

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, Klinische
Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie)

**In vitro-Untersuchungen
zum Effekt von Lenalidomid auf CD34+
hämatopoetische Progenitorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
in Tübingen**

vorgelegt von

Mazier Fischer, Aélis Johanna Raphaëlle, geb. Mazier

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 11.10.2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Hämatopoese.....	3
1.2	Immunmodulatorische Substanzen	5
1.3	Lenalidomid	7
1.3.1	Chemische Struktur	7
1.3.2	Biologische Struktur	7
1.3.3	Pharmazeutischer Einsatz	8
1.4	Ziel dieser Arbeit	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Reagenzien.....	11
2.1.1	Zytokine.....	11
2.1.2	Funktionell blockierende Antikörper	11
2.1.3	Chemikalien, Enzyme und Seren	12
2.1.4	Kits	12
2.2	Lösungen.....	13
2.2.1	Medien für die Zellkultur	13
2.2.2	Sonstige Lösungen.....	13
2.3	Gebrauchswaren.....	14
2.4	Geräte.....	14
2.5	Zellen	15
2.6	Methoden	16
2.6.1	Isolierung von CD34+ Zellen aus Leukopheresat	16
2.6.2	Reinheitsbestimmung	16
2.6.3	Einfrieren und Konservieren von CD34+-Zellen	16
2.6.4	Apoptosenachweis durch Färbung mit Annexin und Propioniodid.....	17
2.6.5	Zellproliferation über 7 Tage.....	17
2.6.6	Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	18
2.6.7	Auszählung mit Beads	18
2.6.8	CFU, Colony Forming Units	19
2.6.9	Auswertung.....	20
3.	Ergebnisse.....	21

3.1	Durch Lenalidomid induzierte Apoptose.....	21
3.2	Der Effekt von Lenalidomid auf die Proliferation der CD34+- Zellen	22
3.3	Der Einfluss von Lenalidomid auf die Entwicklung des Phänotyps der hämatopoetischen Progenitorzellen im Expansionsversuch.....	24
3.4	Colony Forming Units	32
4.	Diskussion	35
4.1	Diskussion der Methodik	35
4.1.1	Apoptose durch Lenalidomid	35
4.1.2	Proliferation der CD34+- Progenitor Zellen.....	35
4.1.3	Colony forming units.....	35
4.2	Diskussion der Ergebnisse	36
4.2.1	Proliferation und Apoptose der CD34+ Zellen durch Lenalidomid.....	36
4.2.2	Der Einfluss von Lenalidomid auf die Differenzierung und Entwicklung des Phänotyps der hämatopoetischen Zellen.....	38
4.3	Schlussfolgerung.....	41
5.	Zusammenfassung	41
6.	Verzeichnis der Abbildungen	44
8.	Abkürzungen	47
9.	Literaturverzeichnis	49
10.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	52

1. Einleitung

1.1 *Hämatopoese*

Schon während der 3. Woche der Embryonalentwicklung bilden sich Zellinseln im Dottersack (Dempke 2006). Ab der sechsten Woche vergrößert sich die Leber bis sie etwa 10% des Gesamtgewichts des Fetus angenommen hat, hier sammeln sich blutbildende Zellen an, sodass die Leber die Blutbildung als Hauptorgan übernehmen kann. Die eigentliche myeloide Hämatopoese fängt erst im 7. Schwangerschaftsmonat an. Ab der 4. Woche nach der Geburt ist das Knochenmark soweit entwickelt, dass es die hepatische Blutbildung ersetzen kann. Die extramedulläre Blutbildung bleibt dem Erwachsenen eine lebenslange Möglichkeit und kann bei bestimmten Erkrankungen, beispielsweise myeloproliferativen Erkrankungen, ihre Funktion zum Teil oder sogar komplett wieder aufnehmen (L. Moore 2007). Beim Neugeborenen wird in fast allen Knochen Blut gebildet. Mit dem Knochenwachstum bildet sich das rote, blutproduzierende Knochenmark zugunsten des gelben Knochenmarks zurück. Beim gesunden Erwachsenen beträgt der Anteil an rotem Knochenmark nur noch 30%, vor allem in den flachen Knochen (C. TH. Smit Sibinga 2005).

Am Anfang der Hämatopoese werden wenige CD34+ pluripotente Stammzellen gebildet. CD34 ist der am häufigsten benutzte Marker für die Isolation von hämatopoetischen Stammzellen. Es handelt sich um einen Antikörper der sich gegen das Zellantigen richtet. Die CD34+ pluripotente Stammzellen können sich in alle Richtungen der Hämatopoese differenzieren, was die wichtigste Grundvoraussetzung für eine gut funktionierende Hämatopoese bedeutet. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Stammzelle ist, dass sie sich selbst erneuern kann („self-Renewal“) (Müller-Newen and Petrides 2014).

Während der Proliferation entstehen die determinierten Stammzellen: die lymphozytopoetische Stammzellen aus denen sich weiter T- und B-Lymphozyten bilden, und die myeloopoetischen Stammzellen aus denen Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Thrombozyten entstehen. Pluripotente und determinierte Stammzellen sind morphologisch nicht unterscheidbar, erst durch Immunphänotypisierung oder Zellkultur lässt sich der Unterschied zeigen (Dempke 2006). Bevor man mit der Immunphänotypisierung

vertraut wurde, die Methode die uns in den heutigen Laboren erlaubt, das Oberflächenantigen CD34 zu bestimmen, 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 (Fauser and Messner 1979).

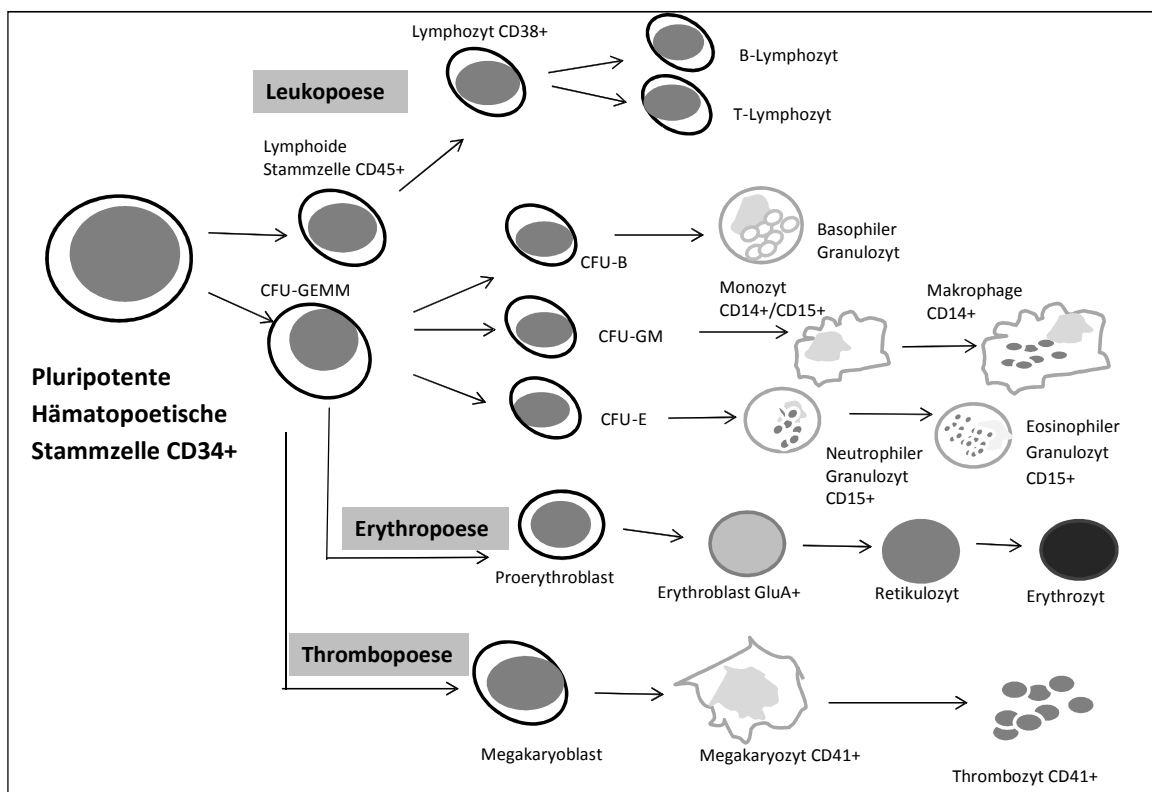


Abbildung 1. Die hämatopoetische Zellreihe und wichtige Zellmarker für diese Arbeit.

1.2 ***Immunmodulatorische Substanzen***

Ab 1957 war das synthetische Glutaminsäurederivat Thalidomid in Deutschland unter dem Handelsnamen Contergan® als Schlaf- und Beruhigungsmittel gebräuchlich. Thalidomid wurde auch bei morgendlicher Übelkeit von Schwangeren eingesetzt, da es im Hinblick auf Nebenwirkungen als besonders sicher galt. Das Mittel wurde schnell sehr erfolgreich da man davon keine Abhängigkeit entwickeln konnte, und selbst unter Einnahme extrem hoher Dosen war es nicht möglich damit einen Suizid zu begehen. Leider musste man bald feststellen, dass es zu schweren konnatalen Fehlbildungen führte (Ordi-Ros and Cosiglio 2013). 1961 wurde die Contergan-Katastrophe aufgedeckt, die ohne Zweifel einer der schwerwiegendsten Arzneimittelskandale der Bundesrepublik Deutschland wurde: die Thalidomid-Embryopathie (Thomann 2007). Dieses tragische Beispiel für die damalige unzulängliche Arzneimittelsicherheit war unter anderem der Anlass für die Verabschiedung des deutschen Arzneimittelgesetzes, das mittlerweile einen weltweit führenden Standard für die Arzneimittelsicherheit in der Bundesrepublik Deutschland garantiert (Kirk 1998).

Als hauptsächliche Nebenwirkungen von Thalidomid zählen zentrale Dämpfung, Obstipation, tiefe Venenthrombosen und periphere Neuropathie (Dimopoulos and Eleutherakis-Papaiakovou 2004). Es wurde versucht Wirkungen von unerwünschten Nebenwirkungen zu trennen, nachdem man wusste dass der Wirkstoff eine chirale Verbindung ist (Chen, Zhou et al. 2016). Da allerdings die Enantiomere bei Thalidomid im Körper racemisieren, konnte man durch das Anreichern eines der beiden Enantiomere das Problem nicht lösen (Eriksson, Bjorkman et al. 2000).

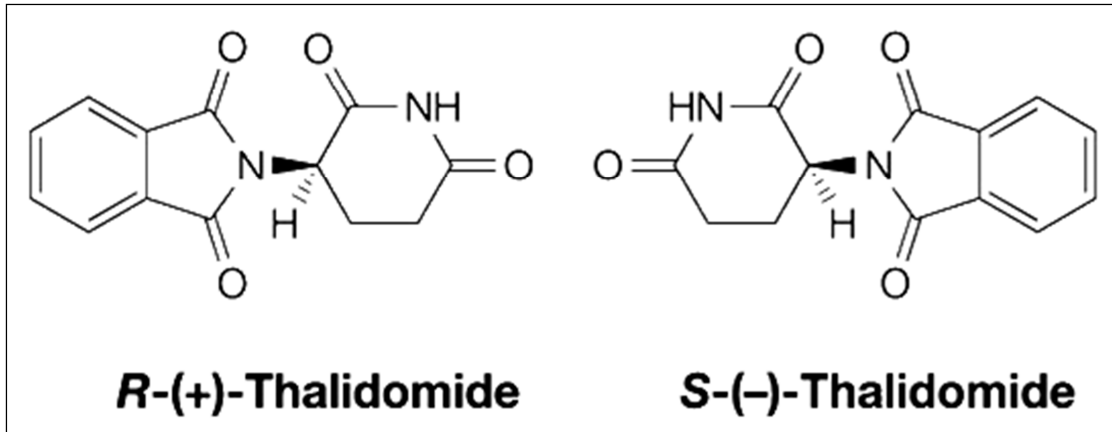


Abbildung 2. Strukturformel von Thalidomid (aus Bartlett, Dredge, and Dalglish 314-22)

Trotz dieser dramatischen Vorgeschichte führte man immer wieder Einzelfallstudien oder Untersuchungen mit kleiner Patientenzahl durch, wodurch man zu der Erkenntnis gelangte, dass Thalidomid auch anti-inflammatorische und immunmodulierende Effekte hat. So wurde es nach einer erfolgreichen Studie unter strengen Auflagen wieder von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (Kirk 1998). In weiteren Untersuchungen stellte man fest, dass der Wirkstoff die Eigenschaft hat, den TNF (Tumornekrosefaktor)- α zu inhibieren und die Angiogenese zu hemmen. Eine weitere Therapiemöglichkeit des multiplen Myeloms wurde aufgegriffen (Knight 2005).

Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Teratogenität und Polyneuropathie führten dazu, dass man nach Derivaten dieser Substanz suchte, die eine ähnliche Wirkungsweise besitzen.

Hier entstand die Substanz Lenalidomid als so genannte Zweitgeneration-IMiDs CC 5013 (Immunomodulatory drugs).

1.3 *Lenalidomid*

1.3.1 Chemische Struktur

Lenalidomid stellt ein N-Phthaloyl-substituiertes Thalidomid-Analogon dar. Es hat eine zusätzliche Aminogruppe am vierten Kohlenstoffatom des Phthaloyl-Rings des Thalidomids und gleichzeitig eine Carbonylgruppe weniger (Shannon, Sandoval et al. 2012).

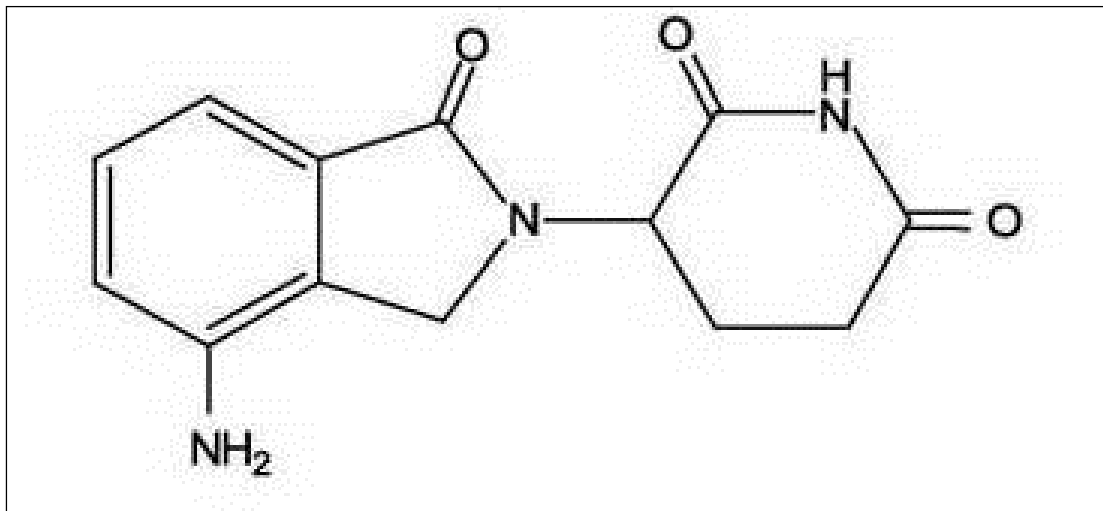


Abbildung 3. Lenalidomid: 3-(4-amino-1oxo1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl) piperidine-2,6-dione (Kotla, Goel et al. 2009)

1.3.2 Biologische Struktur

Wie seine Ausgangssubstanz zeigt Lenalidomid eine direkte Zytotoxizität auf Tumorzellen und eine immunmodulatorische Aktivität. Die Toxizität von Tumorzellen zeigte sich am stärksten auf Zelllinien des Multiplen Myeloms (Davies and Baz 2010). Seine Aktivität konnte schon durch viele verschiedene Wirkmechanismen erklärt werden. Diese ähnelt der von Thalidomid mit dem wichtigen Unterschied, dass bisher keine Teratogenität und Mutagenität im Zusammenhang mit dieser Substanz nachgewiesen werden konnten. Die Teratogenität konnte nach Versuchen mit Hasen nicht festgestellt werden (Christian, Laskin et al. 2007). Außer direkt antiproliferativen Effekten, zeigte man *in vitro* die Inhibition der Angiogenese durch die Hemmung der Sekretion von IL-6 und VEGF (vascular endothelial growth factor), die Stimulation von T-

Zellen-Aktivität und die Hemmung der Synthese von Zytokinen, vor allem des TNF- α in aktivierten Monozyten, hier deutlich stärker als bei Thalidomid (Zangari, Elice et al. 2005). Nach Behandlungen traten wenig sedative und keine neurotoxischen Nebenwirkungen auf (Armoiry, Aulagner et al. 2008). Man beobachtete unter anderem, dass mutierte Zellen von Tumoren, die nicht mehr auf andere Chemotherapeutika ansprachen, durch Lenalidomid in die Apoptose getrieben wurden. Dieser Effekt basiert auf der Induktion von Caspasen, vermutlich durch Hemmung von IL-6 (Gentile, Recchia et al. 2011). In der Interaktion mit Stromazellen bewirkt Lenalidomid, dass Adhäsionsmoleküle, wie z.B. das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1, weniger exprimiert werden und so Myelomzellen nicht an die Stromazellen andocken können (Anderson 2003). Die wichtigsten unerwünschten Nebenwirkungen im Rahmen einer Behandlung, die bisher erkannt wurden, sind: hämatologische Toxizität (Myelosuppression), Neutropenie, venöse Thromboembolien, gastrointestinale Störungen, Dermatotoxizität, Vorhofflimmern, Asthenie, und bei länger andauernder Therapie sinkt die Zahl der peripheren Stammzellen im Blut (Perez Persona, Mesa et al. 2011)

1.3.3 Pharmazeutischer Einsatz

Seit 2003 wurde Lenalidomid von der Food and Drug Administration in den USA als Orphan drug eingestuft. In der EU ist das Medikament für die Therapie des Multiplen Myeloms bei Patienten zugelassen, die vorher mindestens eine andere Therapie erhalten haben.

Seit 2013 hat die Europäische Kommission die Zulassung von Lenalidomid erweitert auf die Behandlung von Patienten mit transfusionsabhängiger Anämie aufgrund eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) mit einer zytogenetischen 5q-Deletionsanomalie, das mit oder ohne zusätzliche zytogenetische Anomalien einhergeht, wenn andere Optionen nicht infrage kommen.

Lenalidomid wird üblicherweise mit Dexamethason kombiniert. Das Medikament wird in 28-tägigen Therapiezyklen eingenommen, jeden Tag etwa zur gleichen

Zeit. Die empfohlene Tagesdosis liegt bei 25 mg an den Tagen 1 bis 21, gefolgt von einer einwöchigen Pause. Zusätzlich nimmt der Patient in den ersten vier Zyklen 40 mg Dexamethason an den Tagen 1 bis 4, 9 bis 12 und 17 bis 20. In den Folgezyklen wird das Steroid nur noch an den ersten vier Tagen gegeben. Bei einem schweren Mangel an Blutplättchen oder Neutrophilen (Thrombozyto- und Neutropenie) sowie Nephrotoxizität wird die Tagesdosis reduziert.

Häufige Off-Label-Use Bereiche sind in der Therapie der akuten und chronischen lymphatischen Leukämie bekannt (Gentile, Recchia et al. 2011). Außerdem bei rezidierenden-Hodgkin-Lymphomen, oder bei den selteneren T-Zell-Lymphomen, sowie seltener bei Prostata-Karzinomen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, malignen Melanomen, Nierenkarzinomen, fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen und Peritonealkarzinose griff man öfters im klinischen Einsatz nach Lenalidomid (Galustian and Dalgleish 2009).

1.4 **Ziel dieser Arbeit**

Die Wirkung von Lenalidomid auf Tumorzellen wurde schon vielfach untersucht. Neben der immunmodulatorischen Aktivität wurden während Behandlungen mit Lenalidomid andere Effekte wie Hämatotoxizität und Hemmung der Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen beobachtet. Die direkt hemmenden oder stimulierenden Effekte von Lenalidomid auf hämatopoetischen und Progenitor Zellen (HPC) sind bis jetzt wenig untersucht, ebenso die indirekte Modulierung des hämatopoetischen Mikro-Environments die zu den Nebeneffekten beiträgt (Richardson, Mitsiades et al. 2010).

Insgesamt bleibt der genaue Wirkmechanismus von Lenalidomid sowie der anderen immunmodulatorischen Substanzen noch unbekannt. Diese Substanzen werden geschätzt für ihre Fähigkeit die Zahl der Monozyten, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen zu beeinflussen (Kronke, Udeshi et al. 2014). Die Suppression von Immunglobulinen könnte eine Erklärung sein für die Effektivität in der Therapie des Multiplen Myeloms (Shannon, Sandoval et al. 2012). Patienten mit chronisch kongenitaler hypoplastischer Anämie und mit Myelodysplastischem Syndrom brauchen deutlich weniger Transfusion nachdem sie mit Kortikosteroiden und Lenalidomid behandelt wurden. In der Tat, die Kombination fördert bei den Patienten die Erythropoese (Narla, Dutt et al. 2011).

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es, die direkt hemmenden und stimulierenden Effekte von Lenalidomid auf CD34+ hämatopoetische Progenitorzellen in vitro näher zu betrachten.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 Zytokine

Eingesetzt wurden ausschließlich rekombinante humane Moleküle.

FLT3-Ligand (FLT3-L)	PeptoTech
G-CSF (Neupogen®)	Amgen
Interleukin 3 (IL-3)	PeptoTech
Interleukin 6 (IL-6)	PeptoTech
Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i> , SCF)	PeptoTech

2.1.2 Funktionell blockierende Antikörper

Alle genannten Antikörper sind gegen humane Epitope gerichtet.

Antigen	Konjugat	Spezifität	Isotyp	Hersteller
Igg1	FITC	Isotyp-Kontrolle	Igg1	BD
Igg1	PE	Isotyp-Kontrolle	Igg1	BD
Igg2b	PE	Isotyp-Kontrolle	Igg2b	BD
CD34	PE	Progenitorzellen	Igg1	BD
CD38	FITC	Aktivierungs- marker	Igg1	Beckman Coulter
CD45	FITC	Leukozyten	Igg1	BD
CD14	PE	Monozyten	Igg1	BD
CD15	FITC	Myeloische Zellen	Igg1	BD
CD41a	FITC	Megakaryozyten	Igg1	BD
Glykph. A	PE	Erythrozyten	Igg2b	BD

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Seren

FACS-Flow	Becton Dickinson
Ficoll (<i>Biocoll Separating Solution</i> , 1,077 g/ml)	Biochrom
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Gentamicin (500x; 20 ml = 1g)	Roche
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x konz.)	Invitrogen
PBS Dulbecco's ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Invitrogen
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %/ 1 mm)	Invitrogen

2.1.4 Kits

CD34+ Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec
Annexin-PI Apoptose Kit	BD Pharmingen

2.2 **Lösungen**

2.2.1 **Medien für die Zellkultur**

RPMI-Grundmedium	RPMI 1640 mit nahco ₃ (0,195 %), Glutamax-I, 25 mm HEPES (Invitrogen) 10 % (v/v) FCS 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 Grundmedium 1 % (v/v) MEM n/e Aminosäuren 1 % (v/v) MEM Na-Pyruvat
CFU-Kulturmedium	Methocult GF H4434 3ml (stemcell Technologies) 20 ng/ml SCF 20 ng/ml IL-3 20 ng/ml IL-6 100 ng/ml G-CSF 6 U/ml EPO
Einfriermedium	45 % (v/v) PBS Dulbecco's 40 % (v/v) HSA (20 %) 15 % (v/v) DMSO 20 I.U./ml Heparin
Serumfreie Kulturmedien	X-VIVO20 (Cambrex)

2.2.2 **Sonstige Lösungen**

FACS-Fixierlösung	99 % (v/v) PBS Dulbecco's 1 % (w/v) Paraformaldehyd
FACS-Puffer	99,98 % PBS Dulbecco's 0,1 % (w/v) BSA

	0,1 % (w/v) Natrium-Azid
MACS-Puffer	94,4 % (v/v) PBS Dulbecco's
	5 % (v/v) BSA (100 mg/ml in IMDM)
	0,6 % (v/v) ACD

2.3 **Gebrauchswaren**

Einfrierröhrchen 1,0 ml, 1,8 ml	Greiner, Nunc
Einmalspritzen, steril, 1 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun
Gewebekulturplatten, 24-well, flacher Boden	Nunc, Greiner
Kanülen:	
- 25GA1 (0,5x25), 25GA5/8 (0,5x16)	BD
- 23Gx11/4" (0,6x30), 20Gx23/4" (0,9x70)	B. Braun
Magnetseparationssäulen:	
- LS+, Large Cell	Miltenyi Biotec
Petrischalen 35/10 mm, 94/16 mm	Greiner
Pipetten, steril, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	BD Falcon
Pipettenspitzen	Greiner
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße für die PCR	Applied Biosystems
Skalpelle, einmal, steril (Feather 21)	pfm AG
Sterilfilter 0,22 µM, Millex	Millipore
Zellsiebe:	
- 30 µM, pre-separation filter	Miltenyi Biotec
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner

2.4 **Geräte**

Begasungsbrutschränke	Heraeus
Durchflusszytometer (facscalibur)	Becton Dickinson
Einfrierbehälter (Cryo 1°C Freezing Container)	Nunc
Magnet-Separationssysteme:	
- Midi-MACS	Miltenyi Biotec

Mikroskope:

- Umkehrmikroskop (IX-51)	Olympus
- Fluoreszenzmikroskope	Zeiss, Olympus
Photometer (genequant II DNA/RNA Calculator)	Pharmacia
Pipettierhilfen (pipetboy acu)	Integra Biosciences
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Spannungsgeräte	Consort
Sterilbänke	Heraeus
Strahlungsquelle 137Cs (Gammacell® 1000 Elite)	MDS Nordion
Thermocycler (geneamp PCR System 2400)	Perkin Elmer
Vortex (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
Wasserbad	B.Braun
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus

2.5 **Zellen**

Aus Leukopheresat von Patienten und gesunden Spendern der Universitätsklinik Tübingen wurden CD34+ Zellen gewonnen, die dann kryokonserviert wurden. Alle Proben wurden anonymisiert.

2.6 **Methoden**

2.6.1 **Isolierung von CD34+ Zellen aus Leukopheresat**

Die Anreicherung von CD34+ hämatopoetischen Progenitorzellen aus der Fraktion der mononukleären Zellen erfolgte mit Hilfe des MACS-Systems (Magnetic Activated Cell Sorting) und des ‚CD34 Progenitor Cell Isolation Kit‘ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) nach den Angaben des Herstellers. Die Methode beruht auf der indirekten magnetischen Markierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen durch einen Hapten-konjugierten, monoklonalen Primärantikörper gegen das Oberflächenantigen CD34 und einen anti-Hapten Antikörper, der an 50 nm große Eisenpartikel gekoppelt ist. Die MACS-Separation der auf diese Weise markierten CD34+-Zellen erfolgte durch Positivselektion über Separationssäulen (LS+), die in einem magnetischen Feld (MidiMACS) positioniert waren. Nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld wurden die CD34+-Zellen mit 9 ml MACS-Puffer eluiert und über eine zweite Säule erneut positiv-selektioniert, wodurch Reinheiten der isolierten CD34+ Fraktionen von 95-99 % erreicht wurden.

2.6.2 **Reinheitsbestimmung**

Nach der Isolierung wurde die Reinheit der Zellen durchflusszytometrisch überprüft. Die FACS-Messung erfolgte nach einer Zweifachmarkierung mit anti-CD45-FITC, bzw. Anti-CD38-Fitc und anti-CD34-PE mAK. Für die Negativkontrolle dienten unspezifische mAk desselben Isotyps. Für die Kompensationseinstellungen wurde jeweils Einzelfärbung eingesetzt. Ausschließlich die Zellen, deren Anteil an CD34+ größer als 95% war, wurden für die Versuche verwendet.

2.6.3 **Einfrieren und Konservieren von CD34+-Zellen**

Zum Einfrieren wurden die pelletierten Zellen (max. 5×10^6) in 900 μ l PBS resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und mit Einfriermedium 1:2 auf ein Gesamtvolumen von 1,8 ml verdünnt. Die Kryoröhrchen wurden unmittelbar danach in eine mit Isopropanol befüllte Einfrierbox überführt (diese bewirkt eine

konstante Abkühlrate von 1°C/Minute) und bei –80°C eingefroren. Zur längerfristigen Lagerung wurden die so gefrorenen Zellen nach frühestens 24 Stunden in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad inkubiert, bis fast die gesamte Zellsuspension aufgetaut war. Die Zellen wurden dann in 10 ml kaltem Medium gewaschen, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen und in der gewünschten Dichte in frischem Medium aufgenommen.

2.6.4 Apoptosenachweis durch Färbung mit Annexin und Propioniodid

Für den Versuch haben wir das Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen verwendet. HPC-Zellen wurden unmittelbar vor der Versetzung mit Lenalidomid aufgetaut. Als Medium wurde X-VIVO20 mit SCF, IL6 und FLT3 verwendet (siehe Medium für 7-Tage Proliferation). Die Induktion von Apoptose durch Lenalidomid auf die CD34+-Zellen wurde nach einer Zeit von 24 Stunden gemessen. Lenalidomid wurde auf die Zelllösung in einer ansteigenden Konzentration von 0,01 bis 100 µM zugegeben. Als Medium wurde RPMI 1640 von der Firma GIBCO + 10% FCS, Na-Pyr., L-Glu und PS verwendet. Der Versuch wurde auch mit Serum-freiem Medium durchgeführt.

Pro Well wurden 2×10^5 Zellen als Anfangskonzentration genommen.

In der flusszytometrischen Messung bezeichneten wir Zellen, die Annexin- und Propioniodid-negativ waren, als „lebend“, die Zellen, die Annexin-positiv und Propioniodid-negativ waren, als „früh-apoptotisch“ und die Zellen, die Annexin- und Propioniodid-positiv waren, als „spät-apoptotisch“ oder „tot“.

2.6.5 Zellproliferation über 7 Tage

Um den Effekt von Lenalidomid auf die Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen festzustellen wurden frisch aufgetaute CD34+-Zellen in einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Pro Well wurden 1×10^5 Zellen in 1 ml Medium eingesetzt. Das Grundmedium der Versuchsreihe bestand aus X-VIVO20, angereichert mit 3 Wachstumsfaktoren SCF (50ng/ml), IL-6 (10ng/ml) und FLT3-L (50 ng/ml) oder 5 Wachstumsfaktoren (zu den genannten drei noch G-CSF (50ng/ml) und IL-3 (10ng/ml)). Lenalidomid wurde in jedes Well in einer

Verdünnungsreihe von 0,001 bis 100 μMol in X-VIVO20 verdünnt dazugegeben. Die Kontrollreihen erhielten 100 μl X-VIVO20 ohne Lenalidomid dazu. Die Inkubationszeit war 7 Tage bei 37°C und 5 % CO_2 .

2.6.6 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Grundlage einer durchflusszytometrischen Messung (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine mit Antikörpern markierte Zellsuspension, die im Gänsemarsch einen fokussierten Laserstrahl passiert. Anhand ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften können die Zellen einzeln analysiert werden.

Ein FACS-Röhrchen wird unter einer Stahlkapillare befestigt und das Medium durch Überdruck in die Messküvette gedrückt. Eine Eigenschaft einer Zelle, die in der Durchflusszytometrie gemessen wird, ist das Streulicht. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Somit erhält man durch Messung des Streulichts auf einfache Weise wichtige Informationen über die Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (Sideward-Scatter) hängt neben der Größe auch sehr stark vom Inhalt einer Zelle ab. Hat die Zelle eine starke Granularität, dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht, hat sie eine geringe Granularität, dann ist ihr Seitwärtsstreulicht entsprechend geringer. Das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter) dagegen hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab.

Durch Markieren der Zellen mit Fluochrom-gekoppelten spezifischen Antikörpern können die Oberflächenantigene der Zellen dargestellt und so charakterisiert werden.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mithilfe der CellQuestPro Software ausgewertet und dargestellt.

2.6.7 Auszählung mit Beads

Die Quantifizierung Mittels Beads zeigte uns in Voruntersuchungen verlässlichere Ergebnisse als ein reines Auszählen der Zellen unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer. Die Zelllösung aus jedem Well wurde nach Reverse Pipeting zu den Kalibrierungsbeads zugefügt, dann

erfolgte die Auswertung der Ansätze am Durchflusszytometer (Abb.4). Die FITC-Beads wurden als R1 gated und die Datenaufnahme für jeden Ansatz nach insgesamt 1000 aufgenommenen Beads beendet. Die Anzahl der CD34+-Zellen/Well errechnete sich folglich aus dem Quotienten an Zellen/FITC (R2)-Beads (R1) multipliziert mit der Gesamtzahl an eingesetzten Beads.

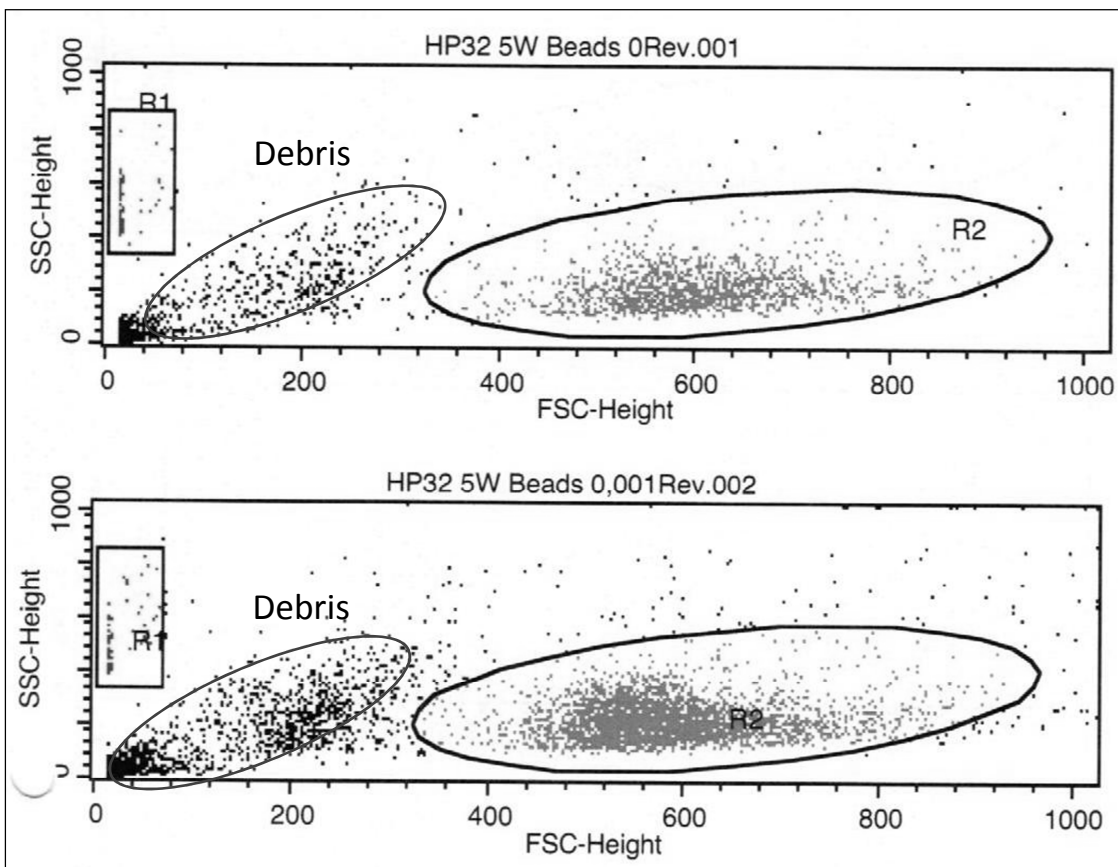


Abbildung 4. In der FACS-Messung wurden im SSC (Sideward- Scatter) gegen FSC (Forward-Scatter) Proben von Zellen (R2) gegen Beads (R1) nach 7 Tagen Expansion von CD34+-Zellen mit 5 Zytokinen gemessen. Hier sehen wir die Kontrolle ohne Lenalidomid und die Probe inkubiert mit einer Konzentration von 0,001 μ M Lenalidomid.

2.6.8 CFU, Colony Forming Units

Für den Versuch wurden frisch aufgetaute CD34+-Zellen beobachtet, sowie solche, die schon eine Woche mit Lenalidomid und entweder drei (SCF, IL6, FLT3) oder fünf Wachstumsfaktoren (SCF, IL3, IL6, FLT3 und G-CSF) inkubiert wurden.

Insgesamt ging dieser Versuch über 14 Tage. Es wurde als Anfangskonzentration $1,5 \times 10^3$ Zellen in 900 μ l Methocult GF H4434 + 100 μ l X-

VIVO20/FCS in kleinen Kulturschalen (35mm) genommen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Auswertung wurde nach den 14 Tagen mit Hilfe eines Zählgitters unter dem Mikroskop ausgeführt. Die visuelle Unterscheidung zwischen weißen (CFU-GM, CFU-E), roten (BFU-E), und gemischten (CFU-MIX) Kolonien wurde erhoben. Kleinere Zellansammlungen unter 50 Zellen wurden als „Cluster“ bezeichnet.

2.6.9 **Auswertung**

Alle statistischen Auswertungen, wie die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung (Standard Error of the Mean = SEM) und die Ermittlung der Signifikanz erfolgten mit Microsoft Excel.

Alle Ergebnisse sind relativiert und der Mittelwert \pm Standardabweichung (SEM) basierend auf mindestens drei Experimenten angegeben. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der gepaarte t-Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 *Durch Lenalidomid induzierte Apoptose*

Nach 24 Stunden Inkubation mit 3 Wachstumsfaktoren bewirkte eine Lenalidomid-Dosis zwischen 0,01 und 0,1 μM einen signifikanten prozentualen Anstieg der frühen apoptotischen Zellen (Annexin+/PI-) und der gemischten früh- und spät-apoptotischen Zellen (Annexin+). Bei hohen Konzentrationen (ab 10 μM) wird kein Effekt beobachtet (Abb.5).

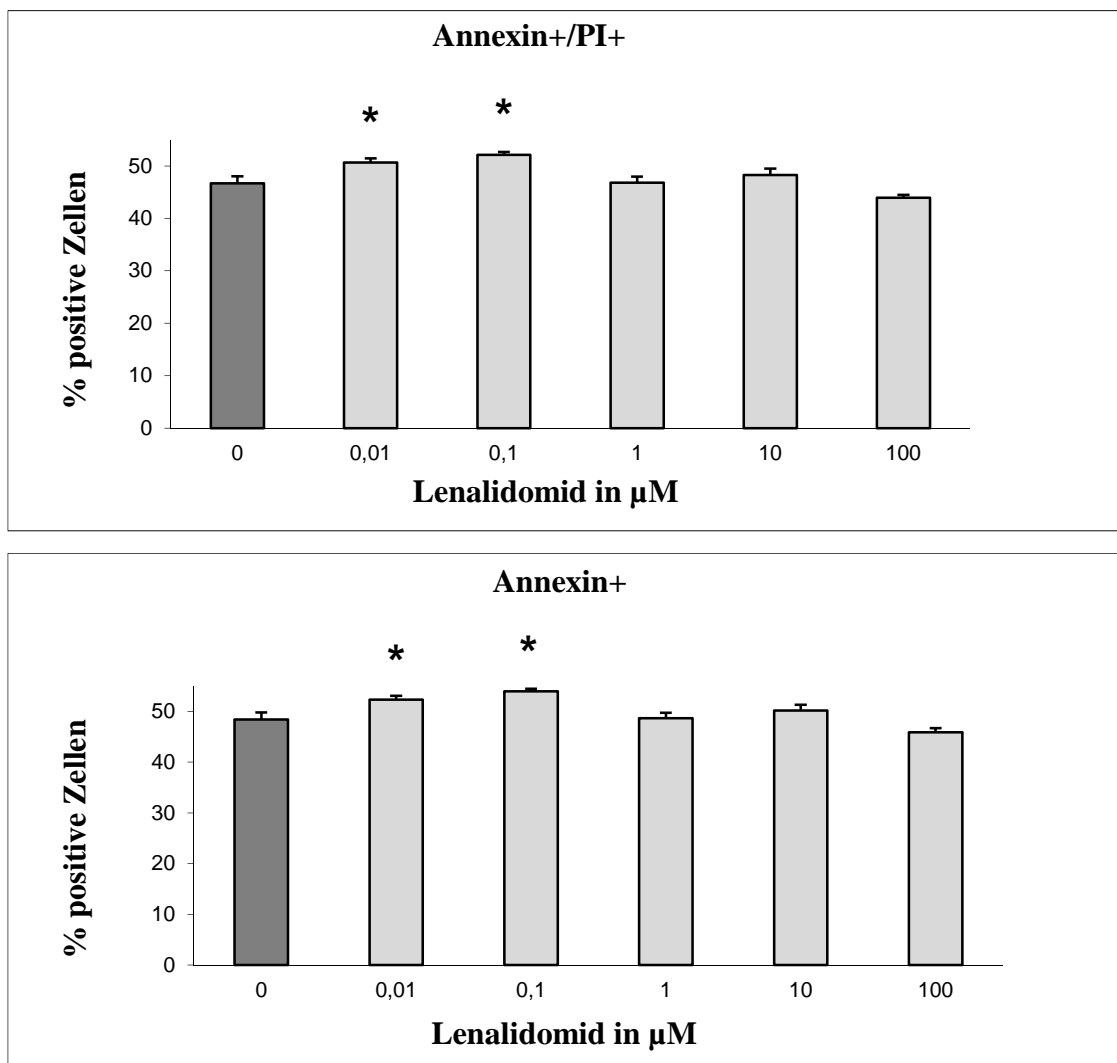


Abbildung 5. Apoptose durch Lenalidomid auf CD34+-Zellen nach 24h Inkubation im 3W-Medium (SCF, IL-6, FLT-3). *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Versuchen angegeben.

3.2 ***Der Effekt von Lenalidomid auf die Proliferation der CD34+- Zellen***

Um den Effekt von Lenalidomid auf die Proliferation der CD34+-Zellen zu beobachten, haben wir anhand von Expansionskulturen in zwei verschiedenen Medien CD34+-Zellen in einer aufsteigenden Reihe von 0,001 bis 100 μM Lenalidomid für 7 Tage inkubieren lassen. Die Zellen wurden mittels FACS-Messung gegen Beads ausgezählt.

Die Gesamtzellzahl der Expansionskulturen mit 3 Wachstumsfaktoren supplementiert (3W: SCF, IL-6, FLT-3) ist im Lenalidomid-Dosisbereich zwischen 0,01 und 10 μM erhöht, die maximale Wirkung der Proliferation sehen wir im Bereich zwischen 0,01 und 1 μM (Abb.6). Auch im Versuch der Expansionskulturen mit fünf Wachstumsfaktoren supplementiert (5W: SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) ist die Gesamtzellzahl im niedrigen bis mittleren Lenalidomid-Dosisbereich (0,001 bis 1 μM) signifikant erhöht, mit einem maximalen Effekt bei 0,1 μM . Im höheren Dosisbereich ändert sich die Gesamtzellzahl nicht (10 μM) oder nimmt sogar ab (100 μM) (Abb.7).



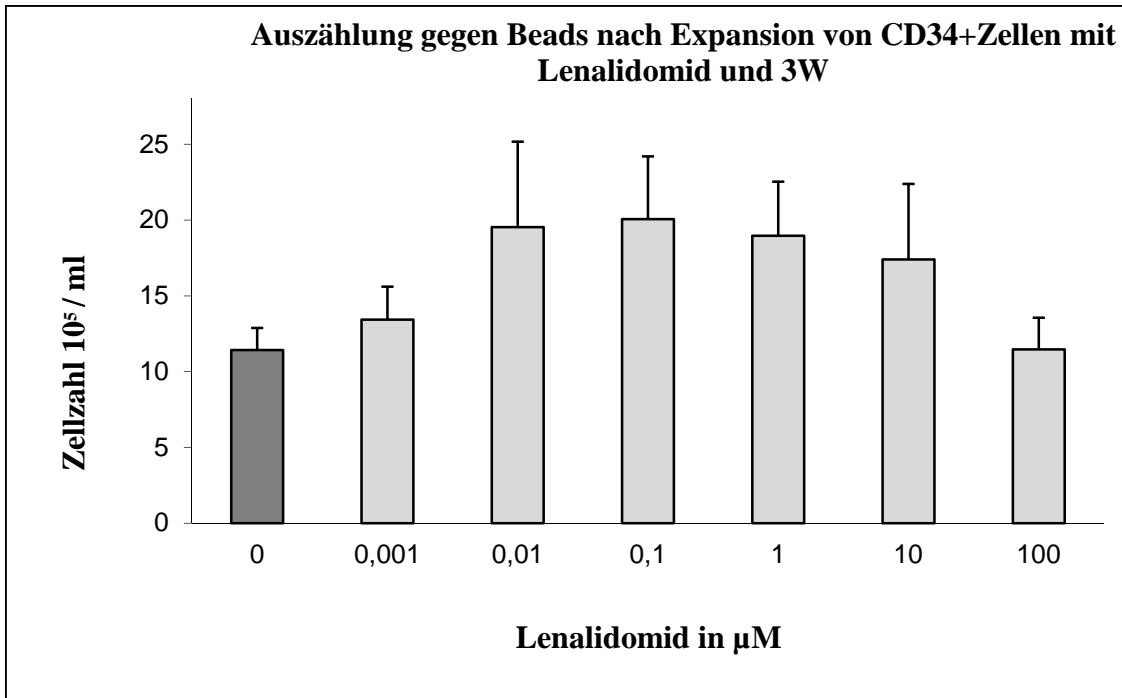


Abbildung 6 Zellzahl 10^5 HP im 3W-Medium mit Lenalidomid. Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im 3W-Medium (SCF, IL-6, FLT-3) mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend gegen Beads ausgezählt. vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen angegeben.

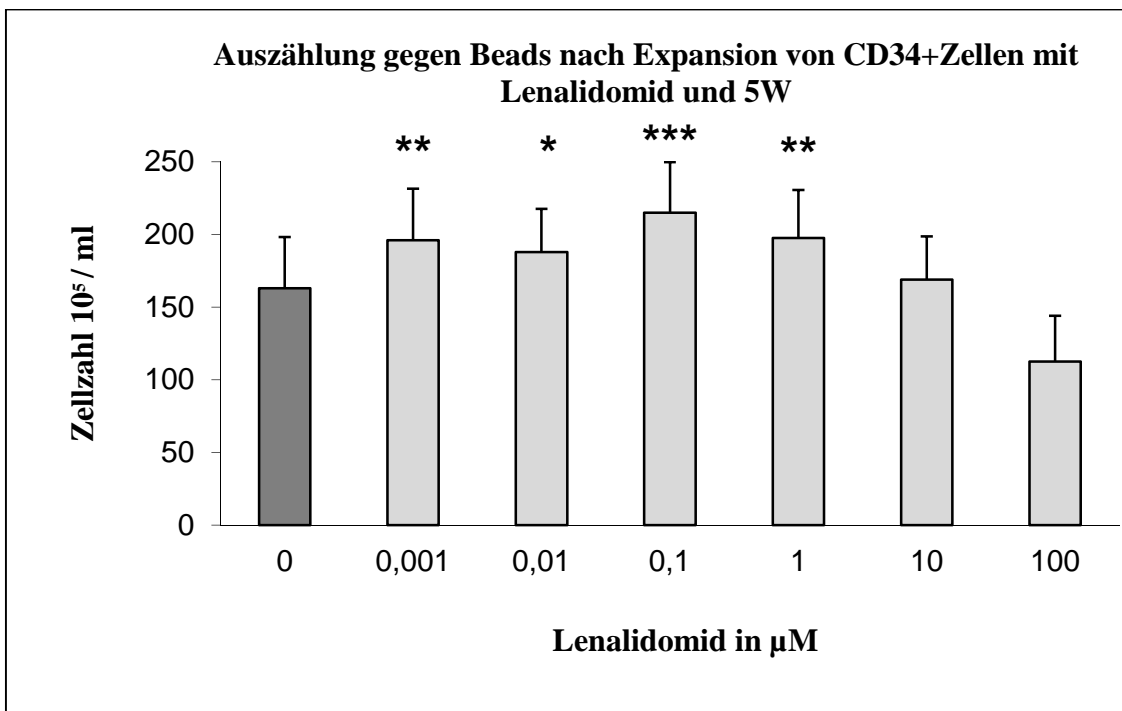


Abbildung 7. Zellzahl 10^5 HP im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid. Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend gegen Beads ausgezählt. *, p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=9 Versuchen angegeben.

Die Proliferation der hämatopoetischen Zellen wird je nach Lenalidomidkonzentration beeinflusst. Niedrige Konzentrationen (0,001 bis 0,1 μMol) bewirken einen Anstieg der Zellzahl, während ab 1 μMol und mehr, die Proliferation inhibiert wird. Unsere Ergebnisse sind jedoch nur bei den Versuchen mit fünf Zytokinen signifikant (***, $p < 0,0001$ vs. Kontrolle).

3.3 *Der Einfluss von Lenalidomid auf die Entwicklung des Phänotyps der hämatopoetischen Progenitorzellen im Expansionsversuch*

Im Proliferationsversuch mit 3 Wachstumsfaktoren beobachten wir eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl der an CD34+-Vorläuferzellen, mit einer signifikanten Reduktion bei 100 μM Lenalidomid (Abb.8). Bezogen auf die Expansion der Gesamtzellzahl ergibt sich auch eine Abnahme der CD34+-Zellen bei hohen Lenalidomidkonzentrationen, die jedoch insgesamt nicht statistisch signifikant ist. Die Zahl der CD34+/CD38+-Zellen die weiter differenziert sind, sinkt ab 1 μM Lenalidomid kontinuierlich ab, wobei signifikante Werte bei 10 und 100 μM erreicht werden (Abb.9).

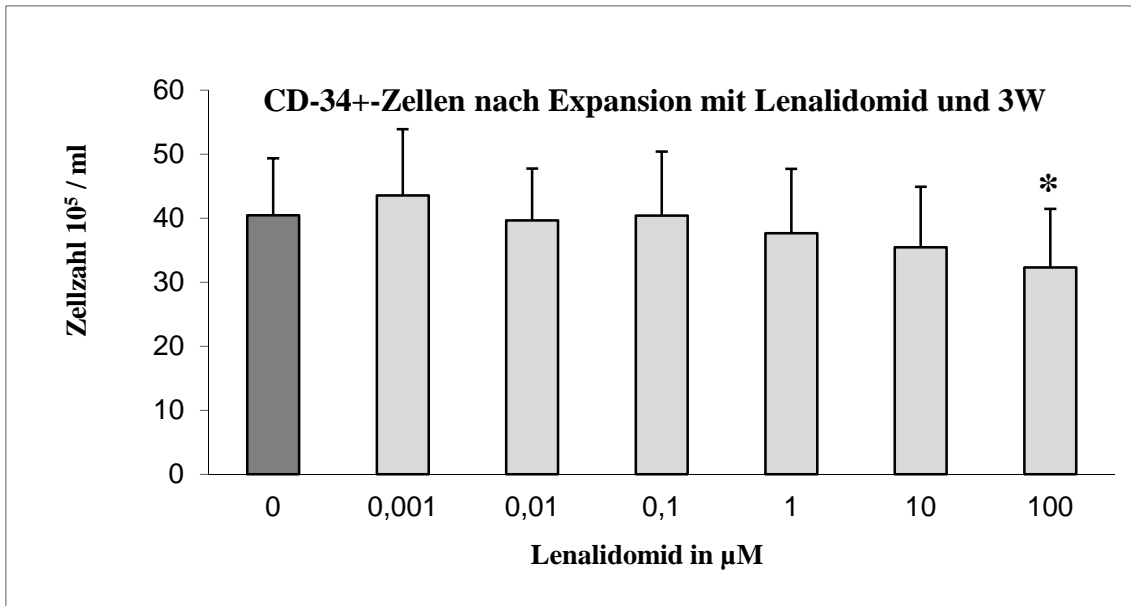


Abbildung 8 Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, IL-6, FLT-3) mit Lenalidomid, CD34+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid und für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Versuchen angegeben

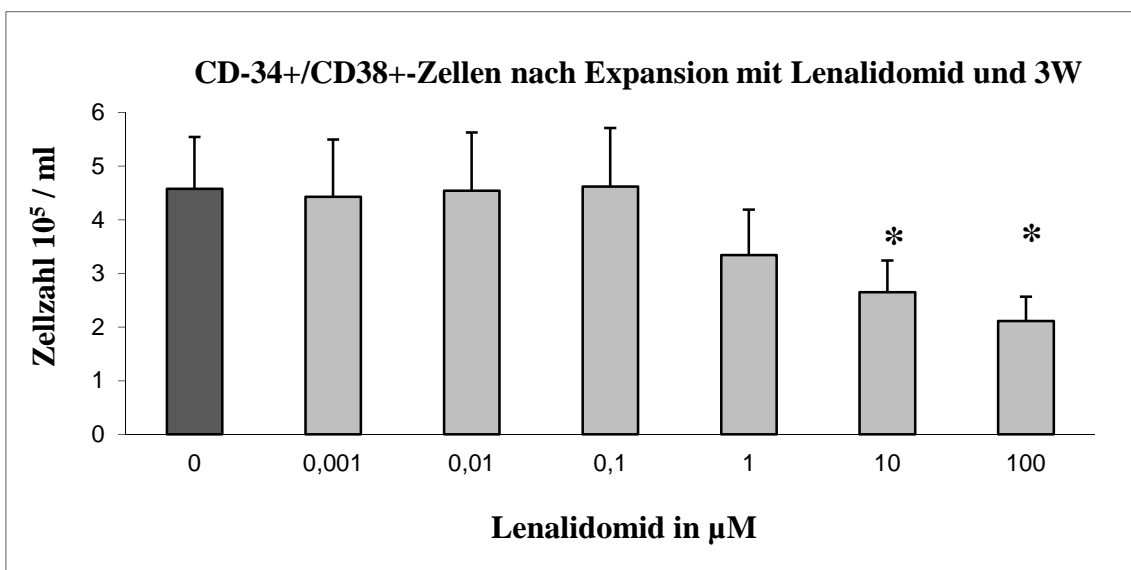


Abbildung 9. Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, IL-6, FLT-3) mit Lenalidomid, CD34+/CD38+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid und für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Versuchen angegeben.

In 5W-Expansionskulturen erhöht sich der Anteil an CD34+-Zellen bei Lenalidomidkonzentrationen zwischen 0,001 und 0,1µM, während er bei einer Konzentration von 100µM signifikant reduziert ist (Abb.10). Ähnliche Effekte sehen wir bei CD34+/CD38+-Zellen: Zunächst zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Zellzahl bei 0,1µM Lenalidomid, der sich ab 1µM reduziert (Abb.11).

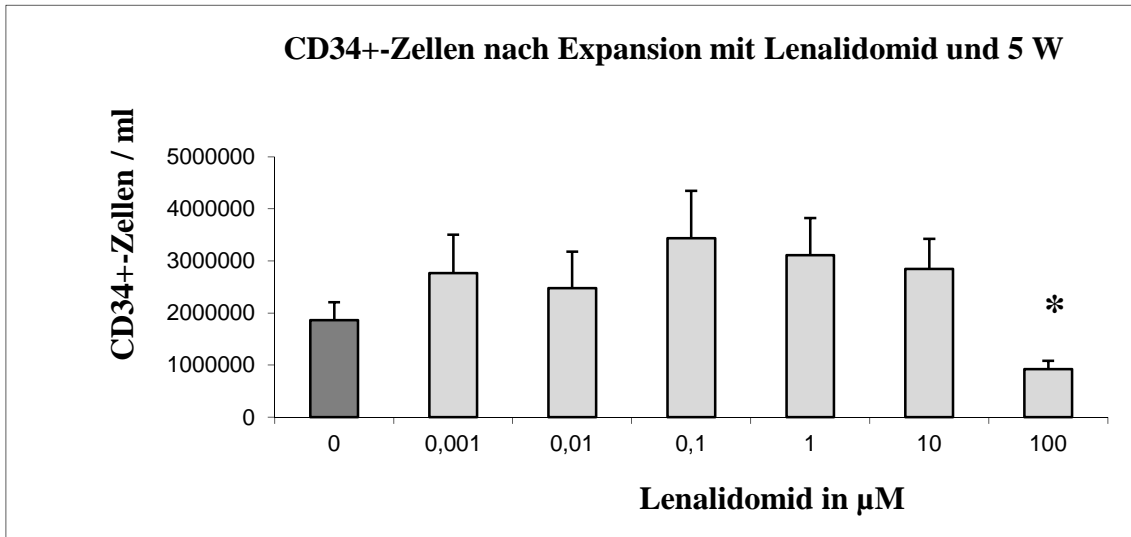


Abbildung 10. Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid CD34+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$ Versuchen angegeben.

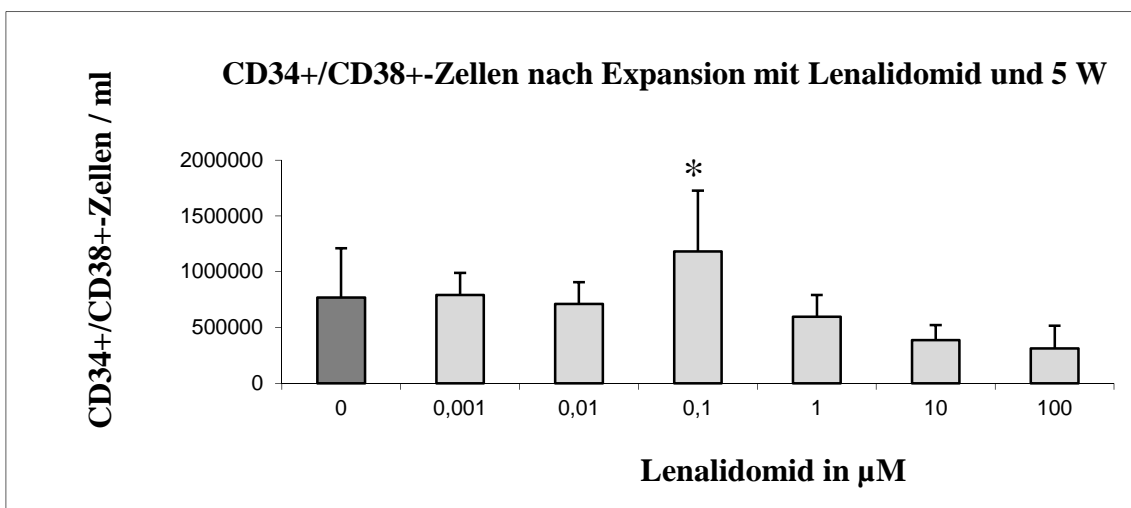


Abbildung 11 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid CD34+/CD38+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$ Versuchen angegeben.

In reziproker Weise sieht man signifikant erhöhte CD45+-Zellzahlen bei Lenalidomidkonzentrationen zwischen 0,001 und 1µM und eine reduzierte Zellzahl bei 100µM (Abb.12).

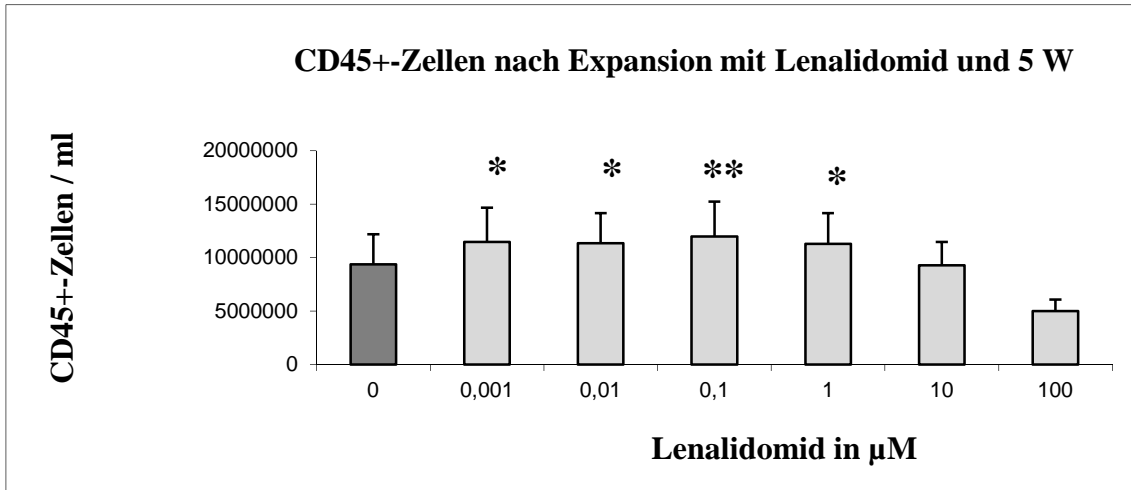


Abbildung 12 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid CD45+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$ vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$ Versuchen angegeben.

Die Proliferation von weiterentwickelten Zellen wurde auch analysiert, hier betrachten wir zunächst einmal die Ergebnisse der Expansionskultur mit 3 Wachstumsfaktoren:

Die Zellzahl von CD14+ monozytären Zellen nimmt bei einer Lenalidomidkonzentration ab 1µM kontinuierlich leicht ab. Dagegen nimmt der Anteil der CD15+ granulozytären Zellen ab einer Konzentration von 0,1µM Lenalidomid kontinuierlich zu (Abb.13).

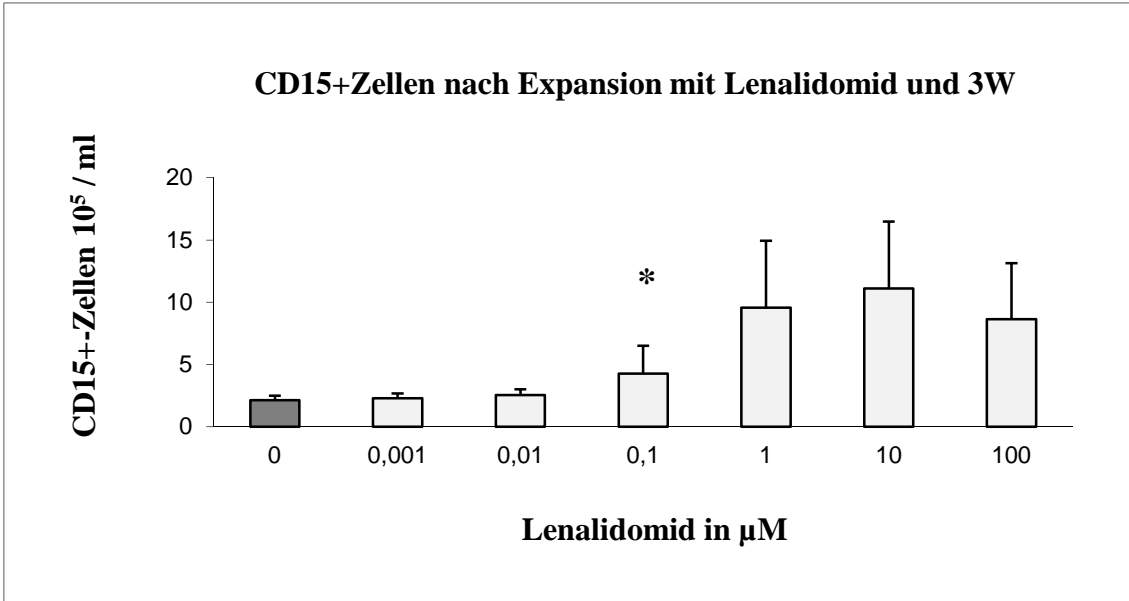


Abbildung 13 Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, FLT-3, IL-6) mit Lenalidomid, CD15+Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$, vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Versuchen angegeben.

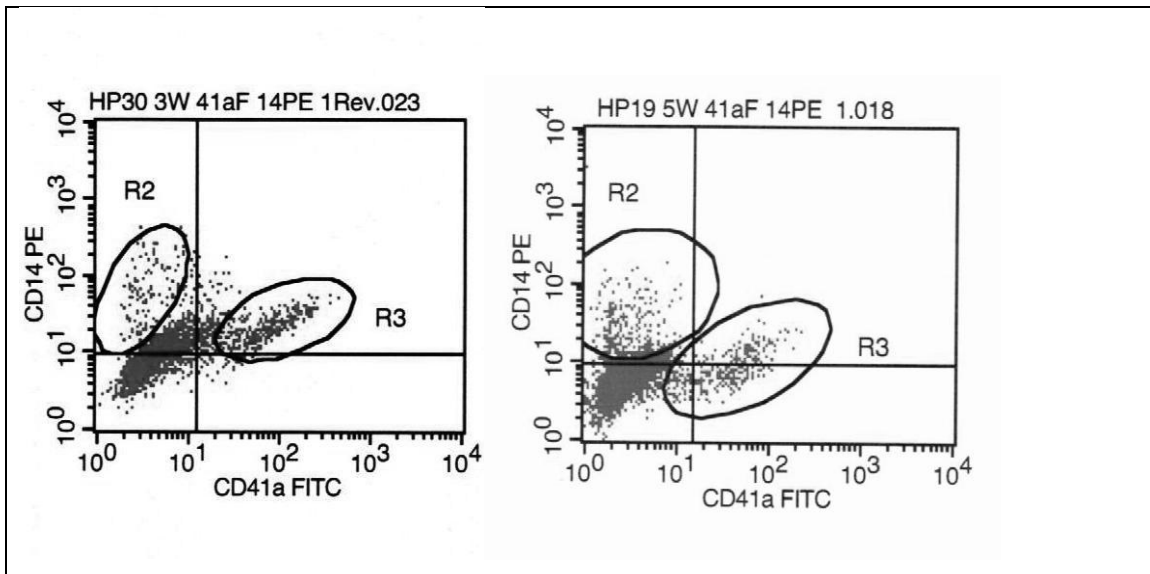


Abbildung 14 FACS-Messung nach 7 Tagen Inkubation von CD34+-Zellen mit $1\mu\text{M}$ Lenalidomid und drei oder fünf Wachstumsfaktoren. Hier die phänotypische Abbildung von CD14+- und CD41+-Zellen.

Der Anteil an CD41+ megakaryozytären Zellen ist zwischen 0,1 und 10 μM Lenalidomid leicht erhöht (Abb.15), ebenso die GlyA+ erythroiden Zellen bei einer Lenalidomidkonzentration von 0,1 μM .

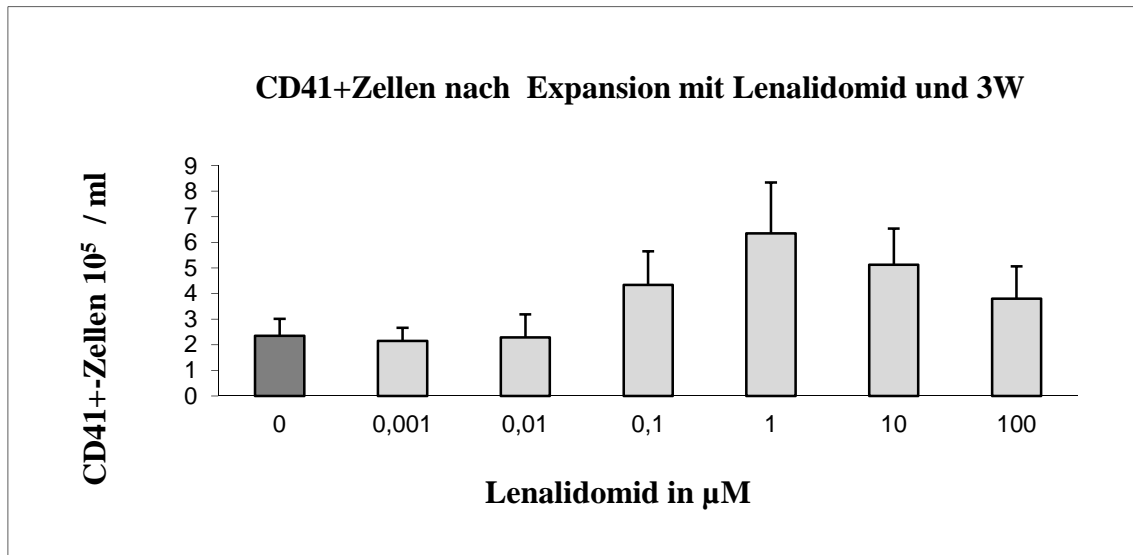


Abbildung 15 Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, FLT-3, IL-6) mit Lenalidomid, CD41+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$, vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Versuchen angegeben.

Die Ergebnisse des gleichen Versuchs mit 5 Wachstumsfaktoren entsprechen den 3W-Kulturen. Die monozytären CD14+-Zellen sind bei einer Lenalidomidkonzentration von 100 μM signifikant reduziert (Abb.16). Wie davor schon beobachtet ist im Gegenteil der Anteil von CD15+-Zellen bei 0,1 μM bis 100 μM Lenalidomid kontinuierlich signifikant erhöht und führt zu einer signifikanten Zellzahlsteigerung bei Lenalidomidkonzentrationen von 0,001 bis 1 μM und einer Verminderung der Anzahl von CD15+-Zellen bei 100 μM (Abb.17). Der Anteil an CD41+ megakaryozytären Zellen steigt bei einer Lenalidomidkonzentration zwischen 0,1 und 10 μM signifikant an (Abb.18), während die GlyA+ Population einen Abfall zeigt (Abb.19).

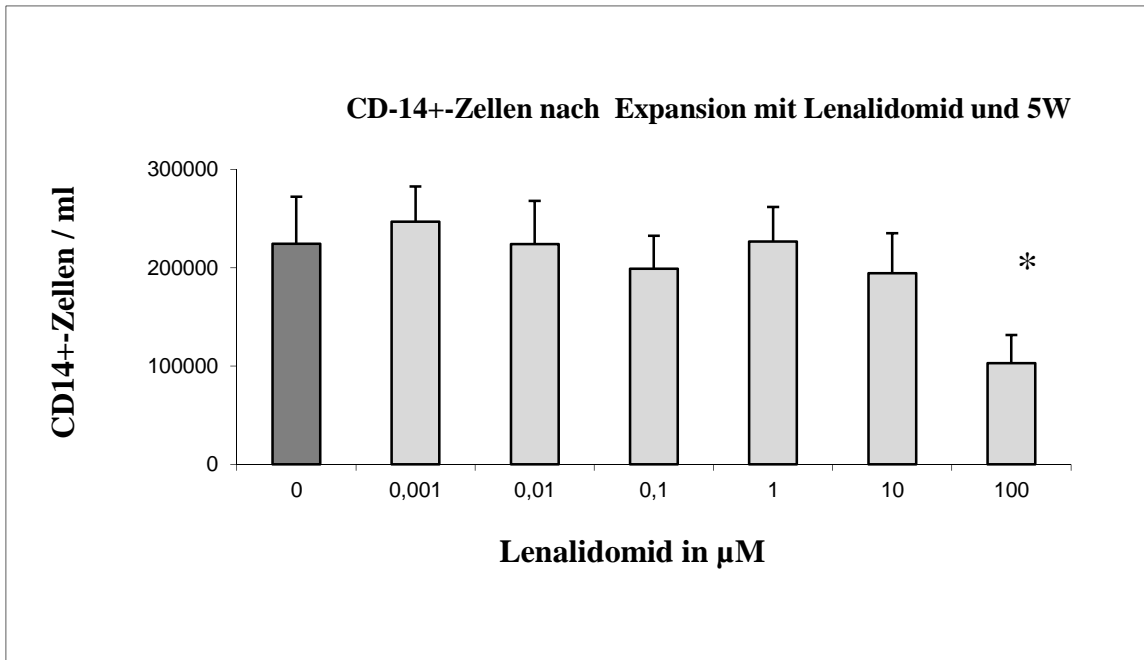


Abbildung 16 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid, CD14+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$, vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen angegeben.

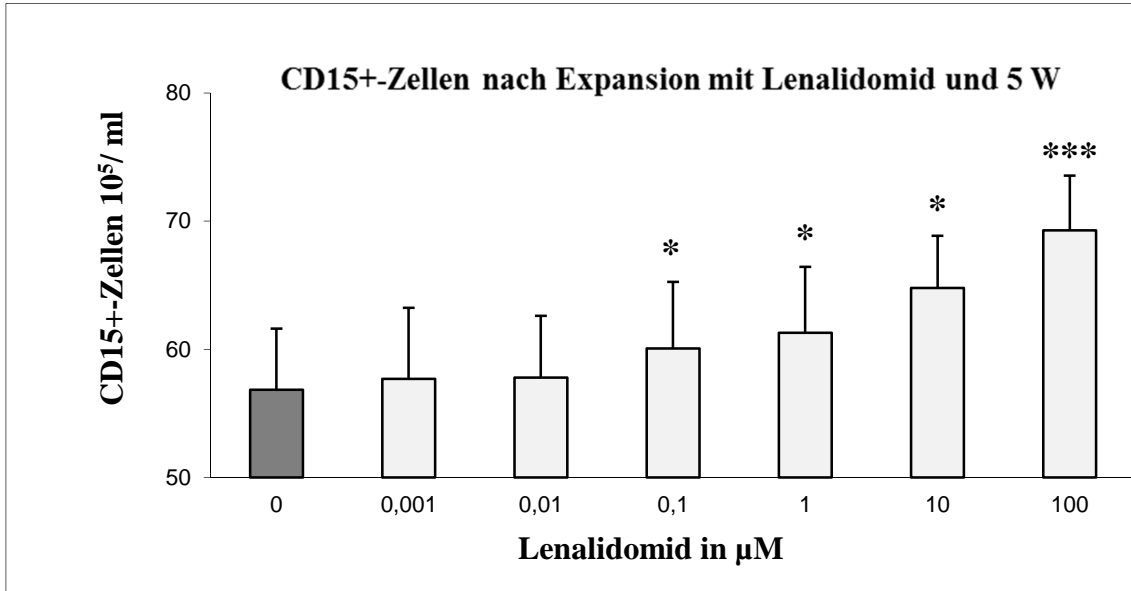


Abbildung 17. Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid, CD15+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Versuchen angegeben.

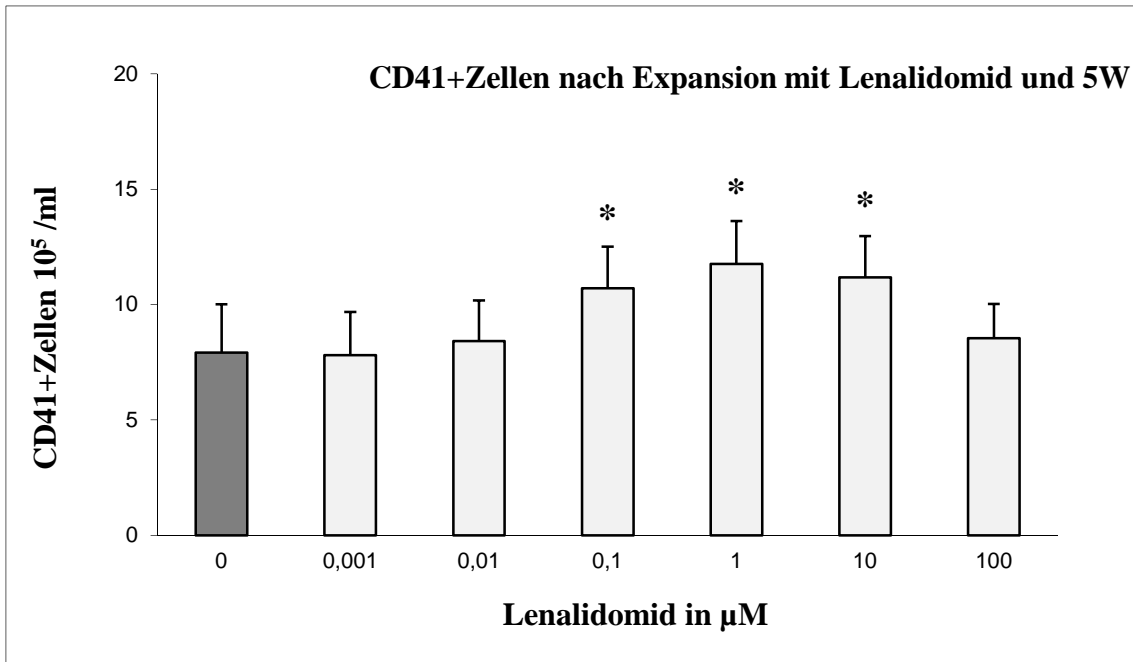


Abbildung 18. Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid, CD41+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$ Versuchen angegeben.

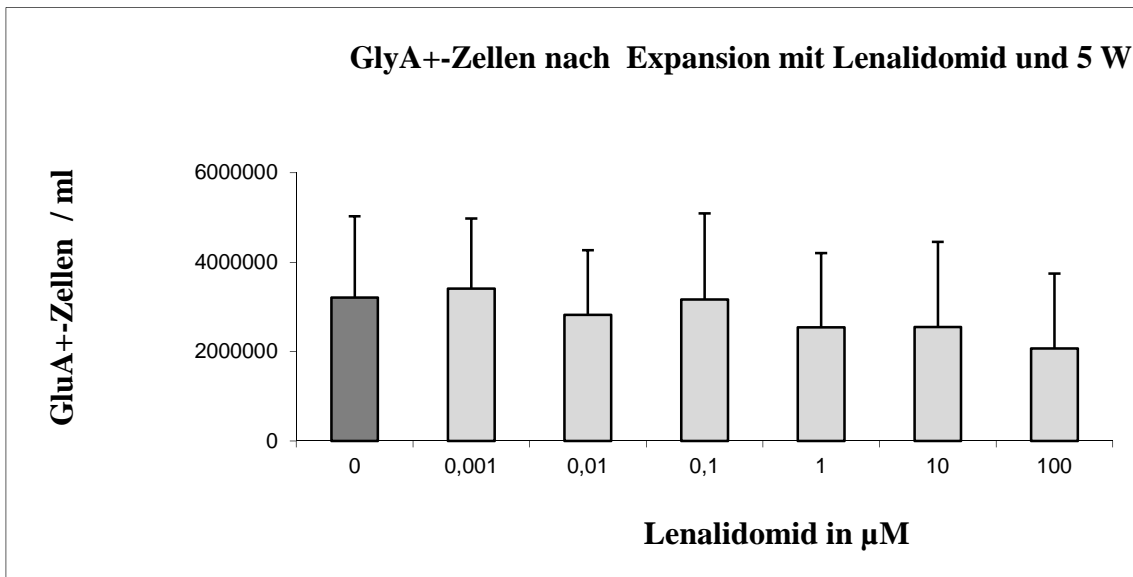


Abbildung 19 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6) mit Lenalidomid, GluA+-Zellen.

Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. vs. Kontrolle (0 μM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$ Versuchen angegeben.

3.4 Colony Forming Units

Wenn CD34+-Zellen und 10 μ M Lenalidomid direkt nach dem Auftauen in semisolidem Methylzellulose-Medium kultiviert werden, bilden sich signifikant weniger Kolonien unter dem Einfluss von 10 μ M Lenalidomid. Hierbei ist die Bildung von erythroiden (BFU-E) Kolonien signifikant reduziert, von myeloiden Kolonien (CFU-GM, CFU-E) leicht reduziert und von gemischten Kolonien (CFU-MIX) signifikant reduziert (Abb.20 und 21).

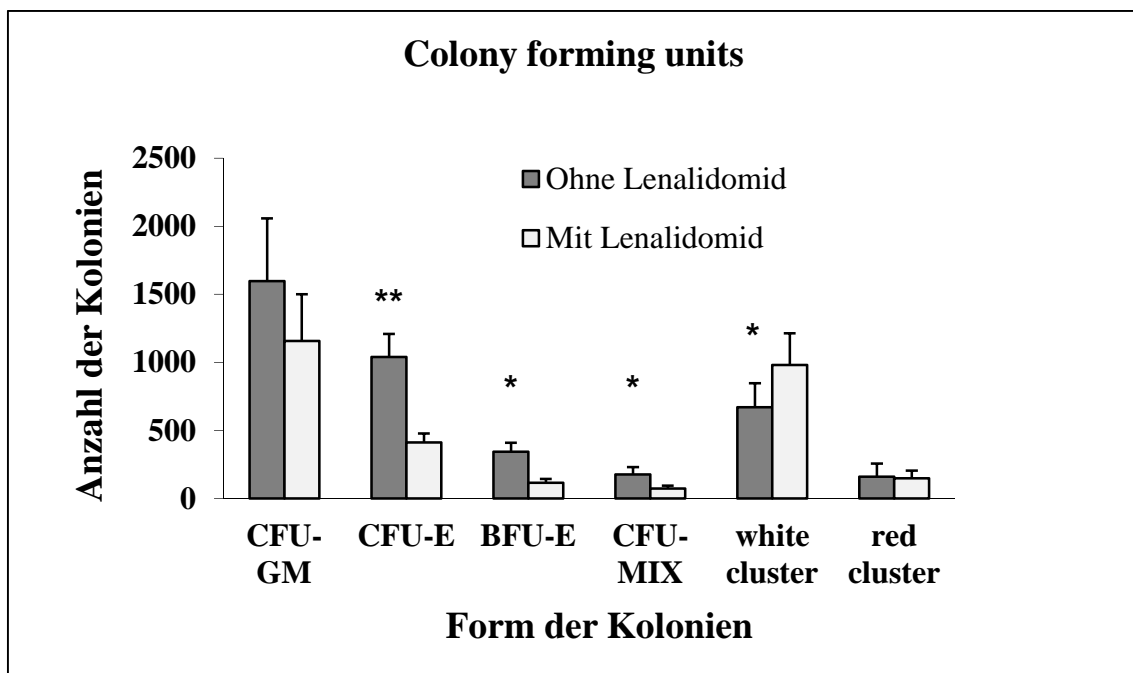


Abbildung 20. Colony forming units. Die frisch aufgetauten CD34+-Zellen wurden in semisolidem Methylzellulose-Medium kultiviert und mit 10 μ M Lenalidomid versetzt. *, $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 μ M Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=11$ Versuchen angegeben.

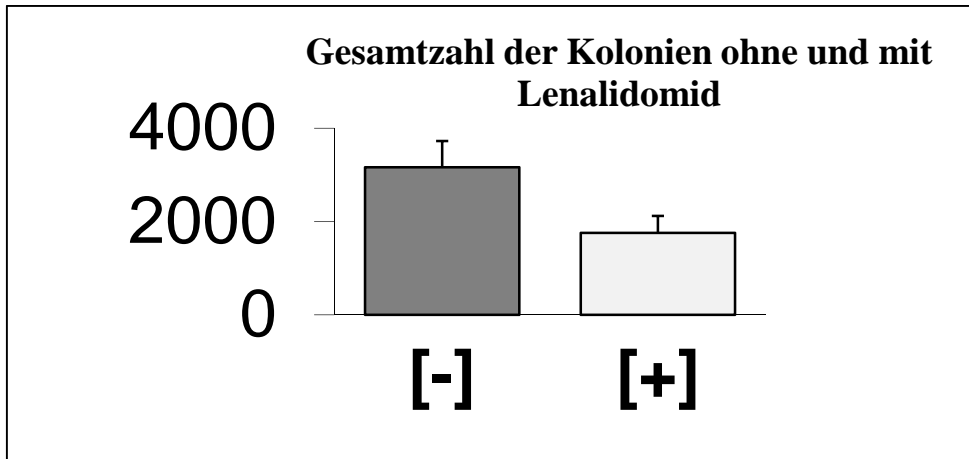


Abbildung 21. Colony forming units. Die frisch aufgetauten CD34+-Zellen wurden in semisolidem Methylzellulose-Medium kultiviert und mit 10µM Lenalidomid versetzt. Auswirkung auf die Gesamtzahl an Kolonien. ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle (ohne Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=11$ Versuchen angegeben.

Ähnlich verhält sich die Kolonie-Bildung bei CD34+-Zellen, die zuvor eine Woche mit 10 µM Lenalidomid in 5W-Expansionskulturen gehalten wurden. Auch hier bilden sich signifikant weniger Kolonien nach Inkubation mit Lenalidomid. Erythroide BFU-E ($p < 0,1$ vs. Kontrolle), myeloide CFU-GM ($p < 0,1$ vs. Kontrolle) und gemischte (CFU-MIX) Kolonien sind signifikant reduziert, sowie die Gesamtzahl an Kolonien ($p < 0,1$ vs. Kontrolle) (Abb.22).

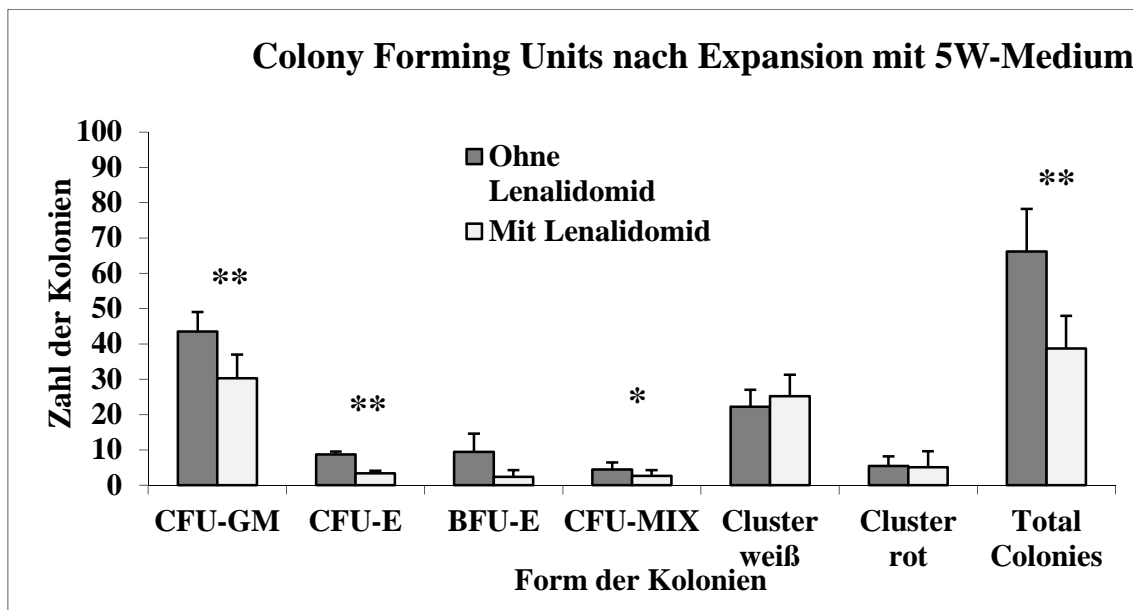


Abbildung 22. Colony forming units nach 7 Tagen Expansion im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-CSF, IL-6). Erneute Kultur in semisolidem Methylzellulose-Medium mit 10µM Lenalidomid versetzt. *, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n=8$ Versuchen angegeben.

Mit einer vorherigen Inkubation von CD34+-Zellen mit nur 3 Wachstumsfaktoren konnten wir keinen signifikanten Effekt von Lenalidomid auf die Koloniebildung beobachten (Abb.23).

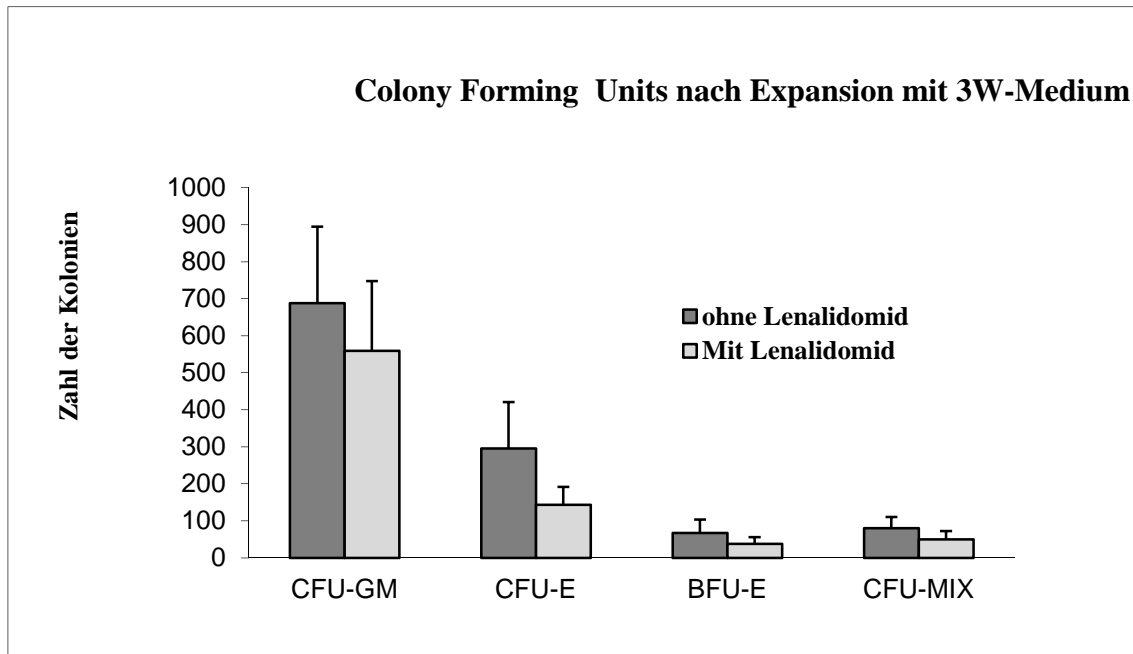


Abbildung 23 Colony forming units nach 7 Tagen Expansion im 3W-Medium (SCF, FLT-3, IL-6). Erneute Kultur in semisolidem Methylzellulose-Medium mit 10 μ M Lenalidomid versetzt. vs. Kontrolle (0 μ M Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen angegeben.

4. Diskussion

4.1 *Diskussion der Methodik*

4.1.1 **Apoptose durch Lenalidomid**

Da die Proliferation der Zellen nach einigen Stunden durch die Inkubation mit Wachstumsfaktoren einsetzt, könnte zu einem Zeitpunkt an dem die Proliferation schon länger andauert die Beobachtung der Apoptose ungünstig sein. Vielleicht hätte eine kürzere Versuchszeit von 8 oder 12 Stunden eindeutige Ergebnisse gezeigt.

4.1.2 **Proliferation der CD34+- Progenitor Zellen**

Wenn die Zellen schon einige Tagen in Kultur sind, beeinflussen auch die indirekten Effekte, wie z.B die Bildung von zelleigenen Zytokinen, die Zellen in ihrer Entwicklung. Diese wurden jedoch von uns nicht untersucht.

4.1.3 **Colony forming units**

Bei diesem Versuch ist die Auswertung nur dann optimal, wenn die einzelnen Kolonien weit genug voneinander entfernt sind und bei geeigneten Kulturbedingungen durch Wachstum und Vermehrung jeweils mit dem Auge sichtbare werden. Tatsächlich liegen unter realen Bedingungen einige Kolonien so dicht beieinander, dass man bei der Auswertung nur eine einzige Kolonie zu zählen meint, obwohl es mehrere sind.

4.2 ***Diskussion der Ergebnisse***

4.2.1 **Proliferation und Apoptose der CD34+ Zellen durch Lenalidomid**

Die Apoptose ist einer der frühen Effekte den wir durch die Behandlung von CD34+-Zellen mit geringen bis mittleren Dosen mit Lenalidomid beobachten. Dieser Effekt scheint aber rasch in den Hintergrund zu treten und von der stärkeren Proliferation der Zellen überdeckt zu werden. Interessant wäre hier zu wissen, ob und warum bestimmte Zellen in die Apoptose getrieben werden, während andere stärker in die Proliferation eingehen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird unter Therapie mit Lenalidomid eine Suppression der Hämatopoese mit Neutropenie und Thrombopenie beobachtet. Andererseits kann die Anämie bei bestimmten Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom durch eine Therapie mit Lenalidomid gebessert bzw. die Transfusionsfrequenz gesenkt werden. Die Hämatopoese und insbesondere die hämatopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen könnten dabei sowohl direkten als auch indirekten Effekten von Lenalidomid unterliegen. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, möglichst die direkten Effekte zu erfassen.

Von der therapeutischen Wirkung von Lenalidomid bei malignen Erkrankungen ausgehend, insbesondere beim Multiplen Myelom und bei B-Zell-Lymphomen, könnte man erwarten, dass Lenalidomid am ehesten zytotoxische Effekte zumindest auf maligne Zellen hat. Es ist daher sehr interessant zu untersuchen, ob direkte Effekte von Lenalidomid auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen bestehen und ob diese hemmend oder steigernd auf die Proliferation wirken bzw. unmittelbar apoptotische Effekte vorhanden sind.

Die bisherigen Untersuchungen zu den direkten Effekten von Lenalidomid auf hämatopoetische Progenitorzellen in vitro zeigen allerdings widersprüchliche Ergebnisse.

In einer Arbeit von (Li, Fu et al. 2013) konnte kein Einfluss von Lenalidomid auf die Zahl der CD34+ Progenitoren in vitro über eine Kulturdauer von 6 Tagen

gefunden werden. Es wurden dabei vergleichsweise mittlere bis hohe Konzentrationen (1 und 10 μM) untersucht.

(Verhelle, Corral et al. 2007) dagegen fanden, dass die Proliferation von CD34+ Progenitorzellen durch Lenalidomid in einem Dosisbereich von 0,1-10 μM gesteigert wird, während die Vermehrung maligner B-Zellen gehemmt wird. Dies wird von den Autoren mit der Hochregulierung bestimmter Signaltransduktionsmoleküle in Zusammenhang gebracht (p21WAF-1).

Es sind allerdings auch hemmende Effekte von Lenalidomid auf hämatopoetische Progenitorzellen beschrieben. (Schmidt-Hieber, Dabrowski et al. 2012) beobachteten eine Reduktion der Viabilität von hämatopoetischen Progenitorzellen unter dem Einfluss von 1 μM Lenalidomid.

Nach der Arbeit von (Moutouh-de Parseval, Verhelle et al. 2008) allerdings bewirkt Lenalidomid in vitro eher eine Abnahme der apoptotischen hämatopoetischen Progenitoren bzw. eine Zunahme der viablen Zellen und das in einem weiten Dosisbereich von 1 nM bis 10 μM .

Die unterschiedlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass einerseits der Effekt von Lenalidomid auf hämatopoetische Progenitorzellen möglicherweise nur moderat ist (im Vergleich zu den stimulierenden Effekten von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und den hemmenden Effekten von stärker zytotoxischen Agentien) und andererseits eine starke Dosisabhängigkeit der Wirkungen vorliegen könnte.

In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sehr wohl auch ein direkt apoptischer Effekt von Lenalidomid auf CD34+ Vorläuferzellen besteht, dieser aber moderat ist und nur in einem Dosisbereich von geringen bis mittleren Konzentrationen auftritt.

Dies scheint im Widerspruch dazu zu stehen, dass in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der Gesamtzellzahl in zytokin-stimulierten Flüssigkulturen von CD34+ Zellen beobachtet wird. Bei sehr hohen Konzentrationen dagegen besteht ein durchweg hemmender Effekt und es wird nach den hier vorliegenden Ergebnissen eine reduzierte Zellzahl gefunden. Unter Bedingungen einer stärkeren Proliferation (5 Wachstumsfaktoren) wird durch Lenalidomid in mittleren Konzentrationen nicht nur die Gesamtzellzahl, sogar

die Anzahl von CD34+ Progenitoren gesteigert. Offensichtlich spielen die beobachteten apoptotischen Effekte unter diesen Bedingungen keine relevante Rolle. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass sich die proliferationsfördernde Wirkung insbesondere auf sich teilende und bereits weiter differenzierende hämatopoetische Zellen erstreckt. Weiter differenzierte, liniendeterminierte Progenitorzellen koexprimieren CD38. Insbesondere die CD34+ CD38+ Population wird durch Lenalidomid in hoher Konzentration (10-100 µM) nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit signifikant gehemmt.

Scheinbar widersprüchliche Ergebnisse könnten auch dadurch bedingt sein, dass es bei Kultivierung in vitro praktisch unmöglich ist, indirekte Effekte auf die Progenitorzellen komplett auszuschließen. Anfangs können die Progenitorzellen zwar in einem hohen Reinheitsgrad in die Kultur eingebracht werden, aber sobald die Progenitorzellen proliferieren, werden weiter differenzierte und schließlich reife Zellen generiert, die dann ebenfalls durch Lenalidomid beeinflusst werden könnten und dann möglicherweise indirekte Effekte auf die Progenitorzellen ausüben.

Wir stellen hier zwei Eigenschaften der Substanz fest: In geringen bis mittleren Dosen werden die hämatopoetischen Progenitorzellen in ihrer Proliferation stimuliert, während höhere Dosen eine toxische Eigenschaft haben und die Proliferation deutlich hemmen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen uns nochmals eindeutig, wie eine genaue Dosierungsfindung abhängig von den Erfolgen einer Behandlung sein kann.

4.2.2 Der Einfluss von Lenalidomid auf die Differenzierung und Entwicklung des Phänotyps der hämatopoetischen Zellen

Neben der Tatsache, dass wir eine verstärkte Generierung von Zellen in Progenitorkulturen gefunden haben ist die Frage interessant, ob bestimmte hämatopoetische Linien präferentiell von Lenalidomid beeinflusst werden. Ob Lenalidomid die Differenzierung proliferierender hämatopoetischer Zellen

vorzugsweise in eine bestimmte Linie lenkt, wird in verschiedenen Untersuchungen allerdings nicht einheitlich beurteilt.

(Pal, Monaghan et al. 2010) beschreiben eine Förderung myeloider Colony forming units unter dem Einfluss von Lenalidomid in vitro, während die Generierung von erythroiden Kolonien gehemmt wird.

Im Gegensatz dazu legen die Ergebnisse mehrerer anderer Untersuchungen nahe, dass besonders eine erythroide Differenzierung durch Lenalidomid gefördert wird ((Schmidt-Hieber, Dabrowski et al. 2012), (Ebert, Galili et al. 2008), (Moutouh-de Parseval, Verhelle et al. 2008), (Narla, Dutt et al. 2011)).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die durch Lenalidomid bewirkte Erhöhung der Gesamtzellzahl in zytokinstimulierten Flüssigkulturen insbesondere zugunsten reifer myeloider Zellen (u.a. CD15+) geht. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Beobachtung, dass unter Lenalidomid (in allerdings höherer Dosierung von 10 μ M) insbesondere wenig erythroide Koloniebildung zu finden ist. Die myeloide Koloniebildung ist ebenfalls reduziert, allerdings wird die weiter differenzierte, myeloide Proliferation („Cluster“) nicht gehemmt, sondern sogar gesteigert.

Abgesehen von der moderat gesteigerten Apoptose nach kurzzeitiger Exposition scheint eine längerdauernde Einwirkung von mittleren Lenalidomid-Konzentration die hämatopoetischen Progenitorzellen nicht negativ zu beeinflussen, im Gegenteil, es wird unter Zytokinstimulation sogar eine stärkere Proliferation in vitro beobachtet.

Die unter Therapie mit Lenalidomid beobachtete Suppression der Hämatopoese ist daher eher nicht auf direkte Einflüsse auf hämatopoetische Progenitorzellen zurückzuführen. Insbesondere die von uns beobachtete Steigerung CD41+ megakaryozytärer Zellen in vitro spricht dagegen, dass eine unter Therapie mit Lenalidomid auftretende Thrombopenie auf direkte hemmende Wirkungen zurückzuführen ist. In der Tat, nützt man in der Therapie des Myelodysplastischen Syndroms die regulierende Effekte von Lenalidomid gegen die Reifungsstörung aus (Komrokji and List 2016). Hier könnte der erhöhte Anteil an CD41+-Zellen auch durch indirekte Effekt, z.B. vermehrte Zytokinbildung, erklärt werden.

Eine frühere Untersuchung zeigte uns schon, wie die Erythropoese durch Lenalidomid moduliert wird (Moutouh-de Parseval, Verhelle et al. 2008). Klinische Studien haben uns auch schon gezeigt, dass Patienten mit chronisch kongenitaler hypoplastischer Anämie und mit Myelodysplastischem Syndrom weniger Transfusionen brauchen, nachdem sie mit Kortikosteroiden und Lenalidomid behandelt wurden. Durch die Behandlung mit der Kombination bei diesen Patienten stellte man eine beschleunigte Erythropoese fest. (Narla, Dutt et al. 2011). Unsere Ergebnisse zeigen aber durch die in vitro Beobachtung der Colonie Forming Units genau das Gegenteil: die Bildung von erythroiden Kolonien wird durch Lenalidomid gehemmt. Vielleicht spielt in vivo beim Myelodysplastischen Syndrom der direkt stimulierende Effekt von Lenalidomid eine Rolle?

4.3 **Schlussfolgerung**

Die Beschleunigung der Expansion und die Selbsterneuerung sowie die Hemmung der Reifung und der Differenzierung der CD34+ hämatopoetischen Progenitor Zellen, all diese Mechanismen werden beobachtet, hängen aber stark davon ab, in welcher Dosierung Lenalidomid zu den inkubierten Zellen zugefügt wurde.

Von anderen Autoren wurde die differenzierte Wirkung von Lenalidomid in Abhängigkeit des Mikro Environments eines Tumors beschrieben. Tatsächlich ist der Mechanismen der immunmodulatorischen Substanzen sehr komplex und so der Nachweis von verschiedenen Effekten durch in vitro Versuche schwer nachvollziehbar.

Durch unsere Versuche, ist es uns gelungen einige dieser sich überlagernde Effekte, in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration zu trennen und damit Licht in das komplexe Verhalten zu bringen.

5. **Zusammenfassung**

Während der Behandlungen mit Lenalidomid wurden neben der immunmodulatorischen Aktivität andere Effekte wie Hämatoxizität, Suppression und Hemmung der Mobilität von hämatopoetischen Stammzellen beobachtet. Verantwortlich dafür werden direkte oder indirekte Effekte gemacht. Nicht zu unterschätzen ist die genaue Dosierungsfindung des Medikaments, sowie die Kombination mit Dexamethason.

Wir haben direkte Effekte von Lenalidomid auf isolierte CD34+ Progenitor Stammzellen untersucht durch leichte (3 Wachstumsfaktoren, 3W= SCF, FLT-3, IL-6) oder stärkere (5 Wachstumsfaktoren, 5W= SCF, FLT-3, IL-6, IL-3, G-CSF) zytokingesteuerte Proliferation. Wir beobachteten Apoptosevorgänge durch 24-stündige Inkubation gemessen mit Annexin-FITC, sowie die Proliferation der Zellen durch 7-tägige Inkubation in flüssiger Kultur. Der Proliferationsversuch wurde über 14 Tagen erweitert, wobei die Zellen im semisoliden Medium versetzt wurden, zur Beobachtung von koloniebildenden Einheiten (CFU). Der

gleiche Versuch (CFU) wurde auch parallel durchgeführt mit den Zellen vom Proliferationsversuch, die also noch nicht 7 Tage Inkubation erfahren hatten.

Nach Inkubation für 24 Stunden und moderater Zytokinstimulierung erhöht Lenalidomid, bei geringen und mittleren Konzentration (0,01-0,1 μM), signifikant den Prozentsatz von apoptotischen Progenitor Stammzellen. In der flüssigen Kultur mit 3W und 5W wird die Proliferation durch eine mittlere Lenalidomidkonzentration (0,1 μM) signifikant positiv beeinflusst. Die Differenzierung der progenitor Zellen wird gelenkt und entwickelt sich eher zugunsten der granulozytischen (CD15+) und megakaryozytische (CD41+) Zelllinien. Bei leichter Zytokinstimulierung (3W) in der flüssigen Kultur wird die Zahl der CD34+- Zellen bei geringen und mittleren Lenalidomidkonzentration nicht beeinflusst, bei sehr hohen Konzentration (100 μM) wird sie sogar um 34% signifikant reduziert. Hingegen, wird die Expansion von CD34+ progenitor Zellen die stark von Zytokinen stimuliert wurde (5W), in den Konzentrationen 0,01-1 signifikant positiv beeinflusst (bis zu 85%), dagegen bei 100 μM wird die Zellzahl, wie bei leichter Stimulierung, sehr reduziert (um 50%). Im semisoliden Medium bilden sich bei 10 μM Lenalidomid weniger koloniebildende Einheiten, vor allem die erythroide und granulozytische Gruppen (BFU-E, CFU-E) werden signifikant reduziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Proliferation von hämatopoetischen Progenitor Zellen in vitro nicht direkt durch Lenalidomid beeinträchtigt wird, obwohl Apoptose anfänglich durch wenige Versuche gezeigt werden konnte.

Eine Vermutung ist, dass die Steigerung der Zellzahl, die sich im Vorhandensein von leichten bis mittleren Lenalidomiddosen mit stärkerer Zytokinstimulierung zeigt, von der deutlichen Entwicklung der Zelllinien in Richtung Granulozyten und Megakaryozyten kommt. Ebenfalls klinisch relevant könnte die beeinträchtigte Mobilisierung der Zellen, die sich nach 14 Tagen und stärkerer Zytokinstimulierung durch 10 μM Lenalidomid zeigt. Vor allem wird die Koloniebildung von erythroiden Linien verhindert. Nur bei hohen Lenalidomiddosen (ab 100 μM) werden die CD34+HPC signifikant inhibiert. Da

man diese Dosen in vivo nie erreicht, ist dieser Effekt während einer Therapie mit Lenalidomid irrelevant. Hierfür tragen eher indirekte als direkte Effekte dazu bei, während Behandlungen mit Lenalidomid Hämatoxizität, Suppression und Hemmung der Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen zu beeinflussen.

6. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1. Die hämatopoetische Zellreihe und wichtige Zellmarker für diese Arbeit.....	4
Abbildung 2. Strukturformel von Thalidomid (aus Bartlett, Dredge, and Dalgleish 314-22)	6
Abbildung 3. Lenalidomid: 3-(4-amino-1oxo1,3-dihydro-2H-isoindol-2yl) piperidine-2,6-dione (Kotla, Goel et al. 2009)	7
Abbildung 4. In der FACS-Messung wurden im SSC (Sideward- Scatter) gegen FSC (Forward-Scatter) Proben von Zellen (R2) gegen Beads (R1) nach 7 Tagen Expansion von CD34+Zellen mit 5 Zytokinen gemessen. Hier sehen wir die Kontrolle ohne Lenalidomid und die Probe inkubiert mit einer Konzentration von 0,001 µM Lenalidomid.	19
Abbildung 5. Apoptose durch Lenalidomid auf CD34+-Zellen nach 24h Inkubation im 3W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3). *, p < 0,05 vs. Kontrolle. Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n=4 Versuchen angegeben.	21
Abbildung 6 Zellzahl 10 ⁵ HP im 3W-Medium mit Lenalidomid. Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im 3W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3) mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend gegen Beads ausgezählt. vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n=6 Versuchen angegeben.	23
Abbildung 7. Zellzahl 10 ⁵ HP im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid. Die aus dem Leukopheresat isolierten CD34+-Zellen wurden nach dem Auftauen im Medium mit einer ansteigenden Konzentration Lenalidomid für 7 Tage inkubiert, anschließend gegen Beads ausgezählt. *, p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n=9 Versuchen angegeben.	23
Abbildung 8 Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3) mit Lenalidomid, CD34+-Zellen.	25

Abbildung 9. Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3) mit Lenalidomid, CD34+/CD38+-Zellen.....	25
Abbildung 10. Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid CD34+-Zellen.	26
Abbildung 11 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid CD34+/CD38+-Zellen.	26
Abbildung 12 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid CD45+-Zellen.	27
Abbildung 13 Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, FLT-3, IL-6) mit Lenalidomid, CD15+-Zellen.	28
Abbildung 14 FACS-Messung nach 7 Tagen Inkubation von CD34+-Zellen mit 1µM Lenalidomid und drei oder fünf Wachstumsfaktoren. Hier die phänotypische Abbildung von CD14+- und CD41+-Zellen.	28
Abbildung 15 Expansionskultur im 3W-Medium (SCF, FLT-3, IL-6) mit Lenalidomid, CD41+-Zellen.	29
Abbildung 16 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid, CD14+-Zellen.	30
Abbildung 17. Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid, CD15+-Zellen.	30
Abbildung 18. Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid, CD41+-Zellen.	31
Abbildung 19 Expansionskultur im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6) mit Lenalidomid, GlyA+-Zellen.....	31
Abbildung 20. Colony forming units. Die frisch aufgetauten CD34+-Zellen wurden in semisolidem Methylzellulose-Medium kultiviert und mit 10µM Lenalidomid versetzt. *, p < 0,05, ** p < 0,001 vs. Kontrolle (0 µM Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n=11 Versuchen angegeben.	32
Abbildung 21. Colony forming units. Die frisch aufgetauten CD34+-Zellen wurden in semisolidem Methylzellulose-Medium kultiviert und mit 10µM Lenalidomid versetzt. Auswirkung auf die Gesamtzahl an Kolonien. ** p <	

0,001 vs. Kontrolle (ohne Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=11 Versuchen angegeben.	33
Abbildung 22. Colony forming units nach 7 Tagen Expansion im 5W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6). Erneute Kultur in semisolidem Methylzellulose-Medium mit 10 μ M Lenalidomid versetzt.*, p < 0,05, ** p < 0,01 vs. Kontrolle (0 μ M Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=8 Versuchen angegeben.....	33
Abbildung 23 Colony forming units nach 7 Tagen Expansion im 3W-Medium (SCF, IL-3, FLT-3, G-SCF, IL-6). Erneute Kultur in semisolidem Methylzellulose-Medium mit 10 μ M Lenalidomid versetzt. vs. Kontrolle (0 μ M Lenalidomid). Gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Versuchen angegeben.	34

8. Abkürzungen

Ak	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
CFU	Colony forming units
Cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	Federal drugs association
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gramm
IMiDs	Immunmodulatorische Substanzklasse (Immunomodulatory Drugs)
G-SCF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten- und makrophagenstimulierender Faktor (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
H	Stunde
HPC/HSC	Hämatopetische Stamm- und Progenitorzelle (hematopoietic stem and progenitor cell)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
m	Meter
M	Molar (Mol/Liter)
MACS	Magnetic associated cell sorting
Mak	Monoklonaler Antikörper

Mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl
p	Signifikanz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat-buffered saline)
s	Sekunde
SCF	Stammzellfaktor
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (standard error of the mean)
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sideward- Scatter)
vs	Vergleich
VEGF	(vascular endothelial growth factor)
W	Wachstumsfaktoren

9. Literaturverzeichnis

Hematopoietic stem cells V 2005. [result of a Conference Entitled Hematopoietic Stem Cells V, held on September 16 - 18, 2004 in Tübingen, Germany]. New York, New York Academy of Sciences: X, 246 S.

Anderson, K. C. (2003). "The role of immunomodulatory drugs in multiple myeloma." *Seminars in hematology* 40(4 Suppl 4): 23-32.

Armoiry, X., G. Aulagner, et al. (2008). "Lenalidomide in the treatment of multiple myeloma: a review." *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 33(3): 219-226.

C. TH. Smit Sibinga, N. L., Ed. (2005). *Neonatology and Blood Transfusion. Developments in Hematology and Immunology*, Springer US.

Chen, N., S. Zhou, et al. (2016). "Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lenalidomide." *Clin Pharmacokinet.*

Christian, M. S., O. L. Laskin, et al. (2007). "Evaluation of the developmental toxicity of lenalidomide in rabbits." *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 80(3): 188-207.

Davies, F. and R. Baz (2010). "Lenalidomide mode of action: linking bench and clinical findings." *Blood Rev* 24(1): 70004-70007.

Dempke, W. (2006). *Lehrbuch Hämathologie Onkologie*.

Dimopoulos, M. A. and V. Eleutherakis-Papaiakovou (2004). "Adverse effects of thalidomide administration in patients with neoplastic diseases." *The American journal of medicine* 117(7): 508-515.

Ebert, B. L., N. Galili, et al. (2008). "An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome." *PLoS Med* 5(2): e35.

Eriksson, T., S. Bjorkman, et al. (2000). "Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man." *The Journal of pharmacy and pharmacology* 52(7): 807-817.

Fausser, A. A. and H. A. Messner (1979). "Identification of megakaryocytes, macrophages, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts." *Blood* 53(5): 1023-1027.

Galustian, C. and A. Dalglish (2009). "Lenalidomide: a novel anticancer drug with multiple modalities." *Expert Opin Pharmacother* 10(1): 125-133.

Gentile, M., A. G. Recchia, et al. (2011). "Lenalidomide in the treatment of chronic lymphocytic leukemia." *Expert opinion on investigational drugs* 20(2): 273-286.

Kirk, B. (1998). *Der Contergan-Fall: eine unvermeidbare Arzneimittelkatastrophe?: zur Geschichte des Arzneistoffes Thalidomid.*

Knight, R. (2005). "IMiDs: a novel class of immunomodulators." *Seminars in oncology* 32(4 Suppl 5): S24-30.

Komrokji, R. S. and A. F. List (2016). "Short- and long-term benefits of lenalidomide treatment in patients with lower-risk del(5q) myelodysplastic syndromes." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 27(1): 62-68.

Kotla, V., S. Goel, et al. (2009). "Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies." *J Hematol Oncol* 2(36): 1756-8722.

Kronke, J., N. D. Udeshi, et al. (2014). "Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells." *Science* 343(6168): 301-305.

L.Moore, K. (2007). *Embryologie.* Elsevier.

Li, S., J. Fu, et al. (2013). "Lenalidomide-induced upregulation of CXCR4 in CD34+ hematopoietic cells, a potential mechanism of decreased hematopoietic progenitor mobilization." *Leukemia* 27(6): 1407-1411.

Moutouh-de Parseval, L. A., D. Verhelle, et al. (2008). "Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells." *J Clin Invest* 118(1): 248-258.

Müller-Newen, G. and E. P. Petrides (2014). *Blut – Hämatopoese und Erythrocyten.* Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie.* C. P. Heinrich, M. Müller and L. Graeve. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 863-876.

Narla, A., S. Dutt, et al. (2011). "Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis." *Blood* 118(8): 2296-2304.

Ordi-Ros, J. and F. J. Cosiglio (2013). "[Current therapeutic indications of thalidomide and lenalidomide.]" *Med Clin* 3(13): 00329-00321.

Pal, R., S. A. Monaghan, et al. (2010). "Immunomodulatory derivatives induce PU.1 down-regulation, myeloid maturation arrest, and neutropenia." *Blood* 115(3): 605-614.

Perez Persona, E., M. G. Mesa, et al. (2011). "Lenalidomide treatment for patients with multiple myeloma: diagnosis and management of most frequent adverse events." *Adv Ther* 1: 11-16.

Schmidt-Hieber, M., R. Dabrowski, et al. (2012). "In vitro effects of perifosine, bortezomib and lenalidomide against hematopoietic progenitor cells from healthy donors." *Invest New Drugs* 30(4): 1396-1403.

Shannon, E., F. Sandoval, et al. (2012). "Lenalidomide alone or lenalidomide plus dexamethasone significantly inhibit IgG and IgM in vitro... A possible explanation for their mechanism of action in treating multiple myeloma." *International immunopharmacology* 12(2): 441-446.

Thomann, K.-D. (2007). "DIE CONTERGAN-KATASTROPHE." *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 104, Heft 41.

Verhelle, D., L. G. Corral, et al. (2007). "Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells." *Cancer Res* 67(2): 746-755.

Zangari, M., F. Elice, et al. (2005). "Immunomodulatory drugs in multiple myeloma." *Expert opinion on investigational drugs* 14(11): 1411-1418.

10. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Abteilung II der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. R. Möhle durchgeführt.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer.nat. A. Drost von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer.nat. A. Drost und Prof. Dr. R. Möhle durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quelle verwendet zu haben.

Freiburg, den 14.02.2017

A. Mazier Fischer