

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
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
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 MYELOYDYSPLASTISCHE 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
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>28</b>
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
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>35</b>
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 <sub>2b</sub> -FITC .....	49
3.8.7	Nachweis aktivierter Caspasen mittels CasPACE™ FITC-VAD-FMK.....	49
3.8.8	Nachweis aktivierter Caspasen mittels PhiPhiLux-G <sub>2</sub> D <sub>2</sub> .....	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
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
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 <sub>2</sub> D <sub>2</sub> (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
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>104</b>

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
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>124</b>
7.1	ZITIERTE LITERATUR.....	124
7.2	EIGENE PUBLIKATIONEN .....	143
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>144</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>148</b>
9.1	BUCHSTABENCODE DER AMINOSÄUREN.....	148
9.2	ALLGEMEINE ANMERKUNGEN.....	148
9.3	DANKSAGUNG.....	149
9.4	LEBENS LAUF .....	150