

## 1 EINLEITUNG<sup>1</sup>

Bei der aplastischen Anämie (AA) und den myelodysplastischen Syndromen (MDS) handelt es sich um zwei potenziell lebensbedrohliche hämatologische Erkrankungen. Die einzige kurative Therapieoption ist derzeit in beiden Fällen die allogene Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation (Anderson, 1993; Gordon-Smith, 1994; Demuynck, 1996; Doney, 1997; Appelbaum, 1998; Marsh, 1998; Runde, 1998; Bacigalupo, 2000c; Killick, 2000b; Kojima, 2000; Aul, 2002). Diese Therapiemöglichkeit kommt jedoch aufgrund ihres hohen Risikos und des oftmals nur schwer zu findenden kompatiblen Spenders nur für einen kleinen Prozentsatz der Erkrankten in Frage. Es ist daher notwendig, weitere geeignete Therapieformen mit gleichen oder besseren Heilungschancen zu finden. Die Therapie der Wahl bei der AA für jene Patienten, die für eine Knochenmarktransplantation nicht in Betracht kommen, ist zur Zeit die immunsuppressive Therapie mit Antithymozytenglobulin (ATG) und Cyclosporin A (CsA) (Frickhofen, 1991; Bacigalupo, 1995; Rosenfeld, 1995; Marsh, 1999; Bacigalupo, 2000b; Frickhofen, 2000; Frickhofen, 2002; Paquette, 2002). Durch dieses Therapieregime können derzeit nahezu gleich gute Therapieergebnisse wie bei einer Knochenmarktransplantation erzielt werden (Bacigalupo, 1988; Fuhrer, 1994; Gillio, 1997; Lawlor, 1997; Pitcher, 1999; Bacigalupo, 2000a). Bei den MDS gibt es zur Zeit mehrere konservative Therapieansätze mit unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Heilungsraten und Überlebenszeiten. Die momentanen Therapieoptionen, meist im Rahmen von klinischen Studien, bestehen aus Chemotherapie, Zytostatikatherapie (eventuell in Kombination mit Wachstumsfaktoren) oder ATG (Hellstrom-Lindberg, 1999; Dansey, 2000; Schmitt-Graeff, 2000; List, 2002). Sowohl bei den MDS als auch bei der AA wird das Augenmerk vermehrt auf die ATG Therapie gerichtet. Die genauen Wirkungsmechanismen des ATG bei der Behandlung dieser Erkrankungen bedürfen jedoch noch der Klärung.

---

<sup>1</sup> Bei der in diesem und den folgenden Abschnitten angegebenen Literatur handelt es sich u. a. um Übersichtsarbeiten zu dem entsprechenden Thema.

## 1.1 Antithymozytenglobulin (ATG), Antilymphozytenglobulin (ALG)

### 1.1.1 Herstellung<sup>2</sup>

ATG oder ALG sind polyklonale Antikörper gegen menschliche Lymphozyten. Gewonnen werden die Immunglobuline durch Reinigung der Sera von zuvor mit menschlichen Thymozyten (z. B. Tecelac, Lymphoglobulin und Thymoglobulin von Mérioux), Lymphozyten, B- oder T-Lymphoblasten (z. B. Zelllinie Jurkat bei ATG-Fresenius S) immunisierten Pferden oder Kaninchen. Die Thymozyten werden aus dem Thymusgewebe von Kindern gewonnen, das im Rahmen von Thoraxeingriffen entfernt werden musste. Die Lymphozyten stammen aus dem *Ductus thoracicus* und die Lymphoblasten von menschlichen Zelllinien, z. B. Jurkat Zelllinie. Um einen Großteil der entstehenden, unspezifischen Antikörper zu entfernen, folgen je nach Hersteller mehrere Schritte wie selektive Adsorption an menschliche Erythrozyten, Adsorption an menschliches Plasma und Ionenaustausch-Chromatographie. Weitere Schritte, um die IgG-Fraktion aufzureinigen, sowie eine Erhitzung der Präparation auf ca. 60°C über mehrere Stunden folgen. Die so gewonnenen ATG-Chargen sind polyklonale Gammaglobulinfraktionen, die sich jedoch von Hersteller zu Hersteller, wie auch von Charge zu Charge in den Antikörperkonzentrationen und den Antikörperspezifitäten unterscheiden (Smith, 1985). Obwohl Antilymphozytenglobulin (ALG) eine Wirkung gegen alle Lymphozyten und Antithymozytenglobulin (ATG) eine Spezifität für T-Zellen vorgibt, wird in der Literatur häufig zwischen beiden Produkten nicht unterschieden, und die Begriffe werden synonym gebraucht. Auch im Rahmen dieser Arbeit soll keine weitere Unterscheidung stattfinden.

### 1.1.2 Enthaltene Antikörper

ATG enthält eine Vielzahl von Antikörpern mit einer breiten Spezifität und hat somit auch nicht nur einen Wirkungsmechanismus. Neben T-zellspezifischen Antikörpern (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CTLA-4) (Bonney-Bérard, 1991; Rebellato, 1994; Pistillo, 2002), welche unter anderem eine Suppression der T-zellvermittelten Immunantwort bewirken können, enthält ATG spezifische Antikörper gegen aktivierte B-Zellen (CD19, CD20, CD21), aber auch gegen Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD18) (Rebellato, 1994) und

---

<sup>2</sup> Angaben u.a. den Produktbeschreibungen der Hersteller entnommen (Institut Mérioux GmbH, 1994; Institut Mérioux Transplant GmbH, 1994; Fresenius AG, 1998; Biotest Pharma GmbH, 1999).

zelllinienunspezifische Marker wie  $\beta$ 2-Microglobulin und HLA-DR (Raefsky, 1986; Bonnefoy-Bérard, 1991). Des Weiteren wurden u. a. Antikörper gegen Monozyten, natürliche Killerzellen und Transduktionsmoleküle (CD45) nachgewiesen (Bonnefoy-Bérard, 1991; Huang, 1994; Bourdage, 1995). Viele der im ATG enthaltenen Antikörper erkennen darüber hinaus, trotz Reinigung, Antigene, welche auch auf nicht lymphoiden Zellen exprimiert werden, so z. B. auf Erythrozyten, Neutrophilen, Thrombozyten und Endothelzellen. Trotz des Namens, der eine Spezifität für Lymphozyten impliziert, ist ATG nicht für einen Zelltyp spezifisch (Greco, 1983).

### *1.1.3 Wirkung*

ATG wirkt durch eine während der Behandlung auftretende Lymphopenie immunsuppressiv. Der genaue Mechanismus des immunsuppressiven Effektes von ATG ist jedoch noch unklar. Unter anderem werden eine komplementvermittelte Zytolyse (Taniguchi, 1990), eine Opsonierung der Lymphozyten oder eine Phagozytose durch Makrophagen, eine Inhibition (Teramura, 1997) oder ein direkter toxischer Effekt (Dubey, 2002) auf immunkompetente Lymphozyten diskutiert.

Untersuchungen zeigten, dass ATG zu einer schnellen und massiven Depletion der peripheren Blutlymphozyten führt (Rebellato, 1994; Bonnefoy-Bérard, 1996; Guttman, 1997; Genestier, 1998; Agha, 2002), welche über den Behandlungszeitraum bestehen bleibt. Das anschließende Wiederauftreten der B- und T-Zellen ist durch eine lang andauernde Verminderung der CD4+ Lymphozyten gekennzeichnet (Muller, 1997). Da Pferde und Kaninchen ATG sowohl C1q binden und den Komplementweg bei hohen Konzentrationen aktivieren (Genestier, 1998), als auch periphere T-Zellen aktivieren und die Synthese von IL-2 und IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  stimulieren können (Bonnefoy-Bérard, 1998), schließt der Mechanismus der antikörpervermittelten Reduktion der Blutzellen die Komplement vermittelte Lyse durch Aktivierung des klassischen Komplementweges ein. In subinhibitiven Konzentrationen induziert ATG eine inkomplette T-Zell Aktivierung, charakterisiert durch einen Anstieg der Zellgröße, der Zellkondensation und der Expression von CD95 und CD69 (Bonnefoy-Bérard, 1998). Die Zunahme der CD95-Expression wurde allerdings nur bei ATG-Präparationen mit Antikörpern gegen CD3 und CD2 beobachtet (Genestier, 1998). Des Weiteren induziert ATG eine CD25- und CD95-L-Expression und kann über TNF- $\alpha$  und

CD95-L-Expression Apoptose triggern (Bonney-Bérard, 1999). Alle Zellen mit einer hohen Ansprechrate auf ATG zeigten auch eine hohe Expression des Fas-Rezeptors (Bonney-Bérard, 1994). Die ATG-vermittelte Apoptose konnte nur in aktivierten, jedoch nicht in ruhenden T-Zellen nachgewiesen werden (Genestier, 1998; Bonney-Bérard, 1999).

Studien von Bonney-Bérard zeigten, dass ATG sowohl mit T- als auch mit B-Zellen reagiert, unabhängig davon, ob die Präparationen B-zellspezifische Antikörper enthielten oder nicht (Bonney-Bérard, 1994). Es fand nur eine vorübergehende Aktivierung von B-Zellen durch ATG statt, eine Differenzierung in antikörperproduzierende Zellen unterblieb jedoch (Bonney-Bérard, 1992a; Bonney-Bérard, 1992c). ATG-induzierte somit T-Zellproliferation, inhibiert jedoch die Proliferation von B-Zellen und B-Zelllinien. Da ATG die B-Zellproliferation bei Konzentrationen von maximaler T-Zellproliferation nicht triggert, besteht somit nicht, wie sonst bei immunsuppressiver Therapie, die Gefahr der Entstehung von B-Zelllymphoproliferativen Erkrankungen (Swinnen, 1990; Bonney-Bérard, 1992a).

Neben der immunsuppressiven Wirkung zeigt ATG auch Wirkung auf die Myelopoese (Gascon, 1985; Huang, 1987; Kawano, 1988). Dies liegt an seiner Fähigkeit, sowohl hämatopoetische Vorläuferzellen direkt zu stimulieren, z. B. über eine Anti-CD45RO-Aktivität (Huang, 1994) oder über Differenzierung (Hunter, 1985), als auch an der Fähigkeit, Wachstumsfaktoren abzugeben (Barbano, 1988; Taniguchi, 1990; Kawano, 1992; Rameshwar, 1992). *In vitro* konnte dies durch erhöhtes Kolonienwachstum gezeigt werden (Huang, 1987; Killick, 2000c).

### 1.1.4 Anwendung

Die polyklonalen Immunglobuline (ALG, ATG) finden hauptsächlich als potente Immunsuppressiva Anwendung und werden bereits seit Ende der 60er Jahre im Rahmen der Organtransplantation eingesetzt (Cosimi, 1988). ATG kann zur selektiven Reduktion von aktivierten Lymphozyten in der Klinik angewendet werden, so dass kein Immundefizit durch eine vollständige Lymphozyteneliminierung auftritt (Genestier, 1998).

Des Weiteren dienen ATG und ALG der Vorbeugung und Behandlung akuter und steroidresistenter Abstoßungsreaktionen (O'Donoghue, 1989; Clark, 1993). Seither konnte durch viele Studien die Wirksamkeit von ATG bei der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Nieren- (Shield, 1997; Szczech, 1997; Szczech, 1998; Agha, 2002; Arns, 2002; Yu,

2002), Herz- (Beaufigeau, 1997), Leber- (Tchervenkov, 1997) und Pankreastransplantationen (Cantarovich, 1990) aber auch bei akuten Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen gezeigt werden (Cohen, 2002; Krasinskas, 2002). Bei prophylaktischer Gabe reduziert es die Häufigkeit und Intensität von Abstoßungskrisen nach Organtransplantationen.

Darüber hinaus wird ATG heutzutage zur myeloablativen Therapie bei Hochrisikopatienten, bei der allogenen Stammzell- und Knochenmarktransplantation (Storb, 1994; Slavin, 1998) sowie zur Behandlung und Prophylaxe der *Graft-versus-host*-Reaktion eingesetzt (Najarian, 1976; Deeg, 1985; Graziani, 2002; Kroger, 2002; MacMillan, 2002; Nachbaur, 2002). In der Hämatologie findet es als Standardtherapie bei der Behandlung der aplastischen Anämie (Marsh, 1999; Bacigalupo, 2000b; Frickhofen, 2000; Frickhofen, 2002) sowie im Rahmen klinischer Studien bei myelodysplastischen Syndromen Anwendung (Biesma, 1997; Molldrem, 1997; Killick, 1999; Stadler, 2000; Molldrem, 2002).

## 1.2 Aplastische Anämie und myelodysplastische Syndrome

<b>Charakteristika der aplastischen Anämie (AA)</b>	<b>Charakteristika der myelodysplastischen Syndrome (MDS)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•1888 von Paul Ehrlich zum ersten Mal beschrieben (Ehrlich, 1888).</li> <li>•1904 von Vaquez und Aubertin als AA benannt (Vaquez, 1904).</li> <li>•Wird auch als Panmyelopathie bezeichnet.</li> <li>•Hämatologische Erkrankung, charakterisiert durch Knochenmarkversagen mit <i>Aplasie</i> oder Hypoplasie <i>des Markes</i> und einer peripheren Bi- oder <i>Panzytopenie</i>.</li> </ul> <p><b>Epidemiologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•<b>Inzidenz</b> 0,2/100.000 Einwohner/Jahr in Europa, in Asien 2/100.000 Einwohnern/Jahr.</li> <li>•Häufigkeitsgipfel zwischen dem <b>20. und 30. Lebensjahr</b>.</li> <li>•Gehäuftes Auftreten jedoch auch in Zeiten der Hormonumstellung (Adoleszenz, Schwangerschaft, Beginn des Seniums).</li> <li>•Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Erstbeschreibung 1949 durch Hamilton-Peterson als präleukämische Anämie (Hamilton-Peterson, 1949).</li> <li>•Wurde auch als oligoblastäre Leukämie, refraktäre Anämie, smoldering myeloische Leukämie (Knospe, 1971; Greenberg, 1983), subakute Leukämie (Cohen, 1979), hämatopoetische Dysplasie, Dyserythropoese oder Präleukämie (Linman, 1974) bezeichnet (Buzaid, 1986).</li> <li>•Heterogene Gruppe <i>erworbener, klonaler Erkrankungen</i> der Knochenmarkstammzellen, gekennzeichnet durch eine <i>ineffektive Hämatopoese</i> (morphologische und funktionelle Abnormalitäten der hämatopoetischen Stammzellen) mit unterschiedlich stark ausgeprägter peripherer <i>Panzytopenie</i> bei jedoch häufig normo- oder <i>hyperzellulärem Knochenmark</i>.</li> <li>•Erhöhtes Risiko eine akute myeloische Leukämie zu entwickeln.</li> </ul> <p><b>Epidemiologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•<b>Inzidenz</b> 3-13/100.000 Einwohner/Jahr (Gesamtbevölkerung); nimmt bis auf 20-50/100.000 jenseits des 70 Lebensjahres zu (Aul, 1998b).</li> <li>•Häufigkeitsgipfel zwischen dem <b>60. und 70. Lebensjahr</b> (Dansey, 2000).</li> <li>•Auftreten gelegentlich auch bei Kindern und jüngeren Erwachsenen, meistens jedoch nach der Behandlung anderer maligner Erkrankungen (Masey, 1997).</li> <li>•Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen.</li> </ul>

**Ätiologie**

- Die Ätiologie ist meist unbekannt.
- Man unterscheidet:
  - A) angeborene aplastische Anämien:** Fanconi-Anämie (Defekt der DNA-Reparaturmechanismen); selten.
  - B) erworbene aplastische Anämien:**
    - 70% der Fälle sind *idiopathische* Formen mit unbekannter Ursache.
    - Sekundär durch Medikamente** (Chloramphenicol, nichtsteroidale Antirheumatika, Sulfonamide, Thyreostatika usw.), **toxische Stoffe** (Benzol), **ionisierende Strahlung** oder **Virusinfektionen** (Hepatitis-, Herpesviren).

**Diagnose**

- Typische Klinik der Patienten.
- Schleichender Beginn.
- Sicherung der Diagnose durch Knochenmarkbiopsie: aplastisches Knochenmark mit Ersatz durch Fettgewebe.
- Knochenmarkausstrich: nur vereinzelt Lymphozyten, Plasmazellen und Fibroblasten.
- Zur Diagnose müssen ebenfalls 2 von 3 Kriterien aus der nachfolgenden Tabelle erfüllt sein:

Schweregrad	Granulozyten/ $\mu$ L	Thrombozyten/ $\mu$ L	Retikulozyten/ $\mu$ L
Nicht schwere AA (nSAA)	<1.500	<50.000	<60.000
Schwere AA (SAA)	<500	<20.000	<20.000
Sehr (very) schwere AA (vSAA)	<200 obligat	<20.000	<20.000

**Tab. 1.2: Unterschiedliche Schweregrade der AA und ihre Kriterien;** modifiziert nach (Herold, 2000).

**Ätiologie**

- Die genaue Ätiologie ist bis heute ungeklärt.
- Man unterscheidet:
  - A) primäre Krankheitsformen:** es können keine auslösenden Noxen ermittelt werden.
  - B) sekundäre Krankheitsformen:** durch Einzelfaktoren, die die Entwicklung von MDS begünstigen können: **Strahlung, Chemotherapeutika** (Alkylantien, Topoisomerase-II-hemmer) (van Leeuwen, 1996), **Chemikalien** (Benzol), **Insektizide und Pestizide, Haarfärbemittel** und **halogenierte Kohlenwasserstoffe**; Vorkommen auch nach **kurativer Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation**, sowie nach autologer Transplantation vor allem bei hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Ebenfalls häufig beschrieben ist der Übergang einer aplastischen Anämie und einer PNH in MDS (Socie, 1993).

**Klassifikationen**

- FAB (French-American-British)-Klassifikation** (Bennett, 1982; Bennett, 1985) 1982 erstellt 1985 modifiziert, bis heute gültig.
  - Beruhet auf morphologischen Kriterien (absolute Monozytenzahl im PB, Blastenanteil im PB und im KM, Vorhandensein von Ringsideroblasten und Auerstäbchen im KM).
  - Klinische Merkmale wurden nicht berücksichtigt.

	Blastenanteil Blut	Knochenmark	Weitere Veränderungen
RA	$\leq 1\%$	$< 5\%$	$< 15\%$ Ringsideroblasten
RARS	$\leq 1\%$	$< 5\%$	$> 15\%$ Ringsideroblasten
RAEB	$< 5\%$	5-20%	
RAEB-T	$\geq 5\%$	21-30%	Auerstäbchen
CMML	$< 5\%$	5-20%	Monozyten $\geq 1 \times 10^9/l$

**Tab. 1.3: FAB-Einteilungskriterien der MDS** erstellt nach (Bennett, 1982).

- Unterscheidung von fünf Subgruppen: refraktäre Anämie (RA), refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten (RAEB), refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation (RAEB-T) und chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML).
- Weitere MDS Varianten:
  - a) hypoplastische MDS:** Reduktion der Hämatopoese auf  $< 30\%$  der knochenfreien Markfläche (Maschek, 1993; Tuzuner, 1995).
  - b) myelofibrotische MDS:** dysplastische Veränderungen der Hämatopoese und ausgeprägte Myelofibrose (Lambertenghi-Deliliers, 1991).
- WHO** (Harris, 1999; Harris, 2000) 1999 neu vorgestellt mit dem Ziel genetische und klinische Merkmale mit den morphologischen, zytochemischen, und

<p><b><u>Pathophysiologie</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Deutlich reduzierte Anzahl von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark.</li> <li>▪ Verantwortlicher Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.</li> <li>▪ Mehrere Ursachen werden vermutet:</li> </ul> <p><b>A) Stammzelldefekt</b></p> <p>Vermutung eines klonalen Ursprungs mit Stammzelldefekt, da:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- nach erfolgreicher immunsuppressiver Behandlung und Wiederherstellung der Knochenmarkfunktion häufig eine leichte Panzytopenie, einige Anzeichen eines myelodysplastischen Knochenmarks, eine abnorme Proliferationskapazität der hämatopoetischen Vorläuferzellen, eine vermehrte Apoptose CD34+-Zellen (Philpott, 1995), eine veränderte Morphologie der Kolonieformationen, eine verminderte Anzahl von Kolonien bleiben.</li> <li>- Häufiger Übergang einer AA in eine Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH), in MDS, oder eine akute myeloische Leukämie (AML) (Bacigalupo, 1980; Tichelli, 1994; Socie, 2000).</li> </ul> <p><b>B) Abnormalitäten im Microenvironment</b></p> <p>Ein gestörtes <i>Microenvironment</i> wird bei manchen Patienten als Mitursache der Entwicklung einer AA gesehen (Nissen-Druey, 1990; Nissen, 1991).</p> <p><b>C) Immunologisch verursachte Schäden der Stammzellen</b></p> <p>- Erfolgreiche Behandlung der AA mit immunsuppressiven Agentien (Mathé, 1970) führte zu der Vermutung einer immunver-</p>	<p>immunophenotypischen Merkmalen zu korrelieren und somit eine Einteilung zu finden, die eine Aussage über die Prognose erlaubt. Folgende Klassen entstanden:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Refraktäre Anämie (RA)       <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mit Ringsideroblasten (RARS)</li> <li>• Ohne Ringsideroblasten</li> </ul> </li> <li>2) Refraktäre Zytopenie mit multilineage Dysplasien (RCMD)</li> <li>3) Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB)       <ul style="list-style-type: none"> <li>• RAEB I mit 5-10% Blasten</li> <li>• RAEB II mit 11-20% Blasten</li> </ul> </li> <li>4) 5q- Syndrom</li> <li>5) nicht klassifizierbare MDS</li> </ol> <p>Die CMML, die sowohl myelodysplastische als auch myeloproliferative Merkmale aufweist, wurde aus der MDS Klassifikation gestrichen und in eine separate Gruppe, die Krankheiten mit myelodysplastischen und myeloproliferativen Merkmalen umfasst, aufgenommen. Der Blastenanteil, der eine AML definiert wurde von 30% auf 20% herabgesetzt und damit die Kategorie RAEB-T eliminiert.</p> <p><b><u>Pathogenese</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Progressive, klonale Erkrankungen, mit Mehrschritt-pathogenese (Hirai, 2002):</li> </ul> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>genetische Transformation</b> in einer einzigen multi- oder pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzelle, z. B. einer (CD34+-Zelle).       <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Molekularbiologisch</b> mehrere <b>Defekte</b> (Mutation der RAS-Oncogene, Inaktivierung des Tumor Suppressorgens p53, Defekte des DNA-Reparatursystems, immunologische Veränderungen) beschrieben; initialen Schritte der neoplastischen Transformation jedoch unklar (Aul, 1998b).</li> <li>- Transformation führt zu <b>gestörter Proliferation und gestörtem Differenzierungsvermögen</b> der abberanten Stammzelle (CD34+).</li> <li>- Ineffektive Hämatopoese durch <b>reduziertes Koloniewachstum, Reifungsstörungen</b> und exzessiven intramedullären Zelltod in Form von <b>Apoptose</b> hauptsächlich in frühen MDS-Stadien nachgewiesen (Greenberg, 1998). Mögliche Erklärung für periphere Zytopenie in Verbindung mit einem normo- oder hyperzellulärem Knochenmark.</li> </ul> </li> <li>2) Tumorweiterentwicklung durch <b>zusätzliche genetische Schäden</b>:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mit zunehmender Progression der Erkrankung dominiert der neoplastische Klon. Eine verminderte Apoptose führt zu einer zunehmenden <b>Expansion unreifer blastärer Zellen</b>, die so zu dem Bild der akuten Leukämie führen (Aul, 1998b).</li> </ul> </li> </ol>
---	--

mittelten Pathogenese.

-Mögliche immunsuppressive Mechanismen:

I) Suppression der Hämatopoese durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (Zoumbos, 1985a; Moebius, 1991).

II) Vermehrte Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) und Interferon (IFN- $\gamma$ ) im KM (Zoumbos, 1985b; Schultz, 1994).

### Prognose

•Bei Nichtbehandlung liegt die Letalität bei über 80% innerhalb von 2 Jahren.

•Die Granulozytenzahl zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist der wichtigste prognostische Einzelparameter.

•Nach allogener KMT/SZT von histokompatiblen Spendern sind ca. 80% (Bacigalupo, 2000a) der Patienten nach 10 Jahren gesund. Da die Ergebnisse nach KMT/SZT von nicht verwandten Fremdspendern schlechtere Ergebnisse erzielen, wird diese Therapievariante nicht als primäre Therapieoption angesehen. Es besteht ein Risiko von ca. 30% eine chronische *Graft-versus-host*-Krankheit zu entwickeln.

•10 Jahre nach immunsuppressiver Therapie leben noch ca. 50% der Patienten, diese zeigen jedoch häufig nur eine hämatologische Teilremission und Spätkomplikationen (Schrezenmeier, 1993).

•Spätkomplikationen nach immunsuppressiver Therapie: erhöhte Inzidenz von malignen Tumoren (Myelodysplasien, AML) (Socie, 1993; Tichelli, 1994).

•Spätkomplikationen der KMT: vorwiegend solide Tumoren.

### Prognose

•Variabler Krankheitsverlauf bei den Patienten durch große Heterogenität der Erkrankung.

•Mediane Lebenserwartung zwischen 10 und 24 Monaten.

•Hypoplastische MDS unterscheidet sich prognostisch nicht von den typischen normo- oder hyperzellulären MDS Varianten.

•Myelofibrotische MDS: prognostisch ungünstiger Subtyp mit häufigem Übergang in eine akute Leukämie (Aul, 1998b).

•Wahrscheinlichkeit einer leukämischen Transformation in eine AML bei den unterschiedlichen FAB-Typen: RA 11%, RARS 5%, CMML 20%, RAEB 23%, RAEB-T 48%.

•Parameter, die in der FAB-Klassifikation nicht berücksichtigt wurden, jedoch prognostische Bedeutung haben: das Alter bei Diagnosestellung, Ausprägung der peripheren Zytopenie, Serum-LDH und Thymidinkinase Aktivität, Ausmaß der dysplastischen Veränderungen der Hämatopoese, histologischer Nachweis von atypisch lokalisierten und reifen Vorläuferzellen im KM, Karyotyp, Immunphänotyp sowie *in vitro* Wachstumsmuster der hämatopoetischen Progenitorzellen (Garcia, 1988; Aul, 1998b; Greenberg, 1999).

•Chromosomenaberrationen: Hauptprognosefaktor für das Überleben, die leukämische Transformation und das Therapieansprechen (Sanz, 1998). Bei etwa 40% der Patienten mit primären MDS und bei bis zu 80% der Patienten mit sekundären MDS sind zum Diagnosezeitpunkt charakteristische chromosomale Veränderungen nachweisbar (Dansey, 2000).

Die häufigsten Chromosomenaberrationen: Verlust der Chromosomen 5 und 7, Deletion der langen Arme dieser Chromosomen, Trisomie 8, Deletionen der langen Arme der Chromosomen 11, 13, 20, Verlust des Y Chromosoms und balancierte Translokationen vor allem mit dem Chromosom 3 (Masey, 1997).

•Keine Veränderung mit spezifischen Syndromen oder FAB-Subtypen verbunden; ebenso ist keine Aberration für MDS spezifisch. Generell lässt sich jedoch sagen, dass multiple Aberrationen mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (Yunis, 1988; Geddes, 1990).

•Erweiterung der FAB-Klassifikation 1997 durch ein sogenanntes **International Prognostic Scoring System (IPSS)** (Greenberg, 1997):



	Punkte					Risiko- gruppe	Punkte- anzahl
	0	0,5	1	1,5	2		
KM Blasten in %	<5	5-10		11- 20	21- 30	Inter- me- diär-1	0,5-1
Karyo- typ	gut	Inter- me- diär	Schlecht			Inter- me- diär-2	1,5-2
Zyto- penie	0 oder 1	2 oder 3				hoch	≥2,5

**Tab. 1.4: Einteilung der MDS in unterschiedliche Risikogruppen nach dem IPSS (Greenberg , 1997).**

•Definition der **Zytogenetischen Gruppen**:

- Gruppe „gut“: normaler, nur del (5q), nur -Y oder nur del (20q) Karyotyp.
- Gruppe mit „schlechtem“ Karyotyp: komplexe Aberrationen (>3) oder Anomalien des Chromosoms 7.
- Gruppe mit intermediärem Karyotyp: restliche chromosomalen Aberrationen.

•**Zytopenie**kennzeichen: Hämoglobin <10g/dl, Thrombozyten <100x10<sup>9</sup> Zellen/l, Neutrophile <1,8x10<sup>6</sup> Zellen/l.

•**Entwicklung einer AML**: In der Niedrigrisikogruppe 31% der Patienten innerhalb von 9,4 Jahren, in der Intermediär-1 Gruppe bei 39% innerhalb von 3,3 Jahren, in der Intermediär-2 Gruppe bei 22% innerhalb von 1,1 Jahren und in der Hochrisikogruppe bei 8% innerhalb von 0,2 Jahren

•Das **Überleben** lag in der Niedrigrisikogruppe bei 5,7 Jahren, in der Intermediär-1 Gruppe bei 3,5 Jahren, Intermediär-2 bei 1,2 Jahren und bei den Hochrisikopatienten bei 0,4 Jahren.

•Bei nicht verfügbaren zytogenetischen Daten sind prognostische Aussagen mit Hilfe des **Düsseldorfscores** (Aul, 1992) möglich (medullärer Blastenanteil, Hämoglobin, Thrombozyten und LDH).

**Therapie**

**A) supportive Maßnahmen:** Erythrozyten-substitution zur Anämiebehandlung, Gabe von Thrombozyten zur Therapie von Blutungen. Antibiotika und Antimykotika zur Infektionsbehandlung.

**B) Knochenmarktransplantation**  
Die allogene KMT oder SZT ist die einzige kurative Therapie; diese kommt jedoch nur für Patienten unter 55 Jahren in Betracht, wenn ein histokompatibler Familienspender vorhanden ist. Transplantation gewöhnlich nach einer intensiven Zytostatikatherapie.

**C) immunsuppressive Therapie**  
Eine immunsuppressive Therapie ist bei nSAA Patienten und bei fehlendem histokompatiblen Familienspender bei SAA und vSAA indiziert. Anwendung hierbei finden Therapien mit

**Therapie**

•Die Therapie richtet sich nach dem Ausmaß der Zytopenie, dem Alter, dem Allgemeinzustand und der Risikogruppe des jeweiligen Patienten.

•Ziele: Verbesserung der Blutwerte mit folgender Besserung der Lebensqualität.  
Kurativ: Eradikation des malignen Klons und Wiederherstellung der normalen Hämatopoese.

**A) Supportive Therapie:** Erythrozytensubstitution, Gabe von Thrombozyten, Antibiotika und Antimykotika.

**B) KMT oder Blutstammzelltransplantation** eines HLA-identischen Familienspender als derzeit einzige kurative Therapie (Appelbaum and Anderson, 1998; Arnold, 1998; Runde , 1998; Deeg, 2000).

Probleme: Altersvoraussetzungen (<60 Jahre) und limitierte Verfügbarkeit HLA-kompatibler Verwandtenspender. Daher nur für wenige MDS-Patienten ein realistischer Therapieansatz.

<p>Cyclosporin A und ATG/ALG, eventuell in Kombination mit Wachstumsfaktoren.</p> <p><b>D) Zytokine</b> GM-CSF, G-CSF, MGDF und Thrombopoetin sind in klinischer Erprobung.</p> <p><b>E) Androgene und Kortikosteroide</b> Kortikoide allein zeigten keine Wirkung. Androgene hoch dosiert zeigten bei einigen Patienten Wirkung.</p> <p><b>F) Cyclophosphamid</b> Wird als potentes Immunsuppressivum oftmals zur Konditionierungstherapie vor einer Knochenmarktransplantation eingesetzt (Gluckman, 1992; Storb, 1994; Storb, 1997). erfolgreiche Remissionsinduktion wurde von Brodsky (Brodsky, 1996) auch ohne Knochenmarktransplantation beschrieben.</p>	<p><b>C) Autologe Stammzelltransplantation</b> nach <i>high dose</i> Chemotherapie.</p> <p><b>D) Im Rahmen von klinischen Studien</b> (Hirst, 1993; Hellstrom-Lindberg, 1999; Dansey, 2000):</p> <p>-<i>Antileukämische Remissionsinduktionstherapie</i>: aggressive Chemotherapie vor allem bei RAEB, CMML und RAEB-T analog zu den AML-Therapien.</p> <p>-<i>Niedrig dosierte Chemotherapien</i> zur Suppression des malignen Klons.</p> <p>-<i>Hämatopoetische Wachstumsfaktoren</i> (G-CSF, GM-CSF, IL-3, EPO) zur Stimulation der residualen normalen Hämatopoese bei RA und RARS Patienten.</p> <p>-<i>Differenzierungsinduktion</i> (Vitamin D, Retinoide) des dysplastischen Klons.</p> <p>-<i>Immunsuppressive Behandlung</i> mit Cyclosporin A (Jonasova, 1998) und ATG als alternative Behandlungsmöglichkeiten bei Niedrigrisikopatienten. In Einzelfällen, wie auch im Rahmen von Studien, konnte ein Ansprechen auf ATG beobachtet werden (Tichelli, 1988; Biesma, 1997; Molldrem, 1997; Molldrem, 1998; Molldrem, 2002).</p> <p>-<i>Weitere potentielle Therapieansätze</i> u. a. mit DNA Methylierungs-Inhibitoren, Aminothiolen, Amifostine, Topoisomerase Inhibitoren, Thalidomid, Arsentrioxid, Phenylbutyraten, Desipeptiden, Proteinkinase C Inhibitoren werden bei Cheson und List beschrieben (Cheson, 2000; List, 2002).</p>
--	--

**Tab. 1.1: Gegenüberstellende Beschreibung der AA und der MDS.** AA ergänzt nach (Young, 1995; Frickhofen, 1999; Herold, 2000) und der MDS ergänzt nach (Hoelzer, 1998; Aul, 1998a).

### 1.3 Programmierter Zelltod (Apoptose)

Da die Apoptose sowohl in der Pathogenese der AA und der MDS, als auch als möglicher Wirkungsmechanismus des ATG eine bedeutende Rolle spielt, sollen die Regulation der Apoptose, sowie die morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle im Rahmen dieses programmierten Zelltodes hier noch etwas genauer beschrieben werden.

Jede eukaryonte Zelle besitzt ein genetisches Programm, welches ihren eigenen Tod triggern kann. Dieser „programmierte Zelltod“ wird auch Apoptose genannt und ist ein aktiver zellulärer Prozess, bei dem die Zellen einen kontrollierten, genetisch gesteuerten Zelltod durchlaufen, der sich von dem unkontrollierten Zelltod, der Nekrose, unterscheidet (Kerr, 1972).

Physiologischer Weise wird Apoptose während der Embryonalentwicklung bei der Ausbildung der Gliedmaßen, des Knorpelgewebes, des Knochens und bei der Entwicklung des Nervensystems beobachtet (Ellis, 1991). Darüber hinaus wird die Größe einer Zellpopulation durch Apoptose reguliert (Abbau gealterter hämatopoetischer Zellen (Moisan,

2002; Yamamoto, 2002)) und die Gewebemhomöostase durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose erhalten. Nicht gewollte, geschädigte, infizierte Zellen werden mit Hilfe der Apoptose eliminiert, so z. B. im Rahmen der Immunantwort bei einem viralen Infekt (Ashkenazi, 1999). Auf der anderen Seite führt eine fehlerhafte Apoptose zu einer Vielzahl von Erkrankungen, z. B. zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson (Carson, 1993), zu Autoimmunerkrankungen, zu verschiedenen Arten von Krebs (Williams, 1993; Thompson, 1995) und zu hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien und Myelodysplastischen Syndromen (Philpott, 1995; Raza, 1996; Lepelley, 1998; Landowski, 2001).

Jedoch auch im Rahmen der Therapie maligner Erkrankungen spielt die Apoptose eine große Rolle. Hierbei nutzt man die Fähigkeit einiger Chemotherapeutika (Caserini, 1997; Hug, 1997; Bellosillo, 1998; Schwartz, 2001; Stepczynska, 2001) oder Antikörper (Timmer, 2002) in Zellen Apoptose auslösen zu können.

Der Begriff der Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie geprägt, welche die morphologischen Veränderungen im Rahmen des Zelluntergangs erstmals detailliert beschrieben (Kerr, 1972).

### *1.3.1 Morphologische Veränderungen*

Apoptose ist morphologisch charakterisiert durch Zellschrumpfung (*cell shrinking*), Chromatinkondensation, Entstehung von DNA-Bruchstücken und einem Zellkernzerfall, (Wyllie, 1980) gefolgt von der Bildung membrangebundener Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*). Im Gegensatz zur Nekrose rufen die zellulären Veränderungen keine Entzündungsreaktion hervor und auch die Zytoplasmamembran bleibt intakt.

### *1.3.2 Biochemische Veränderungen*

Biochemisch kommt es bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. So wird das sonst ausschließlich auf der zytoplasmatischen Membranseite lokalisierte Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite verlagert (Homburg, 1995; Martin, 1995b; Fadok, 1998). Im Zellkern werden spezifische kalzium- und magnesiumabhängige DNAsen aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke (DNA-Leiter) zerschneiden (Cohen, 1997).

### 1.3.3 Regulation der Apoptose

Viele verschiedene Stimuli, wie z. B. Chemotherapeutika, Strahlung, Verminderung von Wachstumsfaktoren und Hormone können Apoptose auslösen (Earnshaw, 1999).

Auf molekularer Ebene sind eine Reihe von Protoonkogenen bekannt, welche in die Regulation der Apoptose involviert sind. Protoonkogene kodieren unter anderem für Proteine, die als Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Signaltransduktoren und Kontrolleure der zellulären Funktion fungieren und somit für den Fortbestand einer Zelle essentiell sind. Ihre Produkte spielen eine Hauptrolle beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und Zellteilung. Eine Unterbrechung der Protoonkogenfunktion und eine damit verbundene Mutation zu sogenannten Onkogenen, kann zu einem unkontrollierten Zellwachstum und zu Neoplasien führen (Martin, 1995a). Die starke Proliferation in hämatopoetischen Zellen begünstigt tendenziell das Auftreten solcher Mutationen.

Neben den oben genannten Apoptoseinduktoren gibt es noch die Apoptoseinduktion durch freie Sauerstoffradikale und die Rezeptor/ Liganden vermittelte Apoptose durch membranständige Todesrezeptoren. Hierbei nimmt unter anderem die Fas/ Fas-Ligand-Interaktion eine zentrale Rolle ein.

### 1.3.4 Fas-Rezeptor und Fas-Ligand

Das Fas-Rezeptor-Gen ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert. Das Protein ist ein 45 kDa großes Oberflächenprotein, welches aus einem intrazellulären, einem transmembranösen und einem extrazellulären Teil besteht. Fas, auch bekannt als Apo-1 oder CD95, ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorsuperfamilie und induziert Apoptose, indem es entweder auf natürlichem Weg durch seinen Liganden (Fas-L) oder *in vitro* durch Anti-Fas-Antikörper trimerisiert (Smith, 1994).

Der Fas-Ligand (Fas-L) löst durch Bindung an den Fas-Rezeptor die Apoptose der Zelle aus. Das menschliche Fas-Ligand-Gen ist auf dem Chromosom 1q23 lokalisiert. Das Protein ist ein Mitglied der TNF-Familie und gehört zu den Typ II Membranproteinen (Nagata, 1997). Der Fas-Ligand besteht aus einem intrazellulären N-Terminus, einem transmembranösen Abschnitt und einem extrazellulären C-Terminus.

### 1.3.5 Apoptoseinduktion durch das Fas-System

Die Aktivierung des CD95-Rezeptors erfolgt durch die Bindung des Fas-Liganden, der in oberflächengebundener oder in freier Form im Körper vorliegen kann oder durch die Bindung eines aktivierenden Anti-Fas-Antikörpers. Durch die Bindung von Fas-L oder aktivierenden Antikörpern kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Die anschließende Signaltransduktion besteht aus zwei Phasen: Im ersten Schritt wird ein DISC (*death inducing signalling complex*) gebildet. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Aktivierung von Enzymkaskaden (Scaffidi, 1998).

Von experimentellem Interesse sind neben aktivierenden auch neutrale Antikörper, die zwar an CD95 binden, aber keinen Effekt haben und inhibierende Antikörper, die an CD95 binden, eine Trimerisierung verhindern und somit eine Apoptoseinduktion durch aktivierende Antikörper verhindern.

### 1.3.6 Bildung des DISC

An der zytosolischen Seite der Zellmembran bildet sich ein Komplex (DISC) aus, bestehend aus den intrazellulären Anteilen des CD95-Rezeptors der sogenannten „Todesdomäne“ (*death domain*, DD), dem Intermediärprotein FADD (*Fas associated death domain*) und FLICE (*FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme* (ICE)) (Boldin, 1995; Chinnaiyan, 1996). Das FADD-Protein besitzt an seinem C-Terminus einen zur „Todesdomäne“ homologen Abschnitt und an seinem N-Terminus den so genannten Todeseffektor DED (*death effector domain*). Mit dem C-terminalen Ende bindet FADD an die Todesdomäne des Fas-Rezeptors, während an sein N-terminales Ende (DED) FLICE bindet (Boldin, 1996; Muzio, 1996).

### 1.3.7 Aktivierung von Enzymkaskaden

FLICE, auch als Proenzym der Caspase-8 bezeichnet, wird zu den Cysteinproteasen der *interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme* Familie gezählt. Durch die Bindung des FLICE an das FADD kommt es zur Oligomerisierung des FLICE. Dies führt zur Autoproteolyse der Caspase-8 Vorstufe, die dann die aktive Caspase-8 ins Zytosol freisetzt. Somit ist das FLICE in der Lage, andere Caspasen katalytisch zu aktivieren und eine Kaskade in Gang zu setzen (Muzio, 1997). Der weitere Kaskadenverlauf und andere wichtige zytoplasmatische Prozesse im Apoptoseverlauf sind in Abb. 1.1 graphisch dargestellt.

### Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signalwege

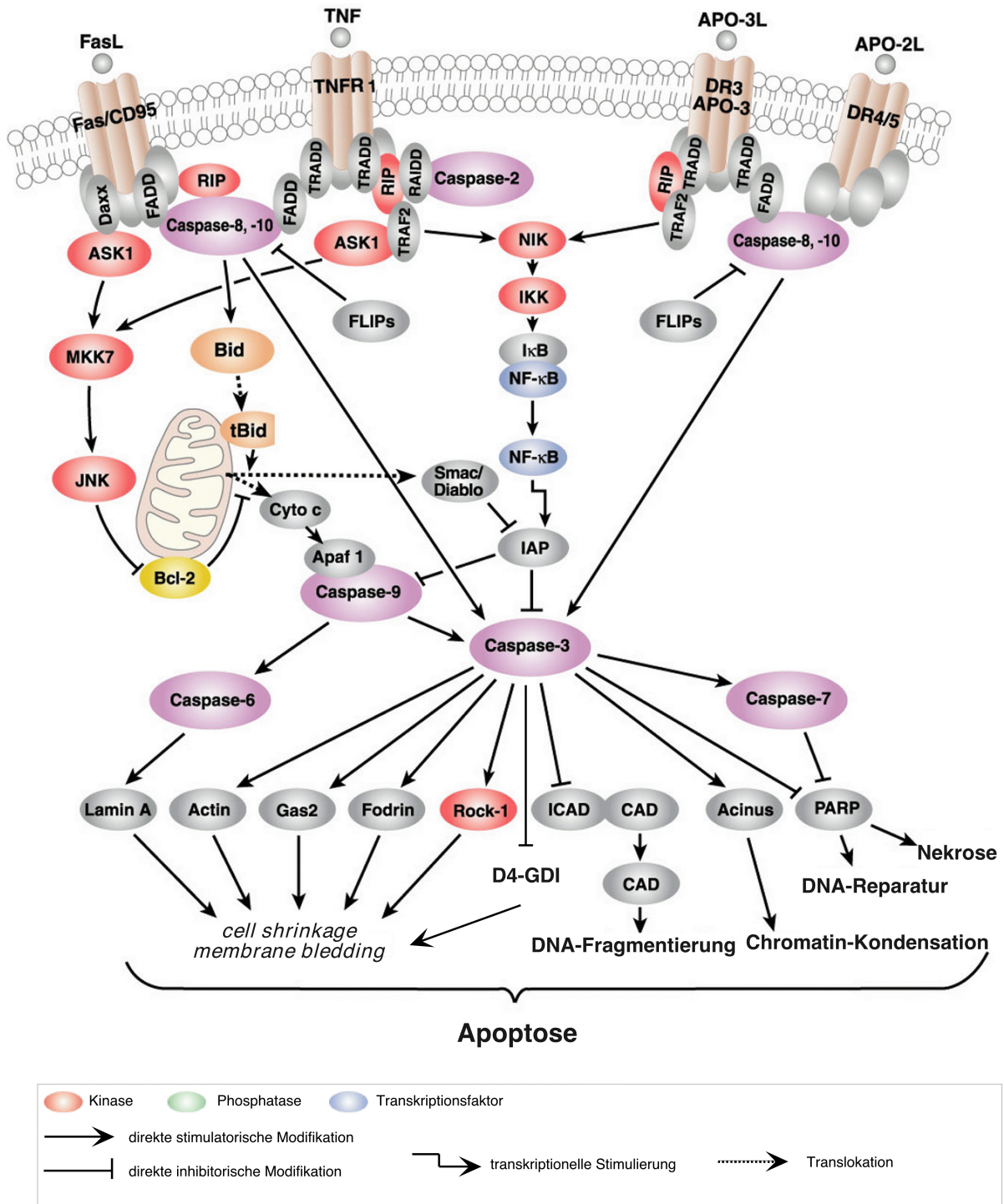
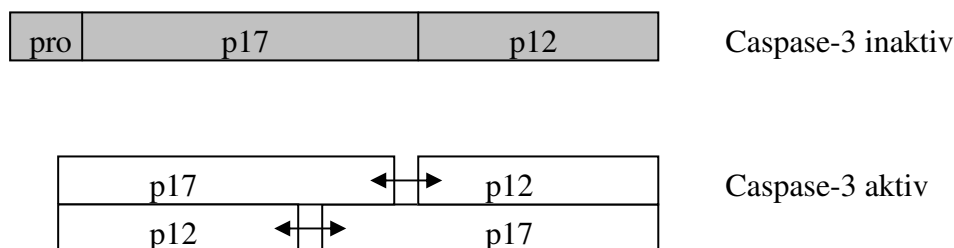


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege der Apoptose (Cell Signaling Technology, 2002).

### 1.3.8 Caspasen

Die in der Zelle durch viele verschiedene Stimuli ausgelösten Apoptosewege enden häufig in einem gemeinsamen Weg. Intrazellulär werden Cysteinproteasen, genannt Caspasen, welche Effektormoleküle des zellulären Apoptoseweges darstellen, aktiviert. Caspasen (cysteine aspartase) sind Proteasen, welche in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Die aktivierte Caspase triggert eine zur Apoptose führende Signalkaskade (Earnshaw, 1999). Bisher sind 14 verschiedene Caspasen bekannt (Wolf, 1999; Yuan, 2002). Zu den am besten charakterisierten Caspasen gehört die Caspase-1 oder auch ICE (*interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*) genannt, welche ursprünglich als Cystein Protease verantwortlich war für die Verarbeitung von Interleukin-1 $\beta$  (Yuan, 1993).

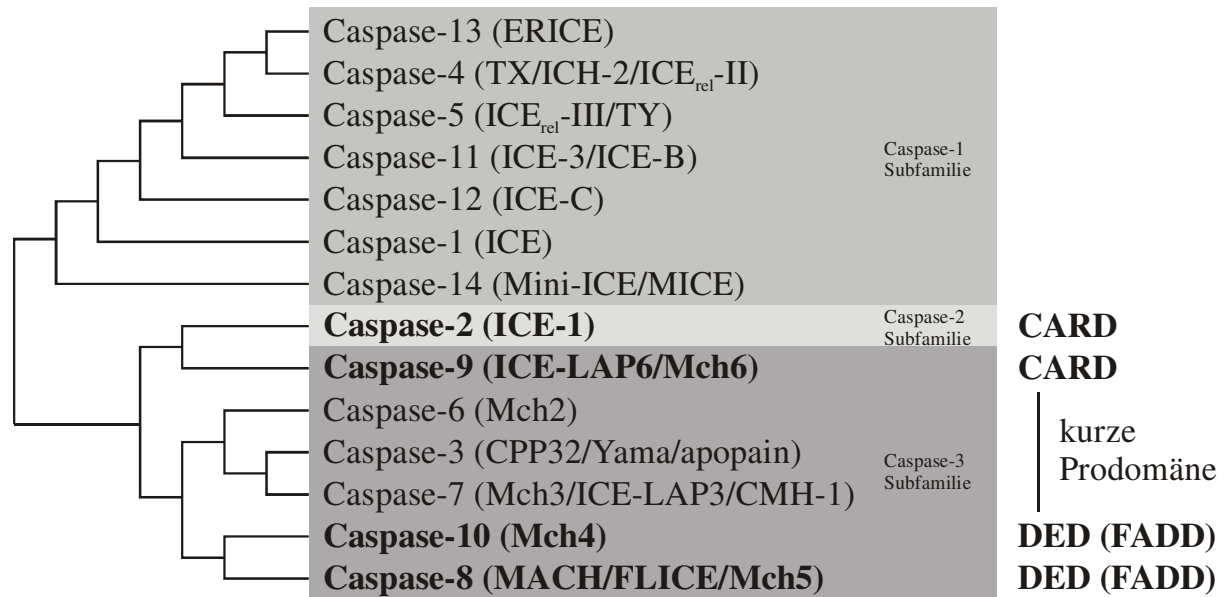
Die Proteasen Caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14 sind hauptsächlich bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen aktiv, während die Proteasen Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 in die Regulation und Ausführung der Apoptose involviert sind. Caspasen werden als Zymogene synthetisiert und bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne und zwei Untereinheiten. Das aktivierte Enzym ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten p12 und p17 (Beispiel der Caspase-3). In der Zelle liegen sie meist als Tetramere vor (Cohen, 1997).



**Abb. 1.2: Caspasenstruktur am Beispiel der Caspase-3.** Modifiziert nach Cohen (Cohen, 1997).

Caspasen mit einer großen Prodomäne (z. B. Caspase-2, -8, -10) gelten als Initiator der Apoptose, während Caspasen mit einer kurzen Prodomäne (z. B. Caspase-3, -6, -7) in einem ersten Schritt durch die Initiatorcaspasen aktiviert werden, gefolgt von einem autoproteolytischen Schritt. Diese Caspasen werden als Effektorcaspasen bezeichnet. Am N-terminalen Ende der Caspasen wurden zwei unterschiedliche Domänen entdeckt. Zum einen eine DED (*death effector domain*) und zum anderen eine CARD (*caspase recruitment*

*domain*). Die DED wird bei den Caspasen-8 und -10 gefunden und ist notwendig für die Verbindung zu FADD (*Fas associated death domain*) und TRADD (*tumor necrosis factor I associated death domain*) bei der rezeptorvermittelten Apoptose. CARD wird bei den Caspasen-1, -2, -4 und -9 gefunden und ist in die Regulation der Interaktionen der Caspasen untereinander und mit anderen Proteinen eingebunden (Earnshaw, 1999).



**Abb. 1.3: Darstellung der Verwandtschaft der Caspase-Familie-Mitglieder.**

Caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14 sind in die Kontrolle von Entzündungsreaktionen eingebunden, die Caspasen-3, -6, und -7 werden im Apoptoseverlauf durch die Caspasen-2, -8, -9 und -10 aktiviert. Modifiziert nach (Cohen, 1997; Hu, 1998; Earnshaw, 1999).

### 1.3.9 Caspasen-Inhibitoren: virale, zelluläre, synthetische

Um eine virale Replikation zu verhindern, ist es für eine infizierte Zelle am effektivsten, sich selbst via Apoptose zu vernichten. Verschiedene Viren, z. B. das Pockenvirus und das Baculovirus haben spezielle Genprodukte entwickelt, welche Caspasen und damit die Apoptose zu inhibieren scheinen. Am besten bekannt sind CrmA (*cytokine response modifier A*) des Pockenvirus und p35 des Baculovirus (Villa, 1997). Bei Säugetieren wurden bis jetzt 5 verschiedene IAP (*inhibitors of apoptosis proteine*) charakterisiert, cIAP-1, cIAP-2, XIAP, NAIP und survivin (Rothe, 1995; Roy, 1995; Liston, 1996; Uren, 1996; Earnshaw, 1999).

Caspasen besitzen eine hohe Substratspezifität (siehe Tab. 1.5). Aufgrund dieser Eigenschaft wurden mehrere synthetische Caspasen-Inhibitoren entwickelt, basierend auf den von den jeweiligen Caspasen bevorzugten Spaltstellen der Caspasen-Substrate. Die Inhibitoren wirken



als Pseudosubstrate der aktivierten Caspasen und sind damit kompetitive Inhibitoren. Am häufigsten finden spezifische Tetrapeptide (DEVD) aber auch Trimere, vor allem mit der Sequenz VAD Anwendung. Aldehydderivate dieser Peptide sind reversible Inhibitoren, während Fluoromethylketone (FMK) oder Chloromethylketone (CMK) irreversible Inhibitoren darstellen. So handelt es sich z. B. bei den in dieser Arbeit eingesetzten kommerziellen Produkten CaspACE<sup>TM</sup>FITC-VAD-FMK (Promega) und Z-DEVD-FMK (Alexis) um irreversible Caspasen-Inhibitoren. CaspACE stellt ein FITC-markiertes Konjugat des irreversiblen Caspasen-Inhibitors Z-VAD-FMK dar (Villa, 1997).

<u>Caspase</u>	<u>Optimale Spaltsequenz</u>
Caspase-1	WEHD
Caspase-4	(W/L)EHD
Caspase-5	(W/L)EHD
Caspase-3	DEVD
Caspase-7	DEVD
Caspase-2	DEHD
Caspase-6	VEHD
Caspase-8	LETD
Caspase-9	LEHD
Caspase-10	-
Caspase-11	-
Caspase-12	-
Caspase-13	-
Caspase-14	-

**Tab. 1.5: Bevorzugte Sequenzspezifität der Caspasen** (Thornberry, 1997; Earnshaw, 1999; Wolf, 1999).

### *1.3.10 Caspasen-Substrate*

Verschiedene natürliche Proteinsubstrate der Caspasen wurden inzwischen identifiziert und charakterisiert. Eine Auflistung findet sich bei Earnshaw (Earnshaw, 1999). Zu den wahrscheinlich am besten untersuchten Substraten gehört PARP (116 kDa) (Poly-ADP-Ribose Polymerase), welches im Apoptoseverlauf in ein 24 kDa und ein 89 kDa Fragment gespalten wird (Lazebnik, 1994; Tewari, 1995; Cohen, 1997; Soldani, 2001). PARP ist ein ATP-abhängiges DNA-Reparaturenzym (Tong, 2001a; Tong, 2001b) und eine Spaltung während der Apoptose verhindert sowohl eine DNA-Reparatur als auch eine ATPase Aktivität. Die Caspasen-3 und -7 scheinen für die Spaltung von PARP verantwortlich zu sein. Des Weiteren wurden das U1-70 kDa Protein (Casciola-Rosen, 1994), das Lamin A und B (Weaver, 1996) sowie zahlreiche zytoskeletale Proteine wie Gas-2 (Brancolini, 1995),

Gelsolin (Kothakota, 1997),  $\beta$ -Catenin (Brancolini, 1997) beschrieben, welche von den Caspasen gespalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit fanden sowohl FITC-markierte Anti-PARP-Antikörper als auch das fluoreszenzmarkierte Substrat der aktivierten Caspase-3 PhiPhiLux-G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> Anwendung.

### 1.3.11 Apoptosenachweis

Apoptose kann unter anderem durch Annexin V, gekoppelt z. B. an Fluoresceinisothiocyanat (FITC), und 7-Amino-Aktinomycin D (7-AAD) nachgewiesen werden.

Annexin V ist ein Protein welches an Phosphatidylserine (PS) bindet. PS werden im Apoptoseverlauf auf die Zellmembranaußenseite verlagert. Apoptotische Zellen können dementsprechend nach Bindung von Annexin V-FITC an extrazelluläres PS durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

7-AAD (7-Amino Actinomycin D) ist eine fluoreszierende Substanz, die nach Bindung an DNA-Moleküle (Philpott, 1996) ihre fluoreszierenden Eigenschaften ändert (Gill, 1975). In vitale Zellen wird 7-AAD nicht aufgenommen. Im Laufe der Apoptose verändert sich jedoch die Zellmembran, so dass 7-AAD in das Zellinnere diffundieren und in die DNA interkalieren kann (Schmid, 1994a; Schmid, 1994b).

## 1.4 Zytostatikaresistenzen

Viele Tumorerkrankungen des Menschen sprechen nur schlecht auf die Behandlung mit Zytostatika an. Diese Tumoren haben eine so genannte *multiple drug resistance* (MDR) entwickelt. Vermittelt wird diese Resistenz u. a. durch eine Familie membranständiger Transportproteine, welche die Zytostatika aus dem Zytosol wieder in den Extrazellulärraum zurücktransportieren. Eines der wichtigsten Mitglieder der MDR-Familie in diesem Zusammenhang ist das MDR-1 Protein. MDR-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170-180 kDa und wird auch als P-Glykoprotein bezeichnet (Souviron Rodriguez, 1997).

Tumoren mit einer hohen MDR-1-Expression sind relativ unempfindlich gegenüber zahlreichen konventionellen Zytostatika, wohingegen die initiale Therapieempfindlichkeit von Leukämien und Lymphomen mit einer niedrigen MDR-1-Expression mit der normaler hämatopoetischer Zellen vergleichbar ist (Löffler, 1997).

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung:

Bei der AA und den MDS handelt es sich um lebensbedrohliche hämatologische Erkrankungen, die kurativ durch eine allogene Knochenmarktransplantation behandelt werden können. Besteht diese Therapieoption nicht (fehlender Spender, fehlende Transplantatindikation) sind Antilymphozyten- (ALG) und Antithymozytenglobulin (ATG) die Mittel der Wahl in der immunsuppressiven Therapie der aplastischen Anämie. Neuere Studien zeigten auch eine Wirksamkeit von ATG bei Subgruppen von Patienten mit *low-risk* myelodysplastischen Syndromen. ATG enthält eine Vielzahl verschiedener Antikörper, welche gegen zahlreiche Epitope gerichtet sind. Bisher ist nicht bekannt, auf welche Komponenten die Wirksamkeit von ALG- und ATG-Präparationen bei der AA und den MDS zurückzuführen ist. Weiterhin ist bislang unklar, wie eine polyklonale T-Lymphozyten-Antikörper-Präparation bei einer klonalen, malignen Stammzellerkrankung eine Remission erzielen kann.

Bisher wurden als Wirkprinzip des ATG seine immunsuppressiven Eigenschaften angenommen. Aufgrund der klinischen Wirksamkeit von ATG bei MDS sollten noch andere mögliche Wirkungsmechanismen des ATG untersucht werden, vor allem direkte Wirkungen von ATG auf maligne myeloische Zellen.

Hierfür wurde zunächst untersucht,

- ob ATG in malignen myeloischen Zelllinien Apoptose auslösen kann,
- ob es Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien gibt,
- ob es Unterschiede zwischen den untersuchten ATG-Präparationen gibt,
- ob eine Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion besteht und
- ob eine Zeitabhängigkeit der Apoptoseinduktion vorhanden ist.

Von besonderem Interesse im Rahmen des Apoptosenachweises waren darüber hinaus die Untersuchung des Fas-Liganden/ Rezeptorsystems und die Untersuchung der Beteiligung von Caspasen :

- Enthält ATG CD95-Antikörper?
- Wird die Expression des CD95-Rezeptors durch ATG beeinflusst?
- Kann die ATG-induzierte Apoptose durch induzierende CD95-Antikörper gesteigert werden?

- Kann die ATG-induzierte Apoptose durch blockierende CD95-Antikörper gehemmt werden?
- Werden im Rahmen der ATG-induzierten Apoptose Caspasen aktiviert?
- Kann die ATG-induzierte Apoptose durch Caspasen-Inhibitoren gehemmt werden?

Des Weiteren sollte durch Koinkubationsexperimente mit Zytostatika und Wachstumsfaktoren geprüft werden, ob synergistische oder antagonistische Wirkungen auf die mit ATG induzierte Apoptose erreicht werden können. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch ein möglicher Effekt von Cyclosporin A (CsA), welches in Kombination mit ATG als Standardtherapie der AA eingesetzt wird, auf die ATG-induzierte Apoptose untersucht. CsA blockiert das Glykoprotein-P und kann dadurch eine eventuelle *multiple drug resistance* der Zellen überwinden.

Da ein möglicher Einfluss des ATG auf die Teilungsrate der Zellen nicht ausgeschlossen werden kann, wurden Proliferationsuntersuchungen durchgeführt.

Um den eventuell vorhandenen proliferativen Effekt des ATG auf primäre Zellen zu untersuchen, wurden Koloniewachstumsstudien mit mononukleären Knochenmarkzellen von Patienten durchgeführt. Die Patienten befanden sich in einer multizentrischen Studie zur immunmodulatorischen Therapie von *low-risk* myelodysplastischen Syndromen mit Antilymphozyten-/ Antithymozytenglobulin.

Der Anteil apoptotischer CD34+-oder CD3+-Zellen aus peripherem Blut von MDS-Patienten wurde bestimmt, um damit Aussagen über eine gegebenenfalls erhöhte Apoptoserate dieser Zellen bei den Patienten machen zu können. Durch Inkubation mit ATG wurde die Wirkung des ATG auf die mononukleären Patientenzellen untersucht.