiation  |
| CFU            | colony-forming unit   |
| CFU-GEMM       | colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megacaryocyte               |
| CFU-GM         | colony-forming unit-granulocyte, macrophage   |
| CLP            | common-lymphoid-progenitor  |
| CML            | Chronisch myeloische Leukämie   |
| d              | Tag / Inkubationstag  |
| D <sub>3</sub> | Vitamin D3  |
| DC             | Dendritische Zelle(n) (dendritic cell)  |
| <DC-A>         | Zytokinkombination mit SCF, IL-3, IL-6, EPO, GM-CSF und IL-4                        |
| <DC-B>         | Zytokinkombination mit SCF, IL-3, IL-6, EPO, GM-CSF und TNF- $\alpha$               |
| <DC-C>         | Zytokinkombination mit IL-4, TNF- $\alpha$ und GM-CSF                               |
| EDTA           | Äthylendiamintetraessigsäure  |
| EPO            | Erythropoietin  |
| FACS           | Fluorescence activated cell Scan  |
| FCS            | Fetales Kälberserum   |
| FISH           | Floureszenz-in-situ-Hybridisierung  |
| FITC           | Flourescein-isothiocyanat   |
| FL-3           | flt3-Ligand   |
| FSC            | Forward Scatter   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| G-CSF           | Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor             |
| GM-CSF          | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor |
| HLA             | Humanes Leukozyten Antigen                             |
| HSZ             | Hämatopoetische Stammzelle                             |
| HuHSZ           | Humane hämatopoetische Stammzelle                      |
| IL-3            | Interleukin-3  |
| IL-4            | Interleukin-4  |
| IL-6            | Interleukin-6  |
| LC              | Langerhans Zelle (Langerhans cell)                     |
| LDH             | Laktatdehydrogenase                                    |
| LTC-IC          | Long-term culture initiating cells                     |
| MACS            | Magnetic absorbent cell sorting                        |
| <i>mAK</i>      | <i>monoklonale(r) Antikörper</i>                       |
| M-bcr           | Major-breakpoint cluster region                        |
| M-CSF           | Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor              |
| MHC             | Major Histocompatibility Complex                       |
| min             | Minuten  |
| PB              | peripheres Blut  |
| PBS             | Phosphate Buffered Saline                              |
| PBSZ            | periphere Blutstammzellen                              |
| PCR             | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)  |
| PE              | Phycoerythrin  |
| Ph <sup>1</sup> | Philadelphia Chromosom                                 |
| <i>rh</i>       | <i>rekombinant human</i>                               |
| SCF             | Stammzellfaktor  |
| <SF>            | Zytokinkombination mit SCF und FL-3                    |
| <SFI>           | Zytokinkombination mit SCF, FL-3 und IL-3              |
| SSC             | Side Scatter   |
| <ST>            | Zytokinkombination mit SCF und TPO                     |
| <STI>           | Zytokinkombination mit SCF, TPO und IL-3               |
| SZ              | Stammzellen  |
| <TF>            | Zytokinkombination mit TPO und FL-3                    |



|                      |  |
|----------------------|--|
| TNF- $\alpha$        | Tumor Nekrose Faktor alpha                     |
| TPO                  | Thrombopoietin                                 |
| <TSF>                | Zytokinkombination mit TPO, SCF und FL-3       |
| <TSF <sup>2x</sup> > | Zytokinkombination mit TPO, SCF und FL-3       |
| <TSFI>               | Zytokinkombination mit TPO, SCF, FL-3 und IL-3 |

## TABELLENVERZEICHNIS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabelle 1  | Zellzahlen im Verlauf der CD34 <sup>+</sup> -Zellanreicherung durch das MACS-Verfahren .....  | 24 |
| Tabelle 2  | Zellamplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil in den untersuchten Einzelzytokinansätzen im Verlauf .....  | 32 |
| Tabelle 3  | Zellamplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil in den untersuchten Zweifachzytokinansätzen im Verlauf .....  | 33 |
| Tabelle 4  | Zellamplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil in den untersuchten Mehrfachzytokinansätzen im Verlauf .....  | 34 |
| Tabelle 5  | Oberflächenantigenprofil der angereicherten CD34 <sup>+</sup> -Stammzellen .....  | 36 |
| Tabelle 6  | Prozentualer CD14 <sup>+</sup> -Anteil und CD14 <sup>+</sup> -Zellzahlen im Verlauf bei Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen .....   | 38 |
| Tabelle 7  | Prozentualer CD1a <sup>+</sup> - und CD14 <sup>+</sup> -Anteil und CD1a <sup>+</sup> - und CD14 <sup>+</sup> -Zellzahlen im Verlauf bei Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen ..... | 41 |
| Tabelle 8  | Oberflächentypisierung der in <DC-C> und <TSF> inkubierten Zellen an Auswerttag 17 .....  | 43 |
| Tabelle 9  | Zellamplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Anteil an Auswerttag 6, CML-Stammzellen und benigne Stammzellen nach Inkubation mit verschiedenen Zytokine / Zytokin-kombinationen im Vergleich.....           | 48 |
| Tabelle 10 | Prozentualer CD14 <sup>+</sup> -Anteil im Verlauf bei Inkubation mit Mehrfachzytokinkombinationen; CML-SZ und benigne SZ-Ansätze im Vergleich .....   | 52 |
| Tabelle 11 | Prozentualer CD14 <sup>+</sup> -Anteil und CD14 <sup>+</sup> -Zellzahlen im Verlauf bei Inkubation von CML-SZ mit <TSF> und <DC-C ohne und mit dem Zusatz von Vitamin D3 an Tag 3, 6 und 9 .....        | 54 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabelle 12 | Prozentualer CD1a <sup>+</sup> -Anteil und CD1a <sup>+</sup> -Zellzahl im Verlauf nach Inkubation mit <TSF> und <DC-C> ..... | 56 |
| Tabelle 13 | Vergleich der in <DC-C> kultivierten Zellen an Auswerttag 17 bezüglich der Oberflächentypisierung .....                      | 57 |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1  | Flussdiagramm zur Veranschaulichung der mit den Stammzellen durchgeführten Versuche .....  | 10 |
| Abbildung 2  | durch das MACS Verfahren angereicherte CD34 <sup>+</sup> -Stammzellen .....  | 23 |
| Abbildung 3  | Gesamtzellamplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil an Tag 6 nach Inkubation mit verschiedenen Zytokinen .....   | 26 |
| Abbildung 4  | Amplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil unter dem Einfluß von Zweifachzytokinkombinationen an Auswerttag 6 im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) ..... | 27 |
| Abbildung 5  | Amplifikationsfaktor im Verlauf bei drei verschiedenen Mehrfachzytokinansätzen im Vergleich zu zytokinfreiem Medium .....                                      | 28 |
| Abbildung 6  | Amplifikation und CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil unter dem Einfluß von Mehrfach-Zytokinkombinationen an Auswerttag 6 .....                                      | 29 |
| Abbildung 7  | Amplifikationsfaktor und CD34 <sup>+</sup> -Zellamplifikation im Verlauf in <TSF>.....   | 30 |
| Abbildung 8  | FACS-Analyse der aufgereinigten Stammzellen bezüglich verschiedener Oberflächenantigene .....  | 36 |
| Abbildung 9  | FACS-Analysen von, mit <TSF> inkubierten Zellen an Tag 0, 2 und 6 im Verlauf .....   | 38 |
| Abbildung 10 | Gesamtzell- und CD14 <sup>+</sup> -Anteil an Tag 6 nach Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen .....  | 39 |
| Abbildung 11 | Prozentualer CD1a <sup>+</sup> - und CD14 <sup>+</sup> -Anteil in <DC-C> und <TSF> im Verlauf .....  | 42 |
| Abbildung 12 | FACS-Analysen der mit <DC-C> inkubierten Zellen an Tag 17 .....  | 44 |
| Abbildung 13 | FACS-Aalyse (FSC/SSC Auswertung) der mit <DC-C> inkubierten Zellen an Tag 17 .....   | 44 |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Abbildung 14 | Gesamtzell- und CD34 <sup>+</sup> -Amplifikation an Tag 6 nach Inkubation mit <TSF>; Vergleich zwischen CML- und benignen Zellen .....                    | 49 |
| Abbildung 15 | CD14 <sup>+</sup> -Anteil nach 12-tägiger Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen; CML- und benigne Stammzellansätze im Vergleich ..... | 51 |
| Abbildung 16 | Generierung von monozytären Zellen aus CML-Stammzellen mit Hilfe von Vitamin D 3.....   | 55 |
| Abbildung 17 | Differenzierungswege der DC bei benignen und CML-Zellen.....  | 67 |

# 1. EINFÜHRUNG

## 1.1. HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sind pluripotente Ursprungszellen der Hämatopoese. Sie besitzen neben ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in alle Linien des hämatopoetischen Systems, und damit zur Erythro-, Leuko-, Lympho- und Thrombopoese, auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Der Nachweis von HSZ gelingt auf unterschiedliche Weise. Bis Mitte der 1980er Jahre bediente man sich semisolider Kulturassays. In diesen Kulturen werden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark bebrütet und nach etwa zwei Wochen können reife Blutzellkolonien, sogenannte colony-forming units (CFU), die sich aus einer einzigen Vorläuferzelle ableiten, nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der Reifungsstufe der Ausgangszelle und damit einer bestehenden Liniendeterminierung entstehen verschiedene Kolonien. Im einzelnen werden BFU-E (burst-forming unit-erythroid), CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte, macrophage) und CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte) unterschieden, wobei auch Mischformen möglich sind. Die Erstbeschreiber einer derartigen Kulturmethode für menschliche Vorläuferzellen waren Fauser und Messner (1978).

Daneben gibt es mittlerweile die Möglichkeit, HSZ über das Oberflächenantigen CD34 zu bestimmen, das ansonsten nur noch auf Gefäßwandzellen anzutreffen ist. Bei dem CD34-Molekül handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 115 kDa. Durchschnittlich tragen etwa 0,5 bis drei Prozent der mononukleären Zellen im Knochenmark das CD34-Antigen auf ihrer Zellmembran. Die Population der hämatopoetischen CD34-Zellen ist sehr heterogen, und nur ein kleiner Teil der CD34-Zellen (etwa ein Prozent der CD34<sup>+</sup>-PBSZ nach Mobilisierung mit G-CSF) sind frühe, pluripotente Stammzellen mit der Fähigkeit, alle Formen reifer Blutzellen zu bilden. Den größten Teil der CD34-Zellen stellen reifere, liniendeterminierte Vorläuferzellen dar, die in ihrer Entwicklung bereits auf eine bestimmte Zelllinie, wie z. B. die erythropoetische

Reihe, beschränkt sind. Die frühen, pluripotenten HSZ weisen neben der Expression von CD34 im Gegensatz zu den reiferen, weiterentwickelteren Zellen nur eine niedrige oder fehlende Expression von HLA-DR (HLA-DR<sup>low</sup> bzw. HLA-DR<sup>-</sup>) und des CD38-Antigens (CD38<sup>low</sup> bzw. CD38<sup>-</sup>) auf. Darüber hinaus sind die reiferen Zellen zusätzlich durch linienspezifische Marker charakterisiert. So findet sich CD33 auf myeloischen Progenitoren, CD14 und CD15 auf myelomonozytären Progenitoren und CD2 sowie CD19 auf Vorläuferzellen der T-lymphozytären bzw. B-lymphozytären Zelllinie. Für Zellen der Erythropoese gelten Glykophorin A und CD71 als spezifische Marker (2, 17).

## **1.2. IN VITRO PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG VON HSZ**

Der Begriff Zytokin (oder Wachstumsfaktor) wurde vor etwa 20 Jahren für hormonähnliche Substanzen eingeführt, die nicht von Drüsen- sondern von unterschiedlichen Blut- und Gewebszellen wie T-Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten produziert werden. Zu diesen gehören G-CSF, GM-CSF, TPO, SCF, FL-3, TNF- $\alpha$  sowie verschiedene Interleukine, Interferone, Chemokine und Endothel- und Nervenzellwachstumsfaktoren. Erythropoetin (EPO), ebenfalls ein Zytokin, wird als einziger Wachstumsfaktor zu 90% in der Niere gebildet (1). Nahezu alle Wachstumsfaktoren hemmen die Apoptose, den programmierten Zelltod, und stimulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen des hämatologischen Systems auf verschiedenen Reifungsstadien. Frühe, pluripotente Zellen werden beispielsweise durch SCF stimuliert, während G-CSF, GM-CSF, Interleukine, TPO und EPO eher spätere Entwicklungsstadien beeinflussen. Dabei können verschiedene Zytokine in Kombination synergistisch wirken bzw. im Vergleich zur Stimulation als singuläre Substanz andere Effekte bewirken (1). Neben Zytokinen können auch Substanzen wie Vitamine Einfluss auf Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen haben. Beispielsweise ist 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>), eine aktive Form von Vitamin D, das beim Menschen und in Wirbeltieren eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumhaushaltes spielt, in der Lage, HSZ in die monozytäre Richtung bzw. in Makrophagen zu differenzieren (69, 71, 73)

### 1.3. CHRONISCH MYELOISCHE LEUKÄMIE (CML)

Die CML hat ihre Ursache in einer klonalen Störung der Hämatopoese und gehört zu den Entitäten der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen (44). Erstmals wurde die Erkrankung von Virchow und Bennett im Jahr 1845 beschrieben. Die Zellen der CML weisen einen spezifischen chromosomalen Defekt auf, der nach dem Ort der Entdeckung Philadelphia-Chromosom genannt wird (erstmalig beschrieben von Nowell und Hungerford im Jahr 1960). Dieses Chromosom ist das Resultat einer Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22. Das zelluläre Onkogen *abl* von Chromosom 9 wird auf die sogenannte Bruchpunktregion (breakpoint-cluster-region = *bcr*) auf Chromosom 22 transloziert. Das Proteinprodukt des chimären *bcr-abl* Gens konnte 1986 nachgewiesen werden (45).

Epidemiologisch macht die CML anteilig ca. 15% aller Leukämien aus, wobei Männer etwa 1,4 mal häufiger als Frauen betroffen sind. Für gewöhnlich ist die CML eine Erkrankung der Erwachsenen mit der höchsten Inzidenz im fünften und sechsten Dezenium, sie wird aber in allen Altersgruppen beobachtet (46). Bei der CML handelt es sich um eine erworbene Erkrankung (kein konkordantes Auftreten bei eineiigen Zwillingen), ein gehäuftes Auftreten der Erkrankung wird nach der Exposition mit Gamma- und Röntgenstrahlung beobachtet, ebenso nach langjährigem Kontakt mit aromatischen Lösungsmitteln. Bei den meisten Erkrankten lässt sich jedoch keine besondere Strahlen- oder Chemikalienexposition nachweisen (47).

Die CML ist eine Erkrankung die in drei Phasen (chronische, akzelerierte und Blastenphase) verläuft. Im Krankheitsverlauf weisen etwa 98% der Patienten eine Leukozytose, 95% das *bcr-abl* Transkript und 90% das Philadelphia-chromosom auf. Bei 93% lässt sich ein *M-bcr* rearrangement nachweisen, der ALP-Index ist bei 86% der Erkrankten erniedrigt. Etwa die Hälfte der Patienten weist bei Diagnosestellung Allgemeinsymptome wie Leistungsabfall, Abdominalbeschwerden und Gewichtsverlust auf. Eine Anämie lässt sich bei 62% der Patienten nachweisen, etwa die Hälfte der Erkrankten weist eine Thrombozytose auf, ca. 10% eine Thrombozytopenie. Recht häufig kommt es



zu einer Splenomegalie (72%) sowie einer LDH-Erhöhung (ca. 71%) im Serum (48).

Der typische Befund der ersten, chronischen Phase ist eine Leukozytose im peripheren Blut, verbunden mit einer Linksverschiebung, häufig bis zu den Myeloblasten. Im Knochenmark findet sich eine gesteigerte, hyperplastische Myelopoese. Diese Phase der Erkrankung ist therapeutisch gut zu beeinflussen und dauert median etwa 4-5 Jahre an (wobei diese Daten nicht die verbesserte Prognose durch die Einführung des Medikamentes Imatinib berücksichtigen). Gefolgt wird sie von einer instabilen Phase, der sogenannten Akzeleration, die mit einer zunehmenden Resistenz auf die Initialtherapie einhergeht. In dieser Phase lassen sich trotz zytoreduktiver Therapie steigende Leukozytenzahlen nachweisen, es kommt öfter zu signifikantem Gewichtsverlust und einem nicht-therapieinduziertem Thrombozytenabfall unter 100.000/ $\mu$ l. Weiterhin kommt es zu einer Verschlechterung der klinischen Symptomatik wie zunehmender Splenomegalie, Gewichtsverlust und persistierendem Fieber ohne Infektion. Die dritte Phase der Erkrankung kann plötzlich im Verlauf der chronischen Phase oder im Anschluss auf die akzelerierte Phase auftreten. Definitionsgemäß lassen sich in der Blastenkrise mehr als 30% Blasten und Promyelozyten im peripheren Blut nachweisen oder mehr als 50% im Knochenmark. Auch das Auftreten von extramedullären blastären Infiltraten spricht für die Blastenphase. Bei zwei Drittel der Patienten lassen sich myeloblastische oder undifferenzierte Blasten finden, bei etwa 30% haben die Blasten einen lymphatischen Phänotyp. Grundsätzlich ist die Stammzellnatur der CML jedoch durch das Auftreten verschiedenster blastärer Phänotypen gekennzeichnet (myeloisch, megakaryoblastär, monoblastär, basophil, eosinophil, B- oder T-lymphoblastisch) wobei immunphänotypische Mischformen häufig sind. Die Dauer der Blastenkrise beträgt median 3-6 Monate (48).

Das charakteristische zytogenetische Phänomen der leukämischen Zellen ist das Philadelphia-Chromosom (Ph<sup>+</sup>), ein verkürztes Chromosom 22, welches aus der erworbenen reziproken Translokation der distalen Bereiche der langen Arme der Chromosomen 9 und 22 resultiert. Gelegentlich lassen sich bei der CML auch komplexere Translokationen, die drei oder mehr Chromosomen be-

treffen, aber immer die Chromosomen 9 und 22 einschließen, finden. Bei ca. 10% aller CML-Patienten kann durch konventionelle Zytogenetik kein Ph<sup>+</sup>-Chromosom nachgewiesen werden. Bei etwa einem Drittel dieser Fälle kann aber die bcr-abl Translokation mit molekuarbiologischen Methoden wie FISH (Floureszenz-in-situ-Hybridisierung), Southern Blot, Western Blot oder PCR (Polymerase-Kettenreaktion) nachgewiesen werden. Etwa sieben Prozent aller CML Patienten sind Ph<sup>+</sup>- und bcr-abl negativ. Das Genprodukt der bcr-abl Translokation ist ein Fusionsprotein mit erhöhter Tyrosinkinaseaktivität.

Die bcr-abl Fusion hat nur dann eine CML zur Folge, wenn sie in einer hämatopoetischen Zelle einer bestimmten Differenzierungsstufe auftritt. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine pluripotente SZ auf einer sehr frühen Stufe der Hämatopoese. Aus dieser Zelle können myeloische, megakaryozytäre, und lymphatische Vorläuferzellen entstehen. In der chronischen Phase behalten die Vorstufen der myeloischen Reihe die Differenzierungsfähigkeit, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß: Granulozyten und deren Vorstufen überwiegen, oft kommt es zu einer Thrombozytose während Erythrozyten meist nicht vermehrt anzutreffen sind, obwohl der CML-Klon im Mark auch erythroide Progenitoren ausbildet. Charakteristisch für die CML ist, daß der maligne Klon nicht auf einer Differenzierungsstufe arretiert ist, sondern offenbar einen sich regenerierenden Pool bcr-abl-positiver, pluripotenter Stammzellen unterhält, aus dem differenzierte Zellen entstehen (49).

Unterschiede zwischen CML Zellen gegenüber normalen Zellen sind die starke numerische Vermehrung, die Ausschwemmung von Progenitoren aller Ausreifungsstufen ins periphere Blut, wobei meist eine pathologische Linksverschiebung zu beobachten ist, sowie die Möglichkeit der extramedullären Absiedelung und Expansion, z.B. in Milz und Lymphknoten. Die Mengenverhältnisse der Zellreihen sind zugunsten der granulopoetischen und thrombopoetischen Reihe verschoben. Weiterhin lassen sich morphologische Reifungsstörungen und Reifungs- und Funktionsstörungen ausmachen (z.B. reduzierte Motilität und Chemotaxis bei Granulozyten). Klinisch zeigt sich in der Regel ein progressiver Verlauf von der chronischen Phase zur Blastenkrise. Im Verlauf lassen sich gehäuft zusätzliche genetische Defekte nachweisen (49).

Die Folgen dieser Unterschiede gegenüber dem normalen Stammzellklon ist ein Selektionsvorteil für den malignen Klon und ein daraus resultierender zunehmender Funktionsausfall des blutbildenden Systems.

Ursprungszelle der CML ist eine sehr primitive Progenitorzelle, die der normalen totipotenten Stammzelle der Hämatopoese ähnelt. Sie besitzt zum einen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, zum anderen die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien. Bei der CML gibt es im Gegensatz zu anderen klonalen Krankheiten keinen einheitlichen Klon, der sich unkontrolliert vermehrt. Statt dessen finden sich maligne Progenitoren mit der Fähigkeit auszudifferenzieren, die sich aber zu einem großen Teil in ruhendem Zustand befinden. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Dominanz der malignen über die gesunden Progenitoren.

Gesunde hämatopoetische Zellen haben, bedingt durch den programmierten Zelltod (Apoptose) begrenzte Lebensspannen. Im Vergleich dazu besteht bei CML-Zellen durch eine verminderte Apoptoserate eine längere Lebensspanne. Eine weitere Rolle für den Proliferationsvorteil des bcr-abl positiven Klons spielt die Tatsache, dass die malignen Zellen sich in extramedullären Lokalisationen (z.B. Lymphknoten und Milz) vermehren können. Dies hängt unter anderem mit einer Störung der normalen Regulation durch Adhäsion zusammen (49, 50).

#### 1.4. DENDRITISCHE ZELLEN UND MONOZYTÄRE ZELLEN

Dendritische Zellen (DC) nehmen eine zentrale Stellung in der Regulation des Immunsystems ein (51, 52). Sie sind hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) und können antigenspezifische Immunantworten initiieren und regulieren (56). Die funktionelle Bedeutung von DC wurde erstmals 1973 von Steinman und Cohn erkannt, die DC mit ihren charakteristischen, namensgebenden Zytoplasmaausläufern aus der Milz von Mäusen isolierten. Allerdings wurden bereits 1868 die zum System der DC gehörigen und nach ihrem Entdecker Paul Langerhans benannten Langerhanszellen (LHC) der Epidermis beschrieben. (51)

DC gelten als Bindeglied zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Immunsystem. Sie bilden als noch unreife Zellen in fast allen Geweben des Körpers ein dichtes Netzwerk von Wächterzellen, die extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen. Aufgenommene Proteine werden zu intrazellulären Peptiden zerlegt und an MHC Moleküle gebunden. Während der Migration von der Peripherie in lymphatische Organe durchlaufen die DC verschiedene zellbiologische Veränderungen und werden zu reifen DC, die die Fähigkeit zur Phagozytose verlieren und eine veränderte Expression von Chemokinrezeptoren aufweisen (52, 55, 56). Die Interaktion mit ruhenden T-Zellen, die gewissermaßen den Start jeder Immunantwort darstellt, findet meist in Lymphknoten oder anderen lymphatischen Organen statt. Nach dem Transport an die Zelloberfläche werden die antigenen Determinanten für T-Lymphozyten erkennbar gemacht (52, 56). Durch diese zentrale Rolle in der Immunsystemregulation sind DC wichtige Mediatoren für viele T-Zell-vermittelte Reaktionen wie Transplantationen, Allergien, Autoimmunkrankheiten, Tumoresistenz oder Impfungen. Die Generierung von DC mit optimaler T-Zell-stimulatorischer Aktivität ist neben der Identifizierung geeigneter Tumorantigene Voraussetzung für die Entwicklung einer Therapie durch Tumorstimulation (56). Neben der Fähigkeit der Antigenpräsentation und der T-Zell-Stimulierung können bestimmte DC-Populationen auch B-Zellen zur

Differenzierung in Plasmazellen und damit zur Antikörperproduktion stimulieren. Die unterschiedlichen Funktionen der DC werden einerseits durch verschiedene Subpopulationen wahrgenommen, andererseits durch die einzelnen Reifestadien vermittelt (61).

Die Gruppe der DC ist eine heterogene Gruppe von Zellen. Da die Differenzierung in DC sowohl von frühen lymphatischen als auch frühen myeloischen Vorläuferzellen erfolgen kann, teilen verschiedene Autoren die DC entsprechend ihrer Herkunft in lymphoide bzw. myeloide DC ein. Myeloide Zellen sind durch den Phänotyp  $CD1a^+$  und  $CD11c^+$  und  $lin^-$  gekennzeichnet und bilden die größere Population der DC. (61, 62) Eine Untergruppe der myeloischen DC, die  $CD16^-$  Zellen gelten außerdem auch als Vorläuferzellen der LHC (51). Die lymphoiden DC exprimieren dagegen keine myeloischen Marker wie  $CD11b/c$ ,  $CD13$  oder  $CD33$ . Statt dessen weisen sie das Profil unreifer Lymphozyten auf (51). Die funktionale Konsequenz dieser beiden DC-Populationen ist jedoch nach wie vor nicht ausreichend geklärt. Beide Progenitoren lassen sich über verschiedene Oberflächenantigene differenzieren, die lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor – CLP) exprimieren z.B.  $CD127$ , den Rezeptor für Interleukin-7 (IL-7), die myeloiden dagegen  $CD117$  (c-kit), den Rezeptor für SCF (61). In Kulturen mit murinen Zellen ließen sich ebenfalls zwei Hauptpopulationen kategorisieren (59). Hier konnten einerseits  $CD8\alpha^+/CD4^-$ , andererseits  $CD8\alpha^-/CD4^+$  DCs nachgewiesen werden, wobei die erstgenannten der lymphoiden Linie und letztere der myeloiden Linie zugerechnet werden (59). Diese Unterteilung ist bei humanen Zellen nicht möglich, da eine Expression von  $CD8\alpha$  bei menschlichen DC nicht vorkommt. Sowohl im murinen als auch im humanen System findet man die, aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu Plasmazellen, sogenannten plasmazytoiden DC, die von verschiedenen Autoren gegenüber anderen DC, meistens ebenfalls als myeloid bezeichnet, abgegrenzt werden. Dies impliziert eine nichtmyeloide Herkunft der plasmazytoiden DC obwohl dies noch nicht ausreichend geklärt ist. Die Tatsache, daß plasmazytoide DC  $CD115$  (c-fms), den Rezeptor für M-CSF exprimieren, läßt dies sogar als unwahrscheinlich erscheinen (61). Schließlich rechnen manche Autoren die bereits genannten

Langerhanszellen der Haut als eigenständige DC-Population (56). Diese zeichnen sich durch die Expression von MHC Molekülen der Klasse I und II, CD1a, CD32 und CD11b aus. Weiterhin verfügen sie über die sogenannten Birbeck Granula, zelluläre Bestandteile die vermutlich endosomale Funktionen besitzen (53).

Bei der *in vitro* Generierung von DC gibt es neben der Differenzierung aus HSZ auch die Möglichkeit der DC-Generierung aus monozytären Zellen. Monozyten sind die größten Zellen im peripheren Blut. Neben einer möglichen Differenzierung in DC fungieren sie auch als Vorläuferzellen für andere Zellen des mononukleären Phagozytosesystems, beispielsweise für Gewebsmakrophagen. Die monozytären Zellen zeichnen sich durch die Expression von CD14 aus. Für die Differenzierung von Monozyten aus HSZ werden ähnliche Zytokine bzw. Zytokinkombinationen verwendet wie bei der Generierung von DC (67, 68).

## 2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel der durchgeführten Arbeit war, die Einflüsse verschiedener Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren auf humane hämatopoetische, CD34-positive Stammzellen zu evaluieren. Im einzelnen sollte zunächst eine Zytokin-kombination gefunden werden, die eine möglichst hohe Zellamplifikation bei gleichzeitig möglichst geringer Differenzierungsinduktion ermöglicht. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die gezielte Differenzierung der CD34<sup>+</sup>-Stammzellen in monozytäre, CD14-positive Zellen sowie in CD1a-positive, dendritische Zellen zu induzieren. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Verhalten von Philadelphiachromosom-positiven CML-Stammzellen im Vergleich zu benignen hu-HSZ, analog zu den obigen Gesichtspunkten, evaluiert. Die erhobenen Daten sollten verglichen und eventuelle Unterschiede im biologischen Verhalten der verschiedenen Zellarten erfasst werden.

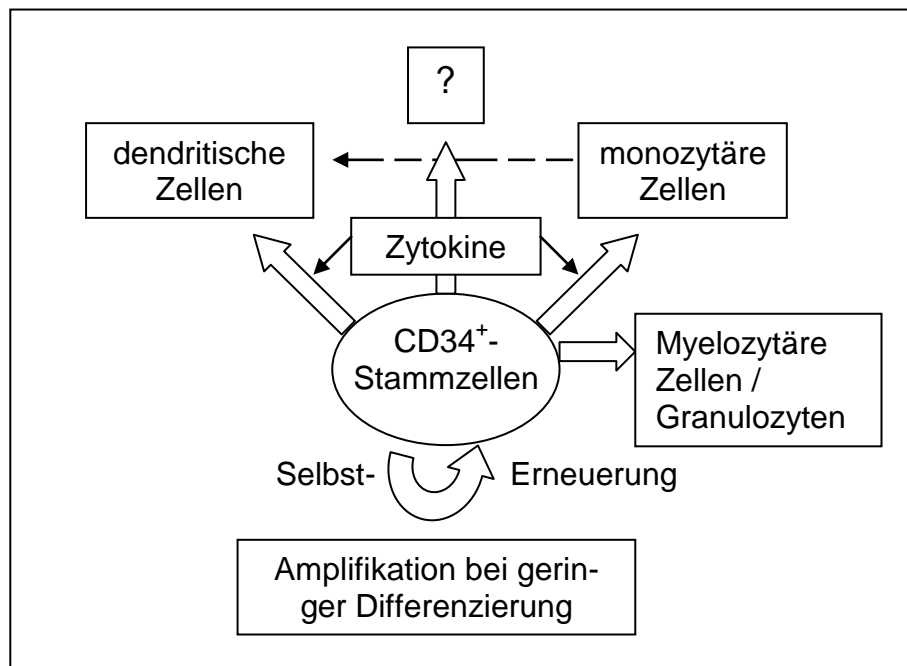


Abbildung 1: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der mit den Stammzellen durchgeführten Versuche

## **3. MATERIALIEN**

### **3.1. VERWENDETE ZELLEN**

- Humane CD34<sup>+</sup>-Zellen

Für die Anreicherung der, für die Versuche verwendeten, humanen, hämatopoetischen Stammzellen (HuHSZ) wurden Reste diagnostischer Proben aus Stammzellapheresaten, die nicht zur weiteren Verwertung gedacht waren, verwendet. Für die Verwendung der Zellen zu Forschungszwecken lagen jeweils Einverständniserklärungen der Patienten vor. Die Zellen wurden nach Mobilisierung durch G-CSF mittels Leukapherese aus peripherem Blut gewonnen und immunomagnetisch nach dem MACS-Verfahren (s.u.) angereichert.

Für die Versuche wurden ausnahmslos frische, nicht kryokonservierte Zellen verwendet.

### **3.2. PLASTIK- UND GLASMATERIALIEN FÜR ZELLKULTUR UND ANALYSEN**

- 48well-Platten (COSTAR GmbH, Bodenheim)
- 24well-Platten (GREINER GmbH, Frickenhausen)
- Zentrifugenröhrchen 12ml mit Verschluss („Whitecaps“); PN-Röhrchen 50ml mit Verschluss („Bluecaps“); Reagenzröhrchen aus Polystyrol zur Verwendung bei der FACSanalyse (alle GREINER GmbH, Frickenhausen)
- Original-Perfusor-Spritze 50ml (BRAUN, Melsungen)
- Minisart-plus CA-Membran + GF Vorfilter 0,45µm (SARTORIUS, Göttingen)
- Pipette mit Spitze steril verpackt 1-25ml (GREINER GmbH, Frickenhausen)
- Zählkammer Tiefe 0,1mm (MARIENFELD, Lauda-Königshofen)
- Haematocytometer Deckgläser (KNITTEL, Braunschweig)



### 3.3. MEDIEN, ZUSÄTZE, CHEMIKALIEN, WASCHPUFFER UND LÖSUNGEN

- Fetales Kälberserum = FCS (LIFE TECHNOLOGIES GmbH, Eggenstein)
- EDTA Dinatriumsalz Dihydrat [Titrierkomplex III] (ROTH, Karlsruhe)
- Natriumchlorid 0,9% = NaCl 0,9% (ROTH, Karlsruhe)
- Natriumacid reinst (MERCK, Darmstadt)
- Trypanblau für die Mikroskopie, (MERCK, Darmstadt)

Für die Zellzahl-Bestimmung wurde aus der einprozentigen Stammlösung durch Verdünnung mit isotoner Kochsalzlösung (PHARMACIA, Erlangen) die 0,2%ige Gebrauchslösung hergestellt (Verdünnung 1:5).

- MyeloCult H5100 (STEM CELL TECHNOLOGIES INC, Vancouver, B.C.) stellte das Basismedium für die Kultivierung der CD34<sup>+</sup>-Zellen dar. Für die Stimulations- und Differenzierungsversuche wurden dem Medium verschiedene Wachstumsfaktoren alleine und in Kombination hinzugefügt (s.u.). Gelegentlich wurde das Medium ohne weitere Zusätze als Vergleichsansatz verwendet („zytokinfreies Medium“).
- Phosphate-buffered-saline 10× Konzentrat (PBS<sup>10x</sup>) (LIFE TECHNOLOGIES GmbH, Eggenstein) wurde zunächst 1:10 zur gebrauchsfertigen Lösung (PBS) verdünnt. Zur Verwendung als Waschpuffer wurde PBS mit 1% FCS versetzt. Bei durchflusszytometrischen Analysen wurden zusätzlich 1 ml/l Natriumazid 20% hinzugefügt (PBS<sup>FACS</sup>). Der Waschpuffer, der bei der immunomagnetischen Anreicherung der CD34<sup>+</sup>-Zellen zur Verwendung kam (MACS-Puffer) enthielt als Basis ebenfalls PBS. Dieses wurde vor Gebrauch mit 0,5% FCS und 2mM EDTA versetzt.

### 3.4. MONOKLONALE ANTIKÖRPER (MAK) FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)

Sofern nicht anders bezeichnet, handelt es sich bei den nachfolgend aufgeführten mAK um Mausimmunglobuline der Klasse IgG<sub>1</sub>, unkonjugiert oder kon-

jugiert mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) bzw. Phycoerythrin (PE), die gegen folgende Epitope gerichtet sind:

Fa. ALEXIS DEUTSCHLAND GmbH, Grünberg:

- CD80 (B7-1), FITC-konjugiert
- CD83, PE-konjugiert
- CD86 (B7-2), PE-konjugiert

Fa. BECTON DICKINSON, Heidelberg:

- Maus IgG<sub>1</sub>, FITC-konjugiert
- Maus IgG<sub>1</sub>, PE-konjugiert
- CD34 (anti-HPCA-2), FITC-konjugiert
- CD34 (anti-HPCA-2), PE-konjugiert
- CD38 (Leu<sup>TM</sup>-17), PE-konjugiert

Fa. COULTER IMMUNOTECH, Krefeld:

- Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>/ IgG<sub>1</sub>, FITC/PE-konjugiert
- CD 45 / CD14, FITC/PE-konjugiert
- HLA-DR (101 2a), FITC-konjugiert
- CD1a, PE-konjugiert
- CD14, FITC-konjugiert
- CD15, FITC-konjugiert
- CD33, PE-konjugiert
- CD45, FITC-konjugiert
- Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>, unkonjugiert

Fa. CYMBUS Biotechnology Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc,  
West Grove, PA, USA:

- CD1a (CBL 160) IgG<sub>2b</sub>, FITC-konjugiert
- Fluorescein (DTAF)-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment Ziege anti-Maus IgG

### **3.5. MATERIALIEN FÜR DIE IMMUNOMAGNETISCHE ANREICHERUNG VON ZELLEN**

- VarioMACS Magnetseparator (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)

- Säulen für die Positivselektion Typ VS<sup>+</sup> (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- VS<sup>+</sup>-Säulen Adapter (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- Säulen für die Positivselektion Typ RS<sup>+</sup> (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- RS<sup>+</sup>-Säulen Adapter (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- Zellsuspensionsfilter (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- MACS CD34<sup>+</sup> Isolierungs-Kit (QBEND/10) (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- MACS Ratte anti-Maus MicroBeads IgG<sub>1</sub> (MILTENY BIOTEC GmbH, Bergisch Gladbach)
- Probenröhrchen, steril mit Spezialstopfen Ø 12,4 mm, 4,5ml und Ø 18 mm, 14ml (GREINER GmbH, Frickenhausen)

### **3.6. ZYKINE UND VITAMINE FÜR DIE STIMULATION VON CD34<sup>+</sup>-ZELLEN**

Die Wachstumsfaktoren wurden singular oder als Kombination in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (s.u.).

- SCF = rh-Stammzellfaktor (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- FL-3 = rh-Flt3-Ligand (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- TPO = rh-Thrombopoetin (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- GM-CSF) = rh-Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- G-CSF = rh-Granulozyten-koloniestimulierender Faktor GRANOCYTE<sup>®</sup> (RHÔNE-POULENC RORER, Köln)
- IL-3 = rh-Interleukin-3 (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- IL-4 = rh-Interleukin-3 (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- IL-6 = rh-Interleukin-6 (PEPROTECH Inc., Rocky Hill, NJ)
- TNF- $\alpha$  = rh-Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen)
- EPO = rekombinantes humanes (rh-) Erythropoetin ERYPO<sup>®</sup> FS 4000 (CILAG GmbH / Fresenius AG)

- Vitamin D3 ( $D_3$ ) =  $[1,25(OH)_2D_3]$  Vitamin D Metabolit (HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basel)

### **3.7. SONSTIGE GERÄTE**

- Biogard Hood (BAKER Company, Sanford, Maine)
- Brutschrank Forma Scientific (LABOTECT, Göttingen)
- Zentrifuge Rotanta/AP (HETTICH, Tuttlingen)
- Szintillationszähler LS-1801 (BECKMANN, Unterschleißheim)

## 5. METHODEN

### 4.1. ERMITTLUNG DER ZELLZAHL

Die Zellen wurden mit Medium oder Puffer nach dem Waschen resuspendiert und das Gesamtvolumen der Suspension an der Skalierung der Pipette abgelesen. 10µl wurden entnommen und mit 0,2%iger gebrauchsfertiger Trypanblau-Lösung verdünnt. Für Leukapheresepräparate betrug der Verdünnungsfaktor in der Regel 1:100, für die Zellkulturen 1:2 bis 1:10 in Abhängigkeit von der zu erwartenden Zellzahl.

Gezählt wurden vier Quadranten (à 16 Quadrate) in der Neubauer-Zählkammer (das Volumen eines Quadranten beträgt  $10^{-4}$ ml). Nicht vitale Zellen, erkennbar durch eine blaue Anfärbung, wurden nicht mitgezählt. Aus dem Mittelwert der vier Quadranten dem Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml und dem verwendeten Verdünnungsfaktor wurde die Gesamtzellzahl nach folgender Formel errechnet:

$$n = \text{Mittelwert (in } 10^{-4}\text{ml)} \times \text{Volumen (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 4.2. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

#### 4.2.1. PRINZIP

Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting = FACS) steht für eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Ein Durchflußzytometer erlaubt durch die Verwendung eines Lasers (Wellenlänge = 418nm), die simultane Messung von fünf Parametern. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, um

anschließend wiederum definierte langwelligere Strahlung zu emittieren. Das Gerät ist in der Lage, gleichzeitig drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (F1, F2, F3) zu messen. Dementsprechend kann eine Zelle mit bis zu drei fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden, die vom Zytometer differenziert werden. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Ein- und Zweifachfärbungen unter Verwendung von Antikörpern, die mit den Farbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), dargestellt auf F1, und Phycoerythin (PE), dargestellt auf F2, markiert waren, verwendet. Diese sind aufgrund von verschiedenen Emissionsmaxima (530nm, Grünfluoreszenz (FITC) bzw. 585nm, Rotfluoreszenz (PE)) gut zu unterscheiden. Zusätzlich bedingen Größe und Granularität der einzelnen Zellen eine Lichtstreuung im Forward Scatter (FSC) bzw. Side-ward Scatter (SSC). Damit die Zellen tatsächlich einzeln den Analysepunkt (= Laserstrahl) erreichen, werden sie zuvor durch die Trägerflüssigkeit so stark beschleunigt, daß sich Aggregate auflösen und eine perlschnurartige Aufreihung der Einzelzellen resultiert (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung). Alle Signale werden von Detektoren empfangen, verstärkt und in elektrische Impulse umgewandelt, die von einem Computer aufgezeichnet werden. Die List-Mode-Datenaufnahme ermöglicht die elektronische Messwiederholung ohne Zellen zu jedem beliebigen Zeitpunkt. Darauf basiert die Auswertung mit dem Programm Cellquest. Hierbei werden die Intensitätsachsen von FSC und SSC in einem Koordinatensystem, in dem jeder Punkt einer Zelle entspricht, gegeneinander aufgetragen. Analog geschieht dies mit F1 und F2. Für jede Messung wurden 10.000 Zählereignisse (Zellen bzw. Zellkompartimente) gemessen.

#### 4.2.2. DURCHFÜHRUNG DER MESSUNG

Pro Messansatz wurden etwa  $10^5$  Zellen einer Zellsuspension und 20µl einer konjugierten Antikörpersuspension (entsprechend etwa 0,25µg Immunglobulin/Test) in ein FACS-Röhrchen pipettiert, gemischt und 20 min. bei +4 bis +8°C inkubiert. Im Fall einer Zweifachfärbung wurden zwei verschiedenen konjugierte Antikörper hinzu gegeben. Anschließend wurden die Proben mit

PBS<sup>FACS</sup> gewaschen, 5min bei 1320U/min bei 5°C zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Pellets mit PBS<sup>FACS</sup> auf ca. 100µl resuspendiert. Danach erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

#### **4.3. AUFREINIGUNG VON CD34<sup>+</sup>-ZELLEN MITTELS IMMUNOMAGNETISCHER SELEKTION (MACS-VERFAHREN)**

Die immunomagnetische Aufreinigung der CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgte gemäß Herstellerangaben.

##### 4.3.1. PRINZIP

Das Verfahren der magnetischen Zellsortierung (MACS) verbindet immunologische Methoden mit physikalischen Gegebenheiten. Ein monoklonaler Antikörper gegen die zu isolierende Zellpopulation wird mit kolloidalen superparamagnetischen Micro-Beads, d.h. magnetischen Partikeln konjugiert. Die aufzureinigenden Zellen, die sich in einer Zellsuspension befinden, werden mit diesem Antikörper markiert und durchlaufen anschließend ein starkes Magnetfeld (s.u.). Unmarkierte Zellen können das Magnetfeld durchlaufen, während die gewünschten, mit den entsprechenden Micro-Beads markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten werden. Um eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen kann dieser Vorgang mehrfach wiederholt werden. Ebenso ist nach enzymatischer Entfernung der Micro-Beads eine weitere Sortierung der Zellen nach anderen Oberflächenantigenen möglich (dies war für die Versuche dieser Arbeit allerdings nicht notwendig).

##### 4.3.2. DURCHFÜHRUNG DER AUFREINIGUNG

Zunächst wurde in der durch Leukapherese gewonnenen Probe die Gesamtzellzahl bestimmt und mit etwa 50µl eine FACS-Analyse durchgeführt um den CD34<sup>+</sup>-Gehalt der Zellen zu bestimmen (meist waren ca. 0,5-1% der Gesamtzellen CD34-positiv). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit ca. 40ml

MACS-Puffer in einem 50ml-Röhrchen gewaschen und der Überstand dekantiert. Nach dem zweiten Waschvorgang wurde das Pellet mit 300µl MACS-Puffer je  $5 \times 10^8$  Gesamtzellen resuspendiert. Es wurden pro  $5 \times 10^8$  Zellen jeweils 100µl humanes Immunglobulin und monoklonaler, Hapten-konjugierter CD34 Antikörper (Reagenz A1 bzw. A2 des CD34-Isolierungskits) dazu pipettiert, gut vermischt und 15min bei 6-12°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit MACS-Puffer (mind. 10-faches Färbevolumen) gewaschen. Das Pellet wurde mit 400µl MACS-Puffer je  $5 \times 10^8$  Zellen resuspendiert und mit 100µl kolloidalen, super-paramagnetischen Micro-Beads (Reagenz B des CD34-Isolierungskits) pro  $5 \times 10^8$  Zellen gemischt, 15min bei 6-12°C inkubiert und im Anschluß erneut mit MACS-Puffer gewaschen (s.o.). Die Zellen wurden mit MACS-Puffer auf eine Konzentration von  $2 \times 10^8$ /ml resuspendiert.

Zur Aufreinigung der Zellen wurden, abhängig von der Zellzahl, verschiedene Selektionssäulen verwendet. Bei mehr als  $10^8$  Gesamtzellen wurde eine Säule vom Typ VS<sup>+</sup> (max. Kapazität:  $2 \times 10^9$  Gesamtzellen bzw.  $10^8$  CD34-positive Zellen) eingesetzt, lag die Zellzahl darunter kam eine Säule vom Typ RS<sup>+</sup> zur Verwendung. Da bei allen verwendeten Separaten die Gesamtzellzahl mindestens  $10^8$  betrug wurde zu Beginn der Aufreinigung stets eine VS<sup>+</sup> Säule verwendet. Die Säule wurde am Magnetseparator installiert und mit 2ml MACS-Puffer gespült, um diese zu kühlen und Konservierungsstoffe sowie eventuelle Produktionsrückstände zu entfernen. Dann wurden die Zellen über einen Zellsuspensionsfilter auf die Säule pipettiert und der Durchlauf im ersten Röhrchen aufgefangen. Nachfolgend wurde die Säule dreimal mit 2ml MACS-Puffer gespült, um schwach gebundene Zellen auszuwaschen. Diese wurden für jeden Waschgang separat aufgefangen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und auf ein steriles 10ml-Röhrchen gesetzt. Zur Elution der angereicherten Zellen wurden 5ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mit dem Kolben unter mäßigem Druck eluiert.

Aus jeder Fraktion wurden Proben zur Zellzählung und für die FACS-Analyse entnommen. Um eine höhere Aufreinigung zu erreichen, wurde das CD34<sup>+</sup>-Eluat immer einem zweiten Durchgang unter Verwendung einer RS<sup>+</sup>-Säule



unterzogen, die jeweils mit 0,5ml MACS-Puffer gespült und abschließend mit 1ml MACS-Puffer eluiert wurde.

#### **4.4. STIMULATION VON CD34<sup>+</sup>-ZELLKULTUREN MIT WACHSTUMSFAKTOREN**

Nach Aufreinigung der CD34<sup>+</sup>-Zellen erfolgte das Ansetzen der Zellkulturen. Für alle Stimulations- und Differenzierungsversuche wurden 24well Flachbodenplatten verwendet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die aufgereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in Langzeitkulturmedium Myelocult H5100 resuspendiert. Entsprechend der Zellzahl wurde die Zellsuspension auf die Konzentration  $3 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter Langzeitkulturmedium verdünnt. Die Suspension wurde, je nach Anzahl der zu untersuchenden Kulturansätze, aufgeteilt und das Medium mit entsprechenden Wachstumsfaktoren in den unterschiedlichen Konzentrationen versetzt (s.u.). Da sowohl das Medium als auch die Wachstumsfaktoren eingefroren gelagert wurden, musste beides vor Verwendung im 37 Grad warmen Wasserbad aufgetaut werden. Abschließend wurden jeweils 0,5ml des fertigen Zytokinansatzes pro well (entsprechend  $1,5 \times 10^5$  Zellen) in die Kulturplatten überführt. Zum Vergleich wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen in *Myelocult H5100* ohne Zytokine als „unstimulierte CD34<sup>+</sup>-Zellen“ in Kultur genommen.

Da die Kultivierung immer über mindestens sechs Tage erfolgte, musste das Medium regelmäßig erneuert werden. Dies geschah alle zwei Tage, wobei die Hälfte des alten Mediums vorsichtig von den Kulturen abgezogen und verworfen und im Anschluss durch frisches Medium ersetzt wurde. Waren die Zellen zu dicht gewachsen, wurden sie auf zwei Wells aufgesplittet und das fehlende Volumen mit frischem Medium ergänzt, sodass sich die Entfernung des alten Mediums erübrigte.

Ansätze mit Konzentrationen der verwendeten Zytokine:

Einzelzytokinansätze:

- SCF<sup>0,5x</sup> (50ng/ml)
- SCF (100ng/ml)

- SCF<sup>2x</sup> (200ng/ml)
- TPO<sup>0,5x</sup> (7,5ng/ml)
- TPO (15ng/ml)
- TPO<sup>2x</sup> (30ng/ml)
- FL-3<sup>0,5x</sup> (37,5ng/ml)
- FL-3 (75ng/ml)
- FL-3<sup>2x</sup> (150ng/ml)

Zweifachzytokinansätze:

- <ST> (SCF 100ng/ml, TPO 15ng/ml)
- <SF> (SCF 100ng/ml, FL-3 75ng/ml)
- <TF> (TPO 15ng/ml, FL-3 75ng/ml)

Mehrfachzytokinansätze:

- <TSF> (TPO 15ng/ml, SCF 100ng/ml, FL-3 75ng/ml)
- <TSF<sup>2x</sup>> (TPO 15ng/ml, SCF 100ng/ml, FL-3 150ng/ml)
- <TSFI> (TPO 15ng/ml, SCF 100ng/ml, FL-3 75ng/ml, IL-3 20ng/ml)
- <STI> (SCF 100ng/ml, TPO 15ng/ml, IL-3 20ng/ml)
- <SFI> (SCF 100ng/ml, FL-3 75ng/ml, IL-3 20ng/ml)
- <CC6> (SCF 100ng/ml, IL-3 20ng/ml, IL-6 50ng/ml, EPO 5 I.U./ml, G-CSF 50ng/ml, GM-CSF 1,8ng/ml)

Mehrfachzytokinansätze zur Generierung dendritischer Zellen (DC):

- <DC-A> (SCF 10ng/ml, IL-3 20ng/ml, IL-6 50ng/ml, EPO 5 I.U./ml, GM-CSF 20ng/ml, IL-4 100ng/ml)
- <DC-B> (SCF 10ng/ml, IL-3 20ng/ml, IL-6 50ng/ml, EPO 5 I.U./ml, GM-CSF 20ng/ml, TNF- $\alpha$  2,5ng/ml)
- <DC-C> (IL-4 100ng/ml, TNF- $\alpha$  2,5ng/ml, GM-CSF 20ng/ml);

Vor dem Einsetzen der Zellen in <DC-C> erfolgte eine 24-stündige Vorstimulation in <CC6>

Ansätze mit Vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>):

D<sub>3</sub> lag als Stammlösung in der Konzentration 10<sup>-3</sup> M in Ethanol gelöst vor und wurde in allen Ansätzen in der Konzentration 10<sup>-7</sup> M verwendet. Das

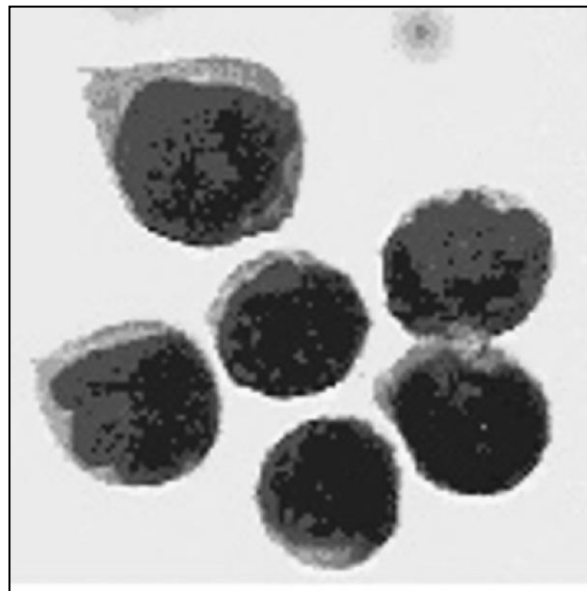
Vitamin wurde in Kombination mit den Ansätzen <TSF> und <DC-C> verwendet, wobei es erst im Verlauf der Inkubation zugesetzt wurde.

- <TSF> + D<sub>3</sub> (ab d3) – Vitamin D3 ab Inkubationstag 3
- <TSF> + D<sub>3</sub> (ab d6) – Vitamin D3 ab Inkubationstag 6
- <TSF> + D<sub>3</sub> (ab d9) – Vitamin D3 ab Inkubationstag 9
- <DC-C> + D<sub>3</sub> (ab d3) – Vitamin D3 ab Inkubationstag 3
- <DC-C> + D<sub>3</sub> (ab d6) – Vitamin D3 ab Inkubationstag 6
- <DC-C> + D<sub>3</sub> (ab d9) – Vitamin D3 ab Inkubationstag 9

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. ANREICHERUNG VON CD34<sup>+</sup>- STAMMZELLEN DURCH DAS MACS-VERFAHREN

Vor der Aufreinigung der Stammzellapheresate lag der Anteil an hämatopoetischen, CD34-positiven Stammzellen, je nach Separat zwischen 0,45% und 5,1%. Die Zahl der zu Beginn der Aufreinigung eingesetzten Zellen variierte von  $5 \times 10^8$  bis  $4 \times 10^9$  Zellen. Die magnetische Aufreinigung erfolgte nach Inkubation mit CD34-Microbeads, mittels zweimaliger Passage über eine magnetische Säule vom Typ VS<sup>+</sup> beziehungsweise bei niedrigeren Zellzahlen vom Typ RS<sup>+</sup>. Die angereicherten Zellsuspensionen (Eluate) enthielten bis zu 99,4% CD34-positiver Stammzellen. Aufgereinigt wurden insgesamt 32 verschiedene Separate. Bereits ein einmaliger Magnetsäulen-Durchlauf ermöglichte eine Anreicherung auf median 78% CD34-positiver Zellen (range: 63% - 92%), aller-



*Abbildung 2: durch das MACS Verfahren angereicherte CD34<sup>+</sup>-Stammzellen*

dings wurden für die folgenden Versuche ausschließlich Zellen nach zweimaligem Magnetsäulen-Durchlauf verwendet. Auf diese Weise wurden Endkonzent-

trationen von median 97,5% CD34-positiver Zellen erreicht (range: 95,1% - 99,4%). (Abb. 2 und Tab. 1)

|          | Gesamtzellzahl        | CD34 <sup>+</sup> -Anteil (%) | CD34 <sup>+</sup> -Zellzahl |
|----------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Vor MACS | 9,6 x 10 <sup>8</sup> | 1,9%                          | 1,82 x 10 <sup>7</sup>      |
| Eluat 1  | 1,7 x 10 <sup>7</sup> | 92%                           | 1,56 x 10 <sup>7</sup>      |
| Eluat 2  | 1,2 x 10 <sup>7</sup> | 98%                           | 1,18 x 10 <sup>7</sup>      |

*Tabelle 1: Zellzahlen im Verlauf der CD34<sup>+</sup>-Zellanreicherung durch das MACS-Verfahren (exemplarisch ist die Anreicherung eines Separats dargestellt)*

## **5.2. AMPLIFIKATION UND DIFFERENZIERUNG VON HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN MITTELS STIMULATION DURCH VERSCHIEDENE ZY TOKINE**

Ein Ziel der Arbeit war es, den Einfluß der Zytokine Stammzellfaktor (SCF), Thrombopoetin (TPO) und Flt-3 Ligand (FL-3) sowie im weiteren Verlauf auch granulocyte-colony-stimulating-factor (G-CSF), granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoetin (EPO) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) auf CD34-positive, hämatopoetische Stammzellen zu untersuchen. Dabei wurde zunächst versucht, ein Zytokin bzw. eine Zytokinkombination zu finden, die *in vitro* eine möglichst hohe Proliferation bei gleichzeitig möglichst geringer Differenzierungsinduktion ermöglichte. Zu Beginn wurden jeweils eine definierte Anzahl ( $1,5 \times 10^5$ ) von Stammzellen in zytokinfreiem Medium und in Medium, das jeweils ein Zytokin enthielt, kultiviert. Diese Zytokine waren die bereits erwähnten SCF, TPO und FL-3, die in drei verschiedenen Konzentrationen getestet wurden. SCF wurde in den Konzentrationen 50ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml verwendet, TPO in den Konzentrationen 7,5ng/ml, 15ng/ml und 30ng/ml und FL-3 in den Konzentrationen 37,5ng/ml, 75ng/ml und 150ng/ml. In

einem zweiten Schritt wurden Zweifachkombinationen dieser Zytokine, jeweils in der mittleren Konzentration, getestet und in einem dritten Schritt Zytokinmehrfachkombinationen (siehe 5.2.1.1 – 5.2.1.4.). (Abb. 1)

Weiterhin sollte eine gezielte Differenzierung in monozytäre und dendritische Zellen erfolgen sowie das Ausgangsprofil von benignen Stammzellen bezüglich der Oberflächenantigene vor Differenzierung untersucht werden (siehe 5.2.2. – 5.2.2.5.). (Abb. 1)

Bei der Oberflächentypisierung wurden zunächst CD34, CD38, CD14, CD15, CD33, HLA-DR, im weiteren Verlauf auch CD1a, CD80, CD83 und CD86 evaluiert.

#### 5.2.1. STIMULATION VON CD34<sup>+</sup>-STAMMZELLEN MIT DEM ZIEL EINER HOHEN AMPLIFIKATION BEI MÖGLICHT GERINGER DIFFERENZIERUNGSINDUKTION

Zunächst sollte der Einfluß verschiedener Zytokine auf die Proliferation von benignen Stammzellen mit dem Ziel einer möglichst hohen Amplifikation bei gleichzeitig geringer Differenzierungsinduktion untersucht werden. Dies erfolgte in drei Einzelschritten: nach Verwendung einzelner Zytokine wurden Zweifachkombinationen und schließlich Zytokinmehrfachkombinationen verwendet (siehe 5.2.1.1. bis 5.2.1.4.).

##### 5.2.1.1. STIMULATION VON STAMMZELLEN UNTER VERWENDUNG EINZELNER ZYTOKINE

Zur Verwendung kamen die Zytokine SCF, TPO sowie FL-3 in den oben genannten Konzentrationen. Zusammen mit einem zytokinfreien Ansatz (Leerkontrolle) ergaben sich zehn verschiedene Kulturmedien. Sämtliche untersuchte Medien zeigen an Auswerttag zwei einen Amplifikationsfaktor <1. Der Anteil an vitalen Zellen fiel gegenüber dem Ausgangswert in allen Fällen ab. An Auswerttag vier ist in allen Ansätzen gegenüber Tag zwei ein Wiederanstieg der vitalen Zellen zu verzeichnen, der Amplifikationsfaktor war jedoch in allen Fällen <1. An Auswerttag sechs (Abb. 3) wiesen lediglich zwei Ansätze, diejenigen mit SCF in mittlerer und hoher Konzentration, einen Amplifikationsfaktor >1, und damit einen Anteil an vitalen Zellen über dem Ausgangswert auf. Der

prozentuale wie auch absolute Anteil der CD34<sup>+</sup>-Stammzellen sank in allen analysierten Ansätzen kontinuierlich ab. An Auswerttag sechs enthielt des Medium mit TPO in der mittleren Konzentration mit 64% bzw.  $0,77 \times 10^5$

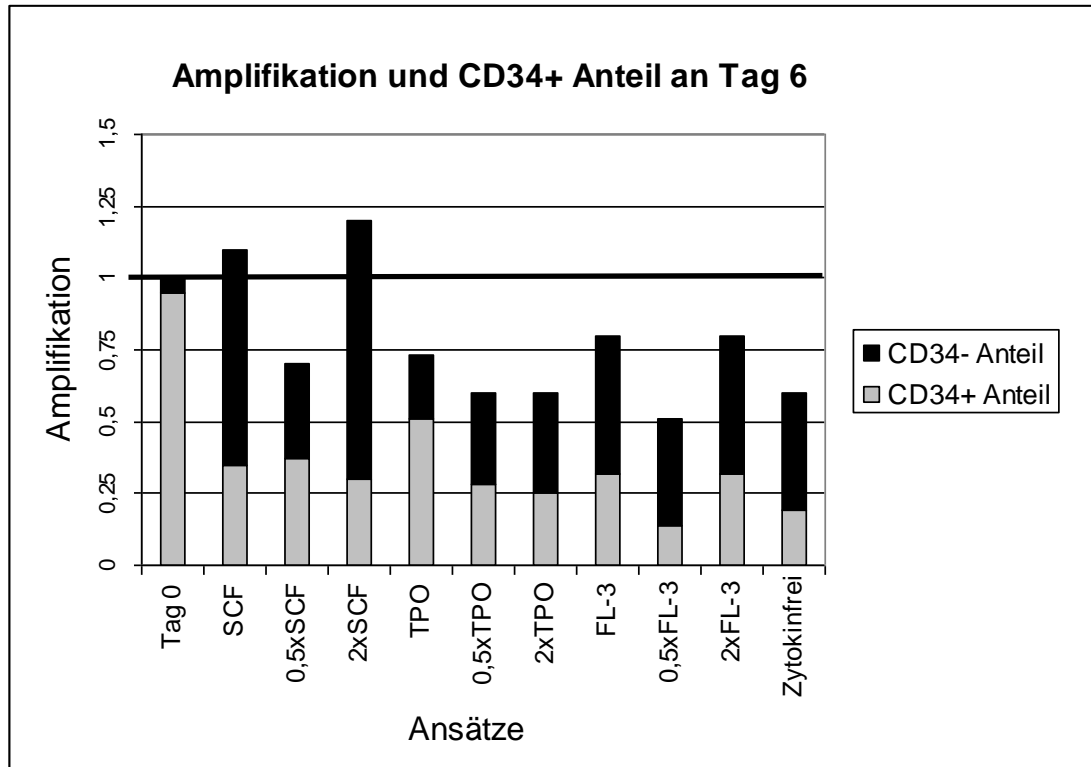


Abbildung 3: Gesamtzellamplifikation und CD34<sup>+</sup>-Zellanteil an Tag sechs nach Inkubation mit verschiedenen Zytokinen; für alle Ansätze gilt n=3; dargestellt ist der Median.

CD34<sup>+</sup>-Zellen den prozentual und absolut höchsten Anteil an Stammzellen (Abb. 3). An Auswerttag 12 wiesen alle untersuchten Medien einen Amplifikationsfaktor <1 und einen CD34<sup>+</sup>-Zellanteil ≤ 6% auf. (siehe auch Tab. 2)

#### 5.2.1.2. STIMULATION VON STAMMZELLEN MIT ZWEIFACHZYTOKINKOMBINATIONEN

Im nächsten Schritt wurden Zweifachkombinationen aus den vorher einzeln getesteten Zytokinen untersucht. Kombiniert wurden die Wachstumsfaktoren jeweils in der mittleren Konzentration, es ergaben sich somit die Ansätze <ST> mit SCF und TPO, <SF> mit SCF und FL-3 sowie <TF> mit den Faktoren TPO und FL-3.

Bei der Versuchsauswertung war ein ähnliches Ergebnis wie bei den Einzelzytokinansätzen zu beobachten, wobei beide Ansätze, die SCF enthielten, am Auswerttag sechs jeweils einen Amplifikationsfaktor von 1,3 aufwiesen und damit einen Anteil von vitalen Zellen, der über dem Ausgangswert lag. Der CD34<sup>+</sup>-Zellanteil an Tag sechs lag zwischen 41% und 44% (Abb. 4 und Tab.3). Im zeitlichen Verlauf ähnelten die Ergebnisse denen der Einzelzytokinansätze. An Tag zwei sank der Anteil an vitalen Zellen in allen Kombinationen ab, um an Tag sechs seinen Höhepunkt zu erreichen. Bei längerer Inkubation (Auswerttag 12) sank die Anzahl der vitalen Zellen wieder ab. Zu keinem Zeitpunkt lag der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen (prozentual oder absolut) über dem Ausgangswert. (Tab. 3)

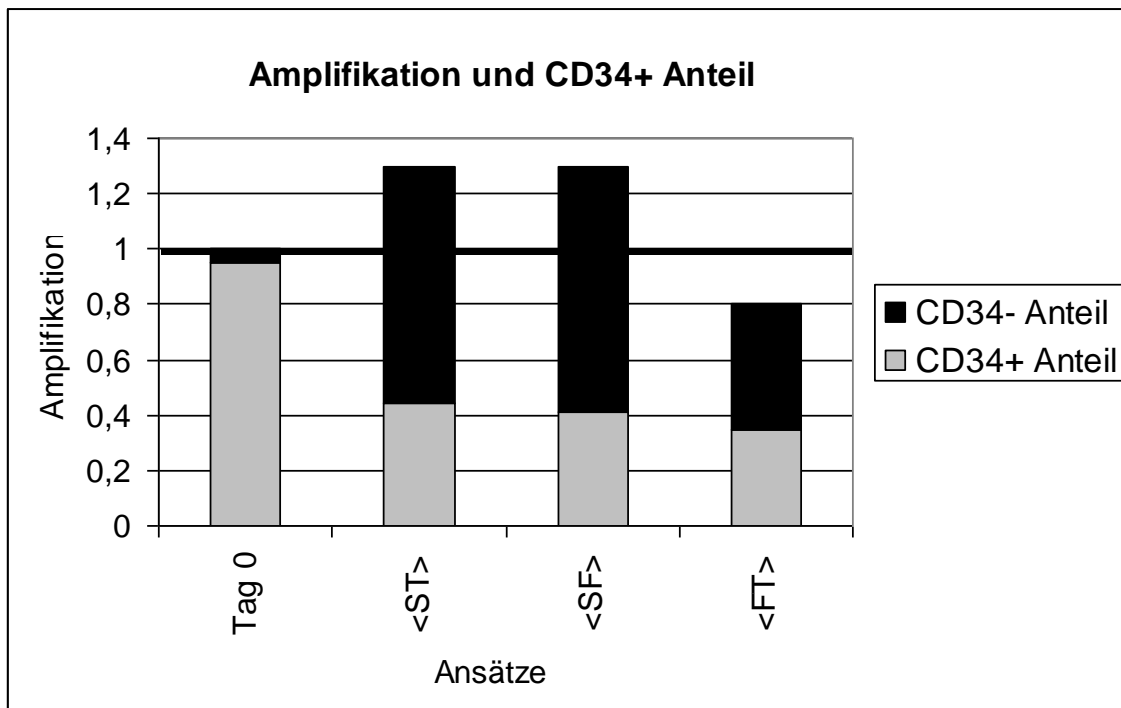


Abbildung 4: Amplifikation und CD34<sup>+</sup>-Zellanteil unter dem Einfluss von Zweifachzytokinkombinationen an Tag sechs im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0); für alle Ansätze gilt n=3; dargestellt ist der Median.



### 5.2.1.3. STIMULATION VON STAMMZELLEN MIT MEHRFACHZYTOKINKOMBINATIONEN

Bei der Untersuchung von Mehrfachzytokinkombinationen wurden insgesamt sechs verschiedene Ansätze verwendet. Zum Einsatz kam die Dreifachkombination aus den bereits untersuchten Zytokinen SCF, TPO und FL-3 unter Verwendung der jeweils mittleren Konzentration, <TSF>, sowie ein Ansatz mit FL-3 in der doppelten Konzentration, <TSF<sup>2x</sup>>. Weiterhin wurden Kombinationen mit IL-3 getestet. IL-3 wurde zum einen mit <TSF> zu <TSFI> kombiniert, außerdem mit den, SCF enthaltenden, Zweifachzytokinkombinationen <SF> und <ST> aus den obigen Versuchen zu <SFI> und <STI>. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein Medium mit sechs verschiedenen Zytokinen, <CC6> mit SCF, IL-3, IL-6, EPO, G-CSF und GM-CSF mit einem hohen Proliferationsvermögen eingesetzt (modifiziert nach Hatzfeld, 1996). (11)

Die Mehrfachzytokinkombinationen induzierten eine höhere Amplifikation als die Ein- und Zweifachansätze. Der höchste Proliferationsreiz (Amplifikationsfaktor 14 an Tag sechs und 30 an Tag 12) wurde durch den Ansatz <CC6> erzielt. Die in <TSFI> kultivierten Zellen wiesen an Tag sechs eine 8,5 fache Amplifikation auf. Die Dreifachzytokinkombinationen (<TSF>, <TSF<sup>2x</sup>>, <STI> und

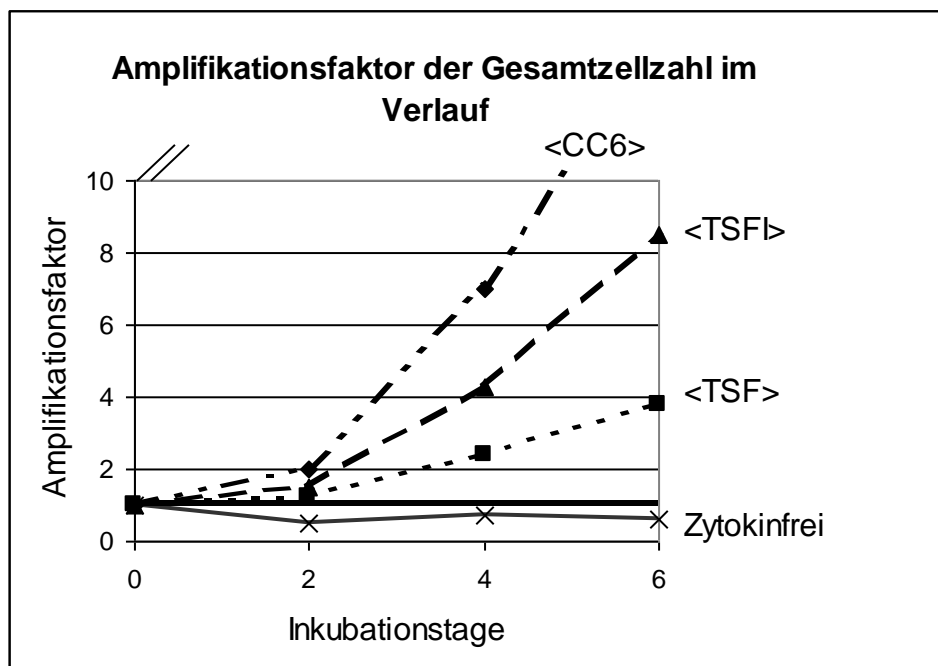


Abbildung 5: Amplifikationsfaktor im Verlauf bei drei verschiedenen Mehrfachzytokinansätzen im Vergleich zu zytokinfreiem Medium; für den zytokinfreien Ansatz gilt n=3, für alle anderen n=10; dargestellt ist der Median.

<SFI>) wiesen an Tag sechs Amplifikationsfaktoren zwischen 2,8 und 4,6 auf und lagen damit ebenfalls über denen der Zweifachzytokinkombinationen. Darüberhinaus stieg der Anteil der vitalen Zellen auch bei längerer Inkubationsdauer weiter an. An Auswerttag 12 fanden sich in sämtlichen Ansätzen ansteigende Werte. Ein Absinken der absoluten Zellzahl an Auswerttag zwei gegenüber dem Ausgangswert (Tag 0) fand sich nur im Ansatz <STI> (Amplifikationsfaktor 0,9). Alle anderen Mehrfachzytokinansätze wiesen an Auswerttag zwei einen Amplifikationsfaktor  $\geq 1$  auf. (Abb. 5 und Tab. 3 & 4)

Die CD34<sup>+</sup>-Zellzahl stieg in allen Ansätzen gegenüber dem Ausgangswert ( $1,44 \times 10^5$  Zellen) an, wobei alle Ansätze an Auswerttag sechs die jeweils absolut höchsten CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen aufwiesen. Die höchsten CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen an Tag sechs fanden sich in <CC6> ( $4,20 \times 10^5$  Zellen), <TSFI> ( $4,08 \times 10^5$  Zellen) und in <TSF> ( $2,75 \times 10^5$  Zellen) wobei der prozentuale CD34<sup>+</sup>-Anteil in <TSF> mit 48% am höchsten lag (Tag sechs). In <CC6> lag der prozentuale

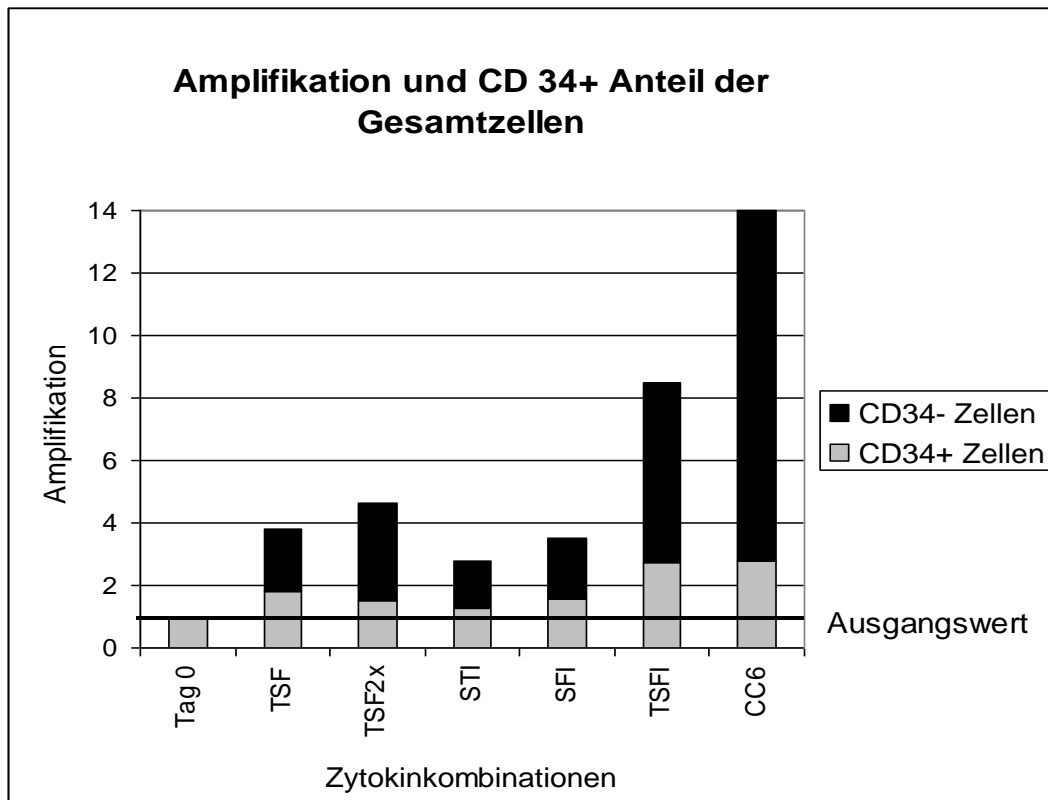


Abbildung 6: Amplifikation und CD34<sup>+</sup>-Zellanteil unter dem Einfluß von Mehrfachzytokinkombinationen an Tag sechs; für <TSF>, <TSFI> und <CC6> gilt n=10, für <TSF<sup>2x</sup>>, <STI> und <SFI> gilt: n=3; dargestellt ist der Median.

CD34<sup>+</sup>-Anteil bei 20%, in <TSFI> bei 32%. <TSFI> und <CC6> induzierten allerdings eine höhere Gesamtzellproliferation.

Bei längerer Kultivierung (Auswerttag 12) stieg zwar die Gesamtzellzahl weiter an, der prozentuale CD34<sup>+</sup>-Anteil fiel jedoch relativ stark ab, so dass der absolute Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen an Auswerttag 12 in allen Ansätzen unterhalb des Ausgangswertes lag. Der CD34<sup>+</sup>-Zellanteil war im Ansatz <TSF> mit 11% am größten. Alle anderen Ansätze wiesen an Tag 12 einen CD34<sup>+</sup>-Zellanteil von ≤ 4% auf. Das Maximum der CD34<sup>+</sup>-Zellzahl lag median bei Tag sechs. (Abb. 6 und 7 und Tab. 4)

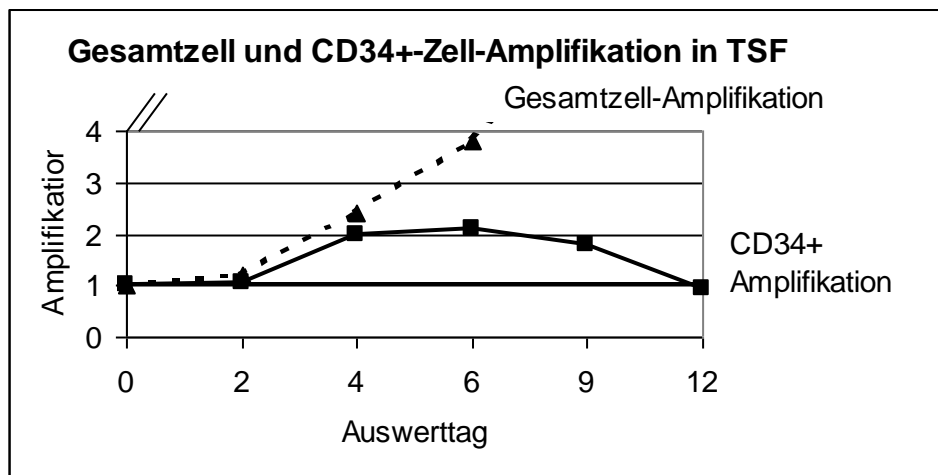


Abbildung 7: Amplifikationsfaktor und CD34<sup>+</sup>-Zellamplifikation im Verlauf in <TSF>; n=10, dargestellt ist der Median

#### 5.2.1.4. ÜBERBLICK ÜBER DIE DURCHGEFÜHRTEN AMPLIFIKATIONSVERSUCHE

für alle untersuchten Einzel- und Zweifachzytokinansätze und den zytokinfreien Vergleichsansatz (Leerkontrolle) gilt:

- Gesamtzellamplifikation von  $\leq 1,3$  an Tag sechs. Absinken der Gesamtzellzahl nach Tag sechs.
- Die höchste Proliferationsrate fand sich an Tag sechs in den Zweifachzytokinansätzen, die SCF bzw. in den Einzelzytokinansätzen, die SCF in mittlerer und hoher Konzentration enthielten.
- Die prozentual und absolut höchsten CD34<sup>+</sup>-Zellanteile fanden sich an Tag sechs in TPO und in <ST> mit  $0,77 \times 10^5$  Zellen bzw.  $0,86 \times 10^5$  Zellen.
- Zu keinem Auswertzeitpunkt fanden sich mehr CD34<sup>+</sup>-Zellen als zu Beginn eingesetzt wurden.
- Nach längerer Inkubation (Auswerttag 12) fielen die CD34<sup>+</sup>-Zellanteile auf  $\leq 5 \times 10^3$  Zellen ab.

für die untersuchten Mehrfachzytokinansätze gilt:

- höhere Amplifikationsfaktoren als bei den Einzel- und Zweifachansätzen (höchste Proliferationsrate mit 14-facher Amplifikation in <CC6> an Tag sechs), bei längerer Inkubation (Auswerttag 12) in allen Ansätzen weiterer Anstieg der Gesamtzellzahl (30-fache Amplifikation in <CC6>)
- Absinken der Gesamtzellzahl an Tag zwei gegenüber dem Ausgangswert nur bei <STI>, alle anderen Ansätze wiesen an Auswerttag zwei einen Amplifikationsfaktor  $\geq 1$  auf.
- Anstieg der CD34<sup>+</sup>-Zellzahl an Tag sechs gegenüber dem Ausgangswert in allen Ansätzen. Höchste CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen an Tag sechs in <CC6> ( $4,2 \times 10^5$  Zellen), <TSFI> ( $4,08 \times 10^5$  Zellen) und <TSF> ( $2,75 \times 10^5$  Zellen)
- prozentualer CD34<sup>+</sup>-Anteil an Tag sechs am höchsten in <TSF> (48%)
- Bei längerer Inkubation (Auswerttag 12) Absinken der CD34<sup>+</sup>-Zellzahl in allen Ansätzen unterhalb des Ausgangswertes. Größter Anteil an Tag 12 in <TSF> mit 11% ( $1,32 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>-Zellen absolut). (*Übersicht in Tab. 2*)

| Medium                                 | n                | Gesamtzellamplifikation  |            |            |            |            | auf die Gesamtzellzahl bezogener prozentualer CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil<br>(in Klammern prozent. CD34 <sup>+</sup> -Anteil im Vgl. zur CD34 <sup>+</sup> -Ausgangszahl) |           |           |           |          |
|--|------------------|--|------------|------------|------------|------------|---|-----------|-----------|-----------|----------|
|  |                  | <i>kursiv sind die Gesamtzellzahlen absolut (x 10<sup>5</sup>) mit range angegeben</i> |            |            |            |            | <i>kursiv sind die CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen absolut (x 10<sup>5</sup>) mit range angegeben</i>   |           |           |           |          |
|  |                  | Auswerttag   |            |            |            |            | Auswerttag  |           |           |           |          |
|  |                  | 0  | 2          | 4          | 6          | 12         | 0   | 2         | 4         | 6         | 12       |
| <b>Zytokinfrei<br/>(Leerkontrolle)</b> | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,5</b> | <b>0,7</b> | <b>0,6</b> | <b>0,2</b> | <b>96</b>   | <b>69</b> | <b>50</b> | <b>32</b> | <b>0</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 0,75       | 1,05       | 0,90       | 0,30       | (100)   | (35)      | (35)      | (17)      | (0)      |
| range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,5-0,8    | 1,0-1,3    | 0,8-0,9    | 0,3-0,45   | 1,4-1,48  | 0,4-0,6   | 0,3-0,6   | 0,2-0,35  | 0,0-0,05 |
| <b>0,5xSCF</b>                         | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,5</b> | <b>0,7</b> | <b>0,7</b> | <b>0,6</b> | <b>96</b>   | <b>85</b> | <b>61</b> | <b>53</b> | <b>4</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 0,75       | 1,05       | 1,05       | 0,90       | (100)   | (45)      | (45)      | (38)      | (3)      |
| range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,6-0,8    | 0,8-1,1    | 0,95-1,1   | 0,85-0,9   | 1,4-1,48  | 0,6-0,75  | 0,6-0,7   | 0,5-0,55  | 0,05-0,1 |
| <b>SCF</b>                             | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,4</b> | <b>0,9</b> | <b>1,1</b> | <b>0,9</b> | <b>96</b>   | <b>80</b> | <b>45</b> | <b>32</b> | <b>2</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 0,6        | 1,35       | 1,65       | 1,35       | (100)   | (31)      | (42)      | (38)      | (3)      |
| range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,4-0,7    | 1,1-1,4    | 1,5-1,8    | 1,1-1,5    | 1,4-1,48  | 0,3-0,6   | 0,4-0,6   | 0,5-0,7   | 0,0-0,1  |
| <b>2xSCF</b>                           | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,9</b> | <b>1</b>   | <b>1,2</b> | <b>0,8</b> | <b>96</b>   | <b>70</b> | <b>50</b> | <b>25</b> | <b>3</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 1,35       | 1,50       | 1,80       | 1,20       | (100)   | (66)      | (52)      | (31)      | (3)      |
| range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,9-1,6    | 1,1-1,7    | 1,7-2,0    | 1,0-1,5    | 1,4-1,48  | 0,8-1,0   | 0,7-0,9   | 0,4-0,5   | 0,0-0,1  |
| <b>0,5xTPO</b>                         | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,5</b> | <b>0,5</b> | <b>0,6</b> | <b>0,4</b> | <b>96</b>   | <b>80</b> | <b>60</b> | <b>47</b> | <b>4</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 0,75       | 0,75       | 0,90       | 0,60       | (100)   | (42)      | (31)      | (31)      | (0)      |
| range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,6-0,8    | 0,6-0,8    | 0,8-1,0    | 0,6-0,7    | 1,4-1,48  | 0,5-0,6   | 0,4-0,6   | 0,3-0,45  | 0,0-0,05 |
| <b>TPO</b>                             | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,6</b> | <b>0,8</b> | <b>0,8</b> | <b>0,6</b> | <b>96</b>   | <b>88</b> | <b>78</b> | <b>64</b> | <b>4</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 0,90       | 1,20       | 1,20       | 0,90       | (100)   | (52)      | (66)      | (52)      | (3)      |
| Range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,8-1,0    | 1,2-1,2    | 1,2-1,4    | 0,8-0,9    | 1,4-1,48  | 0,7-0,8   | 0,8-1,0   | 0,75-0,8  | 0,05-0,1 |
| <b>2xTPO</b>                           | <b>3</b>         | <b>1</b>   | <b>0,4</b> | <b>0,5</b> | <b>0,6</b> | <b>0,5</b> | <b>96</b>   | <b>73</b> | <b>57</b> | <b>42</b> | <b>6</b> |
| Zellzahl abs.                          | x10 <sup>5</sup> | 1,5  | 0,60       | 0,75       | 0,90       | 0,75       | (100)   | (31)      | (31)      | (28)      | (3)      |
| range                                  | x10 <sup>5</sup> | -  | 0,5-0,6    | 0,75-0,8   | 0,8-1,0    | 0,75-0,8   | 1,4-1,48  | 0,4-0,5   | 0,4-0,7   | 0,3-0,4   | 0,0-0,05 |

Tabelle 2, 1. Teil: Zellamplifikation und CD34<sup>+</sup>-Anteil in den untersuchten Einzelzytokinansätzen im Verlauf; zum Vergleich ist die Leerkontrolle angegeben.

|                 |               |          |            |            |            |            |           |           |           |           |          |
|-----------------|---------------|----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| <b>0,5xFL-3</b> | <b>3</b>      | <b>1</b> | <b>0,5</b> | <b>0,6</b> | <b>0,5</b> | <b>0,3</b> | <b>96</b> | <b>68</b> | <b>45</b> | <b>27</b> | <b>3</b> |
|                 |               |          |            |            |            |            | (100)     | (35)      | (28)      | (14)      | (0)      |
| Zellzahl abs.   | $\times 10^5$ | 1,5      | 0,75       | 0,90       | 0,75       | 0,45       | 1,44      | 0,51      | 0,41      | 0,20      | 0,0      |
| range           | $\times 10^5$ | -        | 0,8-0,9    | 0,8-0,9    | 0,6-0,8    | 0,45-0,5   | 1,4-1,48  | 0,5-0,6   | 0,4-0,6   | 0,1-0,3   | 0,0-0,0  |
| <b>FL-3</b>     | <b>3</b>      | <b>1</b> | <b>0,5</b> | <b>0,7</b> | <b>0,8</b> | <b>0,6</b> | <b>96</b> | <b>75</b> | <b>58</b> | <b>40</b> | <b>4</b> |
|                 |               |          |            |            |            |            | (100)     | (49)      | (45)      | (35)      | (3)      |
| Zellzahl abs.   | $\times 10^5$ | 1,5      | 0,75       | 1,05       | 1,20       | 0,90       | 1,44      | 0,70      | 0,65      | 0,5       | 0,05     |
| range           | $\times 10^5$ | -        | 0,6-0,8    | 1,0-1,15   | 0,9-1,3    | 0,6-0,9    | 1,4-1,48  | 0,65-0,8  | 0,5-0,7   | 0,35-0,5  | 0,05-0,1 |
| <b>2xFL-3</b>   | <b>3</b>      | <b>1</b> | <b>0,6</b> | <b>0,7</b> | <b>0,8</b> | <b>0,6</b> | <b>96</b> | <b>78</b> | <b>63</b> | <b>40</b> | <b>4</b> |
|                 |               |          |            |            |            |            | (100)     | (49)      | (45)      | (21)      | (3)      |
| Zellzahl abs.   | $\times 10^5$ | 1,5      | 0,90       | 1,05       | 1,20       | 0,90       | 1,44      | 0,70      | 0,65      | 0,30      | 0,05     |
| range           | $\times 10^5$ | -        | 0,8-1,1    | 1,0-1,2    | 1,1-1,4    | 0,9-1,2    | 1,4-1,48  | 0,7-0,7   | 0,6-0,8   | 0,25-0,4  | 0,0-0,05 |

Tabelle 2, 2. Teil; Anmerkungen siehe oben

| Medium                                | n             | Gesamtzellamplifikation  |             |            |            |            | auf die Gesamtzellzahl bezogener prozentualer CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil<br>(in Klammern prozent. CD34 <sup>+</sup> -Anteil im Vgl. zur CD34 <sup>+</sup> -Ausgangszahl) |           |           |           |          |
|---------------------------------------|---------------|--|-------------|------------|------------|------------|---|-----------|-----------|-----------|----------|
|                                       |               | <i>kursiv sind die Gesamtzellzahlen absolut (<math>\times 10^5</math>) mit range angegeben</i> |             |            |            |            | <i>kursiv sind die CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen absolut (<math>\times 10^5</math>) mit range angegeben</i>   |           |           |           |          |
|                                       |               | Auswerttag   |             |            |            |            | Auswerttag  |           |           |           |          |
|                                       |               | 0  | 2           | 4          | 6          | 12         | 0   | 2         | 4         | 6         | 12       |
| <b>Zytokinfrei</b><br>(Leerkontrolle) | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>0,5</b>  | <b>0,7</b> | <b>0,6</b> | <b>0,2</b> | <b>96</b>   | <b>69</b> | <b>50</b> | <b>32</b> | <b>0</b> |
|                                       |               |  |             |            |            |            | (100)   | (35)      | (35)      | (17)      | (0)      |
| Zellzahl abs.                         | $\times 10^5$ | 1,5  | 0,75        | 1,05       | 0,90       | 0,30       | 1,44  | 0,5       | 0,50      | 0,25      | 0,0      |
| range                                 | $\times 10^5$ | -  | 0,5-0,8     | 1,0-1,3    | 0,8-0,9    | 0,3-0,45   | 1,4-1,48  | 0,4-0,6   | 0,3-0,6   | 0,2-0,35  | 0,0-0,05 |
| <b>&lt;ST&gt;</b>                     | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>0,8</b>  | <b>1</b>   | <b>1,3</b> | <b>0,9</b> | <b>96</b>   | <b>75</b> | <b>55</b> | <b>44</b> | <b>3</b> |
|                                       |               |  |             |            |            |            | (100)   | (63)      | (56)      | (59)      | (3)      |
| Zellzahl abs.                         | $\times 10^5$ | 1,5  | 1,20        | 1,50       | 1,95       | 1,35       | 1,44  | 0,90      | 0,80      | 0,85      | 0,05     |
| range                                 | $\times 10^5$ | -  | 0,9-1,2     | 1,5-1,8    | 1,55-2,0   | 1,3-1,55   | 1,4-1,48  | 0,85-0,9  | 0,8-0,9   | 0,7-0,85  | 0,0-0,05 |
| <b>&lt;SF&gt;</b>                     | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>0,5</b>  | <b>1</b>   | <b>1,3</b> | <b>1</b>   | <b>96</b>   | <b>73</b> | <b>60</b> | <b>41</b> | <b>3</b> |
|                                       |               |  |             |            |            |            | (100)   | (38)      | (63)      | (56)      | (3)      |
| Zellzahl abs.                         | $\times 10^5$ | 1,5  | 0,75        | 1,50       | 1,95       | 1,50       | 1,44  | 0,55      | 0,90      | 0,80      | 0,05     |
| range                                 | $\times 10^5$ | -  | 0,6-0,9     | 1,45-1,8   | 1,8-2,0    | 1,5-1,8    | 1,4-1,48  | 0,5-0,8   | 0,7-1,0   | 0,65-0,8  | 0,0-0,05 |
| <b>&lt;TF&gt;</b>                     | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>0,33</b> | <b>0,4</b> | <b>0,8</b> | <b>0,4</b> | <b>96</b>   | <b>82</b> | <b>49</b> | <b>35</b> | <b>0</b> |
|                                       |               |  |             |            |            |            | (100)   | (28)      | (21)      | (28)      | (0)      |
| Zellzahl abs.                         | $\times 10^5$ | 1,5  | 0,50        | 0,60       | 1,20       | 0,60       | 1,44  | 0,40      | 0,30      | 0,40      | 0,0      |
| range                                 | $\times 10^5$ | -  | 0,4-0,6     | 0,5-0,8    | 1,1-1,5    | 0,6-0,8    | 1,4-1,48  | 0,4-0,65  | 0,2-0,4   | 0,3-0,6   | 0,0-0,05 |

Tabelle 3: Zellamplifikation und CD34<sup>+</sup>-Anteil in den untersuchten Zweifachzytokinansätzen im Verlauf; zum Vergleich ist die Leerkontrolle angegeben

|                                    |               | <b>Gesamtzellamplifikation</b>   |            |            |            |             | <b>auf die Gesamtzellzahl bezogener prozentualer CD34<sup>+</sup>-Zellanteil</b><br>(in Klammern prozent. CD34 <sup>+</sup> -Anteil im Vgl. zur CD34 <sup>+</sup> -Ausgangszahl) |           |           |           |           |
|------------------------------------|---------------|--|------------|------------|------------|-------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                    |               | <i>kursiv sind die Gesamtzellzahlen absolut (<math>\times 10^5</math>) mit range angegeben</i> |            |            |            |             | <i>kursiv sind die CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen absolut (<math>\times 10^5</math>) mit range angegeben</i>  |           |           |           |           |
|                                    |               | Auswerttag   |            |            |            |             | Auswerttag   |           |           |           |           |
| <b>Medium</b>                      | <b>n</b>      | 0  | 2          | 4          | 6          | 12          | 0  | 2         | 4         | 6         | 12        |
| <b>Zytokinfrei (Leerkontrolle)</b> | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>0,5</b> | <b>0,7</b> | <b>0,6</b> | <b>0,2</b>  | <b>96</b>  | <b>69</b> | <b>50</b> | <b>32</b> | <b>0</b>  |
|                                    |               | (100)  | (35)       | (35)       | (17)       | (0)         |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 0,75       | 1,05       | 0,90       | 0,30        | 1,44   | 0,5       | 0,50      | 0,25      | 0,0       |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 0,5-0,8    | 1,0-1,3    | 0,8-0,9    | 0,3-0,45    | 1,4-1,48   | 0,4-0,6   | 0,3-0,6   | 0,2-0,35  | 0,0-0,05  |
| <b>&lt;TSF&gt;</b>                 | <b>10</b>     | <b>1</b>   | <b>1,2</b> | <b>2,4</b> | <b>3,8</b> | <b>8</b>    | <b>96</b>  | <b>85</b> | <b>61</b> | <b>48</b> | <b>11</b> |
|                                    |               | (100)  | (106)      | (198)      | (191)      | (92)        |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 1,80       | 4,68       | 5,70       | 12,00       | 1,44   | 1,53      | 2,85      | 2,75      | 1,32      |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 1,4-2,4    | 4,0-5,8    | 5,2-6,5    | 9,5-16,0    | 1,3-1,49   | 1,35-2,1  | 2,2-3,4   | 2,4-3,6   | 1,1-2,0   |
| <b>&lt;TSF<sup>2x</sup>&gt;</b>    | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>1,3</b> | <b>2,7</b> | <b>4,6</b> | <b>9</b>    | <b>96</b>  | <b>74</b> | <b>49</b> | <b>33</b> | <b>3</b>  |
|                                    |               | (100)  | (101)      | (139)      | (156)      | (28)        |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 1,95       | 4,05       | 6,90       | 13,50       | 1,44   | 1,45      | 2,0       | 2,25      | 0,40      |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 1,8-2,2    | 3,9-4,45   | 5,2-7,4    | 9,5-15,0    | 1,3-1,49   | 1,2-1,85  | 1,9-2,2   | 2,0-2,6   | 0,3-0,6   |
| <b>&lt;STI&gt;</b>                 | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>0,9</b> | <b>2</b>   | <b>2,8</b> | <b>6</b>    | <b>96</b>  | <b>61</b> | <b>48</b> | <b>45</b> | <b>4</b>  |
|                                    |               | (100)  | (56)       | (101)      | (132)      | (24)        |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 1,35       | 3,00       | 4,20       | 9,00        | 1,44   | 0,80      | 1,45      | 1,90      | 0,35      |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 1,1-1,6    | 2,5-3,4    | 3,9-4,55   | 7,5-10,5    | 1,3-1,49   | 0,7-1,1   | 1,2-1,6   | 1,1-2,0   | 0,1-0,4   |
| <b>&lt;SFI&gt;</b>                 | <b>3</b>      | <b>1</b>   | <b>1</b>   | <b>2,2</b> | <b>3,5</b> | <b>7,5</b>  | <b>96</b>  | <b>90</b> | <b>50</b> | <b>44</b> | <b>2</b>  |
|                                    |               | (100)  | (94)       | (115)      | (160)      | (14)        |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 1,50       | 3,30       | 5,25       | 11,25       | 1,44   | 1,35      | 1,65      | 2,30      | 0,20      |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 1,1-1,5    | 3,0-4,0    | 5,0-5,3    | 9,1-14,5    | 1,3-1,49   | 1,1-1,4   | 1,2-1,9   | 2,0-2,55  | 0,1-0,4   |
| <b>&lt;TSFI&gt;</b>                | <b>10</b>     | <b>1</b>   | <b>1,5</b> | <b>4,3</b> | <b>8,5</b> | <b>18,5</b> | <b>96</b>  | <b>83</b> | <b>54</b> | <b>32</b> | <b>2</b>  |
|                                    |               | (100)  | (133)      | (242)      | (285)      | (38)        |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 2,25       | 6,45       | 12,75      | 27,75       | 1,44   | 1,91      | 3,48      | 4,1       | 0,55      |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 1,8-2,9    | 5,5-8,2    | 10,5-18    | 23-31,5     | 1,3-1,49   | 1,55-2,6  | 2,4-5,0   | 3,2-4,9   | 0,1-0,9   |
| <b>&lt;CC6&gt;</b>                 | <b>10</b>     | <b>1</b>   | <b>2</b>   | <b>7</b>   | <b>14</b>  | <b>30</b>   | <b>96</b>  | <b>81</b> | <b>45</b> | <b>20</b> | <b>3</b>  |
|                                    |               | (100)  | (169)      | (328)      | (292)      | (94)        |  |           |           |           |           |
| Zellzahl abs.                      | $\times 10^5$ | 1,5  | 3,00       | 10,50      | 21,00      | 45,00       | 1,44   | 2,43      | 4,73      | 4,20      | 1,35      |
| range                              | $\times 10^5$ | -  | 2,5-4,5    | 8,0-14,5   | 17,0-26    | 38-52       | 1,3-1,49   | 1,1-2,8   | 4,2-5,4   | 3,0-5,4   | 0,4-1,5   |

**Tabelle 4: Zellamplifikation und CD34<sup>+</sup>-Anteil in den untersuchten Mehrfachzytokinansätzen im Verlauf; zum Vergleich ist die Leerkontrolle angegeben.**

## 5.2.2. DIFFERENZIERUNG VON STAMMZELLEN UNTER DEM EINFLUSS VERSCHIEDENER ZYTOKINE

Vor Kultivierung der Stammzellen wurde ein Ausgangsprofil bezüglich der Oberflächenantigene erstellt. Im Folgenden sollte dann mit den bereits verwendeten Mehrfachzytokinansätzen eine gezielte Differenzierung der Zellen in monozytäre Zellen, charakterisiert durch den Oberflächenmarker CD14 und, unter Einsatz weiterer Zytokine bzw. Zytokinkombinationen, die Differenzierung in CD1a-positive, dendritische Zellen induziert werden.

### 5.2.2.1. OBERFLÄCHENTYPISIERUNG DER, FÜR DIE DIFFERENZIERUNG VERWENDETEN STAMMZELLEN (AUSGANGSPROFIL)

Die, aus den Apheresaten angereicherten hämatopoetischen Stammzellen wurden jeweils vor der Inkubation bezüglich ihrer Oberflächenantigene analysiert. Die Zellen waren median zu 96% (range: 95,1% - 99,4%) CD34-positiv, alle CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigten eine Koexpression von CD45. Mit dem Marker HLA-DR ließen sich 95,5% (range: 66% - 97%) anfärben. Von den CD34-positiven Zellen zeigten außerdem median 55% (range: 38% - 76%) eine Koexpression des unreifen myeloischen Markers CD33. Der Anteil an relativ unreifen Stammzellen, charakterisiert durch Negativität oder schwache Expression des Oberflächenantigens CD38 (CD38<sup>-</sup> bzw. CD38<sup>low</sup>) bei gleichzeitiger CD34-Positivität, lag bei 1,1 % (range: 0,1% - 2,1%). Die Zellen ließen sich mit CD14 und CD15, als in den Versuchen verwendete monozytäre bzw. granulozytäre Marker praktisch nicht anfärben (jeweils 0,4% der Ausgangszellen exprimierten diese Marker; *range CD14: 0,1%-0,9%; range CD15: 0,2-1,0%*). Die dendritischen Marker CD1a, CD80 und CD83 wurden überhaupt nicht exprimiert, ebenso ließ sich keine Expression des Markers CD86, der unter anderem bei aktivierten dendritischen Zellen zu finden ist, feststellen. Insgesamt wiesen die Zellen also das Markerprofil von myeloischen Progenitorzellen auf. (*Abb. 8 und Tab. 5*)



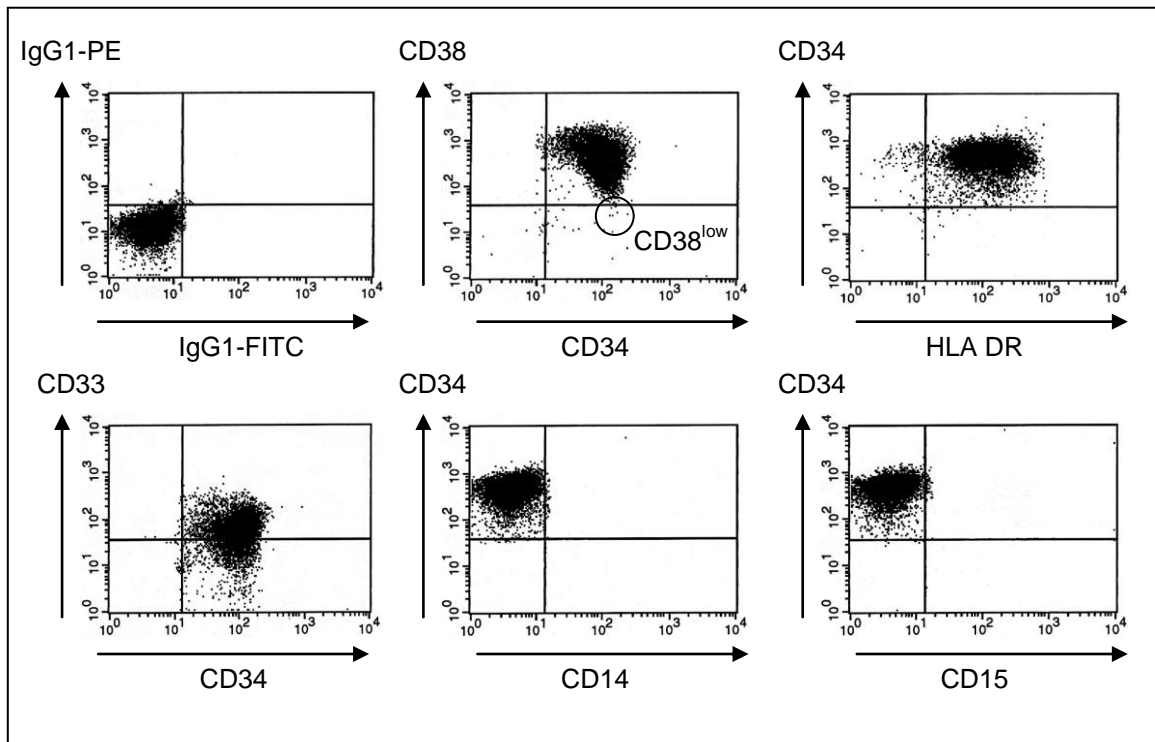


Abbildung 8: FACS-Analyse der aufgereinigten Stammzellen bezüglich verschiedener Oberflächenantigene (exemplarisch sind die Messungen eines aufgereinigten Zellseparats dargestellt)

| Oberflächen-Marker (CD) |                                  |                                      |                                  |                                  |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 34 <sup>+</sup>         | 34 <sup>+</sup> /45 <sup>+</sup> | 34 <sup>+</sup> /38 <sup>-/low</sup> | 34 <sup>+</sup> /DR <sup>+</sup> | 34 <sup>+</sup> /33 <sup>+</sup> | 34 <sup>+</sup> /33 <sup>-</sup> |
| 96%                     | 96%                              | 1,1%                                 | 94%                              | 53%                              | 43%                              |
| <i>95 - 99%</i>         | <i>95 - 99%</i>                  | <i>0,1 - 2,1%</i>                    | <i>66 - 97%</i>                  | <i>38 - 76%</i>                  | <i>33 - 48%</i>                  |

| Oberflächen-Marker (CD) |                   |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 14 <sup>+</sup>         | 15 <sup>+</sup>   | 1a <sup>+</sup>   | 80 <sup>+</sup>   | 83 <sup>+</sup>   | 86 <sup>+</sup>   |
| 0,4%                    | 0,4%              | 0%                | 0%                | 0%                | 0%                |
| <i>0,1 - 0,9%</i>       | <i>0,2 - 1,0%</i> | <i>0,0 - 0,1%</i> | <i>0,0 - 0,2%</i> | <i>0,0 - 0,0%</i> | <i>0,0 - 0,1%</i> |

Tabelle 5: Oberflächenantigen-Profil der angereicherten Stammzellen (Tag 0); für die Bestimmungen CD1a, CD80, CD83 und CD86 gilt n=6, für alle anderen n=13; dargestellt ist jeweils der Median, in der 2. Zeile ist kursiv der range angegeben.

#### 5.2.2.2. GEZIELTE MONOZYTÄRE DIFFERENZIERUNG

Die bereits in den obigen Versuchen eingesetzten Einzelzytokinansätze, Zweifach- und Mehrfachkombinationen wurden auf die Fähigkeit, eine monozytäre Differenzierung zu induzieren untersucht. Als monozytärer Marker wurde CD14 eingesetzt. Bei den Einzelzytokinansätzen zeigte sich an Auswerttag sechs der prozentual höchste Anteil an monozytären, CD14-positiven Zellen in den Ansätzen, die FL-3 in der mittleren und hohen Konzentration enthielten (in beiden Fällen 21% bzw.  $2,5 \times 10^4$  CD14<sup>+</sup>-Zellen; range FL-3:  $1,9 \times 10^4$ - $2,9 \times 10^4$ , range FL-3<sup>2x</sup>:  $2 \times 10^4$ - $3,1 \times 10^4$ ). Bei allen anderen Einzelzytokinansätzen und in der Leerkontrolle ließen sich CD14-Populationen von maximal 15% bzw.  $2 \times 10^4$  Zellen nachweisen. Die monozytäre Population erreichte in allen Ansätzen an Tag sechs ihr Maximum, bei längerer Inkubation sank die CD14<sup>+</sup>-Zellzahl in allen Ansätzen wieder ab.

Ähnlich waren die Ergebnisse bei den Zweifachzytokinansätzen, beide FL-3 enthaltenden Ansätze induzierten die höchste monozytäre Differenzierung (an Tag sechs enthielten die in <TF> inkubierten Zellen 15%, die in <SF> inkubierten 16% CD14<sup>+</sup>-Zellen, entsprechend  $1,8 \times 10^4$  Zellen (range:  $1,5 \times 10^4$  –  $2 \times 10^4$ ) bzw.  $3,1 \times 10^4$  Zellen (range:  $1,9 \times 10^4$  –  $3,7 \times 10^4$ ). An Auswerttag 12 waren, analog zu den Einzelzytokinansätzen, in allen Fällen wieder sinkende CD14<sup>+</sup>-Zellzahlen nachweisbar.

Von den Mehrfachzytokinkombinationen wurden <TSF>, <TSFI> sowie <CC6> evaluiert. Hier exprimierten die in <TSF> inkubierten Zellen an Tag sechs zu 21,5% CD14 ( $1,2 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup>-Zellen absolut), in <TSFI> färbten sich 20% ( $2,6 \times 10^5$  Zellen), in <CC6> 5,5% ( $1,2 \times 10^5$  Zellen) der Zellen an Auswerttag 6 CD14-positiv. Der prozentual höchste CD14<sup>+</sup>-Zellanteil fand sich an allen Auswerttagen in <TSF>, die höchsten CD14<sup>+</sup>-Zellzahlen waren ab Auswerttag sechs im Ansatz <TSFI> nachzuweisen. (Tab. 6 und Abb. 10). In allen Ansätzen stieg der Anteil an CD14-positiven Zellen bei längerer Inkubation (Auswerttag 12) an (Tab. 6). Die FACSanalysen im zeitlichen Verlauf zeigten, dass die CD34-positiven Zellen zunächst ihre Positivität für CD34 verloren bevor zu-

nehmend CD14 exprimiert wurde, und die Zellen damit als monozytäre Zellen zu identifizieren waren. (Abb. 9)

|                              | <TSF>                          | <TSFI>                         | <CC6>                          |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Tag 0                        | 0,4%                           | 0,4%                           | 0,4%                           |
| <i>CD14<sup>+</sup> abs.</i> | <i>0,6 x10<sup>3</sup></i>     | <i>0,6 x10<sup>3</sup></i>     | <i>0,6 x10<sup>3</sup></i>     |
| <i>range</i>                 | <i>0,2-0,8 x10<sup>3</sup></i> | <i>0,2-0,8 x10<sup>3</sup></i> | <i>0,2-0,8 x10<sup>3</sup></i> |
| Tag 2                        | 7,5%                           | 5%                             | 2,6%                           |
| <i>CD14<sup>+</sup> abs.</i> | <i>1,3 x10<sup>4</sup></i>     | <i>1,1 x10<sup>4</sup></i>     | <i>0,8 x10<sup>4</sup></i>     |
| <i>range</i>                 | <i>0,8-1,9 x10<sup>4</sup></i> | <i>0,7-1,6 x10<sup>4</sup></i> | <i>0,4-1,2 x10<sup>4</sup></i> |
| Tag 6                        | 21,5%                          | 20%                            | 5,5%                           |
| <i>CD14<sup>+</sup> abs.</i> | <i>1,2 x10<sup>5</sup></i>     | <i>2,6 x10<sup>5</sup></i>     | <i>1,2 x10<sup>5</sup></i>     |
| <i>range</i>                 | <i>0,8-2,0 x10<sup>5</sup></i> | <i>1,6-3,3 x10<sup>5</sup></i> | <i>0,4-1,8 x10<sup>5</sup></i> |
| Tag 12                       | 29%                            | 26,5%                          | 12,7%                          |
| <i>CD14<sup>+</sup> abs.</i> | <i>3,5 x10<sup>5</sup></i>     | <i>7,4 x10<sup>5</sup></i>     | <i>5,7 x10<sup>5</sup></i>     |
| <i>range</i>                 | <i>3,0-5,1 x10<sup>5</sup></i> | <i>5,2-9,0 x10<sup>5</sup></i> | <i>2,8-6,5 x10<sup>5</sup></i> |

Tabelle 6: Prozentualer CD14<sup>+</sup>-Anteil und CD14<sup>+</sup>-Zellzahlen absolut (kursiv mit range) im Verlauf bei Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen; für Tag 0-6 gilt n=10, für Tag 12 gilt n=3; dargestellt ist der Median.

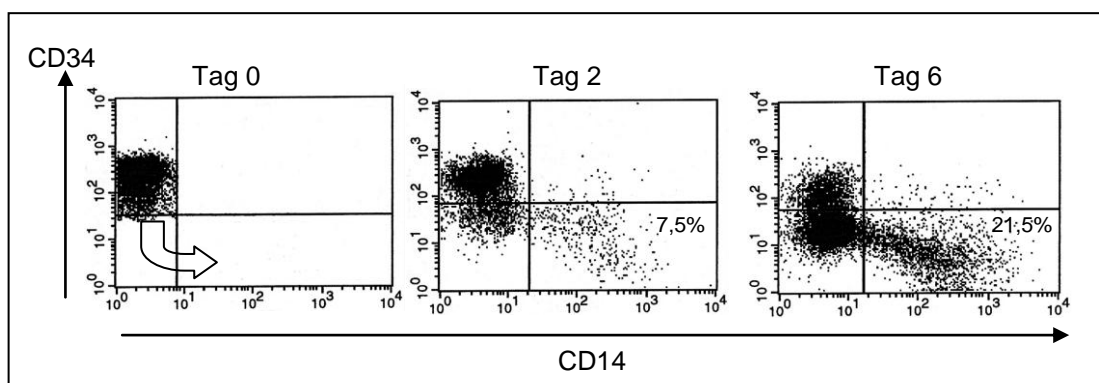


Abbildung 9: FACSanalysen (CD14/CD34) von, mit <TSF> inkubierten Zellen an Tag 0, 2 & 6 im Verlauf; exemplarisch sind die Grafiken eines Versuchs dargestellt; der Pfeil in Bild „Tag 0“ stellt die Differenzierung im Verlauf dar.

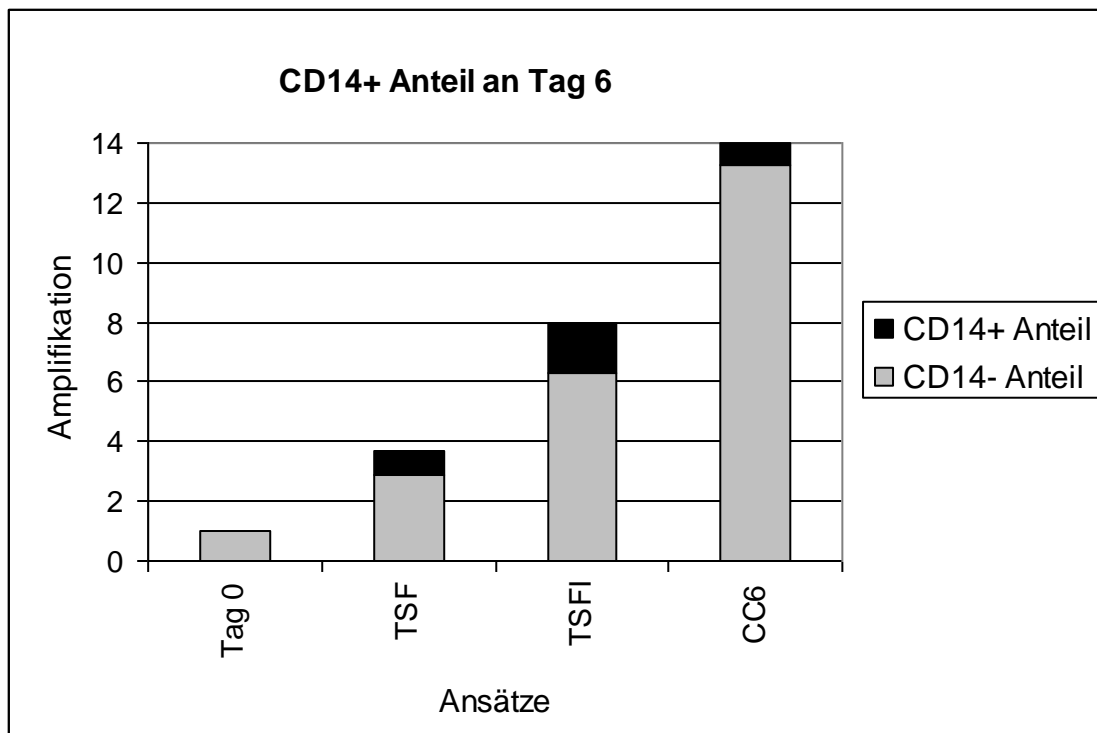


Abbildung 10: Gesamtzell- und CD14<sup>+</sup>-Anteil an Tag 6 nach Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen; für alle Ansätze gilt n=10; dargestellt ist der Median.

### 5.2.2.3. GEZIELTE DIFFERENZIERUNG IN DENDRITISCHE ZELLEN

Ähnlich zu obiger Versuchsanordnung sollte eine gezielte Differenzierung in dendritische Zellen erfolgen. Hierzu wurden neben den bereits verwendeten Mehrfachzytokinkombinationen drei neue Ansätze verwendet. Die ersten beiden Ansätze (<DC-A> und <DC-B>) enthielten neben den bereits verwendeten Wachstumsfaktoren SCF (100ng/ml), EPO (5l.U./ml), GM-CSF (20ng/ml), IL-3 (20ng/ml) und IL-6 (50ng/ml) zusätzlich Interleukin-4 (IL-4, 100ng/ml) im Fall von <DC-A> bzw. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 2,5ng/ml) im Fall von <DC-B>. Der dritte Ansatz (<DC-C>) setzte sich aus der Kombination IL-4 (100ng/ml), TNF- $\alpha$  (2,5ng/ml) und GM-CSF (20ng/ml) zusammen, die Zellen wurden aber zur Vorstimulation zunächst 24 Stunden in <CC6> (s.o.) kultiviert bevor an Tag zwei das Medium gewechselt und durch <DC-C> ersetzt wurde. Da die Differenzierung in dendritische Zellen längere Zeit benötigen kann (60, 65) wurden die Kulturen über einen längeren Zeitraum inkubiert. Zusätzlich zu

Auswerttag sechs und 12 erfolgte noch an Tag 17 eine durchflusszytometrische Analyse. Die Differenzierung in die dendritische Linie wurde mittels Messung des Oberflächenantigens CD1a evaluiert. Zusätzlich wurde die Expressierung der Oberflächenantigene CD80, CD83 und CD86 überprüft und Färbungen mit den bereits im vorigen Versuch eingesetzten Antikörpern durchgeführt.

An Auswerttag 17 wies die Zytokinkombination <DC-C> mit 35,5% (entsprechend  $1,35 \times 10^6$  Zellen) den größten Anteil an CD1a-positiven Zellen auf. Mit den, zur Generierung monozytärer Zellen eingesetzten Kombinationen <TSF>, <TSFI> und <CC6> ließen sich im Verlauf maximal  $1,08 \times 10^5$  CD1a<sup>+</sup>-Zellen (in <TSFI> an Tag 17) nachweisen. Die prozentual höchsten Anteile waren in <TSF> mit 2,5% an Tag sechs bzw. 2,4% an Tag 17 zu finden. In den Kombinationen <DC-A> und <DC-B> färbten sich an Tag 17 3,8% ( $2,5 \times 10^5$  Zellen in <DC-A>) bzw. 4,2% ( $2,8 \times 10^5$  Zellen in <DC-B>) der Gesamtzellen CD1a-positiv. (Tab. 7)

Im zeitlichen Verlauf stieg die dendritische, CD1a<sup>+</sup>-Population in <DC-C> bis Tag 12 zunächst langsam an. An Auswerttag 17 ist ein deutlicher Anstieg festzustellen. Gleichzeitig sinkt die CD14<sup>+</sup>-Population von 24,2% (range: 20,4-26,8%) an Tag 12 auf 11% (range: 8,5-13,8%) an Tag 17 ab. Dieser Effekt war bei den anderen Zytokinkombinationen nicht zu beobachten (zum Vergleich ist in Abb. 11 neben <DC-C> auch <TSF> dargestellt). (Abb. 11)

|        |                   | <TSF>                 | <TSFI>                  | <CC6>                  | <DC-A>                | <DC-B>                | <DC-C>                |
|--------|-------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Tag 0  | CD1a+ (%)         | 0%                    |                         |                        |                       |                       |                       |
|        | CD14+ (%)         | 0,4%                  |                         |                        |                       |                       |                       |
| Tag 6  | CD1a+ (%)         | 0,1%                  | 0,2%                    | 0%                     | 0,6%                  | 5,5%                  | 4,8%                  |
|        | <i>CD1a+ abs.</i> | $0,6 \times 10^3$     | $3 \times 10^3$         | 0                      | $1,1 \times 10^4$     | $9,9 \times 10^4$     | $4,5 \times 10^4$     |
|        | <i>range</i>      | $0,3-0,8 \times 10^3$ | $1,5-4,0 \times 10^3$   | -                      | $0,9-1,4 \times 10^4$ | $6,4-12 \times 10^4$  | $3,0-4,9 \times 10^4$ |
|        | CD14+ (%)         | 21,5%                 | 20%                     | 5,5%                   | 1,6%                  | 11,5%                 | 6,1%                  |
|        | <i>CD14+ abs.</i> | $1,2 \times 10^5$     | $2,6 \times 10^5$       | $1,2 \times 10^5$      | $2,9 \times 10^4$     | $2,1 \times 10^5$     | $5,6 \times 10^4$     |
|        | <i>range</i>      | $0,8-2,0 \times 10^5$ | $1,6-3,3 \times 10^5$   | $0,4-1,8 \times 10^5$  | $1,9-3,4 \times 10^4$ | $1,8-3,0 \times 10^5$ | $2,9-6,2 \times 10^4$ |
| Tag 12 | CD1a+ (%)         | 2,5%                  | 1,8%                    | 1,1%                   | 2,2%                  | 2,3%                  | 8,6%                  |
|        | <i>CD1a+ abs.</i> | $3 \times 10^4$       | $5,0 \times 10^4$       | $5,0 \times 10^4$      | $8,9 \times 10^4$     | $8,9 \times 10^4$     | $1,7 \times 10^5$     |
|        | <i>range</i>      | $2,2-4,8 \times 10^4$ | $2,7-6,2 \times 10^4$   | $3,7-6,7 \times 10^4$  | $7,2-12 \times 10^4$  | $7,8-18 \times 10^4$  | $1,5-2,4 \times 10^5$ |
|        | CD14+ (%)         | 29%                   | 26,5%                   | 12,7%                  | 4,1%                  | 16,4%                 | 24,2%                 |
|        | <i>CD14+ abs.</i> | $3,5 \times 10^5$     | $7,4 \times 10^5$       | $5,7 \times 10^5$      | $1,7 \times 10^5$     | $6,3 \times 10^5$     | $4,8 \times 10^5$     |
|        | <i>range</i>      | $3,0-5,1 \times 10^5$ | $5,2-9,0 \times 10^5$   | $2,8-6,5 \times 10^5$  | $1,5-2,4 \times 10^5$ | $4,5-7,0 \times 10^5$ | $4,0-5,5 \times 10^5$ |
| Tag 17 | CD1a+ (%)         | 2,4%                  | 2,0%                    | 1%                     | 3,8%                  | 4,2%                  | 35,5%                 |
|        | <i>CD1a+ abs.</i> | $5,3 \times 10^4$     | $1,08 \times 10^5$      | $7,2 \times 10^4$      | $2,5 \times 10^5$     | $2,8 \times 10^5$     | $1,35 \times 10^6$    |
|        | <i>range</i>      | $4,3-6,7 \times 10^4$ | $0,8-1,3 \times 10^5$   | $5,0-8,6 \times 10^4$  | $1,9-3,0 \times 10^5$ | $2,1-3,2 \times 10^5$ | $1,2-1,7 \times 10^6$ |
|        | CD14+ (%)         | 33%                   | 29,5%                   | 15,5%                  | 8,5%                  | 20,6%                 | 11%                   |
|        | <i>CD14+ abs.</i> | $7,3 \times 10^5$     | $15,3 \times 10^5$      | $11,5 \times 10^5$     | $5,6 \times 10^5$     | $13,6 \times 10^5$    | $4,2 \times 10^5$     |
|        | <i>range</i>      | $6,6-8,4 \times 10^5$ | $12,5-16,7 \times 10^5$ | $9,0-13,8 \times 10^5$ | $4,8-6,6 \times 10^5$ | $10-15,5 \times 10^5$ | $3,8-6,5 \times 10^5$ |

*Tabelle 7: Prozentualer CD1a<sup>+</sup>- und CD14<sup>+</sup>-Anteil und CD1a<sup>+</sup>- und CD14<sup>+</sup>-Zellzahlen (kursiv mit range) im Verlauf bei Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokin-kombinationen; für alle Auswerttage gilt bezüglich der CD1a Messungen: n=3, bezüglich der CD14 Messungen gilt für Auswerttag 0 & 6: n=10, für Auswerttag 12 & 17: n=3; dargestellt ist der Median*

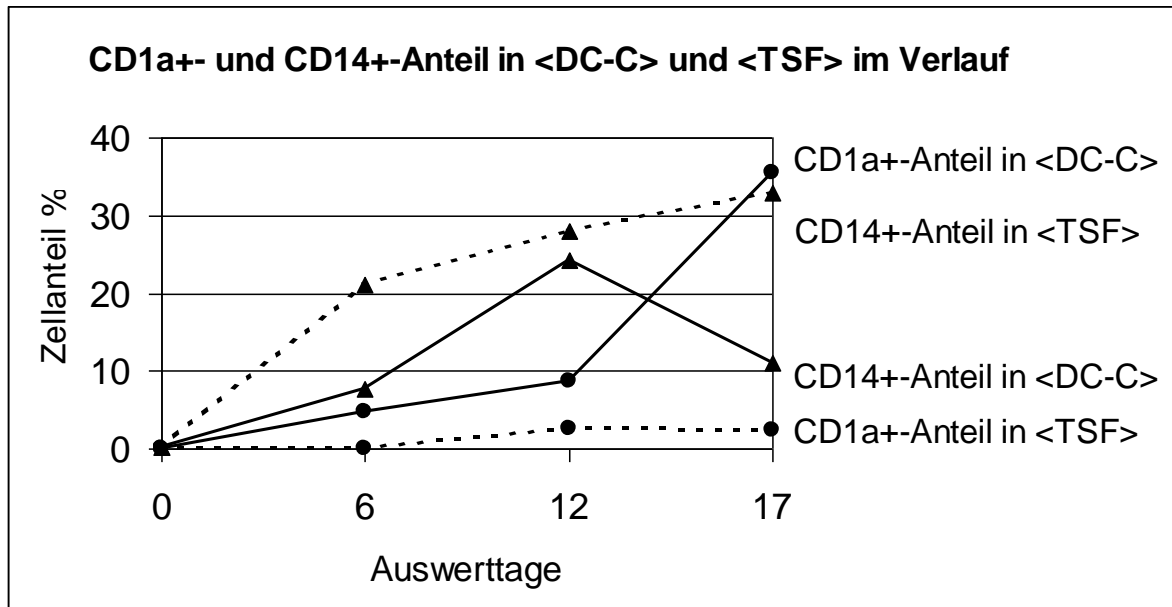


Abbildung 11: Prozentualer CD1a<sup>+</sup>- und CD14<sup>+</sup>-Anteil in <DC-C> und <TSF> im zeitlichen Verlauf; n=3, dargestellt ist der Median

Die inkubierten Zellen wurden nicht nur auf den Marker CD1a sondern auch auf weitere Oberflächenantigene durchflusszytometrisch analysiert. An Auswerttag 17 fand sich in <DC-C> neben den dendritischen Zellen ein Anteil von 11% ( $4,2 \times 10^5$  Zellen) an monozytären, CD14-positiven Zellen (gegenüber 33%,  $7,3 \times 10^5$  Zellen, der in <TSF> kultivierten Zellen). Der größte Anteil (90%) der CD1a<sup>+</sup>-Zellen waren in <DC-C> CD14-negativ (entsprechend 32% der Gesamtzellen). 3,5% der Gesamtzellen zeigten eine doppelte Positivität für CD1a und CD14. 19% der Zellen in <DC-C> exprimierten CD1a und HLA-DR. 5,3% der Zellen waren doppelt-positiv für CD1a und CD80. Mit CD80, das wie CD86 zu den Kostimulationsmolekülen gehört und u.a. bei reiferen, bereits aktivierten DC nachweisbar ist, ließen sich in <DC-C> insgesamt 14,6% der Zellen anfärben. 9,1% der Zellen exprimierten CD86. Die Population der CD83-positiven dendritischen Zellen lag bei 3,4%. Die in <TSF> kultivierten Zellen waren an Auswerttag zu 10,3% CD80-positiv. CD86-positiv färbten sich 8,2% der Gesamtzellen. (Tab. 8 und Abb. 12)

| CD        | 1a <sup>+</sup> | 1a <sup>+</sup> /14 <sup>+</sup> | 1a <sup>+</sup> /14 <sup>-</sup> | 1a <sup>+</sup> /80 <sup>+</sup> | 1a <sup>-</sup> /80 <sup>+</sup> | 1a <sup>+</sup> /DR <sup>+</sup> | 83 <sup>+</sup> | 86 <sup>+</sup> |
|-----------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| <DC-C>    | 35,5%           | 3,5%                             | 32%                              | 5,3%                             | 9,3%                             | 19%                              | 3,4%            | 9,1%            |
| range (%) | 32-38           | 3,0-4,5                          | 29-33,5                          | 4,4-8,0                          | 6,9-10,4                         | 15,5-23,0                        | 2,1-4,4         | 7,8-11,6        |
| <TSF>     | 2,4%            | 0,7%                             | 1,4%                             | 1,5%                             | 8,7%                             | 2,6%                             | 0,2%            | 8,2%            |
| range (%) | 1,9-3,1         | 0,7-1,1                          | 1,2-2,0                          | 1,2-2,1                          | 6,5-9,6                          | 1,9-2,8                          | 0-0,2           | 6,8-10          |

*Tabelle 8: Oberflächentypisierung der mit <DC-C> und <TSF> inkubierten Zellen an Auswerttag 17; n=3, alle Angaben in Prozent mit range; dargestellt ist der Median.*



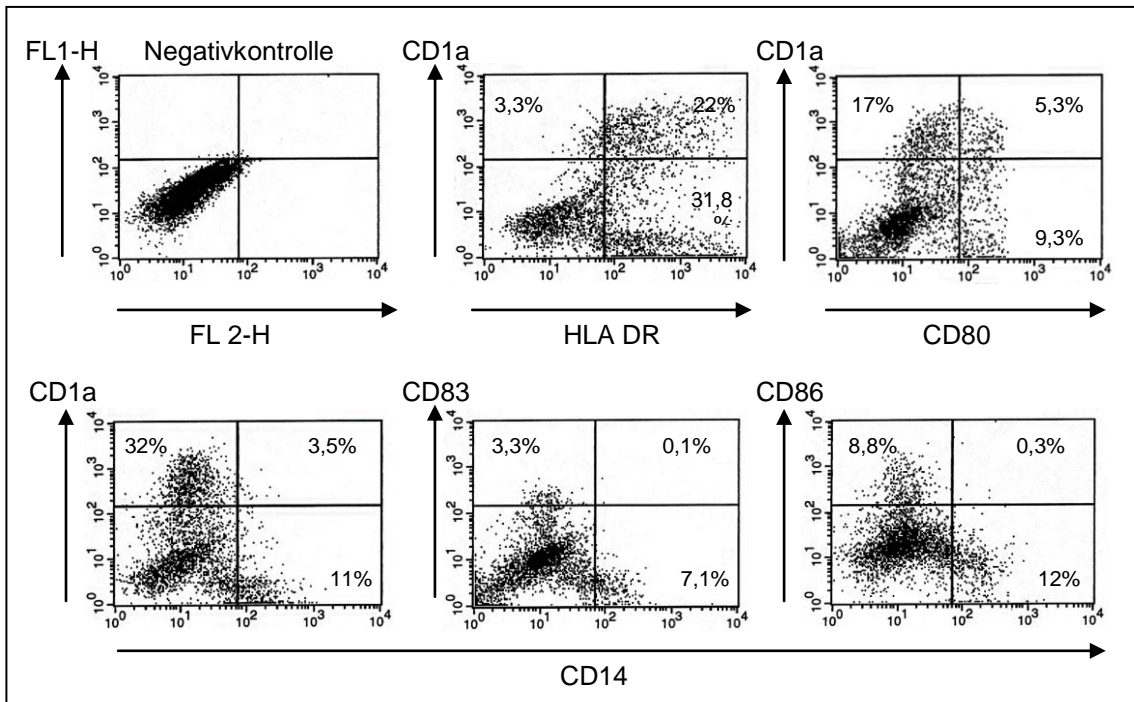


Abbildung 12: FACSanalysen von, mit <DC-C> inkubierten Zellen an Tag 17, exemplarisch sind die Grafiken eines Versuchs dargestellt.

Stellt man die CD1a-positiven Zellen selektiv im Forward- / Sidewardscatter-Bild dar, lassen sich die Zellen als groß und deutlich granuliert identifizieren. (Abb.13)

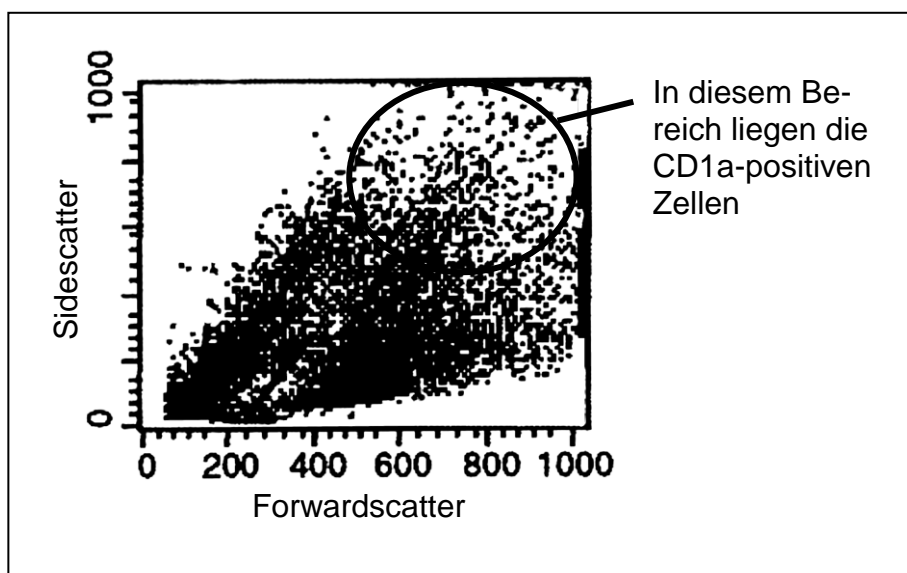


Abbildung 13: FSC/SSC Bild der mit <DC-C> inkubierten Zellen an Tag 17; das ovale Gate markiert den Bereich, in dem die CD1a<sup>+</sup>-Zellen liegen; exemplarisch ist eine Messung dargestellt.

#### 5.2.2.4. ZUSAMMENFASSUNG UND ÜBERBLICK ÜBER DIE DURCHGEFÜHRTEN DIFFERENZIERUNGSVERSUCHE

- Das Oberflächenprofil der für die Differenzierungsversuche verwendeten CD34<sup>+</sup>-Stammzellen klassifiziert die Zellen als myeloische Progenitoren.
- Eine gezielte Differenzierung der Zellen in die monozytäre Richtung erfolgte mit den Zytokinkombinationen <TSF>, <TSFI> und <CC6>, wobei die prozentual höchsten CD14<sup>+</sup>-Anteile an Tag sechs in <TSF> (21,5%) und <TSFI> (20%) zu finden waren. Die höchsten CD14<sup>+</sup>-Zellzahlen waren an Auswerttag sechs im Ansatz <TSFI> ( $2,6 \times 10^5$  Zellen gegenüber  $1,2 \times 10^5$  in <TSF>) nachzuweisen.
- Für eine gezielte Differenzierung in dendritische Zellen wurden zusätzliche Ansätze (<DC-A>, <DC-B>, <DC-C>) verwendet. Der größte Anteil an CD1a-positiven Zellen ließ sich an Auswerttag 17 mit 35,5% ( $1,35 \times 10^6$  Zellen) in <DC-C> nachweisen.

### **5.3. UNTERSCHIEDE BEZÜGLICH DES VERHALTENS VON BENIGNEN STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU CML-STAMMZELLEN IN BEZUG AUF AMPLIFIKATION UND DIFFERENZIERUNG**

Im Folgenden wurden angereicherte CD34<sup>+</sup>-Stammzellen von Philadelphia-chromosom-positiven CML-Patienten im Vergleich zu Stammzellen anderer Patienten betrachtet. Es sollte ein Vergleich bezüglich der Amplifikation unter Verwendung der in 5.2.1. eingesetzten Zytokinkombinationen erfolgen. Weiter sollten Unterschiede im Differenzierungsverhalten erfasst werden und, analog zu 5.2.2., eine gezielte Differenzierung der CML-Stammzellen in eine monozytäre und eine dendritische Richtung erfolgen.

#### **5.3.1. STIMULATION VON CD34<sup>+</sup>-CML-SZ MIT DEM ZIEL EINER HOHEN AMPLIFIKATION UND GERINGER DIFFERENZIERUNGSINDUKTION; UNTERSCHIEDE ZUM VERHALTEN BENIGNER STAMMZELLEN**

Die CML-Stammzellen wurden analog zu den obigen Versuchen unter Zusatz einzelner Zytokine und Zweifachzytokinkombinationen inkubiert und bezüglich der Gesamtzellzahl und dem CD34<sup>+</sup>-Anteil analysiert. An Auswerttag sechs wiesen alle CML-Kulturen außer denjenigen mit FL-3 und FL-3<sup>0,5x</sup> eine Amplifikation  $\geq 1$  und somit mehr vitale Zellen als zu Beginn auf. Dies war im Vergleich bei den benignen CD34<sup>+</sup>-Zellen nur in den Kulturen mit SCF bzw. SCF<sup>2x</sup> zu beobachten. Die höchsten Zellzahlen in den CML-Ansätzen fanden sich an Tag sechs jeweils in den Einzel- und Zweifachzytokinansätzen, die TPO enthielten:  $2,55 \times 10^5$  Zellen (1,7-fache Amplifikation) in TPO,  $3 \times 10^5$  Zellen in <ST> (2-fache Amplifikation) und  $2,1 \times 10^5$  Zellen in <TF> (1,4-fache Amplifikation) (Tab. 9). Die CML-Ansätze mit SCF, TPO sowie alle Zweifachkombinationen führten bei längerer Inkubation (Auswerttag 12) zu einem weiteren Anstieg der Gesamtzellzahl (an Auswerttag 12 fanden sich jeweils höhere Amplifikationsfaktoren). Dies war bei den Ansätzen mit benignen Stammzellen nicht der Fall. (Tab.9)

In den Mehrfachzytokinansätzen wiesen die CML-Zellkulturen eine höhere Amplifikation als die Vergleichskulturen mit benignen Zellen auf. Im Vergleich zu einer 3,8-fachen Amplifikation, die an Tag sechs bei in <TSF> kultivierten benignen Stammzellen vorlag, fand sich eine 11-fache Amplifikation bei CML-Zellen. Analoge Ergebnisse erbrachte der Vergleich der Ansätze <TSFI> (15-fache Amplifikation in der CML-Kultur gegenüber 8,5-facher Amplifikation in der Vergleichskultur) und <CC6> (Amplifikationsfaktor 22 gegenüber 14). (Tab. 9 und Abb. 14)

Beim Vergleich des CD34<sup>+</sup>-Zellanteils ergab sich an Auswerttag sechs ein jeweils größerer prozentualer Anteil an CD34-positiven Zellen in allen CML-Mehrfachzytokinansätzen als in den benignen Vergleichsansätzen. Während die in <TSF> inkubierten CML-Zellen an Tag sechs 66% CD34<sup>+</sup>-Zellen ( $10,9 \times 10^5$  Zellen absolut) aufwiesen, fand sich im benignen Ansatz ein Anteil von 48% ( $2,5 \times 10^5$  Zellen absolut). In <TSFI> ließen sich an Tag sechs 38% CD34<sup>+</sup>-Zellen ( $8,6 \times 10^5$  Zellen absolut) im CML-Ansatz gegenüber 32% ( $4,1 \times 10^5$  Zellen absolut) im Vergleichsansatz nachweisen. In <CC6> wies der CML-Ansatz 23% ( $8,58 \times 10^5$  Zellen absolut) CD34-Zellen auf, der Ansatz mit benignen Zellen 20% ( $4,2 \times 10^5$  Zellen absolut).

Bei Auswertung der Einzelzytokinansätze zeigte sich der größte Unterschied bezüglich des CD34<sup>+</sup>-Zellanteils in SCF. An Auswerttag sechs waren 61% ( $1,1 \times 10^5$  Zellen absolut) der CML-Zellen waren gegenüber 32% ( $0,5 \times 10^5$  Zellen absolut) der benignen Zellen CD34-positiv. In <TF> fand sich ein 65%iger CD34<sup>+</sup>-Zell-Anteil ( $1,35 \times 10^5$  Zellen absolut) im CML-Ansatz gegenüber 35% ( $0,42 \times 10^5$  Zellen absolut) in der Kultur mit benignen Zellen. Der CML-Ansatz mit <SF> wies einen CD34<sup>+</sup>-Zellanteil von 36% ( $0,7 \times 10^5$  Zellen absolut) gegenüber 41% ( $0,8 \times 10^5$  Zellen absolut) im Vergleichsansatz auf. Damit enthielt der CML-Ansatz <SF> an Auswerttag sechs als einziger der untersuchten Ansätze eine niedrigere CD34<sup>+</sup>-Zellzahl (absolut) als der benigne Vergleichsansatz. (Tab. 9 und Abb. 14)

| Gesamtzellamplifikation |   |                                | Auf die Gesamtzellzahl bezogener prozentualer CD34 <sup>+</sup> -Zellanteil<br>(in Klammern prozent. CD34 <sup>+</sup> -Anteil im Vgl. zur CD34 <sup>+</sup> -Ausgangszahl) |                                |
|-------------------------|---|--------------------------------|---|--------------------------------|
|                         | <i>Kursiv sind die Gesamtzellzahlen absolut mit range angegeben</i> |                                | <i>Kursiv sind die CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen absolut mit range angegeben</i>  |                                |
| Medium                  | CML-SZ  | Benigne-SZ                     | CML-SZ  | Benigne-SZ                     |
| <b>Zytokinfrei</b>      | <b>0,9</b>  | <b>0,6</b>                     | <b>66</b>   | <b>32</b>                      |
|                         |   |                                | (62)  | (17)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>1,4x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,9x10<sup>5</sup></i>      | <i>0,92x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,25x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>1,2-1,7x10<sup>5</sup></i>                                       | <i>0,8-0,9x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,8-1,2x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,2-0,35x10<sup>5</sup></i> |
| <b>SCF</b>              | <b>1,2</b>  | <b>1,1</b>                     | <b>61</b>   | <b>32</b>                      |
|                         |   |                                | (74)  | (38)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>1,8x10<sup>5</sup></i>   | <i>1,65x10<sup>5</sup></i>     | <i>1,10x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,55x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>1,55-1,8x10<sup>5</sup></i>                                      | <i>1,5-1,8x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,9-1,3x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,5-0,7x10<sup>5</sup></i>  |
| <b>TPO</b>              | <b>1,7</b>  | <b>0,8</b>                     | <b>60</b>   | <b>64</b>                      |
|                         |   |                                | (104)   | (52)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>2,55x10<sup>5</sup></i>  | <i>1,2x10<sup>5</sup></i>      | <i>1,55x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,75x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>2,4-2,8x10<sup>5</sup></i>                                       | <i>1,2-1,4x10<sup>5</sup></i>  | <i>1,1-1,6x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,75-0,8x10<sup>5</sup></i> |
| <b>FL-3</b>             | <b>0,8</b>  | <b>0,8</b>                     | <b>47</b>   | <b>40</b>                      |
|                         |   |                                | (37)  | (35)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>1,2x10<sup>5</sup></i>   | <i>1,2x10<sup>5</sup></i>      | <i>0,55x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,48x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>0,9-1,2x10<sup>5</sup></i>                                       | <i>0,9-1,3x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,3-0,6x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,35-0,5x10<sup>5</sup></i> |
| <b>&lt;ST&gt;</b>       | <b>2</b>  | <b>1,3</b>                     | <b>30</b>   | <b>44</b>                      |
|                         |   |                                | (60)  | (59)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>3,0x10<sup>5</sup></i>   | <i>1,95x10<sup>5</sup></i>     | <i>0,9x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,86x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>2,85-3,40x10<sup>5</sup></i>                                     | <i>1,55-2,0x10<sup>5</sup></i> | <i>0,75-1,2x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,7-0,85x10<sup>5</sup></i> |
| <b>&lt;SF&gt;</b>       | <b>1,3</b>  | <b>1,3</b>                     | <b>36</b>   | <b>41</b>                      |
|                         |   |                                | (47)  | (56)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>1,95x10<sup>5</sup></i>  | <i>1,95x10<sup>5</sup></i>     | <i>0,70x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,80x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>1,55-2,4x10<sup>5</sup></i>                                      | <i>1,8-2,0x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,5-1,2x10<sup>5</sup></i>   | <i>0,65-0,8x10<sup>5</sup></i> |
| <b>&lt;TF&gt;</b>       | <b>1,4</b>  | <b>0,8</b>                     | <b>65</b>   | <b>35</b>                      |
|                         |   |                                | (91)  | (28)                           |
| Zellzahl abs.           | <i>2,1x10<sup>5</sup></i>   | <i>1,2x10<sup>5</sup></i>      | <i>1,35x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,42x10<sup>5</sup></i>     |
| range                   | <i>1,9-2,4x10<sup>5</sup></i>                                       | <i>1,1-1,5x10<sup>5</sup></i>  | <i>1,1-1,85x10<sup>5</sup></i>  | <i>0,3-0,6x10<sup>5</sup></i>  |

Tabelle 9, 1. Teil: Zellamplifikation und CD34<sup>+</sup>-Anteil an Auswerttag 6, CML-Stammzellen und benigne Stammzellen nach Inkubation mit verschiedenen Zytokinen / Zytokinkombinationen im Vergleich; für alle Einfach- und Zweifachzytokinansätze gilt n=3, für die CML-Mehrfachansätze gilt: n=5, für die benignen Mehrfachansätze gilt: n=10; dargestellt ist der Median.

|                     |                           |                           |                           |                         |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>&lt;TSF&gt;</b>  | <b>11</b>                 | <b>3,8</b>                | <b>66</b>                 | <b>48</b>               |
|                     |                           |                           | (738)                     | (191)                   |
| Zellzahl abs.       | $16,5 \times 10^5$        | $5,7 \times 10^5$         | $11,0 \times 10^5$        | $2,75 \times 10^5$      |
| range               | 14,0-19,0x10 <sup>5</sup> | 5,2-6,5x10 <sup>5</sup>   | 9,5-14,0x10 <sup>5</sup>  | 2,4-3,6x10 <sup>5</sup> |
| <b>&lt;TSFI&gt;</b> | <b>15</b>                 | <b>8,5</b>                | <b>38</b>                 | <b>32</b>               |
|                     |                           |                           | (573)                     | (285)                   |
| Zellzahl abs.       | $22,5 \times 10^5$        | $12,75 \times 10^5$       | $8,55 \times 10^5$        | $4,1 \times 10^5$       |
| range               | 19,5-28,0x10 <sup>5</sup> | 10,5-18,0x10 <sup>5</sup> | 7,35-10,5x10 <sup>5</sup> | 3,2-4,9x10 <sup>5</sup> |
| <b>&lt;CC6&gt;</b>  | <b>22</b>                 | <b>14</b>                 | <b>26</b>                 | <b>20</b>               |
|                     |                           |                           | (574)                     | (292)                   |
| Zellzahl abs.       | $33 \times 10^5$          | $21 \times 10^5$          | $8,55 \times 10^5$        | $4,2 \times 10^5$       |
| range               | 28-37x10 <sup>5</sup>     | 17,0-26,0x10 <sup>5</sup> | 7,35-11,4x10 <sup>5</sup> | 3,0-5,4x10 <sup>5</sup> |

Tabelle 9, 2. Teil; Anmerkungen siehe oben.

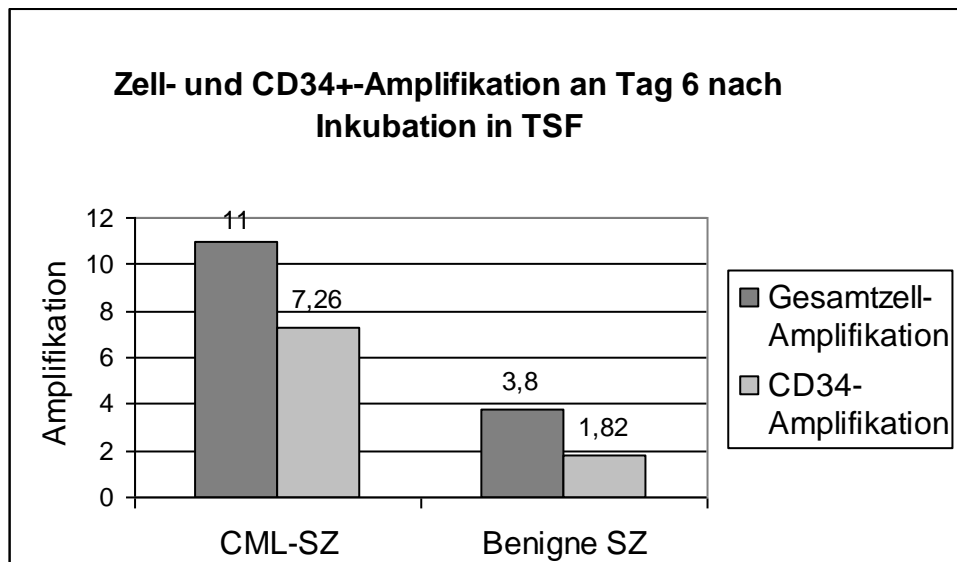


Abbildung 14: Gesamtzell- und CD34<sup>+</sup>-Amplifikation an Tag 6 nach Inkubation mit <TSF>, Vergleich zwischen CML- und benignen Stammzellen; für die CML-Ansätze gilt: n=5, für die benignen Ansätze gilt: n=10; dargestellt ist der Median.

### 5.3.2. GEZIELTE MONOZYTÄRE DIFFERENZIERUNG VON CML-STAMMZELLEN; UNTERSCHIEDE ZUM VERHALTEN BENIGNER STAMMZELLEN

Analog zu 5.2.2.2. sollten die verwendeten Zytokine bzw. Zytokinkombinationen auf ihre Fähigkeit, eine gezielte monozytäre Differenzierung bei CML-Stammzellen zu induzieren, überprüft werden. Vor Inkubation wurde auch von

den CML-Zellen aus Ausgangsprofil erstellt. Hier ließ sich ein größerer Anteil an CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup> Zellen feststellen. Gegenüber 1,1% bei den benignen Zellen wiesen die CML Zellen hier median einen Anteil von 5,8% (range 3,5-11%) auf. Eine Koexpression mit CD33 wiesen median 66% (range: 35% - 98%) der CD34<sup>+</sup>-CML gegenüber 55% der benignen Zellen auf.

Bei der Inkubation der Stammzellen mit einzelnen Zytokinen wiesen alle CML-Ansätze geringere Anzahlen an CD14-positiven Zellen als die Vergleichsansätze mit benignen Stammzellen auf. Die höchsten Anteile fanden sich an in den Ansätzen mit FL-3 und FL-3<sup>2x</sup>. An Auswerttag sechs wies der Ansatz mit FL-3 2,5% CD14-positiv Zellen ( $3 \times 10^3$  Zellen absolut), im Ansatz mit FL-3<sup>2x</sup> fanden sich 3,8% CD14<sup>+</sup>-Zellen ( $5,7 \times 10^3$  Zellen absolut). Demgegenüber enthielten die beiden benignen Vergleichsansätze jeweils 21% CD14<sup>+</sup>-Zellen (in beiden Fällen  $2,5 \times 10^4$  Zellen absolut). In den CML-Ansätzen, die TPO und SCF enthielten sowie im zytokinfreien Medium fanden sich an Auswerttag sechs CD14<sup>+</sup>-Anteile von 0-1,2% ( $0 \times 10^3$ - $2,2 \times 10^3$  Zellen absolut). Auch bei den Zweifachzytokinansätzen ließen sich die höchsten Anteile an CD14<sup>+</sup>-Zellen in den Kombinationen, die FL-3 enthielten, messen. 2,3% ( $4,8 \times 10^3$  Zellen absolut) der mit <TF> inkubierten, 2,8% ( $5,4 \times 10^3$  Zellen absolut) der mit <SF> inkubierten und 0,8% ( $2,4 \times 10^3$  Zellen absolut) der mit <ST> inkubierten CML-Zellen färbten sich an Tag sechs CD14-positiv. Im Vergleich wiesen die benignen SZ-Ansätze mit <TF> und <SF> 15% bzw. 16% CD14-positiv Zellen auf ( $1,8 \times 10^4$  bzw.  $3,1 \times 10^4$  Zellen absolut).

Bei Auswertung der Mehrfachzytokinansätze wiesen alle untersuchten CML-Ansätze an Auswerttag sechs maximal 4% CD14<sup>+</sup>-Zellen auf. Bei den in <TSF> und <DC-C> inkubierten Zellen ließen sich an Tag sechs jeweils 4% ( $6,6 \times 10^4$  Zellen bzw.  $7,8 \times 10^4$  Zellen absolut) nachweisen. <TSFI> und <CC6> enthielten 3,4% ( $7,6 \times 10^4$  Zellen absolut) bzw. 2% ( $9,9 \times 10^4$  Zellen absolut) CD14<sup>+</sup>-Zellen. Nach längerer Kultivierung der Zellen (Auswerttag 12) sank der prozentuale CD14<sup>+</sup>-Anteil in allen CML-Ansätzen wieder ab. Im Vergleich wiesen die Ansätze mit benignen Stammzellen höhere CD14<sup>+</sup>-Zahlen auf. An Auswerttag sechs färbten sich 21,5% ( $1,2 \times 10^5$  Zellen absolut) der Zellen, die mit <TSF> inkubiert waren, CD14-positiv. Der Ansatz <DC-C> wies einen 7,6%igen Anteil

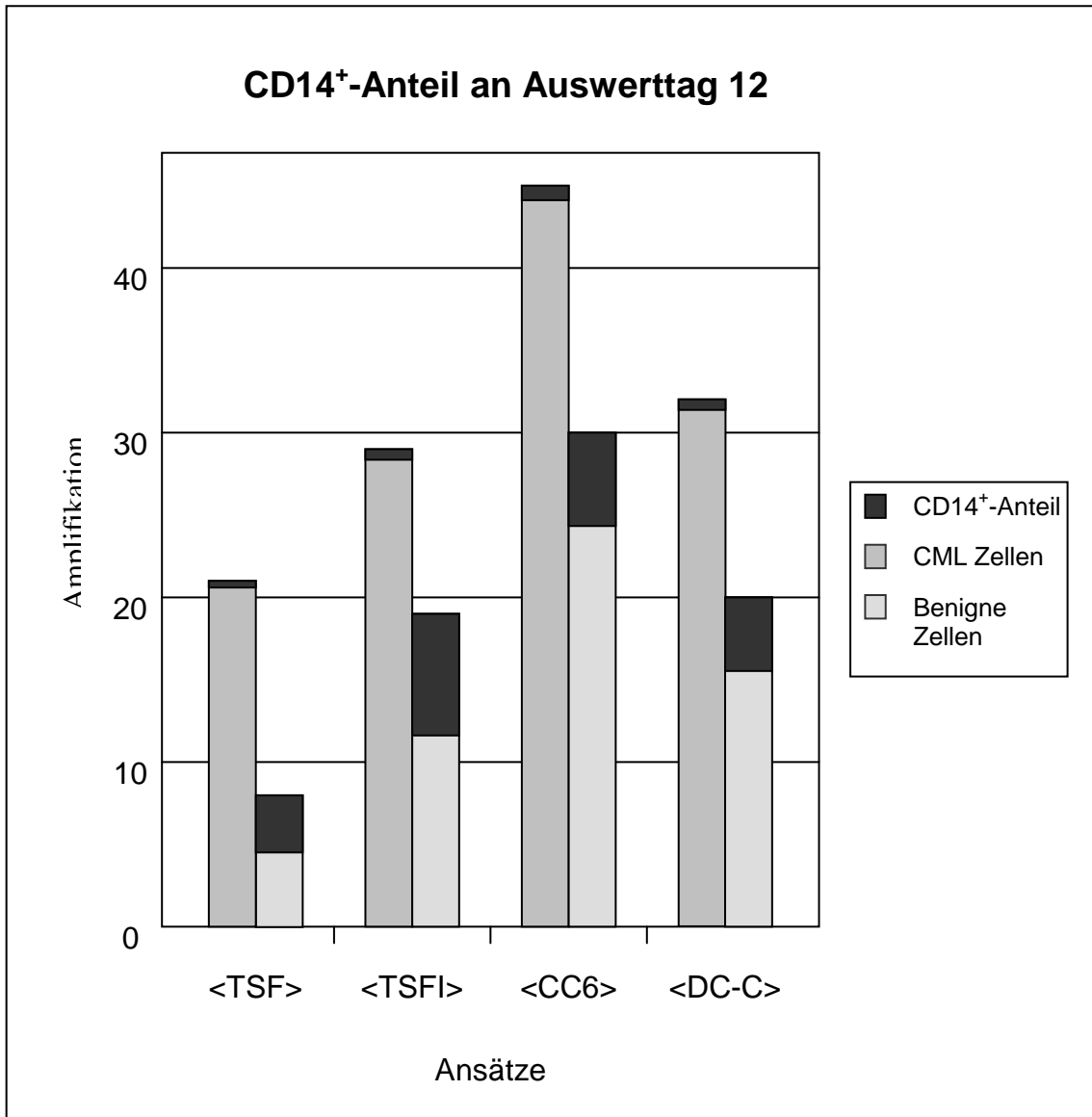


Abbildung 15: CD14<sup>+</sup>-Anteil nach 12-tägiger Inkubation mit verschiedenen Mehrfachzytokinkombinationen; CML- und benigne Stammzellansätze im Vergleich; dargestellt ist der Median.

( $1,1 \times 10^5$  Zellen absolut) auf. Die Ansätze <TSFI> und <CC6> enthielten 20% ( $2,6 \times 10^5$  Zellen absolut) bzw. 5,5% ( $1,2 \times 10^5$  Zellen absolut) CD14<sup>+</sup>-Zellen. (Tab. 10 und Abb. 15)



|                       |                  | <TSF>   |          | <TSFI>  |          | <CC6>   |          | <DC-C>  |          |
|-----------------------|------------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
|                       |                  | CML     | Be-nigne | CML     | Be-nigne | CML     | Be-nigne | CML     | Be-nigne |
| Tag 0                 | %                | 0,2     | 0,4      | 0,2     | 0,4      | 0,2     | 0,4      | 0,1     | 0,1      |
| CD14 <sup>+</sup> abs | x10 <sup>3</sup> | 0,3     | 0,6      | 0,3     | 0,6      | 0,3     | 0,6      | 0,3     | 0,4      |
| range                 | x10 <sup>3</sup> | 0,2-0,4 | 0,2-0,8  | 0,2-0,4 | 0,2-0,8  | 0,2-0,4 | 0,2-0,8  | 0,2-0,4 | 0,3-0,5  |
| Tag 2                 | %                | 0,2     | 7,5      | 0,3     | 5        | 0,4     | 2,6      | 2,8     | 3        |
| CD14 <sup>+</sup> abs | x10 <sup>4</sup> | 0,06    | 1,3      | 0,1     | 1,1      | 0,2     | 0,8      | 0,09    | 1,0      |
| range                 | x10 <sup>4</sup> | 0-0,1   | 0,8-1,9  | 0-0,3   | 0,7-1,6  | 0,1-0,3 | 0,4-1,2  | 0,01-1  | 0,5-1,2  |
| Tag 6                 | %                | 4       | 21,5     | 3,4     | 20       | 2       | 5,5      | 4       | 7,6      |
| CD14 <sup>+</sup> abs | x10 <sup>5</sup> | 0,66    | 1,2      | 0,76    | 2,6      | 0,99    | 1,2      | 0,70    | 0,72     |
| range                 | x10 <sup>5</sup> | 0,3-0,8 | 0,9-2,0  | 0,5-0,9 | 1,6-3,3  | 0,7-1,1 | 0,4-1,8  | 0,5-1,0 | 0,7-1,3  |
| Tag 12                | %                | 1,3     | 29       | 1,5     | 26,5     | 1,3     | 12,7     | 2,1     | 23       |
| CD14 <sup>+</sup> abs | x10 <sup>5</sup> | 0,4     | 3,5      | 0,65    | 7,4      | 0,88    | 5,7      | 0,67    | 4,5      |
| range                 | x10 <sup>5</sup> | 0,1-0,5 | 3,0-5,1  | 0,3-0,7 | 5,2-9,0  | 0,4-1,0 | 2,8-6,5  | 0,5-0,8 | 3,9-6,8  |

*Tabelle 10: Prozentualer CD14<sup>+</sup>-Anteil im Verlauf bei Inkubation mit Mehrfachzytokinkombinationen, CML- und benigne SZ-Ansätze im Vergleich; für die CML-Ansätze gelten die Fallzahlen: Tag 0-6: n=4, Tag 12: n=2, für die benignen Ansätze gelten die Fallzahlen: Tag 0-6: n=6, Tag 12: n= 4; dargestellt ist der Median.*

### 5.3.2.1. VERSUCH DER MONOZYTÄREN DIFFERENZIERUNG VON CML-STAMMZELLEN MIT HILFE VON VITAMIN D

In der Literatur ist eine monozytäre Differenzierungsinduktion durch Vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) beschrieben (69-74). Bei, im Vergleich zu benignen Stammzellen, schlechterer monozytärer Differenzierungsfähigkeit der CML-Stammzellen unter den in den Vorversuchen vorliegenden Bedingungen wurde versucht, durch D<sub>3</sub> bzw. eine Kombination von D<sub>3</sub> mit Mehrfachzytokinansätzen die Differenzierung in eine größere CD14-positive Population zu induzieren.

Hierfür wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Vitamin D<sub>3</sub> wurde jeweils mit der Zytokinkombination <TSF> und <DC-C> kombiniert. In einem Vergleichsansatz wurden die Zellen in Medium, das außer D<sub>3</sub> keine Zytokine enthielt inkubiert. In allen Versuchsansätzen wurden die Zellen zunächst allein mit den Wachstumsfaktoren bzw. in zytokinfreiem Medium kultiviert. Später wurde an Inkubationstag drei, sechs oder Tag neun D<sub>3</sub>, in der Konzentration von 10<sup>-7</sup> M zugesetzt. Die Auswertung der Ansätze erfolgte an Tag sechs, neun und zwölf.

Bei der Versuchsauswertung färbten sich in dem Ansatz, bei dem lediglich D<sub>3</sub> ab Inkubationstag drei als Stimulanz verwendet wurde 1,1% (2x10<sup>3</sup> Zellen absolut) der Zellen CD14-positiv. In der vitamin- und zytokinfreien Leerkontrolle ließen sich 0,5% CD14<sup>+</sup>-Zellen nachweisen. D<sub>3</sub> als singulärer Faktor stellte einen niedrigen Proliferationsreiz für die Zellen dar. An Tag sechs ließ sich im Ansatz mit D<sub>3</sub> ab Inkubationstag drei ein Amplifikationsfaktor von 1,1 nachweisen.

Im Ansatz mit <TSF> und D<sub>3</sub> ab Tag drei ließen sich an Auswerttag 12 13,9% (4,6x10<sup>5</sup> Zellen absolut) CD14<sup>+</sup>-Zellen nachweisen. Das Hinzufügen von Vitamin D<sub>3</sub> zu einem späteren Zeitpunkt (Inkubationstag sechs und neun) führte zu einem niedrigeren Anteil von monozytären Zellen (10,2% (3,1x10<sup>5</sup> Zellen absolut) bzw. 6,2% (1,9x10<sup>5</sup> Zellen absolut)). Im Ansatz mit <TSF> ohne D<sub>3</sub> ließen sich 2,1% (0,6x10<sup>5</sup> Zellen absolut) nachweisen. In allen <TSF> Ansätzen war die CD14<sup>+</sup>-Population an Auswerttag 12 am größten. In den <DC-C> Kulturen fand sich die größte CD14<sup>+</sup>-Zellzahl an Auswerttag neun im Ansatz <DC-C> mit Vitamin D<sub>3</sub> ab Tag drei. Hier ließen sich 21,9% (8,2x10<sup>5</sup> Zellen absolut) monozytäre Zellen nachweisen. Ein späteres Hinzufügen des Vitamins führte auch hier zu geringeren CD14<sup>+</sup>-Zahlen. 14,6% (5,2x10<sup>5</sup> Zellen absolut) färbten sich im Ansatz <DC-C> mit Vitamin D<sub>3</sub> ab Tag sechs an Auswerttag neun positiv für CD14. Längeres Inkubieren (Auswerttag 12) führte zu keinem weiteren Anstieg der CD14<sup>+</sup>-Population. (Tab. 11 und Abb. 16)

|                       |                  | <TSF>               |                             |                             |                             | <DC-C>              |                             |                             |                             |
|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                       |                  | ohne D <sub>3</sub> | + D <sub>3</sub><br>(ab d3) | + D <sub>3</sub><br>(ab d6) | + D <sub>3</sub><br>(ab d9) | ohne D <sub>3</sub> | + D <sub>3</sub><br>(ab d3) | + D <sub>3</sub><br>(ab d6) | + D <sub>3</sub><br>(ab d9) |
| Tag 0                 | %                | 0,1                 | 0,1                         | 0,1                         | 0,1                         | 0,1                 | 0,1                         | 0,1                         | 0,1                         |
| CD14 <sup>+</sup> abs | x10 <sup>3</sup> | 0,15                | 0,15                        | 0,15                        | 0,15                        | 0,15                | 0,15                        | 0,15                        | 0,15                        |
| Tag 6                 | %                | 0,4                 | 3,8                         | -                           | -                           | 2,8                 | 12,5                        | -                           | -                           |
| CD14 <sup>+</sup> abs | 10 <sup>5</sup>  | 0,06                | 0,7                         | -                           | -                           | 0,7                 | 3,2                         | -                           | -                           |
| Tag 9                 | %                | 0,5                 | 5,2                         | 2                           | -                           | 4,4                 | 21,9                        | 14,6                        | -                           |
| CD14 <sup>+</sup> abs | 10 <sup>5</sup>  | 0,1                 | 1,3                         | 0,5                         | -                           | 1,4                 | 8,2                         | 5,2                         | -                           |
| Tag 12                | %                | 2,1                 | 13,9                        | 10,2                        | 6,2                         | 2,1                 | 15,6                        | 11,6                        | 8,5                         |
| CD14 <sup>+</sup> abs | 10 <sup>5</sup>  | 0,6                 | 4,6                         | 3,1                         | 1,9                         | 0,9                 | 7,7                         | 5,4                         | 3,8                         |

*Tabelle 11: Prozentualer CD14<sup>+</sup>-Anteil und CD14<sup>+</sup>-Zellzahlen im Verlauf bei Inkubation von CML-SZ mit <TSF> und <DC-C> ohne und mit dem Zusatz von D<sub>3</sub> an Tag 3, 6 und 9; für alle Ansätze gilt n=1.*

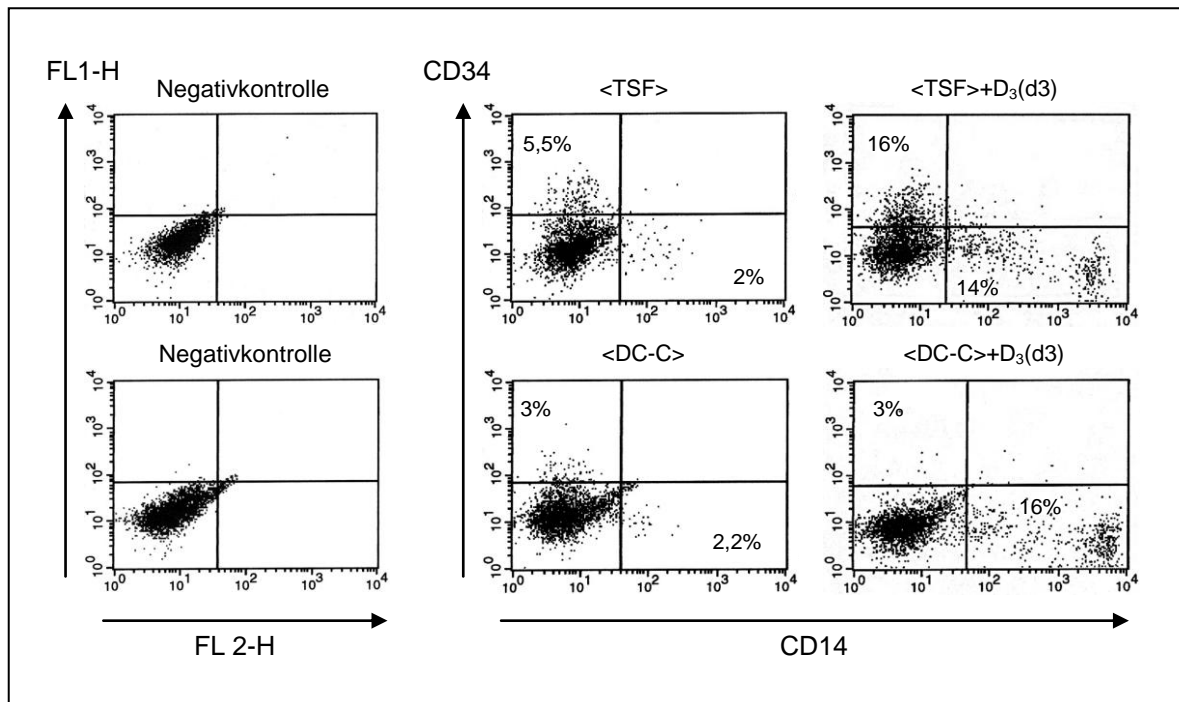


Abbildung 16: Generierung von monozytären Zellen aus CML Stammzellen mit Hilfe von Vitamin D3, im Vergleich sind Ansätze mit <TSF> (obere Reihe) und <DC-C> (untere Reihe) ohne und mit Vitamin D3 ab Tag 3 (jeweils rechts) dargestellt; Exemplarisch sind die Grafiken eines Versuchs (Tag 12) dargestellt.

### 5.3.3. GEZIELTE DIFFERENZIERUNG VON CML-STAMMZELLEN IN DENDRITISCHE ZELLEN

Analog zur gezielten Differenzierung von benignen Stammzellen sollte auch bei CML-Stammzellen eine Differenzierung in CD1a-positive, dendritische Zellen erfolgen. Hierzu wurden die Mehrfachzytokinansätze <TSF> und <DC-C> miteinander verglichen.

Die Analyse der Kulturen erfolgte wie bei 5.2.2.3. an den Auswerttagen sechs, 12 und 17. An Auswerttag 17 wiesen die in <TSF> kultivierten CML-Zellen einen Anteil von 0,3% ( $1,5 \times 10^4$  Zellen absolut) CD1a-positiver Zellen auf. Im Vergleichsansatz mit benignen Zellen ließen sich 2,5% nachweisen. Bei den mit <DC-C> inkubierten Zellen färbten sich an Auswerttag 17 35% ( $2,9 \times 10^6$  Zellen absolut) positiv für CD1a. Die Population lag bei den Kulturen mit benignen SZ analog bei 35,5%. Im zeitlichen Verlauf exprimierten die CML-Zellen CD1a später als die benignen Zellen. An Auswerttag 12 ließen sich 0,3% der CML Zellen gegenüber 8,6% der benignen Zellen anfärben. (Tab. 12)

|                        | Benigne SZ              |                         | CML SZ                   |                         |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                        | <TSF>                   | <DC-C>                  | <TSF>                    | <DC-C>                  |
| Tag 0                  | 0%                      | 0%                      | 0%                       | 0%                      |
| Tag 6                  | 0,1%                    | 4,8%                    | 0,2%                     | 0,8%                    |
| CD1a <sup>+</sup> abs. | 0,6x10 <sup>3</sup>     | 3x10 <sup>3</sup>       | 3,3x10 <sup>3</sup>      | 2x10 <sup>4</sup>       |
| range                  | 0,3-0,8x10 <sup>3</sup> | 1,5-4,0x10 <sup>3</sup> | 0-6,6x10 <sup>3</sup>    | 1-3x10 <sup>4</sup>     |
| Tag 12                 | 2,5%                    | 8,6%                    | 0,1%                     | 0,3%                    |
| CD1a <sup>+</sup> abs. | 3x10 <sup>4</sup>       | 5,0x10 <sup>4</sup>     | 3,1x10 <sup>3</sup>      | 1,4x10 <sup>4</sup>     |
| range                  | 2,2-4,8x10 <sup>4</sup> | 2,7-6,2x10 <sup>4</sup> | 0-6,2x10 <sup>3</sup>    | 1,0-1,8x10 <sup>4</sup> |
| Tag 17                 | 2,4%                    | 35,5%                   | 0,3%                     | 35%                     |
| CD1a <sup>+</sup> abs. | 5,3x10 <sup>4</sup>     | 1,35x10 <sup>6</sup>    | 1,5x10 <sup>4</sup>      | 2,9x10 <sup>6</sup>     |
| range                  | 4,3-6,7x10 <sup>4</sup> | 1,2-1,7x10 <sup>6</sup> | 1,3-1,7 x10 <sup>4</sup> | 2,6-3,2x10 <sup>6</sup> |

Tabelle 12: Prozentualer CD1a<sup>+</sup>-Anteil und CD1a<sup>+</sup>-Zellzahlen im Verlauf nach Inkubation mit den Mehrfachzytokinkombinationen <TSF> und <DC-C>; für alle Ansätze gilt: n=3; dargestellt ist der Median.

Bezüglich der weiteren Oberflächentypisierung wiesen die CML-Zellen an Auswerttag 17 ein gegenüber den benignen Zellen unterschiedliches Profil auf. Eine doppelte Positivität für CD1a und CD14 zeigten 5% der Gesamtzellen, 86% der CD1a<sup>+</sup>-Zellen waren CD14-negativ. Unterschiede zeigten sich bei reiferen DC, charakterisiert durch CD80 und CD86. 10,5% der CML-Zellen exprimierten CD1a und CD80. Dieser Anteil lag bei den benignen Zellen bei 5,3% des Gesamtzellanteils. CD1a-negativ und CD80-positiv waren 7,5% der CML-Zellen. Die Population der CD86-positiven dendritischen Zellen betrug bei den CML-Zellen 17,4%. Hier wiesen die benignen Zellen ein Fraktion von 9,1% auf. Der Anteil der CD1a-positiven CML-Zellen, die zugleich HLA-DR-positiv waren,

lag bei 30% gegenüber 19% der benignen Zellen. 8% der CML-Gesamtzellen exprimierten CD83. (Tab. 13)

| CD      | 1a <sup>+</sup> | 1a <sup>+</sup> /14 <sup>+</sup> | 1a <sup>+</sup> /14 <sup>-</sup> | 1a <sup>+</sup> /80 <sup>+</sup> | 1a <sup>-</sup> /80 <sup>+</sup> | 1a <sup>+</sup> /DR <sup>+</sup> | 83 <sup>+</sup> | 86 <sup>+</sup> |
|---------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| CML     | 35%             | 5%                               | 30%                              | 10,5%                            | 7,5%                             | 30%                              | 8%              | 17,5%           |
| range   | 29-38%          | 3-8%                             | 24-32%                           | 8-14%                            | 5,5-11%                          | 25,5-36%                         | 2-8%            | 15-22%          |
| Benigne | 35,5%           | 3,5%                             | 32%                              | 5,5%                             | 9,5                              | 19%                              | 3,5%            | 9%              |
| range   | 30-41%          | 2,5-5%                           | 22-35%                           | 3,5-7%                           | 7-12%                            | 13-22%                           | 1,5-9%          | 4-12%           |

*Tabelle 13: Vergleich der in <DC-C> kultivierten Zellen an Auswerttag 17 (CML- und benigne Stammzellen) bezüglich Oberflächentypisierung; alle Angaben in % mit range; für alle benignen Ansätze gilt n=3, für alle CML-Ansätze gilt n=3; dargestellt ist der Median.*

#### 5.3.4. ZUSAMMENFASSUNG UND ÜBERBLICK ÜBER DIE CML-STAMMZELLVERSUCHE

- die CML-SZ zeigten bei Inkubation mit Zwei- und Mehrfachzytokin-kombinationen eine höhere Amplifikation als die Vergleichsansätze mit benignen Zellen. Bei den verwendeten Einzelzytokinansätzen traf dies nicht durchweg zu.
- In den Mehrfachzytokinansätzen fand sich im zeitlichen Verlauf eine größere, verbleibende CD34<sup>+</sup>-Zell-Populationen als in den benignen Vergleichsansätzen.
- Bei der zielgerichteten dendritischen Zelldifferenzierung verhielten sich die CML-Stammzellen ähnlich wie die benignen Zellen, wobei die Differenzierung in den Kulturen zu einem späteren Zeitpunkt auftrat und sich das Markerprofil der CML-DC von dem der benignen DC unterscheidet.

- Ein Unterschied gegenüber den benignen Ansätzen zeigte sich bei den CML-Stammzellen bezüglich der geringen Differenzierungsfähigkeit in monozytäre, CD14-positive Zellen. Hier ließ sich durch die Kombination von <TSF> beziehungsweise <DC-C> mit Vitamin D3 der Differenzierungsblock überwinden, wobei die Hinzugabe von Vitamin D3 ab Inkubationstag drei die Bildung der größten CD14<sup>+</sup>-Population induzierte.

## 6. DISKUSSION

Die am häufigsten angewendete Methode, hämatopoetische Zellen *in vitro* zu kultivieren, stellt die Inkubation von angereicherten CD34<sup>+</sup> Zellen mit einer Kombination hochdosierter Zytokine dar. *Haylock et al.* beschrieben als erste Arbeitsgruppe die Proliferation von hochaufgereinigten HuHSZ mit Hilfe einer Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF und SCF. Die verwendeten Zellen stammten aus Knochenmark und aus Nabelschnurblut, wobei die Ergebnisse bzgl. der Proliferation ähnlich waren. Unter den definierten Bedingungen expandierten verschiedene Vorläuferzellgruppen sehr stark, der CFU-GM-pool stieg beispielsweise bei 14-tägiger Inkubation um das 20- bis 60-fache. Ebenso konnten auf diese Weise weitere reife Progenitoren generiert werden. Die erzielten Ergebnisse wurden durch verschiedene andere Arbeitsgruppen reproduziert, wobei teilweise andere Zytokinkombinationen verwendet wurden (*Srouf 1993; Coutinho 1990; Brugger 1993*). Bei Verwendung von nicht hochaufgereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen war die Proliferation dagegen deutlich geringer. Man geht daher davon aus, daß reifere, bereits CD34-negative hämatopoetische Zellen die Proliferation der frühen SZ hemmen. Eine weitere Beobachtung bei den erwähnten Arbeitgruppen war eine Abnahme der Zahl an CD34-Zellen im Verlauf der Inkubation. Die Kulturen lieferten also keine echte SZ-Expansion. Die Gründe hierfür sind möglicherweise die *in vitro* nicht vorhandenen Stromazellen, die wahrscheinlich einen essentiellen Beitrag zur Expansion der frühen HSZ liefern. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Zytokinkombination bzw. ein Zytokin zu finden, das in der Lage ist, eine Expansion der Zellzahl und gleichzeitig keine oder eine möglichst geringe Differenzierungsinduktion zu bewirken. Zur Stimulation der Zellen wurden die Zytokine FL-3, TPO und SCF als singuläre Faktoren und kombiniert eingesetzt. Analog zu der von Haylock verwendeten Zytokinkombination wurde als Vergleichsmedium eine modifizierte Kombination <CC6> (unter Verwendung von EPO anstatt IL-1) eingesetzt. Der Anteil an frühen HSZ, charakterisiert durch CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup>, die von verschiedenen Autoren auch als Long-term



culture-initiating cells (LTC-IC) (28) bezeichnet werden, war bei den aus peripherem Blut nach G-CSF Mobilisation aufgereinigten benignen Zellen relativ gering (1-10).

Fms-like tyrosin kinase 3 ist ein Klasse III Kinase Rezeptor, der u.a. auf murinen und humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird (30). FL-3, der Ligand des Rezeptors, nimmt eine zentrale Rolle in der Proliferation, der Verlängerung des Zellüberlebens (31) und in der Zelldifferenzierung früher hämatopoetischer Vorläuferzellen ein (21). Weiterhin stellt FL-3 eine wichtige Substanz bei der Differenzierung in Monozyten und Makrophagen (20) und auch bei der Differenzierung in DC dar (s.u., 21). Die Differenzierung in die erythroide Richtung wird dagegen eher blockiert. FL-3 alleine stellt nur einen sehr schwachen Wachstumsfaktor bezüglich der Amplifikation (33) dar. Dies konnte in den eigenen Experimenten bestätigt werden. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen (sowohl die benignen als auch die CML-Zellen) zeigten keine Amplifikation bei der Inkubation mit FL-3 als alleinigem Stimulanz. *In vitro* wirkt FL-3 synergistisch mit vielen anderen Wachstumsfaktoren, u.a. SCF, GM-CSF, IL-3 und IL-6 (15, 16). FL-3 synergisiert beispielsweise mit G-CSF und GM-CSF bei der Mobilisierung von hämatopoetischen Progenitorzellen (16).

TPO, der Ligand für c-mpl, gilt als Hauptregulator der Megakaryopoese und damit der Thrombopoese. Allerdings können c-mpl-knockout-Mäuse trotzdem funktionstüchtige Thrombozyten bilden, wenngleich deren Anzahl deutlich reduziert ist (20). TPO ist, im Gegensatz zu FL-3, als alleiniger Wachstumsfaktor in der Lage, frühe hämatopoetische SZ zu stimulieren. Wird TPO in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren als Stimulanz verwendet (25), kann eine Differenzierung in verschiedene Richtungen erfolgen. Beispielsweise lassen sich aus Nabelschnurblut gewonnenen SZ in Langzeitkulturen mittels Stimulation durch SCF und TPO neutrophile Granulozyten generieren (14). Ebenso ist TPO in der Lage, die durch SCF bewirkte Zellamplifikation zu verstärken (14). Im Gegensatz zu FL-3 finden sich in der Literatur Hinweise, dass TPO alleine eine Proliferation bei humanene SZ bewirken kann (24). Dies traf

jedoch bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen mit benignen SZ nicht zu. TPO war bei benignen Zellen nicht in der Lage eine Amplifikation zu bewirken. Allerdings ließen sich die CML-SZ durch TPO alleine in deutlich höherem Maße stimulieren. Bei Vergleich der Einzelzytokinansätze wies hier der Ansatz mit TPO die höchste Amplifikation auf. Sowohl bei benignen als auch CML-Zellen war TPO das am besten geeignete Zytokin, eine möglichst hohe CD34<sup>+</sup>-Fraktion zu erhalten bzw. im Fall der CML Zellen, einen Anstieg der CD34<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der Inkubation zu bewirken. Der Anteil an frühen HSZ, charakterisiert durch CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup>, war bei den aufgereinigten, an Tag 0 eingesetzten CML-SZ im Vergleich zu den benignen SZ deutlich höher. Im Verlauf der Inkubation ließen sich im CML-Ansatz mit TPO die höchsten CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Anteile erhalten, TPO bewirkte also bei den CML Zellen die geringste Differenzierungsinduktion bei gleichzeitig größter Amplifikation.

SCF, der Ligand für c-kit, daher von vielen Autoren auch kit-Ligand genannt, ist ein Wachstumsfaktor, der in der Lage ist pluripotente SZ auf vielfache Weise zu stimulieren. Zusätzlich wirkt SCF auch auf spätere Entwicklungsstufen der Hämatopoese ein (12, 14, 20). Ähnlich wie die bereits erwähnten Faktoren wirkt SCF in Kombination mit vielen Zytokinen synergistisch. SCF induziert durch seine Anwesenheit die Zelldifferenzierung von HSZ in alle Richtungen des hämatopoetischen Systems. Beispielsweise steigert SCF zusammen mit TPO das Megakaryozytenwachstum, in einer Kombination mit EPO, das normalerweise mit einer Reduktion der Myelopoese assoziiert ist (12), ist es in der Lage multilineäre Kolonien zu generieren. Die Applikation von blockierenden c-kit Antikörpern im Tierversuch führte zur deutlichen Reduktion der meisten erythroiden und myeloiden Zellen im Knochenmark, wobei die Knochenmarkzellularität weitgehend konstant blieb. Die Aufgaben von SCF und FL-3 scheinen sich zum Teil zu überlappen (20). In den durchgeführten Einzelzytokinkulturen erwies sich SCF als das Zytokin mit der höchsten Amplifikation bei benignen SZ, der Effekt bei CML-SZ war in etwa gleich. Eine deutlich höhere Amplifikation zeigten die CML-Zellen jedoch in Anwesenheit von TPO (s.o.).

Bei den Zweifachzytokinansätzen fiel auf, dass die Hinzugabe von FL-3 zu den anderen Zytokinen bei den CML Zellen keine Steigerung der Gesamtzellamplifikation bewirken konnte. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass FL-3 in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren (IL-3, IL-6 und G-CSF) in der Lage ist, die Gesamtzellzahl in höherem Maß zu steigern als SCF (26, 27). In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen zeigten diesbezüglich aber nur die Zytokine SCF und TPO synergistische Effekte.

Im Vergleich mit benignen SZ konnte bei CML-SZ durch eine Kombination von drei oder mehr Wachstumsfaktoren eine wesentlich höhere Zellamplifikation erreicht werden, wobei es zu einer geringeren Ausdifferenzierung kam. Die Kombination von TPO, SCF und FL-3, <TSF>, erwies sich in den CML-Zellkulturen als die am besten geeignete Kombination, eine hohe Amplifikation bei geringer Differenzierung zu erzielen. Bei den benignen Zellen waren die Ergebnisse ähnlich, aufgrund der höheren Gesamtzellamplifikation fanden sich die höchsten CD34 Zellzahlen jedoch in <CC6> und <TSFI>. Diese Ergebnisse ähneln denen anderer Arbeitsgruppen. Beispielsweise fanden *Brugger et al.* bei der Hinzunahme von G-CSF und/oder GM-CSF zu der von ihnen verwendeten Zytokinkombination das Resultat einer höheren Gesamtzellzahl bei gleichzeitig niedrigerer CD34<sup>+</sup>-Zellzahl und Progenitorzahl.

Die Zellen der CML-Ansätze setzen sich aus den beiden verschiedenen Fraktionen, den Philadelphia-chromosom-positiven und -negativen Zellen zusammen. Aus der Literatur ist bekannt, dass SCF bei CML Zellen eine selektive Proliferation der Ph<sup>+</sup>-positiven Fraktion bewirken kann. Auch scheinen die CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup> CML Zellen im Vergleich zu den CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> CML Zellen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich Proliferation und Differenzierung zu zeigen (35). Die von uns verwendeten aufgereinigten CML-SZ enthielten median einen größeren Anteil an CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-low</sup> Zellen als die benignen SZ. Allerdings war an Tag 0 der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen, die eine Koexpression mit CD33 aufwiesen, und damit differenzierteren Zellen entsprachen, bei den CML Zellen höher als bei den benignen Zellen. Beides traf auch bei den Versuchen

von *Garin et al* zu (34). Im Gegensatz zu den eigenen Experimenten zeigten die Ansätze mit CML-Zellen hier jedoch einen deutlich rascheren Abfall des CD34<sup>+</sup>-Zellanteils während der Inkubation mit Zytokinen als die Ansätze mit benignen Zellen. Ebenso war die Gesamtzellamplifikation bei *Garin et al.* in beiden Gruppen gleich. Unterschiede bestanden jedoch in den verwendeten Zytokinen. *Garin et al* verwendeten eine Kombination aus IL1, IL-3, IL-6 und SCF (34).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine der von uns untersuchten Zytokine oder Zytokinkombinationen eine selektive Proliferation ohne Differenzierung ermöglicht. Dies trifft sowohl auf die benignen als auch auf die CML-SZ zu. Die geringstmögliche Differenzierungsinduktion gelang bei den CML-Zellen mit <TSF>, bei den benignen Zellen mit <TSFI>. Die CML Zellen wiesen unter identischen Bedingungen gegenüber den benignen Zellen eine deutlich höhere Proliferation auf. Ursächlich für diese Unterschiede könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Ausgangspopulationen mit einem höheren Anteil CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-/low</sup> Zellen bei den CML-Ansätzen sein. Eine alternative Erklärung ist die gesteigerte Proliferation, bedingt durch die bcr-abl Tyrosinkinase bei den Philadelphiachromosom-positiven CML Zellen. Hierdurch könnte auch die gesteigerte Empfindlichkeit auf Wachstumsfaktoren bedingt sein.

Ein weiteres Ziel unserer Untersuchungen war herauszufinden, ob eine Differenzierung in dendritische Zellen (DC), ausgehend von benignen und CML-SZ, möglich ist.

DC sind charakterisiert durch die Expression von CD1a. Die Differenzierung in DC kann sowohl von frühen lymphatischen als auch von frühen myeloischen bzw. monozytären Zellen ausgehen. Für unsere Versuche wählten wir letzteren Weg, sodass zunächst die gezielte Differenzierung in monozytäre Zellen erfolgen sollte. Zur Evaluation wurde der Marker CD14 eingesetzt. Hier erwiesen sich bei den benignen Zellkulturen die bereits verwendeten Zytokinkombinationen <TSF> sowie <TSFI> als potente Stimulatoren für eine monozytärer Differenzierung. Beim Vergleich fiel auf, dass die CML-SZ unter identischen Bedingungen keine monozytäre Differenzierung zeigten. Dieses Phänomen war

auch über eine Inkubationszeit von mehr als 12 Tagen zu beobachten. Ebenso konnte die im Verlauf zusätzlich eingesetzte Zytokinkombination <DC-C>, bestehend aus IL-4, TNF- $\alpha$  und GM-CSF, die später erfolgreich zur DC-Generierung eingesetzt wurde, keine monozytäre Differenzierung bewirken.

Da Vitamin D bzw. dessen aktive Form 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) neben zahlreichen anderen Funktionen auch in der Lage ist, bei hämatopoetischen Zellen eine Differenzierung in Monozyten und in dendritische Zellen zu induzieren, wurden in weiteren Versuchsansätzen D<sub>3</sub> zu den bekannten Zytokinkombinationen an verschiedenen Tagen hinzugefügt. Unter diesen Bedingungen war es möglich, auch bei den CML-Zellen eine Differenzierung in CD14-positive Zellen zu bewirken. Das frühe Hinzufügen (ab Inkubationstag 3) von D<sub>3</sub> zu <DC-C> erwies sich als effizienter als die spätere Hinzugabe. Ein ähnliches Verhalten wurde von anderen Arbeitsgruppen (71, 73) bei benignen Stammzellen beobachtet. *Munker et al* erreichte durch die Inkubation mit D<sub>3</sub> sowohl bei benignen als auch bei Zellen einer leukämischen Linie die Differenzierung in Monozyten (73). D<sub>3</sub> scheint nicht nur bei der Generierung von Monozyten eine Rolle zu spielen sondern auch bei der Funktion und Reifung sowie der Differenzierung von DC aus den differenzierten Monozyten (72). *Piemonti et al* gelangen so die Generierung von DC, die neben CD1a auch CD14-positiv waren.

Vitamin D<sub>3</sub> war bei den vorliegenden Bedingungen zur Generierung von monozytären Zellen aus hämatopoetischen CML SZ essentiell. Eine solche Differenzierung allein durch eine Zytokinkombination war bei CML-Zellen, im Gegensatz zu benignen Zellen, nicht möglich. Durch die Hinzugabe von D<sub>3</sub> konnte bei den CML-SZ der monozytäre Differenzierungsblock überwunden werden.

Wie bereits erwähnt sind verschiedene Wege einer dendritischen Zellgenerierung beschrieben. *In vivo* können DC mittels der Zytokine FL-3 und G-CSF expandiert werden. Als Schlüsselzytokin bei der *in vitro* Differenzierung dendritischer Zellen aus hämatopoetischen SZ wurde GM-CSF erkannt (61). Mit einer alleinigen Stimulation durch GM-CSF kann eine Differenzierung in Monozyten

und DC erreicht werden. Erfolgt eine Kombination mit TNF $\alpha$  wird eine deutlich höhere Zellzahl an CD1a<sup>+</sup>-DC generiert, wobei ein inhibierender Effekt des TNF $\alpha$  auf die monozytäre Differenzierung vermutet wird (62). Als sehr potent hat sich bei verschiedenen Untersuchungen die Zytokinkombination GM-CSF, TNF $\alpha$  und IL-4 gezeigt, wobei auch IL-4 die monozytäre Differenzierung supprimiert und es in den Zellkulturen dadurch zur Bildung von mehr dendritischen Zellaggregaten kommt (57).

Neben diesem Differenzierungsweg aus hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-SZ ist auch eine Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes oder monzytären Vorläuferzellen möglich. Diese können neben einer Ausdifferenzierung in Makrophagen, die insbesondere durch M-CSF induziert wird, auch als Zwischenstadium bei der DC-Differenzierung fungieren. (55, 56, 61) Hierbei spielt IL-4 eine entscheidende Rolle, da es die Differenzierung zugunsten der Makrophagen blockiert und so bei einer Kombination mit GM-CSF zu einer verstärkten DC Bildung führt. Diese sogenannte bipotenzielle Natur der Monozyten wurde unter anderem von *Steinman* beschrieben (61). *Strunk et al* generierten mittels einer Stimulation durch GM-CSF und TNF- $\alpha$  *in vitro* aus HSZ Monozyten und DC. Durch die Hinzugabe von IL-4 gelang ein prozentualer Anstieg der CD1a-positiven DC, die Gesamtzellproliferation stellte sich allerdings sinkend dar (53).

Bei der gezielten Differenzierung in DC, ausgehend von HSZ, wurden in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen analog zur Literatur verschiedene Zytokinkombinationen untersucht. Zwei der untersuchten Ansätze enthielten SCF, EPO, IL-3, IL-6 und GM-CSF sowie entweder IL-4 oder TNF $\alpha$ . Beide Kombinationen waren zwar in der Lage, eine Zelldifferenzierung in CD1a-positiven Zellen zu induzieren, die erreichten Zellzahlen bzw. die prozentualen Anteile waren jedoch sehr gering. Deutlich potenter bzgl. der DC-Differenzierung zeigte sich der Ansatz mit der Kombination von IL-4, TNF $\alpha$  und GM-CSF, <DC-C>. Hier erfolgte zunächst eine 24-stündige Vorstimulation mit <CC6>, einer Zytokinkombination, die in den Amplifikationsexperimenten eine sehr hohe Gesamtzellamplifikation erreichte. Die Technik einer Vorstimulation wurde bereits u.a. von *Arrighi et al.* sowie *Herbst et al.* verwendet, jedoch wurde von den genann-

ten Arbeitsgruppen eine deutlich längere Vorstimulation durchgeführt (14-70 Tage bzw. acht Tage). *Herbst* gelang mit der Zytokinkombination IL-4 und GM-CSF nach einer achttägigen Vorstimulation mit SCF, IL-3 und IL-6 die Generierung von  $2,86 \times 10^6$  Zellen aus initial  $2 \times 10^5$  Zellen (58). Bei den hier durchgeführten färbten sich an Tag siebzehn im Ansatz <DC-C> 35,5% der Gesamtzellen, entsprechend  $1,35 \times 10^6$  Zellen absolut CD1a-positiv (bei initial  $1,5 \times 10^5$  eingesetzten Zellen). Bei den Differenzierungsversuchen von *Arrighi* wurden die Zellen wesentlich länger (14-70 Tage) mit einer Zytokinkombination bestehend aus TPO und FL-3 mit oder ohne SCF (ähnlich dem hier verwendeten <TSF> Ansatz) inkubiert. *Arrighi* erreichte so nach 4 Wochen Vorinkubation eine 250-fache Gesamtzellamplifikation (median). Nach der Vorinkubation konnte *Arrighi* durch eine Stimulation mit GM-CSF und IL-4 einen etwa 25%igen Anteil an CD1a-positiven Zellen nachweisen (65). Bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen, war im zeitlichen Verlauf der <DC-C> Kultur ein zunächst langsames Ansteigen der CD1a-Population (an Tag 12 8,6% CD1a<sup>+</sup> Zellen) bemerkenswert. Im letzten Drittel der Inkubationszeit war ein relativ steiler Anstieg der CD1a<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten. Auffällig war weiterhin ein gleichzeitiges Abfallen der CD14-positiven Zellen, die bis zu Tag 12 ein Ansteigen gezeigt hatten. An Auswerttag 17 ließen sich lediglich noch etwa 11% CD14<sup>+</sup>-Zellen nachweisen. Ähnliches lässt sich bei den Ergebnissen von *Arrighi* finden. Hier war nach der Vorstimulation ein Anteil von 43% CD14-positiven Zellen zu finden, der nach Zytokinwechsel auf ca. 6% absank. In den Vergleichsansätzen <TSF>, <DC-A> und <DC-B> war dieser Verlauf nicht zu beobachten. Hier fand nach Inkubationstag 12 ein weiterer Anstieg der CD14 Fraktion statt. Dies bedeutet, dass es sich bei den mittels <DC-C> generierten CD1a<sup>+</sup>-Zellen wahrscheinlich um aus monozytären Vorläuferzellen differenzierte DC handelt. Die CD1a<sup>+</sup>-Zellen färbten sich an Tag 17 teilweise mit weiteren dendritischen Markern (CD80, CD86). Der überwiegende Teil der CD1a<sup>+</sup>-Zellen war außerdem HLA-DR positiv.

Bei Betrachtung der CML-SZ Kulturen zeigten sich bezüglich der Differenzierbarkeit in DC ähnliche Ergebnisse. Während die Zytokinkombination <TSF>

lediglich einen CD1a Anteil <1% zu generieren vermochte, ließ sich im Ansatz mit <DC-C> ein Anteil von 35% finden. Im zeitlichen Verlauf stieg der CD1a-Anteil noch später als bei den benignen Zellen an. Bei den CML-Kulturen konnte das reziproke Verhalten von CD14 und CD1a-Zellen nicht gefunden werden. Wie aus den Vorversuchen bekannt, ließ sich aus den CML Zellen ohne Zugabe von Vitamin D3 keine relevante CD14-Population generieren. Trotz des fehlenden CD14-Anteils konnte aus den CML-Zellen dennoch ein 35%iger Anteil ( $2,9 \times 10^6$  Zellen absolut) an CD1a-positiven Zellen gewonnen werden. Dies legt den Verdacht nahe, daß die CML-Zellen über einen anderen Differenzierungsweg als die benignen Zellen zu CD1a-positiven DC ausreifen (Abb. 17).

Bezüglich der weiteren Oberflächentypisierung wiesen die CML-DC ein gegenüber den benignen DC unterschiedliches Profil auf. Der Anteil an CD1a<sup>+</sup>-Zellen die zugleich HLA-DR-positiv war bei den CML-Zellen höher. Ebenso lag der Anteil an CD80- und CD83-positiven DC höher als bei den benignen Ansätzen. Die generierten CML-DC entsprachen also reiferen Zellen.

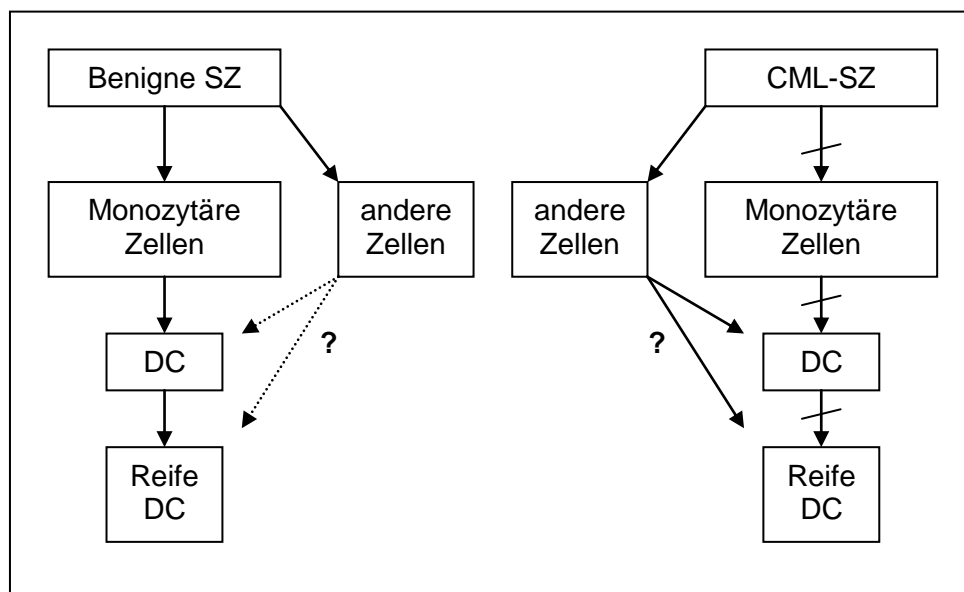


Abbildung 17: Differenzierungswege der DC bei benignen und CML Zellen. Unter den vorliegenden Bedingungen ist eine Generierung über monozytäre Zellen bei CML-Zellen nicht möglich.

Choudhury et al. gelangen, ebenfalls mit der Zytokinkombination GM-CSF, IL-4 und TNF- $\alpha$ , die Generierung von CD1a-positiven DC aus CML-SZ. Die differen-



zierten Zellen zeigten hier ein ähnliches Oberflächenprofil, waren allerdings in höherem Maße CD86-positiv (51-100%)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Generierung von DC sowohl aus benignen als auch aus CML-SZ in hohem Maße möglich ist. Die CML-DC scheinen sich aber im Gegensatz zu den benignen Zellen nicht über monozytäre, CD14-positive sondern über andere Zellen zu entwickeln (siehe Abb. 17). Die generierten Zellen weisen Unterschiede im Markerprofil auf, bei den CML-DC handelt es sich um reifere Zellen.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. J.D. Schwarzmeier. The role of cytokines in hematopoiesis. *European Journal of Hematology* 57: 69-77, 1996
2. G. Herbein, H. Sovalat, E. Wunder, M. Baerenzung, J. Bachorz, H. Lewandowski, C. Schweitzer, C. Schmitt, A. Kirn, and P. Henon. Isolation and identification of two CD34+ cell subpopulations from normal human peripheral blood. *Stem.Cells* 12 (2):187-197, 1994.
3. A.D. Ho, D. Young, M. Maruyama, R. E. Corringham, J. R. Mason, P. Thompson, K. Grenier, P. Law, L. W. Terstappen, and T. Lane. Pluripotent and lineage-committed CD34+ subsets in leukapheresis products mobilized by G-CSF, GM-CSF vs. a combination of both. *Exp.Hematol.* 24 (13):1460-1468, 1996.
4. G. J. Spangrude, D. M. Brooks, and D. B. Tumas. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 85 (4):1006-1016, 1995.
5. A.W. Roberts and D. Metcalf. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood* 86 (4):1600-1605, 1995.
6. J. G. Bender, K. L. Unverzagt, D. E. Walker, W. Lee, D. E. Van Epps, D. H. Smith, C. C. Stewart, and L. B. To. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 77 (12):2591-2596, 1991.

7. E. A. de Wynter, L. H. Coutinho, X. Pei, J. C. Marsh, J. Hows, T. Luft, and N. G. Testa. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem.Cells* 13 (5):524-532, 1995.
8. E. A. de Wynter, D. Ryder, F. Lanza, G. Nadali, H. Johnsen, P. Denning-Kendall, B. Thing-Mortensen, F. Silvestri, and N. G. Testa. Multicentre European study comparing selection techniques for the isolation of CD34+ cells. *Bone Marrow Transplant.* 23 (11):1191-1196, 1999.
9. U. Paulus, P. Dreger, K. Viehmann, N. von Neuhoff, and N. Schmitz. Purging peripheral blood progenitor cell grafts from lymphoma cells: quantitative comparison of immunomagnetic CD34+ selection systems. *Stem.Cells* 15 (4):297-304, 1997.
10. D. A. Williams. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? *Blood* 81 (12):3169-3172, 1993.
11. A. Hatzfeld, P. Batard, B. Panterne, F. Taieb, J. Hatzfeld. Increased stable retroviral gene transfer in early hematopoietic progenitors released from quiescence. *Human Gene Therapy* 7 (2): 207-213, 1996.
12. J. Olweus, L. Terstappen, P.A. Thompson, F. Lund-Johansen. Expression and Function of Receptors for Stem Cell Factor and Erythropoietin During Lineage Commitment of Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood* 88 (5): 1594-1607, 1996
13. K. Brasel, H. McKenna, P.J. Morrissey, K. Charrier, A.E. Morris, C. Chang Lee, D.E. Williams, S.D. Lyman. Hematologic Effects of flt3 Ligand In Vivo in Mice. *Blood* 88 (6): 2004-2012, 1996
14. N. Sawai, K. Koike, S. Ito, H.H. Mwamtemi, Y. Kurokawa, T. Kinoshita, K. Sakashita, T. Higuchi, K. Takeuchi, M. Shiohara, H. Miyazaki, T. Kato, A.

- Komiyama. Neutrophilic Cell Production by Combination of Stem Cell Factor and Thrombopoietin From CD34<sup>+</sup> Cord Blood Cells in Long-Term Serum-Deprived Liquid Culture. *Blood* 93 (2): 509-518, 1999
15. S. E. W. Jacobsen, O. P. Veiby, J. Myklebust, C. Okkenhaug, S. D. Lyman. Ability of flt3 Ligand to Stimulate the In Vitro Growth of Primitive Murine Hematopoietic Progenitors Is Potently and Directly Inhibited by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Blood* 87 (12): 5016-5026, 1996
  16. K. Brasel, H.J. McKenna, K. Charrier, P.J. Morrissey, W.E. Williams, S.D. Lyman. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood* 90 (9): 3781-3788, 1997
  17. Stephen G. Emerson. Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Precursors, Progenitors and Stem Cells: The Next Generation of Cellular Therapeutics. *Blood* 87 (8): 3082-3088, 1996
  18. H. Yu, T.A. Fehniger, P. Fuchshuber, K.S. Thiel, E. Vivier, W.E. Carson, M.A. Caligiuri. Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34<sup>+</sup> Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15. *Blood* 92 (10): 3647-3657, 1998
  19. D.G. Gilliland and J.D. Griffin. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100 (5): 1532-1542, 2002
  20. S.D. Lyman and S.E.W. Jacobsen. C-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood* 91 (4): 1101-1134, 1998

21. M.R. Shurin, C. Esche, M.T. Lotze. FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Reviews* 9 (1): 37-48, 1998
22. S. Querol, G. Capmany, J.A. Cancelas, J. Garcia. Expansion of cord blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 21 Suppl 3: 77-88, 1998
23. G. Kogler, J. Callejas, R.V. Sorg, P. Wernet. An eight-fold ex vivo expansion of long-term culture-initiating cells from umbilical cord blood in stirred suspension cultures. *Bone Marrow Transplant* 21 Suppl 3: 48-53, 1998
24. T. Matsunaga, T. Kato, H. Miyazaki, M. Ogawa. Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood* 92 (2): 452-461, 1998
25. V. Ramsfjell, O.J. Borge, O.P. Veiby, J. Cardier, M.J. Murphy, S.D. Lyman, S. Lok, S.E. Jacobsen. Thrombopoietin, but not erythropoietin, directly stimulates multilineage growth of primitive murine bone marrow progenitor cells in synergy with early acting cytokines: distinct interactions with the ligands for c-kit and FLT3. *Blood* 88 (12): 4481-4492, 1996
26. F. Shapiro, B. Pytowski, S. Rafii, L. Witte, D.J. Hicklin, T.J. Yao, M.A. Moore. The effects of Flk/flt3 ligand as compared with c-kit ligand on short-term and long-term proliferation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors elicited from human fetal liver, umbilical cord blood, bone marrow, and mobilized peripheral blood. *Journal of Hematotherapy* 5 (6): 655-662, 1996
27. M.R. Koller, M. Oxender, D.A. Brott, B.O. Palsson. Flt-3 ligand is more potent than c-kit ligand for the synergistic stimulation of ex vivo hematopoietic cell expansion. *Journal of Hematotherapy* 5 (5): 449-459, 1996

28. A.L. Petzer, P.W. Zandstra, J.M. Piret, C.J. Eaves. Differential cytokine effects on primitive (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *Journal of Experimental Medicine* 183 (6): 2551-2558, 1996
29. M. Lisovsky, S.E. Braun, Y. Ge, H. Takahira, L. Lu, V.G. Savchenko, S.D. Lyman, H.E. Broxmeyer. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* 10 (6): 1012-1018, 1996
30. A.J. Shah, E.M. Smogorzewska, C. Hannum, G.M. Crooks. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood* 87 (9): 3563-3570, 1996
31. H. Takahira, S.D. Lyman, H.E. Broxmeyer. Flt3 ligand prolongs survival of CD34<sup>+</sup> and human umbilical cord blood myeloid progenitors in serum-depleted culture medium. *Annals of Hematology* 72 (3): 131-135, 1996
32. A.L. Petzer, D.E. Hogge, P.M. Landsdorp, D.S. Reid, C.J. Eaves. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long term initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (4): 1470-1474, 1996
33. L.S. Rusten, S.D. Lyman, O.P. Veiby, S.E. Jacobsen. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 87 (4): 1317-1325, 1996
34. M.I. Garin, J.F. Apperley, J.V. Melo. Ex Vivo expansion and characterisation of CD34<sup>+</sup> cells derived from chronic myeloid leukemia bone marrow and peripheral blood, and from normal bone marrow and mobilised peripheral blood. *European Journal of Haematology* 64: 85-92, 2000

35. S. Moore, D.N. Haylock, J-P. Levesque, L.A. Mc Diarmid, L.M. Samels, L.B. To, P.J. Simmons, T.P. Hughes. Stem Cell Factor as a Single Agent Induces Selective Proliferation of the Philadelphia Chromosome Positive Fraction of Chronic Myeloid Leukemia CD34<sup>+</sup> Cells. *Blood* 92 (7): 2461-2470, 1998
36. A.C. Eaves, M.J. Barnett, L. Ponchio, J.D. Cashman, A.L. Petzer, C.J. Eaves. Differences between normal and CML stem cells: potential targets for clinical exploitation. *Stem Cells* 16 Suppl 1: 77-83, 1998
37. R. Kurzrock, J.U. Gutterman, M. Talpaz. The Molecular Genetics of Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *The New England Journal of Medicine* 319 (15): 990-998, 1988
38. G.Q. Daley, Y. Ben-Neriah. Implicating the bcr/abl Gene in the Pathogenesis of Philadelphia Chromosome Positive Human Leukemia. *Advances in Cancer Research* 57: 151-184, 1991
39. A.L. Petzer, C.J. Eaves, M.J. Barnett, A.C. Eaves. Selective Expansion of Primitive Normal Hematopoietic Cells in Cytokine-Supplement Cultures of Purified Cells from Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 90 (1): 64-69, 1997
40. C.M. Verfaillie, W.J. Miller, K. Boylan, P.B. McGlave. Selection of Benign Primitive Hematopoietic Progenitors in Chronic Myelogenous Leukemia on the Basis of HLA-DR Antigen expression. *Blood* 79 (4):1003-1010, 1992
41. M.H. Freedman, J.K. Hitzler, N. Bunin, T. Grunberger, J. Squire. Juvenile chronic myelogenous leukemia multilineage CD34<sup>+</sup> cells: aberrant growth and differentiation properties. *Stem Cells* 14 (6): 690-701, 1996
42. T.P. Hughes, G.J. Morgan, P. Martiat, J.M. Goldman. Detection of Residual Leukemia After Bone Marrow Transplant for Chronic Myeloid Leuke-

mia: Role of Polymerase Chain Reaction in Predicting Relapse. *Blood* 77 (4): 874-878, 1991

43. M.L. Gishizky, J. Johnson-White, O.N. Witte. Efficient transplantation of BCR-ABL-induced chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 90: 3755-3759, 1993
44. W. Dameshek. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6: 372-375, 1951
45. Y. Ben Neriah, G.Q. Daley, A.M. Mes Masson, O.N. Witte, D. Baltimore. The chronic myelous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene of the Philadelphia Chromosome. *Science* 233: 212-214, 1986
46. S.C. Finch, M.S. Linet. Chronic leukaemias. *Baillieres Clinical Haematology* 5: 27-56, 1992
47. L. Brandt. Environmental factors and leukaemia. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy* 2: 7-10, 1985
48. R. Hehlmann, H.Heimpel, J. Hasford, H.J. Kolb, H. Pralle, D.K. Hossfeld, W. Queisser, H. Löffler, A. Hochhaus, B. Heinze, A. Georgii, C.R. Bartram, M. Griesshammer, L. Bergmann, U. Essers, C. Falge, U. Queisser, P. Meyer, N. Schmitz, H. Eimermacher, F. Walther, W. Fett, U.R. Kleeberg, A. Käbisch, C. Nerl, R. Zimmermann, G. Meuret, A. Tichelli, L. Kanz, F..J. Tigges, L. Schmid, W. Brockhaus, A. Tobler, A. Reiter, M. Perker, B. Emmerich, K. Verpoort, R. Zankovich, P.V. Wussow, O. Prümmer, J. Thiele, T. Buhr, F. Carbonell, H. Ansari and the German CML Study Group. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 84: 4064-4077, 1994



49. B.D. Clarkson, A. Strife, D. Wisniewski, C. Lambek, N. Carpino. New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. *Leukemia* 11: 1404-1428, 1997
50. C.M. Verfaillie. Chronic myelogenous leukemia: from pathogenesis to therapy. *Journal of Hematotherapy* 8: 3-13, 1999
51. K. Schäkel, E.P. Rieber. Dendritische Zellen. *Allergologie*, Jahrgang 26, Nr 4/2003, S. 163-171
52. E. Kämpgen, F. Koch, C. Heufler, A. Eggert, L.L. Gill, S. Gillis, S.K. Dower, N. Romani, G. Schuler. Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 179 (6): 1767-1776, 1994
53. D. Strunk, K. Rappersberger, C. Egger, H. Strobl, E. Kromer, A. Elbe, D. Maurer, and G. Stingl. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87 (4):1292-1302, 1996.
54. J. H. Peters, R. Gieseler, B. Thiele, F. Steinbach. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunology today* Vol. 17, No. 6 273, 1996. bn
55. J. Banchereau and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (6673):245-252, 1998.
56. M. Schnurr, P. Galambos, C. Scholz, M. Dauer, A. Krug, G. Hartmann, a. Eigler, S. Endres. Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 99, Heft 37, A2408-A2416, 2002
57. N. Romani, S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, and G. Schuler. Proliferat-

ing dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine* 180 (1):83-93, 1994.

58. B. Herbst, G. Kohler, A. Mackensen, H. Veelken, P. Kulmburg, F. M. Rosenthal, H. E. Schaefer, R. Mertelsmann, P. Fisch, and A. Lindemann. In vitro differentiation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells toward distinct dendritic cell subsets of the birbeck granule and MHC-positive Langerhans cell and the interdigitating dendritic cell type. *Blood* 88 (7):2541-2548, 1996.
59. M. Manz, D. Traver, T. Miyamoto, I. Weissman, K. Akashi. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, (11): 3333-3341, 2001
60. M. Manz, D. Traver, K. Akashi, M. Merad, T. Miyamoto, E.G. Engleman, I. Weissman. Dendritic Cell Development from Common Myeloid Progenitors. *Science* Vol 290 no 5499: 2152-2154, 2000
61. R.M. Steinman. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 111: 675-697, 2003
62. R. Thomas, P.E. Lipsky. Dendritic Cells: Origin and Differentiation. *Stem Cells* 14: 196-206, 1996
63. A. Choudhury, J. L. Gajewski, J. C. Liang, U. Popat, D. F. Claxton, K.-O. Kliche, M. Andreeff, R.E. Champlin. Use of Leukemic Dendritic Cells for the Generation of Antileukemic Cellular Cytotoxicity Against Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, Vol 89, No 4: 1133-1142, 1997
64. A. Mackensen, B. Herbst, G. Köhler, G. Wolff-Vorbeck, F.M. Rosenthal, H. Veelken, P. Kulmburg, H.E. Schaefer, R. Mertelsmann, A. Lindemann. Delineation of the Dendritic Cell Lineage by Generating Large Numbers of

Birbeck Granule-Positive Langerhans Cells From Human Peripheral Blood Progenitor Cells In Vitro. *Blood*, Vol 86, No 7: 2699-2707, 1995

65. J.-F. Arrighi, C. Hauser, B. Chapuis, R. Zubler, V. Kindler. Long-Term Culture of Human CD34<sup>+</sup> Progenitors With FLT3-Ligand, Thrombopoietin and Stem Cell Factor Induces Extensive Amplification of a CD34<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup> and a CD34<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> Dendritic Cell Precursor. *Blood*, Vol 93, No 7: 2244-2252, 1999
66. J.W. Young, P. Szabolcs, M.A. Moore. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine* 182 (4):1111-1119, 1995.
67. B. Obermaier, M. Dauer, J. Herten, K. Schad, S. Endres, A. Eigler. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biological Procedures Online*, Vol 5 No. 1, October 24, 2003
68. C Lee, C.A. Evans, E. Spooncer, A. Pierce, R. Mottram, A.D. Whetton. Generation of a conditionally immortalized myeloid progenitor cell line requiring the presence of both interleukin-3 and stem cell factor to survive and proliferate. *Br. Journal of Haematology*, 122 (6): 985-995, 2003
69. Z. Bar-Shavit, S.L. Teitelbaum, P. Reitsma, A. Hall, L.E. Pegg, J. Trial, A.J. Kahn. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 80: 5907-5911, 1983
70. R. Munker, A. Norman, H.P. Koeffler. Vitamin D Compounds. *Journal of Clinical Investigation* Vol. 78: 424-430, 1986

71. D.E. Zhang, C.J. Hetherington, D.A. Gonzales, H.M. Chen, D.G. Tenen. Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Immunology* 153 (7): 3276-3284, 1994
72. L. Piemonti, P. Monti, M. Sironi, P. Fraticelli, B.E. Leone, E.D. Cin, P. Allavena, V. Di Carlo. Vitamin D3 affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* 164: 4443-4451, 2000
73. R. Munker, W. Zhang, E. Elstner, H.P. Koeffler. Vitamin D analogs, leukemia and WAF1. *Leukemia & Lymphoma* 31 (3-4): 279-284, 1998
74. P. Pietschmann, M. Willheim, M. Peterlik. Bedeutung von Vitamin D im Immunsystem. *Journal für Mineralstoffwechsel* 10 (3): 13-15, 2003

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Wilhelm und Herrn Priv.-Doz. Dr. Weissinger danke ich für die Überlassung des Themas, sehr viel Geduld und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Immunologischen Labors möchte ich mich für die wundervolle Zusammenarbeit bedanken, ein besonderer Dank gilt Frau Rosl Otthol.

Herrn Prof. Dr. Böck danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein herzlicher Dank auch meinen Eltern und meiner Frau Maria.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Tobias Eberhard Schertlin  
Geburtsdatum, -ort 9. Mai 1973, Nürnberg  
e-Mail: tobiasschertlin@aol.com

## Schulbildung

1979 – 1983 Adam-Kraft Grundschule, Nürnberg  
1983 – 1992 Hans-Sachs-Gymnasium, Nürnberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst & Ausbildung

07/1992 – 09/1993 Bayerisches Rotes Kreuz, Nürnberg  
Ausbildung zum Rettungsdiensthelfer

## Hochschulausbildung

11/1993 – 03/1996 Studium der Humanmedizin an der  
Universität Regensburg  
03/1996 Ärztliche Vorprüfung  
05/1996 – 05/2001 Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilian-Universität, Würzburg  
03/1997 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2000 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2001 dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Berufliche Tätigkeit

07/2001 – 01/2002 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik und  
Poliklinik II der Universität Würzburg  
seit 04/2002 Assistenzarzt, Klinikum Nürnberg Nord, Me-  
dizinische Klinik 5, Schwerpunkt Onkolo-  
gie/Hämatologie

Nürnberg, Juli 2008

