

**CYTOKINES AND OTHER FACTORS
IN THE HEMATOPOIESIS OF
MYELOTOXICITY**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY OF ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
MEIKE LORENZ
Diplom-Humanbiologin, Universität Marburg
born August 28, 1967
Germany



accepted on the recommendation of

Prof. F. Würigler, examiner
Dr. B. Car, co-examiner
Prof. M. Baggiolini, co-examiner

Zürich, 1997

SUMMARY

The present experimental work collectively describes investigations of the mechanisms of development and recovery from myelotoxicity in mice and dogs. Cytokines or other growth modulatory factors involved in the repopulation of bone marrow following a myelotoxic insult must move cells from the slowly cycling committed multipotent hematopoietic stem cell pool into erythroid, myeloid and megakaryocytic lineages. This accelerated hematopoiesis potentially employs factors not necessarily involved in the normal maintenance of basal hematopoiesis. The identification of such potentially recovery rate-limiting factors clearly has great potential therapeutic significance. Although central roles for tumor necrosis factor- α (TNF α) in inflammatory and immunological events have been described, little evidence exists for it being a key hematopoietic cytokine. This was confirmed in the present work with TNF receptor I deficient mice exhibiting essentially identical basal hematopoietic parameters to their wild-type counterparts. When treated with the potent myelotoxicant, 5-fluorouracil (5FU) and allowed to recover, TNF receptor I deficient mice indeed showed moderate but clear differences to wild-type mice. Wild-type mice have an enhanced ability to recover myelopoietic function. TNF appears to be inhibitory to the recovery of normal erythropoiesis following myelotoxic injury.

A plethora of cytokines and growth factors have been shown to modify hematopoiesis in *in vitro* culture systems, with relatively fewer exerting clear roles *in vivo*, largely due to the redundancy of many cytokine activities arising from abundant pleiotropy of cytokine functions. Cytokine production is frequently induced by small peptide and lipid molecules, which is also a potential level of regulation in recovery from myelotoxic injury. The bone marrow macrophage together with bone marrow stromal reticular cells are capable of inducing prostaglandin production following transcription of the inducible form of cyclooxygenase: cyclooxygenase 2 (COX-2). The advent of mice rendered deficient in their ability to produce COX-2 in response to inflammatory events, such as following the extensive bone marrow necrosis associated with 5FU therapy, permitted the examination of the role of prostaglandins in recovery from myelotoxic injury. In contrast to the rather subtle effects of TNF Receptor I deficiency, *Cox-2*^{-/-} mice were markedly impaired in their ability to repopulate bone marrow with myeloid, erythroid and megakaryocytic precursors. Secondary cytokines or other direct effects possibly resulting from bone marrow necrosis, COX-2 induction and heightened synthesis of prostaglandins are discussed.

The mechanism of 5FU-induced myelotoxicity is clearly associated with inhibition of thymidine biosynthesis and therefore successful transcription. This effect preferentially targets the rapidly dividing cells of the bone marrow. Occasionally drugs unexpectedly result in myelotoxicity, which was discovered in the course of clinical trials with the antischizophrenic agent, clozapine. The mechanism of clozapine-induced myelotoxicity is not understood. In the course of a 3-month toxicity study in dogs with a structurally and functionally related development compound, DMP 406, severe drug-induced neutropenia was noted. An investigation was instigated, employing in-life analyses, which yielded evidence of a potential immune-mediated mechanism. Canine bone marrow hematopoietic systems were established and used in this investigation to further address the potential mechanisms of toxicity. Although a direct role for immune-mediated myelotoxicity was not confirmed, DMP 406 was shown to be inhibitory to the normal proliferation of erythroid and myeloid colonies at concentrations likely achieved in vivo. Therefore, a complex combination of immune-mediated and direct toxic mechanisms may combine to result in the unique drug-associated agranulocytosis of DMP 406. In addition, this compound may be used to consistently model the adverse clinical effects of clozapine in mechanistic studies.

A minor role for TNF and a highly significant role for prostaglandins in recovery from myelotoxic injury was demonstrated in the conduct of studies with TNF receptor I and COX-2 deficient mice. COX-2 deficient mice will prove useful in further dissecting the roles of various cytokines and growth factors in the recovery of bone marrow from myelotoxic injury. Drug-induced myelotoxic injury of a development compound, DMP 406, was examined mechanistically and although a definitive mechanism of myelotoxicity was not identified, this novel canine model of clozapine-induced agranulocytosis will provide an essential research tool for further examining this serious side-effect. Human counterparts of murine cytokines or growth factors identified from further studies with *Cox-2*^{-/-} mice as essential to recovery from myelotoxic injury may eventually find therapeutic application in treatment of anticancer and clozapine-induced myelotoxicoses.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende experimentelle Arbeit umfasst Untersuchungen zu den Mechanismen in der Entwicklung und Erholung von Myelotoxizität in der Maus und in dem Hund. Zytokine oder andere wachstumsmodulierende Faktoren, die in der Regeneration des Knochenmarks nach einem myelotoxischen Angriff beteiligt sind, müssen Zellen aus dem Pool der sich langsam teilenden, determinierten, multipotenten Stammzellen in die erythroide, myeloische and thrombozytische Blutzelllinien überführen. Unter Umständen bedient sich diese beschleunigte Haemopoese Faktoren, die nicht unbedingt an der Aufrechterhaltung der basalen Haemopoese beteiligt sind. Die Identifikation solcher möglicherweise geschwindigkeitsbestimmender Faktoren für die Erholung ist von grosser, potentieller, therapeutischer Bedeutung. Obwohl eine zentrale Rolle für Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) in entzündlichen und immunologischen Ereignissen beschrieben worden ist, existieren wenige Anhaltspunkte, dass es ein Zytokin mit Schlüsselfunktion in der Haemopoese ist. In dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden. TNF-Rezeptor-I-defiziente Mäuse zeigten insgesamt die gleichen haemopoetischen Werte wie die Wildtyp-Kontrollen. Nach Behandlung mit der stark knochenmarksschädigenden Substanz 5-Fluorouracil (5FU) und anschliessender Erholung, zeigten TNF-Rezeptor-I-defiziente Mäuse moderate aber klare Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen. Wildtyp-Mäuse hatten eine stärkere Fähigkeit zur Erholung in ihren myelopoetischen Funktionen. Hingegen scheint TNF hemmend auf die Erholung der normalen Erythropoese nach myelotoxischem Angriff zu sein.

Eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst die Haemopoese in *in vitro*-Zellkulturen, relative wenige üben aber eine klare Rolle *in vivo* aus. Dies ist weitgehend auf die Redundanz vieler Zytokin-Aktivitäten und die grosse Vielfältigkeit in der Funktion einzelner Zytokine zurückzuführen. Zytokin-Produktion wird gelegentlich auch durch kleine Peptide und Lipid-Moleküle induziert, die eine mögliche Regulationsebene für die Erholung nach toxisch-bedingter Schädigung darstellen. Knochenmarksmakrophagen und Retikulumzellen im Knochenmarksbindegewebe sind nach der Transkription der induzierbaren Cyclooxygenase-Form: Cyclooxygenase 2 (COX-2) in der Lage, Prostaglandine zu produzieren. Die Verfügbarkeit von Mäusen, denen die Fähigkeit genommen worden ist, als Antwort auf entzündliche Ereignisse, wie nach weitgehender Knochenmarksnekrose in Verbindung mit 5FU-Therapie, COX-2 zu produzieren, erlaubt es, die Rolle von Prostaglandinen in der Erholung nach myelotoxischer Schädigung zu untersuchen. Im Gegensatz zu den eher feinen Effekten

von TNF-Rezeptor-I-Defizienz, waren *Cox-2*^{-/-} Mäuse deutlich in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt, das Knochenmark mit myeloischen, erythroiden and thrombozytischen Vorläuferzellen wiederzubesiedeln. Sekundäre Zytokine oder andere direkte Effekte, die möglicherweise aus der COX-2-Induktion und der erhöhten Synthese von Prostaglandinen resultieren, werden erörtert.

Der Mechanismus 5FU-induzierter Myelotoxizität ist eindeutig an die Inhibition der Thymidin-Biosynthese und der erfolgreichen Transkription gebunden. Dieser Effekt trifft vor allem die sich schnell teilenden Zellen des Knochenmarks. Gelegentlich verursachen Medikamente unerwartet Myelotoxizität, wie sich während der klinischen Studien mit Clozapin, einem antischizophrenen Wirkstoff, zeigte. Der Mechanismus Clozapin-induzierter Myelotoxizität ist nicht aufgeklärt. Im Verlauf einer 3-monatigen Toxizitätsstudie mit Hunden und der strukturell und funktionell verwandten Entwicklungssubstanz DMP 406 wurde eine schwere Wirkstoff-induzierte Neutropenie beobachtet. Eine abfolgende Untersuchung mit *in vivo* Analysen brachte mögliche Anhaltspunkte für einen immunvermittelten Mechanismus hervor. Haematopoese-Kulturen für Hundeknochenmark wurden etabliert und in dieser Studie für weitergehende Abklärungen zu möglichen Mechanismen der Toxizität genutzt. Obwohl eine direkte Rolle für immunvermittelte Myelotoxizität nicht bestätigt werden konnte, konnte gezeigt werden, dass DMP 406 direkt die normale Zellteilung erythroider und myeloischer Kolonien in Konzentrationen hemmt, die wahrscheinlich auch *in vivo* erreicht werden. Es mag sich daher um eine komplexe Kombination aus immunvermittelten und direkt toxischen Mechanismen handeln, die eine spezielle, Wirkstoff-assoziierte Agranulocytose durch DMP 406 hervorruft. Zusätzlich könnte diese Substanz benutzt werden, die nachteiligen klinischen Effekte Clozapins in mechanistischen Studien nachzuvollziehen.

Eine geringfügige Rolle für TNF und eine sehr bedeutsame Rolle für Prostaglandine während der Erholung nach toxisch-bedingter Schädigung des Knochenmarks wurde in den durchgeführten Studien mit TNF-Rezeptor-I- und COX-2-defizienten Mäusen gezeigt. COX-2-defiziente Mäuse werden sich als nützlich bei der weiteren Aufklärung der Rollen verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren während der Erholung des Knochenmarks nach toxischer Schädigung erweisen. Wirkstoff-induzierte, myelotoxische Schädigung durch die Entwicklungssubstanz DMP 406 wurde mechanistisch untersucht. Obwohl der definitive Mechanismus der Myelotoxizität nicht identifiziert wurde, wird dieses neue Modell in dem Hund für Clozapin-induzierte Agranulozytose ein wesentliches Werkzeug für die weitere Erforschung dieser schwerwiegenden Nebenwirkung darstellen. Die humanen Analoge für die Maus-Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche sich in weiteren Studien mit *Cox-2*^{-/-} Mäusen

als für die Erholung nach toxisch-bedingter Schädigung des Knochenmarks notwendig erweisen, könnten letztendlich therapeutische Anwendung in der Behandlung von Krankheitsbildern finden, die im Zusammenhang mit Krebsbehandlung oder Clozapin stehen.