

Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Medizinische Klinik III
Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Thiel

**Wirkmechanismen von Antithymozytenglobulin:
Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen und Patienten mit
hämatopoetischer Insuffizienz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Tina Marielle Mönich
aus Memmingen

Referent: Prof. Dr. H. Schrezenmeier

Korreferent: Prof. Dr. J. Oertel

Gedruckt mit Genehmigung der Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am : 02.04. 2004

Für meine Eltern

Inhalt	Seite
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 ANTITHYMOZYTENGLOBULIN (ATG), ANTILYMPHOZYTENGLOBULIN (ALG)	9
1.1.1 Herstellung	9
1.1.2 Enthaltene Antikörper	9
1.1.3 Wirkung.....	10
1.1.4 Anwendung	11
1.2 APLASTISCHE ANÄMIE UND MYELODYSPLASTISCHE SYNDROME	12
1.3 PROGRAMMIERTER ZELLTOD (APOPTOSE)	17
1.3.1 Morphologische Veränderungen	18
1.3.2 Biochemische Veränderungen.....	18
1.3.3 Regulation der Apoptose	19
1.3.4 Fas-Rezeptor und Fas-Ligand	19
1.3.5 Apoptoseinduktion durch das Fas-System	20
1.3.6 Bildung des DISC.....	20
1.3.7 Aktivierung von Enzymkaskaden	20
1.3.8 Caspasen.....	22
1.3.9 Caspasen-Inhibitoren: virale, zelluläre, synthetische.....	23
1.3.10 Caspasen-Substrate.....	24
1.3.11 Apoptosenachweis.....	25
1.4 ZYTOSTATIKARESISTENZEN	25
1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG:	26
2 MATERIAL	28
2.1 ANTIKÖRPER	28
2.1.1 Polyklonale Antikörper	28
2.1.2 Monoklonale Antikörper	28
2.1.3 Isotypenkontrolle.....	29
2.1.4 Sekundäre Antikörper	29
2.2 WEITERE REAGENZIEN	29
2.2.1 Systeme (Kits)	29
2.2.2 Proteine und Peptide.....	30
2.2.3 Chemikalien	30
2.2.4 Seren.....	31
2.2.5 Puffer und Lösungen	31
2.2.6 Substanzen zur Wartung und Reinigung des Durchflusszytometers	31
2.3 ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	32
2.4 ZELLINIEN	32
2.5 WEITERE MATERIALEN	33
2.6 GERÄTE.....	34

2.7	PATIENTENPROBEN.....	34
3	METHODEN.....	35
3.1	PRÄPARATION MONONUKLEÄRER ZELLEN	35
3.1.1	Präparation mononukleärer Zellen mittels Vacutainer System.....	35
3.1.2	Präparation mononukleärer Zellen mittels Ficoll.....	35
3.2	SEPARATION CD 34+-ZELLEN MITTELS <i>MULTI-PARAMETER MAGNETIC CELL SORTING</i> (MACS).....	36
3.2.1	Präparation der MS+-Trennsäulen	36
3.2.2	Magnetische Markierung der Zellen	36
3.2.3	Magnetische Separation der markierten Zellen.....	37
3.3	CFU ASSAY	37
3.4	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	38
3.4.1	Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau	38
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl mittels Türkscher Lösung	39
3.5	KRYOKONSERVIERUNG DER ZELLEN	39
3.6	AUFTAUEN DER ZELLEN	39
3.7	ZELLKULTUR.....	39
3.7.1	Inkubation von Zellen mit IgG-Kontrollantikörpern	40
3.7.2	Apoptoseinduktion in Zellen mit ATG, Zytostatika, Arsentrioxid	40
3.7.3	Inkubation mononukleärer Zellen von MDS-Patienten mit ATG.....	41
3.7.4	Apoptoseverhalten von Zelllinien bei Koinkubation mit ATG und Etoposid .	41
3.7.5	Apoptoseverhalten von Zelllinien bei Koinkubation mit ATG und G-CSF	41
3.7.6	Koinkubation von Zellen mit ATG und Z-DEVD-FMK	41
3.7.7	Koinkubation von Zellen mit ATG und Cyclosporin A (CsA).....	42
3.7.8	Inkubation von Jurkat-Zellen mit ATG und 7C11 oder SM 1/23	42
3.7.9	Inkubation von KG-1a-Zellen mit ATG zum Nachweis aktivierter Caspasen	43
3.8	ZELLFÄRBUNGEN	44
3.8.1	CD34+- und CD 45+-Doppelmarkierung	44
3.8.2	Annexin V-FITC/7-AAD-Doppelmarkierung.....	44
3.8.3	CD3+/7-AAD- und CD34+/7-AAD-Doppelmarkierung mononukleärer Patientenzellen.....	46
3.8.4	Färbung mit dem Antikörper CD95-FITC Klon DX2	47
3.8.5	Indirekte Färbung mit dem CD95-Antikörper SM 1/23.....	48
3.8.6	ATG-Titration im sekundären Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG _{2b} -FITC	49
3.8.7	Nachweis aktivierter Caspasen mittels CasPACE™ FITC-VAD-FMK.....	49
3.8.8	Nachweis aktivierter Caspasen mittels PhiPhiLux-G ₂ D ₂	50
3.8.9	Nachweis der zytoplasmatischen Proteine Caspase-3 und PARP.....	50
3.8.10	Proliferationsassay durch PKH26-Markierung	51
3.9	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	52
3.9.1	Prinzip	53
3.9.2	Signalverarbeitung	54
3.9.3	Zellmessung	54
3.9.4	Datenauswertung.....	55

3.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG	56
4	ERGEBNISSE.....	57
4.1	DATENGEWINNUNG UND DARSTELLUNG.....	57
4.2	VERGLEICH DES APOPTOSENACHWEISES MITTELS 7-AAD UND ANNEXIN V-FITC... 58	
4.3	EINFLUSS VON IGG-KONTROLLANTIKÖRPERN AUF DAS APOPTOSEVERHALTEN DER ZELLEN	59
4.4	ATG-INDUZIERTER APOPTOSE IN MALIGNEN MYELOISCHEN UND LYMPHATISCHEN ZELLINIEN	61
4.5	KOINKUBATIONSEXPERIMENTE	68
4.5.1	Apoptoseinduktion durch Koinkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und Etoposid.....	68
4.5.2	Koinkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und dem Wachstumsfaktor G-CSF	70
4.5.3	Inkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und Cyclosporin A.....	72
4.5.4	Apoptoseinduktion bei der Zelllinie Jurkat durch Koinkubation mit ATG und dem induzierenden monoklonalen CD95-Antikörper 7C11.....	75
4.5.5	Koinkubation von Jurkat-Zellen mit ATG und dem Apoptose inhibierenden monoklonalen CD95-Antikörper SM 1/23	77
4.6	KOMPETITIVE BINDUNGSSTUDIEN.....	79
4.6.1	Färbung des CD95-Rezeptors mit dem FITC-markierten CD95-Antikörper DX2	79
4.6.2	Indirekte Färbung des CD95-Rezeptors mit dem CD95-Antikörper SM 1/23	81
4.6.3	Expressionserhöhung des CD95-Rezeptors durch ATG.....	84
4.7	CASPASEN-AKTIVIERUNG	87
4.7.1	Nachweis aktivierter Caspasen durch das FITC-markierte Konjugat des irreversiblen Caspasen-Substrates VAD-FMK	93
4.7.2	Nachweis aktivierter Caspasen durch Spaltung des Caspasen-Substrates PhiPhiLux-G ₂ D ₂ (DEVDGI)	93
4.7.3	Nachweis aktivierter Caspasen durch den PE-markierten polyklonalen Antikörper Kaninchen-Anti-Human-Aktivierte-Caspase-3	94
4.7.4	Nachweis aktivierter Caspasen durch den polyklonalen Antikörper Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-FITC	94
4.8	INHIBITION ATG-INDUZIRTER APOPTOSE DURCH DEN IRREVERSIBLEN CASPASEN-INHIBITOR Z-DEVD-FMK.....	95
4.9	PROLIFERATIONSINHIBITION	97
4.10	PROLIFERATIVE ATG-EFFEKTE AUF DIE AUS DEM KNOCHENMARK VON MDS-PATIENTEN ISOLIERTEN MONONUKLEÄREN ZELLEN	98
4.11	ANTEIL APOPTOTISCHER CD3+-UND CD34+-ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT VON MDS-PATIENTEN	101
5	DISKUSSION.....	104

5.1	KEINE APOPTOSEINDUKTION IN MALIGNEN MYELOISCHEN ZELLREIHEN DURCH KONTROLLANTIKÖPER VON PFERD UND KANINCHEN.....	104
5.2	VERGLEICH DES APOPTOSENACHWEISES MITTELS 7-AAD UND ANNEXIN V-FITC.	105
5.3	APOPTOSEINDUKTION DURCH ATG IN MALIGNEN MYELOISCHEN UND LYMPHATISCHEN ZELLINIEN.....	105
5.4	KOINKUBATIONSEXPERIMENTE	108
5.4.1	Keine Beeinflussung des ATG-induzierten Apoptoseverhaltens von KG-1a-Zellen durch Koinkubation mit Etoposid	108
5.4.2	Keine Veränderung der ATG-induzierten Apoptose durch Koinkubation mit dem Wachstumsfaktor G-CSF.....	109
5.4.3	Keine Steigerung der ATG-induzierten Apoptoserate durch Koinkubation mit Cyclosporin A (CsA).....	110
5.5	KEINE BETEILIGUNG DES FAS-REZEPTOR/FAS-LIGANDEN SYSTEMS BEI DER DURCH ATG-INDUZIERTEN APOPTOSE.....	111
5.6	CD95-UNABÄNGIGE AKTIVIERUNG VON CASPASEN IM RAHMEN DER ATG-INDUZIERTEN APOPTOSE	113
5.7	KEINE VERMINDERUNG DER ANZAHL APOPTOTISCHER ZELLEN DURCH DEN IRREVERSIBLEN CASPASEN-INHIBITOR Z-DEVD-FMK	114
5.8	PROLIFERATIONSINHIBITION DURCH ATG IN NICHT APOPTOTISCHEN KG-1A-ZELLEN.	115
5.9	ATG-WIRKUNG AUF MONONUKLEÄRE ZELLEN VON MDS-PATIENTEN	117
5.9.1	Kein erhöhtes Koloniewachstum bei mononukleären oder CD34+-Zellen von MDS-Patienten	117
5.9.2	Nachweis eines erhöhten Anteils CD3+- oder CD34+-Zellen im peripheren Blut bei MDS-Patienten nicht möglich	118
5.10	SCHLUSSFOLGERUNG	118
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	121
7	LITERATUR.....	124
7.1	ZITIERTE LITERATUR.....	124
7.2	EIGENE PUBLIKATIONEN	143
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	144
9	ANHANG.....	148
9.1	BUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN.....	148
9.2	ALLGEMEINE ANMERKUNGEN.....	148
9.3	DANKSAGUNG	149
9.4	LEBENS LAUF	150