

Aus dem Institut für Anatomie II:  
Experimentelle Morphologie  
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)  
Zentrum für Experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Leukämiemanifestation bei der normalen Maus und  
„Graft-versus-Host“ Reaktion bei der immundefizienten Maus  
nach Transplantation von transgenen Stammzellen  
Eine morphologische Studie zum myeloischen System der Maus  
und ein Beitrag zur vergleichenden Hämatologie**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Nana Oduraa Addo**

**aus Hamburg**

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in:

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>4</b>
2.1 STAMMZELLEXP. ....	4
2.2 PARAFFIN-UND SEMIDÜNN- SCHNITTHISTOLOGIE.....	5
2.2.1 Färbungen der Knochenmarkpräparate.....	6
2.2.2 Färbungen der Paraffinschnitte .....	7
2.2.3 Einbettung in Epoxydharz und Färbung.....	9
2.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	10
2.4 MORPHOMETRIE.....	11
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>12</b>
3.1 DAS KNOCHENMARK DER NORMALEN MAUS .....	12
3.1.1 Zellularität.....	12
3.1.2 Gefäße .....	12
3.1.3 Stromazellen und Makrophagen (Stz, MP).....	12
3.1.4 Die rote Reihe.....	16
3.1.5 Die neutrophile Reihe.....	20
3.1.6 Die eosinophile Reihe (Eos) .....	25
3.1.7 Die monozytäre Reihe (M0- M2).....	27
3.1.8 Die Lymphozyten und Plasmazellen (LZ und PLZ) .....	28
3.1.9 Die Megakaryozyten (MEG).....	30
3.1.10 Das Myelogramm .....	30
3.2 DIE MILZ DER NORMALEN MAUS .....	31
3.2.1 Die weiße Pulpa .....	32
3.2.2 Die rote Pulpa .....	33
3.2.3 Quantitative Milzdaten .....	37
3.3 LEUKÄMIEENTWICKLUNG NACH KNOCHENMARK- TRANSPLANTATIONEN MIT TRANSGENEN STAMMZELLEN.....	38
3.3.1 Blutbefunde.....	38
3.3.2 Milzbefunde .....	40
3.3.3 Knochenmarkbefunde .....	49
3.3.4 Leberbefunde .....	56
3.4 „GRAFT -VERSUS- HOST“ KONSTELLATION UND VERSUCHSANORDNUNG .....	58
3.4.1 Milzbefunde .....	59
3.4.2 Leberbefunde .....	67
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
4.1 DAS NORMALE KNOCHENMARK DER MAUS IST ZYOLOGISCH DEM DES MENSCHEN HOMOLOG .....	77
4.2 DER HÄMATOPOESE IM KNOCHENMARK FEHLT BEI DER MAUS EINE RESERVEKAPAZITÄT .....	78
4.3 DIE HÄMATOPOESE VERFÜGT BEIM MENSCHEN ÜBER EINE RESERVEKAPAZITÄT IM KNOCHENMARK ...	79
4.4 WIE SIND DIE UNTERSCHIEDE IN DER ZELLULARITÄT DES KNOCHENMARKS VON MENSCH UND MAUS ZU ERKLÄREN? .....	80
4.5 DIE MILZ DER MAUS IST EIN NATÜRLICHES ORGAN DER BLUTBILDUNG.....	82
4.6 LEUKÄMIEENTWICKLUNG IN DER MAUS NACH KNOCHEN-MARKTRANSPLANTATIONEN MIT TRANSGENEN STAMMZELLEN.....	82
4.6.1 Milzbefunde .....	82
4.6.2 Knochenmarkbefunde .....	83
4.6.3 Leberbefunde .....	83
4.7 LEUKÄMIEMANIFESTATION BEI DER MAUS IM VERGLEICH ZUM MENSCHEN.....	83
4.7.1 Akute myeloische Leukämie (AML) beim Menschen.....	84
4.7.2 Präleukämie beim Menschen.....	84

---

4.7.3	<i>Akute myeloische Leukämie (AML) bei der Maus</i> .....	85
4.7.4	<i>Präleukämie bei der Maus</i> .....	89
4.8	„GRAFT-VERSUS-HOST“ KONSTELLATION.....	92
4.8.1	<i>Die Bedeutung der CD34-Moleküle</i> .....	92
4.8.2	<i>Milzbefunde</i> .....	95
4.8.3	<i>Leberbefunde</i> .....	95
4.8.4	<i>Schicksal der humanen CD34 Genprodukte hu trCD34 und hu flCD34 im Mausorganismus</i> .....	96
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>98</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>AML</b>	<b>Akute Myeloische Leukämie</b>
<b>AML1- ETO</b>	<b>AML Gen 1- Eight Twenty One</b> ; Fusionsprotein, das durch die Translokation t(8;21)(q22;q22) entsteht
<b>Balb/ c</b>	<b>Bagg albino mouse</b> ; genotyp at "color" locus <b>c/c</b>
<b>B-Zellen</b>	<b>Bone marrow (Knochenmark) Zellen</b>
<b>CFU</b>	<b>Colony Forming Unit</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of Differentiation</b>
<b>Evi-1</b>	<b>Ecotropic viral integration site-1</b>
<b>FACS</b>	<b>Fluorescence Activated Cell Sorter</b>
<b>FL</b>	<b>Full Length</b>
<b>FAB</b>	<b>French-American-British- Klassifikation der Leukämien</b>
<b>GMFL</b>	<b>Graft MACS Full Length</b>
<b>GMTR</b>	<b>Graft MACS Truncated</b>
<b>Gy</b>	<b>Gray (Einheit)</b>
<b>KMT</b>	<b>Knochenmarktransplantation</b>
<b>LNGFR</b>	<b>Low Affinity Nerv Growth Factor Receptor</b>
<b>LTR</b>	<b>Long Terminal Repeats</b>
<b>MACS</b>	<b>Magnetic Activated Cell Sorting</b>
<b>MDS</b>	<b>Myelodysplastisches Syndrom</b>
<b>M/E</b>	<b>Myelopoese im Verhältnis zu Erythropoese</b>
<b>MESCV</b>	<b>Murine Embryonic Stem Cell Virus</b>
<b>Mg</b>	<b>Miligramm</b>
<b>MuLV</b>	<b>Murine Leukemia Virus</b>
<b>NK-Zellen</b>	<b>Natural Killer Zellen</b>
<b>NOD/SCID</b>	<b>Non-Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency Disease</b>
<b>NS</b>	<b>Non Selected</b>
<b>PALS</b>	<b>Periarterioläre Lymphatische Scheiden</b>
<b>PLT</b>	<b>Platelet</b>

<b>RER</b>	<b>R</b> auhes <b>e</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
<b>RP</b>	<b>R</b> ote <b>P</b> ulpa
<b>SCID</b>	<b>S</b> evere <b>C</b> ombined <b>I</b> mmunodeficiency <b>D</b> isease
<b>SFFVp</b>	<b>S</b> pleen <b>F</b> ocus- <b>F</b> orming <b>V</b> irus <b>p</b> articels
<b>TR</b>	<b>T</b> runcated
<b>T-Zellen</b>	<b>T</b> hymus <b>Z</b> ellen
<b>WBC</b>	<b>W</b> hite <b>B</b> loodcell
<b>WHO</b>	<b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganization
<b>Vol.</b>	<b>V</b> olumen
<b>%</b>	<b>P</b> rozent

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 3.1.1 DAS KNOCHENMARK EINER BALB/C MAUS IM SEMIDÜNNSSCHNITT.....	13
ABBILDUNG 3.1.2 QUETSCHPRÄPARAT DES KNOCHENMARKS EINER BALB/C MAUS. ....	14
ABBILDUNG 3.1.3 QUETSCHPRÄPARAT DES KNOCHENMARKS EINER BALB/C MAUS. ....	14
ABBILDUNG 3.1.4 KNOCHENMARK EINER BALB/C MAUS IM SEMIDÜNNSSCHNITT NACH ENTPLASTUNG UND DURCHFÜHRUNG EINER BERLINER BLAU REAKTION. ....	15
ABBILDUNG 3.1.5 MAKROPHAGEN AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD. .....	16
ABBILDUNG 3.1.6 DAS NORMALE KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN ÜBERSICHTSBILD. ....	18
ABBILDUNG 3.1.7 KNOCHENMARKAUSSCHNITT EINER BLUTGESUNDEN MAUS .....	19
ABBILDUNG 3.1.8 KNOCHENMARKAUSSCHNITT EINER BLUTGESUNDEN MAUS .....	20
ABBILDUNG 3.1.9 ABSTRICHPRÄPARAT DES KNOCHENMARKS EINER BALB/C MAUS. ....	22
ABBILDUNG 3.1.10 KNOCHENMARK EINER NORMALEN MAUS IM ELEKTRONEN-.....	23
ABBILDUNG 3.1.11 DAS KNOCHENMARK EINER NORMALEN MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD.....	24
ABBILDUNG 3.1.12 REIFER SEGMENTKERNIGER NEUTROPHILER GRANULOZYT (N5) AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD.....	25
ABBILDUNG 3.1.13 EOSINOPHILER PROMYELOZYT AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD.....	26
ABBILDUNG 3.1.14 EOSINOPHILER GRANULOZYT AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD.....	27
ABBILDUNG 3.1.15 MONOZYTÄRE ZELLE AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD. ....	28
ABBILDUNG 3.1.16 PLASMAZELLE AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD. .....	29
ABBILDUNG 3.1.17 MEGAKARYOZYT AUS DEM KNOCHENMARK DER MAUS IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD. ....	30
ABBILDUNG 3.2.1A MILZGEWEBE EINER NORMALEN KONTROLLMAUS IM ÜBERSICHTSBILD EINES SEMIDÜNNSSCHNITTES. ....	31
ABBILDUNG 3.2.1B MILZGEWEBE WIE IN ABB. 3.2.1A BEI STÄRKERER VERGRÖßERUNG.....	32
ABBILDUNG 3.2.2 MILZGEWEBE EINER MAUS IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	33
ABBILDUNG 3.2.3 MILZGEWEBE EINER BALB/C MAUS IM ÜBERSICHTSBILD EINES PARAFFINSCHNITTES. ....	35
ABBILDUNG 3.2.4 PARAFFINSCHNITT DER MILZ EINER BALB/C MAUS NACH DURCHFÜHRUNG EINER BERLINER BLAU REAKTION (BBR).....	35
ABBILDUNG 3.2.5 AUSSCHNITT AUS DER ROTEN PULPA EINER NICHT EISENÜBERLADENEN MILZ. ....	36
ABBILDUNG 3.2.6 MILZGEWEBE EINER KONTROLLMAUS IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	37
ABBILDUNG 3.3.1 LEUKOZYTENKONZENTRAT DES BLUTES VON MAUS 1.....	40
ABBILDUNG 3.3.2 ÜBERSICHTSBILD AUS DER MILZ VON MAUS 1 IM PARAFFINSCHNITT.....	42
ABBILDUNG 3.3.3 AUSSCHNITT AUS DER ROTEN PULPA DER MILZ VON MAUS 1 IM SEMIDÜNNSSCHNITT.....	42
ABBILDUNG 3.3.4 LEUKÄMISCH TRANSFORMIERTES MILZGEWEBE VON MAUS 13 IM SEMIDÜNNSSCHNITTBILD. ...	43
ABBILDUNG 3.3.5 MILZ VON MAUS 13 IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD.....	44
ABBILDUNG 3.3.6 MILZGEWEBE VON MAUS 14 IM SEMIDÜNNSSCHNITT.....	45
ABBILDUNG 3.3.7 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUSSCHNITT AUS DER MILZ VON MAUS 14.....	46
ABBILDUNG 3.3.8A MILZGEWEBE VON MAUS 4 IN DER ÜBERSICHT EINES SEMIDÜNNSSCHNITTES. ....	47
ABBILDUNG 3.3.8B AUSSCHNITT AUS DEM ZENTRUM VOM ABB. 3.4.8B.....	47
ABBILDUNG 3.3.9 AUSSCHNITT AUS DER ROTEN PULPA VON MAUS 4. ....	48
ABBILDUNG 3.3.10 MILZGEWEBE VON MAUS 2 IN DER ÜBERSICHT EINES SEMIDÜNNSSCHNITTES. ....	48
ABBILDUNG 3.3.11 AUSSCHNITT AUS DER ROTEN PULPA VON MAUS 2 IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	49
ABBILDUNG 3.3.12 KNOCHENMARK VON MAUS 1 IM SEMIDÜNNSSCHNITT.....	51
ABBILDUNG 3.3.13 DAS KNOCHENMARK VON MAUS 2 IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	51
ABBILDUNG 3.3.14 DAS KNOCHENMARK VON MAUS 3 IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	52
ABBILDUNG 3.3.15 DAS KNOCHENMARK VON MAUS 4 IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	52
ABBILDUNG 3.3.16 DAS KNOCHENMARK VON MAUS 5 IM SEMIDÜNNSSCHNITT. ....	53
ABBILDUNG 3.3.17 KNOCHENMARK VON MAUS 1 IM FEINSCHNITT. ....	54
ABBILDUNG 3.3.18 KNOCHENMARK VON MAUS 5 IM FEINSCHNITT. ....	55
ABBILDUNG 3.3.19 LEBER VON MAUS 1 IM PARAFFINSCHNITT. ....	57
ABBILDUNG 3.3.20 SEMIDÜNNSSCHNITT DER LEBER VON MAUS 1.....	57

---

ABBILDUNG 3.4.1 SEMIDÜNNSSCHNITTBILD DER MILZ EINER NOD/SCID MAUS.....	59
ABBILDUNG 3.4.2 NACHWEIS DES CD3-ANTIGENS IN DER MILZ EINER NOD/SCID KONTROLLMAUS.....	60
ABBILDUNG 3.4.3 SEMIDÜNNSSCHNITT DER MILZ EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	62
ABBILDUNG 3.4.4 MILZGEWEBE EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE IN DER ÜBERSICHT.....	62
ABBILDUNG 3.4.5 PEROXIDASE REAKTION IN DER MILZ EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	63
ABBILDUNG 3.4.6 NACHWEIS DES CD3-ANTIGENS IN DER MILZ EINER MAUS DER GMTR-GRUPPE.....	63
ABBILDUNG 3.4.7 KAPSELNAHES MILZGEWEBE EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	64
ABBILDUNG 3.4.8 NACHWEIS DES (T)CD34-ANTIGENS IN DER MILZ EINER MAUS DER GMTR-GRUPPE.....	64
ABBILDUNG 3.4.9 NACHWEIS DES (FL)CD34-ANTIGENS IN DER MILZ EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	66
ABBILDUNG 3.4.10 MILZGEWEBE EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	67
ABBILDUNG 3.4.11 LEBERGEWEBE EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	68
ABBILDUNG 3.4.12 SEMIDÜNNSSCHNITT DER LEBER EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	68
ABBILDUNG 3.4.13 SEMIDÜNNSSCHNITT DER LEBER EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	69
ABBILDUNG 3.4.14 NACHWEIS DES (T)CD34-ANTIGENS IN DER LEBER EINER MAUS AUS DER GMTR-GRUPPE.....	69
ABBILDUNG 3.4.15 LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	72
ABBILDUNG 3.4.16 LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	72
ABBILDUNG 3.4.17 LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	73
ABBILDUNG 3.4.18 LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	73
ABBILDUNG 3.4.19 NACHWEIS DES CD3-ANTIGENS IN DER LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	74
ABBILDUNG 3.4.20 LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	74
ABBILDUNG 3.4.21 NACHWEIS DES (FL)CD34-ANTIGENS IN DER LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	75
ABBILDUNG 3.4.22 NACHWEIS DES (FL)CD34-ANTIGENS IN DER LEBER EINER MAUS DER GMFL-GRUPPE.....	75
ABBILDUNG 3.4.23 NACHWEIS DES (FL)CD34-ANTIGENS IN DER LEBER EINER MAUS AUS DER GMFL-GRUPPE.....	76
ABBILDUNG 4.8.1 VARIANTEN DES CD34-MOLEKÜLS.....	93

# TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 HÄMATOLOGISCHER STATUS UND DIAGNOSE VON 10 MÄUSEN, DIE ALS SEKUNDÄRE EMPFÄNGERTIERE "GEPOOLTES", HU dLNGFR TRANSDUZIERTES KNOCHENMARK VON 5 SPENDERTIEREN ERHALTEN HATTEN. DIE „GEPOOLTEN“ KNOCHENMARKZELLEN WAREN ENTWEDER AUF DER BASIS VON MAGNETISCHER IMMUNAFFINITÄT ANGEREICHERT (MACS-GRUPPE) ODER NICHT SELEKTIONIERT (NS-GRUPPE) WORDEN.....	39
TABELLE 2 MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER MILZ VON MÄUSEN DER MACS-GRUPPE.....	41
TABELLE 3 MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER MILZ VON MÄUSEN DER NS-GRUPPE.....	41
TABELLE 4 MORPHOMETRISCHE ANALYSE DER SEMIDÜNNSSCHNITTE VON KNOCHENMARK DER MÄUSE IN DER MACS-GRUPPE.....	50
TABELLE 5 LEBERBEFUNDE VON MÄUSEN DER MACS-GRUPPE.....	56
TABELLE 6 MORPHOMETRISCHE MILZBEFUNDE IN DER „GRAFT-VERSUS-HOST“ KONSTELLATION (GMTR-GRUPPE).....	61
TABELLE 6A ZYTOCHEMISCHE MILZBEFUNDE IN DER GMTR-GRUPPE.....	61
TABELLE 7 MORPHOMETRISCHE MILZBEFUNDE IN DER „GRAFT-VERSUS-HOST“ KONSTELLATION (GMFL-GRUPPE).....	65
TABELLE 7A ZYTOCHEMISCHE MILZBEFUNDE IN DER GMFL-GRUPPE.....	66
TABELLE 8 LEBERBEFUNDE IN DER GMTR-GRUPPE.....	71
TABELLE 9 LEBERBEFUNDE IN DER GMFL-GRUPPE.....	71
TABELLE 10 DIAGNOSTISCHE KRITERIEN FÜR EINE PRÄLEUKÄMIE BEI DER MAUS.....	90

# 1. EINLEITUNG

**Arbeitshypothese:** *Die Maus liefert nur dann ein brauchbares Modell für die experimentelle Hämatologie, wenn neben den zytologischen Entsprechungen zum myeloischen System des Menschen bestimmte speziesspezifische Unterschiede in der Blutbildung verstanden werden wie die Rolle der Milz für die Manifestation von Leukämien.*

Beim erwachsenen Menschen befindet sich das blutbildende Gewebe als rotes Knochenmark in den zentralen Anteilen des Skeletts also in Wirbelkörpern, Rippen, Brustbein, Becken, Schulterblatt und proximalen Anteilen von Oberarm- und Oberschenkelknochen (Russel et al.,1966). Dieses rote Knochenmark ist ein weiches Gewebe, das aus Blutzellen, ihren Vorläufern und sog. Stromazellen besteht. Zusammen mit Fettzellen und Blutgefäßen ist es zwischen Knochenbälkchen eingebettet sind. Die Blutzellen und ihre Vorläufer repräsentieren in ihrer Gesamtheit das myeloische System im Knochenmark.

Das Volumenverhältnis von hämatopoetisch aktiven Zellen zu Fettzellen im roten Knochenmark wird durch den Begriff Zellularität ausgedrückt. Ein normozelluläres Knochenmark im Erwachsenenalter des Menschen enthält 62 Vol.%  $\pm$  11 Vol.% hämatopoetische- und 26 Vol.%  $\pm$  9 Vol.% Fettmarkanteile (Frisch und Bartl,1999). Eine Hyperzellularität des Knochenmarks beim Menschen, d. h. eine erhebliche Zunahme an blutbildenden Zellen im Knochenmark, sieht man reaktiv bei Zuständen mit hohem Blutzellbedarf, wie z.B. bei hämolytischer Anämie und chronischer Entzündung, oder bei neoplastischen Prozessen wie myeloproliferativen Syndromen (reifzellig) und meist auch bei akuten Leukämien (unreifzellig). Die gesteigerte Produktion von Blutzellen unter solchen Bedingungen ist also verbunden mit einer gleichzeitigen Reduktion der Fettzellen im Knochenmark (Carter und Jackson ,1962). Zusätzlich zu der räumlichen Ausdehnung des blutbildenden Gewebes kommt es bei den genannten reaktiven Knochenmarksprozessen noch zu einer Verkürzung der Zellzyklus- und Reifungszeiten der Zellen. Eine extramedulläre Hämatopoese z.B. in

Leber und Milz, wird aber bei hoher Blutzellproduktion von Patienten mit den obengenannten Erkrankungen relativ selten gefunden.

Bei der blutgesunden Maus hingegen sind im Gegensatz zum Menschen die Markräume fast vollständig mit hämatopoetischen Zellen erfüllt (Endicott und Gump ,1947; Brecher et al.,1948). Es finden sich also kaum Fettmarkanteile und das Knochenmark ist natürlicher Weise hyperzellulär. Dieser Mangel an einer räumlichen Knochenmarkreserve für Zustände erhöhten Blutzellbedarfs, wie z.B. bei Hämolyse und akuter Entzündung, mag die besondere Rolle der Milz für die Blutbildung bei murinen Spezies erklären.

Ein illustratives Modell für die Rolle der murinen Milz zu Zeiten eines hohen Blutzellbedarfs ist durch die hämolytische Anämie gegeben, wie sie nach Verabfolgung von Phenylhydrazin auftritt. Diese Substanz ruft eine Hämolyse durch Denaturierung von Hämoglobin und durch die Fragmentierung älterer Erythrozyten hervor. Die erythropoetische Reaktion der Milz wird durch den plötzlichen Abfall des Hämatokrits und die damit verbundene Ausschüttung großer Mengen von Erythropoetin hervorgerufen. Die Milz erfährt dabei eine Zunahme ihrer natürlichen Größe um ein Mehrfaches, während das Knochenmark nur mäßig reagiert (Fredrickson und Harris ,2000). Die hämatopoetischen Zellpopulationen jedoch, welche auf die durch Phenylhydrazin induzierte Hämolyse reagieren und erythrozytäre wie megakaryozytäre Marker exprimiert, ist in beiden Organen gleichermaßen vertreten (Vannucchi et al.,2000).

Auch für präleukämische und leukämische Prozesse bei der Maus spielt die Milz insofern eine ganz besondere Rolle als diese in dem Organ der physiologischen extramedullären Blutbildung beginnen sollen und auf dieses beschränkt sein können (Perkins, 1989).

Im Gegensatz zur Situation beim Menschen sind also für die hämatologische Diagnostik bei der Maus nicht nur Material des Knochenmarks sondern auch der Milz und Kenntnis ihrer Größe erforderlich. Die histologische Beurteilung der Qualität der extramedullären Hämatopoese in der Milz erfordert häufig einen besseren Zellerhalt als er mit paraffinhistologischer Technik gegeben ist. Da auch die Leber unter bestimmten Bedingungen eine extramedulläre Blutbildung aufweisen kann, wurde

auch sie in diese Untersuchung über das myeloischen Systems der Maus eingeschlossen.

Will man die speziesspezifischen Besonderheiten eines Zellerneuerungssystems wie es das myeloische darstellt, herausarbeiten, bedarf es experimenteller Eingriffe. Diese wurden im vorliegenden Fall an der normalen und immundefizienten Maus durch Knochenmarktransplantation mit transgenen Stammzellen im Heinrich-Pette-Institut<sup>1</sup> des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die vorgelegte morphologische Studie soll vor allem:

1. ein Beispiel für die Leukämiemanifestation in der Maus geben,
2. aufzeigen, wie sich bestimmte transgene hämatopoetischen Stammzellen in einem immuninkompetenten Organismus nach Art einer „Graft-versus-Host“ Reaktion verhalten,
3. die physiologischen Grundlagen für die prinzipiellen Unterschiede im myeloischen System von Maus und Mensch darlegen und
4. damit einen Beitrag zur vergleichenden Hämatologie liefern.

---

<sup>1</sup>Ich danke der Arbeitsgruppe um Professor Dr. med. Christopher Baum, früher Heinrich-Pette-Institut jetzt Medizinische Hochschule Hannover, für die Überlassung von Organproben zur morphologischen Untersuchung.

## 2. MATERIAL UND METHODE

### 2.1 Stammzelleexperimente

Im Heinrich-Pette-Institut wurden hämatopoetische Stammzellen mit verschiedenen Markergenen transduziert, die auch in der Gentherapie und in der mit ihr in Zusammenhang stehenden experimentellen Forschung benutzt werden. Diese gentechnisch veränderten Stammzellen wurden zum einen nach Konditionierung durch eine letale Ganzkörperbestrahlung (Dosis 10Gy) mittels einer Knochenmarkstransplantation (KMT) den Empfängertieren übertragen oder zum anderen immunkompetenten Mäusen transplantiert.

Bei den Transgenen handelte es sich um die verkürzte (“truncated” oder “deleted”) Form des low affinity nerve growth factor receptor (dLNGFR) des Menschen, welcher bereits in klinischen Studien mit T-Zellen angewandt worden war (Bonini et al.,1997) und zwei Formen des CD34-Antigens des Menschen (hu CD34). Die beiden hu CD34-Antigene bestanden aus dem kompletten Molekül, dem “full-length protein” (hu flCD34), und einer natürlichen Splicevariante (“truncated”), welcher der überwiegende Teil der zytoplasmatischen Domäne für die Signaltransduktion fehlt (hu tCD34) (Fehse et al.,2000). Die Vektoren, welche für diese Marker Gene kodierten, hatten identische Kontrollelemente (Spleen focus forming virus particles SFFVp, long terminal repeats LTR, murine embryonic stem cell virus MESV leader). Sie wurden als replikationsdefekte Überstände mit definierter Infektionsrate benutzt, so ein bis zwei Integrationen der Vektoren in der Hauptmenge der transplantierten Zellen hervorrufend (Fehse et al., 2000).

Erstaunlicherweise war der dLNGFR kräftig in B-Zellen einiger Mäuse expremiert und nahezu überhaupt nicht in Erythrozyten. Um eine langfristige Beobachtung der Hämatopoese aus dLNGFR markierten Stammzellen zu ermöglichen, wurden die Knochenmarkszellen der primären Empfängertiere gewonnen und in Serie weiter transplantiert. Die Knochenmarkszellen wurden vor der Transplantation in weitere Kohorten von bestrahlten (10 Gy) Empfängertieren gepoolt und entweder nicht

selektioniert (NS Gruppe) oder aber auf der Basis von magnetischer Immunaffinität (**m**agnetic **a**ctivated **c**ell **s**orting) angereichert (MACS Gruppe).

Bis zu 6 Monate nach Transplantation in bestrahlte (10Gy) Empfängertiere des genetischen Typs C57Bl/6J waren die Expressionsraten von hu tCD34 und hu fCD34 weitgehend konstant und vergleichbar gefunden worden (Li et al.,2002). Damit war eine effektive Markierung von Progenitorzellen für multiple Zelllinien oder ein verlängertes Überleben von Vorläuferzellen für einzelne Zelllinien anzunehmen.

Im Heinrich-Pette-Institut wurden transgene (hu t/fCD34) Milzzellen immunkompetenter Mäuse des Stammes (C57Bl/6J) immuninkompetenten „non obese diabetic/severe combined immunodeficiency disease“ (NOD/SCID) Mäusen transplantiert. Die beiden CD34-Antigene dienten vor der Transplantation der Zellanreicherung durch Immunaffinität und MACS. Die Mäuse gliederten sich in die Gruppen GMTR und GMFL, wobei **G** für „graft“, **M** für MACS, **TR** für „truncated“ und **FL** für „full-length“ stehen. In einzelnen wurden die Milzen der Tiere mit hu fCD34- (n=4) und hu tCD34- (n=4) transduziertem Knochenmark entnommen und ihre Zellen über MACS auf CD34 angereichert:

- hu fCD34:  $1,5 \times 10^7$  Zellen nach MACS, von diesen  $3 \times 10^6$  Zellen 4 NOD/SCID -Mäuse transplantiert
- hu tCD34:  $1,1 \times 10^7$  Zellen nach MACS,  $2,75 \times 10^6$  Zellen 4 NOD/SCID-Mäuse transplantiert

In beiden Gruppen wurden FACS Analysen<sup>2</sup> von Leber und Milz durchgeführt.

## 2.2 Paraffin- und Semidünnschnitthistologie

Knochenmark ist bei der Maus am besten postmortal aus den Femora zu gewinnen. Jeder dieser langen Röhrenknochen enthält im Normalfall in seiner zentralen Kavität rund  $2 \times 10^7$  Zellen in Form eines Zylinders, der weitgehend frei von Knochen trabekeln ist. Diese Zylinder wurden nach Längsspaltung des Knochens in toto herausgelöst,

<sup>2</sup> Die Analysen wurden durch Frau Dr. Claudia Lange und Herrn Priv. Doz. Boris Fehse in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Ich danke für die Überlassung der Befunde. Leider konnten sie nicht mit den sehr viel weniger sensitiven immunzytochemischen Ergebnissen verglichen werden.

um Quetschpräparate zu erstellen, oder in situ fixiert, um einer weiteren morphologische Aufarbeitung zugeführt zu werden.

## **2.2.1 Färbungen der Knochenmarkpräparate**

### **2.2.1.1 *Panoptische Färbung n. Pappenheim (=kombinierte May-Grünwald-Giemsa- Färbung)***

Die Quetschpräparate wurden nach Pappenheim gefärbt. Dazu wurden die Präparate auf einer Färbebank mit konzentrierter May-Grünwald Lösung beschichtet. Diese Lösung enthält Methanol, sodass die Präparate während des Färbevorgangs fixiert werden. Nach 3 Minuten wurden die Lösungen abgekippt und mit einer 1:1 mit Aqua dest. verdünnten May-Grünwald Lösung für 1 Minute erneut überschichtet. Anschließend wurden die Präparate mit einer Giemsa-Lösung für 15 Minuten gefärbt und danach mit Aqua dest. gespült.

### **2.2.1.2 *Nachweis der alkalischen Leukozyten- Phosphatase; Leucognost®-ALPA***

Die alkalische Leukozytenphosphatase wurde mit dem Kit Leucognost® ALPA nachgewiesen. Die alkalische Leukozytenphosphatase (AP) katalysiert die Hydrolyse von Phosphatester im alkalischen Milieu. Aus 1-Naphthylphosphat freigesetztes 1-Naphthol wird mit einem Diazoniumsalz zu einem braunen Azofarbstoff gekoppelt der entsprechend der Lokalisation und der Aktivität der AP in der Zelle präzipitiert.

Die Gegenfärbung der Präparate erfolgt für 5 Minuten in Mayers Hämalaunlösung. Nach Bläuung der Präparate unter fließendem Wasser wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt eingedeckt.

### **2.2.1.3 *Peroxidase Reaktion***

Peroxidasen sind lysosomale Katalasen. Sie katalysieren durch die H-Ionen des Wasserstoffperoxids die Oxidation von Phenolen und aromatischen Aminen. Die Peroxidase Reaktion dient dem Nachweis myeloischer Zellelemente d.h. aller Zellen der neutrophilen- und der eosinophilen Reihe ab den Promyelozyten, die in ihren Granula Peroxidase erhalten.

Die luftgetrockneten Knochenmarkpräparate wurden in einer Fixationslösung aus Formol und unvergälltem 96%igem Alkohol im Verhältnis 1:10 verdünnt und für 30 Sekunden fixiert. Die Präparate wurden dann in Leitungswasser und Aqua dest.

gespült. Anschließend erfolgte die Reaktion mit dem Peroxidase Reagenz für 10 Minuten.

## **2.2.2 Färbungen der Paraffinschnitte**

Auf einem Schlittenmikrotom wurden 4µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte werden mit Xylol und durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert.

### **2.2.2.1 Hämalaun- Eosin-Färbung**

Die Schnitte wurden für 3 Minuten zur Kernfärbung in Hämalaun nach Mayer gestellt, danach in Aqua dest. gespült und anschließend für 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut. Die Zytoplasmafärbung erfolgte mit 0,5%igem Eosin; Nach Spülung und Entwässerung in einer aufsteigender Alkoholreihe wurde über Xylol mit Eukitt eingedeckt.

### **2.2.2.2 Eisennachweis mit Berliner Blau Reaktion**

Eisen III-Ionen werden mit gelben Blutlaugensalz (Kaliumhexacyanoferrat II) nachgewiesen. Es wird nur ionisiertes Eisen III erfasst, damit das Speichereisen im Gewebe. Die entparaffinierten Schnitte wurden für 15 Minuten in einer Lösung aus 2%igem Kaliumhexacyanoferrat II (gelbes Blutlaugensalz) mit 1%iger HCl (Salzsäure) inkubiert. Anschließend erfolgt die Kernfärbung für 1-2 Minuten in 0,1%igem Kernechtrot.

Die Schnitte wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt eingedeckt.

### **2.2.2.3 Immunhistologie**

#### **Verwendete Substanzen und Lösungen**

- ABC Kit Vectastain Ak 5000 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B/2.5ml TBS:ABC Komplex (Linavis, Wertheim)
- AP-Entwicklungslösung 150ml 300mg Natrium-Nitrit+ 7,5ml Aqua dest.+ 300µl Neufuchsin+ 150ml Trispuffer pH 8,24+ 20-30mg Naphtol AS+ 750µl Dimethylformamid+ 200µl Tween
- APAAP (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase) (Dako, Glostrup, DK)
- Dako Antibody Diluent (Dako, Glostrup, DK)
- Dimethylformamid (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)

- EDTA (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)
- EDTA-Puffer pH 8 0,37g EDTA (Sigma) ad. 1 Liter Aqua dest. , mit 1m NaoH (Natronlauge) einstellen.
- Kaninchen-anti Ratte (Dako, Glostrup, DK)
- Kaninchen-Serum (Dako, Glostrup, DK)
- Levamisol (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)
- Mayers Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Naphtol AS (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)
- NaCl (Kochsalz) (JT Baker,NJ, USA)
- Natrium-Nitrit (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)
- Neufuchsin (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)
- Trispuffer pH 7,6 30,29g Tris+43,55g NaCl+ ~100ml 2n HCl; mit 2n HCl pH einstellen ad. 5 Liter Aqua dem.
- Trypsin (Biochrom, Berlin, Germany)
- Tween (Sigma- Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)

### **Nachweis des CD34-Antigens**

Für den Nachweis des CD34-Antigens wurden biotinylierte IgG1 Antikörper der Maus gegen humanes Antigen (AHS3409) von Biosource Int.® verwendet. Dieses Immunglobulin präzipitiert das 110kD CD34-Antigen.

Nach Entparaffinierung der auf Marienfeld Histoband® beschichteten Leber- und Milzschnitte erfolgte eine Spülung in TBS-Puffer (pH 7,6) mit anschließender Inkubation in einer 0,1%igen Trypsin/ TBS-Lösung bei 37°C für 10 Minuten. Ein Reaktionsstop erfolgte durch Überführung der Schnitte in fließendes Leitungswasser. Nach erneutem Spülen in TBS-Puffer für 2x5 Minuten, wurde der 1:10 verdünnte, biotinylierte Maus-anti-Human CD34-Antikörper in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte nach der Spülung in TBS-Puffer, zwecks Signalverstärkung durch Bildung eines Alkalischen Phosphatase Anti-Alkakische Phosphatase-Komplexes (APAAP-Komplexes), die Beschichtung der Schnitte mit APAAP für 30 Minuten bei RT. Vor und nach der Inkubation mit Vectastain ABC Kit AP für 30 Minuten, wurden die Schnitte mit TBS-Puffer gespült. Die 30 minütige Entwicklung der alkalischen Phosphatase (AP) erfolgte unter

Ausschluß von Licht. Bei allen Milzpräparaten musste bei diesem Schritt zur AP zusätzlich 60mg Levamisol hinzugegeben werden, da die endogene AP der Milz in der Vorbehandlung nicht deaktiviert wird. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mittels 1:1 verdünnter Hämalaunlösung für 10 Sekunden.

### **Nachweis des CD3-Antigens**

Das CD3-Antigen ist 16-28kDa schwer und besteht aus mind. 5 versch. Polypeptidketten (Delta-, Epsilon-, Eta-, Gamma- und Zeta-Ketten). Das Antigen ist eng mit dem T-Zellrezeptor (TCR) assoziiert (Clevers et al. 1988). Als solches wird es auf Thymozyten, reifen T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert.

Für den Nachweis des CD3-Antigens wurden Kaninchen IgG1- $\kappa$  Antikörper gegen Ratte (NCL-CD3-12) von Novo Castra® verwendet. Diese richten sich gegen die 25kDa schwere Epsilon-Kette des CD3-Komplexes.

Die Entparaffinierung der Leber- und Milzschnitte erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe. Die Schnitte wurden dann in EDTA-Puffer für 5x2 Minuten in der Mikrowelle vorbehandelt und anschließend für 20 Minuten abgekühlt. Nach Spülen in TBS-Puffer für 3x5 Minuten, erfolgte die Inkubation mit Kaninchen Normalserum (1:10 verdünnt) bei RT für 30 Minuten. Direkt im Anschluss wurden die Schnitte mit einem prim. AK bei RT für 1 Stunde beschichtet und inkubiert. Die 30 minütige Inkubation mit dem Kaninchen-anti-Ratte AK 1:200 bei RT erfolgte nach erneutem Spülen in TBS-Puffer. Vor und nach Verwendung des ABC Komplexes wurde gespült. Die Entwicklung der AP erfolgt unter Lichtausschluss für 30 Minuten, wobei bei den Milzschnitten hier ebenfalls Levamisol zur Deaktivierung der milzeigenen endogenen AP benutzt wurde. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt mit Hämalaun.

### **2.2.3 Einbettung in Epoxydharz und Färbung**

Die Gewebeproben von Leber, Milz und Knochenmark wurden in 3%igem Glutardialdehyd (Merck) in 0,1mol Natriumphosphatpuffer (Merck) für 24 Stunden fixiert. Die Nachfixation des Materials erfolgt mit 1%igem Osmiumtetroxid in 0,1mol Natriumphosphatpuffer mit 0,1 mol Saccharose für 2 Stunden. Anschließend erfolgte

die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Glycidether (Serva). Semidünnschnitte (1 bis 2µm dick) wurden aus den Blöcken auf einem Mikrotom der Firma Laica angefertigt.

### **2.2.3.1 Die Färbungen der Semidünnschnitte Toluidinblau Pyroninrot**

Die Färbung der Kunststoffschnitten erfolgte mit Toluidinblau und Pyroninrot nach Ito und Winchester (1963).

### **Berlinerblau Reaktion nach Perls**

Für die Berliner Blau Reaktion müssen die Semidünnschnitte enteponisiert werden. Hierzu werden die Schnitte in eine gesättigte Natriummethylat-Lösung (Merck) in Methanol für 10 Minuten gestellt. Danach wurden die Schnitte in einem Gemisch aus gesättigtem Natriummethylat und Methanol/ Acetan 1:1 für 5 Minuten gestellt. Anschließend wurden die Schnitte mehrfach in Aceton gespült bis keine Niederschläge zu mehr zu erkennen waren. Zuletzt wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest. geführt.

Nach Erwärmung einer Kaliumferrocyanid-Lösung auf 60°C und anschließender Filtration derselben, erfolgte eine 15 minütige Färbung bei 60°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült und die Kerne für 10-45 Minuten in 0,1%igen Kernechtrot gefärbt. Nach Spülung in 1%iger Essigsäure und Aqua dest. für 3x1 Minute, wurden die Schnitte auf einer 40°C warmen Platte getrocknet, kurz in Xylol getränkt und mit Eukitt eingedeckt.

## **2.3 Elektronenmikroskopie <sup>3</sup>**

Für die ultrastrukturelle Untersuchung wurden von den in Glycidether eingebetteten Blöcken Feinschnitte von 50-80nm Dicke mit dem Ultramikrotom Supercut 2050 (Reichert-Jung) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert und mit dem Transmissionselektronenmikroskop von der Firma Zeiss untersucht.

---

<sup>3</sup> Frau Bärbel Schäfer und Herrn Klaus Siebert, Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, danke ich für die elektronenmikroskopische Aufarbeitung ausgewählten Materials.

## 2.4 Morphometrie

Myelogramme von Semidünnschnitten wurden von farbigen Mikrofotographien ermittelt, die mit einem 63er Ölimmersionsobjektiv (Sekundärvergrößerung 2,5x) aufgenommen worden waren und als Diapositiv auf Papier projiziert wurden. Klassifizierte Elemente wurden je nach Zugehörigkeit mit unterschiedlichen Farbstiften markiert und am Ende ausgezählt. Megakaryozyten wurden zudem entweder unter Zuhilfenahme eines Meßokulars direkt in den Semidünnschnitten oder auf Mikrophotographien gezählt und auf eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> bezogen. Paraffin- und Semidünnschnitte der Milz wurden mit dem Integrationsokular der Firma Zeiss morphometriert. Ermittelt wurden die volumetrischen Anteile von roter und weißer Pulpa sowie der Hämatopoese in der roten Pulpa. Blastäre Elemente der Hämatopoese wurden auf alle kernhaltigen Zellen des jeweiligen Organs bezogen.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 Das Knochenmark der normalen Maus

#### 3.1.1 Zellularität

Im Begriff der Zellularität drückt sich das Volumenverhältnis von hämatopoetisch aktiven zu Fettzellen im roten Knochenmark aus. Das Knochenmark zeigte im Femur der Maus einen extrem hohen Zellgehalt (Abb. 3.1.1, 3.1.4, 3.1.6). Nur höchst selten waren Fettzellen eingestreut. Das retikuläre Gerüst des Knochenmarks, in dem die hämatopoetischen Zellen und die Gefäße liegen, wird von sog. Stromazellen und von Makrophagen bereitgestellt.

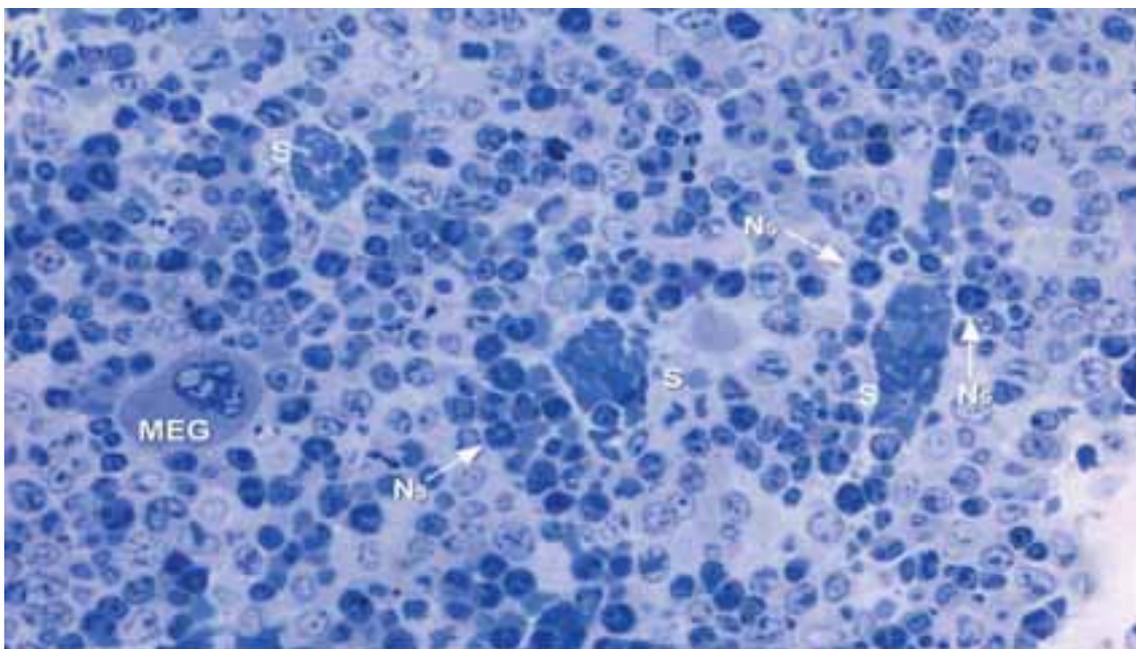
#### 3.1.2 Gefäße

Die spezifischen Gefäße für die Ausschwemmung der differenzierten Zellen ins Blut, sind die Sinusoide. Diese waren von sehr flachen Endothelzellen gesäumt, die elongierte Kerne mit mäßig dichtem Chromatin aufwiesen. Die Sinusoide können entweder aufgeweitet und von Erythrozyten erfüllt (Abb. 3.1.1) oder aber von proliferierenden Vorläuferzellen von außen komprimiert sein (Abb. 3.1.4). An Blutgefäßen waren außerdem vereinzelte Arterien und einige wenige Arteriolen anzutreffen. Löffelte man unter der Stereolupe das Knochenmark nach der Fixierung aus der Cavität des Femurs heraus, sah man häufig ein großes zentrales und in Längsrichtung des Knochens verlaufendes Gefäß, das sich aufgrund seines Angefülltseins mit Erythrozyten als eine zentrale Vene darstellte, welche die Sinusoide drainiert.

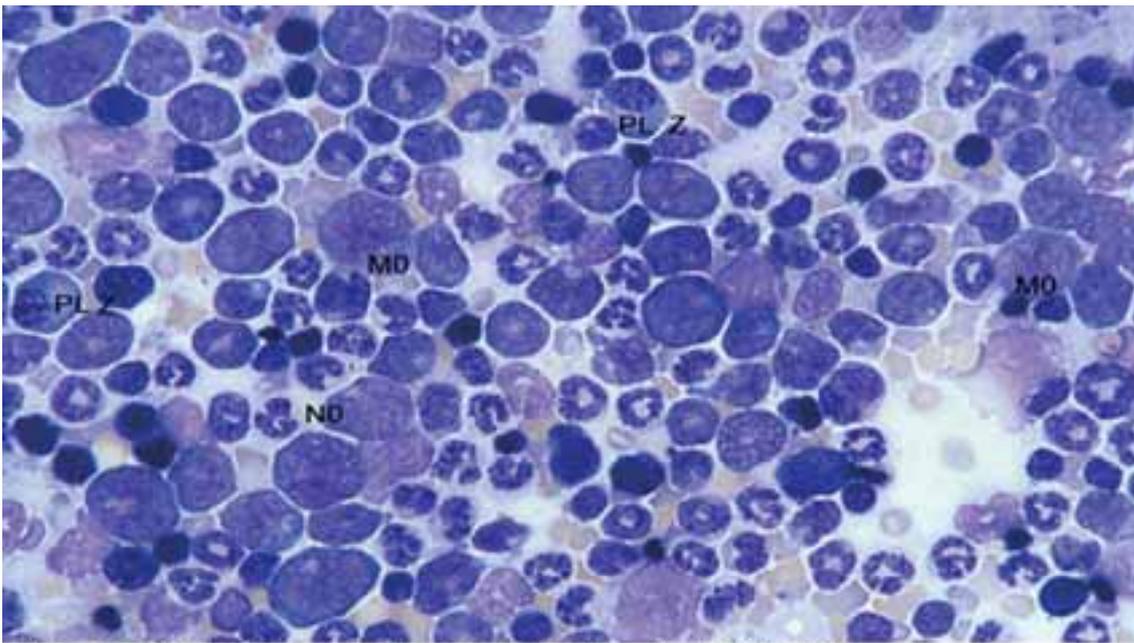
#### 3.1.3 Stromazellen und Makrophagen (Stz, MP)

Die Stromazellen lassen sich durch Nachweis der alkalischen Phosphatase (Abb. 3.1.3) und die Makrophagen durch die saure Phosphatase oder, wenn der Eisenspeicher des Knochenmarks gefüllt ist, durch die Berliner Blau Reaktion (Abb. 3.1.4) selektiv darstellen. Beide Zelltypen waren von dendritischer Gestalt und

erstreckten sich mit ihren schlanken Fortsätzen zwischen die Blutzellvorstufen. Die Makrophagen enthielten als einen weiteren natürlichen Marker neben dem Speichereisen häufig kristalloide Einschlüsse (Abb. 3.1.5, 3.1.11). Die Makrophagen waren vor allem mit Erythroblasten assoziiert und phagozytierten ihre ausgeschleusten Kerne. Als erythroklastische Elemente können sie auch mit phagozytierten Erythrozyten angefüllt sein und so im Sinuslumen liegen. Die Stromazellen hatten vor allem Granulozyten und ihre Vorstufen in ihrer Nachbarschaft.

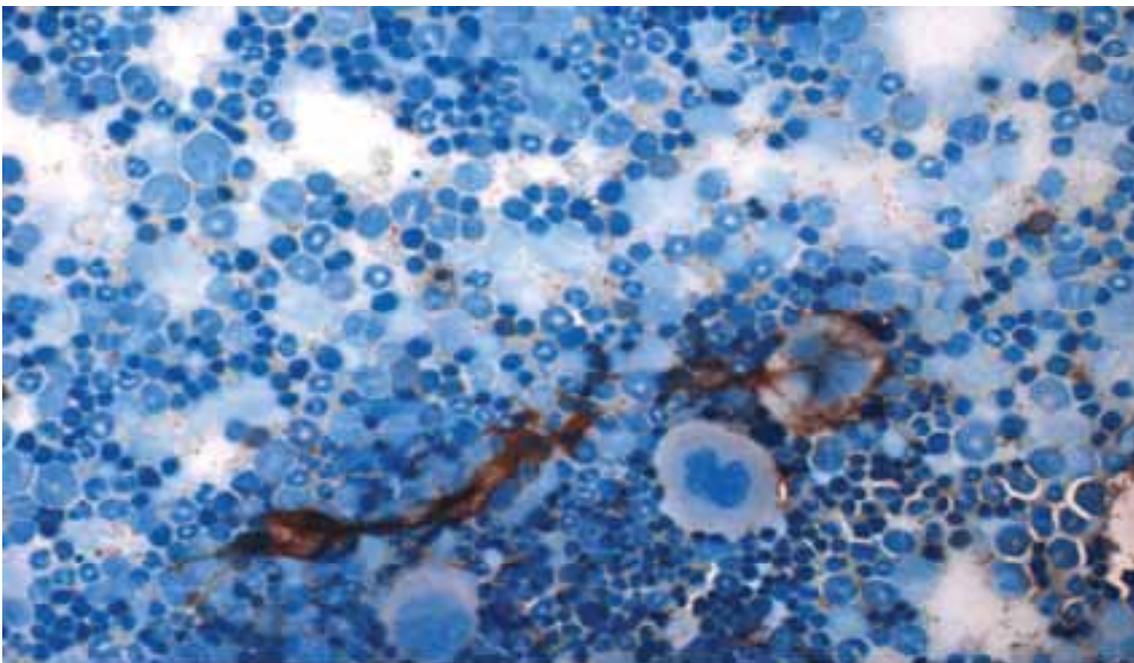


**Abb. 3.1.1 Das Knochenmark einer Balb/c Maus im Semidünnschnitt.** Die myeloischen Zellen füllen zusammen mit Gerüstzellen und Gefäßen die Markräume im Femur vollständig aus. Die Sinusoiden (S) sind mit Erythrozyten dicht angefüllt. Megakaryozyten (MEG) imponieren als Riesenzellen. Die Zellen der Myelopoese sind in allen Reifestufen vorhanden. Reife neutrophile Granulozyten (N5). Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x



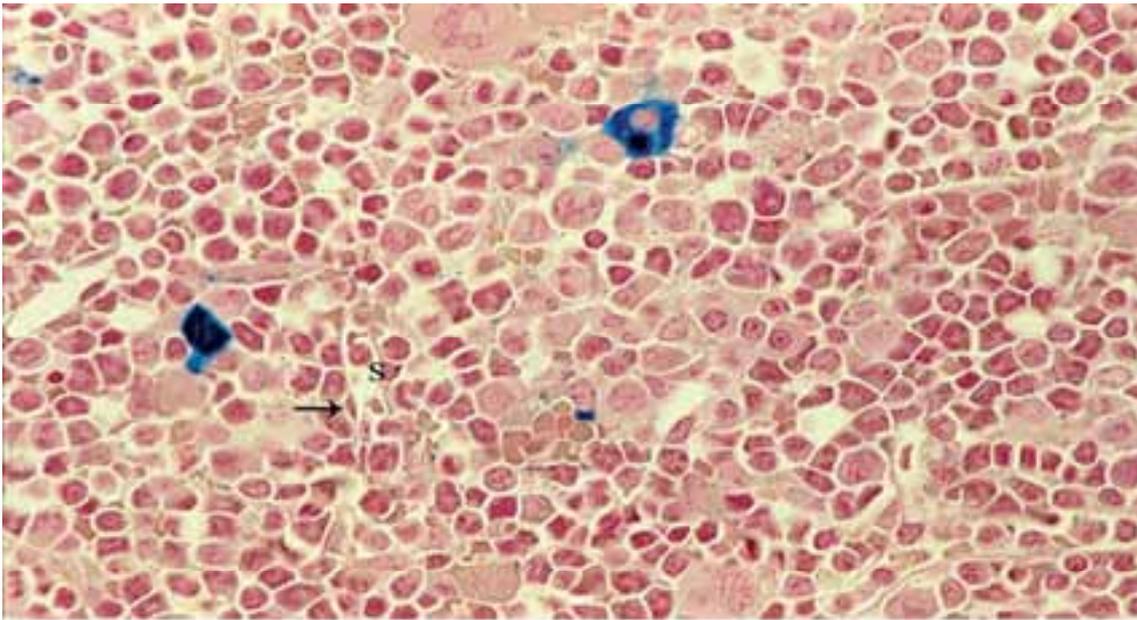
**Abb. 3.1.2 Quetschpräparat des Knochenmarks einer Balb/c Maus.**

Die Zellen liegen dicht beieinander. Die neutrophile Myelopoese ist in ihren unreifen Stadien durch Ringformen charakterisiert. Erythroblasten sind klein bis mittelgroß und von besonderer Dichte des Kerns und Zytoplasmas. Plasmazellen (PLZ) fallen durch die exzentrische Lage des Kerns und ihr basophiles Zytoplasma auf. Pappenheim Färbung. Vergr.: 2100x



**Abb. 3.1.3 Quetschpräparat des Knochenmarks einer Balb/c Maus.**

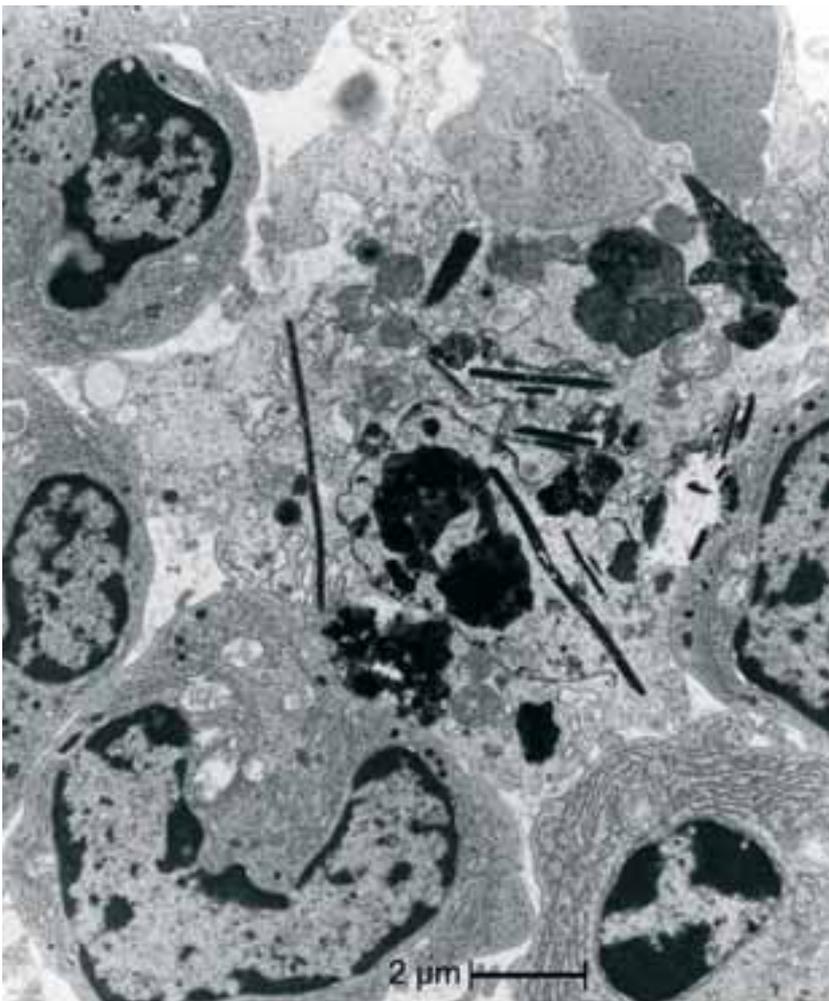
Die Stromazellen des Knochenmarks sind durch eine Reaktion der alkalischen Phosphatase dargestellt, deren Reaktionsprodukte in ihrer Dichte mit der Dicke des Präparats zunehmen. An geeigneten Stellen ist die dendritische Gestalt der Stromazellen erkennbar. Alkalische Leukozyten Phosphatase Reaktion. Vergr.: 1320x



**Abb. 3.1.4 Knochenmark einer Balb/c Maus im Semidünnschnitt nach Entplattung und Durchführung einer Berliner Blau Reaktion.**

Man sieht einzelne Makrophagen mit wenigen zumeist quer geschnittenen kleinen Ausläufern. Im blassblau angefärbten Zytoplasma sind dunkelblaue Granula und Schollen enthalten. Die Sinusoiden (S) enthalten kaum Erythrozyten und sind z.T. von außen eingedellt (→).

Gegenfärbung mit Kernechtrot. Vergr.: 1320x



**Abb.3.1.5 Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**

Die Makrophagen sind nicht nur durch die Speicherung von Eisen, hier in Form sehr elektronendichter Siderosomen erkennbar, sondern häufig auch durch ihren Gehalt an nadelförmigen Zytoplasmaeinschlüssen charakterisiert. Am unteren Bildrand links ein später Promonozyt und rechts eine Plasmazelle.  
Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

### 3.1.4 Die rote Reihe

Die Elemente der roten Reihe zeigten die ausgeprägteste Basophilie und Pyroninophilie des Zytoplasma in den Ausstrichpräparaten bzw. den Semidünnschnitten. Feinstrukturell nahm die Dichte des Zytoplasmas mit der Hämoglobinisierung zu. Die Kerne der roten Reihe waren am stärksten kondensiert, wobei die Verdichtung des Karyoplasmas mit der Ausdifferenzierung zu Normoblasten zunahm. Die Kerne waren weniger gerundet und unregelmäßiger

gestaltet als in der Erythropoese des Menschen und lagen auch häufiger exzentrisch im Zytoplasma. Das Karyoplasma war bei den reiferen Formen ausgesprochen grobschollig. Auch schwand die Basophilie mit vollständiger Ausreifung nicht gänzlich, so dass anders als im Knochenmark des Menschen orthochromatische Normoblasten nicht vorkamen. Im einzelnen ließen sich die folgenden Elemente entsprechend ihrer Reife differenzieren, wenngleich es alle möglichen Übergangsformen gab.

#### **3.1.4.1 Proerythroblasten (E0)**

Sie waren in der Reihe am größten. Ihre locker strukturierten Kerne enthielten Nukleolen. Sie ließen sich von Myeloblasten dadurch unterscheiden, daß ihr Kerngerüst dichter und ihr Zytoplasma basophiler oder pyroninophiler bzw. reicher an freien Ribosomen war (Abb. 3.1.6).

#### **3.1.4.2 Basophile Erythroblasten (E1)**

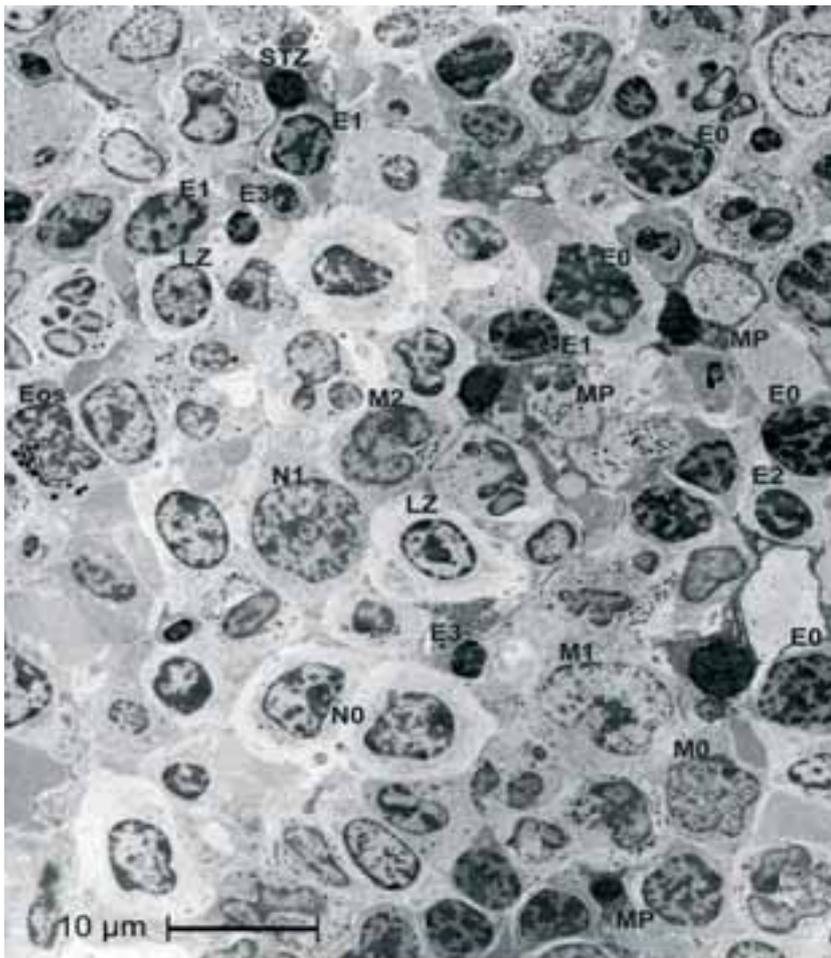
Diese waren etwas kleiner als die Proerythroblasten (Abb. 3.1.6). Die Kerne lagen in ihnen gelegentlich exzentrisch und waren variabel konfiguriert. Das Chromatin war sehr viel stärker kondensiert als in der Vorstufe.

#### **3.1.4.3 Basophile Normoblasten (E2)**

Sie waren deutlich kleiner und das Chromatin war noch viel dichter als in den Kernen der Vorstufen (Abb. 3.1.6, 3.1.7).

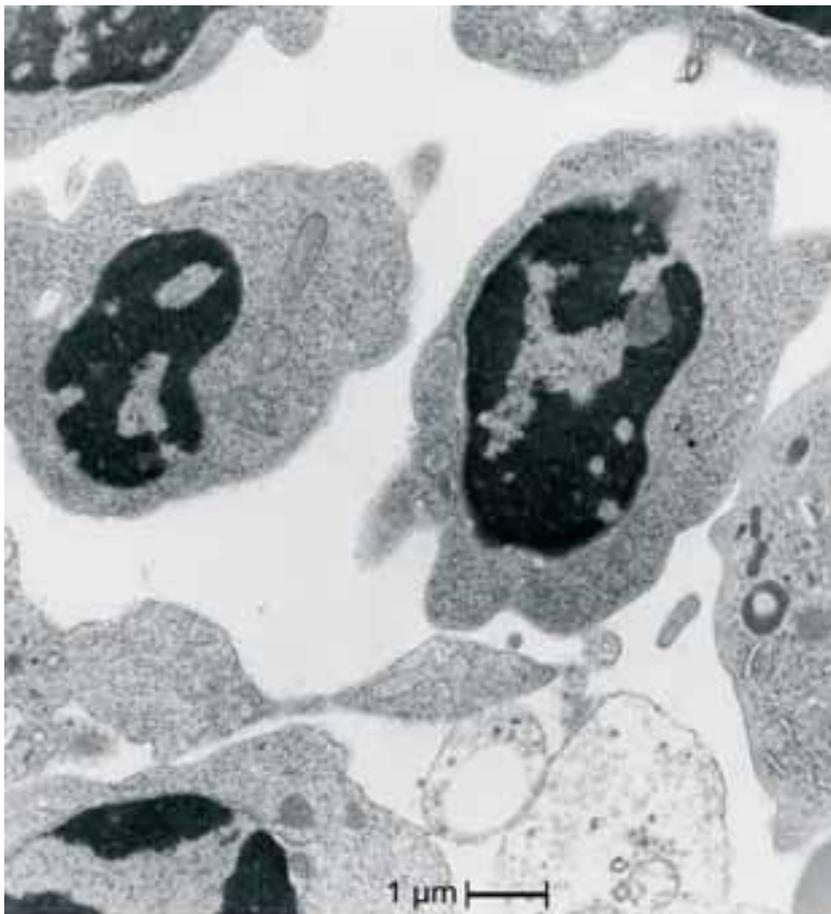
#### **3.1.4.4 Polychromatische Normoblasten (E3)**

Sie waren die kleinsten Elemente der roten Reihe (Abb. 3.1.6, 3.1.8) Ihre meist runden oder ovalen Kerne waren besonders kompakt. Im Sinne der lichtmikroskopischen Polychromasie enthielt ihr Zytoplasma Ribosomen allerdings weniger als in den Vorläuferzellen.

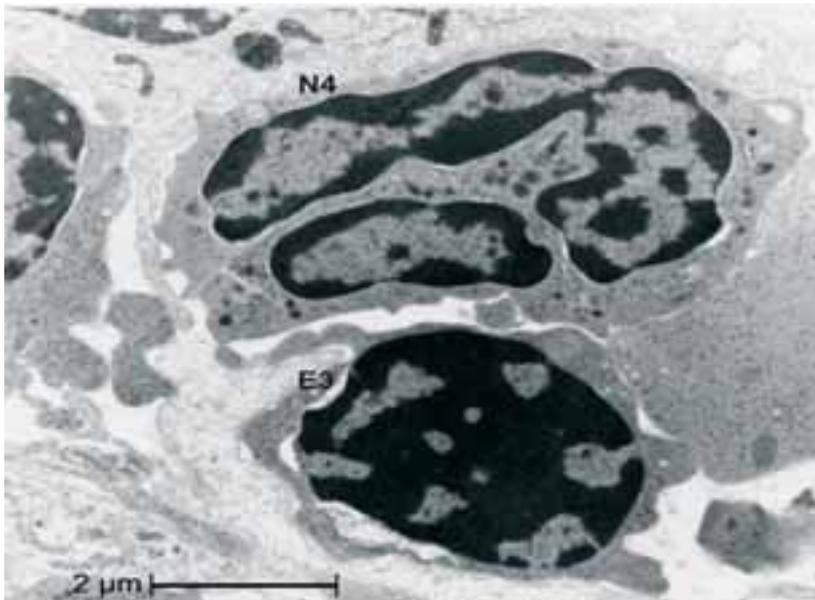


**Abb.3.1.6 Das normale Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Übersichtsbild.**

Einige der unterschiedlich differenzierten Zellen in den verschiedenen Reihen sind gemäß der Buchstaben-Zahlenfolge (E0-E3, N0-N1, M0-M2) markiert. Am rechten unteren Bildrand Ausschnitt einer sog. erythropoetischen Insel mit einem zentral gelegenen Makrophagen und Erythroblasten unterschiedlicher Reife, Stromazelle (STZ), Makrophagen (MP), eosinophiler Granulozyt (Eos), Lymphozyten (LZ). Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab



**Abb.3.1.7 Knochenmarkausschnitt einer blutgesunden Maus.** Nebeneinander liegen zwei basophile Normoblasten (E2), kenntlich an Ihren kondensierten Kernen und dem Reichtum an freien Ribosomen im Zytoplasma. Links daneben Ausschnitt eines Neutrophilen mit mehr runden azurophilen und hantelförmigen spezifischen Granula.  
Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab



**Abb.3.1.8 Knochenmarksausschnitt einer blutgesunden Maus.**  
 Unter einem stabförmigen Granulozyten mit mehr runden azurophilen und variabel konfigurierten spezifischen Granula (N4) liegt ein polychromatischer Erythroblast (E3). Diese kleinste und letzte Zelle der roten Reihe hat immer noch relativ viele Ribosomen im Zytoplasma. Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

### 3.1.5 Die neutrophile Reihe

Aus der neutrophilen Reihe gehen die neutrophilen Granulozyten hervor. Eine Besonderheit in der murinen neutrophilen Reihe stellen ringförmige Kerne dar (Abb. 3.1.2, 3.1.3, 3.1.9, 3.1.10), welche am häufigsten, da die ganzen Zellen und nicht Schnitte von ihnen vorliegen, in Quetsch- und Ausstrichpräparaten in Erscheinung traten (Abb. 3.1.2, 3.1.3, 3.1.9). Die Granulogenese begann in den Promyelozyten, indem sich Vakuolen mit granulärem Inhalt verdichteten (Abb. 3.1.10). Diese Granula stellten Azurgranula dar. Die spezifische neutrophile Granulation bestand aus kleineren variabel geformten und weniger dichten Granula (Abb. 3.1.7, 3.1.8, 3.1.12).

#### 3.1.5.1 **Myeloblasten (N0)**

Aus Myeloblasten differenzierten sich über mehrere Zwischenstufen die verschiedenen Granulozyten. Die Myeloblasten waren sensu strictu granulafrei und enthielten im basophilen Zytoplasma einen locker strukturierten Kern mit ein bis zwei deutlich erkennbaren Nukleolen (Abb. 3.1.6, 3.1.9, 3.1.11).

### **3.1.5.2 Promyelozyten (N1)**

Sie waren die größten Elemente ihrer Reihe (Abb. 3.1.6, 3.1.9, 3.1.10). In ihnen begann die Granulabildung. Der Kern war zumeist eingebuchtet und das Chromatin an der inneren Kernmembran stärker kondensiert als beim Myeloblasten. Die Nukleolen waren weniger prominent und es konnte bereits im Zentrum des Kerns eine kleine Zytoplasmainsel nachweisbar sein (Abb. 3.1.9, 3.1.10) als erstes Zeichen für das Phänomen der Ringstruktur von Kernen, welches besonders das myelo- und metamyelozytäre sowie das stabkernige Stadium auszeichnete.

Das Zytoplasma des Promyelozyten war noch kräftig basophil (Abb. 3.1.9), das heißt reich an Ribosomen (Abb. 3.1.10). Im Bereich des Golgiapparates war die Basophilie des Zytoplasmas weitgehend ausgespart (Abb. 3.1.9). Das RER war weniger weit gestellt als beim Promyelozyten des Menschen

### **3.1.5.3 Myelozyten (N2)**

In den kleineren Myelozyten füllte der häufig ringförmige Zellkern die Zelle immer noch weitgehend aus (Abb. 3.1.9). Das schwach basophile Zytoplasma bildete einen schmalen Saum um den Kern und füllte ein rundes bis ovales zentrales Areal innerhalb desselben. Nukleolen waren nicht mehr erkennbar.

### **3.1.5.4 Metamyelozyten (N3)**

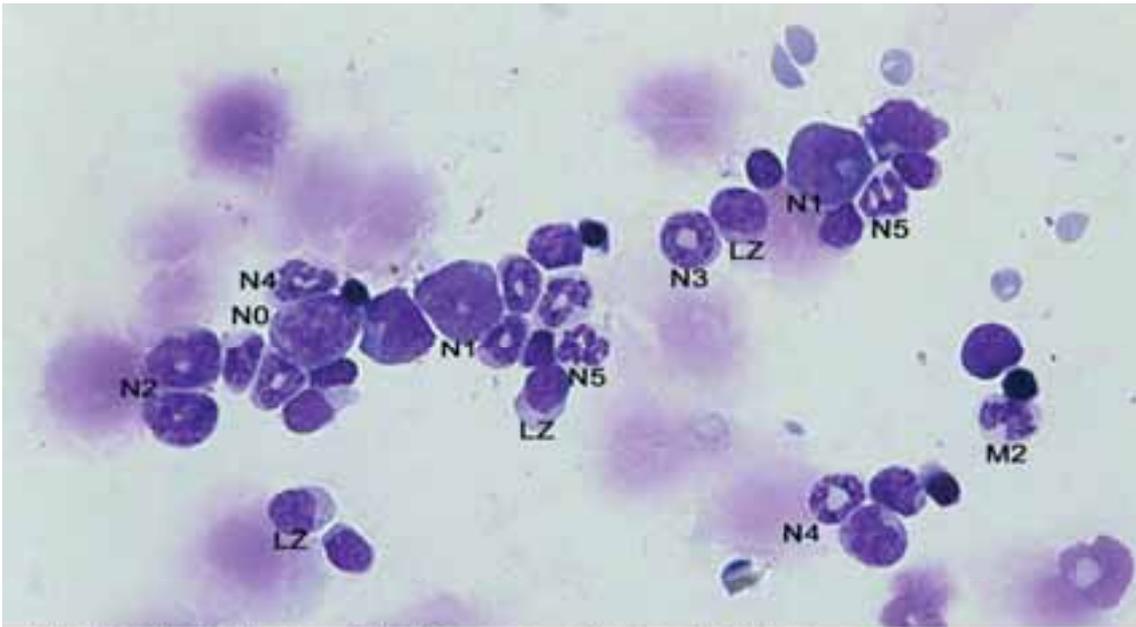
Im Metamyelozyten hatte die Kondensation des Karyoplasmas weiter zu- und die Basophilie weiter abgenommen. (Abb. 3.1.9).

### **3.1.5.5 Stabkernige Granulozyten (N4)**

Unter weiterer Kondensation des Chromatins verschmälerte und kondensierte sich dessen Kern (Abb. 3.1.9). Dadurch konnte er sich verdrehen und z. B. eine Acht bilden.

### **3.1.5.6 Segmentkernige Granulozyten (N5)**

Die Segmentkernigen hatten den stärksten Grad an Chromatinkondensation und je mehr Kernsegmente sich ausgebildet hatten, umso weniger war die ursprüngliche Ringform des Kerns noch nachzuvollziehen (Abb. 3.1.9, 3.1.11, 3.1.12). Im peripheren Blut machten sie 5%-20% aller kernhaltigen Zellen aus und waren damit deutlich niedriger konzentriert als im Blut des Menschen.



**Abb.3.1.9 Abstrichpräparat des Knochenmarks einer Balb/c Maus.**

Durch die Präparation zerstörte Zellen liegen als Kernschatten vor. Die neutrophile Reihe imponiert durch ihre Ringformen, die sich erst in den reifen Granulozyten auflösen. Die Reihe ist von N0 bis N5 durch entsprechende Zahlen markiert. Lymphozyten (LZ). Die Promyelozyten (N1) zeigen eine Ringform bzw. lassen ein Golgfeld in der Kernbucht erkennen.

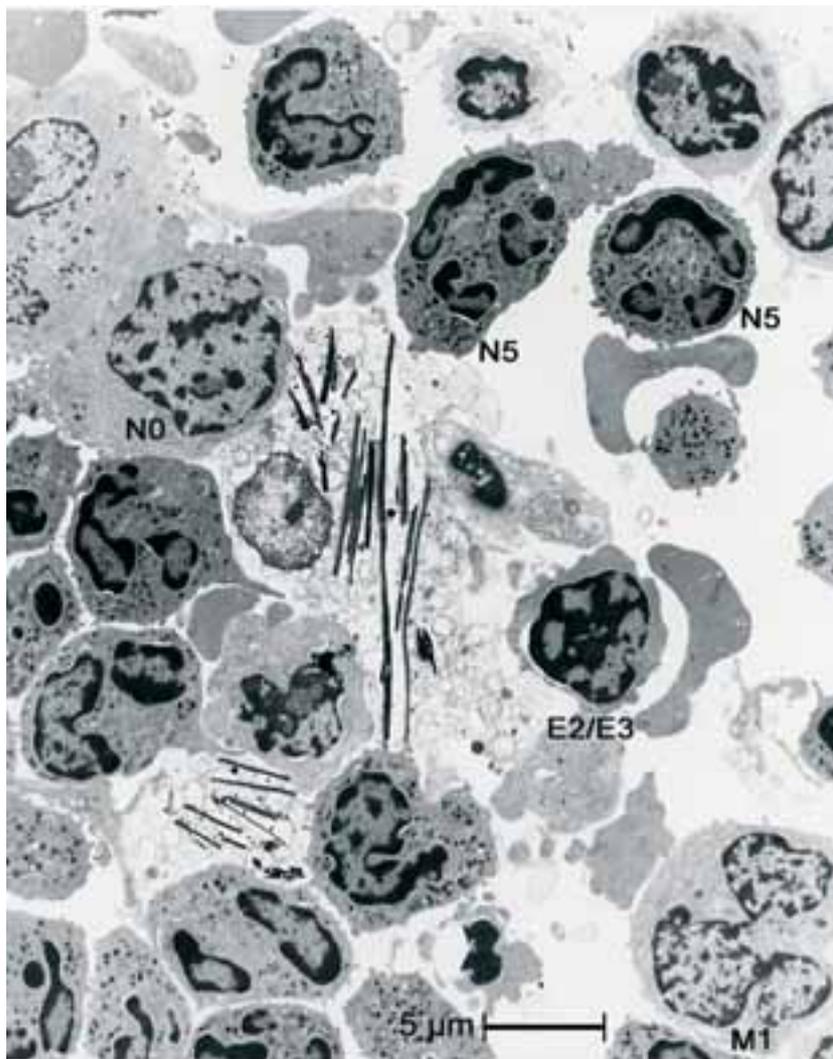
Pappenheim, Vergr.: 2100x



**Abb.3.1.10 Knochenmark einer normalen Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**

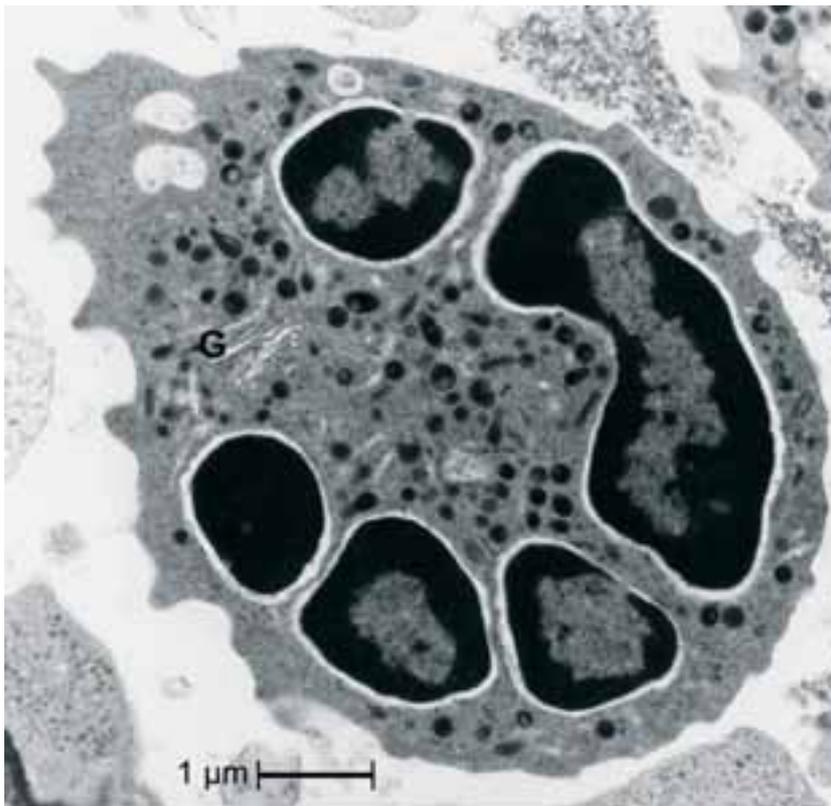
Später neutrophiler Promyelozyt (N1) der Maus in sog. Ringform. Der zentrale Zytoplasmabereich enthält viele, vor allem azurophile Granula, die aus Vakuolen hervorgehen, deren Inhalt elektronendichter wird. Beachte die deutliche Kondensation von Heterochromatin an der inneren Kernmembran im ansonsten locker strukturierten Karyoplasma. Nukleolus (N).

Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab



**Abb.3.1.11 Knochenmark einer normalen Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**

Im Zentrum liegt ein Makrophage mit nadelförmigen kristalloiden Einschlüssen. An seinem linken oberen Rand ein Myeloblast (N0) an seinem rechten unteren ein Normoblast (E2/E3). In der rechten unteren Bildecke befindet sich ein Promonozyt (M1). Dazwischen einige Granulozyten in unterschiedlicher Reife.  
Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: Maßstab



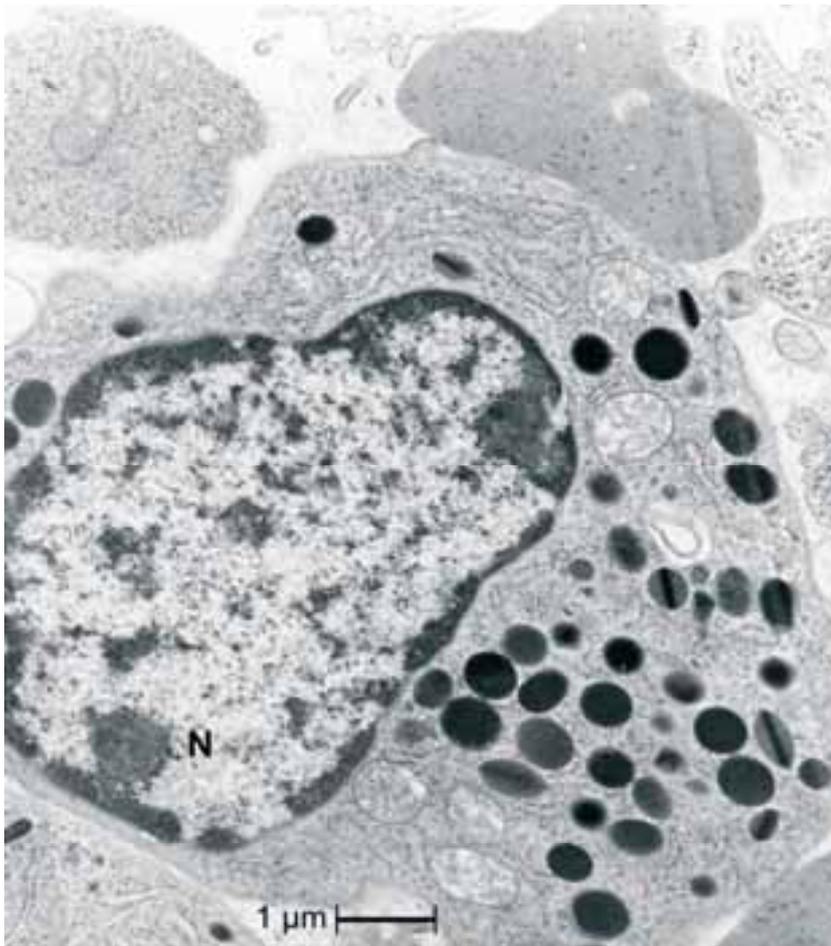
**Abb.3.1.12 Reifer segmentkerniger neutrophiler Granulozyt (N5) aus dem Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**

Der Kern zeigt 5 Segmente. Golgi-Apparat (G). Die Granulation besteht aus meist runden azurophilen Granula mit Verdichtung ihrer Matrix und mehr länglichen Granula ohne derartige Verdichtungen, die spezifische Granula darstellen dürften. Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

### 3.1.6 Die eosinophile Reihe (Eos)

Im panoptisch gefärbten Ausstrichpräparat waren die reifen Eosinophilen sehr viel schlechter als die des Menschen zu erkennen, da sie sich nicht deutlich granulär und eosinophil zu erkennen gaben sondern mehr diffus und bräunlich angefärbt waren. Im elektronenmikroskopischen Bild waren ihre verschiedenen Reifestadien eindeutig gegen die Neutrophilen aufgrund ihrer deutlich größeren Granula abzugrenzen (Abb. 3.1.6, 3.1.13, 3.1.14). Die eosinophile Reihe zeigte nur wenige ringförmige Kerne. Der eosinophile Promyelozyt hatte einen relativ locker strukturierten Kern, welcher eingebuchtet war und Nukleolen enthielt. Die Granula waren rund und oval, von wechselnder Elektronendichte und enthielten nur vereinzelt kristalloide Interna (Abb.

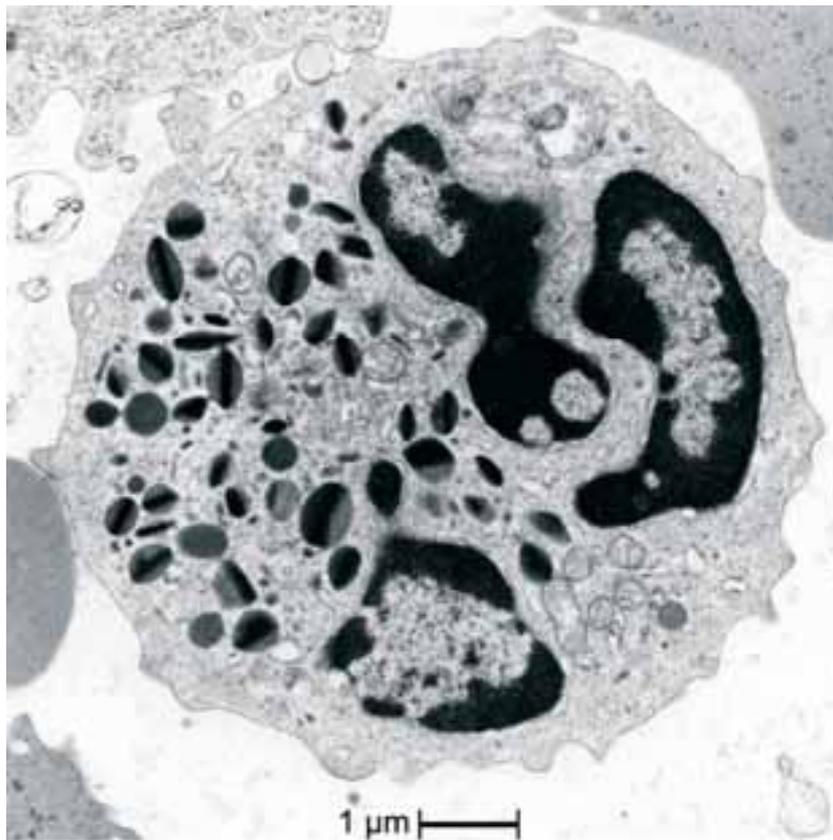
3.1.13). Die weiteren Reifestadien waren durch eine zunehmende Chromatinkondensation, Kerneinschnürungen und Granulareifung unter Ausbildung kristalloider Interna gekennzeichnet. Der reife Eosinophile war zumeist mehrfach segmentiert (Abb. 3.1.14). Im Differentialblutbild betrug der Anteil der Eosinophilen ähnlich wie beim Menschen 1%-2%.



**Abb.3.1.13 Eosinophiler Promyelozyt aus dem Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**

Der Kern ist locker strukturiert und zeigt nur eine geringe Heterochromatinkondensation an der inneren Kernmembran. Nukleolus (N). Die großen spezifischen Granula sind wechselnd elektronendicht und enthalten vereinzelt kristalloide Interna als stabförmige Verdichtungen.

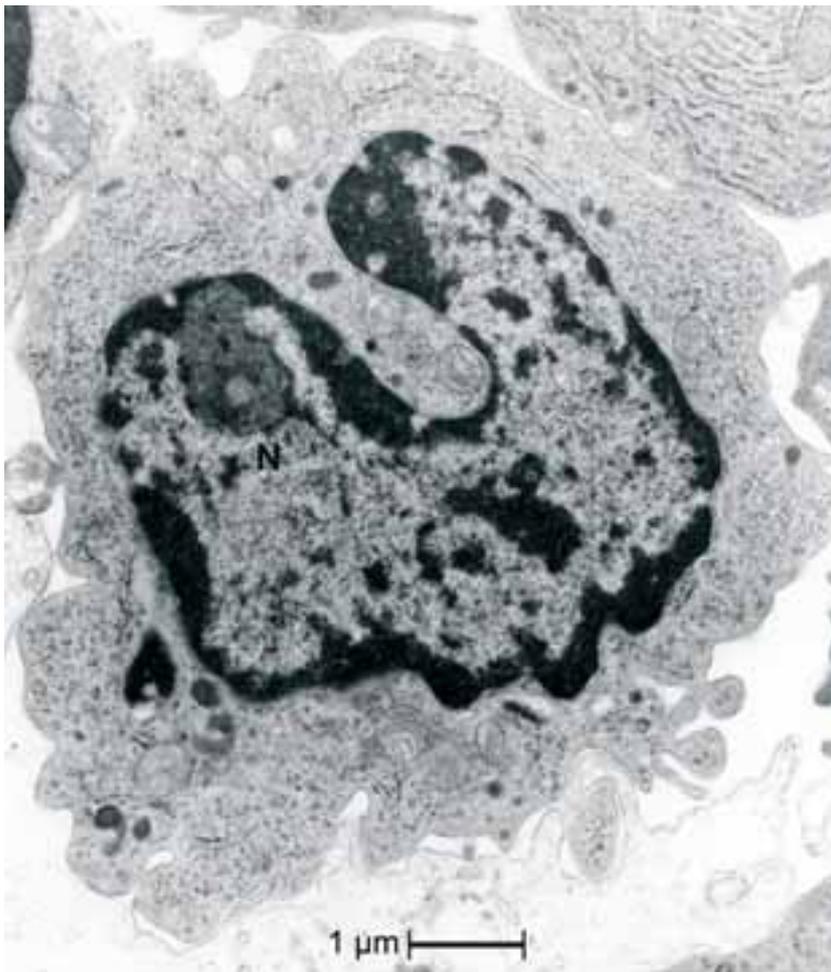
Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab



**Abb.3.1.14 Eosinophiler Granulozyt aus dem Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**  
 Der Kern ist 3fach segmentiert. Die vielfach vorhandenen kristalloiden Interna haben die Granula unterschiedlich verformt.  
 Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

### 3.1.7 Die monozytäre Reihe (M0- M2)

Der Monoblast (M0) entsprach hinsichtlich der Beschaffenheit von Karyo- und Zytoplasma weitgehend dem Myeloblasten. Lediglich die Kernkontur konnte stärkere Unregelmäßigkeiten aufweisen (Abb. 3.1.6). Bereits deutlich eingebuchtet war der Kern des Promonozyten (M1) (Abb. 3.1.5, 3.1.6, 3.1.11). Die Granulation in seinem Zytoplasma war spärlich und nahm auch bis zum reifen Monozyten (M2) nur wenig zu (Abb. 3.1.5, 3.1.6, 3.1.15). Die Abgrenzung der monozytären Reihe von der neutrophilen wurde wie beim Menschen noch dadurch erleichtert, dass die azurophilen Granula in Promonozyten und Monozyten deutlich kleiner waren als in der neutrophilen Reihe. Bei der Maus war aber Kernform und Struktur sowie Granulaarmut entscheidend für die Identifikation dieser Zellformen.



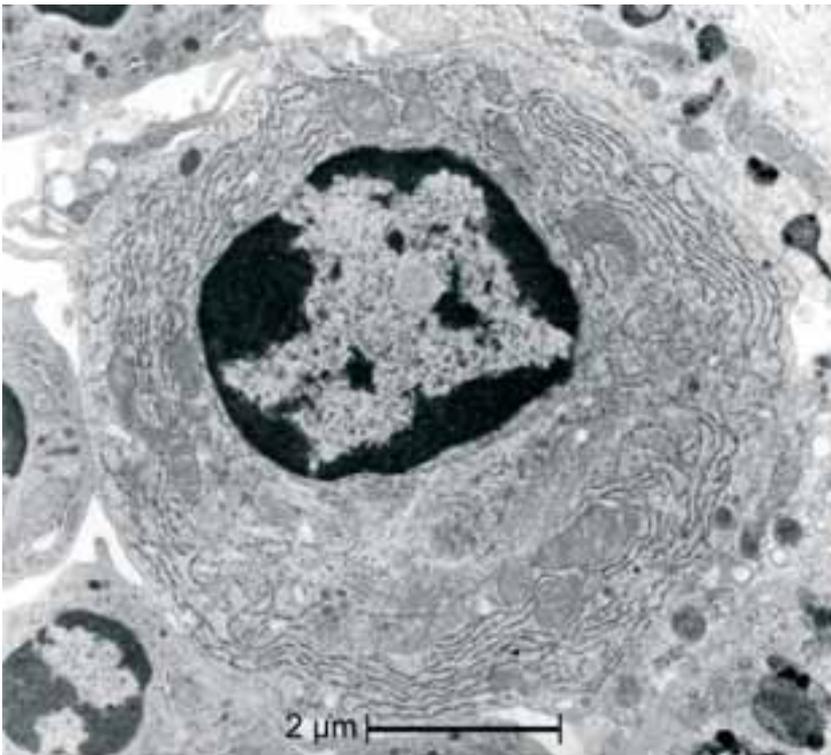
**Abb.3.1.15 Monozytäre Zelle aus dem Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**  
 Sie ist eine Übergangsform zwischen Promonozyten und Monozyten (M1-M2). Der tiefeingebuchtete Kern enthält noch einen großen Nukleolus (N). Die spezifischen Granula sind spärlich.  
 Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

### 3.1.8 Die Lymphozyten und Plasmazellen (LZ und PLZ)

Die mononukleären Lymphozyten unterschieden sich von den Normoblasten durch eine geringere Kondensation des Kernchromatins und eine geringere Basophilie des Zytoplasmasaums (Abb. 3.1.6, 3.1.9). B- und T-Lymphozyten ließen sich durch Routinefärbungen nicht differenzieren.

Die Plasmazellen waren durch ihr basophiles Zytoplasma, in dem zumeist exzentrisch ein relativ runder und radspeichenartig kondensierter Kern lag, charakterisiert (Abb. 3.1.2). Elektronenmikroskopisch war dieser Zelltyp wie beim

Menschen durch den Reichtum an RER ausgezeichnet (Abb. 3.1.5, 3.1.16). NOD/SCID-Mäuse zeigten gegenüber ihren normalen Gegenstücken bei sonst unauffälligem Knochenmark einen deutlich verminderten Gehalt von Lymphozyten und Plasmazellen jedoch keinesfalls ein komplettes Fehlen dieser Zellformen.

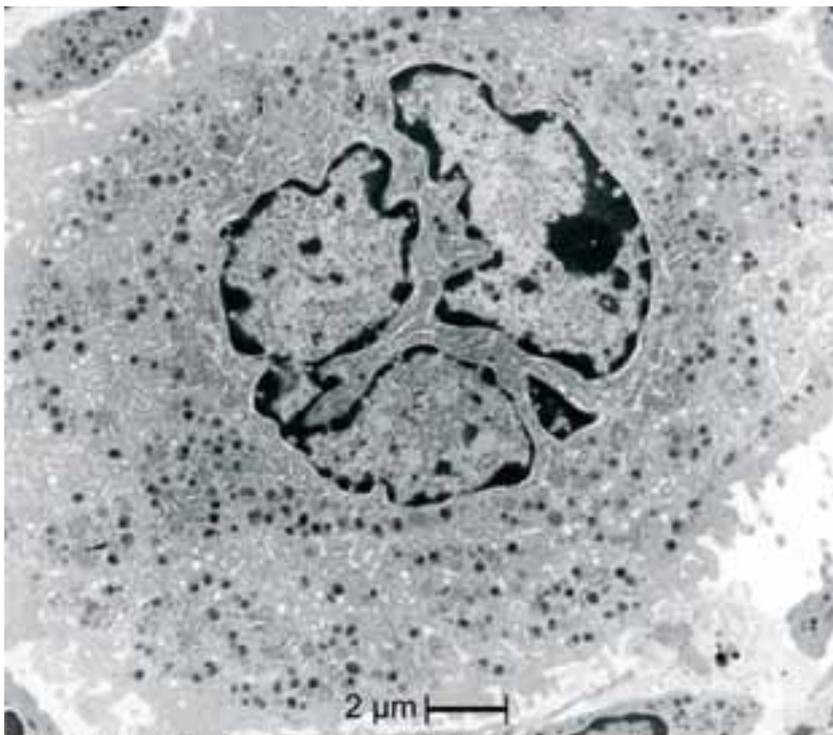


**Abb.3.1.16 Plasmazelle aus dem Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**

Das Chromatin ist derartig an der inneren Kernmembrankondensiert, dass lichtmikroskopisch ein sog. Radspeichenkern vorstellbar ist. Das Zytoplasma enthält in charakteristischer Weise ein reich entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum. Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

### 3.1.9 Die Megakaryozyten (MEG)

Als Megakaryoblasten waren besonders große Zellen blastärer Natur anzusehen. Die reiferen und ausgereiften Elemente waren Riesenzellen mit irregulär lobuliertem Kern. Das Zytoplasma zeigte spezifische Granula und das Membranreservesystem für die Bildung der Thrombozyten (Abb. 3.1.17).



**Abb.3.1.17 Megakaryozyt aus dem Knochenmark der Maus im elektronenmikroskopischen Bild.**  
Der Kern der hyperploiden Riesenzelle ist segmentiert und eingebuchtet. Das Zytoplasma ist reich granuliert und enthält Vesikel sowie Zystemen des rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulums neben einem gewundenen Hohlräumssystem, das die Membranreserve für die Formierung der Thrombozyten darstellt. Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab

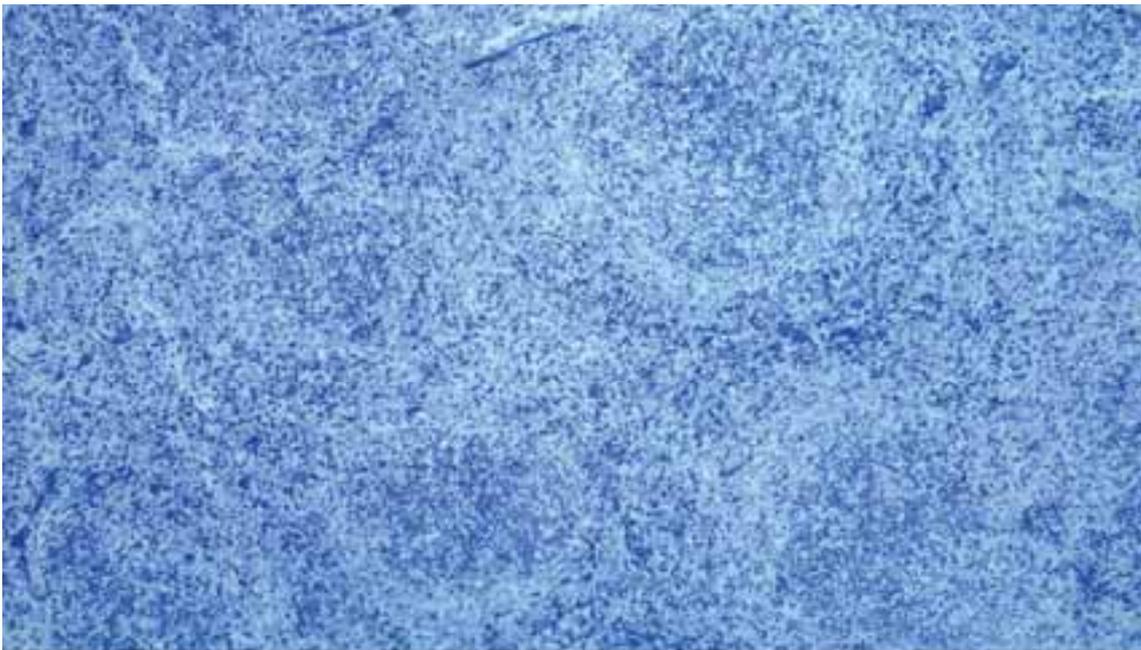
### 3.1.10 Das Myelogramm

Bei der Differenzierung der Knochenmarkzellen stellten die Zellen der neutrophile Reihe 30-40%, die rote Reihe etwa 20%-30%, Lymphozyten 20%-30% und die Monozyten und ihre Vorläufer 10%-20% aller Zellen.

Das Verhältnis von Myelopoese zur Erythropoese, der M/E Gradient, betrug danach ca. 2,5.

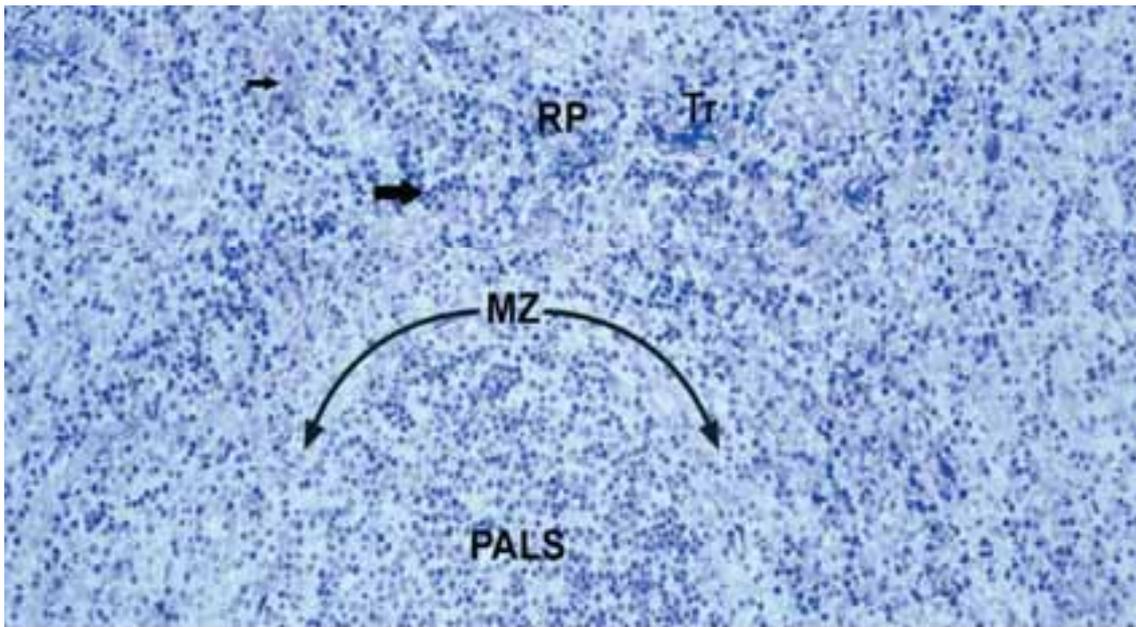
## 3.2 Die Milz der normalen Maus

Die Milz der Nager hat neben der immunologischen und hämophagozytischen Funktion auch noch eine hämatopoetische. Die immunologischen Reaktionen laufen in der weißen Pulpa (Abb. 3.2.1a, 3.2.1b), der Abbau von Blutkörperchen sowie ihre Bildung vor allem in der roten Pulpa (Abb. 3.2.1a, 3.2.1b) ab.



**Abb.3.2.1a Milzgewebe einer normalen Kontrollmaus im Übersichtsbild eines Semidünnschnittes.**

Die weiße Pulpa imponiert als multizentrische Strukturen. Die unterschiedlich breiten Strassen dazwischen stellen die rote Milzpulpa dar.  
Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 210x



**Abb.3.2.1b Milzgewebe wie in Abb. 3.2.1a bei stärkerer Vergrößerung.**

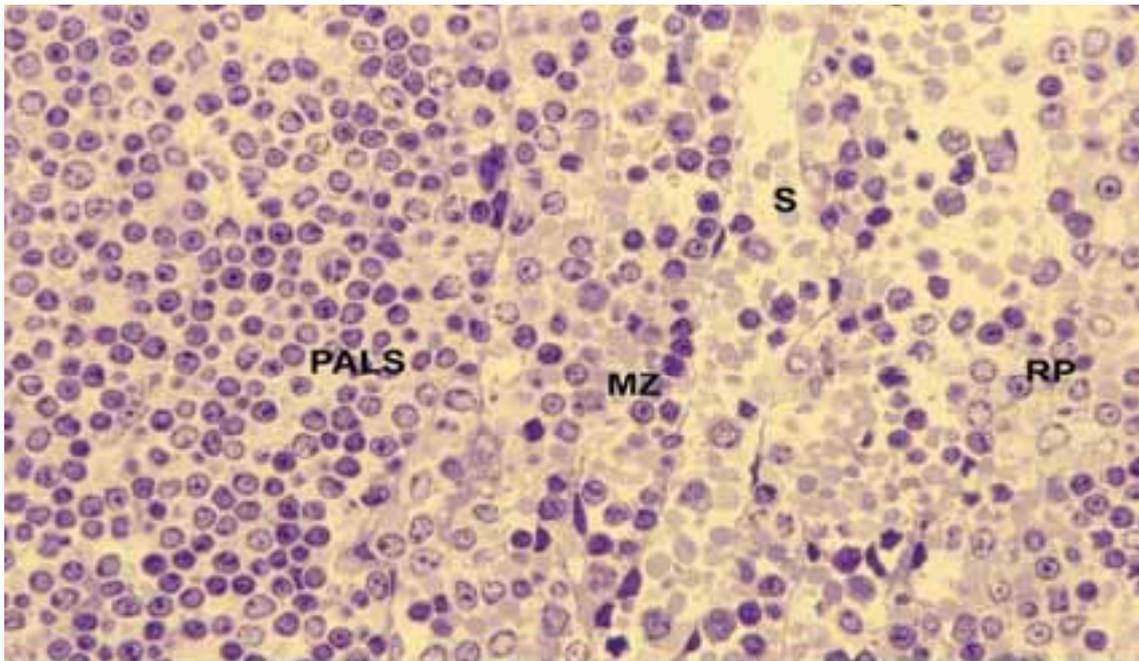
Am unteren Bildrand wölbt sich halbkreisförmig eine periarteriellere lymphatische Scheide (PALS) vor. Marginalzone (MZ). Rote Pulpa (RP) mit Trabekeln (Tr). Erythroblasten (➡), Blassblaue Erythrozyten (→).

Vergr.: 840x

### 3.2.1 Die weiße Pulpa

Ihre Farbe rührt her vom Zellreichtum und dem dadurch hervorgerufenen Farbton des Gewebes an einem Schnitt durch das lebensfrische Organ. Das Grundgerüst der weißen Pulpa wird von fibroblastischen Retikulumzellen gebildet, welche die von ihnen gebildeten retikulären Fasern umschneiden und ein unterschiedlich dichtes Maschenwerk bilden, in dem sich die lymphatischen Zellen befinden (Yoshida et al.,1993; Düllmann et al.,2000). Die T-Zellen sind in Nähe der Zentralarterie oder Zentralarteriole angesiedelt und die B-Zellen in einer Außenzone der sog. periarteriellen lymphatischen Scheide (PALS). In dieser äußeren B-Zone der PALS formieren sich im Rahmen einer immunologischen Antwort die Lymphfollikel (Van den Eertwegh und Claassen,1991). Die PALS-Außenzone mit ihren Follikeln wurde kontinuierlich von der Marginalzone umschlossen (Abb. 3.2.1b, 3.2.2). Diese ist die Eintrittsstelle für Antigene in der Milz und sie ist vor allem in lockerer Form von B-Lymphozyten und Makrophagen besiedelt. Gelegentlich konnte man in der Marginalzone auch Erythroblasten als Zeichen einer extramedullären Blutbildung finden. So zeigte die Marginalzone auch zytologisch ihre Mittelstellung zwischen

weißer und roter Pulpa. Die follikelfreie Außenzone der PALS kann Primärfollikeln des Lymphknotens gleichgesetzt werden und ist nach dieser neuen Lesart von Mantelzonen-B-Zellen besiedelt, welche auch den Mantel um die Keimzentren von Sekundärfollikeln bilden (Fredrickson und Harris,2000).



**Abb.3.2.2 Milzgewebe einer Maus im Semidünnschnitt.**  
Das Grenzgebiet zwischen periarterieller lymphatischer Scheide (PALS), Marginalzone (MZ) und roter Pulpa (RP). An der Oberfläche der MZ ist ein peripherer Sinus (S) der RP in voller Länge angeschnitten.  
Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x

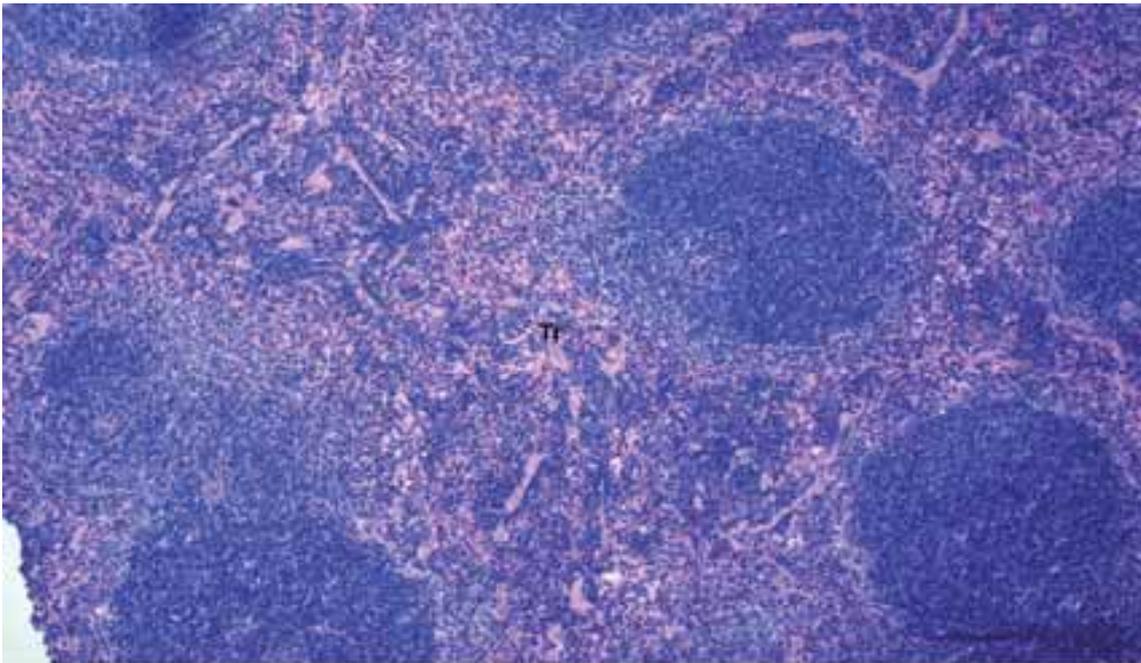
### 3.2.2 Die rote Pulpa

Die Farbe dieser Pulpa wird am lebensfrischen Organ durch den Reichtum an Erythrozyten hervorgerufen. Die Erythrozyten markieren zusammen mit Trabekelanschnitten (Abb. 3.2.1b, 3.2.3, 3.2.5) die rote Pulpa auch am histologischen Schnitt. Als Trabekel werden die Bindegewebssepten der Milz bezeichnet, die von der Kapsel zum Hilum des Organ ziehen und die großen Milzgefäße beherbergen. Die rote Pulpa ist Ort des Abbaus geschädigter oder überalteter Blutzellen, vor allem der Erythrozyten. Die erythroklastische Makrophagen konnten bei der Maus mit zahlreichen phagozytierten Erythrozyten angefüllt sein. Andere Makrophagen wiesen wie die des Knochenmarks multiple

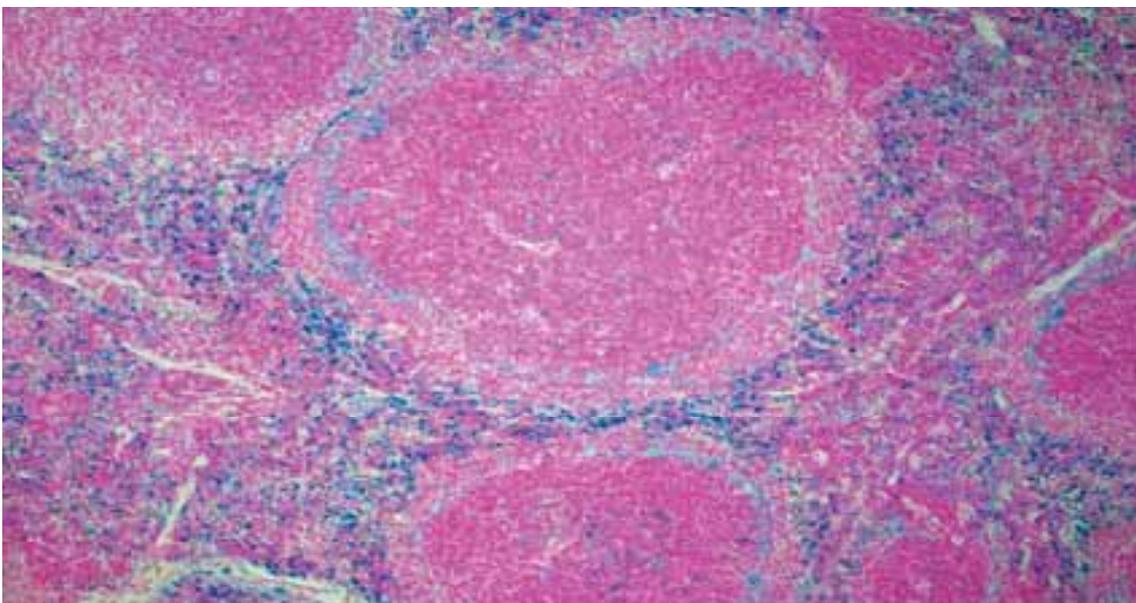
kristalloide Einschlüsse auf. Nach dem Abbau von Erythrozyten kam es in den Makrophagen zur Speicherung von Eisen (Abb. 3.2.4, 3.2.5).

Auch in der roten Pulpa, die sich in sog. Chordastränge und Sinusoide gliedert, wird das Grundgerüst von fibroblastischen Retikulumzellen gestellt. Diese spannen sich zwischen den Sinusoiden aus und in ihrem Maschenwerk liegen die freien Zellen der Chordastränge. Das sind zum einen die Makrophagen und zum anderen die zellulären Elemente des Blutes, die durch den teilweise offenen Milzkreislauf in die Chordastränge befördert wurden. Mit den Sinusoiden beginnt der venöse Schenkel des Kreislaufes in der Milz. Vitale Blutzellen der Chordastränge können über Poren zwischen den langgestreckten Endothelzellen die Sinuswand passieren und wieder Anschluss an die Blutzirkulation gewinnen. Gelingt ihnen dieses nicht, weil sie geschädigt oder überaltert sind, fallen sie der Phagozytose anheim.

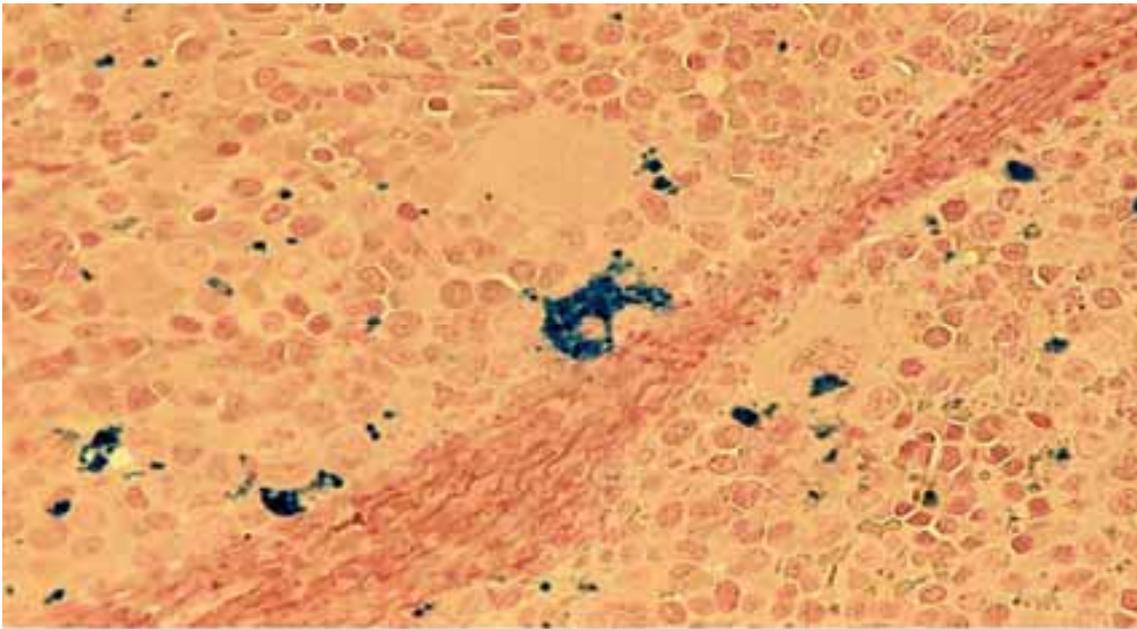
Innerhalb der Chordastränge fand die splenale Hämatopoese statt. Megakaryozyten konnten als ihr Zeichen über die gesamte rote Pulpa sehr locker verteilt sein. Erythropoetische Zellen bildeten, wenn vorhanden, kleine Nester (Abb. 3.2.1b) gelegentlich in Analogie zum Knochenmark mit einem zentral gelegenen Makrophagen. Die splenale Hämatopoese war vor allem in der subkapsulären roten Pulpa zu finden (Abb. 3.2.6). Die Myelopoese bevorzugte als Ort ihrer Proliferation die Nähe von Trabekeln. Unter physiologischen Bedingungen war die splenale Hämatopoese nur gering ausgeprägt. Sie zeigte sich vor allem durch die Präsenz von Megakaryozyten und Erythroblasten (Abb. 3.2.5, 3.2.6). Die Megakaryozyten waren auch am Paraffinschnitt leicht zu erkennen. Eine gering ausgeprägte Erythro- und/oder Myelopoese, wie sie unter physiologischen Bedingungen gegeben ist, konnte histologisch nur in Semidünnschnitten identifiziert werden.



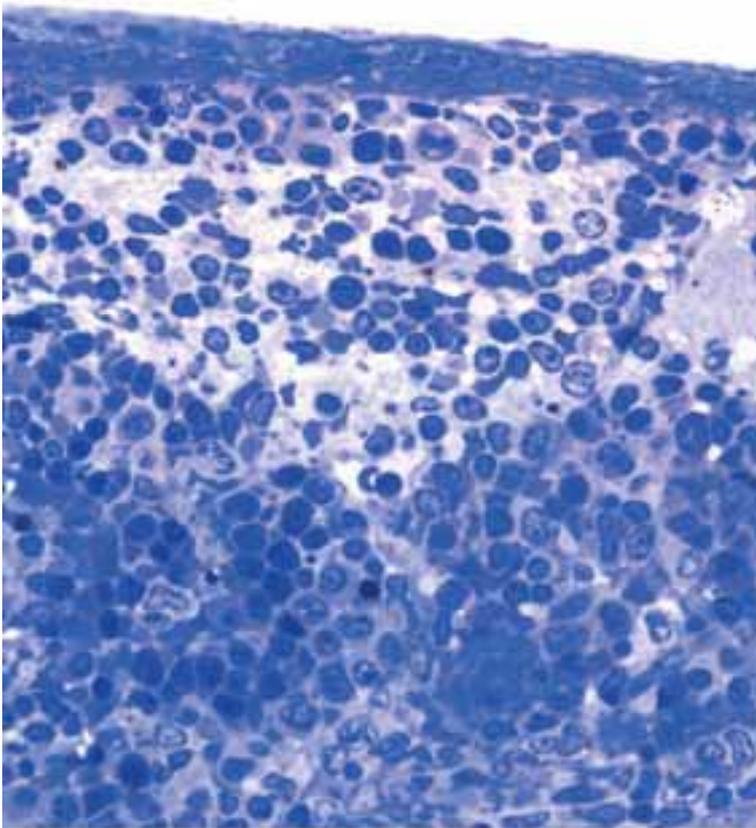
**Abb.3.2.3 Milzgewebe einer Balb/c Maus im Übersichtsbild eines Paraffinschnittes.**  
 In der PALS ist die Lagerung der Lymphozyten besonders dicht. Die breiten Strassen roter Pulpa zeichnen sich durch Schnittprofile von Trabekeln (Tr) und durch den Reichtum an Erythrozyten (rötliche Anteile) aus.  
 Paraffinschnitt, H.E. Vergr.: 420x



**Abb.3.2.4 Paraffinschnitt der Milz einer Balb/c Maus nach Durchführung einer Berliner Blau Reaktion (BBR).**  
 Die BBR ist in dunkelblauer und granulärer Form besonders ausgeprägt in der roten Pulpa. Auch die weiße Pulpa enthält eisenpositive Makrophagen. Hellblau angefärbt formieren sich diese zwischen PALS und Marginalzone als sog. marginale Metallophile. Diese ausgeprägte Eisenüberladung der Milz dürfte nicht nur durch den Abbau von Erythrozyten, sondern auch durch den Eisenreichtum des Tierfutters bedingt sein.  
 Berliner Blau Reaktion. Vergr.: 840x



**Abb.3.2.5 Ausschnitt aus der roten Pulpa einer nicht eisenüberladenen Milz.** Von der linken unteren zur rechten oberen Bildecke zieht ein Trabekel. Erythroblastische Makrophagen und ihre Fortsätze haben sich durch eine kräftige Berliner Blau Reaktion dargestellt. Beiderseits des Trabekels finden sich jeweils ein Megakaryozyt. Vom oberen ist der Kern nicht angeschnitten. Berliner Blau Reaktion. Vergr.: 1320x



**Abb.3.2.6 Milzgewebe einer Kontrollmaus im Semidünnschnitt.**

Unmittelbar unter der Kapsel sind die Zellen locker angeordnet. Dort findet man neben Lymphozyten einzelne Zellen der Myelopoese und am rechten Bildrand einen Megakaryozyten (MEG) ohne angeschnittenen Kern. Zur Organmitte liegen die Zellen dichter. Hier handelt es sich bei den stark angefärbten Zellen um Erythroblasten. Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x

### 3.2.3 Quantitative Milzdaten

Die Milzen von Kontrolltieren wogen 110-120 mg. Bei der volumetrischen Analyse von Schnitten dieser Milzen hatte die weiße Pulpa einen Volumenanteil von 20%-30% und die rote einen solchen von 50%-75%. In der roten Pulpa machte die normale Hämatopoese einen Volumenanteil von ca. 5%-10% aus.

### 3.3 Leukämieentwicklung nach Knochenmarktransplantationen mit transgenen Stammzellen<sup>4</sup>

Murine Stammzellen, in deren Genom mit einem replikationsdefekten retroviralen Vektor das Markergen hu dLNGFR geschleusst worden war, wurden nach Konditionierung der Empfänger durch Ganzkörperbestrahlung (10 GY) transplantiert. Die 5 primären Empfängertiere erlangten einen normalen Blutzellstatus, normale Milzgewichte und blieben in einem Beobachtungszeitraum von 28 Wochen klinisch gesund. Das Knochenmark dieser Tiere wurde gepoolt und in gleicher Weise weiter auf 10 Empfängertiere transplantiert. Diese nächste Kohorte von Mäusen bestand aus zwei Gruppen. Die eine hatte auf der Basis von magnetischer Immunaффinität angereicherte Knochenmarkzellen (MACS-Gruppe), die andere nicht selektionierte Zellen (NS-Gruppe) erhalten. Alle Tiere entwickelten innerhalb von 22 Wochen Erkrankungen des myeloischen Systems bis hin zur akuten Leukämie (Li et al., 2002).

#### 3.3.1 Blutbefunde

Es traten die in Tabelle 1 aufgelisteten Blutbildveränderungen auf. Alle Tiere waren anämisch, 2 nur leicht, 4 von ihnen jedoch ausgeprägt mit Hämoglobinwerten zwischen 7,2 und 9,5 (g/dl). Lediglich eine Maus wies eine normale Konzentration der weißen Blutkörperchen im peripheren Blut auf. Jeweils 4 Tiere waren leukopenisch bzw. leukozytisch, wobei die Leukozytose häufig mit dem Auftreten von Blasten im Blut einherging (Abb. 3.3.1). Am massivsten war die Ausschwemmung von Blasten im Fall der stärksten Leukozytose.

---

<sup>4</sup>Die Experimente und ihre Ergebnisse beruhen auf der Publikation Li et. al (2002). Ich danke Herrn Dr. Zhixiong Li für die Überlassung der hämatologischen Daten (Blutwerte, zytochemische Befunde und Milzgewichte). Die unpubliziert gebliebenen morphologischen Befunde wurden für diese Studie reevaluiert, morphometriert und durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung des Knochenmark erweitert.

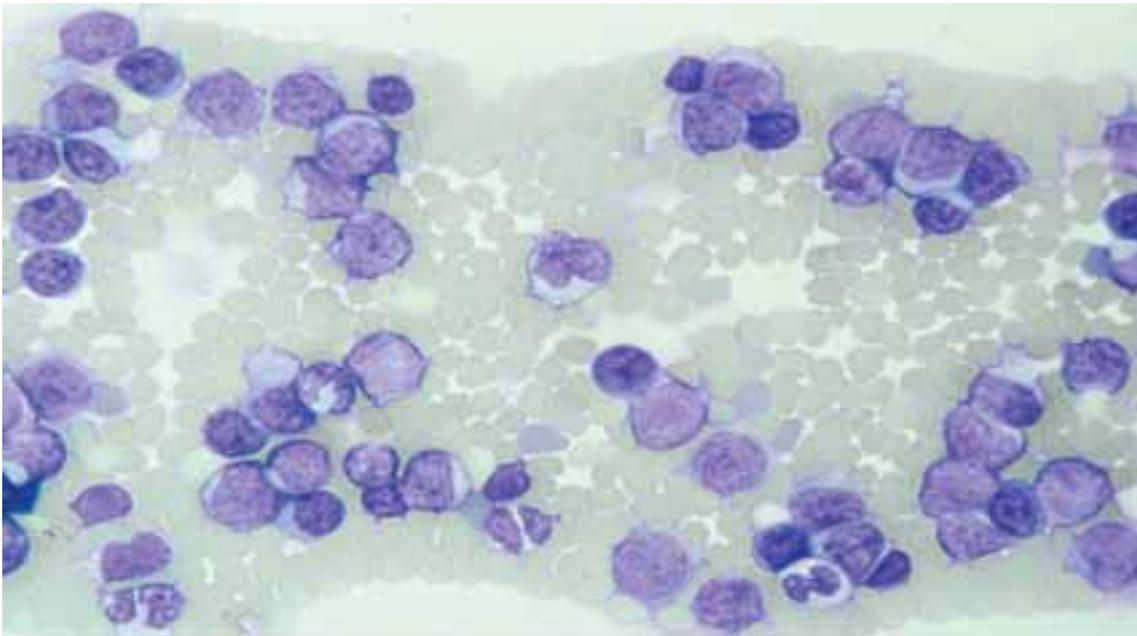
Tabelle 1 Hämatologischer Status und Diagnose von 10 Mäusen, die als sekundäre Empfängertiere „gepooltes“, hu dLNGFR transduziertes Knochenmark von 5 Spendertieren erhalten hatten. Die „gepoolten“ Knochenmarkzellen waren entweder auf der Basis von magnetischer Immunaффinität angereichert (MACS-Gruppe) oder nicht selektioniert worden (NS-Gruppe).

Gruppe	Maus	Blut				Diagnose
		Hb [g/dl]	WBC [10 <sup>3</sup> /μl]	PLT [10 <sup>3</sup> /μl]	Blasten [%]	
MACS	Maus 1	7,6	19	12	59	AML M5 <sup>1</sup>
	Maus 2	12	8,4	560	0	Weitgehend blutgesund
	Maus 3	10,4	24	44	2	AML M5 <sup>1</sup>
	Maus 4	10,8	4,4	28	0	Präleukämie
	Maus 5	7,2	5,2	16	1	AML M5 <sup>1</sup>
NS	Maus 10	10,6	5,9	283	n.b.	Präleukämie <sup>2</sup>
	Maus 11	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Präleukämie <sup>2</sup>
	Maus 12	12,5	17	350	n.b.	AML M5 <sup>1</sup>
	Maus 13	8,5	178	28	>50	AML M5 <sup>1</sup>
	Maus 14	9,2	10	32	n.b.	AML M5 <sup>1</sup>
<b>Normalwerte</b>		<b>13,3 +/- 0,2</b>	<b>11,43 +/- 1,04</b>	<b>700- 1200</b>	<b>0</b>	

<sup>1</sup> Im Heinrich-Pette-Institut waren die leukämischen Zellen mit einer insignifikanten Myeloperoxidasereaktion und mit mehr als 40% positiven Zellen für die unspezifische Esterase als AML M5 (entsprechend der FAB-Klassifikation) klassifiziert worden.

<sup>2</sup> Von den Mäusen 10 und 11 lagen keine Organproben vor. Die Diagnosen waren im Heinrich-Pette-Institut gestellt worden.

n.b.= nicht bestimmt



**Abb.3.3.1 Leukozytenkonzentrat des Blutes von Maus 1.**

Das Bild wird von blastären Zellen bestimmt, deren variable Kernkontur im Ausstrichpräparat nicht immer deutlich erkennbar ist. Im Zentrum liegt ein atypischer Promonozyt. Neben den Blasten kommen vereinzelt klein bis mittelgroße Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten vor.

Pappenheim Färbung. Vergr.: 2100x. Original Priv.Doz.Dr. Li

### 3.3.2 Milzbefunde

Am augenfälligsten für die Diagnostik und Klassifizierung der hämatologischen Veränderungen waren die Milzbefunde der erkrankten Mäuse, insbesondere die Semidünnschnitte dieser Organe, weil sie viel massivere Veränderungen als die entsprechenden Knochenmarkspräparate aufwiesen.

Alle Mäuse in der MACS-Gruppe (Tabelle 2) wiesen eine Splenomegalie auf, die bei 2 Mäusen mit Milzgewichten von 130mg und 170mg moderat blieb und bei den übrigen 3 Tieren das drei- bis annähernd vierfache der Norm erreichte.

Tabelle 2 Morphometrische Analyse der Milz von Mäusen der MACS-Gruppe

Maus	Gewicht [mg]	Weiße Pulpa [Vol%]	Rote Pulpa		Blasten [%]	Diagnose
			Gesamtanteil [Vol%]	Hämatopoese [Vol%]		
<b>Maus 1</b>	410	10	90	78	42	AML M5
<b>Maus 2</b>	170	38	62	54	4	Weitgehend blutgesund
<b>Maus 3</b>	350	5	95	94	14	AML M5
<b>Maus 4</b>	130	54	46	39	8	Präleukämie
<b>Maus 5</b>	370	30	70	66	29	AML M5

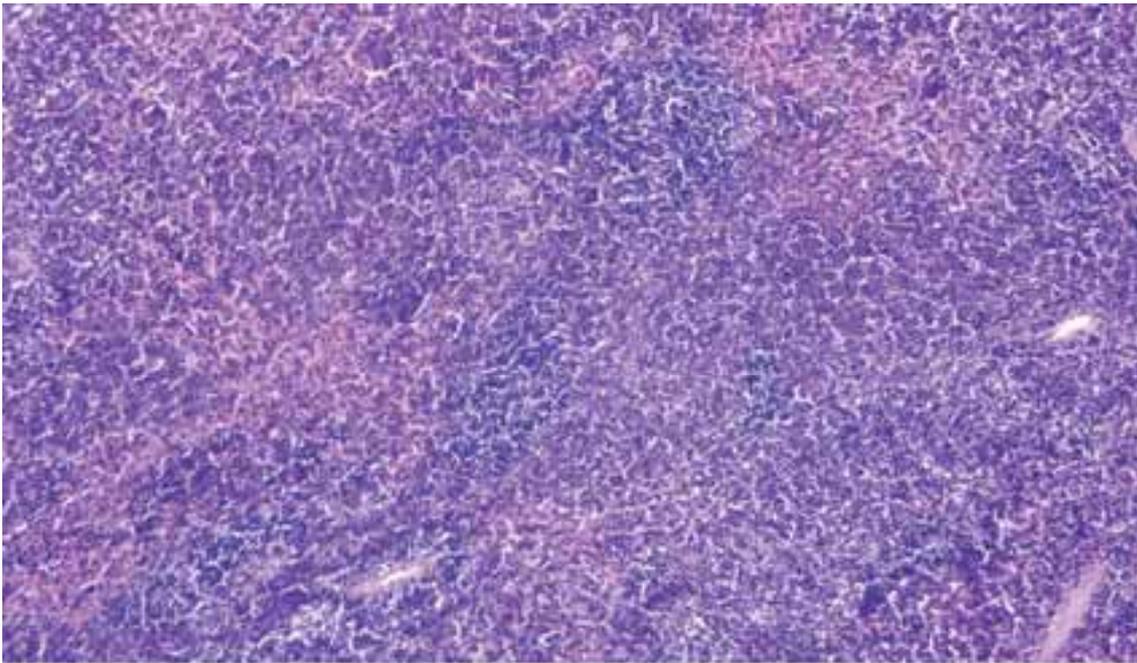
In der Gruppe nach Transplantation von nicht selektionierten Knochenmarkzellen (NS) war nur in einem Fall das Milzgewicht in der Norm, zwei Mäuse zeigten eine mäßige Splenomegalie und die beiden anderen beträchtliche Organvergrößerungen mit Verdoppelung bzw. Verfünffachung des zulässigen Gewichts (Tabelle 3).

Tabelle 3 Morphometrische Analyse der Milz von Mäusen der NS-Gruppe

Maus	Gewicht [mg]	Weiße Pulpa [Vol%]	Rote Pulpa		Blasten [%]	Diagnose
			Gesamtanteil [Vol%]	Hämatopoese [Vol%]		
<b>Maus 10</b>	160	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Präleukämie
<b>Maus 11</b>	170	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Präleukämie
<b>Maus 12</b>	120	50	46	41	25	AML M5
<b>Maus 13</b>	590	12	88	87	80	AML M5
<b>Maus 14</b>	240	31	69	66	15	AML M5

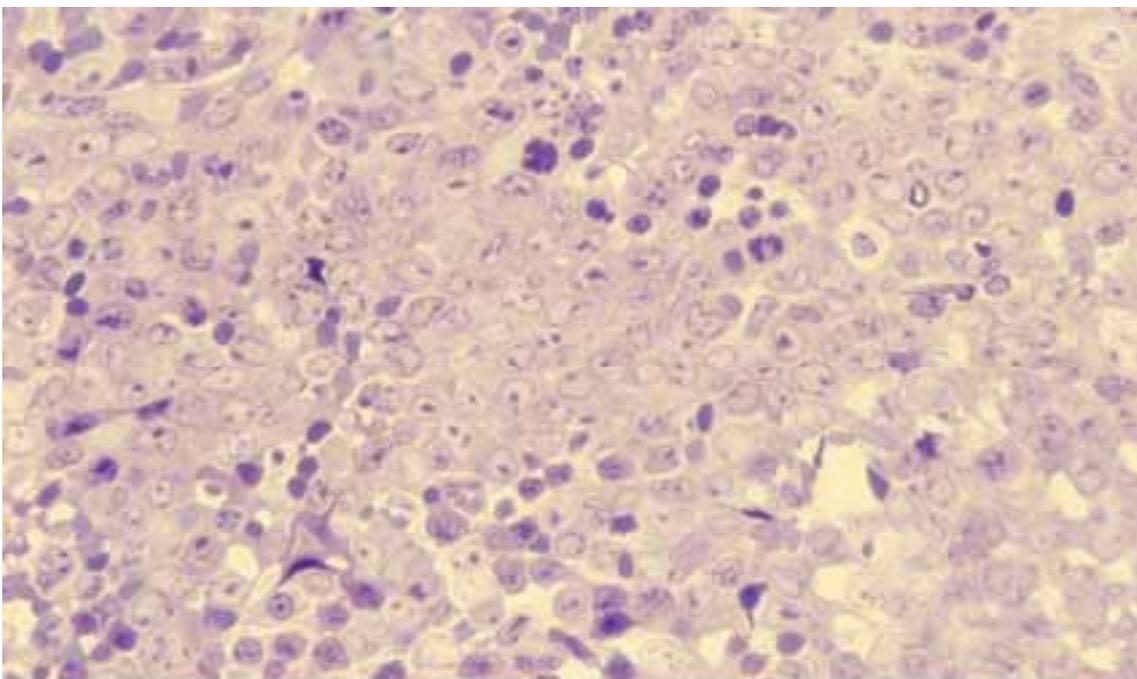
n.b.= nicht bestimmt

Allen Milzen mit eindeutig leukämischem Befall gemeinsam war der Reichtum an blastären Zellen, der am ausgeprägtesten in den vergrößerten Organen zu finden war (Abb. 3.3.2, 3.3.3).



**Abb.3.3.2 Übersichtsbild aus der Milz von Maus 1 im Paraffinschnitt.**

Die weiße Pulpa, kenntlich an dichtgelagerten Lymphozyten, welche eine bläuliche Anfärbung bedingen, ist auf kleine Inseln stark reduziert. Die rote Pulpa ist von blastären Zellen erfüllt, die besser in einem Semidünnschnitt (Abb. 3.3.3) zur Darstellung kommen. Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 420x

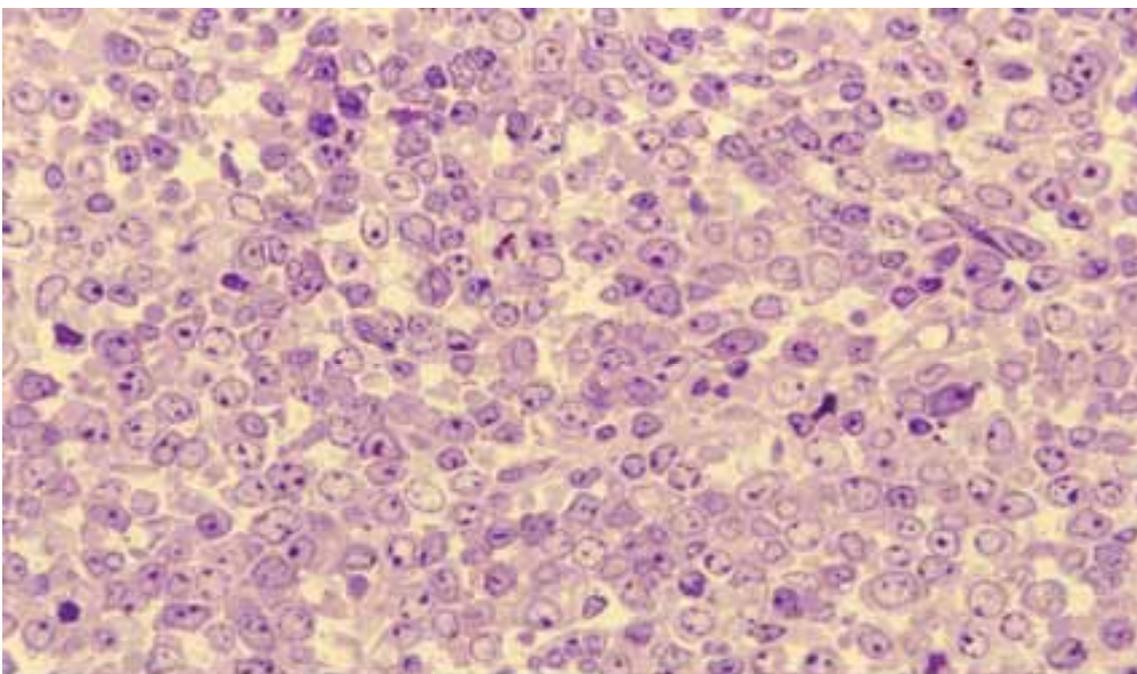


**Abb.3.3.3 Ausschnitt aus der roten Pulpa der Milz von Maus 1 im Semidünnschnitt.**

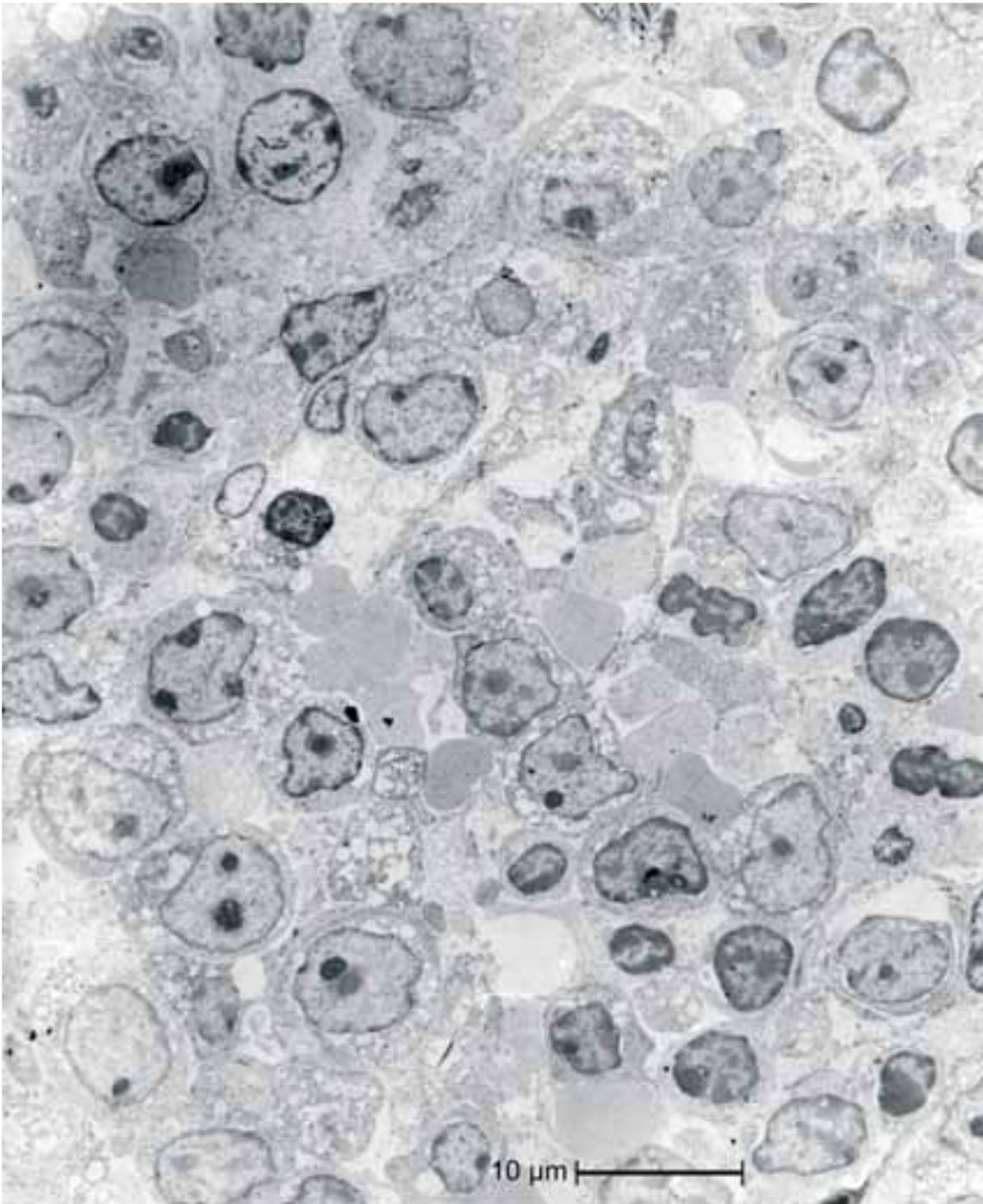
Blastäre Zellen mit lockeren und variabel konfigurierten Kernen, die Nukleolen enthalten, bestimmen das Bild.

Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x

Die massivsten Organomegalien waren in der Regel mit einer weitgehenden Rückbildung der weißen Pulpa verknüpft, so dass als schwerwiegendster Befund das Milzgewebe fast zu einer „Reinkultur“ von Blasten transformiert war (Abb. 3.3.4). Die Blasten wiesen locker strukturierte und variabel konfigurierte Kerne mit prominenten zum Teil an der Kernmembran gelegenen Nukleolen auf (Abb. 3.3.5). Ihr Zytoplasma war vakuolisiert. In einer der Milzen war die Infiltration der roten Pulpa mit Blasten kombiniert mit einer ausgeprägten extramedullären Erythropoese (Abb. 3.3.6, 3.3.7). Für einen präleukämischen Status sprachen als Milzbefunde eine mäßige Splenomegalie, eine mäßige Vermehrung der Blasten zwischen 5% und 10% und eine hämatopoetische Expansion der roten Pulpa wie sie bei Maus 4 kombiniert waren (Abb. 3.3.8a und 8b, 3.3.9). Die Milzbefunde waren mit mindestens einem weiteren Kriterium des Knochenmarks und des Blutes kombiniert. Die geringste Milzveränderung bestand in einer Steigerung der extramedullären Hämatopoese (Abb. 3.3.10). Im Semidünnschnitt dieser Milz fanden sich jedoch außerdem vereinzelte Insel von Blasten als frühester Hinweis auf eine mögliche Entwicklung in Richtung Präleukämie (Abb. 3.3.11).

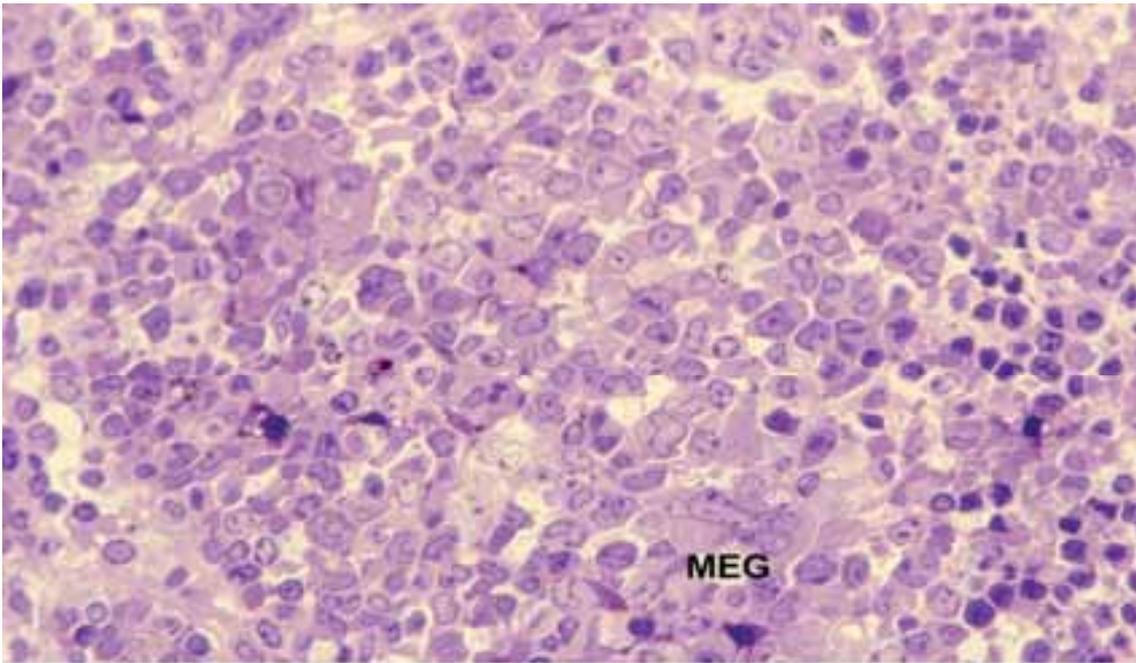


**Abb.3.3.4 Leukämisch transformiertes Milzgewebe von Maus 13 im Semidünnschnittbild.**  
Blastäre Zellen beherrschen das Bild.  
Toluidinblau Pyroninrot, Vergr.: 1320x



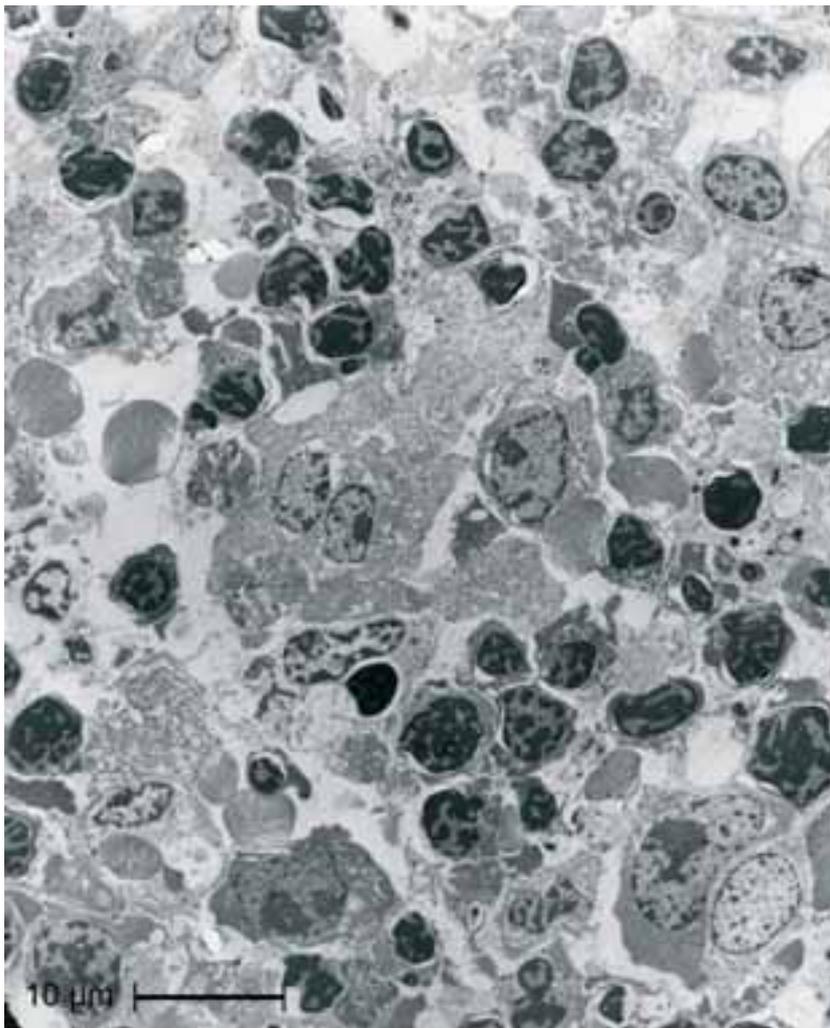
**Abb.3.3.5 Milz von Maus 13 im elektronenmikroskopischen Bild.**

Der Feinschnitt offenbart die meist variable Kernkontur der Blasten, ihr lockeres Karyoplasma und prominente Nukleolen. Das Zytoplasma ist vakouliert.  
Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab



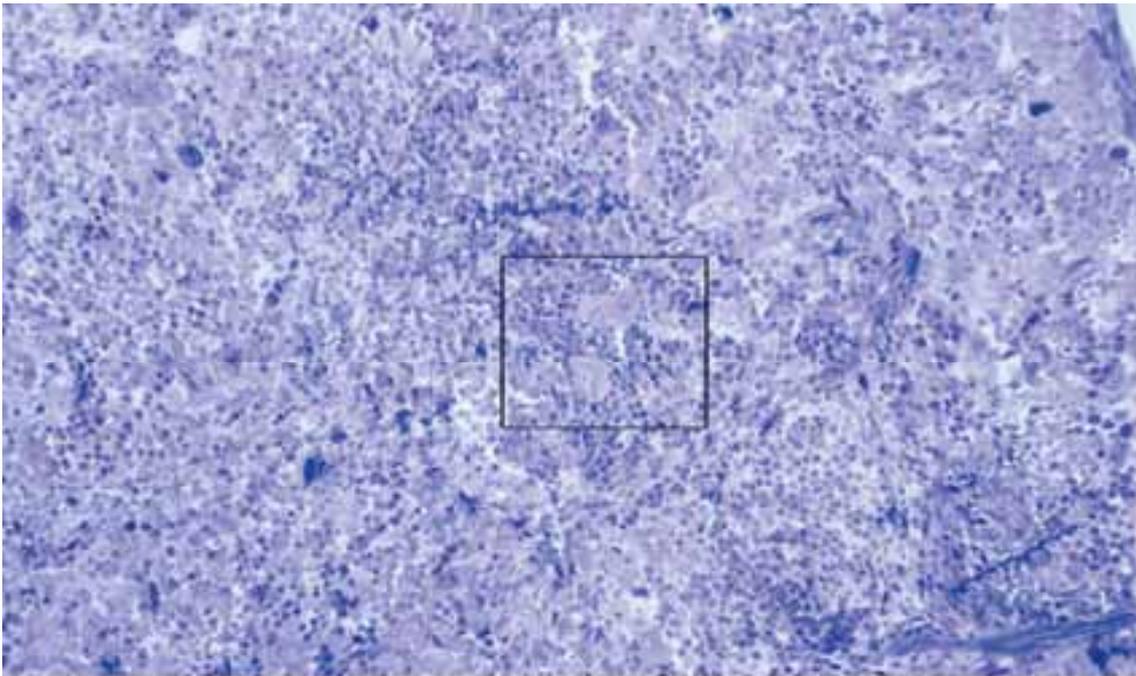
**Abb.3.3.6 Milzgewebe von Maus 14 im Semidünnschnitt.**

Blasten und monozytoide Zellen bestimmen im Zentrum das Bild. Am rechten unteren Rand liegen viele Erythroblasten, kenntlich an ihren kompakten Kernen. Als weiteres Zeichen einer splenalen Hämatopoese findet sich ein Megakaryozyt (MEG).  
Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x

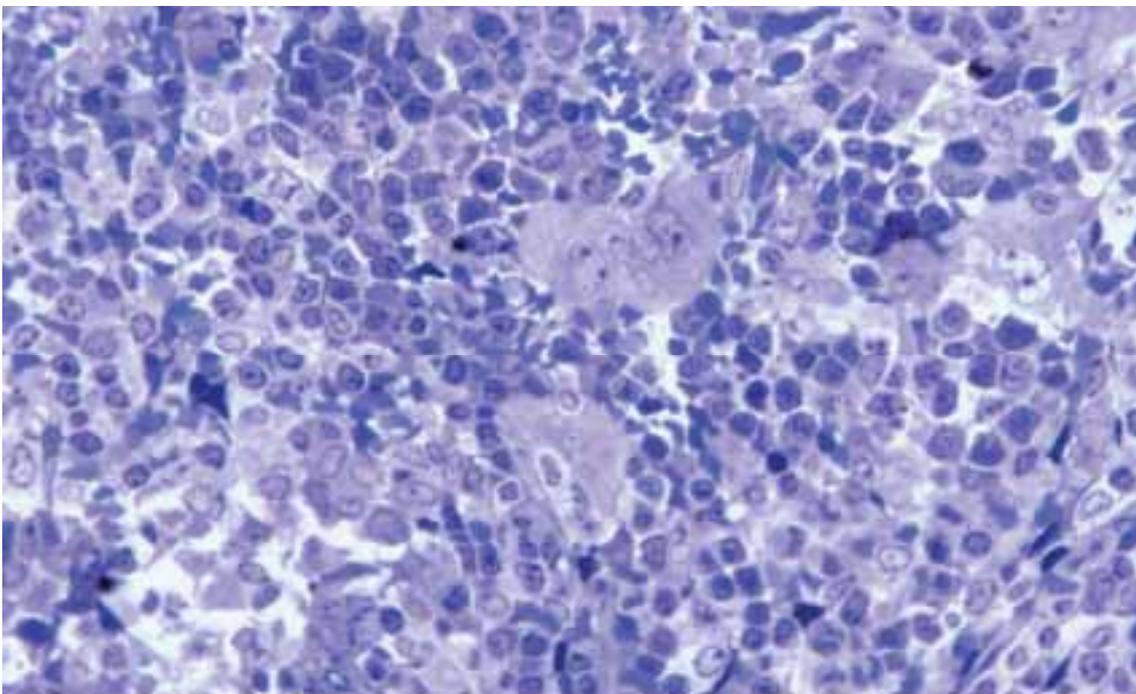


**Abb.3.3.7 Elektronenmikroskopischer Ausschnitt aus der Milz von Maus 14.**

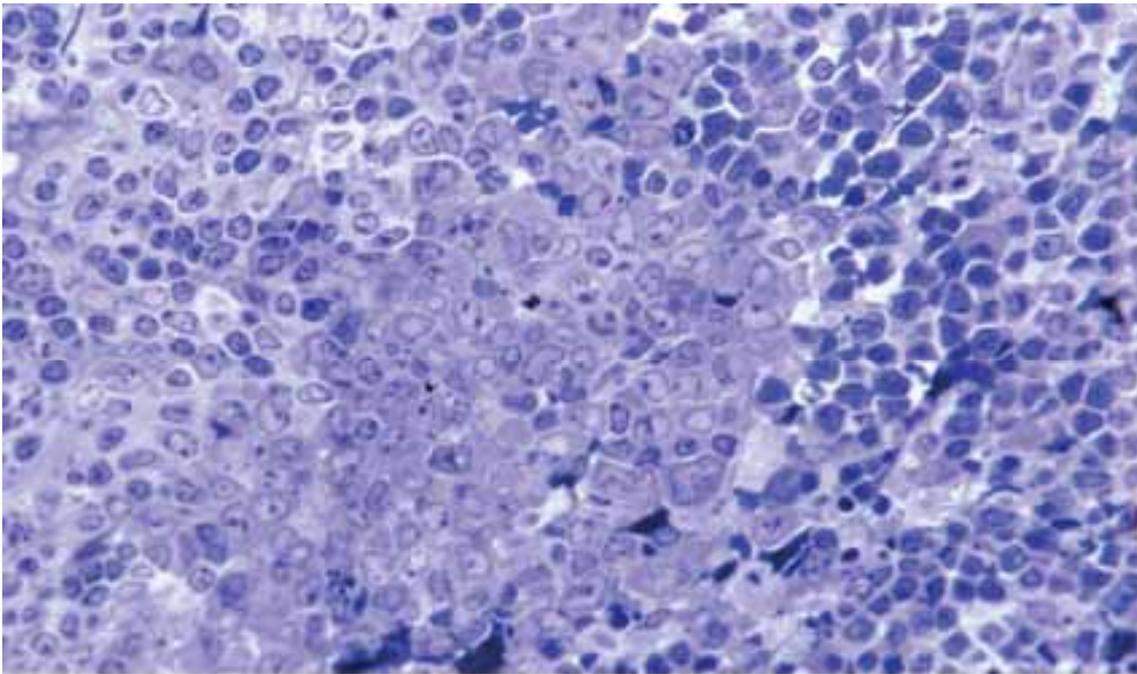
In der Milz sind zahlreiche Erythroblasten nachzuweisen, die an ihren kompakten und unregelmäßig konfigurierten Zellkernen im einem elektronendichten Zytoplasma erkennbar sind.  
Uranylacetat Bleicitrat, Vergr.: siehe Maßstab



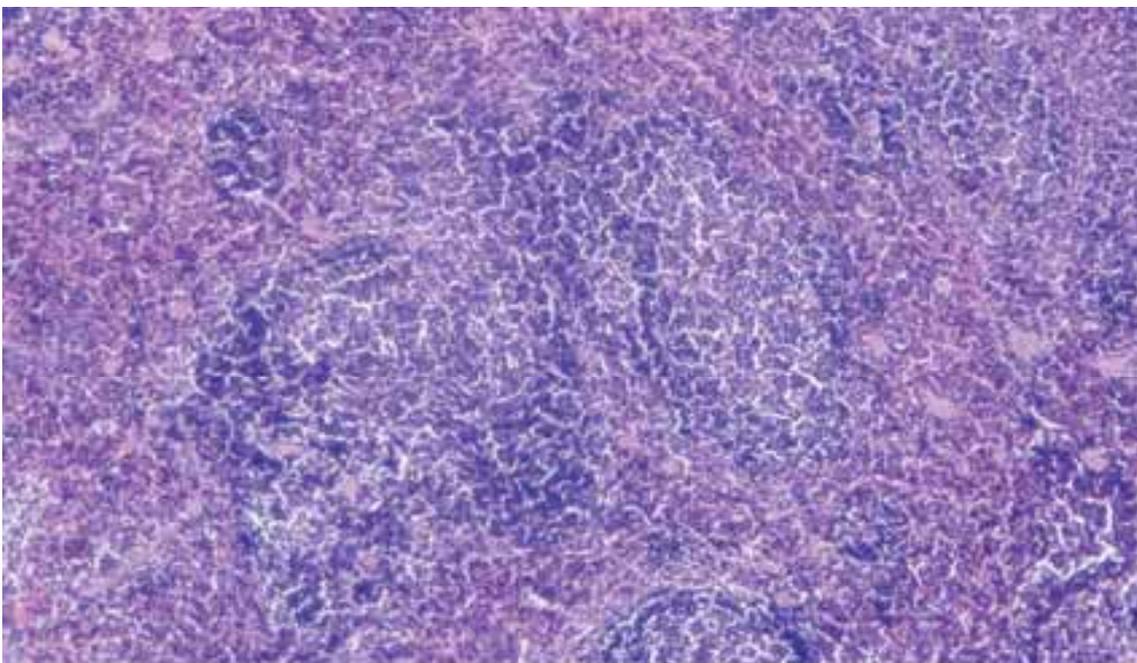
**Abb.3.3.8a Milzgewebe von Maus 4 in der Übersicht eines Semidünnschnitts.**  
Die normale Milzarchitektur ist aufgehoben. Die rote Pulpa ist erfüllt von Erythroblasten und verstreuten Megakaryozyten.  
Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 840x



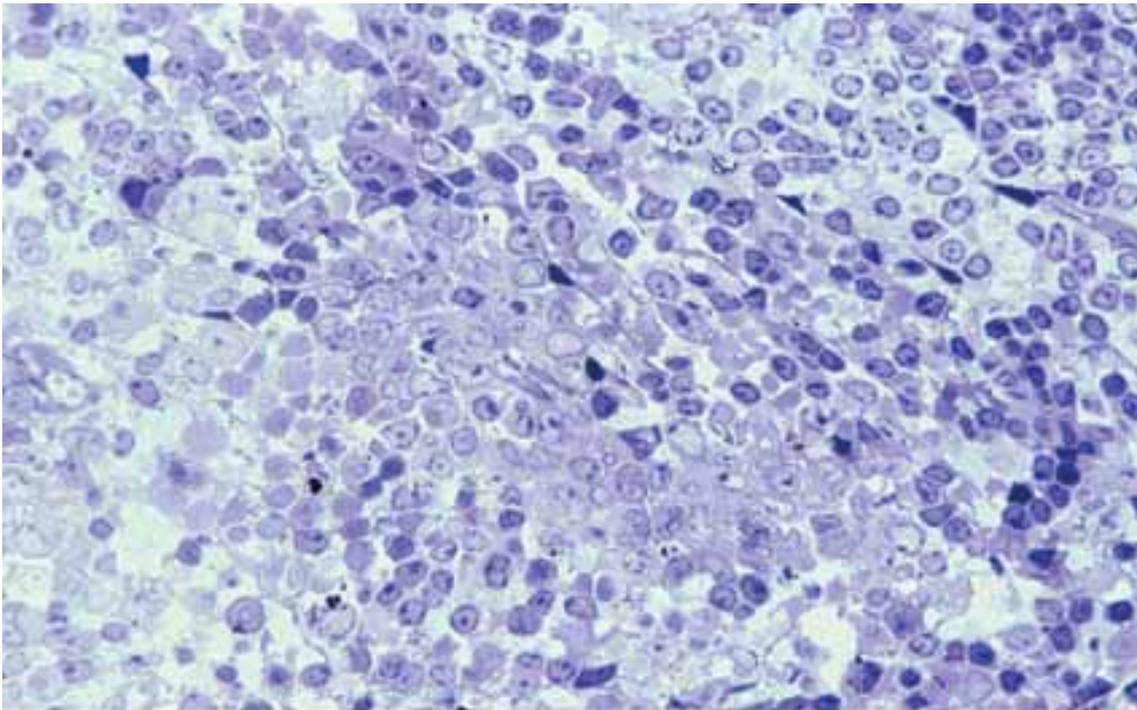
**Abb.3.3.8b Ausschnitt aus dem Zentrum von Abb. 3.4.8a.**  
Die Ausschnittsvergrößerung Bild lässt die Megakaryozyten, Erythroblasten und Blasten besser erkennen.  
Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x



**Abb.3.3.9 Ausschnitt aus der roten Pulpa von Maus 4.**  
In der Bildmitte eine Akkumulation von Blasten. Rechts davon ein Areal mit ausgeprägter Erythropoese.  
Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x



**Abb. 3.3.10 Milzgewebe von Maus 2 in der Übersicht eines Semidünnschnittes.**  
Die Milzarchitektur ist partiell erhalten. In der roten Pulpa, besonders in ihrer Peripherie gegen die weiße Pulpa imponieren dunkelblau gefärbte Bezirke, die erythropoetischen Arealen entsprechen.  
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 420x



**Abb.3.3.11 Ausschnitt aus der roten Pulpa von Maus 2 im Semidünnschnitt.**  
Im Zentrum des Bildes liegt eine kleine Ansammlung blastärer Zellen.  
Toluidinblau Pyroninrot Vergr.: 1320x

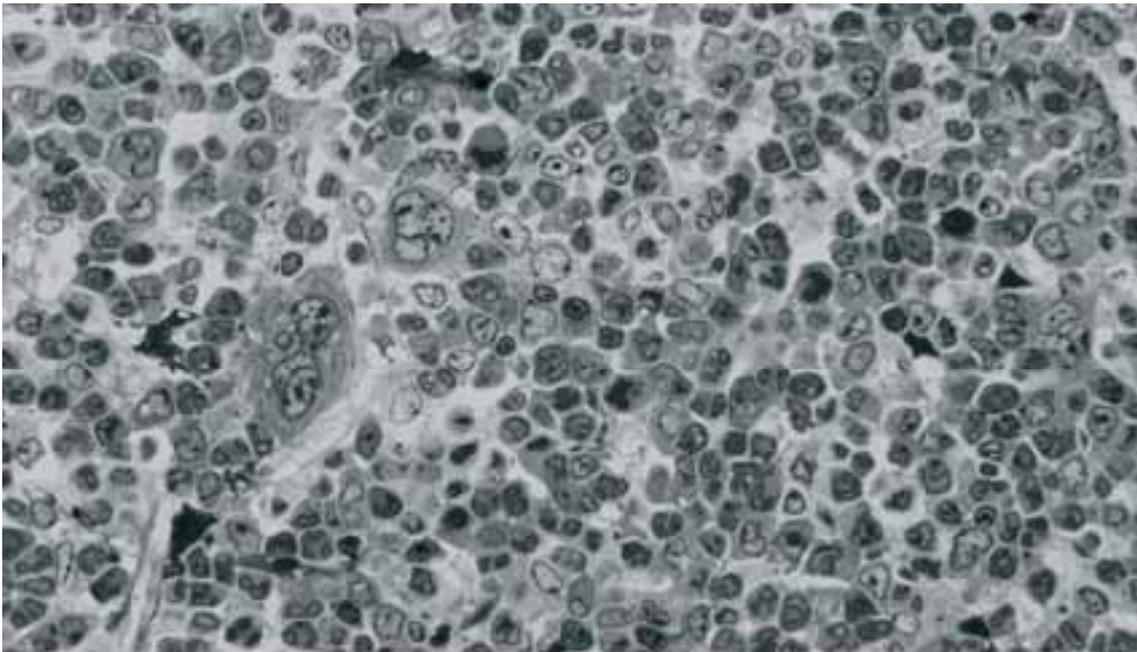
### **3.3.3 Knochenmarkbefunde**

Von jedem Tier in der MACS-Gruppe konnten Semidünnschnitte des Knochenmarks im Vergleich zu solchen der Milz heran gezogen werden. Dabei war festzustellen, daß selbst in den Fällen, in welchen das Milzgewebe eine sog. blastische Transformation zeigte, die Vermehrung von Blasten im Knochenmark in Grenzen blieb (Tabelle 4, Abb. 3.3.12 bis 3.3.16). Als durchgängigste Veränderung des Markorgans waren ursprünglich eine Reduktion der erythropoetischen Anteile mit einer Steigerung des Verhältnisses von Myelopoese zur Erythropoese (M/E-Verhältnis) aufgefallen. Außerdem war aufgefallen, dass die Megakaryozyten, mit Ausnahme von Maus 5 kaum quantitative oder qualitative Veränderungen zeigten.

Tabelle 4 Morphometrische Analyse der Semidünnschnitte von Knochenmark der Mäuse in der MACS-Gruppe

<b>Maus</b>	<b>M/E Verhältnis</b>	<b>Blasten [%]</b>	<b>Monozytoide (Atypische Pro- und Monozyten [%])</b>	<b>Megakaryozyten [%] [/mm<sup>2</sup>]</b>	<b>Diagnose</b>
<b>Maus 1</b>	6,3	13	60	0,5 107	AML M5
<b>Maus 2</b>	2,2	7	30	0,7 170	Weitgehend blutgesund
<b>Maus 3</b>	4,8	10	50	1,5 215	AML M5
<b>Maus 4</b>	5,8	10	65	1,2 187	Präleukämie
<b>Maus 5</b>	6,2	5	57	0,3 80	AML M5
<b>Kontrolle</b>	2	2	0	0,6 81	Kontrolle

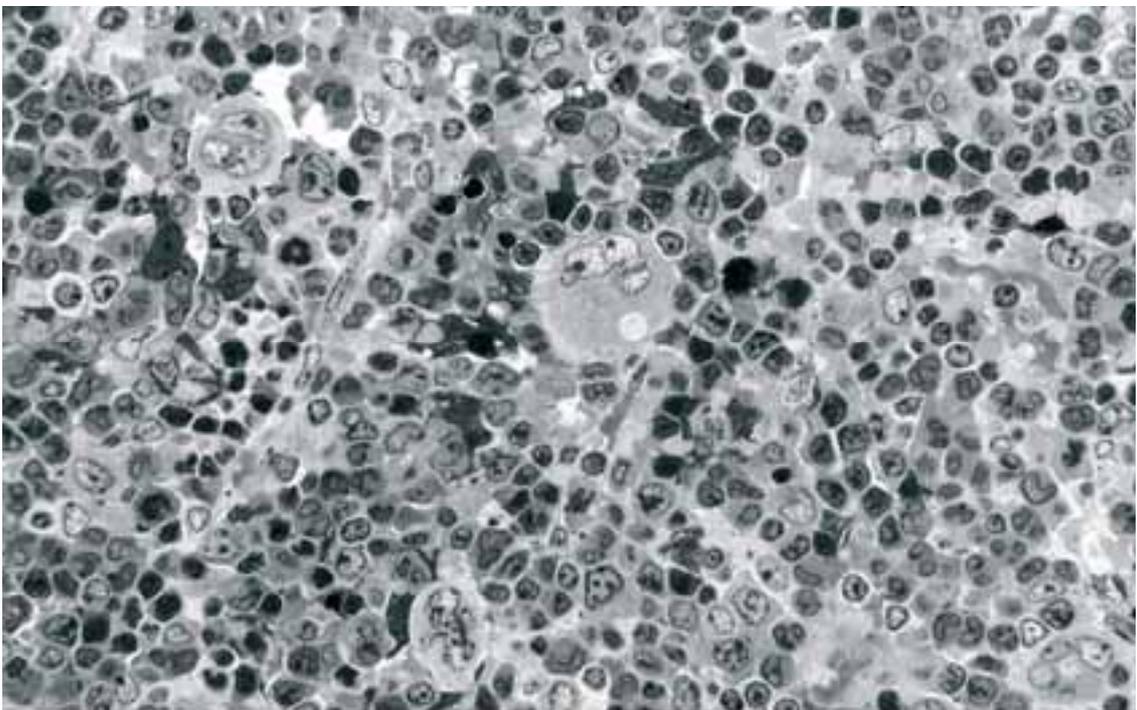
Erst die hier vorgenommene morphometrische Analyse (Tabelle 4) der Semidünnschnitte (Abb. 3.3.12 bis 3.3.16) und die elektronenmikroskopische Analyse (Abb. 3.3.17, 3.3.18) deckten das Vorhandensein größerer monozytoider Zellpopulationen bei AML wie Präleukämie auf .



**Abb.3.3.12 Knochenmark von Maus 1 im Semidünnschnitt.**

Das Bild erschien im Gegensatz zu dem der Milz (vergleiche Abb. 3.3.3) per se nicht leukämieverdächtig. Die Erythropoese ist als ein myelodysplastisches Zeichen deutlich reduziert.

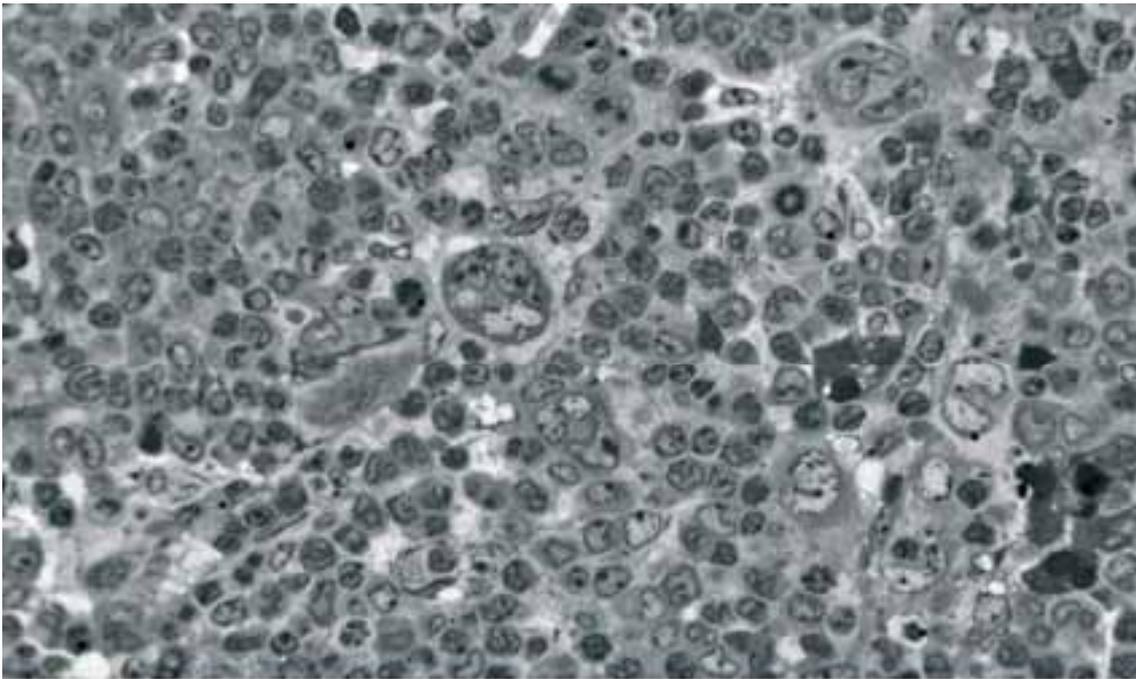
Toluidinblau Pyroninrot, Vergr.: 1320x



**Abb.3.3.13 Das Knochenmark von Maus 2 im Semidünnschnitt.**

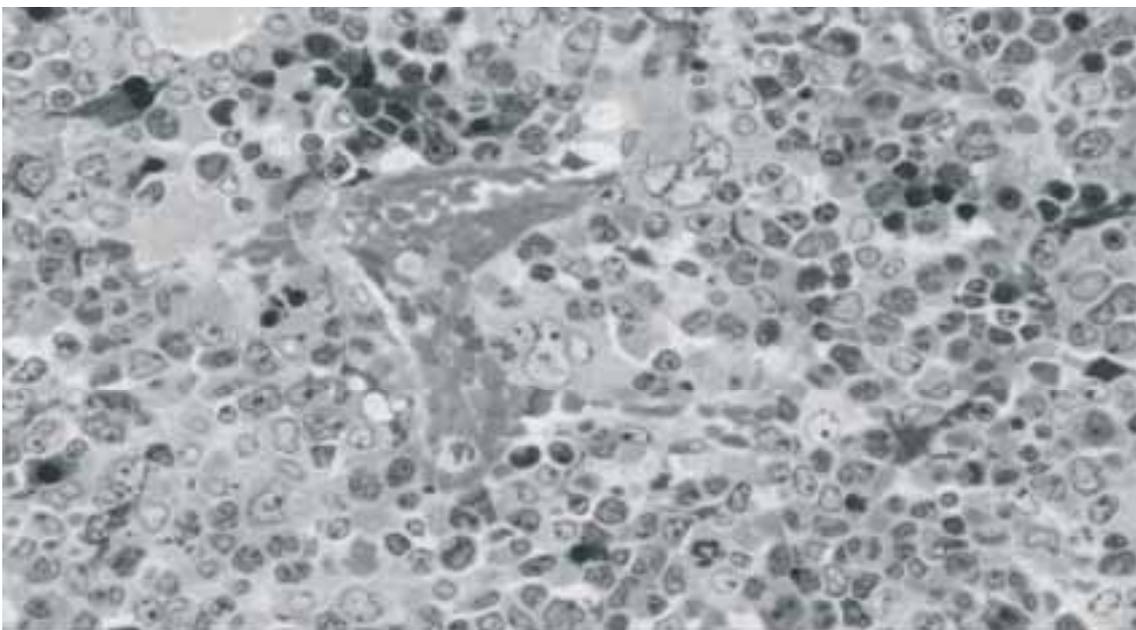
In seiner zellulären Zusammensetzung ist das Bild unauffällig.

Toluidinblau Pyroninrot, Vergr.: 1320x



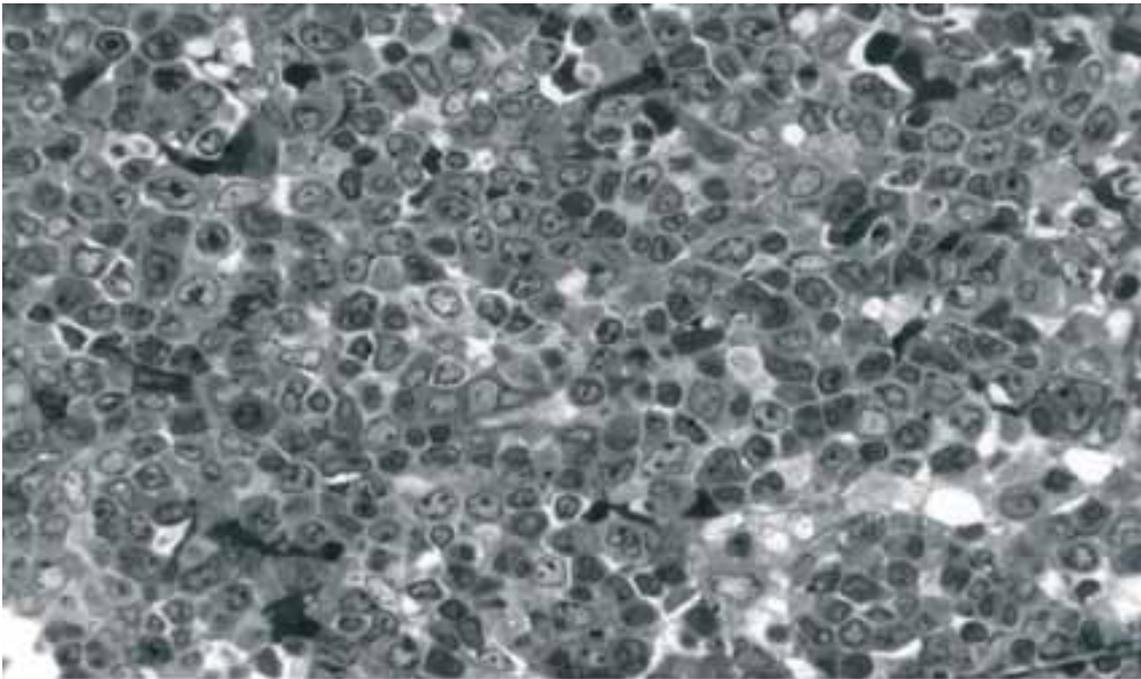
**Abb.3.3.14 Das Knochenmark von Maus 3 im Semidünnschnitt.**

Das Knochenmark spricht bei lichtmikroskopischer Betrachtung in seiner Buntheit per se nicht für das Vorliegen einer akuten Leukämie. Auffällig ist die Reduktion der Erythropoese. Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.:1320x



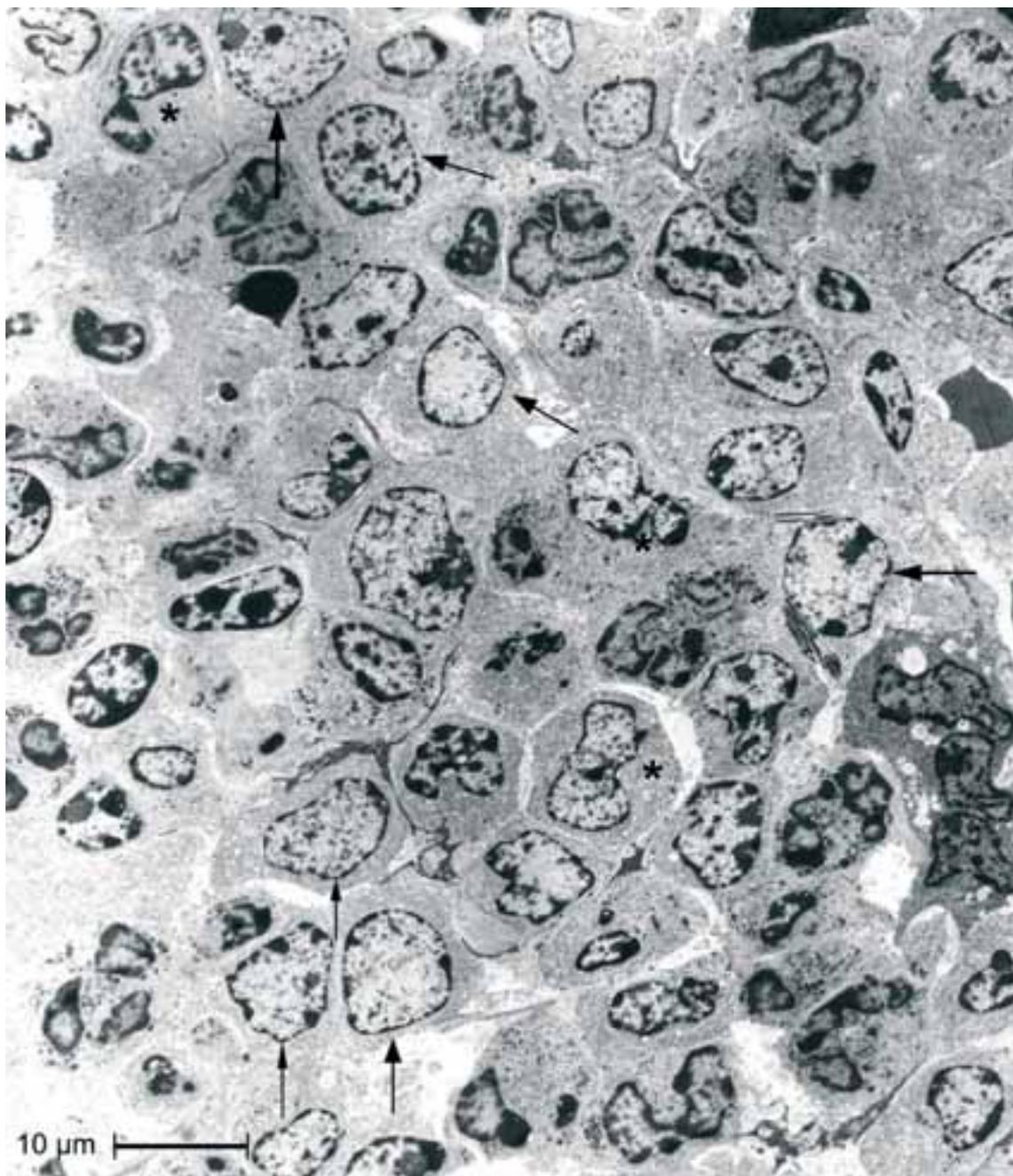
**Abb.3.3.15 Das Knochenmark von Maus 4 im Semidünnschnitt.**

Das Knochenmark ist in seiner bunten Zusammensetzung nicht leukämieverdächtig. Ein Myelodysplasiezeichen ist die stark verminderte Erythropoese und die mäßige Vermehrung von Blasten. Die Akkumulation monozytoider Zellen wurde nach quantitativer Analyse des Feinschnitts offenbar noch offener. Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x



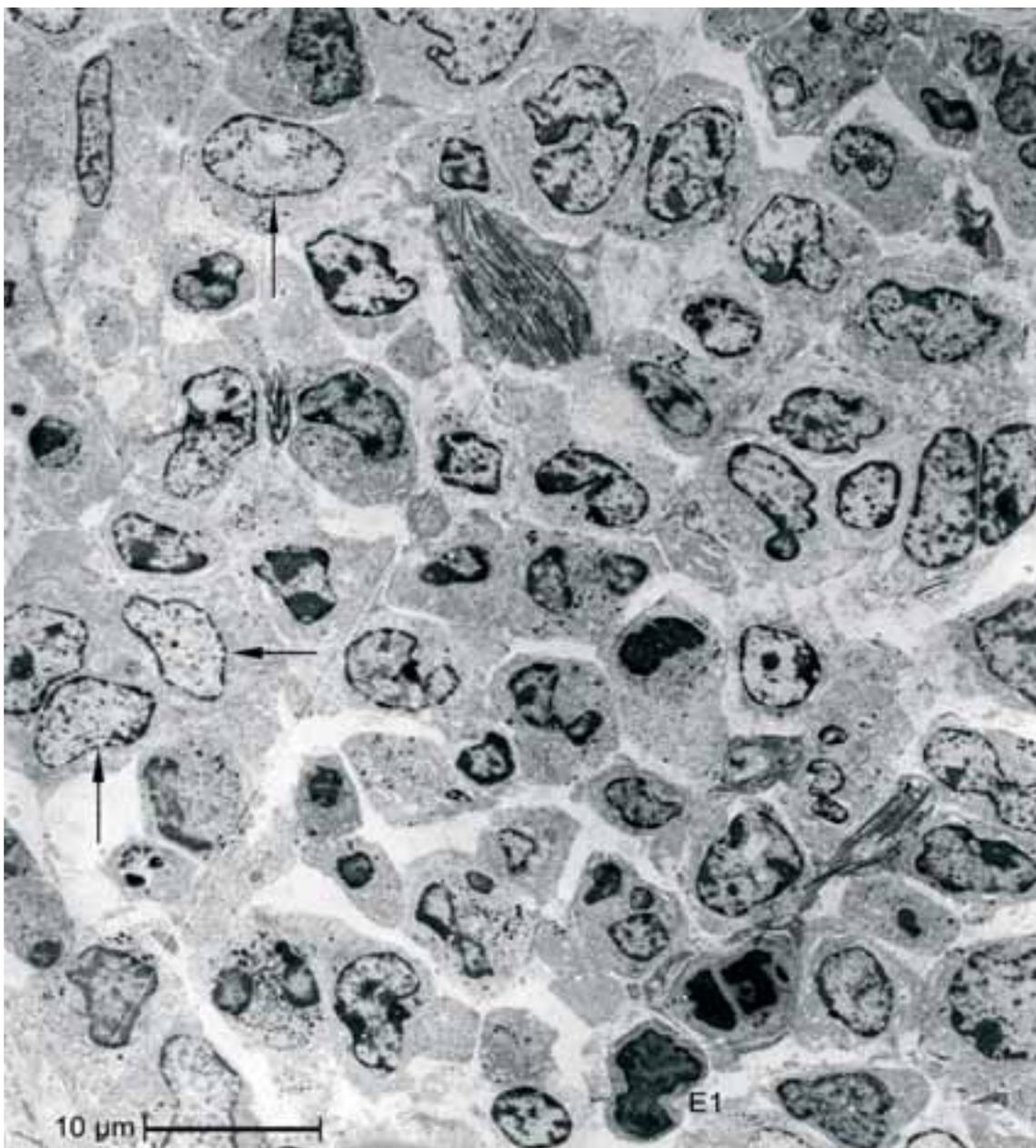
**Abb.3.3.16** *Das Knochenmark von Maus 5 im Semidünnschnitt.*

Das Knochenmark zeigt an dieser Stelle ein Fehlen der Megakaryozyten, eine starke Reduzierung der Erythropoese sowie neben einzelnen Blasten eine große monozytoide Zellpopulation, die im Feinschnitt (vergl. Abb. 3.3.18) viel deutlicher zu Tage tritt. Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 1320x



**Abb.3.3.17 Knochenmark von Maus 1 im Feinschnitt.**

Das Bild wird von monozytoiden Zellen beherrscht (\*). Daneben kommen mehrere blastäre Elemente mit locker strukturierten Kernen vor, die nur eine geringe Heterochromatinkondensation an der inneren Kernmembran zeigen (→). Erythropoetische Zellen fehlen vollständig.  
Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: siehe Maßstab



**Abb.3.3.18 Knochenmark von Maus 5 im Feinschnitt.**

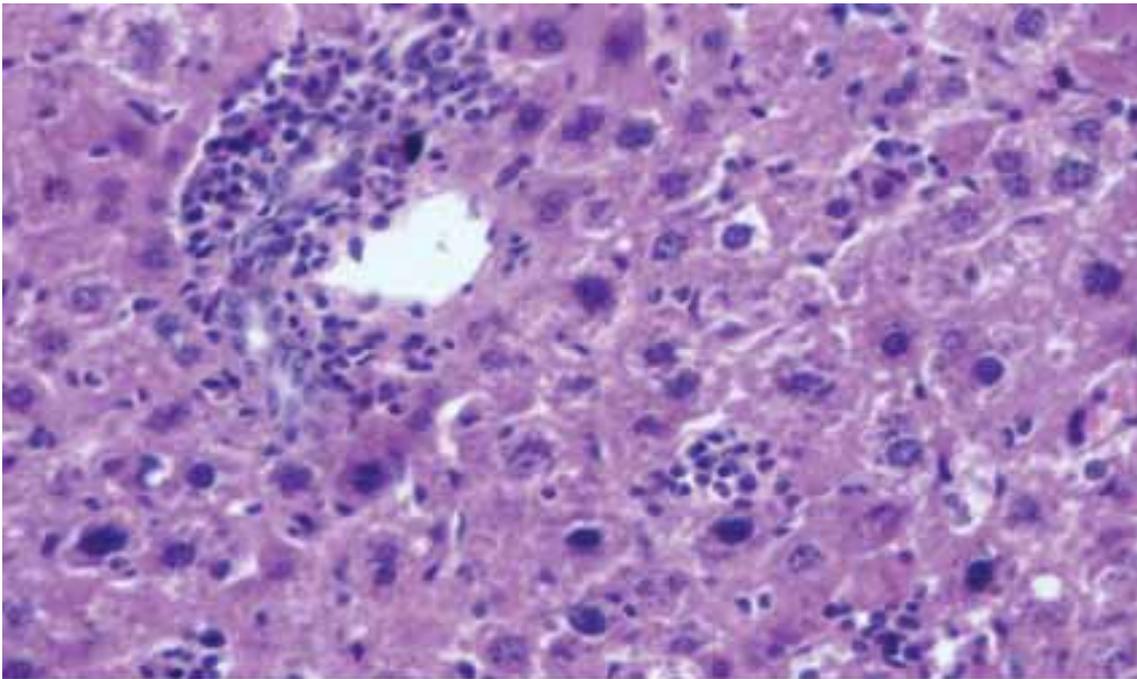
Das Bild wird von monozytoiden Zellen beherrscht. Man sieht lediglich einen basophilen Erythroblasten (E1). Blasten (→) treten dagegen trotz Vorliegens einer akuten Leukämie zurück. Zwei Anschnitte von Makrophagen zeigen nadelförmige Einschlüsse. Uranylacetat Bleicitrat. Vergr.: Maßstab

### 3.3.4 Leberbefunde

Zwei Mäuse mit Leukämie in der MACS-Gruppe wiesen periportale und intrasinusoidale Zellinfiltrationen auf, die als leukämische Infiltrate zu deuten waren (Abb. 3.3.19, 3.3.20). Damit kam der Leber nur eine untergeordnete Rolle in der hämatologischen Diagnostik zu. Die vieldeutigen Veränderungen am Leberparenchym (Tabelle 5) blieben in ihrer Bedeutung unklar.

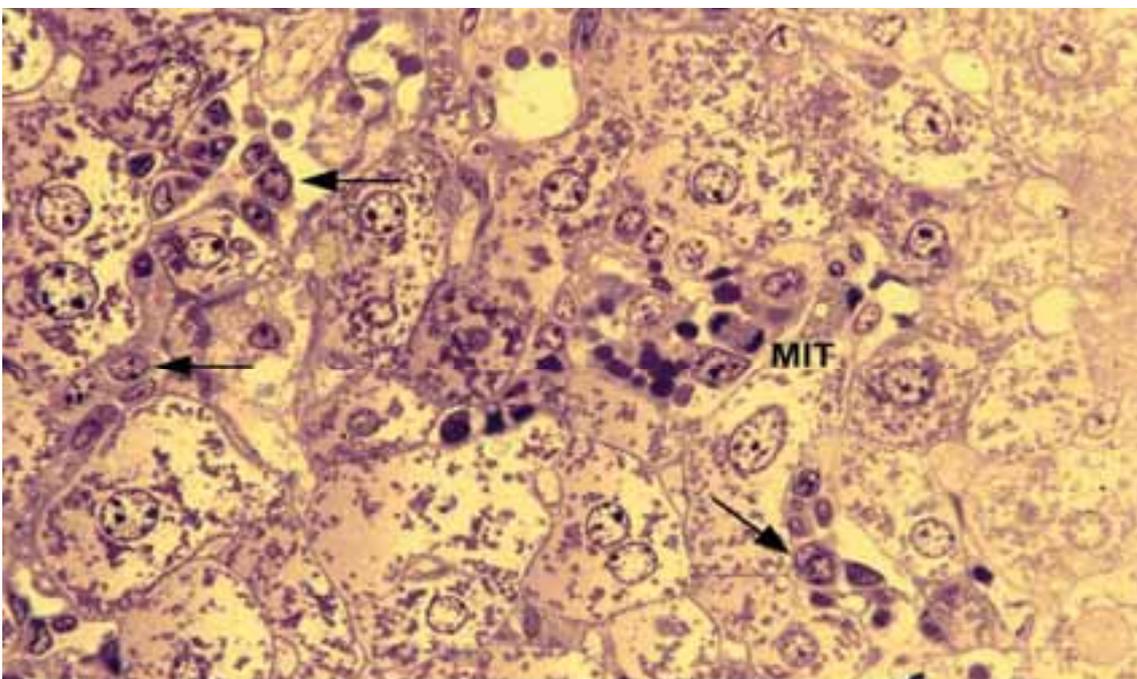
Tabelle 5 Leberbefunde von Mäusen der MACS-Gruppe

Maus	Infiltrate		Leberparenchym
	Periportal	Intrasinusoidal	
<b>Maus 1</b>	Reichliche	Mäßige	Umfangreiche Nekrosen mit Einblutungen
<b>Maus 2</b>	Keine	Keine	Disserminierte Leberzelelneknosen
<b>Maus 3</b>	Geringe	Geringe	Disserminierte Leberzelelneknosen
<b>Maus 4</b>	Keine	Keine	Fokale Leberzellneknosen
<b>Maus 5</b>	Keine	Keine	Fokale Leberzellneknosen



**Abb.3.3.19 Leber von Maus 1 im Paraffinschnitt.**

Eine Leberbeteiligung im Rahmen des leukämischen Prozesses kann sich wie hier durch periportale und intrasinusoidale Zellinfiltrationen äußern. Paraffinschnitt, H.E. Vergr.: 2100x



**Abb.3.3.20 Semidünnschnitt der Leber von Maus 1.**

Die intrasinusoidalen myeloischen Zellen bei Maus 1 sind nur teilweise unreif (->). Es liegen stellenweise auch Erythroblasten vor. Mitose( MIT). Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 2100x

### 3.4 „Graft -versus- Host“ Konstellation und Versuchsanordnung

Eine „Graft-versus-Host“ Reaktion kann einfach dadurch experimentell induziert werden, daß man allogene Milzzellen neonatalen oder subletal bestrahlten Mäusen injiziert (z.B. C57Bl/6 in Balb/c). In einem solchen Experiment rufen die implantierten T-Zellen, aktiviert durch Histokompatibilitätsantigene des Empfängers, in Knochenmark und Milz des Wirtsorganismus eine monozytäre Reaktion hervor (Fredrickson und Harris,2000). In der Leber wird durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Läsion erzeugt, die in Ihren Endstadium einer primären biliären Leberzirrhose gleicht (Itoh et al.,2000).

In der hier durchgeführten Versuchsanordnung waren die Wirtstiere immuninkompetente NOD/SCID-Mäuse, denen immunkompetente transgene Milzzellen von Mäusen des Stammes C57Black intravenös appliziert worden waren.

Das transduzierte Gen kodierte für das CD34-Protein des Menschen (hu). Trotz des hohen Konservierungsgrades bei verschiedenen Spezies unterscheidet sich die Bedeutung des CD34-Proteins für das jeweilige myeloische System (Sato et al.,1999; Goodell,1999; Okuno et al.,2002). Offensichtlich exprimieren z.B. murine Blutstammzellen kein CD34-Protein. Sie sind aber empfänglich für die Transduktion der humanen Variante.

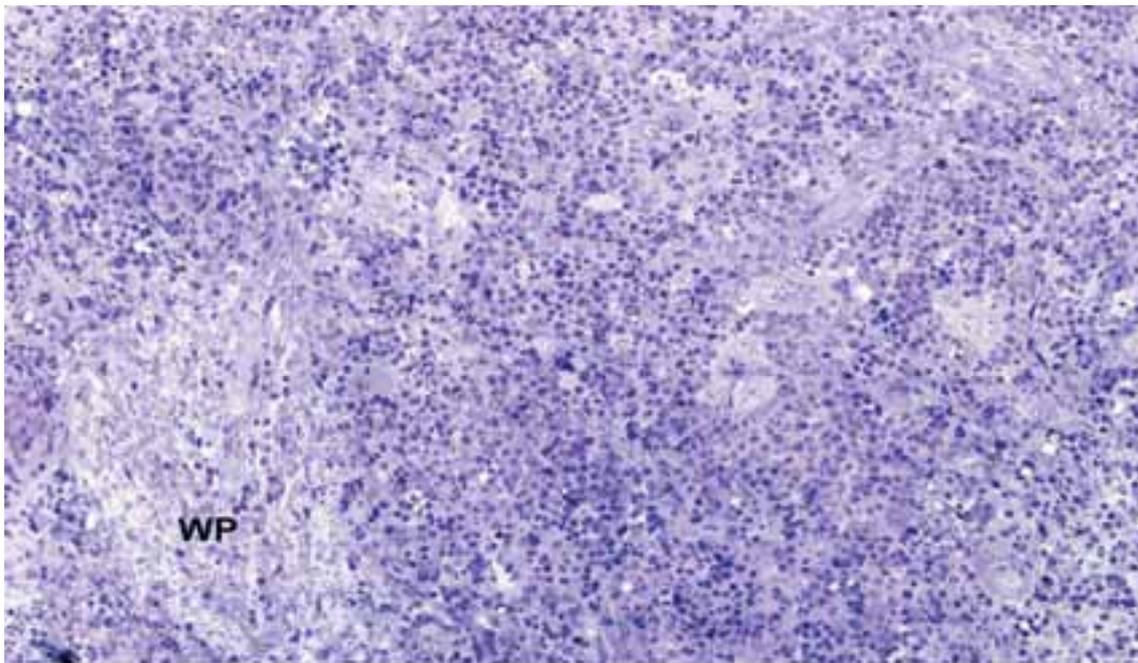
Konstruierte und künstlich eingeschleuste Gene, die für CD34-Proteine kodieren, eignen sich generell als Zellmarker und sind als solche auch geeignet für eine auf Immunaffinität und magnetic-activated cell sorting (MACS) basierende Anreicherung der Zellen. Zum anderen könnten sie helfen, die Rolle des Moleküls im myeloischen System besser zu verstehen. In dieser Hinsicht waren die Erwartungen allerdings durch die Tatsache eingeschränkt, dass das CD34-Molekül im myeloischen System der Maus überhaupt keine dem Menschen vergleichbare Rolle spielt. Vom fl (siehe Seite 4) CD34-Protein existiert eine natürlich Splicevariante mit partieller Deletion (truncated) der intrazellulären Domäne, tCD34 genannt. Ihr fehlen die für die Signaltransduktion essentiellen Erkennungsstellen für die Proteinkinase C (Krause et

al.,1996; Fackler et al.,1995; Fehse et al.,2000). Beide Varianten wurden für die Markierung der als Spender fungierenden Splenozyten eingesetzt. Es bestand die Frage nach Unterschieden in den Wirtstieren im Hinblick darauf, ob sie transgene hu fICD34<sup>+</sup> - oder hu tCD34<sup>+</sup> -Splenozyten erhalten hatten.

### 3.4.1 Milzbefunde

Die Milz des Kontrolltiers war eine unbehandelte NOD/SCID-Maus. Sie zeigte eine nur rudimentäre weiße Pulpa (Tabelle 6, Abb.3.4.1), die allerdings in ihren zentralen Anteilen mit CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten besiedelt war (Tabelle 6a, Abb.3.4.2). Der hypoplastischen weißen Pulpa gemäß war das Milzgewicht mit 50mg niedrig. In der roten Pulpa lag eine ausgeprägte Hämatopoese vor (Tabelle 6, Abb.3.4.1).

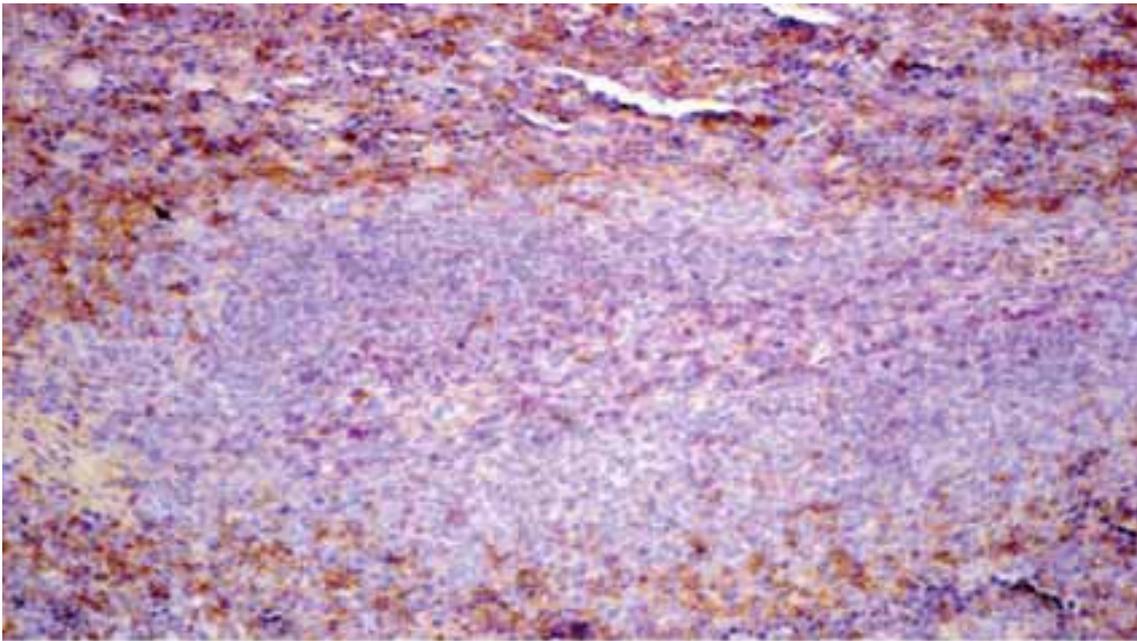
Da das Tier keine transgenen Splenozyten erhalten hatte, fanden sich auch keine hu CD34<sup>+</sup> -Zellen im Milzgewebe (Tabelle 6a).



**Abb.3.4.1 Semidünnschnittbild der Milz einer NOD/SCID Maus.**

Die weiße Pulpa (WP) ist rudimentär. In der roten Pulpa, die das Bild beherrscht, ist eine ausgeprägte splenale Hämatopoese nachweisbar, kenntlich an multiplen Erythroblasten und reichlich Megakaryozyten.

Toluidinblau Pyroninrot, Vergr.: 840x



**Abb.3.4.2 Nachweis des CD3-Antigens in der Milz einer NOD/SCID Kontrollmaus.**  
Das Bild zeigt weiße Pulpa, die am oberen und unteren Bildrand von roter Pulpa gesäumt ist. In der roten Pulpa ist massenhaft Eisen abgelagert, das auf Grund seiner Eigenfarbe sich bräunlich dargestellt. In den zentralen Anteilen der weißen Pulpa liegen mehrere CD3<sup>+</sup>-Zellen, kenntlich an einem rot-violettem Reaktionsprodukt.  
Paraffinschnitt. Vergr.: 840x

In der GMTR-Gruppe (siehe Seite 5) variierten die Milzgewichte zwischen 10mg und 120mg außerordentlich. Das mittlere Gewicht lag bei 67,5mg mit einer Standardabweichung von  $\pm 51,2$ mg (Tabelle 6). Die weiße Pulpa blieb auch nach der Transplantation von transgenen Splenozyten meist rudimentär (Tabelle 6, Abb.3.4.3, 3.4.4) Die rote Milzpulpa war bei diesen Tieren durch das Nebeneinander von Arealen einer kompakten Hämatopoese und hyperämischen Bezirken charakterisiert (Tabelle 6, Abb. 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5). CD3<sup>+</sup>-Zellen lagen zumeist verstreut in der roten Pulpa und eine zentral betonte diffuse Verteilung CD3<sup>+</sup>-Zellen charakterisierte zytochemisch die weiße Pulpa (Tabelle 6a, Abb. 3.4.6)

In einem Fall (GMTR-1) waren zudem wenige Einzelzellen in der roten Pulpa und kleine Gruppen von Lymphozyten in der weißen Pulpa positiv für das hu (t)CD34 Antigen (Tabelle 6a). Bei einem Tier (GMTR-4) war die splenale Hämatopoese fast ausschließlich megakaryozytär (Tabelle 6; Abb. 3.4.7). Die Megakaryozyten waren wie die der anderen Milzen in hohen Prozentsätzen kräftig hu (t)CD34<sup>+</sup> (Tabelle 6a, Abb. 3.4.8).

Tabelle 6 Morphometrische Milzbefunde in der „Graft-versus-Host“ Konstellation (GMTR-Gruppe)

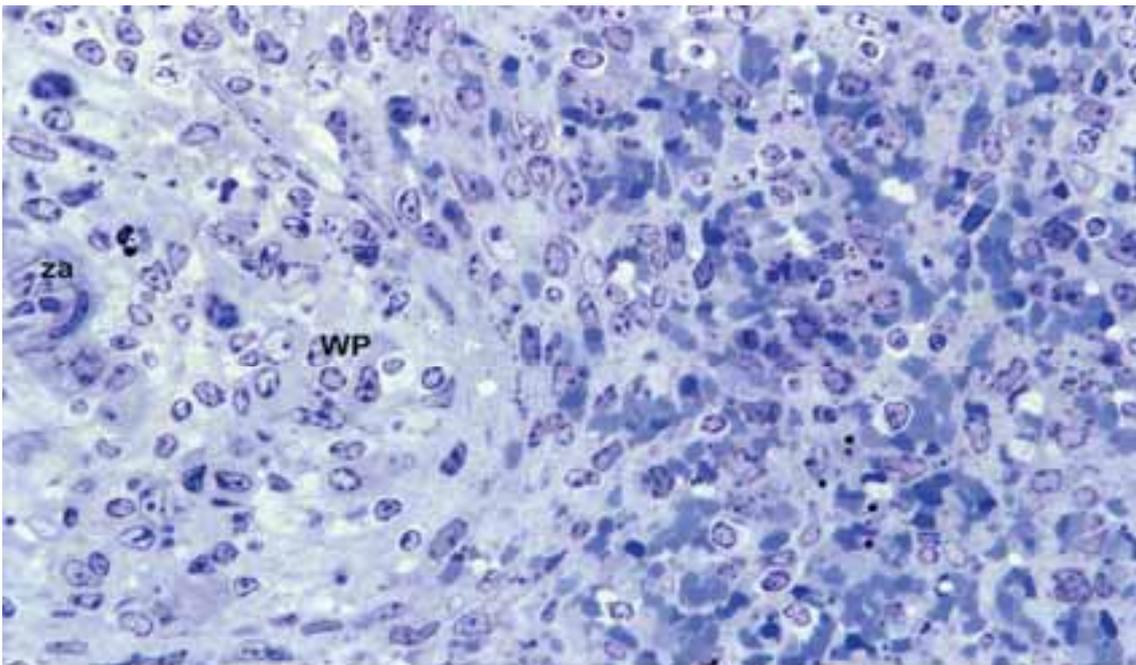
Maus	Gewicht [mg]	Weiße Pulpa [Vol%]	Rote Pulpa	
			Gesamtanteil [Vol %]	Hämatopoese [Vol %]
<b>NOD/SCID unbehandelt</b>	50	12	88	80
<b>GMTR-1</b>	120	17	83	50
<b>GMTR-2</b>	40	n.b.	n.b.	n.b.
<b>GMTR-3</b>	100	5	95	51
<b>GMTR-4</b>	10	27	73	19 fokal megakaryozytär
<b>GMTR-1 bis 4</b>	<b>m 67,5 +/- 51,2</b>			

n.b.= nicht bestimmt

Tabelle 6a Zytochemische Milzbefunde in der GMTR-Gruppe

NOD/SCID Mäuse	CD3+ Zellen in roter Pulpa	CD3+ Zellen in weißer Pulpa	hu (t)CD34+ Megakaryozyten in roter Pulpa [%]	Andere hu (t)CD34+ Zellen in roter Pulpa	hu (t)CD34+ Zellen in weißer Pulpa
<b>Unbehandelt</b>	Weit verstreute Einzelzellen	Zentral angeordnet	Keine	Keine	Keine
<b>GMTR-1</b>	Verstreute Einzelzellen und kleine Gruppen	Zentral akkumuliert und diffus verteilt	98	Wenige Einzelzellen	Kleine Gruppen
<b>GMTR-2</b>	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
<b>GMTR-3</b>	Verstreute Einzelzellen		78	Keine	Keine
<b>GMTR-4</b>	Verstreute Einzelzellen		95	Keine	Keine

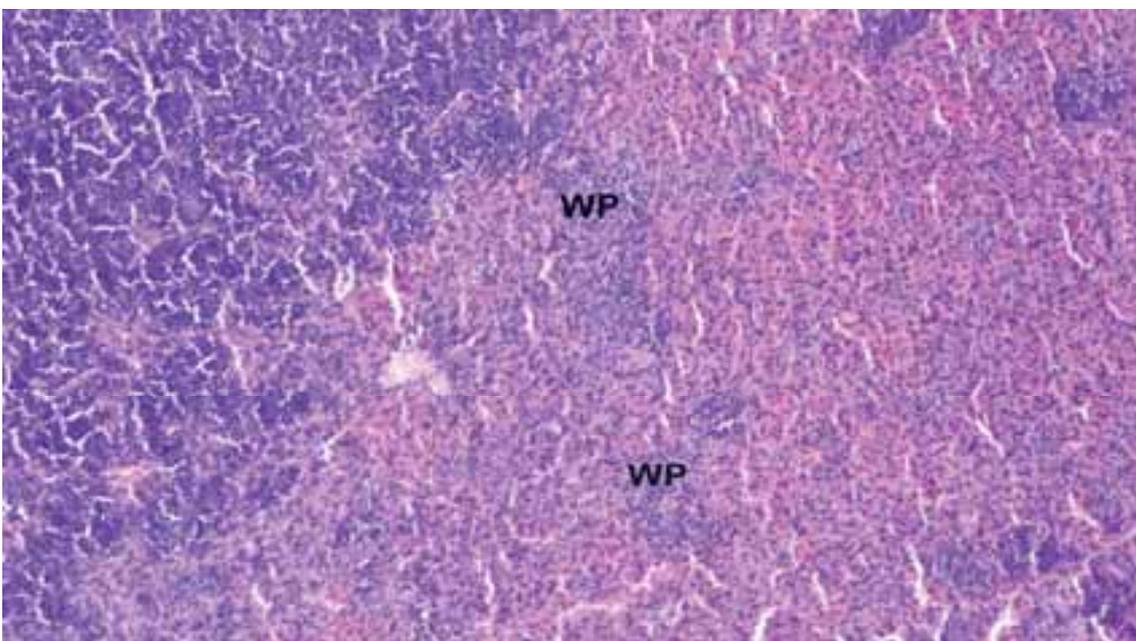
n.b.= nicht bestimmt



**Abb.3.4.3 Semidünnschnitt der Milz einer Maus aus der GMTR-Gruppe.**

Die rechte Bildseite besteht aus einer hyperämischen roten Pulpa. Die Erythrozyten in ihr sind aggregiert und bläulich angefärbt. Links befindet sich rudimentäre weiße Pulpa (WP) mit einer zentralen Arteriole (za) mittig am linken Bildrand.

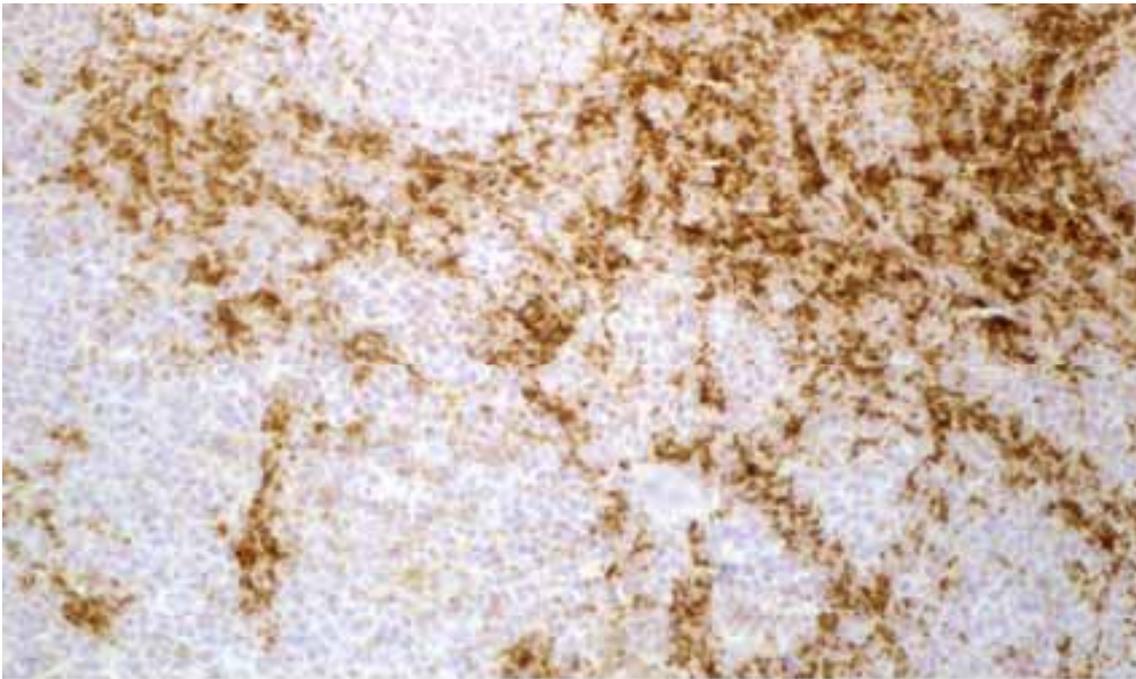
Toluidinblau Pyroninrot .Vergr.: 1320x



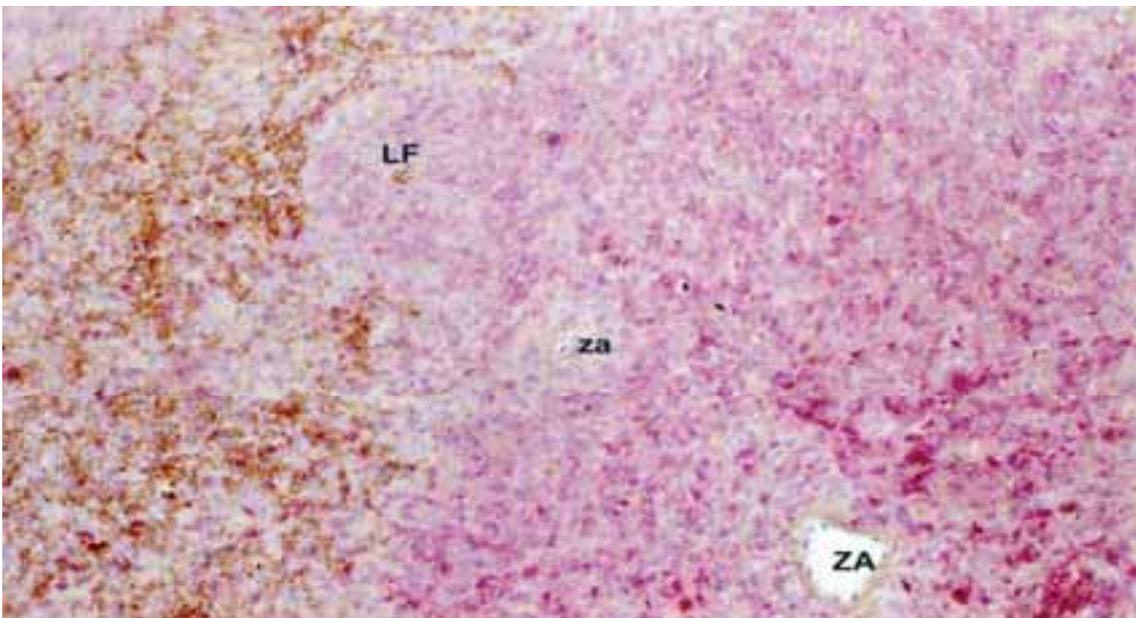
**Abb.3.4.4 Milzgewebe einer Maus aus der GMTR-Gruppe in der Übersicht.**

Neben rudimentären Anteilen der weißen Pulpa (WP) ausgedehnte Bereiche der roten Pulpa. Diese sind entweder hyperämisch (rötliche Bezirke mit reichlich Erythrozyten), wie in der rechten Bildhälfte, oder zeigen eine ausgeprägte Hämatopoese (bläuliche Bezirke) mit reichlich Erythroblasten, wie in der linken oberen Bildecke.

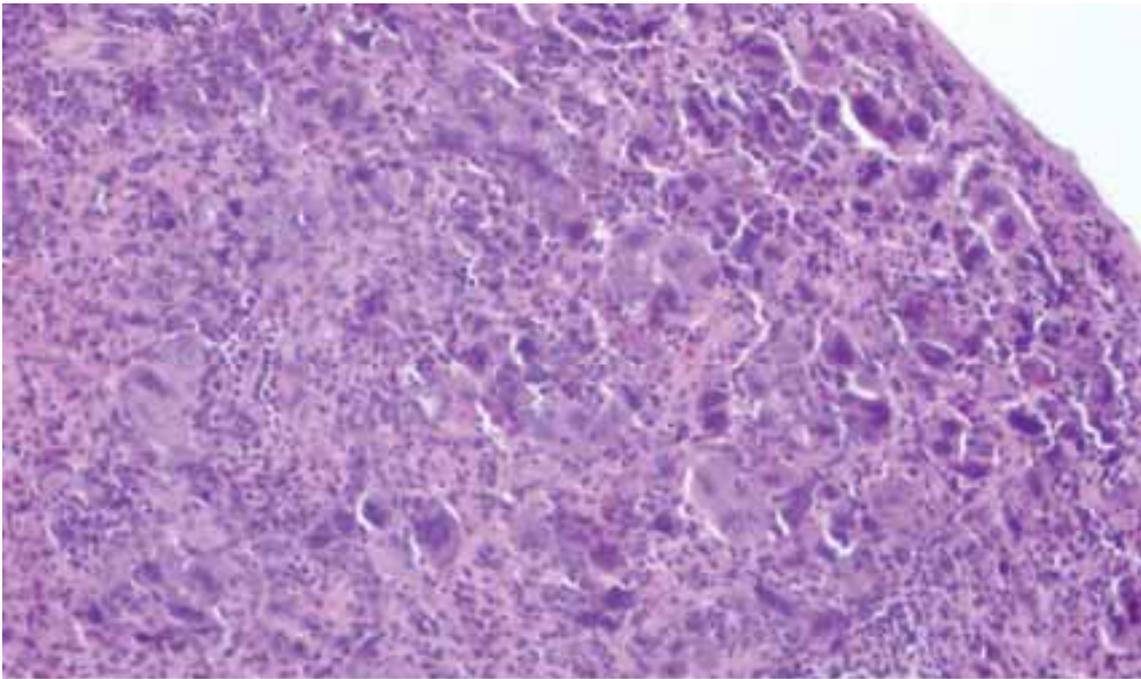
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 420x



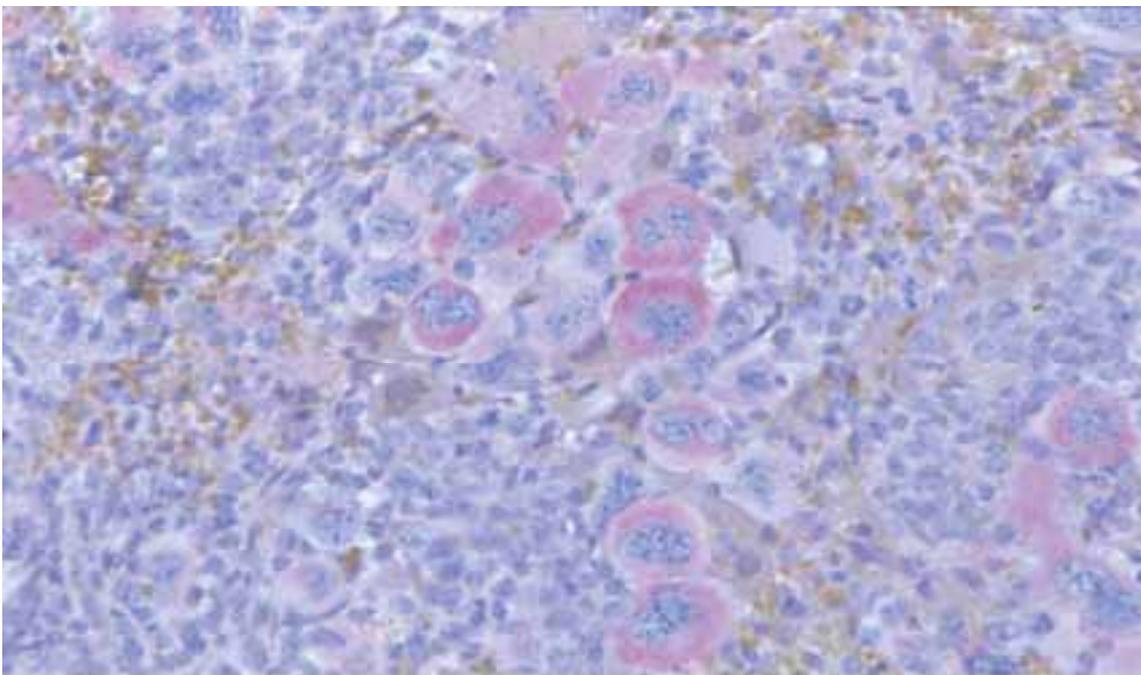
**Abb.3.4.5 Peroxidase Reaktion in der Milz einer Maus aus der GMTR-Gruppe.**  
Das braune Reaktionsprodukt markiert die neutrophile Hämatopoese in ausgedehnten Bereichen.  
Paraffinschnitt, Vergr.: 840x



**Abb.3.4.6 Nachweis des CD3-Antigens in der Milz einer Maus der GMTR-Gruppe.**  
Am linken Bildrand ist rote Milzpulpa durch Ihre eisenhaltigen Makrophagen markiert. Das Speichereisen ist an seiner bräunlichen Eigenfarbe erkennbar. Rechts von ihr ist weiße Pulpa mit einer Zentralarterie(ZA), einer Zentralarteriole (za) und einem Lymphfollikel (LF) angeschnitten. Beachte die locker verteilten CD3<sup>+</sup>-Zellen in der roten Pulpa und ihre Akkumulation in zentralen Bereichen der weißen Pulpa.  
Paraffinschnitt, Vergr.: 840x



**Abb.3.4.7 Kapselnahes Milzgewebe einer Maus aus der GMTR-Gruppe.**  
Milzkapsel am rechten oberen Bildrand. Das Bild der splenalen Hämatopoese beherrschen Massen von Megakaryozyten.  
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 1320x



**Abb.3.4.8 Nachweis des (t)CD34-Antigens in der Milz einer Maus der GMTR-Gruppe.**  
Das rötliche Reaktionsprodukt befindet sich selektiv im Zytoplasma der meisten Megakaryozyten.  
Paraffinschnitt. Vergr.: 2100x

In der GMFL- Gruppe ( siehe Seite 5) variierten die Milzgewichte zwischen 40mg und 160mg. Das mittlere Gewicht lag mit 105mg deutlich höher allerdings bei einer großen Standardabweichung von  $\pm 55,1$ mg (Tabelle 7). Die weiße Milzpulpa blieb auch in dieser Gruppe hypoplastisch mit einem Anteil zumeist diffus verteilter CD3<sup>+</sup>-Zellen. In der roten Pulpa waren Einzelzellen und/oder kleine Gruppen von Zellen CD3<sup>+</sup>. Bei weitem am kräftigsten reagierte auch in dieser Gruppe ein großer Teil der Megakaryozyten auf das hu (fl)CD34-Antigen (Tabelle 7a, Abb. 3.4.9). Die rote Milzpulpa war bei diesen Tieren gleichfalls durch das Nebeneinander von ausgedehnten Arealen einer Hämatopoese und hyperämischen Bezirken charakterisiert. Ein Fall (GMFL-4) zeichnete sich durch eine nur mäßige Hämatopoese ohne Beteiligung von Megakaryozyten in der roten Pulpa und in der weißen durch ein partielles „Leergeräumtsein“ der PALS aus (Abb. 3.4.10).

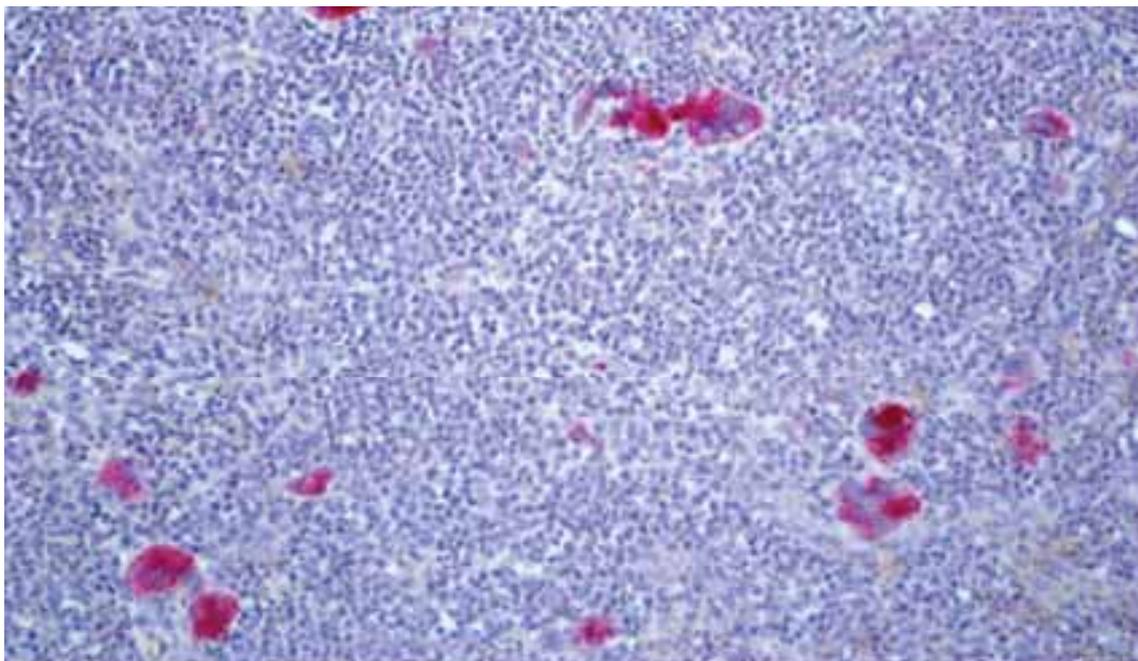
Tabelle 7 Morphometrische Milzbefunde in der „Graft-versus-Host“ Konstellation (GMFL-Gruppe)

Maus	Gewicht [mg]	Weiße Pulpa [Vol%]	Rote Pulpa	
			Gesamtanteil [Vol%]	Hämatopoese [Vol%]
<b>NOD/SCID unbehandelt</b>	50	12	88	80
<b>GMFL-1</b>	160	11	88	67
<b>GMFL-2</b>	140	12	88	70
<b>GMFL-3</b>	40	3	97	88
<b>GMFL-4</b>	80	14	85	28
<b>GMFL-1 bis 4</b>	<b>m 105 +/- 55,1</b>			

n.b.=nicht bestimmt

Tabelle 7b Zytochemische Milzbefunde in der GMFL-Gruppe

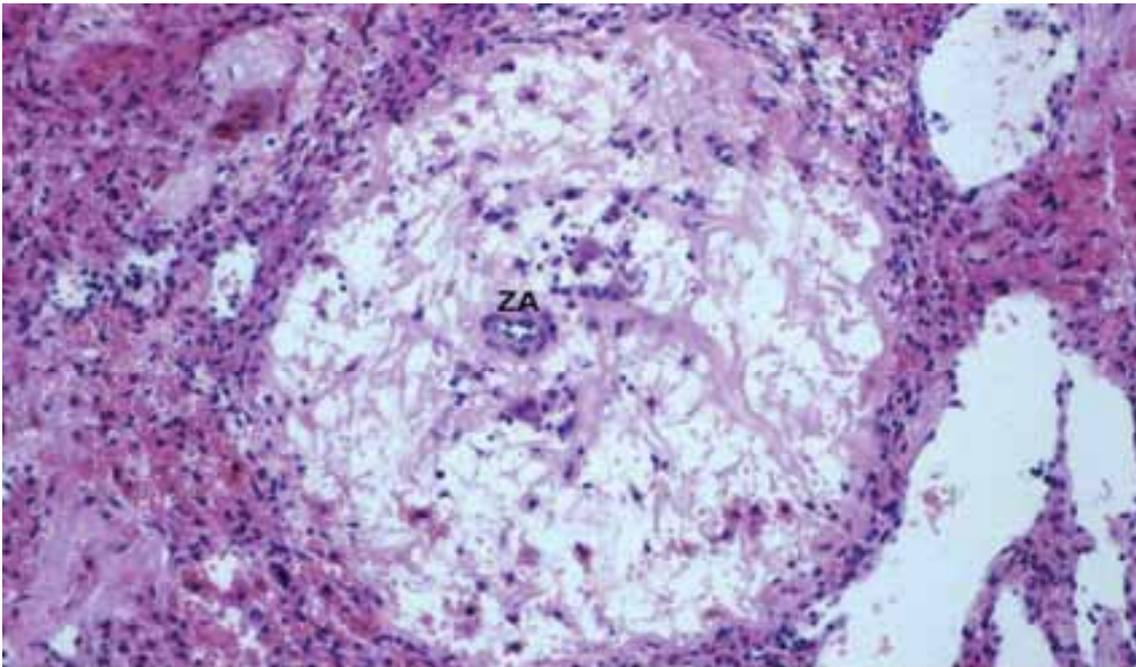
NOD/SCID Mäuse	CD3+ Zellen in roter Pulpa	CD3+ Zellen in weißer Pulpa	hu (fl)CD34+ Megakaryozyten in roter Pulpa [%]	Andere hu (fl)CD34+ Zellen in roter Pulpa	hu (fl)CD34+ Zellen in weißer Pulpa
Unbehandelt	Weit verstreute Einzelzellen	Zentral angeordnet	Keine	Keine	Keine
GMFL-1	Weit verstreute Einzelzellen	Diffus verteilt	50	In hyperämischen Bereichen viele Einzelzellen	Verstreute Einzelzellen u. größere Gruppen fokal
GMFL-2	Einzelzellen und Gruppen	Diffus verteilt	80	Wenige Einzelzellen	Keine
GMFL-3	Kleine Gruppen von Zellen	Diffus verteilt	90	Wenige Einzelzellen und Gruppen	Keine
GMFL-4	Einzelzellen	Diffus verteilt	Keine	Keine	Keine



**Abb.3.4.9 Nachweis des (fl)CD34-Antigens in der Milz einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**

Das kräftige Reaktionsprodukt hat die meisten der im Schnitt befindlichen Megakaryozyten dargestellt.

Paraffinschnitt. Vergr.: 1320x



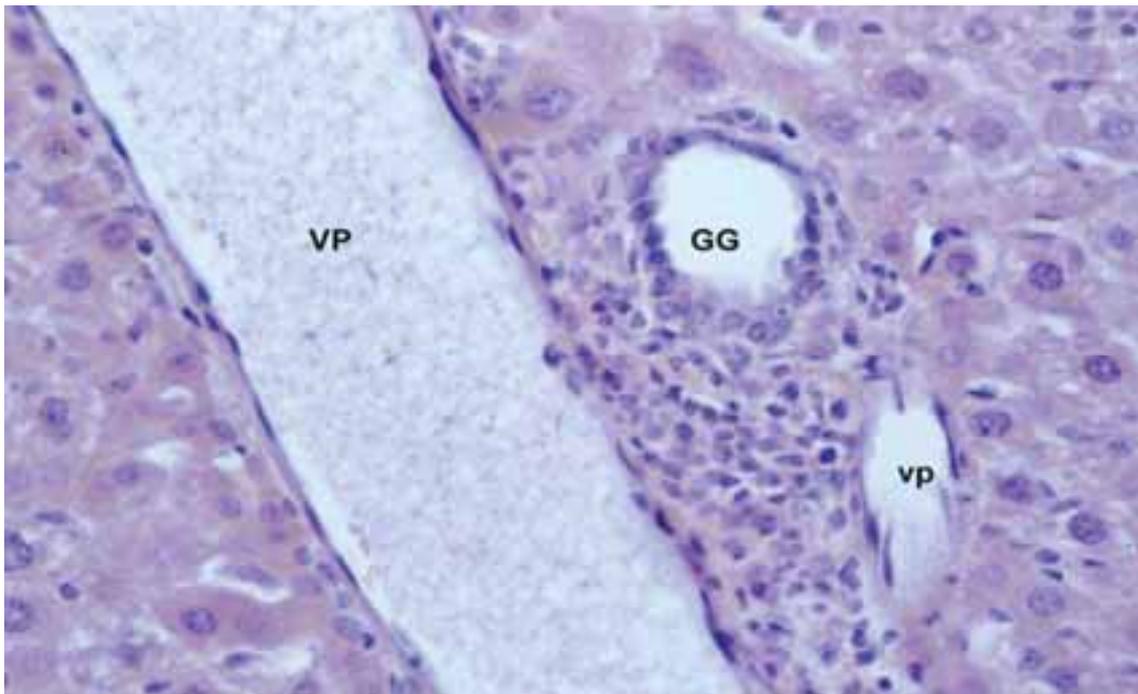
**Abb.3.4.10 Milzgewebe einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**  
 Die ursprünglich rudimentäre weiße Pulpa ist zellulär weitgehend leer geräumt. Man erkennt noch die Zentralarterie (ZA). Die umgebende rote Pulpa weist weite Sinus auf und ist stark hyperämisch.  
 Paraffinschnitt. Vergr.: 840x

### 3.4.2 Leberbefunde

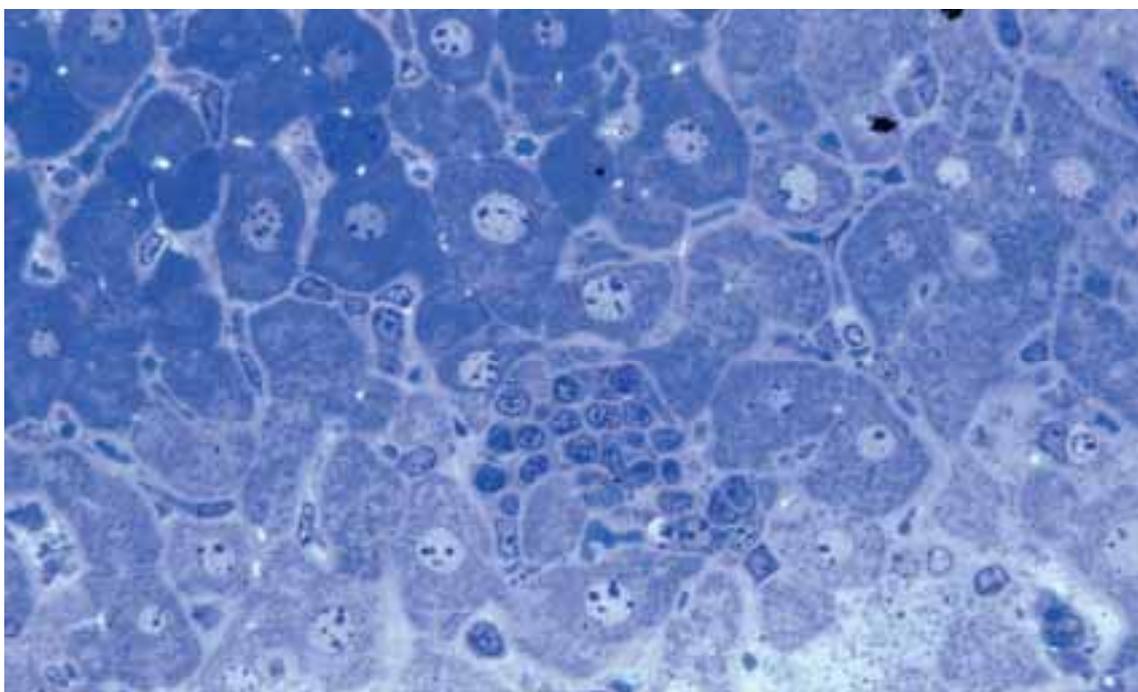
Die Leber des Kontrolltieres war im HE-Präparat unauffällig. In den immunzytochemischen Präparaten fanden sich  $CD3^+$ -Zellen im Sinussystem nur in sehr lockerer Verteilung aber erwartungsgemäß keine Zellen mit hu  $CD34$  Reaktivität.

In der GMTR-Gruppe lagen die Lebergewichte mit einem Medianwert von 1,73g bei einer Standardabweichung von 0,27g (Tabelle 8) deutlich über dem des Kontrolltieres (1,17g).

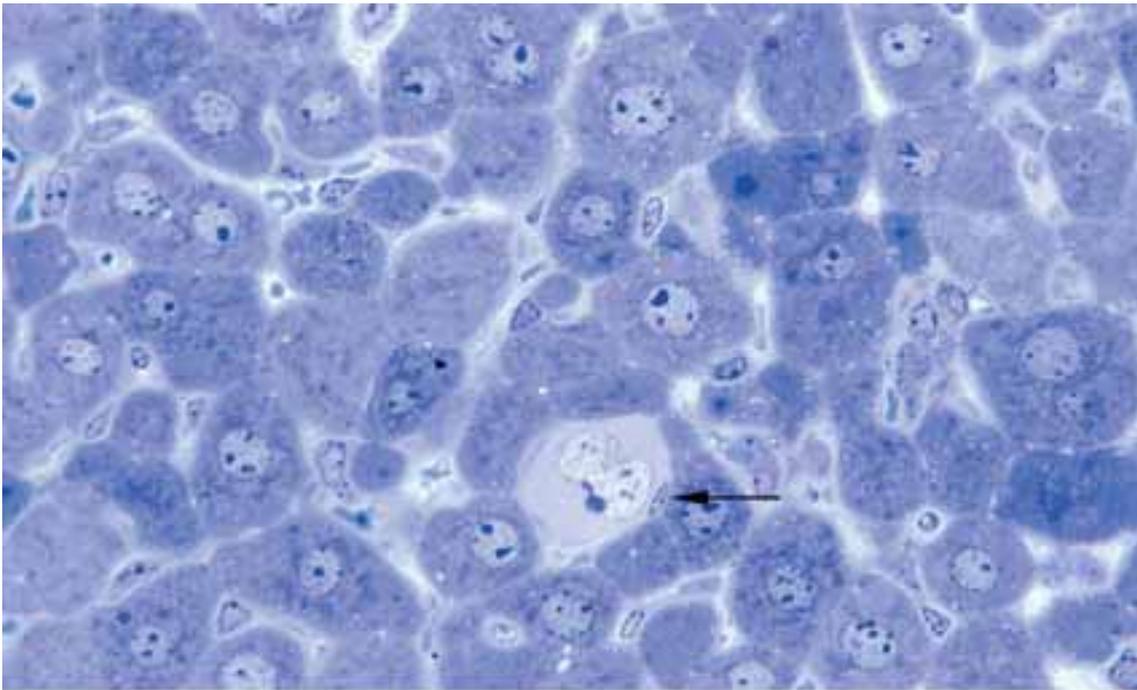
Die Leberschnitte zeigten in dieser Gruppe kleine periportale Rundzellinfiltrate (Abb. 3.4.11) und intrasinusoidal kleine Nester einer Hämatopoese vor allem aus Erythroblasten und wenigen Megakaryozyten bestehend (Abb. 3.4.12, 3.4.13).  $CD3^+$ -Zellen waren im Sinussystem gleichfalls verstreut aber deutlich größer an Zahl als im Kontrolltier und zudem in den kleinen periportalen Infiltraten und perizentral (d.h. um Zentralvenen) nachweisbar (Tabelle 8). Hu  $tCD34^+$  waren lediglich ein Teil bzw. alle der auf der Schnittfläche angetroffenen Megakaryozyten (Tabelle 8, Abb. 3.4.14).



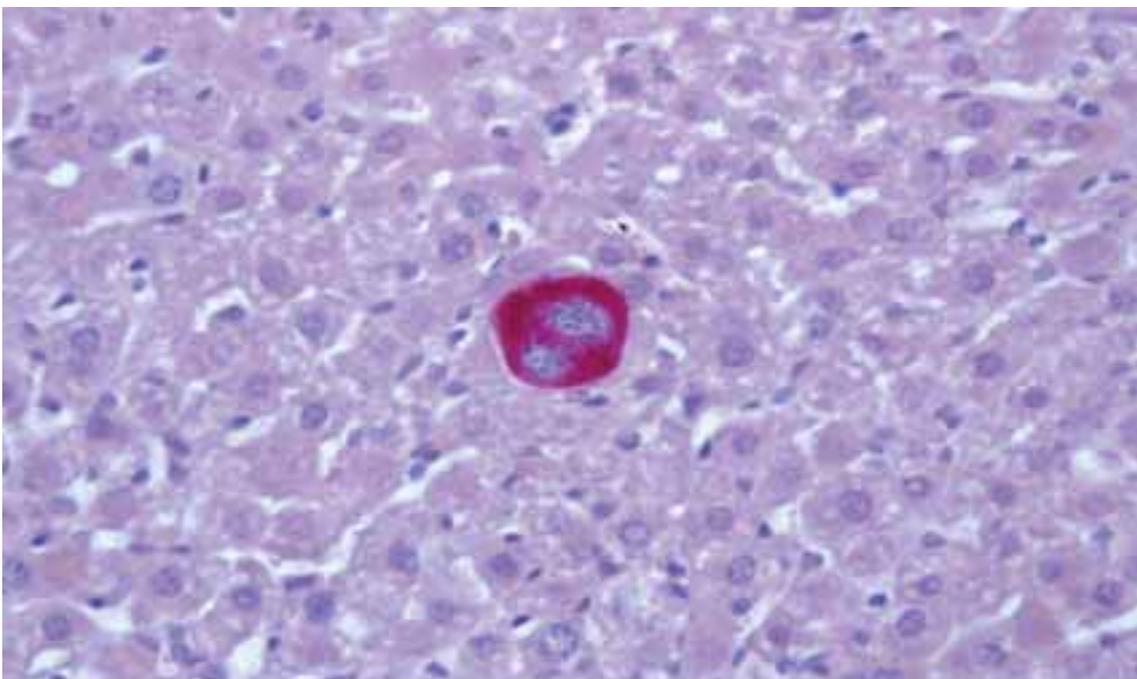
**Abb.3.4.11 Lebergewebe einer Maus aus der GMTR-Gruppe.**  
 Ein Periportalfeld, das neben einem großen Ast der V. portae liegt (VP), zeigt ein sog. Rundzellinfiltrat. Gallengang (GG), Kleiner Ast der V. portae (vp).  
 Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 1320x



**Abb.3.4.12 Semidünnschnitt der Leber einer Maus aus der GMTR-Gruppe.**  
 Unterhalb der Bildmitte erkennt man eine intrasinusoidal gelegene Ansammlung von Erythroblasten.  
 Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 2100x



**Abb.3.4.13 Semidünnschnitt der Leber einer Maus aus der GMTR- Gruppe.** Intrasinusoidal gelegener Megakaryozyt. Die Lokalisation des Megakaryozyten im Sinuslumen zeigt sich durch einen ihm flach anliegenden Endothelzellkern (→). Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 2100x



**Abb.3.4.14 Nachweis des (t)CD34-Antigens in der Leber einer Maus aus der GMTR-Gruppe.** Es hat sich selektiv ein intrasinusoidal gelegener Megakaryozyt dargestellt. Paraffinschnitt. Vergr.: 2100x

In der GMFL-Gruppe lag die Größe der Leber mit im Mittel 1,49g bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,31$ g zwar in jedem der Fälle über dem Kontrollwert von 1,17g aber geringer als in der GMTR-Gruppe. Dennoch waren hier größere periportale Infiltrate (Abb. 3.4.15, 3.4.19) und darüber hinaus einzelne Gewebseinschmelzungen mit Höhlenbildung im Inneren oder Einziehungen des Organs an der Oberfläche nachweisbar (Abb. 3.4.16, 3.4.17). Als Vorstufen solcher Einschmelzungen mussten Gruppen nekrotischer Leberzellen angesehen werden (Abb. 3.4.18).

Im Granulationsgewebe um nekrotisierte Läsionen war der Anteil  $CD3^+$ -Zellen mit 10%-20% deutlich niedriger als in den periportal infiltrierten, wo der Anteil 40% bis maximal 80% betrug (Tabelle 9, Abb. 3.4.19). Auch das Ausmaß der extramedullären Hämatopoese in der Leber war im Mittel deutlich stärker als in der GMTR-Gruppe. Es handelte sich dabei vor allem um erythropoetische Zellen in allen Reifestufen (Abb. 3.4.20) und verstreute Megakaryozyten im Sinussystem.

Die Erythroblasten der Leber zeigten keine Expression des hu (fl)CD34. Das humane Genprodukt war jedoch in fast allen Megakaryozyten (Tabelle 9, Abb. 3.4.21) in kräftiger Form und in vereinzelt, kleinen Gruppen von Granulozyten (Tabelle 9, Abb. 3.4.22) zytochemisch nachzuweisen. Durch die immunzytochemische Färbung ließ sich an einer Stelle zeigen, dass solche extramedullären Megakaryozyten thrombopoetisch aktiv sein können (Abb.3.4.23).

Tabelle 8 Leberbefunde in der GMTR-Gruppe

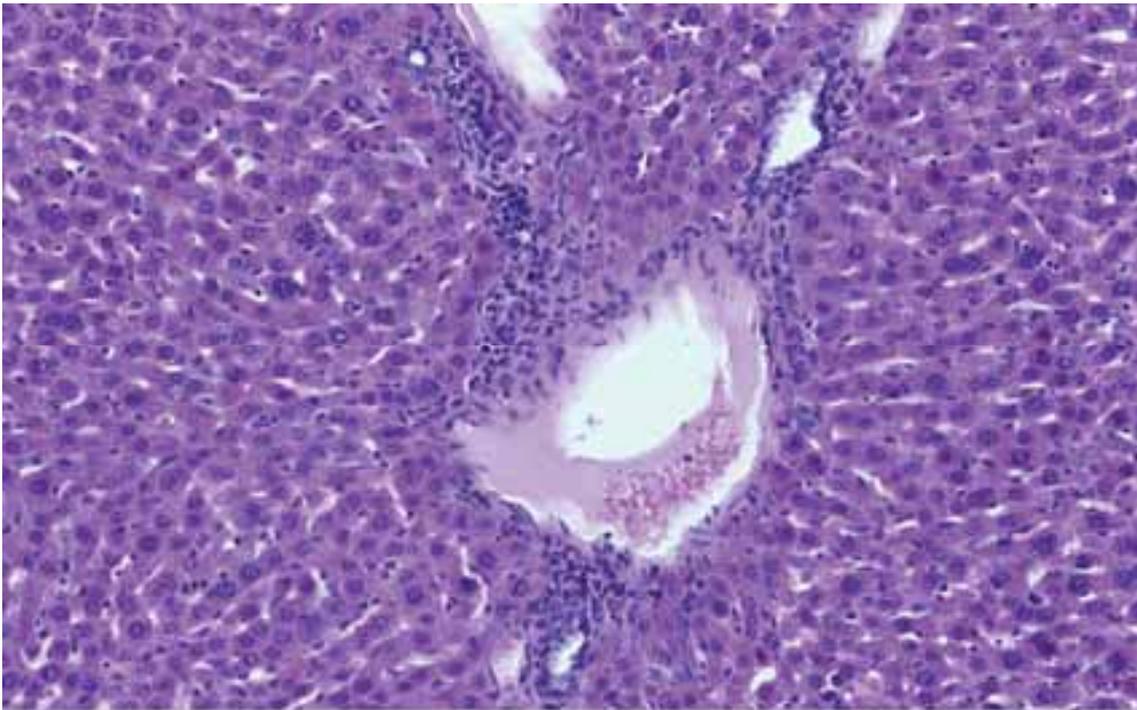
Maus	Lebergewicht [g]	Periportale Infiltration/ Nekrosen	Hämatopoese	CD3+ Zellen	hu CD34+	
					Zellen	Relativer Anteil [%]
<b>Kontrolle</b>	1,17	Geringe/ Keine	Keine	Sehr weit verstreut in Sinus	Keine	
<b>GMTR-1</b>	2,02	Geringe/ Keine	Geringe	n.b.	Megakaryozyten	100
<b>GMTR-2</b>	1,52	Geringe/ Keine	Keine	Verstreut in Sinus, ca. 40% d. Infiltratzellen	Keine	
<b>GMTR-3</b>	1,9	Geringe/ Keine	Mäßige	Verstreut in Sinus ca. 60% d. Infiltratzellen	Megakaryozyten	54
<b>GMTR-4</b>	1,49	Sehr geringe/ Keine	Mäßige	Verstreut in Sinus	Megakaryozyten	50
<b>GMTR-1 bis 4</b>	m 1,73 +/- 0,27					

n.b.= nicht bestimmt

Tabelle 9 Leberbefunde in der GMFL-Gruppe

Maus	Lebergewicht [g]	Periportale Infiltration/ Nekrosen	Hämatopoese	CD3+ Zellen	hu CD34+	
					Zellen	Relativer Anteil [%]
<b>GMFL-1</b>	1,94	Sehr ausgeprägte/ Eine oberflächliche	Ausgeprägte	Verstreut in Sinus; ca. 80% d. Infiltratzellen	Megakaryozyten	94
					Kleine Gruppen v. Granulozyten	n.b.b
<b>GMFL-2</b>	1,3	Ausgeprägte/ Eine große zentrale	Ausgeprägte	Verstreut in Sinus; ca. 40% d. Infiltratzellen; ca. 20% d. Zellen um Nekrosen;	Megakaryozyten	100
					Kleine Gruppen v. Granulozyten	n.b.b
<b>GMFL-3</b>	1,25	Geringe/ Eine große oberflächliche und eine kleine	Mittelgradige bis ausgeprägte	Verstreut in Sinus; ca. 40% d. Infiltratzellen; ca. 10% d. Zellen um Nekrosen;	Megakaryozyten	100
<b>GMFL-4</b>	1,46	Sehr geringe/ Eine oberflächliche	Mittelgradige bis ausgeprägte	Verstreut in Sinus; ca. 10% d. Zellen um Nekrosen	Kleine Gruppen v. Granulozyten	n.b.b
<b>GMFL-1 bis 4</b>	m 1,49 +/- 0,31					

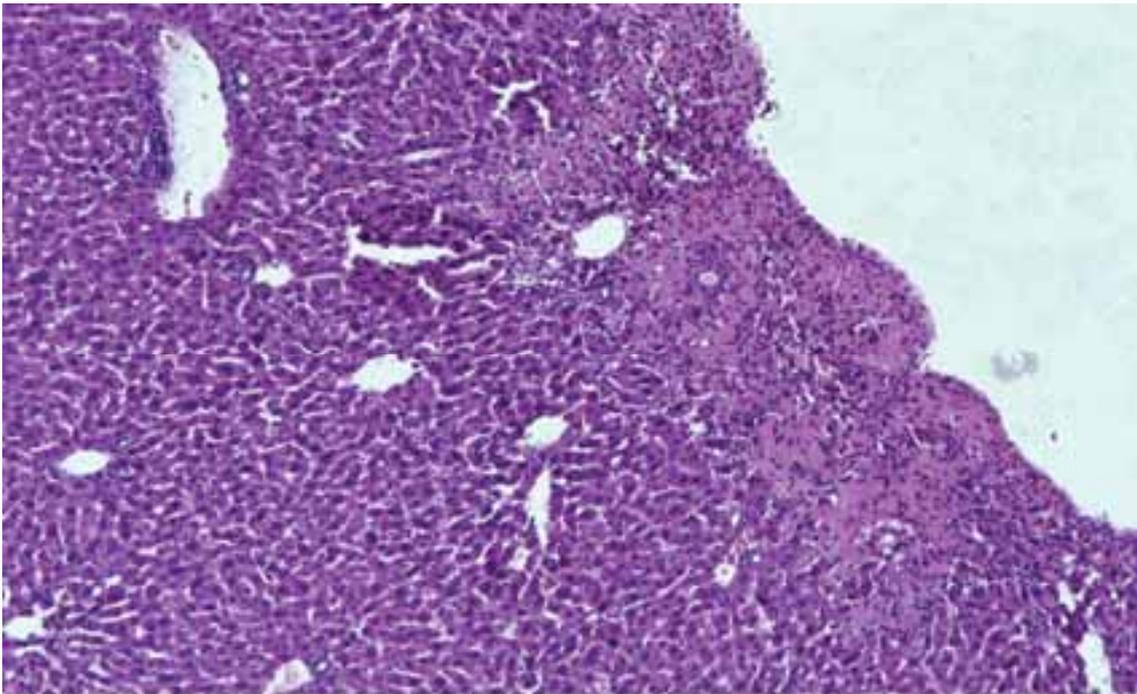
n.b.b.= nicht bestimmbar



**Abb.3.4.15 Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**  
Periportal hat sich ein deutliches Rundzellinfiltrat ausgebildet.  
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 840x

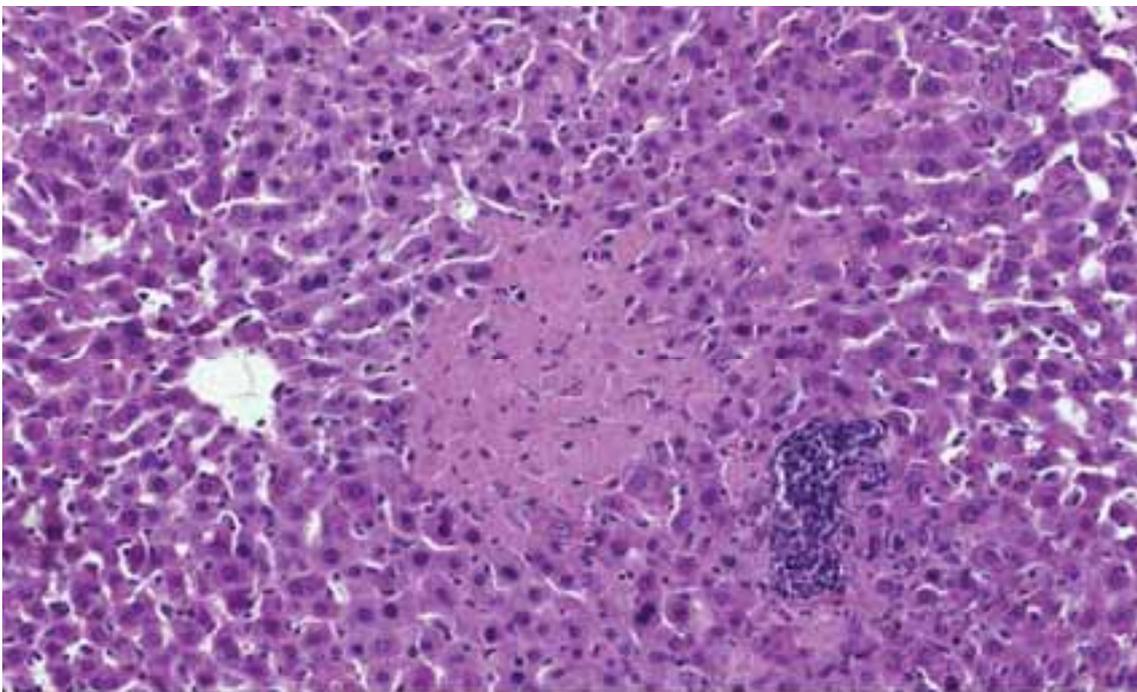


**Abb.3.4.16 Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**  
Es findet sich ein nekrotisierendes Leberareal, das um eine zentrale Höhlenbildung  
dicht zellulär infiltriert ist und im Randbereich eine homogene Gewebszerstörung zeigt.  
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 210x



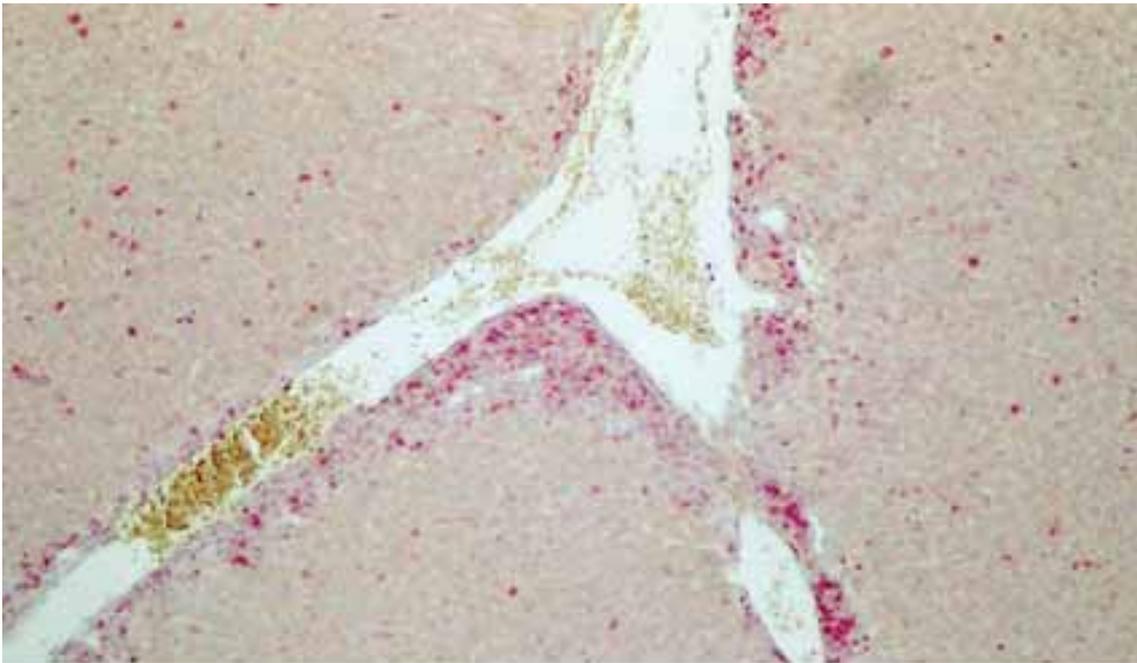
**Abb.3.4.17 Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**

Unter der Leberkapsel hat ein nekrotisierender Prozeß zu einer Randreaktion und Einziehung an der Organoberfläche geführt.  
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 420x



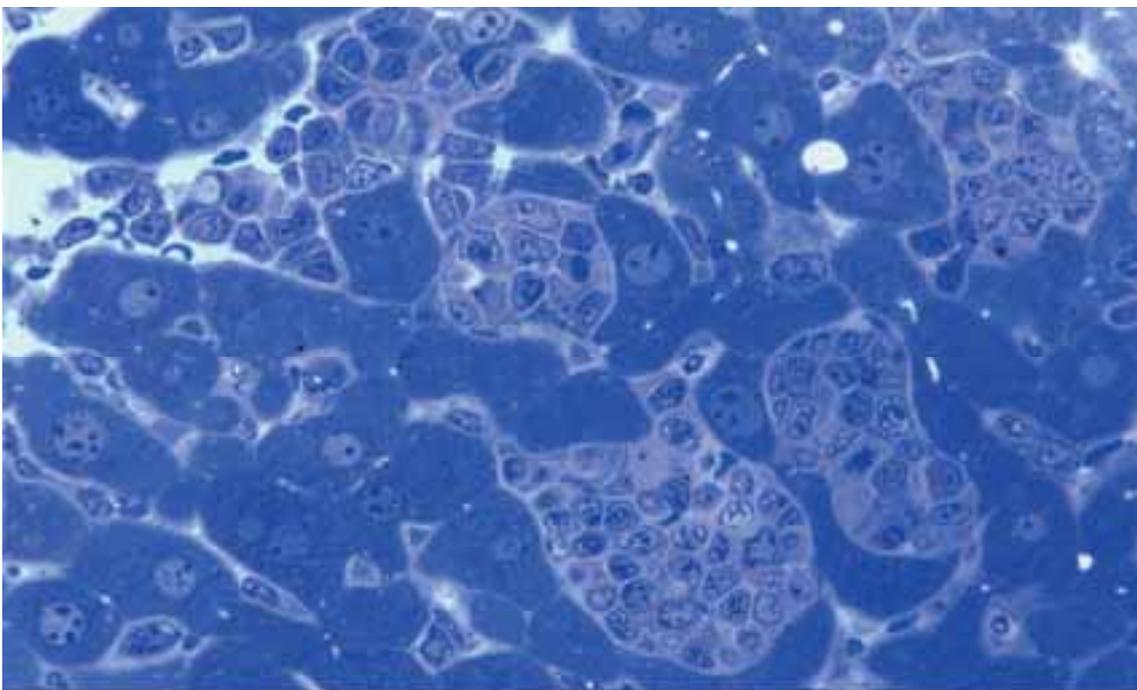
**Abb.3.4.18 Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**

Rechts neben einer Zentralvene liegt ein Areal mit zugrunde gegangenen Hepatozyten.  
Daneben ein Rundzellinfiltrat.  
Paraffinschnitt. H.E. Vergr.: 840x



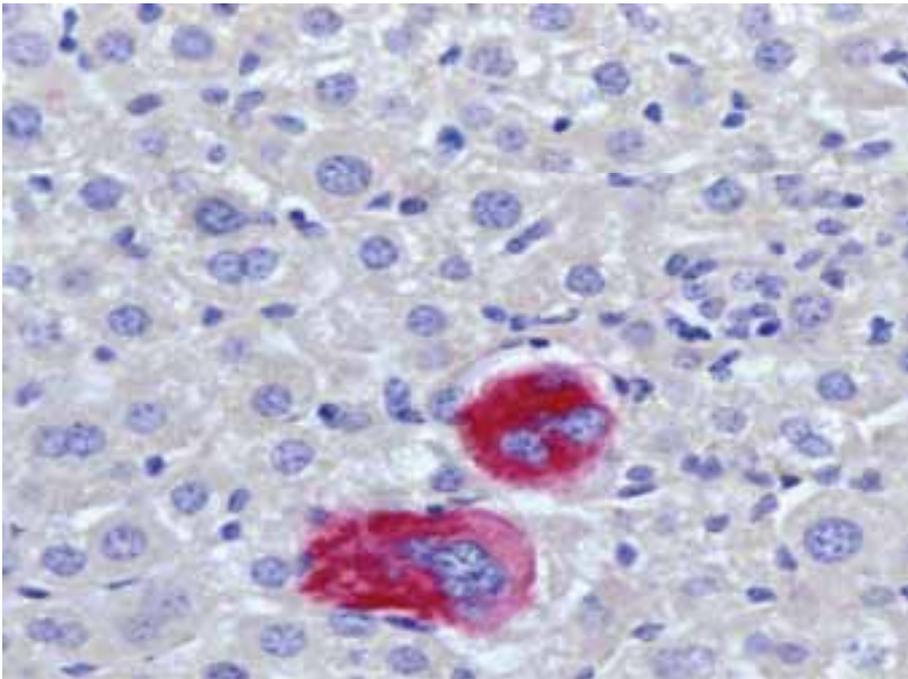
**Abb.3.4.19 Nachweis des CD3-Antigens in der Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**

Es finden sich CD3<sup>+</sup>-Zellen als Bestandteil periportalier Infiltrate und locker verteilt im Lebergewebe. Das gegabelte Gefäß ist eine große Portalvene. Paraffinschnitt. Vergr.: 840x



**Abb.3.4.20 Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**

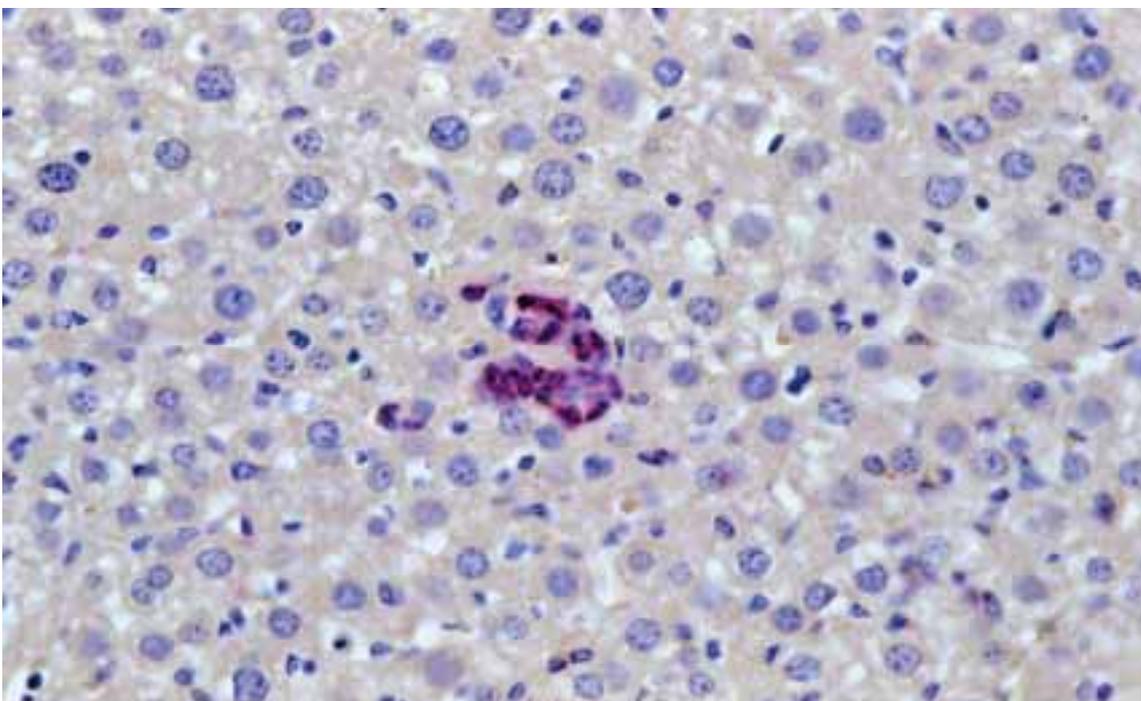
Es finden sich ausgedehnte intrasinusoidal gelegene Herde einer hepatischen Blutbildung mit erythropoetischen Zellen in allen Reifestufen und Elementen der Myelopoese. Toluidinblau Pyroninrot. Vergr.: 2100x



**Abb.3.4.21 Nachweis des (fl)CD34- Antigens in der Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**

Es haben sich zwei Megakaryozyten mit kräftiger Immunreaktivität dargestellt.

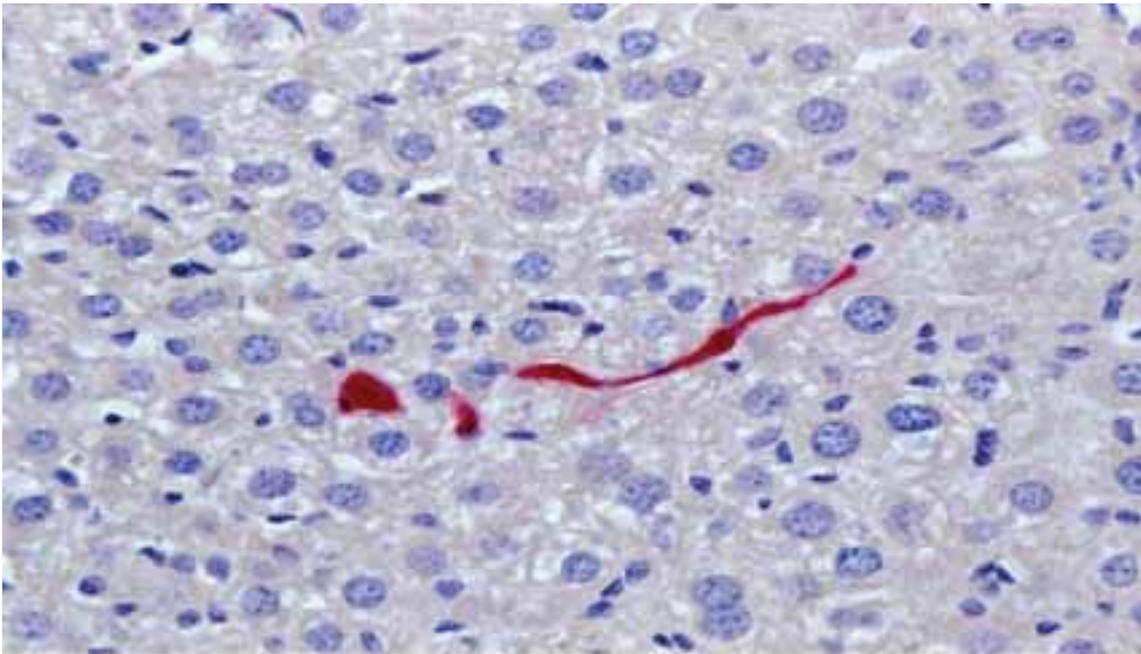
Paraffinschnitt. Vergr.: 2100x



**Abb.3.4.22 Nachweis des (fl)CD34-Antigens in der Leber einer Maus der GMFL-Gruppe.**

Es finden sich kleine, kräftig CD34<sup>+</sup> Ansammlungen von Granulozyten in den Leberläppchen.

Paraffinschnitt. Vergr.: 1320x



**Abb.3.4.23 Nachweis des (fl)CD34-Antigens in der Leber einer Maus aus der GMFL-Gruppe.**  
Nach Form und Intensität der Immunreaktion dürfte es sich um die Reste einer thrombopoetisch aktiven Megakaryozyten handeln.  
Paraffinschnitt, Vergr.: 1320x

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Das normale Knochenmark der Maus ist zytologisch dem des Menschen homolog

Das Knochenmark stellt bei der Maus die Hauptbildungsstätte des myeloischen Systems dar. Es ist am besten im proximalen Femur nach Eröffnung der knöchernen Diaphysenmanschette als ein Gewebszylinder zu gewinnen. Dieser kann entweder ausgestrichen oder aber nach Glutaraldehyd- und Osmiumfixierung in Form der sogenannten Semidünnschicht histologie bzw. elektronenmikroskopisch so aufgearbeitet werden, dass eine Differenzierung in allen Entwicklungsreihen der Blutzellen möglich ist. Herkömmliche histologische Verfahren nach Paraffineinbettung ermöglichen dies nur unzureichend. Zentral und in Längsrichtung des femoralen Knochenmarkzylinders liegt eine Vene. Diese wurde bereits im Knochenmark der Ratte als zentrale longitudinale Vene beschrieben (Weiss, 1976), welche das Markblut der porenhaltigen Sinusoide (Campbell, 1972) mit ihren neu gebildeten Blutkörperchen drainiert.

Stromale Elemente des murinen Knochenmarks wurden hier zytochemisch durch den Nachweis der alkalischen Phosphatase und des Speichereisens färberisch dargestellt. Die alkalische Phosphatase markierte die für das Mikromilieu der Blutbildung verantwortlichen Stromazellen (Westen und Bainton, 1979) und die Berliner Blau Reaktion die sessilen Makrophagen, welche zumeist das Zentrum einer erythropoetischen Insel bilden (Bessis, 1973). Häufig fanden sich als ein zusätzliches Kennzeichen der Makrophagen nadelförmige Einschlüsse in ihrem Zytoplasma. Diese werden mit dem granulozytären Abbau insbesondere von Eosinophilen in Zusammenhang gebracht (Ali et al., 1981; Sasaki et al., 1983; Marshall et al., 1988).

Das an Ausstrichpräparaten, Semidünn- und Feinschnitten analysierte Markorgan der Maus zeigte sich zytologisch demjenigen des Menschen sehr ähnlich. Es ergaben sich aber eine Reihe von charakteristischen Unterschieden, welche vor allem die rote und die neutrophile Reihe betreffen.

Die Kerne von Erythroblasten sind weniger gerundet als in den Gegenstücken der Erythropoese des Menschen. Zudem liegen sie auch häufiger exzentrisch im Zytoplasma. Das Karyoplasma ist bei den Normoblasten ausgesprochen grobschollig. Die Basophilie des hämoglobinisierten Zytoplasmas schwindet mit vollständiger Ausreifung nicht gänzlich, so daß anders als im Knochenmark des Menschen orthochromatische Normoblasten nicht vorkommen.

Besonders charakteristisch für die murine Spezies ist das Phänomen der Ringstruktur von Kernen der Granulozyten, welche besonders das myelo- und metamyelozytäre sowie das stabkernige Stadium der neutrophilen Myelopoese auszeichnen.

Ein weiterer grundsätzlicher Unterschied im Knochenmark von Maus und Mensch betrifft die sog. Zellularität. Der sehr viel größerer Zellgehalt des Markorgan bei der Maus und die sich daraus möglicherweise ergebenden Konsequenzen, z. B. für die Manifestation von Leukämien, konnten im folgenden durch einen Vergleich der unterschiedlichen physiologischen Anforderungen an die Hämatopoese bei beiden Spezies erklärt werden.

Denn nur dann liefert die Maus ein brauchbares Modell für die experimentelle Hämatologie, wenn dieser speziesspezifische Unterschied in der Zellularität des Knochenmarks und die sich daraus ergebende Bedeutung für die splenale Hämatopoese bei der Maus ausreichend berücksichtigt werden.

## **4.2 Der Hämatopoese im Knochenmark fehlt bei der Maus eine Reservekapazität**

Es ist lange bekannt, dass bei der Maus Gegensatz zum Menschen die Markräume schon unter physiologischen Bedingungen fast vollständig mit hämatopoetischen Zellen erfüllt sind (Endicott und Gump, 1947; Brecher et al., 1948). Es finden sich also kaum Fettmarkanteile und das Knochenmark ist natürlicher Weise hyperzellulär. Dieser Mangel an einer räumlichen Knochenmarkreserve für die Zustände erhöhten Blutzellbedarfs, wie z.B. bei Hämolyse und akuter Entzündung, mag die besondere Rolle der Milz für die Blutbildung bei murinen Spezies erklären.

### 4.3 Die Hämatopoese verfügt beim Menschen über eine Reservekapazität im Knochenmark

Beim Erwachsenen ist das hämatopoetisch aktive Knochenmark fast ausschließlich auf die zentralen Partien des Skeletts wie Wirbelkörper, Rippen, Brustbein, Skapula, Becken und proximale Anteile der Humeri und Femora beschränkt (Russel et al., 1966). Bei Kindern ist die Hämatopoese zudem auch in peripheren Knochen lokalisiert, deren Kavitäten während des Erwachsenenlebens ausschließlich mit Fettmark angefüllt sind. Das hämatopoetisch aktive sog. rote Knochenmark des Menschen ist gleichfalls aus Gefäßen, Blutzellen, ihren Vorläufern, Stromazellen sowie Makrophagen zusammengesetzt. Allerdings enthält es viel mehr Fettzellen und ist an seinen herkömmlichen Untersuchungsstellen (Sternum und Os ilium) zwischen den Trabekeln von Knochengewebe gelegen.

So enthält ein normozelluläres Knochenmark im mittleren Lebensalter  $62\% \pm 11\%$  hämatopoetische und  $26\% \pm 9\%$  Fettmarkanteile (Frisch und Bartl, 1999). Während des Lebens besteht eine gewisse Tendenz zur Reduktion der Blutbildung zugunsten des Anteils von Fettzellen. Bei gesunden Menschen, die älter als 70 Jahre sind, haben beide Komponenten des Knochenmarks nahezu gleiche Größe ( $45\% \pm 14\%$  hämatopoetische und  $44\% \pm 14\%$  Fettzellen).

Zur Hyperzellularität des Knochenmarks beim Menschen, d. h. zu einer erheblichen Zunahme an blutbildenden Zellen im Knochenmark, kommt es reaktiv bei Zuständen mit hohem Blutzellbedarf oder bei neoplastischen hyperproliferativen Prozessen, wie z.B. bei hämolytischer Anämie und chronischer Entzündung, oder bei Neubildungen wie myeloproliferativen Syndromen (reifzellig) und akuten Leukämien (unreifzellig).

Die gesteigerte Produktion von Blutzellen unter solchen Bedingungen ist naturgemäß häufig verbunden mit einer gleichzeitigen Reduktion der Fettzellen im Knochenmark (Carter und Jackson, 1962). Zusätzlich zur Ausdehnung des hämatopoetisch aktiven Knochenmarks findet sich bei den reaktiven Zuständen eine Beschleunigung der Generations- und Reifungszeiten der Zellen. So kann die Produktion von Erythrozyten um das 6 bis 12fache, die der Blutplättchen um das 8fache und die der neutrophilen Granulozyten um das 4fache bei Patienten mit hämolytischer Anämie, Autoimmunthrombozytopenie und chronischer Entzündung gefunden werden

(Bernard und Wintrobe,1981). Zu einer extramedullären Hämatopoese in Leber und Milz kommt es bei den genannten reaktiven Erkrankungen nur in Ausnahmefällen und ihre klinische Bedeutung ist marginal.

#### **4.4 Wie sind die Unterschiede in der Zellularität des Knochenmarks von Mensch und Maus zu erklären?**

Die Größe eines Säugetierorgorganismus wird vor allem von der Anzahl und nicht von der Größe seiner Körperzellen bestimmt. Im Fall der Erythrozyten musste dieses Prinzip entwicklungsbiologisch modifiziert werden, um ausreichende Fließeigenschaften des Bluts in kleinen Tieren wie der Maus zu gewährleisten. Mäuse weisen Werte für den Volumenanteil der roten Blutkörperchen (Hämatokrit) auf, die sich von denen des Menschen kaum unterscheiden; aber das Volumen ihrer Erythrozyten ist nur halb so groß, so dass ihre Zahl in der Volumeneinheit doppelt so groß sein muss (Bernstein und Russell,1959 ).

Auch die Lebenszeit von Erythrozyten sind beim Menschen mit ca. 120 Tagen und bei der Maus mit ca. 40 Tagen (Van Putten,1958) verschieden. Beide Parameter, geringeres Volumen wie kürzere Lebenszeit der Erythrozyten, haben verglichen mit den erythrozytären Gegebenheiten beim Menschen eine größere erythropoetische Aktivität des Knochenmarks im Mausorganismus zur Folge. Eine durchschnittliche Lebenszeit von 120 Tagen bedeutet die Notwendigkeit der Produktion von  $100/120\% = 0.84\%$  der totalen Masse roter Blutkörperchen pro Tag (Mensch). Der korrespondierende Wert bei einer Erythrozytenlebenszeit von 40 Tagen beträgt  $100/40\% = 2.5\%$  (Maus). Da die Konzentration von Erythrozyten im Blut zudem in etwa um den Faktor 2 höher ist als beim Menschen, ist die erythropoetische Aktivität des Knochenmark der Maus um den Faktor 5 größer als diejenige des Menschen.

Außerdem weisen Mäuse gegenüber Menschen eine ungefähr dreifach höhere Konzentrationen an Thrombozyten im Blut auf (Heinecke und Wagner,1964). Die hauptsächliche Funktion von Blutplättchen liegt in der Blutstillung für den Fall von Läsionen der Blutgefäße. Die höhere Plättchenzahl bei der Maus steht offenbar direkt mit der höheren Konzentration an Erythrozyten in Zusammenhang, da offenbar das Mehr an kleineren roten Blutkörperchen entsprechend mehr Thrombozyten für eine effektive Blutstillung benötigt. Für diese Studie wurde

orientierend festgestellt, dass die Zahl von Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten im Knochenmark, pro  $\text{mm}^2$  bei Mensch und Maus um einen Faktor von etwa 10 zugunsten der Maus differiert. Dieser Wert weist darauf hin, dass die höhere Thrombozytenproduktion im Knochenmark der Maus nicht nur der höheren Konzentration von Blutplättchen, sondern auch ihrer kürzeren Lebenszeit von ca. 4 Tagen (Bernstein und Russell, 1959) Rechnung trägt.

Die natürliche Hyperzellularität des Knochenmarks der Maus im Vergleich zum Menschen beruht also zusammenfassend vor allem auf einer beträchtlich höheren Produktion von Erythrozyten und Thrombozyten, welche ihrerseits mit den höheren Konzentrationen und geringeren Lebenszeiten dieser Elemente im Blut zusammenhängt. Da wegen dieser speziellen Anforderung an das Knochenmark der Maus keine räumliche Reservekapazität für Zustände erhöhten Blutzellbedarfs zur Verfügung steht, muss offenbar die Hämatopoese in der Milz für solche Fälle einspringen.

Ein sehr illustratives Modell für die Rolle der murinen Milz bei hohem Blutzellbedarf stellt eine hämolytische Anämie dar, wie sie durch Verabfolgung von Phenylhydrazin hervorgerufen werden kann (Fredrickson und Harris, 2000; Vannucchi et al., 2000). Diese Substanz verursacht eine Hämolyse durch die Denaturierung von Hämoglobin und die Fragmentation von alten Erythrozyten. Die erythropoetische Reaktion der Milz, hervorgerufen durch den Absturz des Hämatokrits und einen massiven Ausstoß von Erythropoetin, ist dramatisch. Die Milz vergrößert sich durch massive Erythropoese in ihr um ein Vielfaches ihrer natürlichen Größe, während das Knochenmark erwartungsgemäß nur gering reagieren kann (Fredrickson und Harris, 2000). Es ist bemerkenswert, dass die hämatopoetischen Vorläuferzellen, von denen die reaktiv gesteigerte Hämatopoese bei Phenylhydrazinapplikation ihren Ausgangspunkt nimmt, in Knochenmark wie Milz in hoher Zahl vorkommen (Vannucchi et al., 2000). Allein dem knöchern eingeschlossenen Markorgan fehlt offenbar der Raum für deren Proliferation.

Die unterschiedliche Zellularität des Knochenmarks von Maus und Mensch und die besondere hämatopoetische Rolle der Milz bei der Maus haben bedeutsame Auswirkungen auf das hämatologische Tiermodell, vielleicht auch dann, wenn es,

wie in der vorliegenden Untersuchung, um die Entwicklung und Manifestation von Leukämien geht.

## **4.5 Die Milz der Maus ist ein natürliches Organ der Blutbildung**

Die Milz ist bei der Maus aus den oben unter 4.2. und 4.4. dargelegten Gründen außer einem immunologischen und hämophagozytischen wie beim Menschen also auch ein hämatopoetisch aktives Organ. Dieses ist vor allem in der roten Milzpulpa lokalisiert. Unter den myeloischen Elementen sind wegen ihrer besonderen Größe die Megakaryozyten am leichtesten auszumachen. Es überwiegen normalerweise Zellen der Erythropoese. Diese lagen in den Kontrolltieren zumeist im subkapsulären Milzgewebe, wobei die sog. Semidünnschnitttechnik ihre Identifizierung sehr begünstigte.

## **4.6 Leukämieentwicklung in der Maus nach Knochenmarktransplantationen mit transgenen Stammzellen**

Die molekularen Prozesse, welche im Rahmen einer retroviralen Genmarkierung durch Insertionsmutagenese die hier beschriebenen murinen Leukämien und Präleukämien induziert hatten, waren Gegenstand einer Publikation (Li et al., 2002).

### **4.6.1 Milzbefunde**

Die routinemäßige Anwendung der sog. Semidünnschnitthistologie von in Kunststoff eingebettetem Milzmaterial gestattete eine optimale Analyse der Organarchitektur und eine zuverlässige Beurteilung der extramedullären Hämatopoese, sowohl hinsichtlich Umfang als auch Qualität. Eine Expansion der roten Pulpa hervorgerufen durch splenale Hämatopoese und leukämische Infiltrate ( $\geq 10\%$  Blasten) sowie meist auch ein Schwinden der weißen Pulpa (Perarterielle/periarterioläre lymphatische Scheide und Lymphfollikel, PALS) waren als charakteristische Merkmale für die Leukämie angesehen worden. In fortgeschrittenen Fällen war die

normale Architektur der Milz weitgehend aufgehoben und das Bild beherrscht von Massen blastärer Leukämiezellen.

#### **4.6.2 Knochenmarkbefunde**

Das Knochenmark zeigte in keinem der Fälle von Leukämie eine vergleichbare blastische Transformation und war deshalb für die Diagnostik von nachrangiger Bedeutung. Die führenden Zeichen der Knochenmarksbeteiligung am leukämischen Prozess waren neben der Vermehrung von Blasten eine ausgeprägte Reduktion der Erythropoese. Erst in dieser Untersuchung stellte sich das regelmäßige Auftreten monozytoider Zellpopulationen heraus. Diese konnten erst nach elektronenmikroskopischer Analyse hinreichend identifiziert und dann retrospektiv auch in den Semidünnschnitten nachgewiesen werden. Insgesamt ergaben sich mit diesen Zeichen keine signifikanten Unterschiede im Knochenmarksbefund zwischen Präleukämie und manifester Leukämie.

#### **4.6.3 Leberbefunde**

Eine Leberbeteiligung im Rahmen des leukämischen Prozesses zeigte sich bei zwei Mäusen vor allem durch periportale Infiltrationen mit den Leukämiezellen. Ein solches Infiltrationsmuster wurde bereits beschrieben (Perkins, 1989; Fredrickson und Harris, 2000).

### **4.7 Leukämiemanifestation bei der Maus im Vergleich zum Menschen**

Leukämische Zellen sind in Ihrer Quantität verschobene Zerrbilder von normalen Gegenständen in der Hämatopoese. Da sich die Knochenmark- und Blutzellen morphologisch bei beiden Spezies weitgehend entsprechen, wären auch vergleichbare Neubildungen zu erwarten.

#### **4.7.1 Akute myeloische Leukämie (AML) beim Menschen**

Die Diagnose einer AML beim Menschen basiert auf dem Nachweis unreifer leukämischer Zellen im peripheren Blut und/oder Knochenmark. Leukämische Infiltrate in extramedullären Geweben kommen seltener vor und sind deswegen von geringer diagnostischer Bedeutung. In den meisten Fällen ist das Knochenmark hyperzellulär zumeist mit einer monomorphen Infiltration von Blasten oder Zerrbildern einer weiteren Differenzierung bei gleichzeitig ausgeprägter Reduktion der normalen Blutzellen und ihrer Vorläufer. Somit verdrängt der Klon leukämischer Zellen normaler Weise sowohl die normale Hämatopoese als auch die Fettzellen des Knochenmarks weitgehend.

Die verschiedenen Formen von AML wurden durch eine "French- American- British (FAB)" Arbeitsgruppe klassifiziert (Benett et al.,1976,2000). Die Experten definierten 7 Subtypen von AML (M1-M7) nach der Abkunft des vorherrschenden Zellpopulation, welche heute zudem durch spezifische Reaktionen mit bestimmten monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte CD-Antigene charakterisiert werden kann (Bartel und Frisch,1999).

#### **4.7.2 Präleukämie beim Menschen**

Verschiedene myelodysplastische Syndrome (MDS) stellen präleukämische Zustände beim Menschen dar. Diese differieren hinsichtlich ihres Risikos in eine AML überzugehen. Eine Klassifikation der MDS wurde 1982 durch die FAB-Gruppe (Benett et al.,1982) vorgenommen und durch eine Arbeitsgemeinschaft der WHO modifiziert (Benett,2000). Diese basiert auf morphologischen Merkmalen wie zytologischen Atypien, Blastengehalt in Knochenmark sowie Blut und der Zahl von Blutmonozyten. Bei einer multivarianten Analyse zeigte sich, dass die Menge von Blasten und chromosomale Aberrationen die bedeutsamsten prognostischen Parameter für das Überleben der Patienten und die Transformation in eine AML darstellen (Aul et al.,1992, 1994).

### **4.7.3 Akute myeloische Leukämie (AML) bei der Maus**

Spontan können myeloische Leukämien sehr selten bei alten Mäusen auftreten. Reproduzierbar lassen sie sich durch ionisierende Strahlen und durch Inokulation mit murinen Leukämieviren (MuLV) induzieren. Dabei resultieren neben akuten auch chronische Formen. Bei den MuLV handelt es sich um sich replizierende Retroviren, welche eine sog. Insertionsmutagenese hervorrufen können (Berns,1991). In besonderen Fällen wird eine akute Leukämie dadurch hervorgerufen, dass innerhalb einer polyklonalen Proliferation von Progenitorblutzellen ein leukämischer Klon entsteht, weil die Maus mit einem Retroviruskomplex infiziert ist, der ein replikationsdefizientes Retrovirus mit Onkogenkodierung enthält (Rosenberg et al.,1997). Die Empfänglichkeit von Mäusen, eine Leukämie zu entwickeln, ist generell abhängig vom Tierstamm und seiner Kontamination mit MuLV (Baum et al.,2003).

Das Knochenmark soll, anders als beim Menschen, bei der Maus im Falle einer Leukämie nicht obligat betroffen sein (Perkins,1989).

In den hier vorgestellten Fällen konnte das nur in soweit nachvollzogen werden, als eine monomorphe blastische Transformation wie bei akuter Leukämie des Menschen nicht zu beobachten war. Es fand sich auch keine Verminderung der Megakaryozyten aber eine starke Reduktion der Erythropoese. Allerdings waren in allen Fällen nach feinstruktureller Analyse monozytoide Zellpopulationen zu identifizieren, die als ausdifferenzierender Bestandteil des leukämischen Prozesses angesehen wurden. Diese waren auch bei Präleukämie nachzuweisen, sodass in dem hier untersuchten Kollektiv keine prinzipiellen Unterschiede zwischen Leukämie und Präleukämie im Knochenmark zu erkennen waren. Ob diese Besonderheit der Leukämiemanifestation mit der fehlenden räumlichen Reservekapazität des fast fettfreien Knochenmarks der Maus zusammenhängt, liegt nahe, lässt sich aber nicht abschließend beurteilen.

Die Milz hingegen soll regelmäßig an einen leukämischen Prozess beteiligt sein (Perkins,1989). Aus diesem Grunde ist die Splenomegalie meist ein frühes klinisches Leukämiezeichen bei der Maus und der Histopathologie dieses Organs kommt deshalb, wie auch hier gezeigt und bestätigt, eine besondere diagnostische Bedeutung zu. Bei fortgeschrittener Leukämie fand sich anders als im Knochenmark

derselben Tiere das Bild einer blastischen Transformation unter vollständiger Aufhebung der normalen Organarchitektur.

In diesem Zusammenhang muss jedoch betont werden, dass es bestimmte durch genetisches "engeneering" erzeugte Mausmodelle humaner Leukämie gibt, für die dieses Erscheinungsbild nicht gilt. So siedeln sich transplantierte Knochenmarkzellen, die mit der humanen Translokation als cDNA AML-ETO versehen wurden, als prämaligne Proliferation von Progenitorblutzellen zunächst im Knochenmark an und produzieren dort unter dem Einfluss weiterer Mutationen eine blastäre Knochenmarkstransformation (Grisolano et al.,2003). Auch können bei der Maus in seltenen Fällen Leukämieformen gefunden werden, die mit einer nur minimalen Infiltration von Milz und Knochenmark aber mit hohen Leukozytenzahlen darunter unzählige unreife Formen bzw. Blasten einhergehen (Cuenco et al.,2000).

In Analogie zur FAB-Klassifikation konnten einige schlecht differenzierte also akute Leukämien der Maus zytochemisch mit Hilfe der Chloracetatesterase, der Myeloperoxidase und der unspezifischen Esterase klassifiziert werden (Perkins,1989). So ließen sich aufgrund des zytochemischen Profils folgende Leukämien des Menschen bei der Maus in Analogie setzen:

M1, M2 (beide myeloblastisch, M2 mit Ausdifferenzierungstendenz),M4 (myelomonozytär), M5 (monozytär), M6 (erythroleukämisch, meist durch Friend MuLV hervorgerufen) (Fredrickson und Harris,2000).

Eine AML wurde bei der Maus hier dann diagnostiziert, wenn für die Milz als obligates Kriterium erfüllt war: eine Vermehrung von Blasten (>10%) unter Umständen in einer expandierten roten Pulpa unter gleichzeitiger Reduktion der weißen. Demgegenüber war der Befall des Knochenmarks (> 10% unreife Formen/Blasten) ein variables, also nicht immer erfülltes Kriterium. Weitere variable Zusatzkriterien waren das Vorliegen einer Splenomegalie bzw >2,5% unreife Formen/Blasten im Blutausschlag. War also die Diagnose Leukämie durch die Untersuchung der Milz gestellt, konnte das Knochenmark durchaus eine geringe Vermehrung von unreifen Formen/Blasten (<10%) und/oder eine Veränderung der M/E Ratio (>3) und/oder eine Verminderung der Megakaryozyten zeigen. Damit war es jedoch nicht gegen einen präleukämischen Status abgegrenzt. Die hier zusätzlich nachgewiesene Atypie des Knochenmark, das Vorliegen einer großen monozytoiden

Zellpopulation, die sich erst elektronenmikroskopisch durch die bessere Abgrenzbarkeit der neutrophilen Myelopoese zeigte, war ebenso wenig hilfreich für die Diagnose Leukämie, da sie auch bei Präleukämie vorkam.

Die hier beschriebenen Leukämien waren wegen des Nachweises der unspezifischen Esterase in den unreifen Formen/Blasten als monozytär (M5) klassifiziert worden (Li et al.,2002). Die Ausdifferenzierungstendenz derartiger Elemente im Knochenmark können als weiterer Beleg für die Richtigkeit dieser Klassifizierung angesehen werden.

Kürzlich wurde eine neue Klassifikation der nicht-lymphatischen Leukämieformen bei der Maus vorgeschlagen, die auf Blutbild, zytologischen, hämatopathologischen immunphänotypologischen, genetischen und klinischen Kriterien beruht (Kogan et al.,2002).

Als definierende Merkmale für diese Klassifikation der Leukämien bei Mäusen wurden angesehen:

1. Nachweis einer nicht-lymphatischen hämatopoetischen Neoplasie, die hämatopoetisches Gewebe diffus befällt, generell beide die Milz und das Knochenmark.
2. Die Mäuse sind anämisch, neutropenisch und/ oder thrombozytopenisch.
3. Nicht-lymphatische hämatopoetische Zellen sind in der Milz vermehrt (generell in beiden hämatopoetisch aktiven Organen, also auch im Knochenmark).
4. Die neoplastischen Zellen sind in jeder der folgenden Möglichkeiten (eine oder mehrere) disseminiert:
  - A) in anderen Geweben als Blut, Milz und Knochenmark .
  - B) eine Leukozytose liegt vor und die Leukämiezellen machen wenigstens 20% der Leukozyten im peripheren Blut aus.
5. Die Erkrankung zeigt zusätzliche Merkmale der Malignität im Erscheinungsbild wie bei jedweder Kombination.
  - A) von wenigstens 20% nicht-lymphatischer unreifer Formen/ Blasten in Blut Milz oder Knochenmark.

B1) rapider Verlauf im primär erkrankten Tier (mittlere Zeit zwischen Erscheinen der Leukämie im Blut und moribundem Status innerhalb von 4 Wochen oder weniger).

B2) Transplantabilität auf normale oder sublethal betrahlte histokompatible Empfänger und rapider Verlauf im Empfänger (mittlere Zeit von der Transplantation bis zum moribunden Status 8 Wochen oder weniger).

Die Definitionskriterien unter 1. und 3. sind weitgehend redundant und erfüllen sich deshalb gegenseitig, es sei denn unter 1. werde die Diffusität der Organinfiltration betont und 3. spräche, was kaum wahrscheinlich aber sprachlich nicht auszuschließen ist, die normale Hämatopoese an. In der Milz liegt sensu strictu nur dann ein diffuser Organbefall vor, wenn wie bei M13 des hier abgehandelten Kollektivs die Milzarchitektur vollständig aufgehoben ist und eine "Reinkultur" von Blasten vorliegt. Ein gering ausgeprägter Milzbefall ist insofern immer multifokal, weil bei partiell erhaltener Architektur des Organs sich die Leukämiezellen meist nur in der roten Pulpa finden lassen.

Unter 5. sind alternative Kriterien für die Definierung eines Krankheitsprozesses als Leukämie aufgeführt, wobei nur die Erfüllung der in 5 A) und B) angegebenen zeitlichen Verhältnisse den Zusatz „akut“ verdienen.

Das entscheidende Kriterium in der Bethesda Klassifikation für einen Vergleich mit der hier getroffenen Eingruppierung ist die Organmanifestation mit mindestens 20% an unreifen Leukämiezellen. Obgleich der eigene Grenzwert mit 10% um 50% niedriger liegt, ergaben sich nur in 2 Fällen (Maus 3 und Maus 14) nicht konkordante Diagnosen. In solchen Fällen sollte das Ausmaß der Splenomegalie Berücksichtigung finden, denn 14% bzw. 15% Blasten bei Organgewichten von 350mg und 240mg bedeuten ~40% bzw. ~30% Leukämiezellen bei einem normalen Milzgewicht. Eine derartige Umrechnung des morphometrischen Milzbefundes im Mausorganismus unter Berücksichtigung des Organgewichtes würde die splenale Tumorlast zwischen den Tieren besser beschreiben und vergleichen lassen.

#### **4.7.4 Präleukämie bei der Maus**

Außer den hier dargestellten Leukämiemanifestationen als Folge einer Insertionsmutagenese nach retroviraler Markierung mit dLNGFR traten bei anderen Mäusen der Versuchsreihe weniger schwerwiegend hämatologische Veränderungen auf, die wegen gleichartiger Transgenexpression (Li et al.,2002) als präleukämische Zustände aufgefasst wurden. Dabei stellte sich heraus, dass nur die feingewebliche Untersuchung der Milz und die elektronenmikroskopische Analyse des Knochenmark die frühesten Veränderungen aufdecken konnten. In der Milz manifestierten sich diese Vorboten durch kleine Inseln von Blasten und im Knochenmark durch das Auftreten einer monozytoiden Zellpopulation.

Die darüber hinausgehenden Veränderungen führten zu eigenen Kriterien für die Diagnose einer eindeutigen Präleukämie. Diese sind in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Diagnostische Kriterien für eine Präleukämie bei der Maus<sup>5</sup>

<b>Das Vorliegen einer Präleukämie war anzunehmen, wenn 3 Punkte erfüllt waren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Splenomegalie (&gt; 120 mg)</i></li>   <li>• <i>Zwei morphologische Milzkriterien</i>  Vermehrung von unreifen Formen/ Blasten (&gt; 5% aber &lt;10% Blasten)  Expansion der roten, Kompression der weißen Pulpa</li>   <li>• <i>Wenigstens 2 Knochenmarkkriterium</i>  &gt;2.5% &lt;10% unreife Formen/Blasten  M/E Verhältnis &gt;3</li> </ul> <p><b>Nachweis einer signifikanten monozytoiden Zellpopulation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Wenigstens ein Blutkriterium</i>  Unreife Formen Blasten (&lt;2,5%)  Anämie  Thrombozytopenie  Leukozytopenie  Leukozytose</li> </ul>

Definierte präleukämische Zustände, wie sie die myelodysplastischen Syndrome beim Menschen darstellen (Benett et al., 1982) waren bei der Maus bis vor kurzem nicht bekannt. Die Latenzperioden zwischen der Manifestation einer Leukämie und ihren Induktionsmaßnahmen wie Bestrahlung und/oder Inokulation mit MuLV können als solche präleukämische Stadien aufgefasst werden. Ihre klinischen und histopathologischen Merkmale wurden bislang nur vereinzelt definiert (Grisolano et al., 2003).

Im Rahmen der Bethesda Klassifikation von nicht-lymphozytären hämatopoetischen Neoplasien bei der Maus wurden folgende Definitionskriterien für Myelodysplastische Syndrome vorgeschlagen.

<sup>5</sup> Bis auf den Nachweis einer signifikanten monozytoiden Zellpopulation fanden die Kriterien bereits für die Publikation von Li et al. (2002) Anwendung.

1. Im peripheren Blut zeigen die Mäuse einen oder mehrere der folgenden Punkte:
  - A. Neutropenie (mit oder ohne Anämie, mit oder ohne Thrombozytopenie)
  - B. Thrombozytopenie ohne Leukozytose oder Erythrozytose
  - C. Anämie ohne Leukozytose oder Thrombozytose
2. Die Mäuse weisen einen Reifungsdefekt in der nicht- lymphozytären Hämatopoese auf, so einen der folgenden Punkte:
  - A. Dysgranulopoese, Dyserythropoese und/oder dysplastische Megakaryozyten mit oder ohne einer Vermehrung von nicht-lymphozytären unreifen Formen/Blasten
  - B. Wenigstens 20% nicht-lymphozytärer unreifer Formen/Blasten in Knochenmark und/oder Milz
3. Die Erkrankung ist keine nicht-lymphozytäre Leukämie:

(wenn sie Myelodysplasiekriterien 1 und 2 erfüllt, zusätzlich jedoch auch Leukämiekriterien, sollte sie als nicht-lymphozytäre Leukämie bezeichnet werden).

Die Abgrenzung gegenüber myeloischen Leukämien ist in dieser Klassifikation nicht ersichtlich, wenn der Punkt 2 B erfüllt sein sollte.

Ein weiterer Gesichtspunkt dafür, diese Klassifikation an dem eigenen Kollektiv von Mäusen nicht anzuwenden, war das Fehlen von dysplastischen Veränderungen, wie sie für die myelodysplastischen Syndrome des Menschen charakteristisch sind. Aus diesem Grunde wurde auch bewusst in dieser Untersuchung auf den Begriff Myelodysplastisches Syndrom verzichtet. Es wurde vielmehr der Terminus Präleukämie benutzt, um die nicht-leukämischen Blutbildungs- und Blutbildveränderungen zu charakterisieren, zu denen es im Rahmen der beobachteten Insertionsmutagenese gekommen war.

Alle erkrankten Mäuse, solche mit manifester Leukämie wie auch die mit präleukämischen Veränderungen, besaßen genotypisch den gleichen Zellklon, der sich durch eine Vektorkopie, integriert in das murine Evi1 (ecotropic viral integration site-1) Gen, auszeichnete (Li et al.,2002). So beruhten die hier vorgestellten Fälle von Präleukämie nicht nur auf morphologischen sondern auch auf genetischen Kriterien.

## 4.8 „Graft- versus- Host“ Konstellation

Viele Mausmodelle für eine „Graft-versus-Host“ Erkrankung beruhen auf der Injektion von allogenen Milz- oder Knochenmarkzellen in subletal bestrahlte BALB/c Mäuse (Nonomura et al.,1987, 1988a, 1988b, 1989, 1991a, 1991b, 1993, 1996; Ilan et al., 2000; Itoh et al.,2000 ; Nagler et al.,2000).

Die intraperitoneale Verabfolgung mononukleärer Blutzellen des Menschen in NOD/SCID-Mäuse stellt gleichfalls ein Modell der „Graft-versus-Host“ Erkrankung dar (Mosier et al.,1988). Neuartiger ist ein Tiermodell, welches auf einer intravenösen Applikation menschlicher mononukleärer Blutzellen in Mäusen mit ausgeschalteten „recombination activating genes“ (RAG2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäuse) beruht (van Rijn et al.,2003).

Aus dem Transplantat hervorgegangene T-Zellen, welche durch Histokompatibilitätsantigene aktiviert werden, führen in Knochenmark und Milz des Wirtsorganismus in der Regel eine monozytäre Reaktion hervor (Fredrickson und Harris ,2000). In der Leber wird durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Läsion erzeugt, die schließlich einer primären biliären Leberzirrhose gleicht (Itoh et al.,2000).

In der hier gewählten Versuchsanordnung fungierten die immuninkompetenten NOD/SCID-Mäuse als Wirtstiere und die allogene Splenozyten stammten von immunkompetenten Mäusen des Stammes C57Bl/6J. Als Besonderheit waren die transplantierten Milzzellen zuvor transgenetisch markiert worden. Die transduzierten Gene kodierten für das CD34-Protein des Menschen (hu) mit seinen beiden Varianten „truncated“ tr und „full-length“ fl, den vollständigen Bezeichnungen hu tCD34 und hu flCD34 entsprechend. Da nur jeweils 4 Tiere (GMTR1-4, GMFL1-4) und ein Kontrolltier untersucht werden konnten, hatte die Untersuchung wegen der kleinen Fallzahlen den Charakter einer Vorstudie.

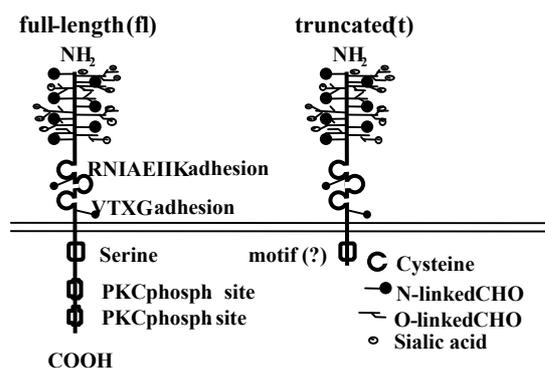
### 4.8.1 Die Bedeutung der CD34-Moleküle

Obgleich der Konservierungsgrad des CD34 bei verschiedenen Spezies hoch ist, unterscheidet sich jedoch die Rolle für das jeweilige myeloische System (Sato et al.1999; Goodell,1999; Okuno et al.,2002). Im Gegensatz zum Menschen sind z.B.

murine Blutstamm- und Progenitorzellen  $CD34^-$ . Nur nach Transplantation retroviral transduzierter Knochenmarkszellen wurden  $CD34^+$  Progenitorzellen im Knochenmark der Maus beschrieben (Grisolano et al., 2003). Dennoch sind die murinen Vorläuferzellen für die Transduktion der humanen Variante empfänglich. Eingeschleuste Gene, die z.B. für CD34-Proteine kodieren, eignen sich als Zellmarker und sind als solche nicht nur geeignet für eine auf Immunaффinität und magnetic-activated cell sorting (MACS) basierende Anreicherung der Zellen, sondern auch, wie hier gezeigt, für ihre immunzytochemische Darstellung im Empfängergerewebe.

Das vollständige (full-length) flCD34 ist ein glykosyliertes Typ I Transmembranphosphoprotein (Transmembran-Sialomucin) mit einem Molekulargewicht von 110-120 kDa (Abb. 4.8.1). Seine extrazelluläre Domäne dürfte der Adhäsion und sein intrazellulärer Schwanz der Signaltransduktion dienen, die abhängig ist von Erkennungsstellen für Proteinkinase C.

Das tCD34 Protein existiert als eine natürlich vorkommende Splicevariante mit partieller Deletion (truncated = t) seiner intrazellulären Domäne. Ihr fehlen die für die Signaltransduktion essentiellen Erkennungsstellen für die Proteinkinase C (Krause et al., 1996; Fackler et al., 1995; Fehse et al., 2000).



**Abb. 4.8.1.** Es kommen den zwei Varianten des CD34-Moleküls vor. Das Molekül in seiner vollständigen Länge (fl) ist links abgebildet. Rechts sieht man die trunckierte Variante (t). Sie ist das Ergebnis eines alternativen Splicings. Es fehlen ihr die beiden PKC-Phosphorylierungsstellen für die Signalübertragung. (Abb. aus Fehse et al., 2000).

Hämatopoetischen Progenitorzellen exprimieren CD34 ebenso wie aktivierte hämatopoetische Stammzellen und bestimmte embryonale Fibroblasten (Krause et al.,1996; Sato et al.,1999; Goodell,1999). Die das CD34-Molekül tragende Zellpopulation im Knochenmark des Menschen ist klein (Krause et al.,1996). Zu ihr gehören alle Koloniebildenden Einheiten (CFU).

So wird das myeloische System nach letaler Bestrahlung nur von CD34<sup>+</sup>, nicht aber von CD34<sup>-</sup>-Zellen bei Primaten besiedelt (Berenson et al.,1988). Wie sich bei der Knochenmark- bzw. Blutstammzell-Transplantation in der Radikalbehandlung von Brustkrebs und Plasmozytom herausstellte, können CD34<sup>+</sup>-Zellen auch beim Menschen das gesamte myeloische System neu etablieren (Dunbar et al.,1995)

Über die molekularen Funktionsweisen der CD34-Moleküle ist wenig gesichert. Möglicherweise dienen sie als Adhäsionsvermittler und beeinflussen damit das sog. „homing“; auch eine Beteiligung an den Differenzierungsprozessen der Blutzellen wird diskutiert (Fackler et al.,1995; Hu und Chien,1998; Gordon et al.,2000)

Die Bedeutung der trunkierten Variante des CD34 Moleküls liegt völlig im Dunkeln. Sie kommt auch bei Mäusen natürlicher Weise vor (Krause,1996; Hu und Chien,1998). Vergleichende Studien mit trunkierten und "full length" Molekülen legten nahe, dass das komplette Molekül sowohl für die Signaltransduktion (Fackler,1995) als auch für die Zelladhäsion (Hu und Chien,1998) von Bedeutung ist. Die Überexpression von flCD34 soll beim Menschen die Differenzierung myeloischer Zellen hemmen. Damit könnte das Molekül der Konstanterhaltung des Stammzell- und Progenitorzellspeichers dienen (Fackler ,1995), indem es möglicher Weise als Aktivierungsmarker fungiert (Sato et al.,1999; Goodell,1999). Dem entspricht, dass die CD34-Expression mit der Differenzierung der Blutzellen verloren geht.

Beide Varianten des humanen Gens wurden für die Markierung der als Spenderzellen fungierenden Splenozyten eingesetzt. Es bestand die Frage nach Unterschieden in den Wirtstieren im Hinblick darauf, ob sie transduzierte hu flCD34<sup>+</sup> oder hu trCD34<sup>+</sup> Splenozyten erhalten hatten.

#### **4.8.2 Milzbefunde**

In der kleinen Milz des Kontrolltiers lag in Übereinstimmung mit seiner Immuninkompetenz eine hypoplastische weiße Pulpa vor, in deren zentralen Anteilen jedoch CD3<sup>+</sup> also T-Zellen nachweisbar waren. Solche Zellen fanden sich auch sehr locker verstreut in der roten Pulpa. Hu CD34<sup>+</sup>-Zellen waren erwartungsgemäß im Kontrolltier nicht nachzuweisen.

Die mit transplantierten transgenen Milzzellen manipulierten NOD/SCID-Mäuse zeigten in den Milzen beider Gruppen jeweils in zwei Fällen gegenüber der Kontrolle deutliche Zunahmen des Milzgewichts bis hin zur Splenomegalie mit  $\geq 120$ mg Organgewicht. Auch in diesen Fällen blieb die weiße Pulpa jedoch hypoplastisch und in der expandierten roten war neben einer extramedullären Hämatopoese zumeist eine Hyperämie festzustellen. Eine zu erwartende monozytäre Reaktion blieb also aus. In einem Fall (GMFL-4) war die weiße Pulpa partiell zellulär leergeräumt bei erhaltenem Gerüstwerk der Retikulumzellen. Eine ausgedehnte fibröse Schädigung der Organstruktur, wie kürzlich bei „Graft-versus-Host“ Erkrankung in einem neuartigen Mausmodell beschrieben (van Rijn et al.,2003), konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

#### **4.8.3 Leberbefunde**

Charakteristischer Weise ist die „Graft-versus-Host“ Erkrankung des Menschen in der Leber histologisch gekennzeichnet durch gelbbraune Ansammlungen von Galle in erweiterten Gallenkanälchen mit Gallengangsatypien und portaler Fibrose (Farthing et al.,1982). Dieses Bild ist morphologischer Ausdruck einer Cholestase. Weiterhin sind in der Leber als Zeichen einer chronischen, immunologisch bedingten Entzündung Lymphozyten um nekrotisierende Gallengänge akkumuliert (Bernuau et al.,1981). Die Zeichen einer Cholestase/ Cholangitis waren im hier untersuchten Material nicht nachweisbar. Entzündliche Veränderungen, die sich auch durch Zunahme der Lebergewichte äußerten, waren allerdings festzustellen. Ihr Muster in Form von periportal angeordneten Rundzellinfiltraten war kompatibel mit anderen Modellen einer „Graft-versus-Host“ Reaktion bei Mäusen (Nonomura et al.,1996, 1998; van Rijn et al ,2003) .

Beweisend für die immunologisch bedingte Natur dieser periportalen Rundzellinfiltrate im hier beschriebenen Kollektiv war der immunzytochemische Nachweis des CD3-Antigens und die damit erwiesene T-Zellnatur in einem Großteil der Lymphozyten. Verglichen mit dem Kontrolltier handelte es sich wegen ihrer großen Anzahl um immunkompetente T-Zellen, die sich also von den Spendersplenozyten notwendigerweise herleiten müssen. Außerdem waren fokale Leberzellnekrosen bis hin zu Gewebseinschmelzungen und Höhlenbildungen zu beobachten. Die periportalen Infiltrate und parenchymatösen Leberschäden waren in der GMFL-Gruppe besonders ausgeprägt.

Außer den entzündlichen Veränderungen waren in der Leber intrasinusoidal kleine Nester einer Hämatopoese nachweisbar, die vor allem aus Erythroblasten und wenigen Megakaryozyten bestanden, über deren Herkunft wegen der Markierung von Stammzellen mit hu CD34 gewisse Aussagen gemacht werden konnten.

#### **4.8.4 Schicksal der humanen CD34 Genprodukte hu tCD34 und hu fICD34 im Mausorganismus**

Die transduzierten Genvarianten hu tCD34 und hu fICD34 zeigten im Mausorganismus nach immunzytochemischer Darstellung ihrer Genprodukte keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression. Der fehlenden Rolle des CD34-Moleküls für das Stamm- und Progenitorzellsystem der Maus entsprach der Befund, dass die Expression des transduzierten Gens nicht mit der Differenzierung der Blutzellen verloren ging.

Die in Zellmembranen lokalisierten Genprodukte zeigten in den Megakaryozyten die bei weitem intensivsten immunzytochemischen Anfärbungen. Die Reaktionsprodukte erfüllten den gesamten Zelleib der Riesenzellen. Das war dahingehend zu deuten, dass im Zytoplasma der Megakaryozyten die Membranen der zukünftigen Thrombozyten als sog. Demarkationszonen und Vesikel präformiert vorliegen und damit eine zytoplasmatische Anfärbung bedingen.

Durch das Reaktionsprodukt in diesen Zellen konnte man hu CD34<sup>+</sup> von hu CD34<sup>-</sup> Megakaryozyten in Milz und Leber differenzieren und so zumindest für die markierten Elemente eine Aussage über ihre Herkunft treffen. Wegen der geringen Fallzahlen war eine statistisch signifikante Aussage für die beiden Gruppen (hu tCD34 und hu fICD34 markiert) zwar nicht möglich, doch ließ sich immerhin veranschlagen,

dass bei ca. 90% bzw. >50% CD34<sup>+</sup> Megakaryozyten in der Milz die dort etablierte extramedulläre Hämatopoese überwiegend aus markierten Spenderzellen stammte. In den Erythroblasten der Leber ließ sich immunzytochemisch kein hu CD34 Genprodukt erkennen, obgleich in der roten Reihe seine Expression mit monoklonalen Antikörpern flußzytometrisch nachgewiesen worden war (Li et al.,2002). Da das humane CD34-Genprodukt aber außer in den Megakaryozyten auch in vereinzelt und kleinen Gruppen von Granulozyten nachzuweisen war, ist anzunehmen, dass die nicht gelungene färberische Darstellung des Markergens in der roten Reihe mit der Menge der exprimierten Moleküle zusammenhängt. So wie diese im Zelleib der Megakaryozyten durch präformierte Membranen der zukünftigen Thrombozyten angereichert sind und damit sogar eine scheinbar zytoplasmatische CD34 Positivität bedingen, könnte umgekehrt in der roten Reihe die Empfindlichkeit der zytochemischen Methode für den Nachweis des Antigens nicht ausreichend gewesen sein. Aus diesem Grunde konnte auch kein Bezug zu FACS Analysen hergestellt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Knochenmark der Maus ist im Vergleich zu dem des Menschen primär hyperproliferativ. Es ist also in den zentralen Anteilen des Skeletts weitgehend frei von Fettzellen. Damit trägt es den folgenden Gegebenheiten Rechnung: die Erythrozyten der Maus sind nur etwa halb so groß wie die des Menschen bei vergleichbarem Hämatokrit, also in etwa doppelter Konzentration vorliegend. Zudem beträgt ihre Lebenszeit weniger als die Hälfte, und die Thrombozyten weisen eine etwa dreifach höhere Konzentration im Blut als beim Menschen auf. Mit seinem Zellreichtum fehlt dem Knochenmark der Maus eine Reservekapazität für Zustände mit erhöhtem Blutzellbedarfs. Daraus ergibt sich eine besondere Rolle der Milz für die Blutbildung bei murinen Spezies, die sich auch auf die Manifestation von Leukämien auswirkt.

Eine Expansion der roten Milzpulpa hervorgerufen durch leukämische Infiltrate ( $\geq 10\%$  Blasten) und ein Schwinden der weißen Pulpa waren charakteristische Merkmale für die Leukämie, wie sie nach Mutagenese hervorgerufen durch Insertion des dLNGFR Markergens in murine Knochenmarkzellen bei 6 von 10 Mäusen auftrat. In fortgeschrittenen Fällen war die normale Architektur der Milz vollständig aufgehoben und weitgehend ersetzt durch Massen von blastären Leukämiezellen. Das Knochenmark zeigte jedoch in keinem der Fälle von Leukämie eine vergleichbare blastische Transformation und war deshalb für die Diagnostik von nachrangiger Bedeutung. Die führenden Zeichen der Knochenmarksbeteiligung am leukämischen Prozess waren neben nur einer mäßigen Vermehrung von Blasten eine ausgeprägte Reduktion der Erythropoese und das Auftreten monozytoider Zellpopulationen. Die damit gegebene Ausdifferenzierungstendenz der leukämischen Elemente im Knochenmark ergab einen weiteren Beleg für die ursprünglich zytochemisch vorgenommene Klassifizierung der Neoplasie als Monozytenleukämie. Für die Diagnostik präleukämischer Zustände bei den transgenen Mäusen waren Blutstatus und Milzbefunde entscheidend. Im Knochenmarksbefund ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Präleukämie und manifester Leukämie. Bei einem noch blutgesunden Tier zeigte sich eine gesteigerte

Hämatopoese in der Milz mit kleinen Inseln von Blasten als die früheste Veränderung im Sinne einer latenten Präleukämie.

In der hier gewählten Versuchsanordnung einer „Graft-versus-Host“-Reaktion fungierten immuninkompetente NOD/SCID-Mäuse als Wirtstiere und als Transplantat dienten allogene Splenozyten, die von immunkompetenten Mäusen des Stammes C57Black stammten. Als Besonderheit waren die transplantierten Milzzellen zuvor transgenetisch markiert worden. Die transduzierten Gene kodierten für das CD34-Protein des Menschen (hu) mit seinen beiden Varianten „truncated“ tr und „full length“ fl. Nach Transplantation von transgenen Milzzellen zeigten die NOD/SCID-Mäuse in den Milzen beider Gruppen jeweils in zwei Fällen deutliche Zunahmen des Milzgewichts bis hin zur Splenomegalie mit  $\geq 120$ mg. Die weiße Pulpa blieb jedoch weitgehend hypoplastisch und in der expandierten roten war neben einer extramedullären Hämatopoese zumeist eine Hyperämie festzustellen. In einem Fall war die weiße Pulpa stellenweise zellulär leergeräumt bei erhaltenem Gerüstwerk der Retikulumzellen.

In beiden Gruppen lagen die Lebergewichte über dem Wert des Kontrolltiers. Die Leberschnitte zeigten periportale Rundzellinfiltrate und intrasinusoidal kleine Nester einer Hämatopoese vor allem aus Erythroblasten und wenigen Megakaryozyten bestehend. Cholestatische Veränderungen waren nicht nachweisbar. CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten waren im Sinussystem und in den periportal infiltrierten angereichert. In der GMFL-Gruppe waren die periportal infiltrierten größer und es kam zu Gewebseinschmelzungen.

Die transduzierten Genvarianten hu tCD34 und hu flCD34 zeigten im Mausorganismus nach immunzytochemischer Darstellung ihrer Genprodukte keine signifikanten Unterschiede in der Expression. Die transmembranen Genprodukte zeigten in den Megakaryozyten die bei weitem intensivsten immunzytochemischen Anfärbungen. Die Reaktionsprodukte erfüllten den gesamten Zelleib der Riesenzellen. Dies wurde dahingegen gedeutet, dass im Zytoplasma der Megakaryozyten die Plasmamembranen der zukünftigen Thrombozyten als sog. Demarkationszonen und Vesikel präformiert vorliegen.

Insgesamt waren in der Leber also die Zeichen einer „Graft-versus-Host“-Reaktion mit derjenigen einer transplantierten Hämatopoese kombiniert.

# LITERATURVERZEICHNIS

**Ali BA et al.** (1981) *Origin of crystalloid inclusions in macrophages II: evidence for derivation from eosinophil granulocyte breakdown.* Br J Exp Pathol 62:662-668.

**Aul C et al.** (1992) *Comparison of in vitro growth characteristics of blast cell progenitors (CFU-L) in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia.* Blood 80:625-633.

**Aul C et al.** (1994) *Risk assessment in primary myelodysplastic syndromes: validation of the Düsseldorf score.* Leukemia 8:1906-1913.

**Bartl R, Fritsch B** (1999) *Clinical significance of bone marrow biopsy and plasma cell morphology in MM and MGUS.* Pathol Biol (Paris) 47:158-168.

**Baum C et al.** (2003) *Side effect of retroviral gene into hematopoietic stem cells.* Blood 101:2099-2144.

**Bennett JM et al.** (1976) *Chronic lymphocytic leukemia: therapeutic options.* Int. J Radiat Oncol Biol Phys 5-6: 625-627.

**Bennett JM et al.** (1982) *Proposal for the classification of the myelodysplastic syndromes.* Int J Haematol 51:189-199.

**Bennett JM et al.** (2000) *World Health Organization Classification of the Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndrome.* Int J Haematol 72:131-133.

**Berenson RJ et al.** (1988) *Antigen CD34<sup>+</sup> marrow cells engraft lethally irradiated baboons.* J Clin Invest 81:951-955.

**Bernard J, Wintrobe M** (1981) *[The blood of Altamira or the birth of hematology (author's transl)].* Nouv Rev RF Hematol 23:249-251.

**Berns A** (1991) *Tumorigenesis in transgenic mice: identification and characterization of synergizing oncogenes.* J Cell Biochem 47:130-135.

**Bernstein SE, Russell ES** (1959) *Implantation of normal bloodforming tissue in genetically anemic mice, without x-irradiation of host.* Proc Soc Exp Biol Med 101:769-773.

**Bernuau D et al.** (1981) *Ultrastructural lesions of bile ducts in primary biliary cirrhosis. A comparison with the lesions observed in graft versus host disease.* Hum Pathol 12:782-93.

**Bessis M** (1973) *The structure of normal and pathologic erythrocytes.* Adv Biol Med Phys 14:35-39.

**Bonini C et al.** (1997) *HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia.* Science 276:1719-1724.

**Brecher G et al.** (1948) *Effects of x-ray on lymphoid and hematopoietic tissue of albino mice.* Blood 3:1,259-1,274.

**Campbell FR** (1972) *Ultrastructural studies of transmural migration of blood cells in the bone marrow of rats, mice and guinea Pigs.* Am J Anat 135:521-535.

**Carter RE, Jackson WL** (1962) *The intercellular substances of bone marrow. II. Variations in granulocytic and in erythrocytic hyperplasia.* Blood 20:322-329.

**Clevers H et al.** (1988) *The T cell receptor /CD3 complex: a dynamic protein ensemble.* Annual Review of Immun 6:629-662.

**Cuenco GM et al.** (2000) *Human AML1/MDS1/EVI 1 fusion protein induces an acute myelogenous leukemia (AML) in mice: a model for human AML.* Proc Natl Acad Sci USA 15;97:1760-1765.

**Dunbar CE et al.** (1995) *Retrovirally marked CD3-enriched peripheral blood marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation.* Blood 85:3048-3057.

**Düllmann J** (2000) *Lectin histochemistry of the spleen: a new lectin visualizes the architecture of white pulp and the sinuses of red pulp.* J Histochem Cytochem 48:923-931.

**Endicott KM, Gump H** (1947) *hemograms and myelograms of healthy female mice of C-57 brown CFW strains.* Blood 1:61-63.

**Fackler MJ et al.** (1995) *Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells.* Blood 85:3040-3047.

**Farthing MJ et al.** (1982) *Liver disease after bone marrow transplantation.* Gut 23:465-474.

**Fehse B et al.** (2000) *CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells.* Mol Ther 1:448-456.

**Fredrickson TN, Harris AW** (2000) *Atlas of mouse hematopathology.* Newark, NJ: Harwood Academic Publishers;2000.

**Goodell MA** (1999) *Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter?* Blood 94:2545-2547.

**Gordon MY et al.** (2000) *Contact-mediated inhibition of human haematopoietic progenitor cell proliferation may be conferred by stem cell antigen, CD34.* Hematol J 1:77-86.

**Grisolano JL et al.** (2003) *An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFBetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice.* Proc Natl Acad Sci USA 100:9506-9511.

**Heinecke H, Wagner M** (1964) *Zur Frage der Hämoglobintypen der Maus.* Z. Versuchstierk.5:88-97.

**Hu MC, Chien SL** (1998) *The cytoplasmatic domain of stem cell antigen CD 34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling.* Blood 91:1152-1162.

**Ilan Y et al.** (2000) *Induction of oral tolerance in splenocyte recipients toward pretransplant antigens ameliorates chronic graft versus host disease in a murine model.* Blood 95:3613-3619.

**Itoh S, Winchester RJ** (1963) *The fine structure of the gastric mucosa in the bat.* J Cell Biol 16:541-577.

**Itoh S et al.** (2000) *Cytokine profile of liver-infiltrating CD4+ T cells hepatic lesions induced by graft-versus-host reaction.* J Gastroenterol Hepatol 15:342-343.

**Kogan SC** (2002) *Bethesda proposal for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice.* Blood 100:238-245.

**Krause DS et al.** (1994) *Characterization of the murine CD34, a marker for hematopoiet progenitor and stem cells.* Blood 84:691-701.

**Krause DS et al.** (1996) *CD34: structure, biology, and clinical utility.* Blood 87:1-13.

**Li Z et al.** (2002) *Murine leukemia induced by retroviral gene marking.* Science 296:497.

**Li Z et al.** (2002) *Persisting multilineage transgene expression in the clonal progeny of a hematopoietic stem cell.* Leukemia 16:1655-1663.

**Marshall T** (1988) *Release of lysosomal enzyme beta-glucuronidase from isolated human eosinophils.* J Allergy Clin Immunol 82:550-555.

**Mosier DE et al.** (1988) *Transfer of a functional human immune system to mice with combined immunodeficiency.* Nature 335:256-259.

**Nagler A et al.** (2000) *Oral tolerization ameliorates liver disorders associated with chronic graft versus host disease in mice.*Hepatology 31:641-648.

**Nonomura A et al.** (1987) *Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. I.Light microscopic and immunocytochemical observations.*Acta Pathol Jpn 37:763-773.

**Nonumura A et al.** (1988a) *Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. II.Electron microscopic observations.*Liver 8:32-41.

**Nonumura A et al.** (1988b) *Histological changes of bile duct in experimental graft-versus-disease across minor histocompatibility barriers. III.Immunoelectron microscopic observations.*Acta Pathol Jpn 38:269-280.

**Nonumura A et al.** (1989) *Histological changes of the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. IV.A study of lymphocyte-endothelial interaction.*Liver 9:294-301.

**Nonomura A et al.** (1991a) *Histological changes of the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. V.A light and electron microscopic study of the intralobular changes.*Liver 11:149-157.

**Nonomura A et al.** (1991b) *Histological changes in the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. VI.A light and electron microscopic study of the periportal changes.*Liver 11:278-286.

**Nonomura A et al.** (1993) *Histological changes of the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. VII.A light and electron microscopic study of the large bile duct.*Liver 13:163-171.

**Nonomura A et al.** (1996) *Histological changes of the liver in experimental graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. VIII.Role of eosinophil infiltration.*Liver 16:42-47.

**Okuno Y et al.** (2002) *Distal elements are critical for human CD34 expression in vivo.* Blood 100:4420-4426.

**Perkins AS** (1989) *The Pathology of Murine Myelogenous Leukemias. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 149 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

**Rosenberg N, Joelicoer P** (1997) *Retroviral pathogenesis. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. Retroviruses*. 1st ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 475-586.

**Russel WJ et al.** (1966) *Aktive bone marrow distribution in the adult*. Br J Radiologie 39:735

**Sasaki K et al.** (1983) *Crystalloid inclusion-containing macrophages in the bone marrow and red pulp of the mouse, with particular relation to age, sex and hydrocortisone administration: qualitative and quantitative electron microscopy*. Arch Histol Jpn 46:381-391.

**Sato K et al.** (1999) *[The control survey in CD marker analysis of leukemia cells]* Gan To Kagaku Ryoho 26:515-521.

**Van den Eertwegh AJ, Claassen E** (1991) *T cells in the spleen: localization, cytokine production and cell/cell interactions*. Res Immunol 142:334-339.

**Van Putten LM** (1958) *The life span of red cells in the rat and the mouse as determined by labeling with DFP<sup>32</sup> in vivo*. Blood 13:789-794.

**Van Rijn RS et al.** (2003) *A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2<sup>-/-</sup>gammac<sup>-/-</sup> double-mutant mice*. Blood 102:2522-2531.

**Vannucchi AM et al.** (2000) *Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice*. Blood 95:2559-2568.

**Weiss L.** (1976) *The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats.* Anat Rec 186:161-184.

**Westen H, Bainton DF** (1979) *Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors.*J. Exp. Med 150:919-937.

**Yoshida K et al.** (1993) *Development of antigenic heterogeneity in the splenic meshwork of severe combined immunodeficient (SCID) mice after reconstitution with T and B lymphocytes.*Cell Tissue Res 272:1-10.

# DANKSAGUNG

Zunächst danke ich allen Institutionen und Funktionsträgern des Fachbereichs Medizin an der Universität Hamburg, die mir dieses erfolgreiche Studium ermöglicht haben.

Prof. Dr. J. Düllmann, gebührt hier mehr als die traditionelle Danksagung an den Doktorvater. Sein persönliches Engagement und seine stetige Unterstützung, auch nach seiner aktiven Lehrzeit, kann ich nicht hoch genug schätzen.

An dieser Stelle möchte ich auch Prof. Dr. U. Schumacher, dem Direktor des Instituts für Anatomie II: Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die Möglichkeit danken, die Doktorarbeit am Anatomischen Institut II zu erstellen. Für die Unterstützung im praktischen Teil dieser Arbeit danke ich Frau Susanne Feldhaus, Frau Maike Märker und Herrn Klaus Siebert.

Panagiota Pechlivanidou, Ayşegül Yurtserver, Basim Mohammad und all meinen Freunden, die mich in all den Jahren bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben, danke ich sehr.

Meiner Mutter Esther Pamela Addo-Doku, meinem Bruder Otto Addo und meinem Ehemann Collins Adu Brako Tabiri danke ich dafür, dass sie in den Herausforderungen meines Lebens stets an meiner Seite stehen. Ohne Sie wäre all dieses nicht möglich gewesen.

Gye Nyame

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

<b>Name</b>	<b>Nana Oduraa Addo</b>
<b>Adresse</b>	<b>Kleiner Kielort 9, 20144 Hamburg</b>
<b>Geburtsdatum</b>	<b>09. Juni 1975</b>
<b>Geburtsort</b>	<b>Hamburg</b>
<b>Familienstand</b>	<b>Verheiratet; Dr. med. Collins Adu Brako Tabiri</b>
<b>Bruder</b>	<b>Otto Addo</b>
<b>Eltern</b>	<b>Esther Pamela Addo-Doku Dr. med. Bernhard Doku</b>

## Ausbildung

Seit 2005	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Itzehoe (Dr. U. Heilenkötter)
1999 – 2005	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Fachbereich Medizin der Universität Hamburg Pysikum: März 2001 1.Staatsexamen: März 2002 2.Staatsexamen: März 2004 3.Staatsexamen: Juni 2005
1996 – 1999	Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg Lehranstalt für Technische Assistenten in der Medizin; Qualifikation: Examinierte MTLA
1994 – 1996	Universität Hamburg, Fachbereich Chemie
1985 – 1994	Gymnasium Hummelsbüttel, Hamburg

## Praktisches Jahr 2004-2005

- 3. Tertial *Albertinen- Krankenhaus, Hamburg*  
Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Prof. Dr. M. Carstensen)  
*University of Ghana Medical School;*  
Korle- Bu Teaching Hospital, Accra/ Ghana

- 2.Tertial  
Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Prof. E.Y. Kwawakume)  
*University of Ghana Medical School;*  
Korle- Bu Teaching Hospital, Accra/ Ghana  
Chirurgie (Dr. R. Darko M.D.)  
*AK Eilbek, Hamburg*
- 1.Tertial  
Chirurgie (Dr. med. L. Steinmüller)  
*AK Altona, Hamburg*  
Innere Medizin/ Hämatologie  
(Dr. med. Braumann)

Nana Oduraa Addo

Hamburg, 2007

# ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seiten des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Nana Oduraa Addo