

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Pathologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

Einfluß der allogenen Stammzelltransplantation bei der Primären
Myelofibrose (PMF) auf den osteosklerotischen Knochenumbau

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Mignon Chin-Ae Hann
aus Seoul

promoviert am 31. Oktober 2012

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Pathologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

Einfluß der allogenen Stammzelltransplantation bei der Primären
Myelofibrose (PMF) auf den osteosklerotischen Knochenumbau

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Mignon Chin-Ae Hann
aus Seoul

promoviert am 31. Oktober 2012

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Med Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. M. A. Kvasnicka

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. E. Schönau

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen bzw. Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Professor Dr. med. J. Thiele

Herrn Professor Dr. med. H. M. Kvasnicka

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch nicht veröffentlicht.

Köln, den 2.12.2011

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden morphometrischen Messungen führte ich nach entsprechender Anleitung durch Herrn Universitätsprofessor Dr. med. J. Thiele und Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. M. Kvasnicka selbstständig durch.

Die statistischen Berechnungen habe ich mit Unterstützung und unter Anleitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. M. Kvasnicka selbstständig durchgeführt.

Die Auswertung der klinisch-hämatologischen Daten habe ich alleine vorgenommen.

Die Färbungen der Schnittpräparate wurden von mir mit Unterstützung durch den medizinisch-technischen Assistenten des Labors für Hämatopathologie des Zentrums für Pathologie der Universität zu Köln, Herrn Hans Günter Simons, durchgeführt.

Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation am Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln durchführen zu dürfen, danke ich dem ehemaligen Direktor, Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. J. Thiele für die freundliche Überlassung des Themas und die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. med. H. M. Kvasnicka für die stets freundliche Betreuung und die sehr hilfreiche Unterstützung im Verlauf dieser Dissertation.

Herrn Hans Günter Simons danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen im Labor für Hämatopathologie des Zentrums für Pathologie.

Danken möchte ich auch allen Ärzten der beteiligten Kliniken, die mit der Behandlung der Patienten betraut waren, vor allem jedoch Herrn Prof. Dr. Dr. A. Zander sowie Privatdozent Dr. N. Kröger (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf) sowie Prof. Dr. D.W. Beelen (kommissarischer Direktor der Klinik für Knochenmarkstransplantation) und Prof. Dr. D. Schmidt (Direktor des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Essen).

Des weiteren gilt mein besonderer Dank allen Kliniksdirektoren, Chefärzten und Fachärzten für Hämatologie und Onkologie, die uns bereitwillig entsprechende Daten ihrer Patienten zur Verfügung gestellt haben.

Meiner Familie und Alexander

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Experimentelle Befunde zur Genese der fibro-osteosklerotischen Veränderungen bei der PMF	13
1.1.2. In-vitro Experimente	17
1.1.3 Tiermodelle	23
1.2 Bedeutung der Fibroosteosklerose	36
1.2.1. Klinische Befunde (Myeloische Metaplasie)	38
1.2.2. Histologische Befunde	43
1.3 Therapeutische Ansätze zur Reduzierung der Fibro-Osteosklerose	47
1.4 Fragestellung der Arbeit	54
2. Material und Methode	55
2.1. Übersicht über das Patientengut	55
2.2. Entnahme und Bearbeitung der Knochenmarksbiopsien	56
2.2.1 Routinefärbung	59
2.2.2. Enzymhistochemische Färbung/ Tartrat-resistente saure Phosphatase	60
2.3. Morphometrische Analyse	64
2.3.1. Knochenanteil (Osteoklasten)	66
2.3.2. Quantifizierung der Osteoklasten	67
2.4. Statistische Auswertung	68
3. Ergebnisse	69
3.1. Qualitative Beschreibung des Knochenmarkbefundes (Bilder)	69
3.2. Morphometrische Auswertung	71
3.3. Knochenanteil (Osteosklerose)	74
3.4. Osteoklasten	75
4. Diskussion	76
4.1. Vergleich mit tierexperimentellen Daten	76
4.2. Ursachen der Osteosklerose	80
5. Zusammenfassung	83
6. Literaturverzeichnis	84
7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	123
8. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

Das Krankheitsbild der Myelofibrose mit Myeloischer Metaplasie (MMM) wurde zum ersten Mal 1879 beschrieben (Heuck 1879) und wird heutzutage gemäss WHO 2008 zu den myeloproliferativen Neoplasien (MPN) ehemals Chronisch Myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE) gezählt. Für die Primäre Myelofibrose (PMF) wurden vor der Einführung der WHO-Klassifikation von 2008 auch eine Vielzahl von synonymen Krankheitsbezeichnungen wie: „Chronisch Idiopathische Myelofibrose (CIMF), Osteomyelofibrose, Osteomyelosklerose, Agnogenische Myeloische Metaplasie (AMM), Myelofibrose mit Myeloischer Metaplasie (MMM) oder Chronische Megakaryozytäre Myelose (CMGM) gebraucht (Lutz 2003). Den myeloproliferativen Neoplasien liegt eine in der überwiegenden Anzahl der Fälle erworbene klonale Transformation pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen zugrunde aus der sich eine neoplastische Hämatopoese entwickelt, die ganz unterschiedliche Zelldifferenzierungen umfassen kann und teilweise von einer sekundären Stromareaktion, der Myelofibrose, begleitet wird (Georgii et al. 1998; Thiele et al. 1999; Michiels und Thiele 2002). Es ist nun bekannt, dass der PMF eine klonale Transformation pluripotenter hämatopoetischer Zellen zugrunde liegt mit immer wiederkehrenden molekularen Markern (i.e. JAK2V617F, MPLW515L/K) und/oder zytogenetischen Markern (i.e. del(13q), del(20q), und Abweichungen, die die Chromosomen 1,7 und 12 betreffen) (Tefferi 2007).

In der WHO-Klassifikation von 2001 wurden vier verschiedene Gruppen von chronischen myeloischen Erkrankungen unterschieden: Chronische myeloproliferative Erkrankungen (CMPD), Myelodysplastische Syndrome (MDS), Erkrankungen mit sowohl myeloproliferativen als auch myelodysplastischen Merkmalen (MDS/MPD), Mastzell-Erkrankungen.

Die WHO-Klassifikation von 2008 unterscheidet dagegen die folgenden Gruppen: Myeloproliferative Neoplasien (MPN), Myelodysplastische Syndrome (MDS), MDS/MPN, Myeloische Neoplasien mit Eosinophilie und genetischen Abnormalitäten, die die Gene PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor

alpha), PDGFRB (platelet-derived growth factor receptor beta) oder FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) betreffen.

Zur Gruppe der MPN im Sinne der WHO-Klassifikation 2008 zählen nun folgende Erkrankungen: Chronische myeloische Leukämie (CML), Polycythaemia vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET), Primäre Myelofibrose (PMF), Chronische Neutrophilenleukämie (CNL), Chronische Eosinophilenleukämie (CEL), Hypereosinophiles Syndrom (HES), Mastzellleukämie (MCD), unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien.

Die WHO-Klassifikation umfasst folgende Major- und Minorkriterien:

Majorkriterien:

- 1.) PMF-typische Knochenmarksveränderungen
- 2.) Ausschluss MDS und andere CMPE
- 3.) Ggf. JAK2V617F oder MPLW515L/K

Minorkriterien:

- 1.) Leukoerythroblastisches Blutbild
- 2.) LDH-Erhöhung
- 3.) Anämie
- 4.) Splenomegalie.

Es müssen zur Diagnose alle Major- und 2 Minorkriterien erfüllt sein (Tefferi und Vardiman 2008).

Klinische Symptome der PMF umfassen eine progressive Anämie, eine massive Splenomegalie, einen leukoerythroblastischen Blutausschlag und konstitutionelle Symptome (z.B. Kachexie). Die meisten Patienten werden nach der sechsten Lebensdekade mit der Diagnose „PMF“ konfrontiert und die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnose beträgt 3,5 bis 10 Jahre. Todesursachen schließen Infektion, Blutungen, Organversagen, Portale Hypertonie und leukämische Transformation ein. Letztere tritt bei 8% bis 23 % der Patienten in der ersten Dekade der Erkrankung auf (Tefferi 2005). Bei der PMF handelt es sich um einen klonalen Stammzelldefekt, der durch eine Beteiligung aller drei hämatopoetischen Zellreihen gekennzeichnet ist. Charakteristika für die PMF sind Myeloproliferation, Angiogenese, Extramedulläre Hämatopoese und die intramedulläre kollagene Myelofibrose (Odenike und Tefferi 2005). Die Panmyelose weist folgende gemeinsame Merkmale auf: intakte Reifung, progressive Myelofibrose und Splenomegalie

(Ahmed und Chang 2006). Hinsichtlich der Genese der fibroosteosklerotischen Veränderungen stellte sich heraus, dass die Myeloproliferation auf eine klonale Vermehrung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu sind die Fibroblasten, die an der fortschreitenden Myelofibrose teilhaben, polyklonal (Bock et al. 2006).

Das morphologische Korrelat der multilineären Neoplasie ist eine ausgeprägte Proliferation polymorpher herdbildender Megakaryozyten, eine Steigerung der Granulopoese mit erhöhtem Anteil an früheren Reifungsformen und eine oft linksverschobene ineffektive Erythropoese. Im Hinblick auf die PMF ist eine allgemein gültige Beschreibung der Knochenmarkhistologie insofern schwierig, da in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Stadien des Krankheitsverlaufes, die Ausprägung bestimmter morphologischer Phänomene sehr wechselhaft ist. Im Allgemein lässt sich ein initiales bzw. frühes präfibrotisches Stadium mit einer deutlichen Hyperzellularität von manifesten und fortgeschrittenen myelofibrotischen Phasen abgrenzen. Die einzelnen Stadien sind nicht nur durch eine mäßiggeradige Vermehrung und Linksverschiebung neutrophilen Granulopoese, sondern auch durch histotopographische Anomalien (häufige Nesterbildungen, Verschiebung zu den endostalen Bildungszonen der Granulopoese) der megakaryozytären Zellreihe gekennzeichnet. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang die in diagnostischer Hinsicht wichtigen zytologischen Atypien der Megakaryozyten zu erwähnen, die sich einmal durch Anhäufungen kleiner und riesengroßer Formen auszeichnen und zudem oft chromatindichte, hypolobulierte Kerne (sog. Wolkenkerne) aufweisen sowie schließlich eine deutliche Verschiebung der Kern-Zytoplasma-Relation zeigen. Dagegen reift die Erythropoese eher verzögert aus und weist vermehrt Vorläuferzellen (frühe Erythroblasten) auf. Die morphologisch fassbare enge Beziehung von atypischer Megakaryopoese und Faservermehrung sowie terminaler Osteosklerose im Verlaufe der Erkrankung lässt sich für die PMF besonders gut anhand von Sequenzbiopsien dokumentieren (Thiele und Kvasnicka 2001).

Die PMF kann mit einer gesteigerten Vaskularisation, einer reaktiven Ablagerung von extrazellulärer Matrix, einer fakultativen Knochenneubildung (Osteosklerose) und einer extramedullären Hämatopoese assoziiert sein. Diese Veränderungen des Mikromilieus im Knochenmark stellen Sekundärphänomene

dar und sind die Folge einer Zytokinproduktion mit angiogenetischem, fibrogenetischem und osteogenetischem Potential (Tefferi 2000; Thiele et al. 2000; Jaffe et al. 2001).

Sowohl Megakaryozyten als auch Monozyten gelten als Quelle der Zytokine, die die Fibroblastenproliferation und die Osteogenese steigern. Die Pathomechanismen der Deposition von Komponenten der extrazellulären Matrix in der PMF sind weitgehend unklar. Insbesondere ist nicht bekannt, welche Vorgänge den Übergang in eine manifeste Fibrose bedingen. Das liegt auch daran, dass bei Vorliegen einer Knochenmarkfibrose die Zellularität einer Untersuchung durch Aspiration nicht mehr zugänglich ist. Eine Dysbalance zwischen Kollagenen und Kollagenasen ist eine der diskutierten möglichen Ursachen für eine progressive Fibrose (Tefferi 2000; Bock et al. 2006). Jedoch werden mehrere pathogenetische Mechanismen für die Entstehung der Myelofibrose vermutet. Zum einen führt die Disintegration atypischer Megakaryozyten mit Plättchenablagerungen in den extravasalen interstitiellen Markräumen zur Ausschüttung zahlreicher Zytokine mit nachfolgenden Veränderungen des Knochenmarksstromas. Diese Zytokine induzieren unter anderem eine Fibroblastenproliferation mit gesteigerter Kollagenproduktion (Kollagen Typ III, später Typ I) in Nachbarschaft der Megakaryozytenhaufen. Zum anderen induzieren zirkulierende Immunkomplexe eine chronische Entzündungsreaktion mit Nachweis von vaskulitischen Veränderungen, Plasmozytose und vermehrter Lymphozyteninfiltration. Die Fibrosierung des Knochenmarkes bei der PMF ist demnach eine sekundäre Reaktion auf eine zugrunde liegende Myeloproliferation mit obligater Beteiligung der Megakaryozytopoese (Petrides et al. 2003).

Förderlich für zukünftige Therapiestrategien hat das Verständnis für die Komplexität von sowohl normalem als auch myelofibrotischen Knochenmarksstroma in den vergangenen Jahren außerordentlich zugenommen. Dennoch verbleibt die Genese der Myelofibrose als Merkmal der PMF unklar.

Bindegewebe besteht aus Zellen, i.e. Fibroblasten, Makrophagen, Endotheloid- und Mastzellen und Extrazellulärer Matrix (EZM). Kollagen, welches das Haupt-Makromolekül in der EZM darstellt, wird hauptsächlich von Fibroblasten produziert. Zu der nichtkollagenösen EZM zählen: Fibronectin,

Thrombospondin, Basalmembranproteine (Laminin, Tenaskin und Vitronectin) und Glykosaminoglykane (GAG), von denen Hyaluronan der Hauptvertreter ist. Im Knochenmark ist der Kollagenspiegel abhängig von dem Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau des Kollagens. Letzterer wird durch Kollagenasen, Proteasen (die von Neutrophilen synthetisiert werden), Monozyten, Endotheloidzellen und Fibroblasten geregelt. Immunhistochemische Studien bei der MMM haben gezeigt, dass eine markierte Neovaskularisierung in myelofibrotischem Knochenmarksstroma zusammen mit einer gesteigerten Anlagerung von Kollagen Typ I, III, IV und VI (von diesen überwiegend Kollagen Typ III) einhergeht. Eine vermehrte Ablagerung von interstitiellen und Basalmembranproteinen, Fibronectin, Laminin, Tenaskin und Vitronectin wurde auch dokumentiert für die fortgeschrittenen Phasen der Erkrankung. Die Zunahme von Kollagen spiegelt sich dabei im Kreislauf über die Nebenprodukte der Fibroblastenproliferation: z.B. das C-terminale Peptid von Prokollagen Typ I (PICP) und das N-terminale Peptid von Kollagen Typ III (PIIIP) wider. Die Plasmakonzentration von diesen Komponenten ist vor allem bei Patienten mit aktiver Krankheit erhöht. Im Hinblick auf die Entstehung der Myelofibrose wurden in den letzten Jahren signifikante Fortschritte gemacht. Eine Anzahl von Studien beschäftigt sich mit den pathogenetischen Ursachen von diesem auch namensgebenden Krankheitsmerkmal der PMF (Le Bousse-Kerdiles und Martyré 2000).

1.1 Experimentelle Befunde zur Genese der fibro-osteosklerotischen Veränderungen bei der PMF

Der Grund für die exzessive Knochenmarkfibrose, die bei der PMF beobachtet wird, bleibt unklar. Mehrere pathogenetische Mechanismen werden für die Entstehung der Myelofibrose diskutiert. Morphologisch ist im Knochenmark eine große Anzahl von dysplastischen Megakaryozyten, eine sinusoidale Dilatation und eine intravaskuläre Hämatopoiese vorzufinden. Diese wird begleitet von einer exzessiven Menge an Kollagen (Typ I und III) und anderen Extrazellulärmatrixproteinen wie Fibronectin und Proteoglykanen zusammen mit einer Knochenneubildung (Osteosklerose) und Blutgefäßneubildung (Angioneogenese) (Dingli et al. 2004). Wie schon in früheren Studien gezeigt

wurde, sind Knochenmarksfibroblasten polyklonal (Castro-Malaspina et al. 1982; Greenberg et al. 1987; Wang et al. 1992), voll funktionsfähig und weisen *in vitro* bestimmte Wachstumscharakteristika auf (Castro-Malaspina et al. 1982). Die extrazellulären Proteine werden von polyklonalen Fibroblasten, Stromazellen und glatten Muskelzellen synthetisiert. Diese Reaktion in Verbindung mit den zellulär und extrazellulär gemessenen Werten von verschiedenen fibrogenetischen und angiogenetischen Zytokinen ist bei Patienten mit MMM verändert und unterstützt die These, dass die histologischen Veränderungen im Knochenmark bei der MMM reaktiv und zytokinvermittelt sind (Castro-Malaspina et al. 1981; Castro-Malaspina et al. 1982; Rameshwar et al. 1994). Aktuell ist die Quelle der fibrogenen Zytokine noch nicht geklärt und sowohl maligne Megakaryozyten (Kato et al. 1990; Martyré et al. 1994) als auch Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie (Rameshwar et al. 1994) sind mit der Pathogenese in Zusammenhang gebracht worden (Dingli et al. 2004).

In dieser Hinsicht haben mehrere patientenzentrierte Studien die pathogenetische Rolle von TGF- β (Terui et al. 1990; Martyré et al. 1991; Martyré et al. 1994), PDGF (Martyré et al. 1991), bFGF (Le Bousse-Kerdiles et al. 1996; Le Bousse-Kerdiles und Martyré 2001), VEGF (Di Raimondo et al. 2001) und Bindegewebsinhibitoren von Matrix-Metalloproteinen (Wang et al. 2002; Jensen et al. 2003) nachgewiesen. Im Hinblick auf die meist späte Osteosklerose sind Osteokalzin und Osteoprotegerin (OPG) näher untersucht worden (Dingli et al. 2004).

Neueren Studien zufolge liegt eine pathologische Interaktion (Emperipolesis) zwischen Megakaryozyten und Neutrophilen/Eosinophilen vor. Megakaryozyten schütten unangemessene Werte (quantitativ und nicht *loco typico*) an P-Selektin, einem wichtigen Mediator bezüglich der Neutrophilenanlagerung, aus (Schmitt et al. 2000; Centurione et al. 2004). Die von den Neutrophilen abstammenden Enzyme, Elastase eingeschlossen, könnten also auch an dem pathologischen Prozess beteiligt sein, indem sie die Ausschüttung von myeloischen Vorläuferzellen vereinfachen (Barosi et al. 2001; Pelus et al. 2004; Xu et al. 2005). Genauer betrachtet kommt es zu einer Ausschüttung von proteolytischen Enzymen, sobald sich die Neutrophilen bei der Durchwanderung in den Megakaryozyten befinden. Dies führt zu dem Zelltod beider Zellen, was

wiederum in einer Ausschüttung von in den Zellen befindlichen Wachstumsfaktoren TGF- β und PDGF aus den α -Granula der Thrombozyten resultiert. PDGF stimuliert die Proliferation von Fibroblasten, Mesenchym- und glatten Muskelzellen. Die Fibroblastenproliferation führt zu gesteigerter Kollagenproduktion (Kollagen Typ III, später Typ I) in Nachbarschaft der Megakaryozytencluster. TGF- β stimuliert die von PDGF stimulierten Zellen wiederum EZM-Komponenten wie Kollagen und Proteoglykane zu synthetisieren. Die TGF- β -Ausschüttung wird derzeit mit der TPO-Stimulation in Verbindung gebracht. Dies wurde in Tiermodellen belegt: in mit TPO stimulierten Mäusen konnte keine Myelofibrose nachgewiesen werden, wenn kein TGF- β ausgeschüttet wurde.

Die verstärkte Emperipolesis könnte auch eine Erklärung für die erhöhte Ausschüttung von Elastase und aktiviertem MMP-9, die bei Patienten mit MMM beobachtet werden kann und verantwortlich ist für die erhöhte Anzahl der zirkulierenden CD34⁺-Vorläuferzellen (Dingli et al. 2004).

Das Ausmass der Osteosklerose und die Anzahl von Osteoklasten in MPN wurden bereits früher untersucht (Thiele et al. 1989). Es wurde festgestellt, dass die Gesamtfläche von trabekulärem Knochen und die Anzahl der Osteoklasten bei der CML, Essentielle Thrombozythämie (ET), P.vera und in den initialen hyperzellulären Phasen der PMF abnahm. Im Gegensatz zu diesen Befunden fand man in den fortgeschrittenen Phasen der PMF einen signifikanten Anstieg in der Gesamtfläche des Knochenanteiles und eine hohe Anzahl von osteoklastischen Elementen und offensichtlich auch eine erhöhte Anzahl von Osteoblasten. Es wurde diskutiert ob der Anstieg der osteoklastischen-osteoblastischen Elemente in den späten Stadien der AMM möglicherweise die Imbalance von Calcitriol (1,25 Dihydroxyvitamin D3) auf die knöcherne Homöostase reflektiert. Diese pathologische Knochenneubildung wurde auf die Anwesenheit der atypischen Megakaryozytenproliferation zurückgeführt (Thiele et al. 1989).

Hinsichtlich der Osteosklerose ist OPG nachweislich ein wichtiger Inhibitor der Osteoklastengese. In Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte OPG-Ausschüttung zu einer Osteopetrose führt (Simonet et al. 1997).

Thrombopoietin führte in Tiermodellen zu einer Up-Regulierung der OPG-Ausschüttung und könnte eine Erklärung für die in der MMM beobachtete Osteosklerose sein (Chagraoui et al. 2003).

Neuere Studien zeigten erhöhte OPG-Werte im Blut bei Patienten mit PMF im Gegensatz zu gesunden Probanden und Patienten mit einer anderen Erkrankung des Chronisch Myeloproliferativen Formenkreises. Demzufolge liegt nahe, dass die Osteosklerose mit erhöhter OPG-Ausschüttung assoziiert ist, die nicht auf die Wirkung von TGF- β 1 auf Knochenmarksstromazellen zurückgeführt wird, sondern eventuell mit der Wirkung von TGF- β 1 oder anderen Wachstumsfaktoren auf andere Zellen als Knochenmarksstromazellen z.B. Osteoblasten (Wang et al. 2004).

Die fortgeschrittene PMF mit Osteosklerose und einer vermehrten Anzahl und Dicke von Knochen trabekeln zeigt unerwartet wenige oder auch gar keine Osteoklasten und Osteoblasten auf (Ward et al. 1971). Da die Bildung von Osteoklasten durch Osteoprotegerin (OPG) inhibiert werden kann, wurde die OPG-Ausschüttung von mehreren Studiengruppen untersucht. In 2005 wurden Patienten mit einer fortgeschrittenen Myelofibrose und Myelosklerose untersucht, die signifikant mehr OPG-mRNA-Werte (bis 71-fach) im Vergleich zu Patienten im präfibrotischen Stadium und einer Kontrollgruppe aufzeigten. Der „receptor activator of nuclear factor kappa B ligand“ (RANKL), ein positiver Regulator der Osteoklastendifferenzierung und vermeintlicher Antagonist von OPG, ist ausschließlich in fortgeschrittener PMF bis zu 34fach erhöht ausgeschüttet worden. Fallspezifische Kalkulationen der RANKL/OPG-Quotienten in fortgeschrittener PMF zeigten ein breites Spektrum ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zu präfibrotischer PMF und nicht-neoplastischer Hämatopoiese. Der immunhistochemische Nachweis des OPG-Proteins zeigte eine starke Markierung von Endothelzellen in proliferierenden Gefäßen bei fibrotischer PMF und heterogen markierte Megakaryozyten und Fibroblasten. Osteosklerose und die verminderter Osteoklastenfunktion in der PMF scheinen somit mit einer erhöhten endothelialen OPG-Ausschüttung zusammenzuhängen, eine gleichzeitige Reduktion des Antagonisten RANKL konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Bock et al. 2005).

Zum anderen induzieren zirkulierende Immunkomplexe eine chronische Entzündungsreaktion mit Nachweis von vaskulitischen Veränderungen,

Plasmozytose und vermehrter Lymphzellinfiltration. Analog z.B. zur Pathogenese der Leberzirrhose werden dabei auch im Knochenmark Zytokine freigesetzt, die wiederum zur Fibroblastenproliferation und zunehmender Fibrosierung (Kollagen Typ III, später Typ I) führen (Ahmed und Chang 2006).

Die Fibrosierung des Knochenmarks bei der PMF ist demnach eine sekundäre Reaktion auf eine zugrunde liegende Myeloproliferation mit obligater Beteiligung der Megakaryopoese (Wilmanns 1996).

Von der PMF muß die reaktive Markfibrose streng abgegrenzt werden, die in der Regel nicht mit einer extramedullären Blutbildung und den charakteristischen Blutbildveränderungen einhergeht. Ursächlich kommen infektiöse, immunologische, toxische, neoplastische und osteologische Erkrankungen in Frage (Petrides et al. 2003).

1.1.2. In-vitro Experimente

Castro-Malaspina (Castro-Malaspina et al. 1984) war der erste, der vorschlug, dass die Pathogenese der Myelofibrose auf eine unangemessene Ausschüttung von Wachstumsfaktoren aus Megakaryozyten zurückzuführen ist. Dieser Aussage entsprechend führt eine Imbalance zwischen vermehrter Kollagenproduktion durch einen aus Megakaryozyten stammenden Wachstumsfaktor, der später als PDGF (Castro-Malaspina et al. 1981) identifiziert wurde und verminderter Kollagenabbau durch platelet factor four (PF4), ein Kollagenaseinhibitor, zur Entstehung der Myelofibrose.

Die unangemessene Ausschüttung an Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF-beta, EGF, ECGF, bFGF, Calmodulin) wurde durch neuere Studien bekräftigt (Thiele et al. 1991; Kreft et al. 2004), die auch morphologische Veränderungen an Megakaryozyten und Thrombozyten feststellten.

Neuere Studien haben die bedeutende Schlüsselrolle von PDGF und TGF- β in der Entwicklung der Myelofibrose belegt und gezeigt, dass beide essenzielle Faktoren für die megakaryozytenabhängige Fibroblastenproliferation in vitro sind (Martyré et al. 1994; Kimura et al. 1995; Martyré 1995; Schmitz et al. 1995).

Auf der Hypothese beruhend, dass Wachstumsfaktoren einen maßgeblichen Einfluß auf die Myelofibrose besitzen, beurteilten mehrere Gruppen die PDGF-

Aktivität in CMPE und es zeigten sich folgende quantitative Veränderungen von Thrombozyten-PDGF.

Es wurde eine allgemeine Verminderung von intrazellulärem Thrombozyten-PDGF in verschiedenen MPN beobachtet mit der Ausnahme der MMM, bei der manche Gruppen reduzierte Thrombozyten-PDGF Aktivität aufzeigten (Kato et al. 1990), während andere über eine erhöhte Thrombozyten-PDGF-Konzentration berichteten (Martyré 1995). Diesen unterschiedlichen Studien zufolge scheint das intrazelluläre Thrombozyten-PDGF nicht strikt mit dem Ausmaß der Fibrose zu korrelieren. Folglich, kann das Ausströmen von PDGF nicht vollständig für die Komplexität des myelofibrotischen Stromas verantwortlich gemacht werden, obwohl es zweifelsohne die Fibroblastenproliferation induziert und es liegt nahe, dass zusätzliche von MK stammende Wachstumsfaktoren beteiligt sind.

Der Rolle von zwei Wachstumsfaktoren, die beide maßgeblich fibrogen sind, wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt: TGF- β und bFGF (Klagsburn 1998; Le Bousse-Kerdiles und Martyré 2000).

TGF- β wird in Megakaryozyten synthetisiert und in Thrombozyten gespeichert und ist maßgeblich an der Aktivitätsregelung von Genen beteiligt, die an der EZM-Synthese beteiligt sind. Die pathogenetische Bedeutung von TGF- β liegt in seiner Eigenschaft die Biosynthese von Kollagen Typ I, III und IV, Fibronectin (Ignatz 1986), Tenaskin und Proteoglykan (Pearson et al. 1998) zu steigern. Gleichzeitig blockiert es den Abbau der Matrix, indem es die Synthese von kollagenaseähnlichen Proteasen (Edwards et al. 1987) vermindert und die Ausschüttung von Proteaseinhibitoren verstärkt (Laiho et al. 1987). Eine Reihe von experimentellen Studien betont seine maßgebende Rolle bei der Pathogenese der Myelofibrose. Seine Beteiligung in diesem Prozess wurde das erste Mal in Berichten von erhöhten TGF-beta1-Werten bei Patienten mit MMM (Martyré et al. 1991; Zauli et al. 1993) gezeigt. Dieses Ergebnis wurde bestärkt durch Aufzeigen von verminderter TGF- β Produktion durch Megakaryoblasten in akuter megakaryoblastärer Leukämie (Terui et al. 1990) und erhöhten TGF- β Plasmakonzentrationen, die mit dem vermehrten Knochenmarksstromaumsatz bei megakaryozytärer Leukämie korrelierten (Reilly et al. 1993).

Weitere Studien der Le Bousse-Kerdilès und Martyré-Gruppe zeigten, dass die Expression von TGF-beta (mRNA und/oder ein sekretorisches Peptid) auch in

den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von Patienten erhöht ist (Martyré et al. 1994) und später als zirkulierende Megakaryozyten identifiziert wurden, indem man sie mit monoklonalen anti-gpIIb/IIIa Antikörpern (ein spezifischer Marker der megakaryozytären Zelllinie) kennzeichnete. Unter Berücksichtigung von in-situ Daten eines signifikant erhöhten Spiegels für PDGF-mRNA in den Megakaryozyten (Kato et al. 1990) ist zu schließen, dass dieser Mediator die Synthese der wichtigen Matrix-Protein-Kollagentypen I, III und Fibronektin stimuliert, die in der Entstehung der Myelofibrose resultieren (Reilly et al. 1992).

Insgesamt legen alle diese Ergebnisse nahe, dass TGF- β und MK in Zusammenhang stehen mit der Pathophysiologie der MMM (Martyré et al. 1994) und dass die megakaryozytäre Linie von großer Wichtigkeit für die Entwicklung der Myelofibrose ist. Die Korrelation von stetig zunehmender Myelofibrose in Übereinstimmung mit der Proliferation von Megakaryozyten in CML- Patienten, unterstreicht nachhaltig die Korrelation zwischen dieser Zelllinie und der Fibrose (Buhr et al. 1993). Eine Myelofibrose kann auch in anderen MPN beobachtet werden sehr gut untersucht bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) und auch bei Polyzythämia Vera (PV). Im Gegensatz dazu ist eine Myelofibrose bei Essentieller Thrombozythämie üblicherweise nicht zu beobachten, obwohl eine erhöhte Megakaryozyten- und Thrombozytenzahl vorzufinden ist, befinden sich die TGF- β -Werte im Normalbereich.

bFGF wird von einer Mehrzahl von Zelltypen produziert, Stroma und hämatopoetische Zellen eingeschlossen (Klagsburn 1998). Auch in Megakaryozyten und Thrombozyten entdeckt, ist bFGF ein leistungsfähiges Mitogen für Stromazellen des Knochenmarks (Li et al. 1991). Es wurde gezeigt, dass bFGF an der Hämatopoese beteiligt ist (Oliver et al. 1990), insbesondere indem es die Proliferation von Megakaryozyten und deren Vorläufern im Knochenmark möglich macht und indem es deren Adhäsion an Fibroblasten des Knochenmarksstromas verstärkt (Han et al. 1992; Bruno et al. 1993; Avraham et al. 1994). Angaben, die auf seine möglichen Auswirkungen auf hämatologische Funktionsstörungen hinweisen, sind immer noch rar. Dennoch haben kürzlich Studien gezeigt, dass bFGF in zirkulierenden MK und Thrombozyten von Patienten mit MMM verstärkt ausgeschüttet wird (Martyré et

al. 1997). Interessanterweise schütten megakaryozytäre Zellen kein bFGF aus während sie es produzieren. Das Fehlen des sekretorischen Signals, welche die Ausschüttung über den üblichen Endoplasmatisches Retikulum-Golgi Weg leiten würde, ist ein verblüffendes Merkmal, welchen von allen Formen des primären Translationsproduktes von bFGF geteilt wird. Daher sind andere Wege wie Exozytose, subletale Zellverletzung und/oder Zellyse als Möglichkeiten der bFGF-Ausschüttung vermutet worden. Im Anbetracht der atypischen Megakaryozyten und den offensichtlichen Abweichungen von Kern-Zytoplasma-Reife und der dysplastischen und nekrotischen Erscheinung in MMM sind die beiden letzteren Routen wahrscheinlich.

Die erhöhten bFGF Werte im Harn (Dalley et al. 1996) und die erhöhten bFGF Werte im Serum, die bei MMM Patienten (Martyré et al. 1997) festgestellt wurden, könnten von einer unangemessenen Ausschüttung und/oder Ausströmen aus solchen Megakaryozyten und/oder Thrombozyten herkommen. Einmal ins Knochenmark abgegeben, binden sowohl TGF- β als auch bFGF an Heparansulfat-Proteoglykane in der EZM und an den Basalmembranen (Moscatelli 1988; Lopez-Casillas et al. 1991).

Die anhaltende Ausschüttung der beiden gespeicherten Wachstumsfaktoren, welche in hoher Menge bei Patienten mit MMM produziert werden, legt nahe, dass diese an der fortschreitenden Veränderung des Knochenmarksstroma beteiligt sind.

Darüber hinaus wird TGF- β , bei der MMM in Megakaryozyten/Thrombozyten, wie in den meisten Zellen, hauptsächlich in einer latent inaktiven Form produziert, die dann anschließend physiologisch aktiviert wird. Zu der Komplexität des myelofibrotischen Prozesses sei hinzugefügt, dass vermutet werden kann, dass die anhaltende Ausschüttung von gespeichertem TGF- β aus einer möglichen Fehlentwicklung in der enzymatischen Maschinerie, welche die TGF- β Aktivität reguliert, herkommt.

Schlußendlich sollten die angiogenetischen Eigenschaften (Folkman und Shing 1992) von TGF-beta und bFGF in der MMM betont werden, da Neoangiogenese ein häufiges Merkmal dieser myeloproliferativen Funktionsstörung ist.

Im Rahmen dieser Vorgänge ist nicht nur die besondere Bedeutung von PDGF und TGF- β hervorzuheben, sondern auch die Tatsache, dass für die

Megakaryozyten/Fibroblasteninteraktionen eine enge räumliche Beziehung (durch β 1-Integrine) notwendig ist, um einen relevanten Fibroblasten-stimulierenden Effekt zu erreichen (Schmitz et al. 1995).

Der Einsatz von Zellkulturen welche die Zelltypen voneinander trennte, schwächte diesen megakaryozytenabhängigen Effekt signifikant (Schmitz et al. 1995). Dieses Merkmal ist auch übereinstimmend mit der histomorphologischen Untersuchung von Knochenmarksproben, welche eine Benachbarung von MK und Retikulin und Kollagenfibrillen zeigt (Burkhardt et al. 1984; Thiele et al. 1989; Buhr et al. 1992; Thiele et al. 1993). In diesem Zusammenhang wurden diverse β 1-Rezeptoren untersucht. Zu der Vermittlung von enger räumlicher Nähe, sind α 5 β 1-Rezeptoren an der Fibrillogenese von Fibronektin beteiligt (Wu et al. 1995).

Diese Tatsache könnte die Vermutung bestätigen, dass Fibronektinfibrillen sowohl die Fähigkeit von sekretierten TGF- β -Molekülen an diese Matrix zu binden, intensivieren (Fava et al. 1987) als auch zu einer höheren lokalen Konzentration von Wachstumsfaktor führt. Doch auch andere Wachstumsfaktoren können an der Ätiologie der Knochenmarksfibrose in der MMM beteiligt sein. Epidermal Growth Factor (EGF), welches auch in den α -granula der Thrombozyten vorhanden ist, könnte insofern wichtig sein, da es mit PDGF und TGF- β bei der Stimulation der Fibroblastenproliferation im Knochenmark kooperiert (Kimura A. et al. 1988). Nichtsdestotrotz, ist keine Änderung in seiner Ausschüttung in MMM Patienten beobachtet worden; ähnliche intrazelluläre Thrombozytenwerte sind auch in gesunden Leichen und Patienten in der bisher einzigen EGF Studie nachgewiesen worden (Martyré 1991).

Neben den bereits erwähnten Wachstumsfaktoren, wurde kürzlich festgestellt, dass myeloische MK eine große Menge an Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) produzieren und sekretieren können und dass PDGF, EGF, bFGF und TGF- β die Expression von VEGF erhöhen können (Brogi et al. 1994; Tsai et al. 1995). VEGF ist ein multifunktionelles Zytokin, welches bei der Angiogenese mitwirkt und auch die Fibrose begünstigen kann. VEGF macht die mikrovaskulären Endothelzellen hyperpermeabel, indem es zulässt, dass sie ihre Plasmaproteine in den Extravasalraum ausschütten. Dies führt zu tiefgreifenden Veränderungen in der EZM und könnte zur Fibrose führen. Nach

der kürzlichen Entdeckung von erhöhten VEGF Plasmawerten in MMM (Novetsky et al. 1997) wird vermutet, dass VEGF an dem Ablauf der Krankheit teilhat.

Für Calmodulin, welches reichlich in Thrombozyten vorkommt, wurde in vitro nachgewiesen, dass extrazelluläres Calmodulin die Proliferation von normalen humanen Fibroblasten regulieren kann (Dalley et al. 1996). Im Gegensatz zu nichtfibrotischen MPN sind erhöhte Harnwerte von Calmodulin in MMM gefunden worden. Dieses Ergebnis könnte eine unangemessene Ausschüttung aus fehlerhaften MK/Thrombozyten widerspiegeln (Eastham et al. 1994; Dalley et al. 1996), welche in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren an der Fibroblastenproliferation und/oder Aktivierung bei der MMM teilnehmen könnten

Weiterführende Studien befassten sich mit der Rolle von Selektinen (CD62L, CD62P) und megakaryozytischen Glykoproteinen (CD41a, CD42b), die nachweislich MK-Fibroblasten Interaktionen im menschlichen Knochenmark verursachen, indem CD62L und CD62P die Anlagerung an Knochenmarksfibroblasten induzieren. CD41a und CD42b bringen ihre Wirkung auf das megakaryozytenabhängige Fibroblastenwachstum zur Geltung (Wickenhauser et al. 2000).

In vitro Studien zeigten auch, dass die von Megakaryozyten induzierte Fibroblastenproliferation mittels Costimulation durch IL-6/IL-3 verstärkt wird und abhängig ist von sekretorischen und die Adhäsion betreffenden Ereignissen. In Bezug auf die Entwicklung der Myelofibrose bei MPN sind diese Ergebnisse von besonderem Interesse, da verschiedene Progenitorzellen- die megakaryozytäre Linie mit eingeschlossen hypersensitiv gegenüber IL-3 und ein unangemessene Sekretion von IL-6 aus MK für diese Erkrankung beschrieben wird (Schmitz et al. 1999). Auch hämatopoetische Wachstumsfaktoren spielen bei der Pathogenese der Myelofibrose eine Rolle. Es wird spekuliert, dass bei der MMM M-CSF Makrophagen aktivieren könnte, Zytokine zu produzieren, die zusammen mit MK an der Fibrose und Myeloproliferation beteiligt sein könnten. Auch andere hämatopoetische Zytokine wie Erythropoetin, Stammzellfaktor und IL-6 (Wang et al. 1997) sind vermutlich auch an dem komplexen Netzwerk das zur Entstehung der MMM führt, beteiligt (Le Bousse-Kerdiles und Martyré 2000).

Zusammengefaßt ergibt sich hier ein komplexes Netzwerk, das zahlreiche autokrine und parakrine Feedbackmechanismen umfasst. Die Ergebnisse stützen die These, dass Wechselwirkungen zwischen MK und Fibroblasten ein durch Zytokine vermitteltes funktionelles Netzwerk miteinbeziehen, welches durch verschiedene Faktoren wie räumliche Nähe, Zytokinstimulation und geringe Konzentration an Mediatoren, vor allem PDGF und TGF- β existieren. In diesem komplexen System scheint auch rhIL-3 eine äußerst wichtige Rolle in der Förderung dieser verschiedenen Zwischen- und Wechselwirkungen zu spielen (Schmitz et al. 1995).

1.1.3 Tiermodelle

In den letzten Jahren sind signifikante Fortschritte im Hinblick auf die pathogenetischen Mechanismen, die zu der klonalen Myeloproliferation und der reaktiven Myelofibrose bei der MMM führen, gemacht worden.

Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden Mäusemodelle konstruiert, um den Mechanismen und der Pathogenese der Myelofibrose und Osteosklerose auf den Grund zu gehen. Als zusätzlicher Gewinn besteht bei Mäusemodellen die Möglichkeit, krankheitsspezifische Molekulardefekte zu entdecken, die zukunftssträchtig die Therapie der PMF auf genetischer Ebene verbessern könnten. Die Entwicklung der extramedullären Hämatopoiese und die Entwicklung der Myelofibrose, ausnahmslos mit Thrombozytose und Megakaryozyten-clustern assoziiert, wurde in mehreren Mäusemodellen, die im Rahmen von MPN durchgeführt wurden, beobachtet. Darin eingeschlossen: Mäuse mit TEL/PDGbetaR⁵ oder TEL/JAK² Fusions-Genen oder Mäusen, denen hämatopoetische Zellen transplantiert wurden, die FLT3-ITD (FLT3 internal tandem implications) enthalten, welches von primär menschlichen Leukämiezellen geklont wurde (Vannucchi et al. 2005).

Es gibt zwei spezifische Mäusemodelle, die mehrere Aspekte der PMF widerspiegeln. In diesen Mäusemodellen wurde in vivo entweder eine unangemessene Ausschüttung von Thrombopoietin (TPO), der physiologische Regulator der Hämatopoiese, verursacht (TPO^{high} Mäuse) oder die megakaryozytäre Zelllinie mittels der verminderten Ausschüttung von Transkriptionsfaktor GATA-1 (GATA-1^{low} Mäuse) unterdrückt.

GATA-1, ein Transkriptionsfaktor, gehört zu der letztlich entdeckten zinc finger Gruppe, die Transkriptionsfaktoren beinhaltet, welche eine prominente Rolle in der erythroiden und megakaryozytären Entwicklung spielen (Shivdasani et al. 1997; Ohneda 2002). Die Bildung von Megakaryozyten aus megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP) ist vollkommen von funktionierenden GATA-1- und dem obligaten Co-Faktor FOG-1-Komplexen („Friend of GATA-1“) abhängig. Dies wurde in Studien gezeigt, in denen überschneidende Phänotypen von verschiedenen Mäusemutanten entweder GATA-1 oder FOG-1 eingeschlossen (Tsang et al. 1998; Chang et al. 2002). GATA1 interveniert auch in den letzten Phasen der Megakaryozytendifferenzierung, wenngleich zu diesem Stadium die Effekte auch indirekt und möglicherweise durch nachgeschaltete Faktoren zustande kommen könnten wie z.B. durch NF-E2 (Shivdasani et al. 1995), dessen mRNA vermindert in GATA1-defekten Mäusen gefunden wurde (Vyas et al. 1999). Familiäre Defekte von GATA-1 resultieren in Thrombozytopenie mit reduzierten Thrombozytengranula und kleinen pathologischen Megakaryozyten im Knochenmark (Nichols et al. 2000; Freson et al. 2001), mit variablen Defekten der erythroiden Zellen assoziiert. Während Mäuse ohne GATA-1-Ausschüttung in utero an schwerer Anämie sterben, ist eine geringfügige Ausschüttung des Transkriptionsfaktors mit dem Überleben vereinbar (Pevny et al. 1991; Shivdasani et al. 1997). In Abwesenheit von GATA-1 akkumulieren Megakaryozyten im Knochenmark und entwickeln nukleäre und zytoplasmatische Dysplasien, meist findet keine Endomitose statt (Vyas et al. 1999). Diese GATA-1^{low} Mäuse entwickeln eine progressive Anämie, Myelofibrose und extramedulläre Hämatopoiese und weisen eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden Vorläuferzellen auf, wenn sie altern (Vannucchi A.M. 2002). Zusätzlich sind im Gegensatz zu gleichalten normalen Mäusen erhöhte Werte von TGF-β1, PDGF, VEGF und Osteokalzin in dem Knochenmark der GATA-1^{low} Mäuse zu finden (Vannucchi et al. 2002). Die mögliche Rolle von GATA-1 in hämatopoetischen Erkrankungen wird ausserdem durch folgende Beobachtung unterstützt: in erworbenen Mutationen in GATA-1 konnte eine vorübergehende myeloische Funktionsstörung bei Patienten mit Down-Syndrom beobachtet werden (Groet et al. 2003). Wiedem auch sei ist die Stellung der GATA-1-Ausschüttung bei Patienten mit MMM umstritten. Eine Studiengruppe berichtete von keiner nachweisbaren GATA-1-Ausschüttung in CD34⁺-Zellen,

die von Patienten mit Myelofibrose isoliert worden waren (Martyré et al. 2003). Im Gegensatz dazu berichtet eine andere Gruppe von erniedrigten GATA-1-Werten in Vorläuferzellen, die von Patienten mit MMM isoliert wurden (Vannucchi et al. 2003). Während die Wechselwirkungen zwischen TPO und GATA-1 im Augenblick noch nicht ganz entschlüsselt sind, schütten Megakaryozyten von GATA-1^{low} Mäusen verminderte Mengen von c-mpl aus. Die TPO-Ausschüttung wird nicht durch die Transkriptionsmenge kontrolliert, sondern durch die Beseitigung aus dem Kreislauf (Tefferi et al. 2003). C-mpl - sowohl auf Megakaryozyten als auch auf Thrombozyten - ist für die Beseitigung von TPO aus dem Kreislauf verantwortlich. Daher könnten die verminderten Werte der c-mpl-Ausschüttung möglicherweise auf die verminderte Ausschüttung von GATA-1 zurückzuführen sein und zum Teil die durchgehend hohen Werte von TPO in diesen Patienten und die damit verbundene Myelofibrose erklären (Dingli et al. 2004).

TPO, welches auch als MPI-Ligand oder megakaryocyte growth and development factor (MGDF) bekannt ist, ist der wichtigste physiologische humorale Regulator der Thrombozytenproduktion (Kaushansly 1995; De Sauvage et al. 1996). Ehemals für einen dominanten Wachstumsfaktor der megakaryozytären Zelllinie gehalten, spielt TPO eine wichtige Rolle für das Überleben und die Proliferation der Vorläuferzellen von verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien, inklusive primitiver Stammzellen (Alexander et al. 1996; Carver-Moore et al. 1996; Solar et al. 1998). Das Molekül wird hauptsächlich von der Leber und Niere produziert und die Clearance aus dem Plasma wird durch Rezeptoraufnahme, Internalisation und Abbau geregelt (Cohen-Solal et al. 1996; Fielder et al. 1996). Demzufolge nimmt TPO eine besondere Position unter anderen hämatopoietischen Zellen ein, da seine Produktion nicht via Transkription geregelt wird und TPO physiologisch dafür notwendig ist, die Megakaryozytose und Thrombozytose aufrechtzuerhalten-zusätzlich zur Aufrechterhaltung und Reifung von primitiven und verschiedenen anderen myeloischen Vorläuferzellen. Um die biologischen Effekte, die mit einer chronischen Exposition von TPO assoziiert sind, in vivo zu bewerten, sind verschiedene Methoden verwendet worden. Bei der einfachsten Herangehensweise wurde eine verkürzte Version des rekombinanten TPO-Moleküls mit einem Polyethylen Glycol Schwanz (PEG-r-MGDF) gekoppelt und

14 Tage lang täglich in erwachsene Mäuse injiziert. Alle Mäuse entwickelten eine Thrombozytose in Anwesenheit von großen Thrombozyten, Leukozytose, Anämie, Splenomegalie mit erhöhten Megakaryozytenwerten und eine extramedulläre Hämatopoiese. Bei der höchsten Dosis, die injiziert wurde, konnte eine herdförmige Ablagerung von Retikulinfasern im Knochenmark beobachtet werden, welche sich nach Beendigung der Injektionen rasch zurückbildete. Als alternativer Ansatz zu den täglichen Injektionen wurde TPO mit Hilfe von durch in der Replikation fehlerhafte Adenovirusvektoren in die Mäuse gebracht. Die Genexpression mit Hilfe von diesen Vektoren war nur vorübergehend, da sie durch extrachromosomale Ablagerung von genetischem Material und immunologische Clearance von infizierten Zellen, die Adenovirus-codierte Proteine ausschütteten, gebremst wurde. Rekombinante Adenovektoren, die ein humanes TPO-Gen kodieren, wurden in verschiedene Mäusestämme und auf verschiedene Art und Weise in Mäuse injiziert. Ohne Bezug auf die Art der Injektion, ob subkutan (Ohwada et al. 1996), intratracheal (Canizzo et al. 1997), intraperitoneal (Frey et al. 1998) oder intravenös (Abina et al. 1998) entwickelten immunkompetente Mäuse eine Thrombozytose mit einem Maximum an Tag 7, die bald von einer immunologischen Thrombozytopenie gefolgt wurde, welche auf die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen menschliches TPO-Protein und Kreuzreaktionen mit dem endogenen Mausprotein zurückzuführen war (Abina et al. 1998; Frey et al. 1998). Um immunologische Reaktionen zu vermeiden, wurden Studien durchgeführt mit Mäusen mit schwerwiegenden kombinierten Immundefekt (SCID) und mit nicht-adipösen diabetischen (NOD = non-obese-diabetic) – SCID Mäusen. SCID Mäuse entwickelten rasch eine Thrombozytose, Leukozytose und eine durch Megakaryozyten gekennzeichnete Hyperplasie der Milz und des Knochenmarks, die mit einer progressiven Myelofibrose und Osteosklerose assoziiert war (Abina et al. 1998; Frey et al. 1998). Trotz Thrombozytose und Hypermegakaryozytose, die sich auch in NOD-SCID Mäusen zeigte, entwickelten sich erstaunlicherweise keine fibrotischen und sklerotischen Veränderungen. Da NOD-SCID sich von SCID Mäusen durch defekte Zellen der monozytären Zelllinie unterscheiden, wurden die Ergebnisse so interpretiert, dass möglicherweise Monozyten eine Rolle in der Pathogenese der Myelofibrose spielen. Wiedem auch sei wurde diese Interpretation durch

keine andere Studie belegt, die zeigen konnte, dass sich tatsächlich eine Myelofibrose bei NON-SCID Mäusen entwickelt, die kontinuierlich hohen TPO-Werten ausgesetzt werden.

Retrovirale Vektoren, die ein Maus-TPO-Protein verschlüsseln, wurden benutzt, um eine dauerhafte Ausschüttung des Transgens zu erreichen. Knochenmarkszellen von Mäusen, die mit 5-Fluorouracil vorbehandelt worden waren, wurden in vitro mit dem defekten Replikationsvirion infiziert und in letal bestrahlte gen-identische Wirte injiziert, um ein hämatopoetisches System langfristig wiederherzustellen.

Es sind zwei Studien bekannt, die ähnliche, aber nicht identische Ergebnisse hatten. Yan et al. (Yan et al. 1995; Yan et al. 1996) berichteten von einer Erhöhung der Thrombozytenwerte, die einige Tage nach der Transplantation begann und etwa für einen Monat anhielt. Danach verminderten sich die Thrombozytenwerte wieder, blieben aber während dem 17 Monate langem follow-up über dem Normalwert. Dementsprechend waren die TPO-Werte im Plasma 3 Wochen stark erhöht, fielen danach aber ab. Die Mäuse zeigten eine milde Anämie, eine marked Leukozytose, die mit einem Anstieg von zirkulierenden Vorläuferzellen, Splenomegalie mit megakaryozytärer und granulozytärer Hyperplasie und extramedullärer Hämatopoese assoziiert war. Zehn Wochen nach der Transplantation war die Knochenmarkshöhle mit einem dichten Netzwerk von Retikulinfasern obliteriert und es hatte sich trabekulärer Knochen neu gebildet. Kein Tier starb während des follow-up.

Die zweite Gruppe (Villevall et al. 1997) beschrieb eine ernstere Erkrankung, da 100% der Mäuse innerhalb von neun Monaten an einer Erkrankung, die durch zwei verschiedene Phasen gekennzeichnet war, starben. Bald nach Transplantation und während der folgenden 2 Wochen konnte eine starke Zunahme der Thrombozyten und Leukozytenwerte beobachtet werden, wohingegen der Hämatokrit leicht erniedrigt war. Die absolute Anzahl der myeloischen Progenitorzellen war im Blut, Milz und Knochenmark erhöht. Die vergrößerte Milz und das Mark waren massiv durch reife Granulozyten und durch Megakaryozyten geprägt, die sich oft in großen Clustern versammelten. Acht bis zehn Wochen nach der Transplantation konnte eine drastische Verminderung der Thrombozytenwerte, der kernhaltigen Zellen und roten Blutkörperchen beobachtet werden, die insgesamt zu einer schweren Zytopenie

führte. Eine extramedulläre Hämatopoiese konnte in mehreren Organen nachgewiesen werden. Schwere Fibrose mit Kollagenablagerungen konnte in Milz und Knochenmark beobachtet werden, aber nicht in anderen Organen und die femorale Kavität wurde mit neuen Knochentrabekeln gefüllt. Bemerkenswerterweise starb eine kleine Anzahl von Mäusen an einem klinischen Bild einer leukämischen Transformation. Folglich konnte die typische Entwicklung der Funktionsstörung durch Villeval et al. beobachtet werden (Villeval et al. 1997), die klinische Merkmale nachahmte, welche auch in der Entwicklung der menschlichen idiopathischen Myelofibrose beobachtet werden kann. Der Unterschied bezüglich der Letalität zwischen den beiden Modellen ist vermutlich auf die extrem hohe ektopische TPO-Produktion zurückzuführen, die bei der Villeval-Studie erreicht (etwa 1000fach Erhöhung zum Normalwert) und die ganze Zeit durch aufrechterhalten wurde.

Schlußendlich wurden transgene Mäuse durch Klonen von humaner TPO-cDNA mit nachgeschaltetem Apolipoprotein E (ApoE)-Promotor und einer leberspezifischen Verstärkerregion, die eine Ausschüttung in der Leber bewirken sollte, gewonnen (Zhou et al. 1997). Zwei Reihen wurden gewonnen mit einer 1,3fachen TPO-Produktion in der einen Reihe und einer 30fachen in der anderen. Mit der letzteren wurden Studien durchgeführt, die zeigten, dass Mäuse für mehr als 500 Tage überlebten trotz fünffach erhöhter Steigerung der Thrombozytenwerte, einer zweifachen Vermehrung der Blutleukozyten und einer milden Anämie. Obwohl die Anzahl der Megakaryozyten in der Milz und im Knochenmark stark vermehrt waren, konnte zu keinem Zeitpunkt eine Myelofibrose beobachtet werden.

Insgesamt zeigen diese Studien, dass eine chronische Erhöhung der TPO-Werte zu einer signifikanten Stimulierung der Megakaryozytopoiese und Thrombozytopoiese führt, die in der Mehrzahl mit einer Myeloproliferation vergesellschaftet ist. In Studien mit durchgehend hoher TPO-Produktion wurde die hyperproliferative Phase von einem Knochenmarksversagen/defekt gefolgt, welche auf Myelofibrose und Osteosklerose zurückzuführen war. Ein direkter Effekt von TPO auf Zellen des Microenvironment ist unwahrscheinlich seitdem transgene Mäuse mit leber-gerichteter TPO-Ausschüttung keine Myelofibrose entwickelten, obwohl die TPO-Plasmawerte während der gesamten Lebensdauer 30fach erhöht waren. Zytologische und histologische Studien, die

mit Mäusen während der myelofibrotischen Phasen durchgeführt wurden, beschreiben übergroße Thrombozyten von dysplastischer Morphologie und atypischen Megakaryozyten mit pyknotischen Nuklei und verstärkter Emperipoiesis, welche nahe legt, dass eine exzessive TPO-Stimulation über längere Zeit störend auf den normalen Prozess der Megakaryozytenreifung wirken könnte (Yan et al. 1995; Villeval et al. 1997; Schmitt et al. 2000). Darüberhinaus wurden signifikante Erhöhungen von TGF- β 1 und PDGF im Plasma gefunden, die auf eine Koinkidenz zwischen einer unangemessenen Ausschüttung von Zytokinen durch Megakaryozyten und der Entwicklung der Myelofibrose hinweisen (Vannucchi et al. 2005; Le Bousse-Kerdiles et al. 2008). Solche Tiermodelle, bei denen einzelne Gene ausgeschaltet wurden (knockout-Experimente), legen nahe, dass TGF- β , welches von hämatopoietischen Zellen stammt, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Knochenmarksfibrose spielt. Dasselbe gilt für aus Knochenmarksstromazellen stammenden Osteoprotegerin in der Pathogenese der Osteosklerose.

Die Osteosklerose stellt die andere das Microenvironment betreffende Hauptveränderung des Knochenmarks dar, die sowohl bei den Mäusemodellen als auch bei der menschlichen Erkrankung auftritt. Der Knochenumbau kommt durch das Gleichgewicht der Aktivität zweier Zellen zustande: Osteoblasten und Osteoklasten (Ducy et al. 2000; Teitelbaum 2000). Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen, die durch verschiedene regulatorische Prozesse beeinflusst werden. Verschiedene Wachstumsfaktoren (TGF- β eingeschlossen) haben einen stimulatorischen oder inhibitorischen Effekt (Centrella et al. 1994; Alliston et al. 2001). Osteoklasten hingegen sind hämatopoietischer Abstammung. Sie stammen von monozytären Zellen und benötigen zur Proliferation macrophage-stimulating factor (M-CSF) und RANK-L (Receptor activator-Ligand of NF-KB). Osteoprotegerin ist ein Glykoprotein mit inhibitorischer Wirkung auf Osteoklasten. Rank wird an der Oberfläche von Osteoklasten Vorläuferzellen, der entsprechende Ligand RANKL an der Oberfläche von Präosteoklasten exprimiert. Durch Interaktion dieser beiden Moleküle wird die Osteoklastengese induziert, auch für die Fusion mehrkerniger Zellen und die folgende Aktivierung der Osteoklasten ist eine Bindung von RANKL an RANK erforderlich. OPG ist ein löslicher Rezeptor, der von verschiedenen Geweben gebildet wird. Als „decoy receptor“ blockiert OPG

die Interaktion zwischen RANK und RANKL und damit die Schritte der Rekrutierung und Proliferation und Aktivierung der Osteoklasten. Demzufolge sind OPG und RANK-L, die hauptsächlich von Osteoblasten und Stromazellen produziert werden mit TGF- β 1 als negative Regulatoren der Osteoklastengnese zu sehen, indem sie einerseits die OPG-Produktion stimulieren und die RANK-L Expression down-regulieren (Takai et al. 1998). Die entscheidende Rolle von dem OPG/RANK/RANK-L-Trio ist elegant an genetisch manipulierten Mäusen nachgewiesen worden. Transgene Mäuse, die OPG überexprimieren zeigen eine verminderte Osteoklastengnese und schwere Osteopetrose, nach Ausschalten des OPG kam es zu verstärkter Osteoklastengnese und Osteoporose (Hofbauer 1999). Dieselbe Strategie wurde benutzt um die Rolle von OPG in der osteogenetischen Antwort, die TPO^{high} Mäuse entwickeln, zu klären. Dieses Mal wurden OPG null-mouse-derived Stammzellen benutzt (Chagraoui et al. 2003). Da Mäuse mit ausgeschaltetem OPG überlebensfähig sind, wurden die vier möglichen Kombinationen von host/graft untersucht, die eine Unterscheidung zwischen den möglichen Rollen der hämatopoietischen (donor- Zellen) und Stroma- (host-Zellen) von OPG erlauben. Ohne Rücksicht auf die host/graft Kombination, entwickeln alle Tiere das erwartete myeloproliferative Syndrom mit schwerwiegender Myelofibrose, die mit einer erhöhten TGF- β 1 Plasmawerten einhergeht. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass das Stroma-OPG, welches durch das host Microenvironment produziert wird, eine Rolle bei der Pathogenese der Osteosklerose spielt. Darüberhinaus scheint der Mechanismus der unangemessenen OPG-Ausschüttung in diesem Mäusemodell nicht durch TGF- β 1-Überexprimierung induziert zu sein (Chagraoui et al. 2003). Tatsächlich zeigten retrospektive Studien von kombinierten TGF- β 1-Mäusen und TPO-überexprimierenden Mäusen keine Korrelation zwischen TGF β 1-Werten und OPG-Werten, obwohl bei Wildtyp-hosts, die mit TGF- β 1-null-donor Zellen transplantiert (engrafted) wurden, ein normaler TGF β 1-Wert beobachtet wurde, wurde der gleiche Umfang von OPG-Up-Regulierung von OPG-Plasmawerten bei Wildtyp-hosts, die mit Wildtyp-donor Zellen transplantiert (engrafted) wurden, ein erhöhter TGF- β 1-Wert im Plasma beobachtet. Es ist bemerkenswert, dass die Wildtyp-host, die mit TGF- β 1-null-donor-Zellen transplantiert

(engrafted) wurden, eine verspätete Osteosklerose im Gegensatz zur Kontrollgruppe entwickelten, was darauf hindeutet, dass ein weiterer Mechanismus neben der OPG-vermittelten Inhibierung der Osteoklastengnese notwendig ist, möglicherweise eine TGF- β 1-vermittelte Stimulation der Osteoblastenproliferation. Für die These der vermutlich erhöhten Proliferation von Osteoblasten, möglicherweise durch Wechselwirkungen zwischen Osteoblasten und mutierten Megakaryozyten vermittelt, konnte Unterstützung geliefert werden (Kacena et al. 2004).

Die Untersuchungen an Mäusen haben zusätzliche Erkenntnisse im (Vyas et al. 1999) Hinblick auf bestimmte Zytokine gebracht, die an der Pathogenese der Stromareaktion bei der MMM beteiligt sind (Yanagida et al. 1997; Chagraoui et al. 2002).

Die zwei oben beschriebenen aktuell fundierten Studienmodelle bezüglich experimenteller Myelofibrose in Mäusen sind zusammenfassend folgendermaßen konstruiert: TPO^{high} und GATA-1^{low} Mäuse. Erstere sind durch die systemische Mehrausschüttung von Thrombopoietin charakterisiert (Yan et al. 1995; Yan et al. 1996; Villeval et al. 1997; Yanagida et al. 1997) und letztere durch die reduzierte Ausschüttung von dem die megakaryozytäre Zelllinie begrenzenden Transkriptionsfaktor GATA-1 (Vannucchi et al. 2002). Als gemeinsame Merkmale treten in beiden Studien folgende Ergebnisse auf: die Kumulation von Megakaryozyten im Gewebe, welche in TPO^{high} Mäusen durch TPO-gesteuerte Proliferation zustande kommt und die beeinträchtigte Megakaryozyten-Reifung in GATA-1^{low} Mäusen (Vyas et al. 1999). Darüber hinaus findet sich eine beträchtliche Heterogenität unter verschiedenen Mäusemodellen im Hinblick auf sowohl Phänotyp als auch den Krankheitsverlauf (Yan et al. 1995; Villeval et al. 1997; Zhou et al. 1997; Frey et al. 1998; Vannucchi et al. 2002; Kakumitsu et al. 2005).

In immungeschwächten Mäusen entwickelt sich Myelofibrose und Osteosklerose nur bei Mäusen mit schwerwiegenden kombinierten immungeschwächten (T- und B-Zelldefekt) Modellen mit der zusätzlichen Eigenschaft ein hohes Maß an TPO-Ausschüttung zu haben, im Gegensatz zu folgenden Modellen, in welchen keine Myelofibrose zu finden ist: dem nackten (T-Zelldefekt) Modell unter Beibehaltung von Monozyten-Makrophagen-Funktionen und den Mäusen, die nicht adipös, diabetisch sind und einen

schwerwiegenden kombinierten Immundefekt (T- und B-Zelldefekt sowie multiple andere angeborene Defekte- NK und Monozyten-Makrophagen-Funktion eingeschlossen) besitzen (Albina et al. 1998; Frey et al. 1998).

Darüber hinaus wurde in TPO^{high} Mäusen gezeigt, dass experimentelle Myelofibrose reversibel ist- entweder durch Transplantation (Yan et al. 1996) oder durch die Beendigung der systemischen Regulierung von TPO (Ulich et al. 1996).

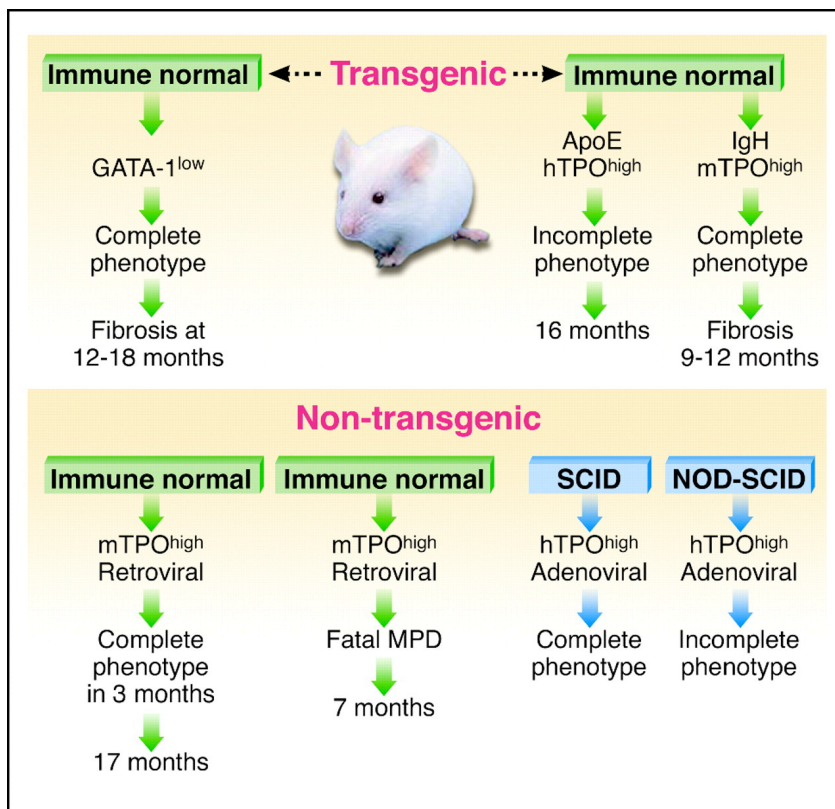


Abbildung 1: Mäusemodelle der Myelofibrose. Transgenetische GATA-1^{low} oder IgH/mTPO^{high} entwickeln einen kompletten MMM-Phänotyp mit verspätetem Beginn der Myelofibrose und Osteosklerose. Im Gegensatz dazu entwickeln transgenetische ApoE/hTPO^{high} Mäuse einen inkompletten Phänotyp: megakaryozytäre Hyperplasie ohne Myelofibrose. Ähnlich sieht man sowohl kompletten und inkompletten Phänotyp in nicht-transgenetischen Mäusemodellen, bei denen Knochenmarksstammzellen retroviral verändert wurden, um übermässig Thrombopoietin zu produzieren. SCID: severe combined immunodeficient disease; NOD-SCID: nonobese diabetic severe combined immunodeficient disease (Tefferi et al. 2005).

Es wurde zum ersten Mal auf die entscheidende Rolle hinsichtlich der Myelofibrose von TGF-beta aus Megakaryozyten hingewiesen, als man in-vitro beobachtete, dass die Zugabe von neutralisierenden TGF- β Antikörpern die stimulatorischen Effekte auf die Kollagensynthese von Knochenmarksfibroblasten (auf Megakaryoblasten abhängigen Medien) bei einem Patienten mit Akuter Megakaryozytärer Leukämie (Terui et al. 1990) hemmte. Interessanterweise wurde dieses spezielle Zytokin auch mit der Haarzelleukämie-assoziierten Retikulin- und Kollagenfibrose in Zusammenhang gebracht (Shehata et al. 2004).

Mit diesen Beobachtungen übereinstimmend blieb bei aus TGF- β 1 Null-Murin-hämatopoetischen Stammzellen, die retroviral mit Murin-TPO infiziert wurden, die Entstehung einer Myelofibrose aus, wenn sie in letale bestrahlte Wildtypmäuse transplantiert wurde, wengleich die Mäuse komplett alle anderen Komponenten vom Phänotyp entwickelten (Chagraoui et al. 2002). Ähnlich schlägt auch die osteosklerotische Komponente von experimenteller Myelofibrose in TPO^{high} Mäusen fehl, wenn das von den Stromazellen herstammende Osteoprotegerin-gen ausser Gefecht gesetzt wird (Chagraoui et al. 2003). In gleicher Weise geht der altersabhängige Anstieg von Osteoprotegerin einher mit der Entwicklung von Osteosklerose in einer der oben genannten TPO-Modelle (Kakumitsu et al. 2005). TGF- β scheint in dem Modell von GATA-1^{low} Mäusen ähnlich wichtig zu sein (Vannucchi et al. 2002; Vannucchi et al. 2003). In diesem Fall verbesserte TPO die assoziierte Thrombozytopenie und stabilisierte auch die Knochenmarksfibrose, indem es die TGF- β -Expression verringerte (Vannucchi et al. 2004).

Neben den Mäusemodellen ist bezüglich der PMF auch eine Studie einer Katze und drei Hunden bekannt, die nachweislich an einer PMF erkrankt waren (Breuer et al. 1999).

Es schien so, dass Mechanismen und genetische Veränderungen, die Myelofibrose und Osteosklerose in Mäusemodellen induzieren, ein Aufschluss über molekulare Ursachen der menschlichen Erkrankung geben könnte. Nichtsdestotrotz konnte eine umfassende Suche nach Funktionsstörungen in der TPO-Regulierung und/oder dem c-mpl Signalübertragungsweg in 14 Patienten mit PMF nicht gefunden werden (Taksin et al. 1999). Ähnlich wurde

keine bedeutsame Veränderung in der Struktur oder Ausschüttung von GATA-1 bei Patienten mit PMF gefunden (Martyré et al. 2003), was wiederum einen wichtigen Unterschied zwischen der Erkrankungsform von Mäusen und der Erkrankungsform bei Menschen darstellt. Andererseits konnte beobachtet werden, dass etwa 30 % der Megakaryozyten in Knochenmarkbiopsien von Patienten mit PMF nicht mit anti-GATA-1-Antikörpern besetzt werden konnten, was darauf hinweist, dass GATA-1-Defekte möglicherweise auf einen immer noch unbekanntem posttranslationalen Defekt zurückzuführen sein könnte, welcher an der Pathogenese der Erkrankung mitwirkt (Vannucchi et al. 2005). Schlussendlich scheint die erhöhte Anzahl an polymorphkernigen Leukozyten, die Emperipolesis innerhalb des megakaryozytären Zytoplasmas begehen und sowohl bei den Mäusemodellen als auch bei der menschlichen Myelofibrose auftreten, da die Emperipolesis im Knochenmark von Patienten mit IMF genau untersucht wurde und mit der Menge an Retikulinablagerung übereinstimmte (Schmitt et al. 2000). Gleichzeitig ist die Struktur der Verteilung von immungekennzeichneten P-Selektin in Megakaryozyten bei Mäusen und Menschen ähnlich: nicht nur die α -Granula, sondern auch die im Zytoplasma verstreuten kleinen Vakuolen und einige Membranen, die ein Demarkationssystem bilden, wurden bei beiden gefunden (Schmitt et al. 2000). Demzufolge haben die Mäusemodelle und die menschliche Erkrankung den Mechanismus der Zytokinausschüttung aus Megakaryozyten gemeinsam, der zu einer Aktivierung von Fibroblasten und einer Ablagerung von Matrixkomponenten führt (Vannucchi et al. 2005).

Da sich aber bei allen Tiermodellen die experimentelle Myelofibrose nicht in klonaler Myeloproliferation wiederholt, welches für die menschliche MMM fundamental ist, fokussierten weiterführende Studien auf menschliche Knochenmarksfibroblasten.

Auch Veränderungen in der Genstruktur oder Genexpression: TPO, c-MPL, GATA1 oder FOG-1 (Transkriptionsregulatorgen von GATA1) konnte nicht in menschlicher MMM nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz liefert die Möglichkeit der Tierversuche eine Erleichterung der in vivo getestete Medikamente und kann zur Identifizierung von entscheidenden Molekülen verhelfen, die einen therapeutischen Ansatz in Zukunft darstellen könnten (Tefferi et al. 2005).

Demnach verbleiben für die Zukunft offene Fragen. Die experimentellen Modelle, die sich mit der Pathogenese der Myelofibrose und Osteosklerose bei Mäusen entweder durch hohe TPO-Ausschüttung oder durch GATA-1^{low} Mutation beschäftigt haben, haben die These bekräftigt, dass Megakaryozyten definitiv an der Entwicklung der Myelofibrose beteiligt sind und die entscheidende Rolle von TGF- β als zugrundeliegenden Prozess der Retikulinfaser- und Kollagenfaserablagerung bestärkt. Das gleich gilt für OPG im Hinblick auf die Osteosklerose. Es verbleiben laut Vannucchi (Vannucchi et al. 2005) u.a. folgende Fragen, die in Zukunft gestellt werden sollten:

1.) Welche Rolle haben Megakaryozyten und Monozyten im Hinblick auf die Osteosklerose?
2.) Sind die GATA-1-nachgeschalteten Gene möglicherweise an der Entstehung der Myelofibrose beteiligt?
3.) Welches sind die akzessorischen Gene/Produkte/Zellen, die verantwortlich für die zeitlich unterschiedliche Entstehung der Myelofibrose bei den Mäusemodelle verantwortlich sind?
4.) Welches sind die entscheidenden Signalwege, die an der Aktivierung von TGF- β in hämatopoietischen Geweben beteiligt sind?
5.) Welches sind die Prozesse und Moleküle, die Ziel einer Verhinderung der Emperipoiesis sein könnten?
6.) Schlussendlich unter einer Vielzahl von Fragen, die immer wieder neu entstehen- welches sind die Mechanismen, die zu einer Steigerung der OPG-Produktion in vivo führen?

Es könnte sein, dass bei einer Kombination von gesteigerter TPO-Ausschüttung und GATA-1^{low} Mäusen mit Mutantenmäusen, die genetisch in dem gerade von Interesse scheinenden Gen (Thrombospondin-1, integrin alpha v beta 6, interleukin-13, P-selektin) (Subramanian et al. 1996; Crawford et al. 1998; Munger et al. 1999; Lee et al. 2001) modifiziert wurden, die möglichen zellulären Kreuzreaktionen, die an den pathologischen Stroma- und Knochenmarksreaktionen beteiligt sind, aufklärbar sein werden. Darüber hinaus bietet die unterschiedlich schnelle Krankheitsentwicklung bei beiden Mäusemodellen eine einzigartige Möglichkeit, die Effekte von externer Intervention (Splenektomie, konventionelle und neue Medikamente, Transplantationstherapien) zu

untersuchen, welche als Ziel haben, die Myelofibrose aufzuhalten oder sogar wieder rückläufig zu machen. Obwohl die molekularen Defekte, die für die Pathogenese der Myelofibrose verantwortlich sind, sich bei Menschen von den tierexperimentellen Untersuchungen zu unterscheiden scheinen, sollen weitere Studien im Hinblick auf erhöhte TPO-Ausschüttung und GATA-1^{low} Mäusen wichtige Einblicke in den Verlauf der Erkrankung bringen, mit möglichen klinischen und therapeutischen Lösungen (Vannucchi et al. 2005).

1.2 Bedeutung der Fibroosteosklerose

Die Fibro-osteosklerose war und ist von Bedeutung bei der Stadieneinteilung der PMF nach der WHO-Klassifikation in ein präfibrotisches Stadium und ein fibrotisches Stadium. Im präfibrotischen/initialen/frühen Stadium ist nur eine fehlende oder nur minimale retikuläre Fibrose anzutreffen (Lutz 2003). Dieses initial hyperzelluläre Stadium der PMF wurde früher rein deskriptiv auch als chronisch-megakaryozytäre-granulozytäre Myelose (CMGM) bezeichnet und als primäre Läsion (Entität) angesprochen (Georgii et al. 1990). Es weist gegenüber dem Normalbefund keine wesentlich erhöhte Dichte an retikulären Fasern auf. Bei etwa 20-30% der Patienten wird die Diagnose im präfibrotischen Stadium gestellt (Buhr et al. 1993; Thiele et al. 1999). Die WHO-Klassifikation der MPN von 2008 bezeichnete diese Veränderungen als präfibrotische Phase mit der grundsätzlichen Maßgabe, das klinische Krankheitsbild in seinem gesamten phasenartigen Verlauf (initiales präfibrotisches bis terminales fibroosteosklerotisches Stadium) zu umfassen.

Im fibrotischen Stadium kommt es zu einer retikulären und/oder kollagenen Fibrose. Weiterhin lässt sich eine endophytische Knochenneubildung (Osteosklerose) beobachten, die im Endstadium zu einer bizarren Einengung der Markräume und einer damit verbunden zunehmenden Verödung der Blutbildung mit gleichzeitiger Vermehrung der Fettzellen führt (Burkhardt et al. 1984; Frisch et al. 1984; Georgii et al. 1984a; Georgii et al. 1984b; Burkhardt et al. 1986). Bei den meisten Patienten (70-80%) wird die Erkrankung erstmals in diesem Stadium diagnostiziert. Liegt schon eine Fibrosierung des Knochenmarkes vor, wird die Diagnose der PMF um einiges schwieriger, da

eine Reihe von Differentialdiagnosen, die ebenfalls zu einer Verfaserung des Knochenmarks führen können, ausgeschlossen werden müssen, um die klinische Diagnose der PMF endgültig stellen zu können. In erster Linie bedeutsam ist dabei die Abgrenzung von den anderen in den Formenkreis der MPN fallenden Erkrankungen: der PV, der ET und der CML. Auch muß an reaktive Formen im Rahmen entzündlicher Prozesse gedacht werden (Hunstein 1974). Andere maligne lymphoproliferative Erkrankungen wie der Morbus Hodgkin, aus der Reihe der Non-Hodgkin-Lymphome, die Akute Lymphoblastische Leukämie (Manoharan und Pitney 1979), die Haarzell-Leukämie und das Zentroblastisch-Zentrozytische und das Lymphoplasmozytoide Maligne Lymphom (Thiele et al. 1990) sowie das Plasmozytom (Burkhardt et al. 1982) müssen ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann eine Faservermehrung auch Stoffwechsel- und Knochenerkrankungen, einen ausgeprägten Vitamin-D-Mangel oder eine Knochenkarzinose einiger Neoplasien zur Ursache haben.

Nach dem Europäischen Konsensus des Myelofibrosegrades werden sogar vier Stadien bei der PMF unterschieden: ein präfibrotisches, frühfibrotisches, fibrotisches und ein sklerotisches Stadium (Thiele et al. 1989). Der Grad der Myelofibrose wird nach den Stadien MF-0 bis MF-3 eingeteilt.

Die histomorphologischen Veränderungen, insbesondere das Stadium der Erkrankung bzw. der Grad der Myelofibrose schienen bei der PMF nicht entscheidend für die Prognose zu sein, obwohl initiale (präfibrotische) Stadien der Erkrankung, die keine oder eine nur gering retikuläre Verfaserung aufweisen, in univariaten Analysen leichte Prognosevorteile zeigten (Ivanyi et al. 1994; Kvasnicka et al. 1999).

Einige Studien zeigten, dass das Fibrosierungsausmass des Knochenmarks keinen entscheidenden Einfluss auf das Überleben hat (Thiele et al 1989; Kvasnicka et al. 1997). Neuerdings kann nahegelegt werden, dass die Prognose der PMF vom Grad der Myelofibrose zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig ist, da eine frühe PMF mit einem Myelofibrosegrad 0 bis 1 eine wesentlich bessere Prognose hat als eine fortgeschrittene PMF mit einem Myelofibrosegrad 3 (Michiels et al. 2006). Wie auch immer konnte in multivariaten Datenanalysen kein signifikanter Einfluss der Fibroosteosklerose auf die Prognose nachgewiesen werden (Kvasnicka et al. 1999; Thiele und

Kvasnicka 2003). Die Prognose wird in allen Krankheitsstadien mehr durch ungünstige Parameter wie fortgeschrittenes Alter und Anämie, Leukozyten- und Thrombozytenwerte bestimmt (Tefferi et al. 2000), als durch den Grad der Myelofibrose (Michiels et al. 2006).

1.2.1. Klinische Befunde (Myeloische Metaplasie)

Die PMF ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,3-1,5 pro 100.000 pro Jahr, die hauptsächlich bei Patienten jenseits der siebten Lebensdekade auftritt (Ahmed und Chang 2006). Männer und Frauen sind gleich oft betroffen. Etwa 20% aller Erkrankten sind zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 55 Jahre und es wurden auch einige Krankheitsfälle im Kindesalter beobachtet (Tefferi et al. 2000). Untersuchungen zufolge tritt die Krankheit bei Individuen der kaukasischen Rasse häufiger auf. Auch exogene Einflüsse wie radioaktive Strahlung lassen die Inzidenz ansteigen.

Die Abgrenzung der PMF von anderen MPN ist besonders im frühen Stadium nicht einfach. Zur sicheren Diagnose ist deshalb die Gewinnung einer Knochenmarkbiopsie Voraussetzung. Nach den WHO-Kriterien von 2001 werden folgende klinische Kriterien herangezogen, um die Diagnose „PMF“ zu sichern:

Fibrotisches Stadium:

Milz und Leber: mäßiggradige oder ausgeprägte Spleno- oder Hepatomegalie

Hämatologie: mäßiggradige bis ausgeprägte Anämie, Anzahl der weißen Blutkörperchen erhöht, niedrig oder normal; Thrombozytenzahl verringert, normal oder erhöht (Thiele und Kvasnicka 2001).

Es gibt kein biologisches, klinisches oder pathologisches Kriterium, welches absolut charakteristisch für die PMF ist (Barosi 1999). Im frühen Stadium der Erkrankung können klinische Auffälligkeiten fehlen oder nur schwach ausgeprägt sein. Rund ein Drittel der Patienten mit PMF ist zum Zeitpunkt der Diagnose beschwerdefrei (Tefferi et al. 1995; Barosi 1999; Ahmed und Chang 2006). Insgesamt sind die Symptome im frühen Krankheitsstadium häufig uncharakteristisch. Die Patienten klagen z.B. über Symptome, die der hyperkatabolen Stoffwechsellage zuzuschreiben sind. Darunter fallen: Fieber,

Gewichtsverlust und Nachtschweiß. Den peripheren Blutveränderungen kann man folgende Symptome zuordnen: Müdigkeit und Dyspnoe (Anämie, Blutung); Petechien (Thrombozythämie/anormaler Thrombozytenfunktion). Seltener sind Thrombosen oder Blutungen zu beobachten; gelegentlich treten bereits früh Oberbauchbeschwerden auf (Tefferi et al. 1995; Thiele et al. 1996; Barosi 1999; Tefferi et al. 2000; Thiele et al. 2001; Ahmed und Chang 2006).

Die Anämie tritt als häufigste Zytopenie bei der PMF auf und wird durch verschiedene Faktoren verursacht, einschließlich (1) ineffektive Hämatopoese; (2) verminderte Knochenmarkreserve als direkte Folge der Kollagenfibrose und Osteosklerose; (3) Sequestration in der Milz; (4) Myelosuppression durch zytoreduktive Therapie; (5) Hämolyse; (6) Blutung aus dem Gastrointestinaltrakt, inklusive Varizenblutung und gelegentlich (7) koexistenter Mangel an Eisen, Vitamin B12 oder Folsäure (Mesa RA 2006). Bei der Blutuntersuchung werden in 50-70% eine zumindest geringgradige Anämie und leicht bis mäßig erhöhte Leukozyten- und Thrombozytenzahlen gefunden (Thiele et al. 1996; Thiele et al. 2001). In 20 % der Fälle ist die Anämie bereits initial stärker ausgeprägt mit Hämoglobinwerten unter 8 g/dl (Tefferi et al. 2000). Die Ursachen der Anämie bei der PMF sind wie erwähnt vielseitig. Wichtigste Ursache ist die ineffektive Hämatopoese mit begleitender Hypoplasie der Erythropoese (Tefferi et al. 1995; Barosi 1999; Tefferi et al. 2000). Vor allem im fortgeschrittenen Krankheitsstadium wird die Anämie durch die Knochenmarkfibrosierung und den Hypersplenismus verstärkt (Reilly et al. 1997; Tefferi et al. 2000). Am häufigsten tritt bei der PMF eine normozytäre Anämie auf; seltener sind mikro- oder makrozytäre Anämieformen (Tefferi et al. 1995; Reilly et al. 1997).

Bei einigen Patienten werden erhöhte Hämoglobinspiegel gefunden, was den Verdacht auf das Vorliegen einer PV lenken könnte. Ebenso zeigen PMF-Patienten gelegentlich sehr hohe Thrombozytenzahlen, so dass auch eine ET differentialdiagnostisch in Frage käme (Thiele et al. 1996; Thiele et al. 2000). Eine Leukozytose mit begleitender Basophilie im peripheren Blut hingegen könnte den Verdacht auf das Vorliegen einer CML lenken.

Die Milz ist im frühen Stadium der Erkrankung fast immer leicht vergrößert (Thiele et al. 2001). Es zeigen insgesamt 85-100% der Patienten bei Diagnose eine Splenomegalie (Kvasnicka et al. 1997; Ozen et al. 1997; Barosi 1999). In

ca. 10 % ist die Vergrößerung der Milz bereits massiv. Wiederholte Kontrollen klinischer und laborchemischer Parameter sowie die histologische Begutachtung von Sequenzbiopsien erleichtern die Diagnosestellung (Georgii und Kreft 1998; Thiele und Kvasnicka 2001).

Im Verlauf der Erkrankung bestimmen Komplikationen der zunehmenden Hepato- und vor allem der Splenomegalie das klinische Bild. Bei fortgeschrittener PMF kann die Milz ein Gewicht von mehreren Kilogramm erlangen und bei der körperlichen Untersuchung als großer, derber Milztumor bei bis zu 90 % der Patienten palpirt werden und auch bis in das kleine Becken reichen („Riesenmilz“). Eine wichtige Ursache ist die Absiedlung von Hämatopoese-Inseln in der roten Pulpa der Milz; möglicherweise tragen auch Zytokine zum Wachstum des Organs bei (Barosi 1999; Mesa et al. 2000). Die Patienten berichten über Völlegefühl, Appetitlosigkeit und Schmerzen im Oberbauch; Milzinfarkte mit begleitender Perisplenitis treten bei Organvergrößerung gehäuft auf. In diesem Fall leiden die Patienten unter starken Schmerzen im linken Oberbauch mit Ausstrahlung in die linke Schulter begleitet von Übelkeit und Fieber (Tefferi et al. 2000).

Infolge der Splenomegalie ist der Blutfluss durch die Milz erhöht. Daraus entsteht gehäuft eine portale Hypertension, die durch intrahepatische Obstruktionen im Rahmen von thrombotischen Prozessen in kleineren Portalvenenästen noch verstärkt werden kann (Tefferi et al. 2000; Mesa et al. 2000). Folglich können sich bei PMF-Patienten die mit einer portalen Hypertension verbundenen Komplikationen entwickeln, wie z.B. portokavale Anastomosen/ manchmal Ösophagus- und Magenfundusvarizen.

Die Milz ist zwar besonders in den Krankheitsprozess miteinbezogen, jedoch kann eine myeloische Metaplasie in fast allen Organen des Körpers mit Ausnahme des Thymus auftreten. Größere Mengen hämatopoetischer Zellen wurden in Lunge und Pleura (Bartlett et al. 1995; Ueno et al. 2000), in Lymphknoten, Gastrointestinaltrakt, ZNS und anderen serösen Häuten gefunden (Garcia-Riego et al. 1998; Elliott et al. 2002). Als Folge der Organmanifestationen können diverse klinische Befunde erhoben werden wie Lymphadenopathien, Aszites und Pleuraergüsse, Nervenausfälle und zentralnervöse Ausfallerscheinungen (Tefferi et al. 1995; Tefferi et al. 2000). Auch in der Haut können sich blutbildende Zellen bei der PMF absiedeln; dies

ist allerdings sehr selten (Jufresa et al. 1996). Es wird vermutet, dass die myeloische Metaplasie, vor allem der Milz, einen Kompensationsmechanismus für die zunehmende Insuffizienz des Knochenmarks darstellt. Eine eindeutige Korrelation zwischen Splenomegalie und Grad der Knochenmarkfibrose konnte jedoch nicht hergestellt werden (Hasselbach und Lisse 1991; Thiele et al. 1996).

Das Fehlen einer Milzvergrößerung darf jedoch keinesfalls als Ausschlusskriterium für eine PMF verstanden werden, da diese lediglich als Resultat der extramedullären Hämatopoese (EMH) zu deuten ist (Falk et al. 1990; Thiele et al. 1993). Die EMH kann neben der Milz mit Ausnahme des Thymus in jedem Organ des Körpers beobachtet werden (Ward et al. 1971; Varki et al. 1983; Haedersdahl et al. 1985; Thiele et al. 1992 b). Aus der Literatur ist eine Vielzahl von Fallbeschreibungen über extramedulläre Hämatopoese der verschiedenen Organsysteme bekannt (Landolfi et al. 1988; Fedeli et al. 1990).

Meist treten erst im fortgeschrittenen PMF-Stadium Symptome der Knochenmarkinsuffizienz auf wie Infektionen, Blutungsneigung und transfusionsbedürftiger Anämie (Anger et al. 1990; Thiele et al. 2000; Mesa und Tefferi 2001). Blutungen sind bei ca. 25 % der Patienten zu beobachten und entstehen als Folge der Thrombopenie, sind aber auch Zeichen einer Plättchendysfunktion, einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), eines Faktor-V-Mangels oder eines portalen Hochdrucks im Rahmen der Grunderkrankung (Tefferi et al. 1995). Die Thrombopenie kann ihrerseits durch eine okkulte disseminierte intravasale Gerinnung verstärkt werden.

Als dritte Säule entstehen bei der PMF Symptome als Folge des Hyperkatabolismus. Die Hyperurikämie bedingt die Manifestation einer Gicht oder das Auftreten von Nierenkoliken infolge einer Nephrolithiasis. Viele Patienten haben als metabolisch induzierte Krankheitserscheinungen Fieber, Juckreiz, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Müdigkeit oder leiden unter Anorexie (Tefferi et al. 1995; Thiele et al. 1996; Steensma et al. 2002).

Eine durch die Krankheit bedingte Thrombozytose begünstigt das Auftreten von thromboembolischen Ereignissen. Diese finden besonders in den Gefäßsystemen von Leber und Milz sowie im Mesenterialgefäßsystem statt. Im

Rahmen der PMF tritt das Budd-Chiari-Syndrom gehäuft auf (Anger et al. 1989).

Zwischen 5 und 30 % der Todesfälle bei der PMF sind Folge eines terminalen Blastenschubes (Thiele et al. 1996; Barosi 1999). Es kann zur Ausschwemmung von Blasten der granulozytären, der myelomonozytären oder auch der megakaryozytären Reihe kommen. Faktoren, die einen Blastenschub wahrscheinlicher machen, sind eine starke Anämie sowie das Auftreten von unreifen Zellen im peripheren Blut (Barosi 1999). Bislang konnte noch kein klarer Nachweis erbracht werden, dass zytotoxische Medikamente einen Blastenexzess begünstigen. Eine zur palliativen Therapie durchgeführte Splenektomie begünstigt hingegen das Auftreten dieser schweren Komplikation (Barosi et al. 1998; Barosi 1999; Tefferi et al. 2000; Mesa et al. 2000).

Röntgenologisch finden sich in den Anfangsstadien keine auffallenden Veränderungen. Erst mit der Entwicklung einer stärkeren Markfibrosierung kommt es in 50 % der Fälle zu ausgedehnten, teils fleckigen Sklerosierungen, vor allem im Achsenskelett. Auch isolierte osteoporotische Veränderungen werden beobachtet. Mit Hilfe der Knochenmarksszintigraphie und der Magnetresonanz-Tomographie können das Fortschreiten der Fibrosierung und der Blutbildung in die peripheren Skelettareale sowie auch EMH-Herde im Weichgewebe dokumentiert werden. Die Veränderungen in der Zusammensetzung des Knochenmarks können im Rahmen einer Knochenmarksaspiration als *Punctio sicca* imponieren (Pettigrew und Ward 1969; Ward et al. 1971).

Zahlreiche Untersuchungen haben bestätigt, dass die Prognose der PMF ungünstig ist. Die meisten Patienten versterben an Infektionen oder Blutungen als Folge der Knochenmarkinsuffizienz oder erleiden einen terminalen Blastenschub (Thiele et al. 1996; Barosi 1999; Tefferi et al. 2000; Elliott et al. 2002). Die Überlebenszeiten sind sehr variabel und liegen im Durchschnitt bei 2 bis 5 Jahren nach Diagnosestellung (Kvasnicka et al. 1997; Reilly et al. 1997; Barosi 1999; Thiele et al. 1999; Tefferi et al. 2000; Kvasnicka et al. 2000; Cervantes et al. 2001; Mesa et al. 2001). Jüngere Patienten haben eine bessere Prognose als ältere (Kvasnicka et al. 1997; Cervantes et al. 1998; Tefferi et al. 2000; Kvasnicka et al. 2000; Thiele et al. 2002). Der Grad der Markfibrose ist für die Verlaufsbeurteilung der Erkrankung von geringerem

Stellenwert als die klinischen Parameter (Thiele et al. 1996; Kvasnicka et al. 1997; Ozen et al. 1997).

1.2.2. Histologische Befunde

Bei Patienten mit PMF unterliegen auf Grund der Dynamik des Krankheitsbildes die hämatologisch-klinischen Befunde sowie die damit verknüpfte Knochenmarkhistologie und -morphologie einer breiten Variabilität (Georgii et al. 1998; Buhr et al. 2002). Eine allgemein gültige Beschreibung der Knochenmarkhistologie ist schwierig, weil in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Stadien des Krankheitsverlaufes, die Ausprägung bestimmter morphologischer Phänomene sehr wechselhaft ist (Thiele et al. 2001).

Initiale pathognomische Veränderungen des Knochenmarks betreffen zunächst die Zelldichte. Hierbei kommt es zu einer Proliferation der drei hämatopoetischen Zellreihen bei einer gleichzeitigen Verringerung des Fettzellanteils. Differenziert betrachtet imponiert bei der Granulo- und Erythropoese lediglich eine mäßige Steigerung, während es durch eine atypische Megakaryopoese zu einer erheblichen Zunahme der Megakaryozytenpopulation und –zelldichte kommt (Thiele et al. 1994; Georgii et al. 1996).

Die WHO-Klassifikation von 2001 grenzte ein initiales bzw. frühes präfibrotisches Stadium mit einer deutlichen Hyperzellularität von manifesten und fortgeschrittenen myelofibrotischen Phasen ab.

Gemäss WHO 2008 zählen zu den PMF-typischen histologischen Knochenmarksveränderungen: Megakaryozytenproliferation und Atypien, die von einer retikulären und/oder kollagenen Knochenmarksfibrose begleitet werden oder bei Abwesenheit von einer retikulären Fibrose, werden die Veränderungen der Megakaryozyten von einer Hyperzellularität, granulozytärer Proliferation und oft verminderter Erythropoese (i.e. präfibrotisches Stadium) begleitet (Tefferi et al. 2008).

Die einzelnen Stadien sind nicht nur durch eine mäßiggradige Vermehrung und Linksverschiebung der neutrophilen Granulopoese, sondern auch durch histotopographische Anomalien (häufige Nesterbildungen, Verschiebung zu den

endostalen Bildungszonen der Granulopoese) der megakaryozytären Zellreihe gekennzeichnet.

Insbesondere sind in diesem Zusammenhang die in diagnostischer Hinsicht wichtigen zytologischen Atypien der MK zu erwähnen, die sich einmal durch Anhäufungen kleiner und riesengroßer Formen auszeichnen und zudem oft chromatindichte, hypolobulierte Kerne (sog. „Wolkenkerne“) aufweisen sowie schließlich eine deutliche Verschiebung der Kern-Zytoplasma-Relation zeigen.

Dagegen reift die Erythropoese eher verzögert aus und weist vermehrte Vorläuferzellen (frühe Erythroblasten) auf. Die morphologisch fassbare enge Beziehung von atypischer Megakaryopoese und Faservermehrung sowie terminaler Osteosklerose im Verlaufe der Erkrankung lässt sich besonders gut an Sequenzbiopsien dokumentieren (Thiele et al. 2001).

Genauer betrachtet fehlt im Frühstadium häufig die der PMF den Namen gebende Myelofibrose. Die Faserdichte ist nicht signifikant verändert, lediglich die Retikulinfasern können etwas vermehrt vorhanden sein (Barosi 1999; Thiele et al. 2001; Buhr et al. 2003). Die auffälligste Veränderung in diesem Krankheitsstadium ist die signifikant erhöhte Zahl der MK im KM. Die Knochenmarkmorphologie wird folglich als „präfibrotisch-hyperzellulär“ bezeichnet (Michiels et al. 1999; Thiele et al. 1999; Mesa et al. 2000; Thiele et al. 2001). Rund 20% der Erkrankten zeigen bei Erstdiagnose diese Knochenmarkmorphologie ohne nennenswerte Fibrose (Thiele et al. 1999).

Durch das expansive Wachstum der hämatopoetischen Zellen wird das Fettgewebe verdrängt (Thiele et al. 1999). Im Vergleich hierzu würde man bei gesunden Patienten mit fortschreitendem Lebensalter eine leichte Zunahme des Fettanteils erwarten (Thiele et al. 1999; Thiele und Kvasnicka 2001).

Die neutrophile Granulopoese ist durch eine mäßige Vermehrung und Linksverschiebung gekennzeichnet (Thiele et al. 2001). Die Nester der Erythropoese sind bei der PMF seltener zu finden als im normalen KM. Diese Zelllinie weist ebenfalls eine Linksverschiebung auf, wobei die Ausreifung eher verzögert ist. In meist kleinen Zellnestern liegen viele Erythroblasten und frühe Normoblasten eng zusammen (Thiele et al. 1999; Thiele et al. 2000; Thiele and Kvasnicka 2001).

Die Zahl der Makrophagen im KM ist signifikant erhöht (Thiele et al. 1999), aber sie weisen noch keine Atypien auf. Man vermutet, dass es als Folge des

veränderten Zytokinmusters (PDGF; TGF-beta; IL-1) zu einer Aktivierung der Makrophagen kommt. Daraus resultiert eine gesteigerte Phagozytose von Zelltrümmern, die als Folge der neoplastischen Proliferation vermehrt anfallen (Thiele et al. 1992; Thiele et al. 1999). Im präfibrotischen Stadium zeigt die Knochenmarkbiopsie eine erhöhte Anzahl von unreifen Stammzellen, die das Oberflächenantigen CD34 tragen. Die Vermehrung dieser Zellpopulation ist jedoch keinesfalls für die PMF spezifisch, sondern kommt auch bei anderen hämatoonkologischen Erkrankungen wie der CML vor (Thiele et al. 2002).

Besonders auffällig und in diagnostischer Hinsicht wichtig sind die Veränderungen der Megakaryopoese. Abweichend von ihrer normalen Lage in zentralen Regionen des Knochenmarks häufen sich die atypischen MK unter Verdrängung der Granulopoese sinusnah in peritrabekulären Zellnestern, so dass es zu einer beginnenden aberranten histotopographischen Verteilung der Megakaryopoese kommt (Thiele et al. 2001). Die MK zeigen im PMF-KM eine erhöhte Dichte und typischerweise Störungen in der Ausreifung (Michiels et al. 1997; Thiele et al. 2000). Neben den sehr großen Zellen mit hypolobulierten, chromatindichten Zellkernen („Wolkenkerne“) erscheinen auch Mikromegakaryozyten und pyknotische Formen (Michiels et al. 1999; Tefferi et al. 2000; Thiele et al. 2000; Thiele et al. 2001). Diese Atypien vereinfachen die Abgrenzung der frühen PMF von anderen MPN anhand der Knochenmarkbiopsie. Hier ist vor allem die ET zu nennen, bei der solche Ausreifungsstörungen der Megakaryopoese fehlen (Barosi 1999; Thiele et al. 1999; Thiele et al. 2000; Thiele und Kvasnicka 2001). Die Konfiguration der spongiösen Knochen trabekel sowie die Osteoklastenzahl verhalten sich noch unauffällig (Thiele et al. 1977; Georgii et al. 1980).

Das KM bei weiter fortgeschrittener Erkrankung imponiert durch Fibrosierung und auch Knochenneubildung, große Gefäßkonvolute und Verarmung an blutbildenden Zellen. Auch hier ist die Entwicklung all dieser Veränderungen sehr variabel und individuell verschieden.

Untersuchungen zufolge entwickeln ca. 70 % der Patienten drei bis vier Jahre nach der Diagnosestellung eine Myelofibrose (Buhr et al. 2003). Es ist davon auszugehen, dass diese Fibrose irreversibel ist (Thiele et al. 1999; Thiele et al. 1999); jedoch werden in der Literatur auch vereinzelt Fälle einer Rückbildung

der Verfaserung unter Chemotherapie (Hasselbach und Lisse 1991) oder nach einer Knochenmarktransplantation beschrieben (Smith und Moliterno 2001).

Der veränderte Zytokinspiegel des KM bedingt eine Aktivierung von Stromazellen, z.B. von Fibroblasten, Osteoblasten (Le Bousse-Kerdiles und Martyré 1999; Tefferi et al. 2000), aber auch von Endothelzellen (Tefferi 1995; Reilly et al. 1997; Barosi 1999; Thiele et al. 1999; Mesa et al. 2000). Durch die Fibroblastenproliferation wird vermehrt extrazelluläre Matrix synthetisiert. Im Krankheitsverlauf werden neben Kollagen der Typen I,III,V, VI, Hyaluronsäure, Fibronectin, Vitronectin, Tenascin auch die Basalmembranbestandteile Kollagen IV und Laminin gebildet (Reilly et al. 1997; Barosi 1999). Zu Beginn der Knochenmark-Matrix-Veränderungen ist nur eine diskrete Vermehrung von Retikulinfasern nachzuweisen; später nimmt der Gehalt an Kollagen allerdings stark zu (Buhr et al. 2003). Diese Herde mit feiner Verfaserung liegen in enger räumlicher Beziehung zu den Haufen der atypischen MK (Thiele et al. 1999; Thiele und Kvasnicka 2001).

Als Zeichen des osteosklerotischen Knochenmarkumbaus kommt es im Verlauf der Erkrankung zur zunehmenden Einengung und Deformation der Markräume. Ursache dieses Prozesses ist das endophytische Wachstum von primitivem Geflechtknochen. So entstehen zum Teil bizarr geformte unterschiedlich breite Trabekel (Thiele et al. 1999; Thiele et al. 2001; Buhr et al. 2003). TGF- β stimuliert Knochenvorläuferzellen, die nicht von den hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen. Die Zellen wandeln sich in osteoblastenähnliche Zellen um und sind zur Bildung von Knochenmatrix befähigt. Sie setzen Kollagen I, Osteonektin und Osteokalzin frei. In diese so geschaffene Matrix wird Kalzium eingelagert (Long et al. 1995).

Die exzessiv gesteigerte Freisetzung von Zytokinen (vor allem VEGF, bFGF und TGF- β) führt zur Neubildung von Gefäßen im KM. Das Resultat sind bizarr geformte große Sinusoide, die von einer dicken Wand aus Kollagen IV umgeben sind (Thiele et al. 1992; Buhr et al. 2003). Megakaryozytencluster liegen im Bereich um die Sinusoide; nach Durchdringung der Gefäßwand sind sie aber auch innerhalb der Sinusoide zu finden (Thiele et al. 1996; Tefferi 2000; Thiele et al. 2002; Buhr et al. 2003). In den weiten Lumina befinden sich ebenfalls neoplastische hämatopoetische Vorläuferzellen der anderen Zellreihen, jedoch weniger zahlreich (Georgii et al. 1990; Thiele et al. 1996;

Thiele et al. 1999). Im hyperzellulären Krankheitsstadium enthält das KM wenige Fettzellen. Deren Anteil nimmt jedoch im Stadium der ausgeprägten Markfibrose bzw. der Osteosklerose wieder zu. Im Endstadium der Erkrankung zeigt das KM zusätzlich eine Verarmung an hämatopoetischen Zellen (Thiele et al. 1999). Die übriggebliebenen hämatopoetischen Zellreihen begrenzen sich dann zunehmend auf fleckförmig angeordnete Zellnester (Ward et al. 1971; Thiele et al. 1989). Untersuchungen zufolge kann die Reduktion der Zellularität zwischen 20 und 70 % in Vergleich zu altersentsprechenden Normalbefunden betragen (Thiele et al. 1996). Die Auswertung von Sequenzbiopsien hat verdeutlicht, dass sich bei Patienten im fibroosteosklerotischen Stadium auch die Zahl der CD34-positiven Stammzellen im Vergleich zum präfibrotischen PMF-Stadium signifikant verringert (Thiele et al. 2002).

Die variable Ausprägung der Neoossifikation reicht von wenig ausgeprägtem trabekulärem Knochenumbau mit geringer Geflechtknochenbildung bis hin zu einem ausgebrannten Terminalstadium, wobei das Knochenmark zur Neospongiosa umgebaut worden ist. Der Markraum präsentiert sich nunmehr von Fettgewebe und Fasern vollständig verödet (Frisch und Bartl 1985; Thiele et al. 1989; Thiele et al. 1991).

1.3 Therapeutische Ansätze zur Reduzierung der Fibro-Osteosklerose

Die pathogenetischen Mechanismen, die ursächlich für die klonale Myeloproliferation und die reaktive Knochenmarksfibrose, welche für die MMM charakteristisch sind, sind noch wenig verstanden. Neuere pathophysiologische Erkenntnisse konnten noch nicht in effektive therapeutische Möglichkeiten für Patienten umgesetzt werden. Es gibt keine Standardtherapie und bis auf die allogene Stammzelltransplantation, die den einzigen kurativen Therapieansatz darstellt, sind noch keine Therapieformen bekannt, die das Krankheitsbild der MMM signifikant verbessern. Demzufolge sind die aktuellen Therapieansätze als palliativ anzusehen und zielen darauf krankheitsassoziierte Symptome der Krankheit zu lindern und die erhöhten hämatologischen Parameter zu therapieren. Konventionelle Therapien für die Anämie schließen Androgene und Kortikosteroide ein. Zytoreduktive Medikamente wie Hydroxyurea sind bei symptomatischer Organomegalie und zur Verminderung der Leukozytose und Thrombozytose indiziert. Bei der Splenomegalie kann auch eine chirurgische

Intervention in Betracht gezogen werden. Viele neue medikamentöse Ansätze sind in der Vergangenheit untersucht worden, antiangiogenetische Medikamente und Signaltransduktionsinhibitoren sollen die Angiogenese und die fibrogenen Zytokine und deren Folgen inhibieren (Odenike et al. 2005).

Es gibt verschiedene medikamentöse Behandlungsansätze, die zu einer Reduzierung der Fibro-Osteosklerose führen sollen.

Hydroxyurea:

Hydroxyurea (HU) ist ein Zytostatikum, das die gesteigerte Myeloproliferation supprimiert. Unter diesem Zytostatikum wurden ein Rückgang von KM- und Milzfibrose (Manoharan und Pitney 1984; Lovgenberg et al. 1990) und ein Absinken der Prokollagen-III-Spiegel im Serum (Hasselbach et al. 1990) gefunden.

Diese früheren Berichte, daß HU einen Rückgang der Myelofibrose durch Unterdrückung der Megakaryopoiese und der damit verbundenen Zytokinausschüttung verursachen können, haben sich in größeren Studien und klinischer Praxis nicht bestätigt (Odenike et al. 2005).

Interferon- α :

Interferon- α ist eine myelosuppressive Substanz, die nicht aus der Gruppe der Zytostatika wie HU und Melphalan stammt. Es supprimiert die MK-proliferation und inhibiert die Synthese von Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β , die unter anderem auch für die zunehmende Myelofibrose verantwortlich gemacht werden. Auch nach einjähriger Behandlungszeit kann keine signifikante Verbesserung der intramedullären Retikulinfaserzahl beobachtet werden (Mesa 2002). Einige Autoren beschreiben keinen Effekt oder sogar eine Zunahme der Myelofibrose sowie eine Persistenz oder Zunahme der Splenomegalie bei einer beträchtlichen Anzahl von Patienten nach Interferon-Therapie (Sacchi 1995; Gilbert 1998; Michiels et al. 1999; Tefferi et al. 2001). Bei anderen Autoren wiederum, lassen sich keine signifikanten Verbesserungen in einem fortgeschrittenen Stadium der PMF nachweisen, jedoch ein vielversprechender Effekt in frühen Stadien der Erkrankung (Bachleitner-Hofman und Gisslinger 1999). Klinische Beobachtungen und Knochenmarksbefunde zeigen unter

IFN- α bei vielen Patienten sogar eine weitere Zunahme der Knochenmarkfibrose (Kvasnicka et al. 2003).

Für Interferon- α ist in vitro und in vivo nachgewiesen worden, dass es fibrogenetische Zytokine, i.e. TGF- β und PDGF inhibiert (Craig et al. 1991). Obwohl einige Autoren von einem Rückgang der Myelofibrose berichten, haben die meisten prospektiven Studien keinen klaren klinischen Benefit aufgezeigt.

Interferon γ :

Interferon- γ ist hinsichtlich der Inhibition von PDGF und TGF- β in vitro und in vivo untersucht worden. Leider waren auch hier klinische Studien enttäuschend und die Therapie wurde zusätzlich kompliziert durch Myelosuppression und Sepsis kompliziert.

Interferon wurde auch mit Wachstumsfaktoren kombiniert angewendet- in kleinen Studien (an sieben Patienten) ist IFN mit Epo und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mit günstigen Auswirkungen durchgeführt worden: bei zwei Patienten konnte ein Rückgang der Myelofibrose beobachtet werden, bei fünf Patienten verbesserte sich die Anämie und bei vier Patienten wurde eine signifikante Verkleinerung der Milzgröße beobachtet (Bourantas et al. 1994). Diese Ergebnisse müssen noch in größeren klinischen Studien bestätigt werden (Odenike et al. 2005).

Anagrelide

Bei Anagreliden handelt es sich um ein Imidazol-Quinazolin Präparat, das die zyklische Adenosin- Monophosphat-Phosphodiesterase inhibiert. Bezüglich der MMM wurde es auf seine Wirkung auf die Megakaryopoiese und der damit verbundenen Zytokinausschüttung untersucht. Nach Untersuchung an einem kleinen Patientenkollektiv gibt es keinen Beweis dafür, dass es die Fibroosteosklerose des KM verbessert (Yoon et al. 1999).

Thalidomid:

Ursprünglich als Sedativum entwickelt, ist Thalidomid ein Medikament mit einem Spektrum mehrerer Eigenschaften, die aber z. T. noch nicht ausreichend analysiert sind. Bei Thalidomid handelt es sich gegenwärtig um einen sehr effektiven innovativen Therapieansatz zur Behandlung der PMF (Barosi et al. 2001; Tefferi et al. 2003). Es inhibiert die Produktion von TNF- α (Moreira et al. 1993), IL-6 und IL-12 (Moller et al. 1997). Als weitere Eigenschaft wird die spezifische Hemmung der Fibroblastenproliferation angenommen. Zudem soll es VEGF und weitere Interleukine sowie Interferone beeinflussen und bestimmte Zelloberflächenantigene down regulieren (McCarthy 2004). Es zeigte sich, dass die Therapie mit Thalidomid in Standarddosierungen mit einer Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen vergesellschaftet ist, die eine prolongierte Therapie verhindern. Jedoch wurde eine unter Therapie mit Thalidomid eine Verminderung der Anämie und Thrombozytopenie sowie der Hepatosplenomegalie beobachtet, so dass eine low-dose Therapie in Erwägung gezogen werden kann (Barosi et al. 2001). Der Grad der Myelofibrose und Osteosklerose scheinen sich unter Thalidomid nicht zu verändern- die Veränderungen des VEGF und bFGF unterliegen breiten Schwankungen und lassen keine eindeutige Schlussfolgerung zu (Strupp et al. 2004).

Imatinib:

Imatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor. Entwickelt wurde Imatinib ursprünglich als Inhibitor der PDGF-Rezeptor-Kinase. Da aber auch fibrosefördernde Faktoren wie das Bcr-abl, das ARG und c-kit sowie deren Oberflächenstrukturen assoziiert sind, werden sie ebenfalls durch Imatinib gehemmt. Die Fibrose des KM schreitet unter Therapie mit Imatinib nicht fort, in wenigen Fällen kommt es sogar zu einer Reduktion des Fasergehaltes (Hasselbach et al. 2003).

Pirfenidone:

Pirfenidone (5-Methyl-1-Phenyl-2-(1H)-Pyridone) wurde in der MMM bezüglich seiner antifibrotischen Eigenschaften untersucht und seiner Fähigkeit Zytokine wie PDGF, TNF- α , und TGF- β zu inhibieren, die an der Pathogenese der Myelofibrose beteiligt sind. Die Ergebnisse von Phase-II-Studien waren enttäuschend, da nur einer von 28 Patienten einen klinisch signifikanten Benefit im Hinblick auf die Anämie und Splenomegalie hatte (Mesa et al. 2001).

Etanercept:

Etanercept ein TNF-alpha-Inhibitor wird in erster Linie bei rheumatologischen Erkrankungen eingesetzt. TNF-alpha stimuliert die Fibroblastenproliferation. Beim Therapieversuch mit Etanercept konnte trotz der Hemmung des fibrogenetisch wirkenden TNF- α keine Verminderung der intramedullären Fibrose beobachtet werden (Steensma et al. 2002).

KM- und Stammzelltransplantation bei der PMF:

Die KM- und allogene Stammzelltransplantation (ASZT) stellt bei der PMF den einzigen kurativen Therapieansatz dar, die jedoch mit einer Transplantations-assoziierten Mortalität von bis zu 50 % belastet ist (Barosi et al. 2005; Barosi et al. 2006).

Jedoch ist die allogene Stammzelltransplantation (ASZT) nur für ein bestimmtes Patientenkollektiv anwendbar. Im Allgemeinen ist sie nicht für Patienten geeignet, deren Lebenserwartung zehn Jahre übersteigt (low-risk disease) oder für solche, die sechzig und älter sind. Es ist sinnvoll eine myeloablative ASZT für jüngere Patienten (Alter < 50 Jahre) in Betracht zu ziehen, die eine Lebenserwartung von unter fünf Jahren besitzen (high-risk disease) (Mesa et al. 2006) oder nicht auf eine medikamentöse Therapie ansprechen. Eine ASZT, vorzugsweise mit dosisreduzierter Konditionierung ist mit einer niedrigeren Mortalität verbunden und behält dabei kuratives Potential und kann auch bei 45-70jährigen Patienten angewandt werden, die an einer high- oder intermediate-risk Erkrankung leiden (Cervantes et al. 2007). Aktuell wird die ASZT für Patienten mit intermediate und high-risk-disease angewendet. Die Grenzen der Transplantation werden ständig überschritten durch Strategien, die versuchen,

die Toxizität der Behandlung zu vermindern, die antimikrobielle Prophylaxe zu verbessern und die graft-versus-host-Reaktion zu vermindern (Kröger und Mesa 2008). Die Erfolgsrate der ASZT ist vom Stadium der Erkrankung abhängig. Bei Patienten mit Myelofibrose ist sie in 50-80% erfolgreich, wenn sie im fibrotischen Stadium durchgeführt wird. Die Erfolgsrate sinkt bereits auf 25-40% falls das Transplantat nach leukämischer Transformation zum Einsatz kommt (Scott und Deeg 2006). Die autologe SZT kann nur als palliative Therapie in Erwägung gezogen werden.

Neue Therapieansätze:

Experimentelle Therapieversuche mit Substanzen, die direkt die Fibroblastenproliferation angreifen, wie z.B. Colchicin, D-Penicillamin und anti-TGF-beta haben noch keinen klinischen Erfolg erkennen lassen (Kaminsky 2005).

Die Fibroblastenproliferation ist nachweislich das Resultat einer unangemessenen Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF-beta, EGF, ECGF, bFGF und Calmodulin, die in den alpha-Granula der MK gespeichert werden. Eine Hemmung der Ausschüttung oder der Wirkung dieser Faktoren stellt einen weiteren Therapieansatz dar.

Auch Therapieansätze mit Vitamin D Analoga waren bisher recht erfolglos. In vitro Versuche haben Grund zu der Annahme gegeben, dass diese Substanzen für die Kontrolle und Reduktion der Myelofibrose geeignet seien. Vitamin D3 soll die Fibrose des KMs verbessern (Arlet et al. 1984; Richard et al. 1986), da es die abnorme Differenzierung der MK reguliert. Dadurch wird eine exzessive Sekretion von PDGF verhindert, das als einer der fibrosefördernden Faktoren gilt. In der Praxis haben sich diese Hoffnungen aber noch nicht bestätigt.

Mit einer Therapie, die aus mega-dose Methylprednisolon (mPSL) gefolgt von aktiviertem Vitamin D3 bestand, konnten jedoch Erfolge erzielt werden (Matsukawa 2000). Die Blutparameter normalisierten sich bei den Patienten 41 Monate nach der Behandlung, die Knochenmarkhistologie bereits nach 10 Monaten. Mit diesem Therapiekonzept konnte in einigen Fällen eine andauernde Remission erreicht werden.

Unter Ayalew Tefferi wurden zahlreiche Medikamente über einen Zeitraum von zwölf Jahren getestet. Einige zielten auf die Reduzierung der MK-Masse

(Interferon α -2a, Cladribine), indem sie in die MK-Differenzierung eingriffen durch MK-Neutrophilen-Interaktion (Anagrelide), durch Hemmung der TGF- β -vermittelten Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese (Suramin, Pirfenidone), durch Hemmung der PDGF-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase-Aktivität (Imatinib, Mesylate) und durch Eingreifen in die Angiogenese und TNF- α -Produktion (Thalidomide, Etanercept). Unglücklicherweise konnte keines dieser Medikamente einen positiven Einfluß auf die KM-veränderungen bewirken, obwohl ein klinischer Benefit unter Cladribine, Thalidomid und Etanercept beobachtet wurde. Ein aktueller Therapieansatz versucht die Effekte von TGF- β zu vermindern. Ein solcher Kandidat ist connective tissue growth factor und menschliche klonale Antikörper gegen diese sind bereits in klinischen Studien bei anderen fibrotischen Erkrankungen getestet worden. Eine klinische Studie lässt erahnen, dass manche Moleküle entweder den TGF- β -Rezeptor oder die Postrezeptor Signal Intermediate, die Smad Proteine angreifen. Zusammenfassend wird voraussichtlich eine Kombination von verschiedenen Molekülen benötigt werden um die komplexe Stromareaktion der MMM zu kontrollieren. In dieser Hinsicht könnte das letztlich entdeckte CMPE-assoziierte JAK2V617F ein molekulares Ziel für die Entwicklung eines erfolgversprechenden Medikamentes darstellen (Tefferi et al. 2005).

1.4 Fragestellung der Arbeit

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird die PMF symptomorientiert und überwiegend palliativ behandelt (Barosi et al. 1999; Tefferi 2000; Mesa 2002). Patienten mit PMF ohne Symptome müssen nicht behandelt, sollten aber regelmäßig untersucht werden (Reilly et al. 1997). Zur Verfügung stehen Bluttransfusionen, Androgene, Chemotherapie, chirurgische Interventionen und Bestrahlungstherapie. Außerdem wurde gezeigt, dass ein ausgewähltes Patientenkollektiv von einer allogenen Stammzelltransplantation, der einzige kurative Ansatz, profitiert (Morel et al. 1997; Cervantes et al. 1998; Barosi 1999; Mesa et al. 2000; Cervantes et al. 2001; Hasselbach 2001; Mesa et al. 2001). Dies geschieht nach einer Hochdosischemotherapie mit dem Ziel der Ablation des malignen hämatopoetischen Zellklons (Guardiola et al. 1999; Devine et al. 2002). Die Stammzelltransplantation wird überwiegend bei jüngeren Patienten eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass sich bei Patienten bis zum 55. Lebensjahr dadurch die Überlebenszeit verlängert (Morel et al. 1997; Barosi 1999).

Die Zeit bis zum erfolgreichen Engraftment ist wesentlich kürzer bei Patienten nach Splenektomie und ohne Osteosklerose. Das Überleben nach Transplantation ist signifikant schlechter bei anämischen Patienten mit Osteosklerose (Lutz 2003).

Im Hinblick auf die Myelofibrose gibt es keine Medikamente, die dieses charakteristische Merkmal signifikant verbessern. Es gibt einige Studien zum Verhalten der Myelofibrose nach allogener Stammzelltransplantation aber nur wenige Studien, die sich mit dem osteosklerotischen Knochenumbau bei der PMF befassen. Wie sich dieser Parameter nach einer allogenen Stammzelltransplantation verhält, ist daher noch weitgehend unklar. Aus diesem Grunde ergeben sich folgende Fragestellungen:

- a) Kommt es zu einer Reduzierung des Endophytischen Knochenanteils nach Stammzelltransplantation?
- b) Wie sieht das Verhalten der Osteoklasten aus?

2. Material und Methode

2.1. Übersicht über das Patientengut

Im Rahmen dieser Studie wurden retrospektiv Knochenmarkbiopsien von insgesamt 20 Patienten (17 Männern und 3 Frauen), die entsprechend den WHO-Kriterien an einer PMF erkrankt waren, immunhistochemisch untersucht. Die Beckenkammbiopsien und die klinischen Daten stammen von Patienten aus verschiedenen Kliniken: dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln (Direktor: Prof. Dr. H. P. Dienes), aus den Kliniken für Knochenmarktransplantation in Essen (kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D.W. Beelen) bzw. dem Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. med. D. Schmidt) : (8) Patienten und dem Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Zander) (12 Patienten), die im Rahmen einer europäischen Referenzbeurteilung zugesandt wurden (Kröger et al. 2005).

Dabei wurden von Patienten jeweils vor und auch zu mehreren Zeitpunkten nach der allogenen Stammzelltransplantation Knochenmarkbiopsien entnommen. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über insgesamt bis zu vier Jahren. Zur Vervollständigung der Datensätze wurden bei den Patienten zusätzlich relevante klinische und hämatologische Befunde erhoben. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der ersten Biopsieentnahme betrug 46,8 Jahre.

Es mussten bestimmte Kriterien für die Aufnahme der Patienten in das Untersuchungskollektiv erfüllt sein:

Die Patienten hatten zuvor eine Therapie erfahren.

In der Anamnese konnte eine andere verwandte myeloproliferative Erkrankung ausgeschlossen werden.

Zu Beginn des Beobachtungszeitraumes und als Sequenzbiopsien während der weiteren Krankheitsentwicklung lagen repräsentative Knochenmarkbiopsien vor.

Die Dauer von dem Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zur Stammzelltransplantation lag im Mittel bei 2 Monaten (minimal 0 Monate, maximal 121 Monate). In Tabelle 1 sind die Zeitpunkte der entnommenen Biopsien in Bezug zu der durchgeführten Stammzelltransplantation dargestellt.

Von jedem Patienten untersuchten wir jeweils eine Biopsie, die im Mittel 20 Tage vor der Stammzelltransplantation entnommen worden war. Der minimale Zeitraum betrug 5 Tage, der maximale lag bei 52 Tagen vor der Transplantation. Die erste nach der Stammzelltransplantation gewonnene Sequenzbiopsie wurde in einer Zeitspanne von 20 bis 84 Tagen mit einem Mittelwert von 35 Tagen posttransplantationem entnommen. Von 12 Patienten konnten wir eine zweite, die im Mittel 144 Tage nach der Stammzelltransplantation (das Minimum betrug 105 Tage, das Maximum 184 Tage) entnommen wurde, analysieren. Von 9 Patienten konnten wir eine letzte Sequenzbiopsie untersuchen. Diese wurde dabei im Durchschnitt 524 Tage (mit einem Minimum von 213 und einem Maximum von 1435 Tagen) nach der Transplantation entnommen.

Tabelle 1: Biopsiezeitpunkte in Tagen in Beziehung zum Tag der Knochenmarkstransplantation.

Biopsiezeitpunkt	Biopsie vor ASZT	1.Biopsie nach ASZT	2.Biopsie nach ASZT	Letzte Biopsie nach ASZT
Mittelwert	20± 17 Tage	35 ±17 Tage	144 ±29 Tage	524 ±365 Tage
Minimum	-5 Tage	20 Tage	105 Tage	213 Tage
Maximum	-52 Tage	84 Tage	184 Tage	1435 Tage

2.2. Entnahme und Bearbeitung der Knochenmarksbiopsien

Bei Notwendigkeit einer Knochenmarkbiopsie, punktiert man bevorzugt die Spina iliaca posterior superior des Os ileum. Die Trepanate werden bevorzugt nach der von Jamshidi und Swaim (Jamshidi et al. 1971) beschriebenen Methode gewonnen. Dazu wird das Knochenmark mit einer scharfgeschliffenen Hohlstanze (Knochenmarkpunktionsnadel) entnommen. Ohne eingeblutete oder komprimierte Areale zu berücksichtigen, müssen die nach diesem Verfahren entnommenen Stanzzyylinder mindestens eine Ausdehnung von 2 mm x 17 mm aufweisen. Eine weitere Methode zu der Gewinnung von Knochenmark ist die

Drillbohrung nach Burkhardt (Burkhardt 1966). Obwohl hierbei weniger technisch bedingte Artefakte auftreten und die Biopsiequalität ebenfalls gut ist, hat sich diese Entnahmetechnik nicht durchsetzen können.

Um zellzerstörende und autolytische Prozesse nach der Entnahme des KM gering zu halten, müssen die Präparate so schnell wie möglich nach der Entnahme in geeigneten Konservierungslösungen fixiert werden. Verwendet man nur eine hochprozentige Formalinfixierung, führt dies zu Schrumpfungsprozessen und Verzerrungen der Knochenmarkarchitektur. Bei der histopathologischen Beurteilung werden diese Veränderungen als sehr störend empfunden. Die Schaefer'sche Fixationslösung (Schaefer 1984) schont die Gewebsstruktur und hat sich deshalb als optimales Fixationsmedium für Beckenkammbiopsien bewährt. Dieses Fixativum besteht aus:

20 ml 25%iger Glutardialdehydlösung, 30 ml 37%iger Formaldehydlösung und 15,8 g wasserfreiem Kalziumacetat, aufgefüllt mit 1000 ml Aqua dest..

Ein vermehrter Einbau von gelösten Kalziumionen in Membranstrukturen der Zellen, der vor allem durch Glutardialdehyd bewirkt wird, führt zu einer Versteifung und damit zu einer verbesserten feinstrukturhaltenden Qualität der Präparate. Artefakte durch Schrumpfungsprozesse und Verzerrungen werden so vermieden. Damit auch das Zentrum der Stanze völlig durchfixiert wird, sollte die Behandlungszeit nicht kürzer als 24-48 Stunden sein.

Die Beckenkammbiopsien enthalten in den harten Kompakta- und Spongiosaanteilen Kalzium. Zur Dekalzifizierung, die für eine gute Schneidfähigkeit notwendig ist, verwendet man folgende Mixtur mit einem pH-Wert von 7,0 bis 7,2: 100g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 33g Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (THAM), aufgefüllt auf 1000ml Aqua bidest.. Auf einem Schüttelgerät werden die Präparate bei Zimmertemperatur drei bis fünf Tage mit dieser Lösung behandelt. Die Hydrolyse von basophilen Gewebekomponenten lässt Artefakte entstehen, die im Extremfall Gewebnekrosen vortäuschen können; diese Hydrolyse mit ihren Folgen wird durch neutralisiertes EDTA vermieden. Erst durch den Entkalkungsvorgang erreichen die Präparate die gewünschte Schnittfähigkeit, da diese Behandlung eine homogene Konsistenzangleichung von Paraffinblock- und Biopsiematerial bewirkt (Schaefer 1984).

Um gleichmäßig dünne Schnitte herzustellen, muss das Biopsiematerial in eine homogene Masse eingebracht werden. Dies wird durch Eingießen des Biopsiematerials in ein wasserunlösliches Medium, das aus gesättigtem C22 bis C28 Kohlenstoffketten besteht, erreicht. Die hydrophoben Eigenschaften des Paraffins ermöglichen es, dem Gewebe Wasser mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln, die eine hohe Affinität zu Wasser besitzen, zu entziehen. Für die Dehydrierung der Beckenkammbiopsien verwendet man steigende Konzentrationen von Äthylalkohol in den Stufen von 50% über 70% sowie 96% bis zu 100%. Dieser Vorgang sollte bei einer Temperatur von etwa 39°C stattfinden und dauert ca. 3 Stunden. Daran schließt sich ein fünfzigminütiger Waschvorgang in einem Xylol enthaltenden Intermedium an, durch den die notwendige Angleichung zwischen dem hydrophilen Alkohol und dem hydrophoben Paraffin erzielt wird. In wiederholten Paraffinbädern, die mit 59°C knapp über dem Schmelzpunkt des Paraffins liegen, können die so behandelten Präparate eine Stunde lang paraffinisiert und anschließend in Einbettkassetten eingegossen werden.

Eingespannt in einem Grundschlittenmikrotom (Leica RM 2145) Leitz GmbH, Wetzlar, BRD), werden von den Paraffinblöcken Schnitte einer Schichtdicke von 3 bis 5 µm angefertigt, bei 36-39°C für 12-18 Stunden in einem Inkubator gelagert und anschließend auf spezielle Adhäsivobjektträger (Super Frost Plus, Menzel Gläser, Braunschweig, BRD) aufgezogen. Diese besondere Form der beschichteten Objektträger gewährleistet eine intensive Haftung der Schnittpräparate und ermöglicht eine längere Behandlung, besonders im Verlauf von aufwendigen und präparatebelastenden immunhistochemischen Färbeprozessen (Kaminsky 2005).

Die weitere histomorphometrische Untersuchung der Präparate erfolgte sofort nach Beendigung des Färbeprozesses, um eine möglichst gleich bleibende Farbintensität ohne Ausbleichungseffekte, insbesondere hinsichtlich der zytochemischen Reaktion, zu garantieren.

2.2.1 Routinefärbung

Giemsa-Färbung:

Die Giemsafärbung dient der Darstellung von Plasmabestandteilen der Blutzellen. Die Präparate werden mit einer Azur-Eosin-Methylen-Blau-Lösung bei einem pH-Wert von 6,8-7,0 versetzt und 3 Minuten mit Methylalkohol fixiert. Daran schließt sich die 20-25minütige Färbung mit Giemsa-Lösung an. Nach dem Färbevorgang werden die Präparate mit Aqua dest. abgespült und können nach dem Trocknen lichtmikroskopisch untersucht werden. Durch die Giemsa-Färbung werden die Granulationen der neutrophilen Zellreihe amphophil blaurötlich, die der Eosinophilen rot und die der Basophilen und Mastzellen blaurot-metachromatisch dargestellt. Das Zytoplasma der unreifen Erythroblasten wird blau, das der reifen Normoblasten rot und die Zytoplasmaausläufer der Osteozyten rotblau angefärbt (Schaefer 1984).

PAS:

Die Perjod-Säure-Schiff Reaktion (PAS) ermöglicht den Nachweis von Glykogenablagerungen und die Anreicherung von Glykoproteinen in Knochenmark-Schnittpräparaten. Eine positive Reaktion (Rotfärbung) kann bei neutrophilen Granulozyten, sowie bei deren Vorstufen, Plasmazellen, leukämischen Zellen, MK und Thrombozyten erfolgen. Hierbei nimmt die Intensität der Färbung proportional mit dem Glykogengehalt während der physiologischen Reifung zu. Eine Anfärbung von MK kann erst ab einer Größe von ca. 80 μm^2 erreicht werden; Vorstufen können nicht bzw. nur unvollständig angefärbt werden (Thiele et al. 1990; Thiele et al. 1992).

Alpha-Naphthyl-ASD-Chlorazetat-Esterase:

Diese Färbemethode weist histochemisch MK, Makrophagen, Monozyten, Plasmazellen und Lymphozyten nach (Li et al. 1994). Da eine Hydrolyse bei den MK nur durch das Substrat Alpha-Naphtyl-Azetat hervorgerufen werden kann, und die Esterase zudem resistent gegenüber Aldehydfixation, Entkalkung und Paraffineinbettung ist, können makrokaryozytäre Zellbestandteile mittels dieser Färbung erst sichtbar gemacht werden. Eine Anfärbung von Promegakaryoblasten gelingt mit dieser Methode nicht, Megakaryoblasten sind

schwach anfärbbar. Reife Megakaryozyten und atypische Mikromegakaryozyten zeigen eine diffus positive Reaktion in Form eines braunen Farbniederschlags.

Silberimprägnation nach Gomori:

Die Versilberung stellt die argyrophilen retikulären Kollagenfasern speziell vom Typ III dar. Dabei werden die zuvor entparaffinisierten Knochenmarkschnitte verschiedenen Reaktionsschritten unterworfen. Die Färbung mit der ammoniakalischen Silberlösung und die Kerngegenfärbung mit Kernechtrot stellen die Hauptschritte der Reaktion dar. Bei dieser Färbemethode erscheinen die Fasern lichtmikroskopisch schwarz und verhalten sich nach erfolgter Färbung optisch anisotrop, weshalb sie polarisationsoptisch auf dunklem Hintergrund abbildbar sind. Sie können in der Auswertung quantitativ bestimmt werden. Die Knochengrundsubstanz und die kollagenen Fasern erscheinen braun angefärbt, Zellgrenzen und Kerne reagieren häufig in einem schwarz-braunen Farbton mit.

Perl's Reaktion:

Diese Methode wird auch als Berliner-Blau-Reaktion bezeichnet und macht Eisen in Blut- und Knochenmarksausstrichen sichtbar. Die Eisengranula, z.B. die der Erythrozyten oder Erythroblasten imponiert bei der lichtmikroskopischen Betrachtung in einem blauen Farbton.

2.2.2. Enzymhistochemische Färbung/ Tartrat-resistente saure Phosphatase

Einige, ursprünglich für Ausstrichpräparate entwickelte enzymhistochemische Verfahren lassen sich auf Paraffinschnitte übertragen. Es handelt sich dabei um den Nachweis solcher Enzyme, die resistent sind gegenüber der KGF-Fixation, neutralen EDTA-Entkalkung und konventionellen Paraffineinbettung: Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase (NACE), tartratresistente saure Phosphatase (TSP) und Plättchenesterase (PE).

Die meist schwer löslichen Enzymkonzentrate werden nach Schäfer in einem einheitlichen „Universallösungsmittel“ (siehe unten) gelöst, das als Detergens einen Zusatz von Triton X-100^R enthält. Sofern die jeweiligen Substrate im

Universallösungsmittel unter Einhaltung der angegebenen Gewichts-Volumen-Relationen gelöst werden, bilden sich bei der Herstellung der Inkubationsmedien keinerlei Niederschläge, so dass sich eine Filtration erübrigt. Als Kopplungsreagenz dient hexazoiertes Pararosanilin, vom Typ her eine Azo-Kopplungsreaktion, das in kleinen, dicht schließenden Plastikgefäßen in gebrauchsfertige Portionen aufgeteilt bei -30°C monatelang haltbar ist (Schaefer 1995).

Die saure Phosphatase im Serum stammt überwiegend aus dem Knochen, der Prostata und den blutbildenden Organen. Sie fasst als Überbegriff mindestens fünf Isoenzymfraktionen aus Prostata, Knochen, Thrombozyten, Erythrozyten und der Milz zusammen.

Bei dem Isoenzym 5, die tartratresistente, saure Phosphatase (TSP/TRAP), handelt es sich um einen Marker des Knochenabbaus. Dieses Enzym wird von Osteoklasten gebildet und ist somit ein Parameter für deren Aktivität (Minkin 1982). Es ist eine eisenhaltige Phosphorylase, die ihr spezifisches pH-Optimum bei 5,2 besitzt und gegenüber L (+)-Tartrat resistent ist. Diese Gruppe von Isoenzymen ist nicht nur gegen Tartrathemmung, sondern auch gegen Einflüsse einer Chelatentkalkung und Paraffineinbettung resistent. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf das mononukleäre, phagozytäre System und auf Erythrozyten (Bevilacqua et al. 1991). Neueren Studien zufolge existieren zwei Formen des Isoenzym 5: eine Isoform 5a und 5b (Lam WK 1978), wobei der Unterschied lediglich in einigen Sialinsäureresten der Isoform 5a besteht (Halleen et al. 1996). Die Isoform 5a wird laut J. Halleen von aktivierten Makrophagen gebildet (persönliche Mitteilung, CTS-Meeting 2003, Zagreb). Die Form 5b lässt sich nur in Osteoklasten und Makrophagen nachweisen. Da Makrophagen nur eine inaktive Form des Isoenzym 5b bilden, ist ein immunologischer Nachweis der aktiven TRAP 5 b ein hochspezifischer Test der Osteoklastenaktivität (Halleen et al. 2001). Da der Osteoklast Quelle der erhöhten Aktivität der sauren Phosphatase ist, korreliert dementsprechend die messbare Aktivität des Isoenzym mit der Aktivität bei osteolytischen Knochenveränderungen. Häufigkeit und Verteilung aktiver und inaktiver, also auch zytoplasmaarmer Osteoklasten lassen sich an Beckenkammbiopsien am besten mit der TSP-Methode beurteilen (Schaefer 1995). Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden TRAP-färbungen angefertigt. In

der TRAP Färbung stellt das Enzym sich braun dar und erlaubt so die Identifikation von Osteoklasten.

Die Funktion der tartratresistenten, sauren Phosphatase ist noch nicht vollständig geklärt, eine regulatorische und katalytische Funktion in der osteoklastozytären Degradation des Knochens ist beschrieben. Osteoklasten sezernieren im Sinne eines Feedback-Mechanismus mit steigender Ca^{2+} -Konzentration, weniger TRAP (Moonga BS 1990). Zaidi et al. zeigten sogar, dass in Osteoklastenkulturen durch Inhibition der TRAP mittels Antikörper der Resorptionsprozess der Osteoklasten gestoppt wird (Zaidi et al. 1989).

Medium

100 ml 0,1 m Azetatpuffer (a), pH 5,6 werden mit

0,8 ml hexazotiertem Pararosanilin (b) gemischt. Es resultiert pH 5,2.

25 mg di-Natrium-Naphthol-AS-BI-Phosphat, gelöst in 1 ml Universallösungsmittel (c) werden unter Schütteln zugesetzt (Endkonzentration des Substrates: 5×10^{-4}). Kleine Portionen der Substratlösung können bei -30°C in dicht geschlossenen Plastikgefäßen tiefgefroren gehalten werden.

150 ml L(+)-Weinsteinsäure, gelöst in 1,8 ml n NaOH können zur spezifischen Erfassung der tartratresistenten sauren Phosphatase zugefügt werden (Endkonzentration des Inhibitors: 10^{-2}). Allerdings kann dieser Zusatz auch entfallen, da an paraffineingebetteten Schnittpräparaten ohnehin nur die tartratresistenten Isoenzyme der sauren Phosphatase nachweisbar sind, während der tartrathemmbar Teil durch die kombinierte Wirkung von Fixation, Entkalkung und Paraffineinbettung irreversibel inaktiviert ist.

In Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffinierte und gewässerte Schnittpräparate werden 2h bei 40°C (oder über Nacht bei Zimmertemperatur) inkubiert, 3 min. mit fließendem Wasser, zuletzt mit destilliertem Wasser spülen. Gegenfärbung der Kerne mit Mayers Hämalaun, Wässern, Eindecken in Glyzeringelatine. Reaktionsfarbe: rot.

Zusätzlich notwendige Reagenzien:

(a) Natriumazetatpuffer pH 5,6 Konzentrat (20fach)

11,52g (10,92 ml) Eisessig

148,25g wasserfreies Natriumazetat (oder 245,88g Natriumazetat x 3 H₂O) werden in destilliertem Wasser gelöst und in Messkolben auf ein Endvolumen von 1000 ml eingestellt.

Diese Vorratslösung ist ohne die Gefahr der mikrobiellen Kontamination bei Zimmertemperatur unbegrenzt haltbar. Vor Gebrauch wird der 0,1 M Azetatpuffer pH 5,6 hergestellt, indem 5 ml des Konzentrats mit Aqua dest. auf 100 ml Endvolumen aufgefüllt werden.

(b) Hexazotiertes Pararosanilin

100mg Pararosanilin HCl werden vollständig in

6 ml 1 n HCl gelöst. Kühlung des Reaktionsgefäßes mit schmelzendem Eis von außen vor der Zugabe von

1,0 ml 1 n Natriumnitrit (69,0 mg NaNO₂ gelöst in 10ml H₂O).

Die vollzogene Hexazotierung wird durch einen Farbumschlag von Braunrot in Strohgelb angezeigt. Die Reaktion ist nach 10 min abgeschlossen. Das Hexazotat kann in dicht schließenden Plastikgefäßen portioniert wochenlang bei - 30°C gelagert oder sofort verwendet werden. Eine längere Lagerung bei Zimmertemperatur ist nicht möglich (Schaefer 1995).

(c) Universallösungsmittel für Enzymsubstrate

9 Volumina Dimethylsulfoxid werden mit

1 Volumen Triton X-100^R versetzt.

Dieses Gemisch verbindet gute Lösungseigenschaften mit einer Detergenswirkung. Aus diesem Grunde werden kleine Mengen dieses

Universallösungsgemisches aus dem Inkubationsmedium und Spülflüssigkeiten bei immunhistochemischen Reaktionen zugefügt.

Histochemisches Anfärben der TRAP mittels Burstone's Media:

4mg Naphthol AS-BI-phosphate werden in 0,25 ml N,N-dimethylformamid aufgelöst und dazu werden 25 ml 0,2 M Acetat-Puffer (pH= 5,0), 35 mg Fast Red Violet LB als Kopplungsreagenz und zwei Tropfen (60µl) MgCl₂ gegeben.

In je 25 ml dieses gefiltertem Mediums werden nun bei 37°C verschiedene Konzentrationen von L(+)-Tartrat (1; 32,5; 50; 100mM) hergestellt.

Mit diesen Lösungen werden nun die Knochenschnitte bei Raumtemperatur zwischen 30 min bis 3 Stunden inkubiert.

Dann werden die Schnitte 30 min in fließendem Wasser gereinigt, bei 25 °C getrocknet und mit 1 % Fast Green FCF für 1 min gegengefärbt und dann eingedeckt.

2.3. Morphometrische Analyse

Die morphometrische Analyse stellt ein wissenschaftliches Verfahren dar, mit dessen Hilfe Gewebe- und Zellkompartimente und andere Bestandteile (z. B. Zellen) eines histologischen Untersuchungsgutes vermessen werden (Oberholzer 1983). Durch die Möglichkeit, die Merkmale dieser morphologischen Strukturen in Form von Zahlen auszudrücken, erlaubt dieses Verfahren in erster Linie eine quantitative Erfassung in Form von Größe und Flächenausdehnung von morphologischen Strukturen in histologischen Präparaten. Die Ergebnisse können dann anschließend in Beziehung zueinander gesetzt werden.

Das für diese Studie verwendete Morphometriegerät besteht aus einer Kombination von Mikroskop und angeschlossenem Rechnersystem (Pentium I, 60 MHz, 64 MB Arbeitsspeicher). Das von der Firma Zeiss hergestellte Auslegermikroskop ist hierbei mit einem Kontron K64/IBAS-1 gesteuerten Rechnersystem der Firma MOP-Videoplan (München) verbunden. Auf dem Rechner ist als Software ein Messprogramm installiert (OPTIMAS), das komplexe Gewebestrukturen durch Festlegung von Parametersequenzen in Verbindung mit der Parameterarithmetik erfasst und speichert. In Verbindung

stehen die einzelnen Komponenten über eine handelsübliche Tastatur, einen Bildschirm, einen Laserdrucker, einen Cursor und ein Digitalisiertablett (Abmessungen: 28 x 28 cm). Letzteres stellt die Verbindung zwischen der angeschlossenen Optik und dem Rechner her. Das nach der Arbeitsweise des Induktionsprinzips verfahrenende Gerät ermöglicht so die Erfassung von rechnerkompatiblen Ortskoordinaten.

Hierbei beruht die Arbeitsweise auf dem Induktionsprinzip. Dies geschieht derart, dass eine im Cursor vorhandenen Empfangsspule ein Magnetfeld, welches von elektrischen Leitern im Digitalisierungstablett aufgebaut wird, verändert. Derartige Magnetfeldveränderungen werden durch rasterförmig im Digitalisierungstablett gelegene Leiter erfasst und als Punktkoordinaten an den Rechner weitergeleitet. Hiermit ist sowohl die Erfassung eines Flächenmaßes durch Aneinanderreihung von Koordinaten, als auch eine Koordinatendarstellung der Messwerte möglich.

Die jeweiligen Standortkoordinaten des Cursors werden von einem mikroprozessorgesteuerten Meßsystem mit einer Geschwindigkeit von 100 Koordinaten pro Sekunde bei einer Diskriminierungsgeschwindigkeit von kleiner als 0,1 mm errechnet.

Unter Zuhilfenahme des Auslegerarmes am Mikroskop ist es möglich, eine auf dem Cursor angebrachte Lichtquelle (LED) in das jeweilige mikroskopische Präparat hinein zu projizieren. Somit ergibt sich in Verbindung mit dem Digitalisierungsbrett die Möglichkeit, Punkte im mikroskopischen Präparat als Koordinaten zu erfassen oder auch durch Umfahren bestimmter histologischer Strukturen (z.B. Zellen) deren exakte Größe zu ermitteln.

Das Messprogramm besteht aus mehreren Basisparametern:

P1: Gewebedefekte und spongiöser Knochen in μm^2

P2: Fläche des Fettmarkes in μm^2

P3: Zahl der markierten Zellen pro Gesichtsfeld

P4: Fläche des Knochenmarkes in μm^2 (Gesichtsfeldfläche-Artefakt- bzw. Spongiosafläche)

P5: Fläche der Hämatopoese in μm^2 (Knochenmarkfläche-Fettmarkfläche)

Um eine größtmögliche Meßgenauigkeit zu garantieren, ist es nötig, vor jedem Meßvorgang eine Kalibrierung der Meßeinheit vorzunehmen. Indem man das im Mikroskop sichtbare Areal mit 3 Punkten am Rand des Gesichtsfeldes markiert, bestimmt man die Fläche des Gesichtsfeldes, die dann als Ausgangsgröße für verschiedene Berechnungen dient. Artefakte oder Spongiosaanteile werden bei der Messung zur Bestimmung der Markfläche von dieser Ausgangsfläche subtrahiert. Die histomorphometrische Auswertung erfolgt ohne Kenntnis des Biopsiezeitpunktes. Durch Gegenzählungen eines anderen Untersuchers wird die Messgenauigkeit überprüft. An der Kortikalis beginnend durchfährt man die Biopsie mäanderförmig. Flächenanteile wie Spongiosabälkchen, Artefakte (Luftblasen, Risse, Einblutungen) oder Fettzellen werden mit dem Cursor umfahren, die zu bestimmenden Zellen durch „Anklicken“ markiert.

2.3.1. Knochenanteil (Osteoklasten)

Bei den Knochenmarksbiopsien handelt es sich um ca. $18,4 \times 3,9 \text{ mm}^2$ Stanzbiopsien, das artefaktfreie Knochenmark besteht aus einer prä- und posttransplantatorischen Biopsie und berücksichtigt etwa eine Fläche von 12 ± 7 und $14 \pm 4 \text{ mm}^2$ (Thiele et al. 2005).

Zur Erfassung des Knochenanteils wurde die gesamte Biopsie morphometrisch im Hinblick auf Biopsiegröße und trabekulären Knochenanteil beurteilt. Die Gesichtsfelder wurden mäanderförmig über die Gesamtfläche analysiert. Für diesen Messschritt benötigten wir eine 31,25fache Vergrößerung. Bei gleicher Vergrößerung wurden aber zuvor in dem gesamten Präparat Artefakte (kortikaler Knochen und angrenzendes Bindegewebe, Quetschungen, Risse, Einblutungen, Luftblasen) beurteilt und mit dem Cursor umfahren, um anschließend von der Gesamtfläche des Präparates subtrahiert zu werden. Dann erst wurde der Knochenanteil (trabekulärer/spongiöser Knochen) vermessen.

Im Einzelnen wurden folgende Parameter für jede Biopsie ausgewertet:

Gewebsdefekte (Einblutungen, Gewebseinrisse etc.) in mm^2

Fläche von spongiösen Knochen in mm^2

Daraus errechneten sich:

Biopsiegröße in mm²

Markfläche in mm² (definiert als Biopsiegröße abzüglich der Defekte und Knochenanteile)

spongioser Knochenanteil an der Gesamtbiose in % (Thiele et al. 1989).

Für dieses Meßprogramm wurden Präparate verwendet, welche mit der PAS-Reaktion gefärbt worden waren (Schaefer & Fischer, 1968).

Die Vergrößerung betrug in diesem Meßprogramm für die Erfassung der Biopsiegröße und Knochenanteile 31,25fach.

2.3.2. Quantifizierung der Osteoklasten

Anhand der gewonnenen morphometrischen Daten der auf den Knochenanteil untersuchten Biopsieflächen im ersten Schritt erfolgte in einem zweiten Schritt die Zählung der Osteoklasten. Dafür wurde mäanderförmig in jeder Sequenzbiopsie die absolute Anzahl der Osteoklasten bei einer 250fachen Vergrößerung ermittelt. Auch bei dieser Zählung haben wir die im vorherigen Schritt vermessene Artefaktfläche vom Gesamtflächenwert des Gesichtsfeldes abgezogen und nicht bei der Auswertung berücksichtigt.

Als Färbung wurde die für Osteoklasten spezifische TRAP verwendet. Nach Thiele (Thiele et al. 1989) wurden alle phosphatasepositiven Elemente, die an der endostalen/trabekulären Knochengrenze anliegend vorzufinden waren, gezählt, d.h. sowohl Riesenzell-(mehrkernige), große, mittlere bis kleinzellige (einkernige) Osteoklasten sowie kernlose zytoplasmatische Fragmente von variablen, meist kleinzelligen Osteoklasten.

Dieser Wert wurde dann in Bezug zu der oben beschriebenen Knochenanteilfläche gesetzt. Auf diese Weise wurde eine mittlere Anzahl der Osteoklasten pro Quadratmillimeter (mm²) Biopsiefläche des jeweiligen Präparates errechnet. Eine zweite Zählung der Osteoklasten fand zur Kontrolle nach 2 Monaten statt. Alle Messungen wurden mit Mittelwert,

Standardabweichung und Standardfehler ausgedruckt, anschließend erfolgte eine Speicherung auf PC.

2.4. Statistische Auswertung

Die bei der histomorphologischen Analyse vorher gewonnenen Daten wurden statistisch ausgewertet, indem wir den empirischen Median, das arithmetische Mittel mit Standardabweichung sowie die Stichprobenspannweite (Range) ermittelten.

Für die Berechnungen benutzten wir das Programm „SPSS/PC+ – Statistical Package for the Social Sciences“ (Version 3.0, SPSS Inc., 444 N. Michigan Avenue, Chicago, Illinois, USA). Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden stets der Mittelwert und die Standardabweichung (95 % Konfidenzintervall) und gegebenenfalls die Spannweite angegeben.

Statistische Maße:

Stichprobenmittelwert:

Der Stichprobenmittelwert ist definiert als die Summe von Messwerten (x_i) dividiert durch deren Anzahl (n).

Stichprobenstandardabweichung:

Die Stichprobenstandardabweichung (s) ist definiert als Quadratwurzel der Varianz (v), die sich aus der Summe aller Abweichungsquadrate, dividiert durch die Zahl aller Messwerte minus eins, errechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitative Beschreibung des Knochenmarkbefundes (Bilder)

Zur Darstellung des spongiösen Knochens wurden Präparate verwendet, welche mit der PAS-Reaktion gefärbt worden waren. Die Osteoklasten wurden mittels spezifischer TRAP gekennzeichnet.

Die Abbildungen entstammen von Biopsien, die vor und nach ASZT entnommen wurden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigt sich vor der ASZT eine deutliche vermehrte kollagene Fibrosierung des KM, die bei der PMF häufig mit endophytischen Knochenläsionen vergesellschaftet sind (Abb.2a). Drei Monate nach ASZT kann bei dem gleichen Patienten eine signifikante Verminderung der Fibrose beobachtet werden, während die endophytischen Knochenläsionen noch immer nachweisbar sind (s. Pfeil Abb. 2b). Nach 6 Monaten nach ASZT ist wieder bei dem gleichen Patienten eine normale Dichte von einzelnen retikulären Fasern zu sehen (Abb. 2c). In Bezug auf die Osteosklerose zeigte sich vor und nach ASZT keine signifikante Verminderung des trabekulären Knochenanteils. Die Anzahl der Osteoklasten hat sich nach ASZT hingegen vermehrt (Abb. 2d).

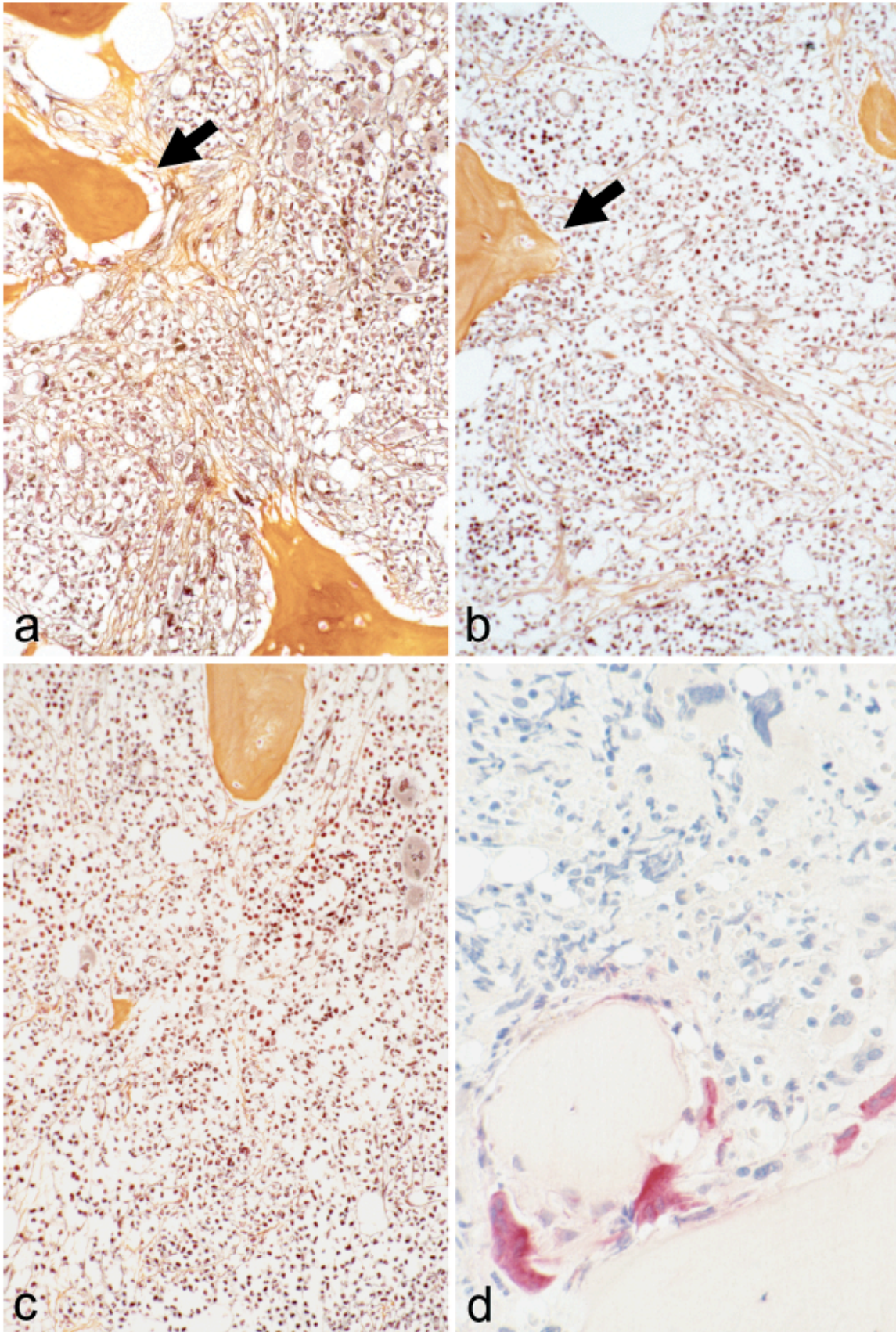


Abbildung 2: Fibroosteosklerotische Knochenmarksveränderungen der Primären Myelofibrose vor und nach Stammzelltransplantation

3.2. Morphometrische Auswertung

Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei den 20 in der Arbeit untersuchten Patienten bei 50 Jahren mit einer Variationsbreite von 13 bis 64 Jahren. Es zeigte sich ein überproportional hoher Anteil des männlichen Geschlechts von 1:5,67, das entspricht absolut drei Frauen und 17 Männern.

In den Tabellen 1 und 2 sind die klinischen und hämatologischen Daten im Verlauf dargestellt. Aus den Daten der ersten, diagnostischen Knochenmarksbiopsie konnte ein für die PMF typisches Bild gewonnen werden. Es wurden im Rahmen der Anämie erniedrigte Hämoglobinwerte gemessen, im Mittel 10,7 g/dl mit einer Variationsbreite von 7,7 bis 15,5 g/dl. Analog dazu fand sich auch eine stark reduzierte Erythrozytenzahl im peripheren Blutbild, hier betrug der Mittelwert gerade einmal $3,6 \times 10^{12}/l$ mit einer Variationsbreite von $2,3$ bis $5,5 \times 10^{12}/l$.

Bei den Leukozytenzahlen fielen Veränderungen in Form einer leichtgradigen Leukozytose auf. So wurde zum Zeitpunkt der ersten diagnostischen Biopsie ein Mittelwert von $16,8 \times 10^9/l$ bei einer sehr großen Variationsbreite von $2,4$ bis $49,0 \times 10^9/l$ festgestellt. Ebenso zeigte sich ein hoher Anteil an Myeloblasten. Dieser lag im Mittel bei 9,8 % mit einer Streuung von 0 bis 75 %. Bei den Thrombozyten sieht das Bild ähnlich wie bei den Leukozyten aus, der Mittelwert lag mit $379 \times 10^9/l$ im oberen Normbereich, es bestand jedoch auch hier eine erhebliche Variationsbreite von 21 bis $1,218 \times 10^9/l$.

Als klinischen Parameter wurden ebenfalls Milz- und Lebergröße erfasst. So stellte sich heraus, dass die Milzgröße bei Erstbiopsie deutlich erhöht war, im Mittel um 8,3 cm unterhalb des Rippenbogens bei einer Variationsbreite von 3 bis 14 cm unterhalb des Rippenbogens. Die Leber war nur diskret vergrößert, so zeigten sich Mittelwerte von 1,8 cm unterhalb des Rippenbogens bei einer Spannweite von 0-7 cm unterhalb des Rippenbogens. Da die untersuchten Milz- und Lebergrößen nur während der ersten Untersuchung am 30. Tag nach ASZT stattfanden, werden sie in einer separaten Tabelle dargestellt.

In Bezug auf die in den Tabellen 1 und 2 gezeigten klinischen und hämatologischen Daten zeigte sich nach der ASZT ein gebesserter Befund. Insbesondere die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen wurden durch diesen

Therapieansatz in ihre Normbereiche zurückgeführt, bei den Leukozyten stellte sich eine Reduktion von $16,8 \times 10^9/l$ über $10,5 \times 10^9/l$ an Tag 30 nach ASZT bis hin zu $7,0 \times 10^9/l$ an Tag 384 nach ASZT entnommenen Biopsie. Analog hierzu sank der Anteil der Myeloblasten im peripheren Blut auf mittlere 0,1 % bei einer Variationsbreite von 0 bis 1 %. Auch die Thrombozyten wurden in ihrer Konzentration reduziert, es stellte sich eine Reduktion von initial $379 \times 10^9/l$ über $202 \times 10^9/l$ bis hin zu $247 \times 10^9/l$ während der letzten Biopsie nach ASZT ein. Dabei fiel zum Zeitpunkt der zweiten Biopsie an Tag 157 nach ASZT ein gegenüber der Norm erniedrigter Wert von $121 \times 10^9/l$ auf.

Die Anämie konnte nur diskret gebessert werden, so stieg der Hämoglobinwert von anfänglich 10,7 g/dl auf 12,6 g/dl an Tag 384 nach ASZT, die Anzahl der Erythrozyten im peripheren Blut konnte von $3,6 \times 10^{12}/l$ nur minimal erhöht werden (erste Untersuchung nach ASZT $3,8 \times 10^{12}/l$, letzte Untersuchung $3,7 \times 10^{12}/l$).

Parameter		Tag 14 vor ASZT	Tag 30 nach ASZT	Tag 157 nach ASZT	Tag 384 nach ASZT
Hämoglobin (g/dl)	Mittelwert	10,7	10,8	10,3	12,6
	Median	9,7	10,5	10,1	12,2
	Standardabweichung	2,7	1,3	1,0	4,0
	Spannweite	7,7 - 15,5	9,5 - 14,5	9,4 - 11,4	8,9 - 17,0
Erythrozyten ($\times 10^9/ml$)	Mittelwert	3,6	3,8	3,2	3,7
	Median	3,3	3,6	3,4	3,8
	Standardabweichung	1,1	1,0	0,5	1,2
	Spannweite	2,3 - 5,5	2,9 - 6,6	2,6 - 3,7	2,4 - 4,9
Leukozyten ($\times 10^6/ml$)	Mittelwert	16,8	10,5	8,2	7,0
	Median	15,4	9,4	10,4	7,2
	Standardabweichung	11,3	7,5	4,4	3,2
	Spannweite	2,4 - 49,0	0,8 - 24,2	3,2 - 11,1	3,0 - 10,3
Thrombozyten ($\times 10^6/ml$)	Mittelwert	379	202	121	247
	Median	297	115	78	269
	Standardabweichung	365	226	112	125
	Spannweite	21 - 1.218	0,391 - 609	36 - 248	75 - 373

Tab. 1: Klinische und hämatologische Daten im Verlauf (A and CC)

Parameter		Tag 14 vor ASZT	Tag 30 nach ASZT
Milzgröße (cm unter Rippenbogen)	Mittelwert	8,3	6,3
	Median	9,0	5,0
	Standard- abweichung	4,2	4,3
	Spannweite	03 - 14	03 - 12
Lebergröße (cm unter Rippenbogen)	Mittelwert	1,8	1,7
	Median	1,5	0,0
	Standard- abweichung	2,2	3,2
	Spannweite	0 – 7	0 - 8
Myeloblasten (%)	Mittelwert	9,8	0,1
	Median	0,0	0,0
	Standard- abweichung	26,4	0,4
	Spannweite	0 – 75	0 - 1

Tab. 2: Klinische und hämatologische Daten im Verlauf (2).
Erhebung fand nur an Tag 14 vor ASZT und an Tag 30 nach ASZT statt.

Anhand der gewonnenen morphometrischen Daten der auf den Knochenanteil (Osteosklerose) untersuchten Biopsieflächen im ersten Schritt erfolgte in einem zweiten Schritt die Zählung der Osteoklasten. Die Darstellung der Osteoklasten erfolgt durch enzymhistochemische Färbung mittels der tartratesistenten sauren Phosphatase (TRAP), ein spezifischer Marker des Knochenabbaus. Nach Thiele (Thiele et al. 1989) wurden alle phosphatasepositiven Elemente, die an der endostalen/trabekulären Knochengrenze anliegend vorzufinden waren, gezählt, d.h. sowohl Riesenzell (mehrkernige), große, mittlere bis kleinzellige (einkernige) Osteoklasten sowie kernlose zytoplasmatische Fragmente von variablen, meist kleinzelligen Osteoklasten. Dieser Wert wurde dann in Bezug zu der oben beschriebenen Knochenanteilsfläche gesetzt. Auf diese Weise wurde eine mittlere Anzahl der Osteoklasten pro Quadratmillimeter Biopsiefläche des jeweiligen Präparates errechnet.

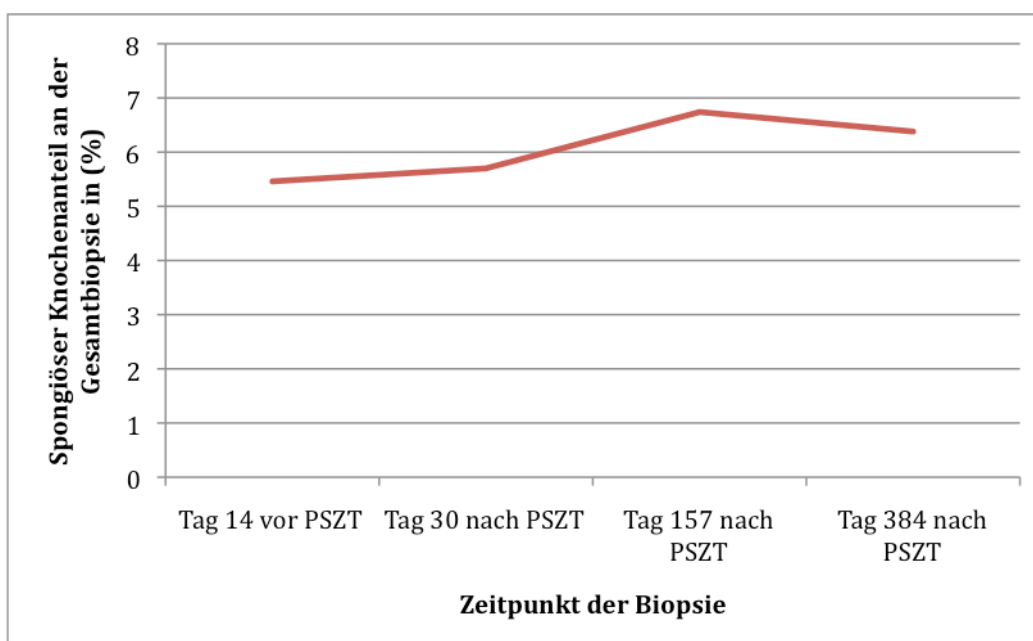
3.3. Knochenanteil (Osteosklerose)

In Bezug auf die Osteosklerose zeigte sich vor und nach ASZT keine signifikante Verminderung des trabekulären Knochenanteils. Die Messungen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Entwicklung ist graphisch in Abbildung 3a dargestellt.

Parameter		Tag 14 vor ASZT	Tag 30 nach ASZT	Tag 157 nach ASZT	Tag 384 nach ASZT
Spongioser Knochenanteil an der Gesamtbiopsie in (%)	Mittelwert	5,46	5,7	6,74	6,38
	Median	5,23	4,6	5,84	6,08
	Standardabweichung	2,40	2,14	4,13	1,91
	Spannweite	2,67-12,52	2,44-9,68	2,41-18,58	3,75-9,47

Tab. 3 Spongioser Knochenanteil an der Gesamtbiopsie in (%)

Abb. 3a: Entwicklung des spongiösen Knochenanteils nach ASZT bei der PMF



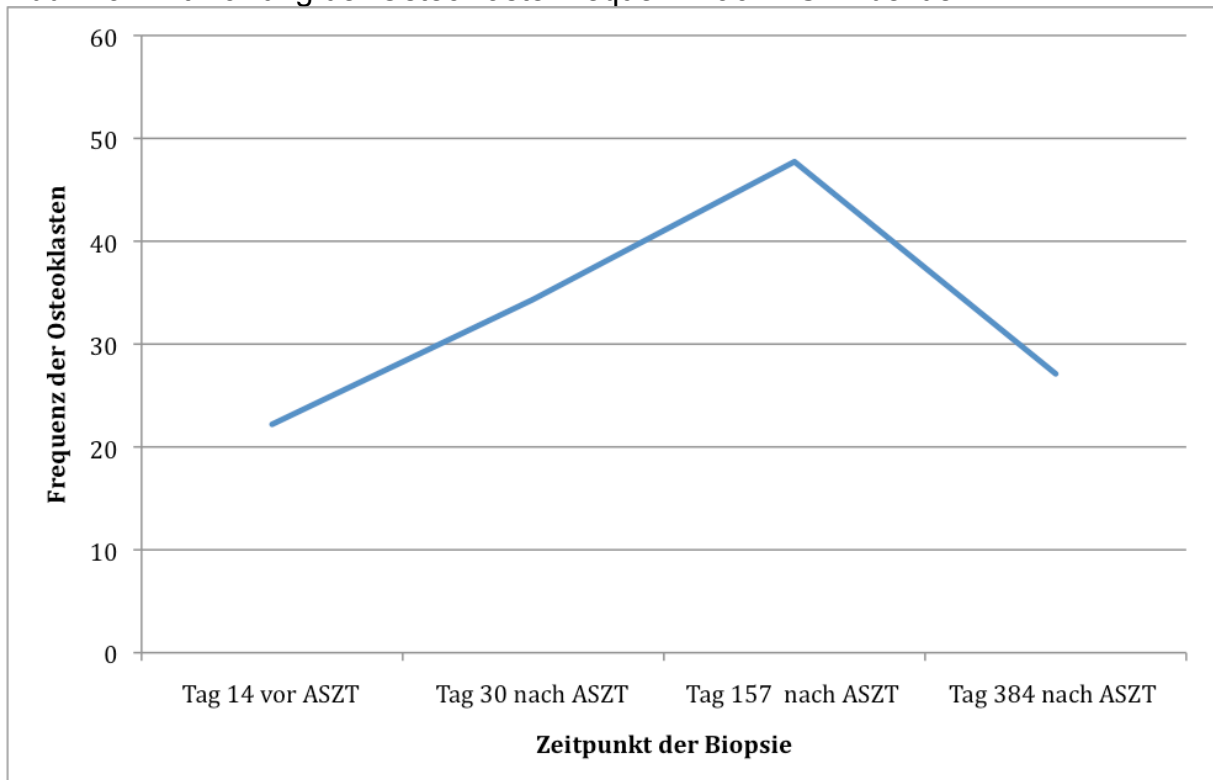
3.4. Osteoklasten

Die Frequenz der Osteoklasten ist in Tabelle 4 aufgeführt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine bleibend erhöhte Anzahl von Osteoklasten pro Knochenfläche nach ASZT. Die Verteilung ist graphisch in Abb. 4a dargestellt.

Parameter		Tag 14 vor ASZT	Tag 30 nach ASZT	Tag 157 nach ASZT	Tag 384 nach ASZT
Osteoklasten	Mittelwert	22,2	34,35	47,73	27,11
	Median	17	34	28,5	18
	Standardabweichung	20,66	30,28	48,25	20,37
	Spannweite	2-79	8-140	4-151	6-76

Tab. 4 Frequenz der Osteoklasten vor und nach ASZT.

Abb. 4 a: Entwicklung der Osteoklastenfrequenz nach ASZT bei der PMF



4. Diskussion

4.1. Vergleich mit tierexperimentellen Daten

Die pathogenetischen Untersuchungen, die den sekundären Veränderungen des Knochenmarkstromas in der MMM zugrunde liegen, sind wie bereits erwähnt nur unvollständig geklärt. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden Mäusemodelle konstruiert, um die Mechanismen und die Pathogenese der Myelofibrose und Osteosklerose auf den Grund zu gehen. Es besteht bei den Mäusemodellen die Möglichkeit krankheitsspezifische Molekulardefekte zu entdecken, die zukunftssträchtig die Therapie der PMF verbessern könnten.

Es schien so, dass Mechanismen und genetische Veränderungen, die die Myelofibrose und Osteosklerose in Mäusemodellen induzieren, einen Aufschluss über molekulare Ursachen der menschlichen Erkrankung geben könnten.

Die Entwicklung der extramedullären Hämatopoiese und die Entwicklung der Myelofibrose, ausnahmslos mit Thrombozytose und Megakaryozyten-clustern assoziiert, wurde in mehreren Mäusemodellen, die im Rahmen von CMPE durchgeführt wurden, beobachtet.

Es gibt zwei spezifische Mäusemodellen, die mehrere Aspekte der PMF widerspiegeln. In diesen Mäusemodellen wurde in vivo entweder eine unangemessene Ausschüttung von TPO, der physiologische Regulator der Hämatopoiese, verursacht (TPO^{high} Mäuse) oder die megakaryozytäre Zelllinie mittels der verminderten Ausschüttung von Transkriptionsfaktor GATA-1 ($GATA-1^{low}$ Mäuse) unterdrückt. Diese $GATA-1^{low}$ Mäuse entwickeln eine progressive Anämie, Myelofibrose und extramedulläre Hämatopoiese und weisen eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden Vorläuferzellen auf, wenn sie altern. Zusätzlich sind im Gegensatz zu gleichalten normalen Mäusen erhöhte Werte von TGF- β , PDGF, VEGF und Osteokalzin in dem Knochenmark der $GATA-1^{low}$ Mäuse zu finden (Vannucchi und Cellai 2002). Die mögliche Rolle von GATA-1 in hämatopoietischen Erkrankungen wird ausserdem durch

folgende Beobachtung unterstützt: in erworbenen Mutationen in GATA-1 konnte eine vorübergehende myeloische Funktionsstörung bei Patienten mit Down-Syndrom beobachtet werden (Groet et al. 2003). Wiedem auch sei ist die Stellung der GATA-1-Ausschüttung bei Patienten mit PMF umstritten. Eine Studiengruppe berichtete von keiner nachweisbaren GATA-1-Ausschüttung in CD34⁺-Zellen, die von Patienten mit Myelofibrose isoliert worden waren (Martyré et al. 2003). Im Gegensatz dazu berichtet eine andere Gruppe von erniedrigten GATA-1-Werten in Vorläuferzellen, die von Patienten mit MMM isoliert wurden (Vannucchi et al. 2003). Es wurde keine bedeutsame Veränderung in der Struktur oder Ausschüttung von GATA-1 bei Patienten mit PMF gefunden (Martyré et al. 2003), was wiederum einen wichtigen Unterschied zwischen der Erkrankungsform von Mäusen und der Erkrankungsform bei Menschen darstellt.

Andererseits konnte beobachtet werden, dass etwa 30 % der Megakaryozyten in Knochenmarkbiopsien von Patienten mit PMF nicht mit anti-GATA-1-Antikörpern besetzt werden konnten, was darauf hinweist, dass GATA-1-Defekte möglicherweise auf einen immer noch unbekanntem posttranslationalen Defekt zurückzuführen sein könnte, welcher an der Pathogenese der Erkrankung mitwirkt (Vannucchi et al. 2005).

Neulich wurde in einem Mäusemodell gezeigt, dass bei GATA-1^{low} Mäusen Mitglieder der BMP-Familie (Bone Morphogenetic Protein) essentiell an der Entstehung der frühen Osteosklerose beteiligt sind (Garimella et al. 2007).

Neuere Studien zeigen, dass der PMF zwei voneinander abhängige pathogenetische Mechanismen zugrunde gelegt werden können. Einerseits eine Megakaryozyten-gewichtete klonale Myeloproliferation und eine zweite (paraneoplastische) stromale Reaktion, welche die Knochenmarksfibrose, Osteosklerose und Angiogenese sowie eine extramedulläre Hämatopoiese (EMH) beinhaltet. Mäusemodelle zeigten, dass JAK2V617F eine PV-ähnliche Erkrankung bei Mäusen hervorruft, wohingegen MPLW515L einen PMF-Phänotyp verursacht. Nichtsdestotrotz zeigt etwa die Hälfte der Patienten mit PMF weder die Mutation noch die zielgerichtete pathogenetische Konsequenz dieser Mutation, wenn sie vorhanden ist- dies muss noch geklärt werden.

Der zweite Mechanismus im pathogenetischen Prozess der PMF beinhaltet Veränderungen des Knochenmarks (i.e. kollagene Fibrose, Angiogenese und

Osteosklerose), welche oft mit der Krankheit einhergehen sowie die EMH, welche in der Milz, Leber und anderen Stellen zu beobachten ist. Es wird angenommen, dass diese paraneoplastischen histologischen Veränderungen durch klonale zelluläre Zytokine sowie durch autoimmune Reaktionen auf das veränderte Knochenmarkstroma vermittelt werden. Es wurde mehrfach in diesem Kontext nachgewiesen, dass Knochenmarksfibroblasten in der PMF polyklonal sind und sowohl zelluläre und extrazelluläre Zytokine oft bei erkrankten Patienten verändert sind. Allgemein anerkannt ist die Hypothese, dass beim Menschen, eine veränderte zelluläre Wechselwirkung zwischen Megakaryozyten und Neutrophilen zur Freisetzung von Zytokinen wie: TGF- β , PDGF, basic fibroblast growth factor und TNF- α beiträgt.

Ein ähnliches Szenario kann bei experimentell in Mäusen induzierter Myelofibrose mit entweder systemisch erhöht ausgeschüttetem Thrombopoietin oder auf die megakaryozytäre Linie begrenzte vermindert ausgeschütteter Transkriptionsfaktor GATA-1 verursacht werden und es zeigen sich PMF-ähnliche Knochenmarksveränderungen. Ähnliche Mäusemodelle legen nahe, dass das aus der hämatopoietischen Zellreihe stammende TGF- β eine tragende fibrogenetische Rolle spielt sowie für die Entstehung der Osteosklerose das Osteoprotegerin.

Weitere Studien zeigen ähnliche Abweichungen im SDF-1/CXCR4 System sowohl bei Patienten mit PMF und bei GATA1^{low}-Mäusen. Es ist noch nicht geklärt, welcher Mechanismus der verminderten Expression von CXCR4 zugrunde liegt (Migliaccio et al. 2008).

In dem zweiten spezifischen Mäusemodell untersuchte man die TPO-Ausschüttung und deren Folgen. Bei der einfachsten Herangehensweise wurde eine verkürzte Version des rekombinanten TPO-Moleküls mit einem Polyethylen Glycol Schwanz (PEG-r-MGDF) gekoppelt und 14 Tage lang täglich in erwachsene Mäuse injiziert. Alle Mäuse entwickelten eine Thrombozytose in Anwesenheit von großen Thrombozyten, Leukozytose, Anämie, Splenomegalie mit erhöhten Megakaryozytenwerten und eine extramedulläre Hämatopoiese. Bei der höchsten Dosis, die injiziert wurde, konnte eine herdförmige Ablagerung von Retikulinfasern im Knochenmark beobachtet werden, welche sich nach Beendigung der Injektionen rasch zurückbildete (Abina et al. 1998).

Nichtsdestotrotz konnte eine umfassende Suche nach Funktionsstörungen in der TPO-Regulierung und/oder dem c-mpl Signalübertragungsweg in 14 Patienten mit PMF nicht gefunden werden (Taksin et al. 1999).

Schlussendlich scheint die erhöhte Anzahl an polymorphkernigen Leukozyten, die Emperipolesis innerhalb des megakaryozytären Zytoplasmas begehen und sowohl bei den Mäusemodellen als auch bei der menschlichen Myelofibrose auftreten, da die Emperipolesis im Knochenmark von Patienten mit PMF genau untersucht wurde und mit der Menge an Retikulinablagerung übereinstimmte (Schmitt et al. 2000). Gleichzeitig ist die Struktur der Verteilung von immungekennzeichneten P-Selektin in Megakaryozyten bei Mäusen und Menschen ähnlich: nicht nur die α -Granula, sondern auch die im Zytoplasma verstreuten kleinen Vakuolen und einige Membranen, die ein Demarkationssystem bilden, wurden bei beiden gefunden (Schmitt et al. 2000). Die experimentellen Modelle, die sich mit der Pathogenese der Myelofibrose und Osteosklerose bei Mäusen entweder durch hohe TPO-Ausschüttung oder durch GATA-1^{low} Mutation beschäftigt haben, haben die These bekräftigt, dass Megakaryozyten definitiv an der Entwicklung der Myelofibrose beteiligt sind und die entscheidende Rolle von TGF- β als zugrundeliegenden Prozess der Retikulinfaser- und Kollagenfaserablagerung bestärkt. Das gleich gilt für OPG im Hinblick auf die Osteosklerose.

Demzufolge haben die Mäusemodelle und die menschliche Erkrankung den Mechanismus der Zytokinausschüttung aus Megakaryozyten gemeinsam, der zu einer Aktivierung von Fibroblasten und einer Ablagerung von Matrixkomponenten führt (Vannucchi et al. 2005).

Da sich aber bei allen Tiermodellen die experimentelle Myelofibrose nicht in klonaler Myeloproliferation wiederholt, welches für die menschliche MMM fundamental ist, focussierten weiterführende Studien auf menschliche Knochenmarksfibroblasten.

Auch Veränderungen in der Genstruktur oder Genexpression: TPO, c-MPL, GATA1 oder FOG-1 (Transkriptionsregulatorgen von GATA1) konnte nicht in menschlicher MMM nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz liefert die Möglichkeit der Tierversuche eine Erleichterung der in vivo getestete Medikamente und kann zur Identifizierung von entscheidenden Molekülen

verhelfen, die ein therapeutischen Ansatz in Zukunft darstellen könnten (Tefferi et al. 2005).

4.2. Ursachen der Osteosklerose

Die PMF verursacht deutliche Veränderungen der Knochenstruktur. Sie ist charakterisiert durch fortschreitende Knochenmarksfibrosierung in fortgeschrittenen Stadien durch Osteosklerose. Die Herkunft der Knochenmarksfibrose und Osteosklerose ist noch immer ungeklärt. Bei der Fibrosierung des Markes handelt es sich um einen reversiblen Prozeß (Smith et al. 2001). Durch die Transplantationen kommt es zu einer vollständigen oder zumindest sehr deutlichen Remission der Markfibrose (Anderson et al. 1997; Guardiola et al. 1999), die bei der Heilung bestehen bleibt. Man vermutet, dass eine „graft-versus-fibrosis“-Reaktion existiert (Cervantes et al. 2000; Smith et al. 2001), die zu diesem Rückgang der Fibrose beitragen könnte. Die Osteosklerose betrifft vor allem die Wirbelsäule, Becken und das proximale Segment der langen Röhrenknochen und kann durch konventionelles Röntgen bei 30% bis 70% festgestellt werden. Studien lassen vermuten, dass die Osteosklerose Folge von den hämatopoietischen Veränderungen sind. Es wurde nachgewiesen, dass die Vermehrung der Osteosklerose auf einen erhöhte Anzahl von knochenbauenden Osteoblasten im Gegensatz zu weniger leistungsfähigen abbauenden Osteoklasten bei gut erhaltener Knochenformation mit niedriger Mineralisationsrate zurückzuführen ist (Mellibovsky et al. 2004).

Im Knochenmark befinden sich hämatopoietische und nicht-hämatopoietische Zellen, welche durch das gleiche System vaskularisiert werden. Vor kurzer Zeit wurde eine gemeinsame Stammzelle für Vorläuferzellen der Osteoblasten und hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark einer Maus identifiziert. Andere Mäusemodelle zeigten eine wahrscheinliche Rolle des OPG für die Entstehung der Osteosklerose. Dieses Mäusemodell wurde durch eine folgende Patientenstudie bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass bei der fortgeschrittenen PMF mit Osteosklerose und Vermehrung der Knochen trabekel typischerweise durch die Abwesenheit bzw. spärliche Präsenz von Osteoklasten begleitet wurde. Da die Osteoklastenzahl mittels OPG inhibiert wird, untersuchte man die OPG-Ausschüttung bei Patienten mit PMF und

schwerer Fibrose und Osteosklerose, welche eine signifikant höhere Ausschüttung von OPG-mRNA (bis zu 71 fach) hatten als Patienten mit weniger Knochenmarkfibrose und Osteosklerose oder eine Kontrollgruppe. RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappaB Ligand), ein positiver Regler der Osteoklastendifferenzierung und vermeintlicher Antagonist von OPG wird bis zu 34 fach höher ausgeschüttet vor allem in der fortgeschrittenen PMF. Die RANKL/OPG-Ratio in fortgeschrittener PMF zeigte eine grosse Streuweite, die sich nicht von anderen Stadien der Erkrankung unterschied. Die Osteosklerose und beeinträchtigte Osteoklastenfunktion bei der PMF scheint mit einer erhöhten endothelialen OPG-Ausschüttung assoziiert zu sein, aber eine begleitende Verminderung des Antagonisten RANKL konnte nicht nachgewiesen werden (Bock et al. 2005)

Nur wenige Studien haben sich bisher mit den Veränderungen der Knochenstruktur bei der PMF beschäftigt. Coindre untersuchte neun Patienten und fand einen signifikanten Anstieg des trabekulären Knochenanteils und eine verminderte Anzahl von Osteoklasten zu Beginn der Krankheit. Dies ist mit der Tendenz assoziiert, eine reduzierte Osteoklastenaktivität in fortgeschrittenen Stadien aufzuweisen. (Schmidt et al. 2007).

Als einziger kurativer Ansatz bei Patienten, die an der PMF erkrankt sind, haben sich in den letzten Jahren die Knochenmarks- und vor allem auch die PSZT herausgestellt. Es hat sich gezeigt, dass bis vor wenigen Jahren im Falle der PMF besonders jüngere Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf von der Stammzelltransplantation im Rahmen der KMT profitieren (Barosi 1999). Bei 90 % zeigte sich ein erfolgreiches Engraftment, prognostisch ungünstig wirkten sich starke Faservermehrung im Knochenmark und eine schwere Anämie aus (Tefferi 2000). Bei 70 % der Patienten wurde eine komplette hämatologische Remission beschrieben, bei 40 % sogar ein Rückgang der Knochenmarksfibrose (Tefferi 2000). Diese Erfolgsaussichten wurden jedoch durch hohe Komplikationsraten bei dieser Therapieform getrübt, durch das Auftreten von Infektionen, Organversagen, akuter oder chronischer Graft-versus-Host-Reaktionen kam es zu einer Letalität von bis zu 40 % (Devine et al. 2002).

Das Ausmass der Myelofibrose spielt eine wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf nach Transplantation. Eine Arbeit, die die PSZT bei PMF

untersucht, steht auch zur Verfügung (Kröger et al. 2005). Darin wurde bei 21 Patienten der Krankheitsverlauf während eines Jahres nach PSZT dargestellt. Insgesamt kam es hier bei 75 % der Patienten zu einer histopathologischen Komplettremission, die restlichen 25 % erholten sich partiell, zeigten jedoch auch einen Rückgang der Knochenmarksfibrosierung. Alle Patienten in dieser Studie zeigten eine hämatologische Antwort in Form einer sich erholenden Hämatopoiese.

Die Reversibilität der Knochenmarksfibrosierung und Osteosklerose spielt für die langfristige Erholung eine wichtige Rolle. Durch das Entfallen der Produktion von PDGF und TGF- β durch den malignen Klon wird sie ermöglicht. Da diese Mediatoren die Fibrosierung stimulieren, schreitet der Prozess nach einer zytoreduktiven Therapie nicht mehr fort. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Fibrosierung um einen reversiblen Prozess handelt, der entweder durch das Fehlen der Mediatoren (Deeg et al. 2003) oder aber durch eine „Graft-versus-fibrosis“ Reaktion zu begründen ist (Cervantes et al. 2000).

Neuerdings kann nahegelegt werden, dass die Prognose der PMF vom Grad der Myelofibrose zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig ist, da eine frühe PMF mit einem Myelofibrosegrad 0 bis 1 eine wesentlich bessere Prognose hat als eine fortgeschrittene PMF mit einem Myelofibrosegrad 3 (Michiels et al. 2006). Wie auch immer konnte in multivarianten Datenanalysen kein signifikanter Einfluss der Fibroosteosklerose auf die Prognose nachgewiesen werden (Kvasnicka et al. 1999; Thiele und Kvasnicka 2003).

In unserer Arbeit wurde gezeigt, dass die Faserdichte und damit die Myelofibrose etwa sechs Monate nach ASZT auf ein normales Mass zurückgingen. Dies stimmte überein mit anderen Studien, die ähnliche Verläufe in Bezug auf die Myelofibrose beobachtete (Deeg et al. 2003).

Das Ausmaß der Osteosklerose wies keine signifikanten Unterschiede vor und nach

ASZT auf, wohingegen die Zahl der CD34-positiven Progenitorzellen mit initial hohen Konzentrationen in der Mark- und Hämatopoiesefläche rückläufig war und sich bei jenen Patienten, die Engraftment zeigten, auf Normwerte einpendelten. Die Zellproliferation und -apoptose zeigten steigende Zellumsätze im Verlauf. Insgesamt lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit, aber auch durch die parallel dazu gewonnenen Erkenntnisse der

therapeutische Nutzen einer PSZT bei fortgeschrittener PMF darstellen und sich deren Einsatz rechtfertigen.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit schließt Knochenmarksbiopsien von 20 Patienten mit PMF ein. Es wurden Biopsien vor und nach einer allogener PSZT gewonnen, eine an Tag 14 vor und drei Biopsien nach PSZT, diese zeitlich standardisiert an den Tagen 30, 157 und 384 nach PSZT. Die Auswertung erfolgte anhand morphometrischer Kriterien computerunterstützt. Untersucht wurde einerseits ob es zu einer Reduzierung des endophytischen Knochenanteils nach PSZT kommt und andererseits wie sich die Osteoklasten vor und nach PSZT verhalten. Zu diesem Zweck wurden zur morphometrischen Erfassung des endophytischen Knochenanteils Präparate verwendet, die mit PAS-Reaktion gefärbt worden waren, andererseits die Osteoklasten mittels spezifischer TRAP gekennzeichnet. Anhand der gewonnenen morphometrischen Daten der auf den Knochenanteil untersuchten Biopsieflächen im ersten Schritt erfolgte in einem zweiten Schritt die Zählung der Osteoklasten. Es gibt einige Studien zum Verhalten der Myelofibrose nach allogener Stammzelltransplantation, aber nur wenige Studien, die sich mit dem osteosklerotischen Knochenumbau bei der PMF befassen.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 1.4 formulierten Fragestellungen dieser Arbeiten ergaben unserer Untersuchungen folgende Ergebnisse:

- 1.) In Bezug auf die Osteosklerose zeigte sich in den Knochenmarksbiopsien vor und nach PSZT keine signifikante Verminderung des endophytischen Knochenanteils.
- 2.) Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine bleibend erhöhte Anzahl von Osteoklasten pro Knochenfläche nach PSZT.

6. Literaturverzeichnis

1. Abina, MA, M. Tulliez, C. Lacout, N. Debili, JL Villeval, F. Pflumio, F. Wendling, W. Vainchenker, H. Haddada: Thrombopoietin (TPO) knockout phenotype induced by cross-reactive antibodies against TPO following injection of mice with recombinant adenovirus encoding human TPO.
J Immunol 160: 4481-4489. (1998)
2. Abina, MA, M. Tulliez, MT Duffour, N. Debili, C. Lacout, JL Villeval, F. Wendling, W. Vainchenker, H. Haddada : Major effects of TPO delivered by a single injection of a recombinant adenovirus on prevention of septicemia and anemia associated with myelosuppression in mice: Risk of sustained expression inducing myelofibrosis due to immunosuppression.
Gene Ther 5: 497-506. (1998)
3. Ahmed, A. und C. Chang: Chronic Idiopathic Myelofibrosis. Clinicopathologic Features Pathogenesis, and Prognosis.
Archives of pathology & laboratory medicine 130(8): 1133-1143. (2006)
4. Alexander, WS, AW Roberts, NA Nicola, R. Li, D. Metcalf : Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietin receptor c-mpl.
Blood 87: 2126-2170. (1996)

5. Alliston, T., L. Choy, P. Ducy, G. Karsenty, R. Derynck : TGF-beta-induced repression of CBFA I by Smad3 decreases cbfa I and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 20: 2254-2272. (2001)
6. Anderson, RE, G. Sale, FR Appelbaum, TR Chauncey, R. Storb: Allogeneic marrow transplantation for primary myelofibrosis and myelofibrosis secondary to polycythaemia vera or essential thrombocytosis. *Br J Haematol* 98: 1010. (1997)
7. Anger, B., R. Seidler, U. Haug, C. Popp, H. Heimpel: Idiopathic myelofibrosis: a retrospective study of 103 patients. *Haematologica* (75): 228. (1990)
8. Anger, BR, E. Seifried, J. Scheppach, H. Heimpel: Budd-Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases. *Klin Wochenschr* (57): 818. (1989)
9. Arlet, PH, R. Ncodeme, D. Adoue, D. Fournier-Larrgain, G. Delsoi, Y. Le Talleo : Clinical evidence for 1,25-hydroxycholecalciferol action in myelofibrosis. *Lancet* I: 1013. (1984)
10. Avraham, H., N. Banu, DT Scadden, J. Abraham, JE Groopman : Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood* (83): 2126. (1994)
11. Bachleitner-Hofman, T. und H. Gisslinger: The role of interferon- α in treatment of idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol* 78: 533. (1999)

12. Barosi, G.: Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines.
J Clin Oncol (17): 2954. (1999)
13. Barosi, G. und A. Bacigalupo: Allogenic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis.
Curr. Opin Hematol 13(2): 74-78. (2006)
14. Barosi, G., A. Grossi, B. Comotti, P. Musto, G. Gamba, M. Marchetti: Safety and efficacy of thalidomide in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia.
Br J Haematol 114(1): 78-83. (2001)
15. Barosi, G. und R. Hoffman: Idiopathic Myelofibrosis.
Semin Hematol 42(4): 248-258. (2005)
16. Barosi, G., G. Viarengo, A. Pecci, V. Rosti, Piaggio G., M. Marchetti, F. Frassoni: Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia
Blood 98(12): 3249-55 (2001)
17. Bartlett, RP, PR Greipp, A. Tefferi, RE Cupps, BP Mullan, VF Trastek: Extramedullary hematopoiesis manifesting as a symptomatic pleural effusion.
Mayo Clin Proc (70): 1161. (1995)
18. Bevilacqua, MA, DK Lord, NC Cross, KB Whitaker, DW Moss, TM Cox: Regulation and expression of type V (tartrate-resistant) acid phosphatase in human mononuclear phagocytes.
Mol Biol Med 8: 135-140. (1991)
19. Binder, D. und J. Fehr: Myeloproliferative disorders.
Ther Umschau. 61(2): 131-42. (2004)

20. Bock, O., H. Kreipe, U. Lehmann: One-step extraction of RNA from archival biopsies.
Anal Biochem (295): 116-7. (2001)
21. Bock, O., G. Loch, U. Schade, G. Büsche, R. Wasielewski, B. Wiese, H. Kreipe: Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin.
Br J Haematol. 130(1): 76-82. (2005)
22. Bourantas, KL, S. Tsiara, L. Christou, P. Repousis, P. Konstantinidou, M. Bai, K. Seferiadis: Combination therapy with recombinant human erythropoietin, interferon-alpha-2b and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in idiopathic myelofibrosis.
Acta Haematologica 96: 79-82. (1996)
23. Bouruncle BA, D. C. (1962). "Myelofibrosis: clinical, hematologic and pathologic study of 110 patients."
Am J Med Sci(243): 697.
24. Breuer, W., J. Darbes, W. Hermanns, J. Thiele: Idiopathic Myelofibrosis in a Cat and in Three Dogs.
Comp Haematol Int 99: 17-24. (1999)
25. Brogi E., T. Wu, A. Namiki, JM Isner: Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells whereas hypoxia upregulates VEGF expression only.
Circulation (90): 649. (1994)
26. Bruno E., RJ Cooper, EL Wilson, JL Gabilove, R Hoffman: Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of human

megakaryocyte progenitor cells.

Blood (82): 430. (1993)

27. Buhr T., A. Georgii, H. Choritz: Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders. Incidence among subtypes according to the Hannover classification.
Pathol Res Pract (189): 121. (1993)
28. Buhr, T., G. Büsche, H. Choritz, F. Länger, H. Kreipe: Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens."
Am J Clin Pathol. 119 (1): 152-8. (2003)
29. Buhr, T., H. Choritz, A. Georgii: The impact of megakaryocyte proliferation on the evolution of myelofibrosis. Histological follow-up study in 186 patients with chronic myeloid leukaemia.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 420 (6): 473-8. (1992)
30. Burkhardt, R.: Technische Verbesserung im Anwendungsbereich der Histo-Biopsie von Knochenmark und Knochen.
Klin Wochenschr 44: 326. (1966)
31. Burkhardt R., R. Bartl, K. Jäger, B. Frisch, G. Kettner, G. Mahl, M. Sund: Chronic myeloproliferative disorders (CMPD).
Pathol Res Pract 179: 131-86. (1984)
32. Burkhardt R., R. Bartl, K. Jäger, B. Frisch, G. Kettner, G. Mahl, M. Sund: Working classification of chronic myeloproliferative disorders based on histological, haematological and clinical findings.
J Clin Pathol (39): 237. (1986)
33. Cannizzo, S.J., BM Frey, S. Rafii, MA Moore, D. Eaton, M. Suzuki, R. Singh, CA Mack, RG Crystal: Augmentation of blood platelet levels by intratracheal administration of an adenovirus vector encoding

human thrombopoietin cDNA.
Nature Biotech 15: 570-573. (1997)

34. Carlo-Stella, C., M. Cazzola, A. Gasner, G. Barosi, L. Dezza, F. Meloni, P. Pedrazzoli, D. Hoelzer, E. Ascari: Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood 70: 1014-1019. (1987)
35. Carver-Moore K, HE Broxmeyer, SM Luoh, S. Cooper, J. Peng, SA Burstein, MW Moore, FJ de Sauvage: Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin- and c-mpl-deficient mice. Blood 88: 803-808. (1996)
36. Castro-Malaspina, H. : Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. Prog Clin Biol Res 154: 427-54 (1984)
37. Castro-Malaspina H., RE Gay, SC Jhanwar, JA Hamilton, DR Chiarieri, PA Meyers, S. Gay, MA Moore: Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. Blood 59: 1046-1054. (1982)
38. Castro-Malaspina, H., EM Rabellino, A. Yen, RL Nachman, MA Moore: Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. Blood (57): 781. (1981)
39. Centrella, M., MC Horowitz, JM Wozney, TL McCarthy: Transforming growth factor-beta gene family members and bone. Endocr Rev 15: 27-39. (1994)

40. Centurione, L., A. Di Baldassare, M. Zingariello, D. Bosco, V. Gatta, RA Rana, V. Langella, A. Di Virgilio, AM Vannucchi, AR Migliaccio: Increased and pathological emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis GATA-1low mice. *Blood* 104: 3573-3580. (2004)
41. Cervantes, F.: Prognostic factors and current practice in treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia: an update anno 2000. *Pathol Biol (Paris)* (49): 148. (2001)
42. Cervantes, F., G. Barosi, JL Demory, J. Reilly, R. Guarnone, B. Dupriez, A. Pereira, E. Montserrat: Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol* (102): 684. (1998)
43. Cervantes, F., R. Mesa, G. Barosi : New and Old Treatment Modalities in Primary Myelofibrosis. *The Cancer Journal* 13(6): 377-383. (2007)
44. Cervantes, F., M. Rovira, A. Urbano-Ispizua, M. Rozman, E. Carreras, E. Montserrat : Complete remission of idiopathic myelofibrosis following donor lymphocyte infusion after failure of allogeneic transplantation: demonstration of a graft-versus-myelofibrosis effect. *Bone Marrow Transplant* **26**: 697. (2000)
45. Chagraoui, H., E. Komura, M. Tulliez, S. Giraudier, W. Vainchenker, F. Wendling: Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoetin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 100(10): 3495-503. (2002)
46. Chagraoui, H., M. Tulliez, T. Smayra, E. Komura, S. Giraudier, T. Yun, N. Lassau, W. Vainchenker, F. Wendling: Stimulation of

osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO.

Blood (101): 2983-2989. (2003)

47. Chang, AN, AB Cantor, Y. Fujwara, MB Lodish, S. Droho, JD Crispino, SH Orkin: GATA-factor dependence on the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryocytopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 9237-9242. (2002)
48. Cohen-Solal, K., JL Villeval, M. Titeux, S. Lok, W. Vainchenker, F. Wendling : Constitutive expression of Mpl ligand transcript during thrombocytopenia and thrombocytosis. Blood 88: 2578-2866. (1996)
49. Craig, JL, RS Anthony, AC Parker: Circulating progenitor cells in myelofibrosis: the effect of recombinant alpha 2b interferon in vivo and in vitro. Br J Haematol 78: 155-160. (1991)
50. Crawford, SE, V. Stellmach, JE Murphy-Ullrich, SM Ribeiro, J. Lawler, RO Hynes, GP Boivin, N. Bouck: Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. Cell 93: 1159-1170. (1998)
51. Dalley, A., JM Smith, JT Reilly, SM Neil: Investigation of calmodulin and basic growth factor (bFGF) in idiopathic myelofibrosis: evidence for a role of extracellular calmodulin in fibroblast proliferation. Br J Haematol (93): 856. (1996)
52. De Sauvage, FJ, K. Carver-Moore, SM Luoh, A. Ryan, M. Dowd, DL Eaton, MW Moore : Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. J Exp Med 183: 651-656. (1996)

53. Deeg, HJ, TA Gooley, ME Flowers, GE Sale, JT Slattery, C. Anasetti, TR Chauncey, K. Doney, GE Georges, HP Kiem, PJ Martin, EW Petersdorf, J. Radich, JE Sanders, BM Sandmaier, EH Warren, RP Witherspoon, R. Storb, FR Appelbaum: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 102: 3912-8. (2003)
54. Di Raimondo, F., GA Palumbo, S. Molica, R. Giustolisi: Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia* 15: 976-980. (2001)
55. Dingli, D., R. Mesa, A. Tefferi: Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia: New Developments in Pathogenesis and Treatment. *Internal Medicine* 43(7): 540-547. (2004)
56. Ducey, P., T. Schinke, G. Karsenty: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289(1501-1504). (2000)
57. Eastham, JM, JT Reilly, S. MacNeil: Raised urinary calmodulin levels in idiopathic myelofibrosis: possible implications for the aetiology of fibrosis. *Br J Haematol* (86): 668. (1994)
58. Edwards, DR, G. Murphy, JJ Reynolds, SE Whitman, AJ Docherty, P. Angel, JK Heath: Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* (6): 1899. (1987)

59. Elliott, MA, R. Mesa, CY Li, CC Hook, SM Ansell, RM Levitt, SM Geyer, A. Tefferi: Thalidomide treatment in myelofibrosis with myeloid metaplasia.
Br J Haematol 117: 288. (2002)
60. Falk, S., D. Mix, HJ Stutte: The spleen in osteomyelofibrosis. A morphological and immunohistochemical study of 30 cases.
Pathol Anat Histopathol (416): 437. (1990)
61. Fava, RA, DB McClure: Fibronectin-associated transforming growth factor.
J Cell Physiol. 131(2): 184-9. (1987)
62. Fedeli G., M. Certo, O. Cannizzaro, G. Forti, R. Perniola, R. Manna, G. Gambassi: Extramedullary hematopoiesis involving the esophagus in myelofibrosis.
Am J Gastro (85): 1512. (1990)
63. Fielder PJ, AL Gurney, E. Stefanich, M. Marian, MW Moore, K. Carver-Moore, FJ de Sauvage: Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets.
Blood 87: 2154-2161. (1996)
64. Folkman J., Y. Shing: Angiogenesis.
J Biol Chem (267): 10931. (1992)
65. Freson K., K. Devriendt, G. Matthijs, A. Van Hoof, R. De Vos, C. Thys, K. Minner, MF Hoylaerts, J. Vermeylen, C. Van Geet: Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA-1 mutation.
Blood 98: 85-92. (2001)
66. Frey, BM, S. Rafii, M. Teterson, D. Eaton, RG Crystal, MA Moore: Adenovector-mediated expression of human thrombopoietin cDNA in immune-compromised mice: Insights into the pathophysiology of

osteomyelofibrosis.

J Immunol (160): 691-699. (1998)

67. Frisch, B., R. Bartl, R. Burkhardt, K. Jäger: Histologic criteria for classification and differential diagnosis of chronic myeloproliferative disorders.
Haematologica 17(2): 209-26. (1984)
68. Frisch, B., R. Bartl, R. Burkhardt, K. Jäger, G. Mahl, G. Kettner: Classification of myeloproliferative disorders by bone marrow histology.
Bibl. haematol. (50): 57. (1984)
69. Garcia-Riego, A., C. Cuinas, JJ Vilanova, R. Ibarrola : Extramedullary hematopoietic effusions.
Acta Cytol 42: 1116. (1998)
70. Garimella, R., MA Kacena, SE Tague, J. Wang, MC Horowitz, HC Anderson : Expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in the bone marrow megakaryocytes of GATA-1(low) mice: a possible role in osteosclerosis.
J. Histochem. Cytochem. 55: 745-752. (2007)
71. Georgii, A., G. Buesche, A. Kreft: The histopathology of chronic myeloproliferative diseases.
Baillieres Clin Haematol. 11: 721-49. (1998)
72. Georgii A., G. Buesche, A. Kreft , H. Choritz: Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies.
Leuk Lymphoma (22): 15. (1996)
73. Georgii, A., KF Vykoupil, T. Buhr, H. Choritz, U. Döhler, V. Kaloutsis, M. Werner: Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow

biopsies.

Pathol Res Pract (186): 3-27. (1990)

74. Georgii, A., KF Vykoupil, J. Thiele: Classification of chronic myeloproliferative diseases by bone marrow biopsies. Haematological and cytogenetic findings and clinical course. Bibl. haematol. (50): 41. (1984)
75. Gilbert, H. S.: Long term treatment of myeloproliferative disease with interferon-alpha-2b. Feasibility and efficiency. Cancer 83: 1205. (1998)
76. Greenberg, BR, L. Woo, IC Veomett, CM Payne, FR Ahmann: Cytogenetics of bone marrow fibroblastic cells in idiopathic myelofibrosis. Br J Haematol 66: 487-490. (1987)
77. Groet, J., S. McElwaine, M. Spinelli, A. Rinaldi, I. Burtcher, C. Mulligan, A. Mensah, S. Cavani, F. Dagna-Bicarelli, G. Basso, FE Cotter, D. Nizetic: Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's Syndrome with transient myeloid disorder. Lancet 361: 1617-1620. (2003)
78. Guardiola, P., JE Anderson, G. Bandini, F. Cervantes, V. Runde, W. Arcese, A. Bacigalupo, D. Przepiorka, MR O'Donnell, P. Polchi, A. Buzyn, L. Sutton, D. Cazals-Hatem, G. Sale, T. de Witte, HJ Deeg, E. Gluckmann: Allogenic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European group for blood and bone marrow transplantation, Societe francaise de greffe de moelle, gruppo italiano per il trapianto del midollo osseo and Fred Hutchinson cancer research center collaborative group." Blood (93): 2831-2838. (1999)

79. Haedersdahl, C., H. Hasselbach, A. Devantier, K. Saunamäki: Pericardial haematopoiesis with tamponade in myelofibrosis. *Scand J Haematol* (34): 270. (1985)
80. Halleen, JM, TA Hentunen, J. Hellman, HK Väänänen: Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. *J Bone Miner Res* 11: 1444-1452. (1996)
81. Halleen, JM, SL Alatalo, AJ Janckila, HW Woitge, MJ Seibel, HK Väänänen: Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem* 47: 597-600. (2001)
82. Han, ZC, S. Bellucci, HY Wan, JP Caen: New insights into the regulation of megakaryocytopoiesis by haemopoietic and fibroblastic growth factors and transforming growth factor beta-1. *Br J Haematol* (81): 1. (1992)
83. Hasselbach, HC, OW Bjerrum, BA Jensen, NT Clausen, PB Hansen, H. Birgens, MH Therkildsen, E. Ralfkiaer: Imatinib Mesylate in Idiopathic and Postpolycythemic Myelofibrosis." *Am J Haematol* 74: 238. (2003)
84. Hasselbach, HC, P. Junker, K. Horslev-Paterson, I. Lisse, KD Bentsen: Procollagen type III aminoterminal peptide in serum in idiopathic myelofibrosis and allied conditions. *AM J Hematol* 33: 18. (1990)
85. Hasselbach HCund I. Lisse: A sequential histological study of bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis. *Eur J Haematol* (46): 285. (1991)
86. Hasselbach, HC, HT Mourits-Andersen, BA Jensen, MK Jensen, OJ Nielsen: "The chronic Philadelphia chromosome-negative

- myeloproliferative syndrome I, pathogenesis and pathophysiology.
Ugeskr Laeger 163: 2471. (2001)
87. Heuck, G.: Zwei Falle von Leukämie mit eigenthumlichem Blut- resp: Knochenmarksbefund.
Arch Pathol Anat Physiol Virchows 78: 475-496. (1879)
88. Hofbauer, LC: Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism.
Eur J Endocrinol 141: 195-210. (1999)
89. Hunstein, W., C. Hauswaldt: Die Osteomyelofibrose.
Klin. Wochenschr (52): 305. (1974)
90. Ignatz, RA und J. Massagué: Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix.
J Biol Chem (261): 4337. (1986)
91. Ivanyi; JL, M. Mahunka, A. Papp, A. Kiss, B. Telek: Prognostic significance of bone marrow reticulin fibres in idiopathic myelofibrosis: evaluation of clinicopathological parameters in a scoring system.
Haematologica (26): 75. (1994)
92. Jaffe ES, N. Harris, H. Stein, JW Vardiman JW (2001). Classification of Tumors, Pathology & Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon/France, IARC. 16-44. (2001)
<http://www.springerlink.com/content/e8jf1vfgep74hjva/>
(Zuletzt abgerufen am 31.07.2011)
93. Jamshidi K und WR Swaim: Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device.
J Lab Clin Med 77: 335-42. (1971)

94. Jensen MK, M. Holten.-Andersen, R. Riisbro R., P. de Nully Brown, MB Larsen, L. Kjeldsen, L. Heickendorff, N. Brünner, HC Hasselbalch: Elevated plasma levels of TIMP-1 correlate with plasma suPAR/uPA in patients with chronic myeloproliferative disorders. Eur J Haematol (71): 377-384. (2003)
95. Jufresa J, J. Alegre, MC Ruiz Marcellan, JM Surinach, A. Marqués, T. Fernandez de Sevilla (1996) : Cutaneous vasculitis during primary myelofibrosis. An Med Interna (13): 494. (1996)
96. Kacena MA, RA Shivdasani, K. Wilson, Y. Xi, N. Troiano, A. Nazarian, CM Gundberg, ML Bouxsein, JA Lorenzo, MC Horowitz : Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2. J Bone Miner Res (19): 652-660. (2004)
97. Kakumitsu H., K. Kamezaki, K. Shimoda K., K. Karube, T. Haro, A. Numata, K. Shide, T. Matsuda, K. Oshima, M. Harada: Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. Leuk Res (29): 761-769. (2005)
98. Kaminsky, A. M.: Proliferation und Apoptose im Knochenmark bei der chronischen idiopathischen Myelofibrose (CIMF) nach allogener Stammzelltransplantation (ASZT). Institut Pathologie. Köln, Köln: 3-31. (2005)
http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=994521340&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=9

99. Katoh O., A. Kimura, T. Itoh, A. Kuramoto: Platelet derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megakaryocytes in patients with myeloproliferative disorders.
American journal of Hematology (35): 145-150. (1990)
100. Kaushansly, K.: Thrombopoietin, the primary regulator of platelet production.
Blood (86): 419-431. (1995)
101. Kimura A., O. Katoh, H. Hyodo, A. Kuramoto, Y. Satow: Platelet derived growth factor expression, myelofibrosis and chronic myelogeneous leukemia.
Leuk Lymphoma (18): 237-242. (1995)
102. Klagsburn, M. (1998). "The fibroblast growth factor family: structural and biological properties."
Prog Growth Factor Res (1): 207.
103. Kreft A., B. Wiese, M. Weiss, H. Choritz, T. Buhr, G. Büsche, A. Georgii: Analysis of risk factors of the evolution of myelofibrosis: A retrospective study based on follow-up biopsies of 70 patients by using the RECPAM method.
Leuk Lymphoma (45): 553-559. (2004)
104. Kröger N. und RA Mesa: Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis.
Leukemia 22(3): 474-86. (2008)
105. Kröger, N., T. Zabelina, H. Schieder, J. Panse, F. Ayuk, N. Stute, N. Fehse, O. Waschke, B. Fehse, HM Kvasnicka, J. Thiele, A. Zander: Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in

patients with myelofibrosis.

Br J Haematol 128: 690-7. (2005)

106. Kvasnicka, H. M., J. Thiele, C Regn, R. Zankovich, V. Diehl, R. Fischer: Prognostic impact of apoptosis and proliferation in idiopathic (primary) myelofibrosis.
Ann Hematol (78): 65. (1999)
107. Kvasnicka HM, J. Thiele, A. Schmitt-Graeff, HE Schaefer: Prognostische Faktoren und Überlebenszeiten bei chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (CMPE).
Pathologe (21): 63. (2000)
108. Kvasnicka HM, J. Thiele, C. Werden, R. Zankovich, V. Diehl, R. Fischer: Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis.
Cancer (80): 708. (1997)
109. Laiho M., O. Saksela, J. Keski-Oja: Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor.
J Biol Chem (262): 17467. (1987)
110. Landolfi R., C Jr Colosimo, E. De Candia, MA Castellana, R. De Cristofaro, L. Trodella, G. Leone : Meningeal hematopoiesis causing exophthalmus and hemiparesis in myelofibrosis: Effect of Radiotherapy.
Cancer (62): 2346. (1998)
111. Le Bousse-Kerdiles MC, S. Chevillard, A. Charpentier, N. Romquin, D. Clay, F. Smadja-Joffe, V. Praloran, B. Dupriez, JL Demory, C. Jasmin, MC Martyré : Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia.
Blood 88: 4534-4546. (1996)

112. Le Bousse-Kerdiles, MC, MC Martyré, M. Samson: Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review.
Eur. Cytokine Netw. 19(2): 69-80. (2008)
113. Le Bousse-Kerdiles, MC und MC Martyré: Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis.
Ann Hematol (78): 437-444. (1999)
114. Le Bousse-Kerdiles, MC und MC Martyré: Myelofibrosis: Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia.
Springer Semin Immunopathol (21): 491-508. (2000)
115. Le Bousse-Kerdiles, MC und MC Martyré: Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis.
Pathol Biol (Paris) 49: 153-157. (2001)
116. Lee, CG, RJ Homer, Z. Zhu, S. Lanone, X. Wang, V. Koteliansky, JM Shipley, P. Gotwals, P. Noble, Q. Chen, RM Senior, JA Elias: Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1).
J Exp Med (194): 809-821. (2001)
117. Li M., A. Hatzfeld, EL Brown, H. Sookdeo, B. Panterne, JP Levesque, T. O'Toole, SC Clark, J. Hatzfeld: Autocrine transforming growth factor- α controls G0 phase of early human hematopoietic progenitors in serum- or serum-free culture.
Blood cell growth factors. M. M. Jr. Dayton, AlphaMed: 228. (1991)
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.5530090723/abstract>
(Zuletzt abgerufen am 31.07.2011)

118. Li, X, J. Gong, E. Feldman, K. Seiter, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz
"Apoptotic cell death during treatment of leukemias."
Leuk Lymphoma (13 Suppl 1): 65-70. (1994)
119. Link, H. :Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen.
Onkologe 3 (Suppl 1): 1. (1997)
120. Long, MW, JA Robinson, EA Ashcraft, KG Mann: Regulation of
human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic
growth factors.
J Clin Invest (95): 881. (1995)
121. Lopez-Casillas, F., S.- Cheifetz, J. Doody, JL Andres, WS Lane, J.
Massagué: Structure and expression of the membrane proteoglycan
betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system.
Cell (67): 785. (1991)
122. Lövgenberg, E., A. Wahlin, G. Roos, A. Ost: Reversal of
myelofibrosis by hydroxyurea.
Eur J Haematol (44): 33. (1990)
123. Lutz, MA: Sequenzbiopsien und Verlaufsbeobachtung bei der
idiopathischen/primären Myelofibrose zum Problem des präfibrösen
Initialstadiums und der Dynamik der Markfibrose.
Bremen. (2003)
<http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/1080/> (Zuletzt abgerufen
am 31.07.2011)
124. Manoharan, A., R. Horsley, W.R. Pitney: The reticulin content of
bone marrow in acute leukaemia in adults.
Br J Haematol (43): 185. (1979)
125. Manoharan A. und WR Pitney: Chemotherapy resolves symptoms
and reverses marrow fibrosis in myelofibrosis.
Scand J Haematol (33): 453. (1984)

126. Martyré, MC: TGF-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferativ disorders.
Leuk Lymphoma (20): 39. (1995)
127. Martyré, MC, N. Romquin, MC Le Bousse-Kerdiles, S. Chevillard, B. Benyahia, B. Dupriez, JL Demory, F. Bauters: Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis."
Br J Haematol (88): 9. (1994)
128. Martyré, MC, MC Le Bousse-Kerdiles, N. Romquin, S. Chevillard, V. Praloran, JL Demory, B. Dupriez : Elevated levels of basic growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis.
Br J Haematol (97): 441-448. (1997)
129. Martyré, MC, H. Magdalenat, MC Bryckaert, C. Laine-Bidron, F. Calvo: Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia.
Br J Haematol (77): 80. (1991)
130. Martyré, MC, V. Stenou, MC Le Bousse-Kerdiles, J. Wietzerbin: Lack of alteration in GATA-1 expression in CD34+ hematopoietic progenitors from patients with idiopathic myelofibrosis.
Blood (101): 5087-5088. (2003)
131. Matsukawa, Y.: Treatment of idiopathic myelofibrosis.
Ann Hematol (79): 646. (2000)
132. McCarthy, JM: Transplant strategies for Idiopathic Myelofibrosis.
Semin Hematol (41): 23. (2004)

133. Mellibovsky, L., ML Marinoso, F. Cervantes, C. Besses, M. Nacher, X. Nogués, L. Florensa, A. Munné, A. Diez-Perez, S. Serrano: Relationship among densitometry, bone histomorphometry, and histologic stage in idiopathic myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant* (34): 330-335. (2004)
134. Mesa, RA: The therapy of myelofibrosis: targeting pathogenesis. *Int J Hematol.* (76 Suppl 2): 296-304 (2002)
135. Mesa, RA, G. Barosi, F. Cervantes, JT Reilly, A. Tefferi: Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Disease overview and non-transplant treatment options. *Best Pract Res Clin Haematol.* **19**(3): 495-517. (2006)
136. Mesa RA, CA Hanson, SV Rajkumar, G. Schroeder, A. Tefferi: Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* (96): 3374-3380. (2000)
137. Mesa RA und A. Tefferi: Palliative splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk Lymphoma* (42): 901. (2001)
138. Mesa RA, A. Tefferi, MA Elliott, HC Hoagland, TG Call, GS Schroeder, SY Yoon, CY Li, LA Gray, S. Margolin, CC Hook: A phase II trial of pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone), a novel antifibrosing agent, in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* (**114**): 111-113. (2001)
139. Michiels, JJ: Diagnostic criteria of the myeloproliferative disorders (MPD): essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and chronic megakaryocytic granulocytic metaplasia. *Neth J Med* (51): 57. (1997)

140. Michiels, JJ, J. Kutti, P. Stark, M. Bazzan, L. Gugliotta, R. Marchioli, M. Griesshammer, PJ van Genderen, J. Briere, JJ Kiladjian, T. Barbui, G. Finazzi, NI Berlin, TC Pearson, AC Green, SM Fruchtmann, RT Siver, E. Hansmann, A. Wehmeier, E. Lengfelder, R. Landolfi, HM Kvasnicka, H. Hasselbalch, F. Cervantes, J. Thiele: Diagnosis, pathogenesis and treatment of the myeloproliferative disorders essential thrombocythaemia, polycythemia vera and essential megakaryocytic granulocytic metaplasia and myelofibrosis. *Neth J Med* (54): 46. (1999)
141. Michiels, JJ, H. de Raeve, Z. Berneman, D. van Bockstaele, K. Hebeda, K. Lam, W. Schroyens: The 2001 World Health Organization and Updated European Clinical and Pathological Criteria for the Diagnosis, Classification, and Staging of the Philadelphia Chromosome-Negative Chronic Myeloproliferative Disorders. *Semin Thromb Hemost.* (32): 307-340. (2006)
142. Michiels, JJ und J. Thiele: Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia). *Int J Hematol.* (76): 133-45. (2002)
143. Migliaccio, AR, F. Martelli, M. Verruci, G. Migliaccio, AM Vannucchi, H. Ni, M. Xu, Y Jiang, V. Nakamoto, T. Papayannopoulou, R. Hoffmann: Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with primary myelofibrosis and in the GATA1^{low} mouse model of the disease. *Exp Hematol* (36): 158-171. (2008)
144. Minkin, C.: Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* (34): 285-290. (1982)

145. Moller, DR, M. Wysocka, BM Greenlee, X. Ma, L. Wahl, DA Flockhart, G. Trinchieri, CL Karp: Inhibition of IL-12 production by thalidomid.
J Immunol (159): 5157. (1997)
146. Moreira, AL, EP Sampaio, A. Zmundzinas, P. Frindt, KA Smith, G. Kaplan: Thalidomid exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation.
J Exp Med (177): 1675. (1993)
147. Moscatelli, D.: Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells.
J Cell Biol. (107): 753. (1988)
148. Munger, JS, X. Huang, H. Kawakatsu, MJ Griffiths, SL Dalton, J. Wu, JF Pittet, N. Kaminiski, C. Garat, MA Matthay, DB Rifkin, D. Sheppard: The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF-beta1: A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.
Cell (96): 319-328. (1999)
149. Nichols, KE, JD Crispino, M. Poncz, JG White, SH Orkin, JM Maris, MJ Weiss : Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocythaemia due to an inherited mutation in GATA-1.
Nat Genet (24): 266-270. (2000)
150. Novetsky A., JC Wang, C. Chen: Plasma VEGF levels in patients with primary myelofibrosis and other myeloproliferative disorders.
Blood (90). (1997)
151. Ohneda K. und M. Yamamoto: Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage.
Acta Haematologica (108): 237-245. (2002)

152. Ohwada A., S. Rafii, MA Moore, RG Crystal : In vivo adenovirus vector-mediated transfer of the human thrombopoietin cDNA maintains platelet levels during radiation- and chemotherapy induced bone marrow suppression.
Blood **88**: 778-784. (1996)
153. Olatoyosi Odenike und A. Tefferi: Conventional and New Treatment Options for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia.
Semin Oncol **32**: 422-431. (2005)
154. Oliver, LJ, DB Rifkin, JL Gabrielove, MJ Hannocks, EL Wilson: Long-term culture of human bone marrow stromal cells in the presence of basic fibroblast growth factor.
Growth Factors (3): 231. (1990)
155. Ozen S., B. Ferhanoglu, M. Senocak, N. Tuzuner: Idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia): clinicopathological analysis of 32 patients.
Leuk Res (21): 125. (1997)
156. Pearson, CA, D. Pearson, S. Shibahara, J. Hofsteenge, R. Chiquet-Ehrismann: Tenascin: cDNA cloning and introducing by TGF-beta.
EMBO J (7): 2977. (1998)
157. Pelus, LM, H. Biang, AG King, S. Fukuda: Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRO-beta/CXCL2 and GRO-betaT/CXCL2-delta-4.
Blood (103): 110-119. (2004)
158. Pettigrew, JD, HP Ward: Correlation of radiologic, histologic, and clinical findings in agnogenic myeloid metaplasia.
Radiology (93): 541. (1969)

159. Pevny, L., MC Simon, E. Robertson, WH Klein, SF Tsai, V. D'Agati, SH Orkin, F. Costantini: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1.
Nature (349): 257-260. (1991)
160. Rameshwar P., TN Denny, D. Stein, P. Gascón: Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines: Potential role for interleukin-1 and TGF-beta.
J Immunol (153): 2819-2830. (1994)
161. Reilly, JT, D. Barnett, G. Dolan, P. Forrest, J. Eastham, A. Smith: Characterisation of an acute micromegakaryocytic leukaemia: evidence for the pathogenesis of myelofibrosis.
Br J Haematol (83): 58. (1993)
162. Reilly, JT: Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: Role of growth factors.
J. Clin. Pathol. (45): 461-464. (1992)
163. Reilly, JT: Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management.
Blood Rev (11): 233. (1997)
164. Richard, C., F. Mazon, A. Iriando, E. Mazo, C. Bello, A. Zubizanetta: The usefulness of 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)₂VitD₃) in the treatment of idiopathic myelofibrosis.
Br J Haematol (62): 399. (1986)
165. Sacchi, S.: The role of alpha-interferon in essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM): A concise update.
Leuk Lymphoma (19): 13. (1995)

166. Schaefer, HE: How to fix, decalcify and stain paraffin embedded Bone Marrow biopsies.
Pathology of the bone marrow. H. K. Lennert K. Stuttgart, Springer Verlag. (1984)
167. Schaefer, HE: Die histologische Bearbeitungstechnik von Beckenkammbiopsien auf der Basis von Entkalkung und Paraffineinbettung unter Berücksichtigung osteologischer und hämatologischer Fragestellungen.
Pathologe (16): 11-27. (1995)
168. Schmidt, A., O. Blanchet, M. Dib, MF Baslé, N. Ifrah, D. Chappard: Bone changes in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a histomorphometric and microcomputed tomographic study.
Eur J Haematol. (78): 500-509. (2007)
169. Schmitt A., H. Jouault, J. Guichard, F. Wendling, A. Drouin, EM Cramer: Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis.
Blood (96): 1342-1347. (2000).
170. Schmitz, B., J. Thiele, O. Witte, R. Kaufmann, C. Wickenhauser, F. Kuhn-Regnier, R. Fischer: Megacaryocytes and fibroblasts- interactions as determined in normal human bone marrow specimens.
Leuk Res 19(9): 629-37. (1995)
171. Schmitz, B., C. Wickenhauser, J. Thiele, S. Frimpong, C. Brockbals, B. Selbach, C. Mueller, R. Fischer: Megakaryocyte induced fibroblast proliferation is enhanced by costimulation with IL-6/IL-3 and dependent on secretory and adhesion events.
Leuk Res 23(8): 723-9. (1999)

172. Scott B. und HJ Deeg: Hematopoietic cell transplantation as curative therapy of myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders.
Best Pract Res Clin Haematol. 19(3): 519-533. (2006)
173. Shehata M., JD Schwarzmeier, M. Hilgarth, R. Hubmann, M. Duechler, H. Gisslinger: TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia.
J. Clin. Invest (113): 676-685. (2004)
174. Shivdasani RA, Y. Fujiwara, MA McDevitt, SH Orkin: A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth.
EMBO J (16): 3965-3973. (1997)
175. Simonet, WS, DL Lacey, CR Dunstan, M. Kelley, MS Chang, R. Lüthy, HQ Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, HL Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, TM Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, WJ Boyle : Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.
Cell (89): 309-319. (1997)
176. Smith, BD und AR Moliterno: Biology and management of idiopathic myelofibrosis.
Curr. Opin Oncol (13): 91. (2001)
177. Solar, GP, WG Kerr, FC Ziegler: Role of c-mpl in early hematopoiesis.
Blood (92): 4-10. (1998)

178. Steensma, DP, RA Mesa, CY Li, L. Gray, A. Tefferi: Etanercept, a soluble tumor necrosis factor, palliates constitutional symptoms in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of a pilot study.
Blood **99**: 2252. (2002)
179. Stein, RS: Relevance of prognostic features in myeloid metaplasia to selection of patients for bone marrow transplantation.
Blood (89): 2219. (1997)
180. Strupp, C., U. Germing, A. Scherer, A. Kündgen, U. Mödder, N. Gattermann, R. Haas: Thalidomid for the treatment of idiopathic myelofibrosis.
Eur J Haematol (72): 52. (2004)
181. Subramanian M., P. Frenette, S. Saffaripour: Defects in hemostasis in P-selectin deficient mice.
Blood (87): 1238-1242. (1996)
182. Takai, H. M. Kanematsu, K. Yano, E. Tsuda, K. Higashio, K. Ikeda, K. Watanabe, Y. Yamada: Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells.
J Biol Chem (273): 27091-27096. (1998)
183. Taksin, AL, JP Couedic, I. Dusanter-Fourt, A. Massé, S. Giraudier, A. Katz, F. Wendling, W. Vainchenker, N. Casadevall, N. Debili: Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L.
Blood (93): 125-139. (1999)
184. Tefferi, A.: Myelofibrosis with myeloid metaplasia.
N Engl J Med (342): 1255-1265 (2000)

185. Tefferi, A. : Thrombopoietin expression and plasma concentrations in chronic myeloproliferative disorders.
Leuk Res (27): 121-123. (2003)
186. Tefferi, A.: Treatment approaches in myelofibrosis with myeloid metaplasia: the old and the new.
Semin Hematol (40): 18. (2003)
187. Tefferi, A.: Pathogenesis of Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia.
Journal of Clinical Oncology 23(33): 8520-8527. (2005)
188. Tefferi, A.: Primary myelofibrosis and its paraneoplastic stromal effects.
Haematologica 92(5): 577-579. (2007)
189. Tefferi, A., MA Elliott, SY Yaou, CY Li, RA Mesa, TG Call, A. Dispenzieri: Clinical and bone marrow effects of interferon alpha therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia.
Blood (97): 6. (2001)
190. Tefferi, A., MN Silverstein, P. Noel: Agnogenic myeloid metaplasia.
Sem Oncol (22): 327. (1995)
191. Tefferi, A. und JW Vardiman: Classifications and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms.
Leukemia 22(1): 14-22. (2008)
192. Teitelbaum, SL: Bone resorption by osteoclasts.
Science (289): 1504-1508. (2008)

193. Terui, T., Y. Niitsu, K. Mahara, Y. Fujisaki, Y. Urushizaki, Y. Mogi, Y. Kohgo, N. Watanabe, M. Ogura, H. Saito: The production of transforming growth factor-beta in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implication in myelofibrosis. *Blood* (75): 1540. (1990)
194. Thiele, J., AC Ballard, A. Georgii, KF Vykoupil: Chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis: an electron microscopic study I Megakaryocytes and thrombocytes. *Virchows Arch* (373): 191. (1977)
195. Thiele, J., FG Bennewitz, HP Bertsch, S. Falk, R. Fischer, HJ Stutte: Splenic haematopoiesis in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis: immunohistochemical and morphometric evaluation of proliferative activity of erythro- and endoreduplicating capacity of megakaryopoiesis (PCNA- and Ki-67 staining). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 64(5): 281. (1993)
196. Thiele, J. und R. Fischer: Histomorphologische Befunde am Knochenmark bei chronischen myeloproliferativen Erkrankungen. *Z Hautkr* (64): 903. (1989)
197. Thiele, J. und R. Fischer: Megakaryocytopoiesis in haematological disorders: diagnostic features of bone marrow biopsies. An overview. *Virchows Arch* (A) (418): 87. (1991)
198. Thiele, J., B. Hoepfner, S. Wienhold, G. Schneider, R. Fischer: Osteoclasts and Bone Remodeling in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Path Res Pract* (184): 591-599. (1989)
199. Thiele, J., B. Hoepfner, R. Zankovich, R. Fischer, V. Diehl: Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic idiopathic

- (primary) myelofibrosis.
Ann Hematol (80): 160. (2001)
200. Thiele, J., B. Hoepfner, R. Zankovich, R. Fischer: Histomorphometry of bone marrow biopsies in primary osteomyelofibrosis/-sclerosis (agnogenic myeloid metaplasia)-correlations between clinical and morphological features.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol (415): 191-202. (1989)
201. Thiele, J. und HM Kvasnicka: Thrombocytosis versus thrombocythemia-differential diagnosis of elevated platelet count.
Pathologe (21): 31. (2000)
202. Thiele, J. und HM Kvasnicka: Chronische myeloproliferative Systemerkrankungen. Die neue WHO-Klassifikation.
Pathologe (22): 429-443. (2001)
203. Thiele, J. und HM Kvasnicka: CD34+ stem cells in chronic myeloproliferative disorders.
Histol and Histopathol (17): 507. (2002)
204. Thiele, J. HM Kvasnicka, B. Boeltken: Resident bone marrow macrophages in idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF): a histochemical and morphometric study on sequential trephine biopsies.
Leuk Lymphoma (33): 295. (1999)
205. Thiele, J., HM Kvasnicka, B. Boeltken, R. Zankovich, V. Diehl, R. Fischer: Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) - a clinicopathological study.
Leukemia (13): 1741-8. (1999)
206. Thiele, J., HM Kvasnicka, C. Czeslick: CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification

between spleen and bone marrow tissue.

Ann Hematol (81): 86. (2002)

207. Thiele, J., HM Kvasnicka, S. Falk, HP Bertsch, R. Fischer, HJ Stutte: Splenic megakaryocytopoiesis in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis. Acta Haematologica (87): 176. (1992b)
208. Thiele, J., HM Kvasnicka, R. Fischer: Histochemistry and morphometry on bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders- aids to diagnosis and classification. Ann Hematol (78): 495-506. (1999)
209. Thiele, J., HM Kvasnicka, A. Schmitt-Graeff, TK Zirbes, F. Birnbaum, C. Kressmann, M. Melguizo-Grahmann, H. Frackenpohl, C. Sprungmann, LD Leder, V. Diehl, R. Zankovich, HE Schaefer, N. Niederle, R. Fischer: Bone marrow features and clinical findings in chronic myeloid leukemia- a comparative, multicenter, immunohistological and morphometric study on 614 patients. Leuk Lymphoma (36): 295-308. (2000)
210. Thiele, J., HM Kvasnicka, BR Titius, U. Parpert, R. Nebel, R. Zankovich, R. Fischer : Histological features of prognostic significance in CML-an immunohistochemical and morphometric study (multivariate regression analysis) on trephine biopsies of the bone marrow. Ann Hematol (66): 291-302. (1993)
211. Thiele, J., HM Kvasnicka, C. Werden, R. Zankovich, V. Diehl, R. Fischer: Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. Leuk Lymphoma (22): 303. (1996)

212. Thiele, J., HM Kvasnicka, R. Zankovich, V. Diehl: Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* (85): 1126-1134. (2000)
213. Thiele, J., T. Kuemmel, C. Sander, R. Fischer: Ultrastructure of the bone marrow tissue in so-called primary (idiopathic) myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia). 1. Abnormalities of megakaryopoiesis and thrombocytes. *J Submicrosc Cytol Pathol* (23): 93. (1991)
214. Thiele, J. und HM Kvasnicka: Chronic myeloproliferative disorders. The new WHO classification; Chronische myeloproliferative Systemerkrankungen - Die neue WHO-Klassifikation. *Pathologe* 22(6): 429-443. (2001)
215. Thiele, J. und HM Kvasnicka: Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol.* 82(3): 148-152. (2003)
216. Thiele, J. und HM Kvasnicka: Diagnostic differentiation of essential thrombocythaemia from thrombocythaemias associated with chronic idiopathic myelofibrosis by discriminate analysis of bone marrow features-a clinicopathological study on 272 patients. *Histol Histopathol.* 18(1): 93-102. (2003)
217. Thiele, J., HM Kvasnicka, H. Dietrich, G. Stein, M. Hann, A. Kaminski, N. Rathjen, KA Metz, DW Beelen, M. Ditschkowski, A. Zander, N. Kroeger: Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell

transplantation.

Histol Histopathol. 20(3): 879-89. (2005)

218. Thiele, J., V. Rompcik, S. Wagner, R. Fischer: Vascular architecture and collagen type IV in primary myelofibrosis and polycythaemia vera: an immunomorphometric study on trephine biopsies of the bone marrow.
Br J Haematol (80): 227. (1992)
219. Thiele, J., T. Steinberg, R. Zankovich, R. Fischer: Primary myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia): correlation of clinical findings with bone marrow histopathology and prognosis.
Anticancer Res (9): 429. (1989)
220. Thiele, J., BR Titius, C. Kopsidis, R. Fischer: Aypical micromegakaryocytes, promegakaryoblasts and megakaryoblasts: a critical evaluation by immunohistochemistry, cytochemistry and morphometry of bone marrow trephines in chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.
Virchows Arch B Cell Pathol Inc Mol Pathol (62): 275 -82. (1992)
221. Thiele J, W. R., Kvasnicka HM, Titius BR, Zankovich R, Fischer R, (1994). "Erythropoiesis in primary (idiopathic) Osteomyelosclerosis: quantification, PCNA-reactivity, and prognostic impact."
Am J Haematol(46): 36.
222. Thiele, J., S. Wienhold, R. Zankovich, R. Fischer: A histomorphometric analysis of trephine biopsies of bone marrow from 65 patients with chronic myeloid leukemia. Classification of patients into subgroups with different survival patterns.
Anal Quant Cytol Histol (12): 103-16. (1990)

223. Thiele, J., R. Zankovich, T. Steinberg, R. Fischer, V. Diehl: Agnogenic myeloid metaplasia (AMM)-correlation of bone marrow lesions with laboratory data: a longitudinal clinicopathological study on 114 patients.
Hematol Oncol (7): 327-343. (1989)
224. Tsai, JC, CK Goldman, GY Gillepsie: Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF, and bFGF.
J Neurosurg (82): 864. (1995)
225. Tsang, AP, Y. Fujwara, DB Hom, SH Orkin : Failure of megakaryocytopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG.
Genes Dev (12): 1176-1188. (1998)
226. Ueno, H., R. Yoneda, W. Ogawa, S. Yoon, S. Kitazawa, R. Kitazawa, M. Kasuga: Bilateral interstitial pneumonic shadows caused by pervascular fibrosis and extramedullary megakaryopoiesis of the lung in a case of advanced agnogenic myeloid metaplasia and myelofibrosis.
Acta Haematologica (104): 212. (2000)
227. Ulich TR, J. Delcastillo, G. Senaldi, O. Kinstler, S. Yin, S. Kaufman, J. Tarpley, E. Choi, T. Kirley, P. Hunt, WP Sheridan: Systemic hematologic effects of PEG-rHuMDGF-induced megakaryocyte hyperplasia in mice.
Blood (87): 5006-5015. (1996)
228. Vannucchi AM, L. Bianchi, AR Migliaccio AR: Reduced GATA-1 content in megakaryocytes of patients with idiopathic myelofibrosis.
Blood (102): 663. (2003)

229. Vannucchi AM, L. Bianchi, F. Paoletti, V. Di Giacomo, G. Migliaccio, AR Migliaccio: Impaired GATA-1 expression and myelofibrosis in an animal model.
Pathol Biol (52): 275-279. (2004)
230. Vannucchi AM, AR Migliaccio, F. Paoletti, H. Chagraoui, F. Wendling: Pathogenesis of Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia: Lessons from Mouse Models of the Disease.
Semin Oncol (32): 365-372. (2005)
231. Vannucchi AM, L. Bianchi, C. Cellai, F. Paoletti, RA Rana, R. Lorenzini, G. Migliaccio, AR Migliaccio : Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1 (low)mice).
Blood (100): 1123-1132. (2002)
232. Vannucchi AM, A. Pancrazzi, P. Guglielmelli, S. Di Lollo, C. Bogani, G. Baroni, L. Bianchi, AR Migliaccio, A. Bosi, F. Paoletti: Abnormalities of GATA-1 in megakaryocytes from patients with idiopathic myelofibrosis.
AM J Clin Pathol. 167(3): 849-858 (2005)
233. Varki A., R. Lottenberg, R. Griffith, E. Reinhard: The syndrome of idiopathic myelofibrosis: a clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival.
Medicine (62): 353-371 (1983)
234. Villeval JL, K. Cohen-Sulal, M. Tulliez, S. Giraudier, J. Guichard, SA Burstein, EM Cramer, W. Vainchenker, F. Wendling : High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice.
Blood (90): 4369-4383. (1997)

235. Vyas P., K. Ault, CW Jackson, SH Orkin, RA Shivdasani: Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* (93): 2867-2875. (1999)
236. Wang JC, C. Chen, LH Lou, M. Mora: Blood thrombopoietin, IL-6 and IL-11 levels in patients with agnogenic myeloid metaplasia. *Leukemia* (11): 1827. (1997)
237. Wang JC, A. Novetsky, C. Chen, AD Novetsky: Plasma matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in patients with agnogenic myeloid metaplasia or idiopathic primary myelofibrosis. *Br J Haematol* (119): 709-712. (2002)
238. Wang JC, K. Hemavathy, W. Charles, H. Zhang, PK Dua, AD Novetsky, T. Chang, C. Wong, M. Jabara: Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp Hematol* 32(10): 905-10. (2004)
239. Wang JC, HD Lang, S. Lichter, M. Weinstein, P. Benn: Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol* (80): (184-188). (1992)
240. Ward HP, MH Block: The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of it relationship with the myeloproliferative syndrome. *Medicine (Baltimore)* (50): 357. (1971)
241. Wickenhauser C., B. Schmitz, SE Baldus, F. Henze, P. Farahmand, S. Frimpong, J. Thiele, R. Fischer: Selectins (CD62L, CD62P) and megakaryocytic glycoproteins (CD41a, CD42b) mediate

- megakaryocyte-fibroblast interactions in human bone marrow.
Leuk Res. 24: 1013-1021 (2000)
242. Wilmanns, W. :Leukämien und Myelodysplastische Syndrome.
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.
München: 199-204. (1996)
[http://tumorzentrum-
muenchen.de/fileadmin/manuale/697_Manual_Maligne_Melanome.p
df](http://tumorzentrum-muenchen.de/fileadmin/manuale/697_Manual_Maligne_Melanome.pdf)
(Zuletzt abgerufen am 31.07.2011)
243. Wu C., VM Keivens, TE O'Toole, JA McDonald, MH Ginsberg:
Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the
assembly of a fibronectin matrix.
Cell (83): 715-724. (1995)
244. Xu M, E. Bruno, J. Chao, H. Ni, V. Lindgren, R. Nunez, N. Mahmud,
G. Finazzi, SM Fruchtman, U. Popat, E. Liu, JT Prchal, D. Rondelli,
G. Barosi, R. Hoffman: The constitutive mobilization of CD34+-cells
into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the
action of a number proteases.
Blood (105): 4508-4515. (2005)
245. Yan XQ, D. Lacey, F. Fletcher, RG Hawley, IK McNiece: Chronic
exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces
lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in
mice.
Blood (86): 4025-4033. (1995)
246. Yan XQ, D. Lacey, D. Hill, Y. Chen, F. Fletcher, RG Hawley, IK
McNiece: A model of myelofibrosis and osteosclerosis in mice
induced by overexpressing thrombopoietin (mpl-ligand). Reversal of
disease by bone marrow transplantation.
Blood (88): 402-409. (1996)

247. Yanagida M., Y. Ide, A. Imai, M. Toriyama, T. Aoki, K. Harada, H. Izumi, H. Uzumaki, M. Kusaka, T. Tokiwa: The role of transforming growth factor-beta in PEG-rHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats.
Br J Haematol (99): 739-746. (1997)
248. Yoon SY, CY Li, RA Mesa, A. Tefferi : Bone marrow effects of anagrelide therapy in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia.
Br J Haematol (106): 682-688. (1999)
249. Zaidi M., B. Moonga, DW Moss, I. Macintyre: Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption.
Biochem Biophys Res Commun (159): 68-71. (1989)
250. Zauli G., G. Visani, L. Catani, N. Vianelli, L. Gugliotta, S. Capitani : Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor-beta1, produced in normal amounts, in patients with essential thrombocythaemia.
Br J Haematol (83): 14-20. (1993)
251. Zhou W., CF Toombs, T. Zou, J. Guo, MO Robinson : Transgenic mice overexpressing human C-Mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment.
Blood (89): 1551-1559. (1997)

7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Mit ausdrücklicher Genehmigung des Dekans der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln sind Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit in der Zeitschrift „Histology and Histopathology“ zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Thiele, J., H. M. Kvasnicka, H. Dietrich, G. Stein, M. Hann, A. Kaminski, N. Rathjen, K. A. Metz, D. W. Beelen, M. Ditschkowski, A. Zander and N. Kroeger (2005). Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histol Histopathol* 20: 879-89. (2005)