

4 ERGEBNISSE

4.1 Datengewinnung und Darstellung

Falls in den entsprechenden Ergebnisteilen nicht anders erwähnt, wurden die Daten nach dem hier beschriebenen Schema gewonnen, ausgewertet und dargestellt.

Anhand der Durch- und Streulichteigenschaften wurde die zu betrachtende Zellpopulation ausgewählt (R1 in Abb. 4.1a). Anschließend erfolgte durch eine Kontrolle die Definition der Annexin- bzw. 7-AAD-Negativität der Zellen (siehe Abb. 4.1b) um so bei den Positiv-Proben den Anteil der positiv gefärbten Zellen bestimmen zu können (M1 in Abb. 4.1c).

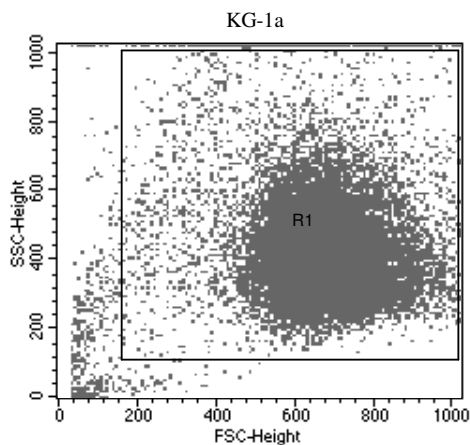


Abb. 4.1a: Auswählen der gewünschten Zellpopulation anhand von Durch- und Streulichteigenschaften im FCS und SSC.

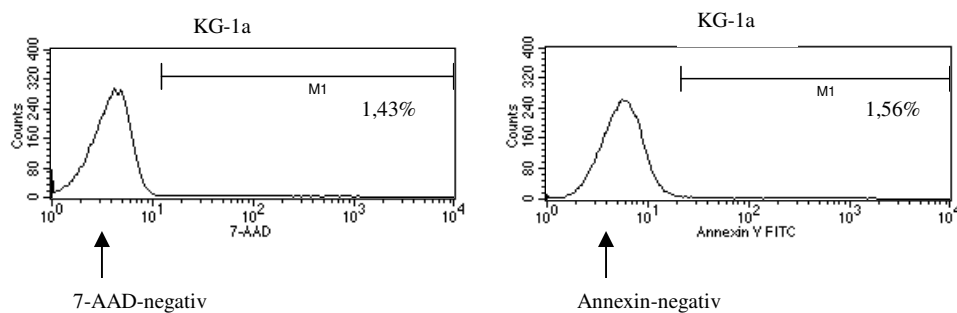


Abb. 4.1b: Setzen des Markers M1 anhand der Negativ-Kontrolle.

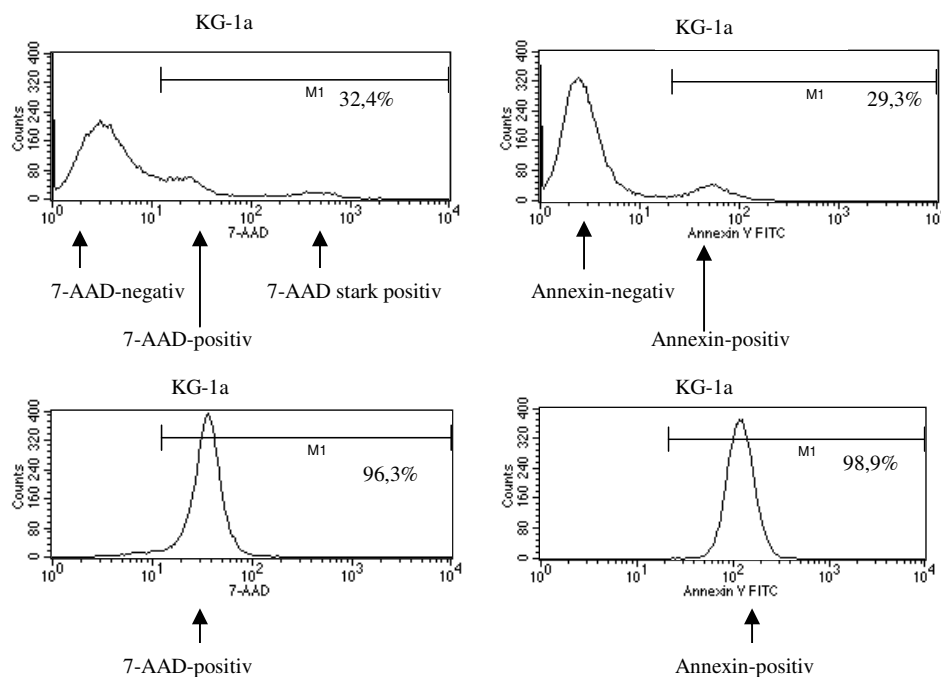


Abb. 4.1c: Bestimmung des Prozentsatzes positiver Zellen in den entsprechenden Proben. Beispiele gezeigt für Annexin und 7-AAD.

Die anhand des gesetzten Markers M1 erhaltenen Werte wurden in Excel-Tabellen übertragen und in den gezeigten Diagrammen graphisch dargestellt.

4.2 Vergleich des Apoptosenachweises mittels 7-AAD und Annexin V-FITC

Zur Überprüfung der Übereinstimmung von den durch eine 7-AAD- oder durch eine Annexin V-FITC-Färbung erhaltenen Ergebnisse wurde eine Korrelation der Annexin- und 7-AAD-Werte durchgeführt (siehe Abb. 4.2).

Es wurden 905 Annexin V-FITC/7-AAD-Doppelmarkierungen mit anschließender Messung der apoptotischen Zellen durchgeführt. Die 905 Messungen ergaben in der einfachen Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten mit $R = 0,943$ und mit $p < 0,001$.

Aufgrund der durch die Regressionsanalyse erhaltenen Werte, welche eine Übereinstimmung der Ergebnisse von Annexin V-FITC und 7-AAD zeigten, wurde bei einigen Versuchen auf eine Annexin V-FITC/7-AAD-Doppelmarkierung verzichtet und nur eine 7-AAD-Färbung durchgeführt. Auch die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen zeigen nur die durch die 7-AAD-Färbung erhaltenen Werte.

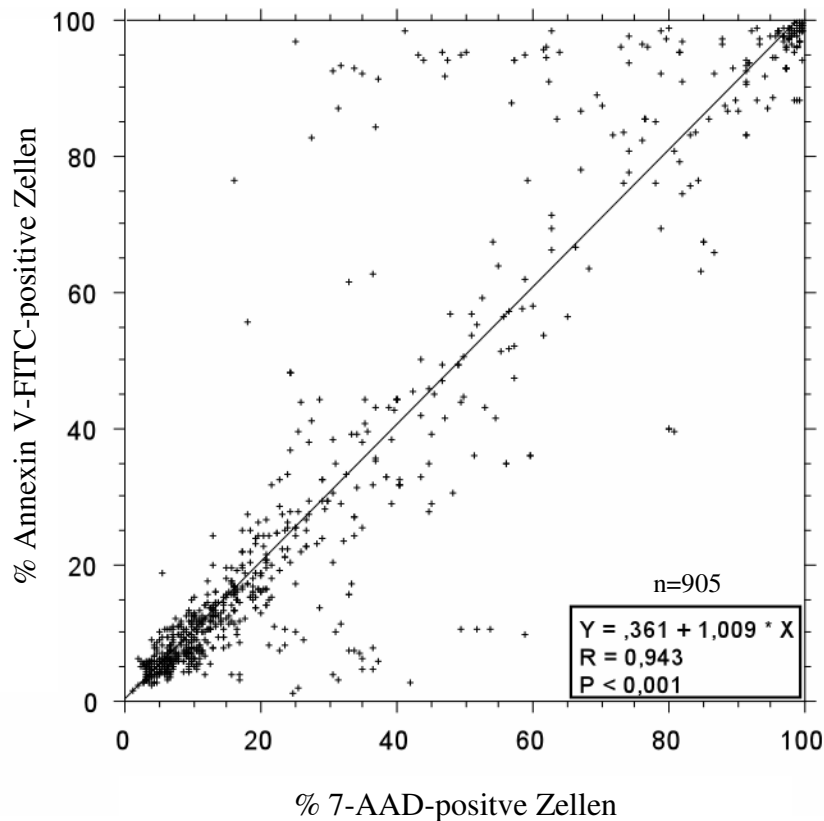


Abb. 4.2: Regressionsanalyse des Prozentsatzes apoptotischer Zellen gemessen durch 7-AAD- bzw. Annexin V-FITC-Färbung.

4.3 Einfluss von IgG-Kontrollantikörpern auf das Apoptoseverhalten der Zellen

Für polyklonale ATG-Präparationen gibt es keine vollkommen korrekte Isotypenkontrolle, da ein Präimmenserum von dem selben Tier vor der Immunisierung nicht erhältlich ist. Daher wurden in den Versuchen, um dennoch eventuell vorhandene unspezifische Effekte der IgG-Präparationen ausschließen zu können, Pferde- und Kaninchen-IgG-Kontrollantikörper eingesetzt. KG-1a-Zellen wurden bis zu 10 Tage mit den Kontrollantikörpern in Konzentrationen von 0 µg/mL -1000 µg/mL inkubiert. An den Tagen 0, 2, 4, 7 und 10 wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels 7-AAD-Färbung bestimmt (siehe Abb. 4.3a und b). Es zeigte sich, dass sowohl die Pferde- als auch die Kaninchen-Kontrollantikörper zu keinem Zeitpunkt in keiner der eingesetzten Konzentrationen zur Apoptose der Zellen geführt haben (siehe Abb. 4.3a und b). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Versuchen darauf verzichtet, den Kontrollansätzen IgG-Kontrollantikörper hinzuzufügen.

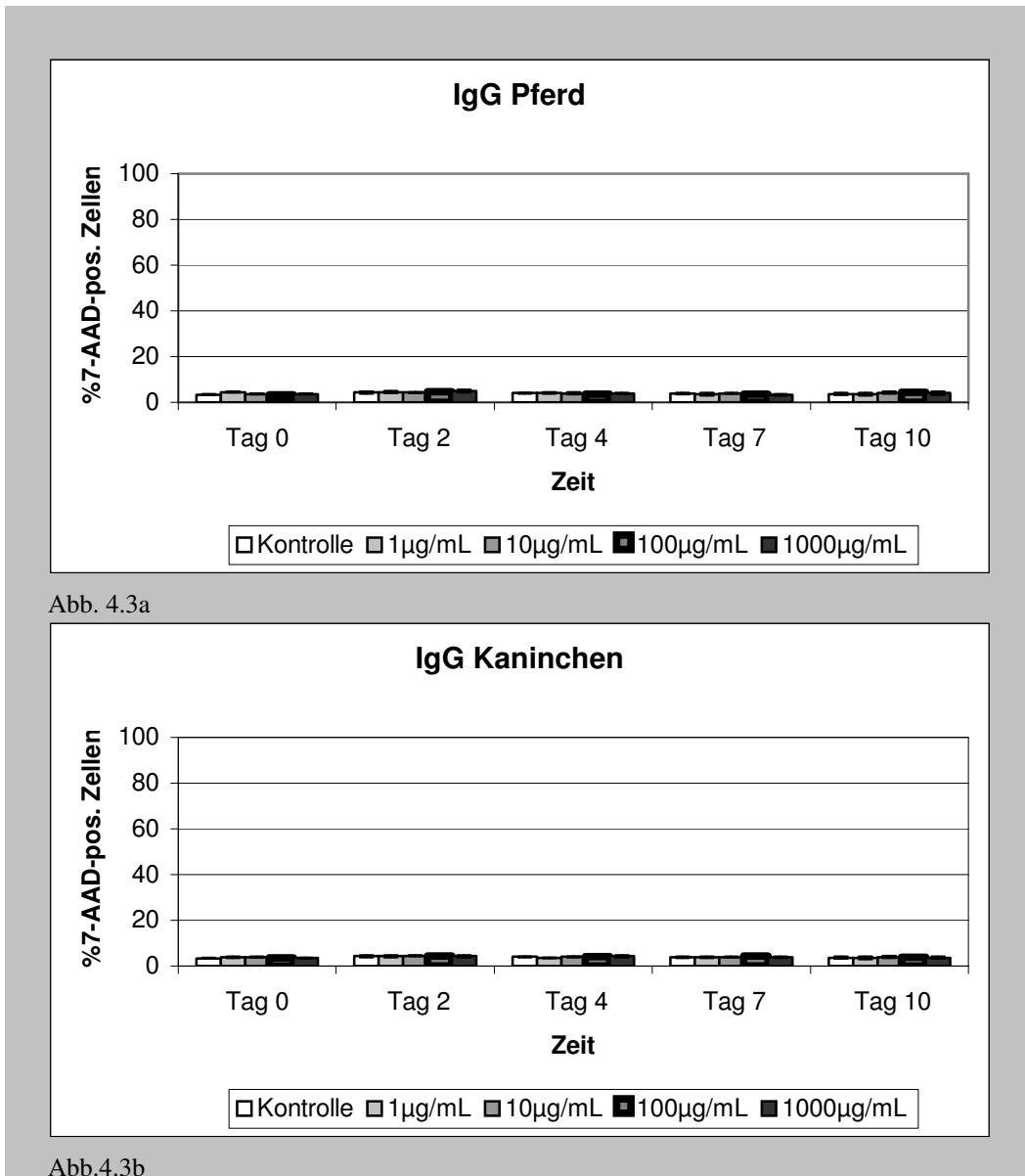


Abb. 4.3a und b: Inkubation von KG-1a-Zellen mit Pferde- oder Kaninchen-IgG.
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) 7-AAD-positiver Zellen der Zelllinie KG-1a an den Tagen 0, 2, 4, 7 und 10 nach Inkubation mit Pferde- oder Kaninchen-IgG in den Konzentrationen 0 µg/mL-1000 µg/mL.

4.4 ATG-induzierte Apoptose in malignen myeloischen und lymphatischen Zelllinien

Eine klinische Wirksamkeit von ATG bei Subgruppen von Patienten mit *low-risk* myelodysplastischem Syndrom konnte bereits nachgewiesen werden. Bisher ist nicht klar, welche Komponenten und Mechanismen für die Wirksamkeit des ATG bei MDS und AA verantwortlich sind. Insbesondere ist unklar, wie polyklonale Antilymphozyten- oder Antithymozyten-Antikörper-Präparationen bei einer malignen, klonalen Stammzellerkrankung Remissionen erzielen können. Um Einblicke in den Wirkungsmechanismus des ATG zu erlangen, wurde zunächst untersucht, ob ATG in malignen myeloischen Zelllinien Apoptose auslösen kann.

Die malignen myeloischen und lymphatischen Zelllinien NB-4, KG-1a, U-937, Jurkat, K-562 und HL-60 wurden mit vier kommerziell erhältlichen ATG-Präparationen (Tecelac, Lymphoglobulin, Thymoglobulin und ATG-Fresenius S) in Konzentrationen von 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL, mit Zytostatika (50 µM Etoposid) oder mit Arsentrioxid (5 µM) bis zu 10 Tage inkubiert (siehe Abb. 4.4a und 4.4b). Die Verwendung von Etoposid (VP-16) und Arsentrioxid diente der Kontrolle der Apoptoseinduktion. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels 7-AAD-Färbung oder 7-AAD/Annexin V-FITC-Doppelmarkierung (nicht dargestellt) zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 2, 4, 7 und 10) bestimmt.

Die Abbildungen 4.4a und 4.4b machen die Heterogenität der verschiedenen Zelllinien bezüglich der Apoptose-Sensitivität deutlich.

Bei den Zellen der Zelllinie Jurkat konnte für die Konzentrationen von 100 µg/mL und 1000 µg/mL ATG bereits an Tag 2 für alle ATG-Präparationen eine Erhöhung der Zahl 7-AAD-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. So lag der Anteil apoptotischer Zellen für 100 µg/mL Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S an Tag 2 bei 81,1%, 19,7%, 44,0% und 26,4% und steigerte sich auf 82,0%, 46,6%, 86,2% und 44,0% an Tag 10. Für 1000 µg/mL lag der Anteil 7-AAD-positiver Zellen schon an Tag 2 bei 98,3%, 89,7%, 94,7% und 96,3%. Selbst für 10 µg/mL lag die Zahl apoptotischer Zellen an Tag 10 bei 54,5%, 20,3%, 39,2% und 22,0%. Bei diesen Zellen zeigte Lymphoglobulin gefolgt von Tecelac die höchsten Apoptoseraten.

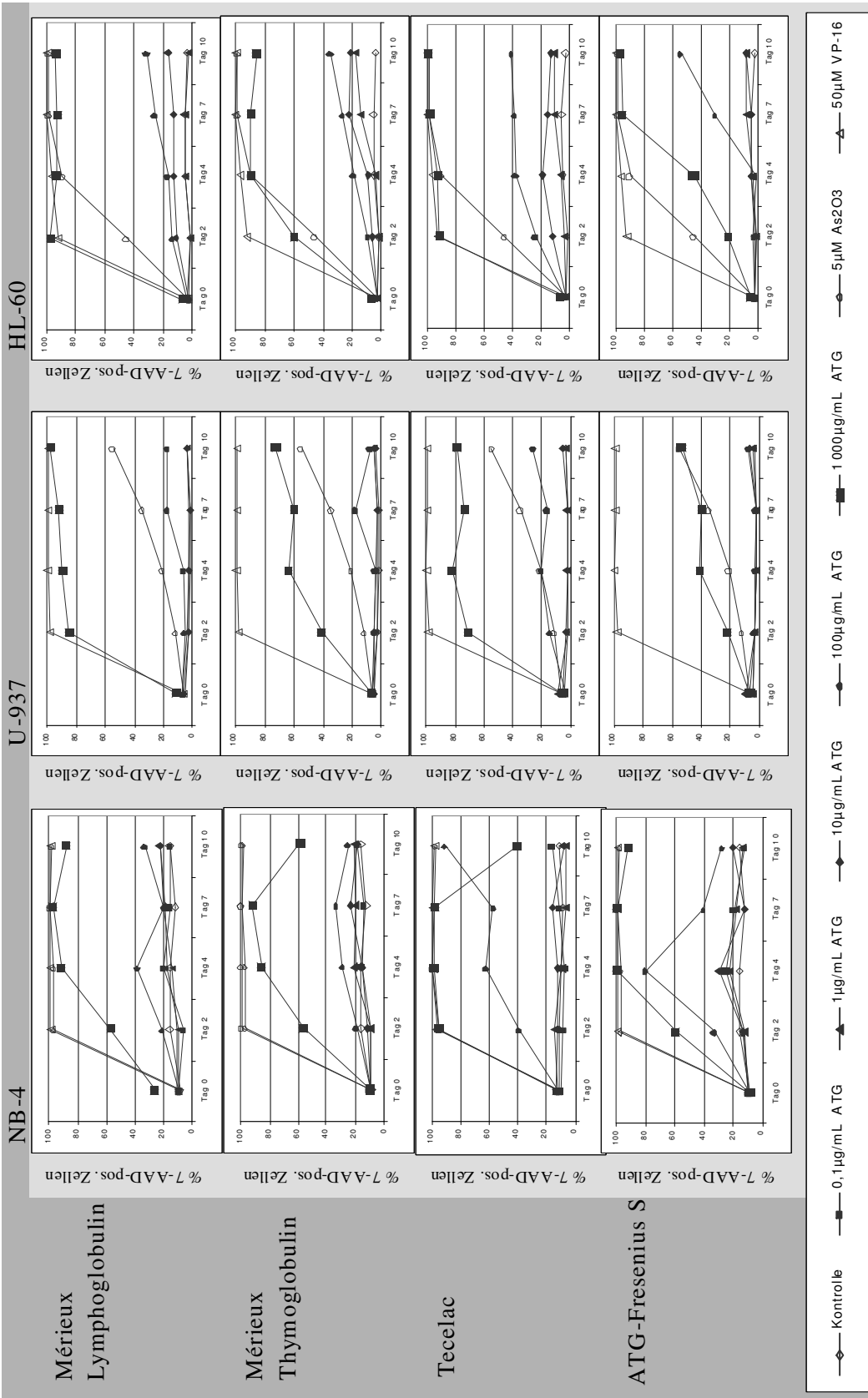


Abb. 4.4a: Apoptoseinduktion in malignen myeloischen und lymphatischen Zelllinien durch ATG, Etoposid (VP-16) und As₂O₃.
 Dargestellt ist der Anteil 7-AAD-positiver Zellen der Zelllinien NB-4, U-937 und HL-60 an den Tagen 0, 2, 4, 7 und 10 nach Inkubation mit Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac und ATG-Fresenius S in Konzentrationen von 0,1 µg/ mL- 1000 µg/ mL, Arsenitoxid (5 µM) und VP-16 (50 µM).

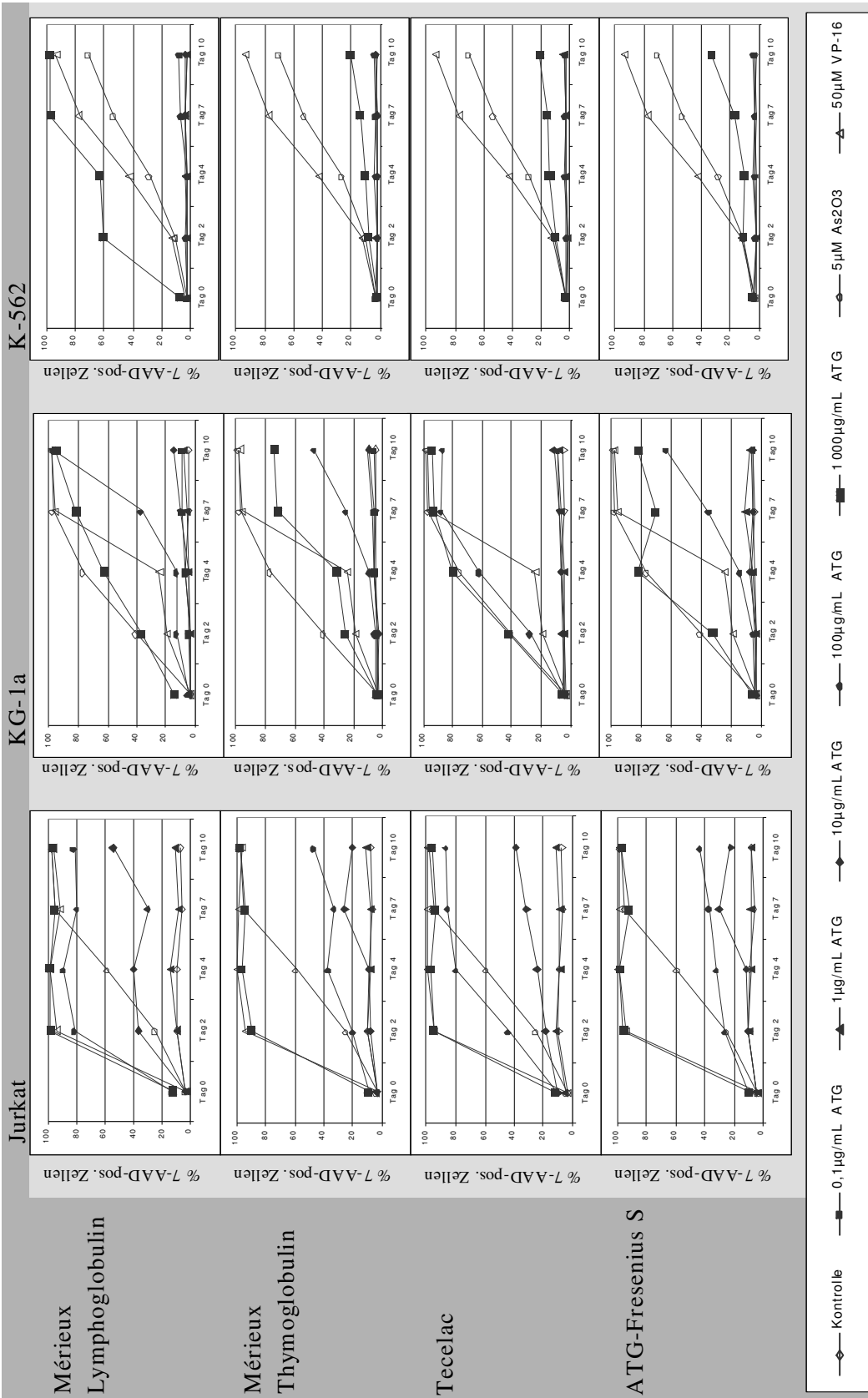


Abb. 4.4 b: Apoptoseinduktion in malignen myeloischen und lymphatischen Zelllinien durch A TG, Etoposid (VP-16) und As₂O₃. Dargestellt ist der Anteil 7-AAD-positiver Zellen der Zelllinien Jurkat , KG-1a und K-562 an den Tagen 0, 2, 4, 7 und 10 nach Inkubation mit Lymphoglobulin, Thymoglobulin , Tecelac und ATG-Fresenius S in Konzentrationen von 0,1 µg/ mL- 1000 µg/ mL, Arsenitoxid (5 µM) und VP-16 (50 µM).

Bei der Zelllinie KG-1a konnte, bis auf eine Ausnahme (100 µg/mL Tecelac 27,2%), nur für 1000 µg/mL eine Erhöhung der Rate apoptotischer Zellen an Tag 2 beobachtet werden (Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S 36,6%, 25,4%, 41,9%, 31,9%). An Tag 10 lagen die Werte 7-AAD-positiver Zellen für 1000 µg/mL bei 95,8%, 74,0%, 94,3% und 81,8% und für 100 µg/mL bei 96,0%, 47,2%, 86,7% und 62,9% (Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S). Für die übrigen ATG-Konzentrationen konnte keine Erhöhung der apoptotischen Zellen festgestellt werden. Am sensibelsten reagierten die KG-1a-Zellen auf Tecelac gefolgt von Lymphoglobulin.

K-562-Zellen zeigten nur für 1000 µg/mL Lymphoglobulin eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen an Tag 2 (60,5%), die sich auf 97,9% an Tag 10 steigerte. Die verbleibenden ATG-Präparationen zeigten an Tag 10 für 1000 µg/mL nur eine geringfügige Steigerung der Apoptoserate auf 21,2% (Thymoglobulin) 20,9% (Tecelac), 33,5% (ATG-Fresenius S). Bei den übrigen ATG-Konzentrationen konnte keine Wirkung beobachtet werden. Die deutlichste Wirkung hinsichtlich der Apoptoseinduktion bei dieser Zelllinie zeigte sich für Lymphoglobulin gefolgt von ATG-Fresenius S.

Die Zellen der Zelllinie NB-4 zeigten an Tag 2 sowohl für 1000 µg/mL als auch geringfügig für 100 µg/mL eine Erhöhung der 7-AAD-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle. So lag der Anteil apoptotischer Zellen für 100 bzw. 1000 µg/mL Lymphoglobulin bei 20,9% bzw. 57,2%. Für Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S lagen die entsprechenden Werte bei 19,1% bzw. 56,2%, 39,4% bzw. 95,4% und 33,6% bzw. 59,6%. An Tag 7 waren bei 1000 µg/mL Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S 97,5%, 91,9%, 98,5% und 99,7% der Zellen apoptotisch. Für 100 µg/mL zeigte sich eine Erhöhung auf 20,8%, 33,9%, 57,4% und 40,3% für die entsprechenden ATG-Präparationen. Die übrigen ATG-Konzentrationen führten zu keiner erhöhten Apoptoserate. Die deutlichste Wirkung konnte bei Tecelac beobachtet werden.

Auch bei der Zelllinie U-937 konnte an Tag 2 für 1000 µg/mL ATG eine Steigerung der 7-AAD-positiven Zellen beobachtet werden (Lymphoglobulin 85,1%, Thymoglobulin 41,1%, Tecelac 70,3% und ATG-Fresenius S 21,3%), welche sich auf 98,7%, 72,2%, 78,4% und 53,1% an Tag 10 erhöhte. Bei 100 µg/mL zeigte nur Tecelac an Tag 2 einen geringfügigen Anstieg der apoptotischen Zellen auf 14,6%. An Tag 10 lagen die Werte bei 17,2%, 7,4%, 26,3% und 7,6% (Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S).

Eine eindeutige Wirksamkeit zeigte sich nur für die höchste ATG-Konzentration. Am sensibelsten reagierten die U-937-Zellen auf Lymphoglobulin und Tecelac, am wenigsten sensibel zeigten sie sich gegenüber ATG-Fresenius S.

An Tag 2 lag der Anteil 7-AAD-positiver HL-60-Zellen für 1000 µg/mL Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S bei 97,4%, 59,8%, 91,3% und 22,1% und steigerte sich auf 94,1%, 85,7%, 99,0% und 97,0%. 100 µg/mL ATG führten an Tag 2 nur zu einer geringfügigen Erhöhung der apoptotischen Zellen auf 13,7%, 9,5%, 23,6% und 13,8%. An Tag 10 waren 31,9%, 85,7%, 40,7% und 54,1% der Zellen apoptotisch (Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac, ATG-Fresenius S). Für 10 µg/mL ATG lag die Rate apoptotischer Zellen an Tag 10 bei 16,8%, 21,2%, 13,2% und 8,6%. Eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich somit bei allen Präparationen. Die größte Wirksamkeit konnte bei Tecelac, gefolgt von den Präparationen Lymphoglobulin und Thymoglobulin beobachtet werden.

Die Anzahl 7-AAD-positiver Zellen in den Kontrollen lag für alle Zelllinien bis auf NB-4 (<17,0%) unter 10% 7-AAD-positiver Zellen. Für die Konzentrationen 0,1 µg/mL und 1 µg/mL ATG konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. An Tag 2 konnte jedoch für alle Zelllinien bei 1000 µg/mL eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden.

Arsentrioxid und Etoposid induzierten in den Zelllinien NB-4, HL-60, KG-1a und Jurkat in über 90% der Zellen nach 10 Tagen Apoptose (Arsentrioxid bzw. (Etoposid) NB-4 96,3% bzw. (98,8%), HL-60 98,5% bzw. (99,6%), KG-1a 94,2% bzw. (91,3%) und Jurkat 98,0% bzw. (98,0%)). In den Zelllinien U-937 und K-562 induzierte Etoposid nach 10-tägiger Inkubationszeit in 99,3% bzw. 93,2% der Zellen Apoptose, Arsentrioxid in 54,6% der Zellen bzw. in 70,9% der Zellen.

Insgesamt waren die lymphatischen Zellen der Jurkat-Zelllinie am sensibelsten gegenüber der ATG-Wirkung, gefolgt von den Zelllinien KG-1a, NB-4 und HL-60. Am resistentesten zeigten sich die K-562- und U-937-Zellen.

Betrachtet man alle untersuchten Zelllinien, so zeigten Lymphoglobulin und Tecelac die größten Wirksamkeiten bezüglich der Apoptoseinduktion.

Somit konnte gezeigt werden, dass ATG nicht nur in malignen lymphatischen Zelllinien (Jurkat) sondern auch in myeloischen Zelllinien (HL-60, K-562, KG-1a, NB-4, U-937) in hohen Konzentrationen (100 $\mu\text{g/mL}$ und 1000 $\mu\text{g/mL}$) Apoptose auslösen kann.

In Abb. 4.5a und 4.5b dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller mit den Zelllinien Jurkat (siehe Abb. 4.5a) und KG-1a (siehe Abb. 4.5b) und Lymphoglobulin durchgeführten Versuche. Es bestand eine gewisse Interassayvarianz. Die Fähigkeit des ATG Apoptose auslösen zu können, wurde jedoch deutlich. Bei der Zelllinie Jurkat (siehe Abb. 4.5a) zeigte sich für 1000 $\mu\text{g/mL}$ bereits an Tag 2 ein durchschnittlicher Anteil 7-AAD-positiver Zellen von 75,2%, der sich auf 79,7% an Tag 7 steigerte. Für 100 $\mu\text{g/mL}$ lag der Prozentsatz apoptotischer Zellen an Tag 7 bei 61,0% und auch für 10 $\mu\text{g/mL}$ bei 24,2% im Vergleich zu der Kontrolle mit 7,5%. Bei der Zelllinie KG-1a (siehe Abb. 4.5b) zeigte sich an Tag 7 ein Anteil 7-AAD-positiver Zellen von 84,8% bei 1000 $\mu\text{g/mL}$ und von 38,3% bei 100 $\mu\text{g/mL}$ ATG. Die Kontrolle lag im Durchschnitt bei 5,5% apoptotischer Zellen.

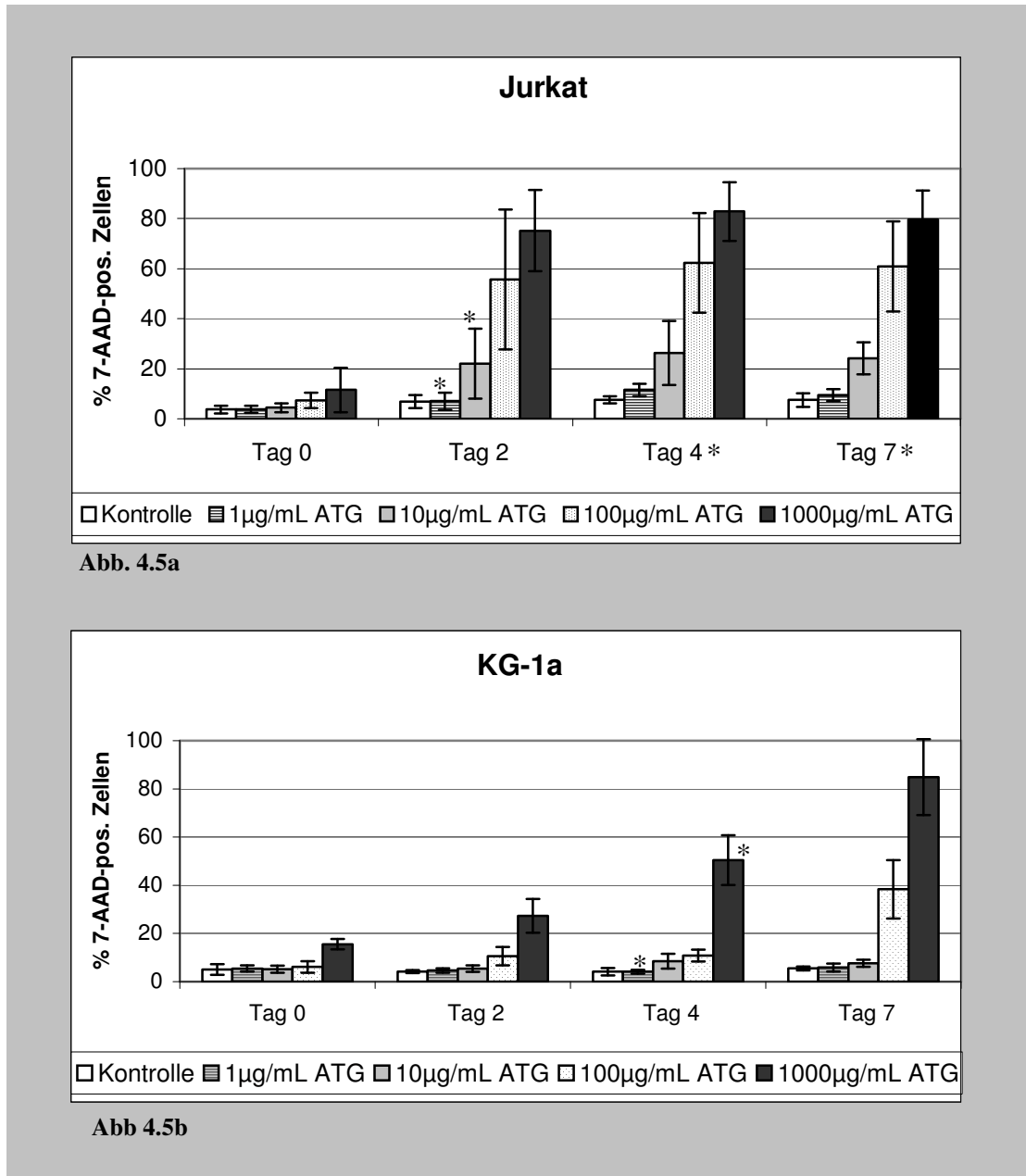


Abb. 4.5a und b: Apoptoseinduktion in KG-1a- und Jurkat-Zellen durch ATG.

Anteil 7-AAD-positiver Zellen der Zelllinien KG-1a und Jurkat an den Tagen 0, 2, 4 und 7 nach Inkubation mit Lymphoglobulin. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von allen durchgeführten Messungen ($n \geq 4$) mit den Zelllinien Jurkat (4.5a) und der Zelllinie KG-1a (4.5b).

* Anzahl der durchgeführten Messungen 3.

4.5 Koinkubationsexperimente

Durch Koinkubationsexperimente mit Zytostatika oder hemmenden bzw. induzierenden CD95-Antikörpern sollte ein möglicherweise synergistischer oder antagonistischer Effekt auf die ATG-induzierte Apoptose geprüft werden.

4.5.1 Apoptoseinduktion durch Koinkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und Etoposid

Mit Hilfe dieser Experimente sollten eventuelle Mechanismen der Apoptoseinduktion durch ATG untersucht werden. Hierfür wurde zunächst geklärt, ob es durch Koinkubation von ATG mit dem Zytostatikum Etoposid (VP-16, Topoisomerasehemmer) zu einer additiven oder sogar synergistischen Steigerung der Rate apoptotischer Zellen kommt.

KG-1a-Zellen wurden bis zu 7 Tage mit ATG Tecelac in den Konzentrationen 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL und Etoposid (2 µM, 10 µM und 50 µM) koinkubiert. An den Tagen 0, 2 und 7 wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Annexin/7-AAD-Färbung bestimmt (Ergebnisse siehe Abb. 4.6a-d).

Für die mit Etoposid inkubierten Zellen konnte ein Anstieg der apoptotischen Zellen auf 12,3% (2 µM), 83,0% (10 µM) und 99,0% (50 µM) an Tag 7 beobachtet werden. Für die Ansätze mit ATG wurden Prozentsätze 7-AAD-positiver Zellen von 4,3%, 9,8%, 97,2% und 98,8% (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL) an Tag 7 ermittelt. Bei den Kontrollen und bei den Ansätzen an Tag 0 lag der Anteil 7-AAD-positiver Zellen stets unter 5,3%.

Lediglich in dem Koinkubationsansatz mit 100 µg/mL ATG und 50 µM Etoposid an Tag 2 konnte eine Erhöhung der Rate apoptotischer Zellen auf 36,8% im Vergleich zu den Ansätzen mit den jeweiligen Einzelsubstanzen (Etoposid 50 µM 21,5% und ATG 1000 µg/mL 26,3%) gemessen werden. Ansonsten konnte zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Steigerung der Apoptoserate der Kombinationsansätze im Vergleich zu der durch die Einzelsubstanzen herbeigeführten Rate gezeigt werden.

Somit konnte weder ein eindeutig additiver noch ein synergistischer Effekt auf die ATG-vermittelte Apoptose durch Koinkubation mit Etoposid nachgewiesen werden.

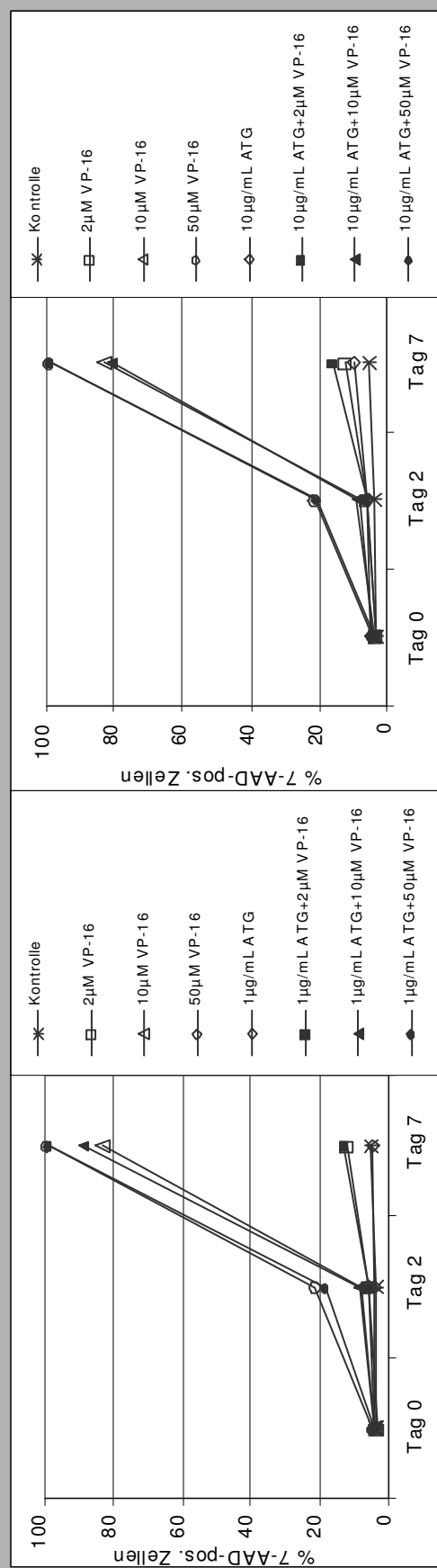


Abb. 4.6b

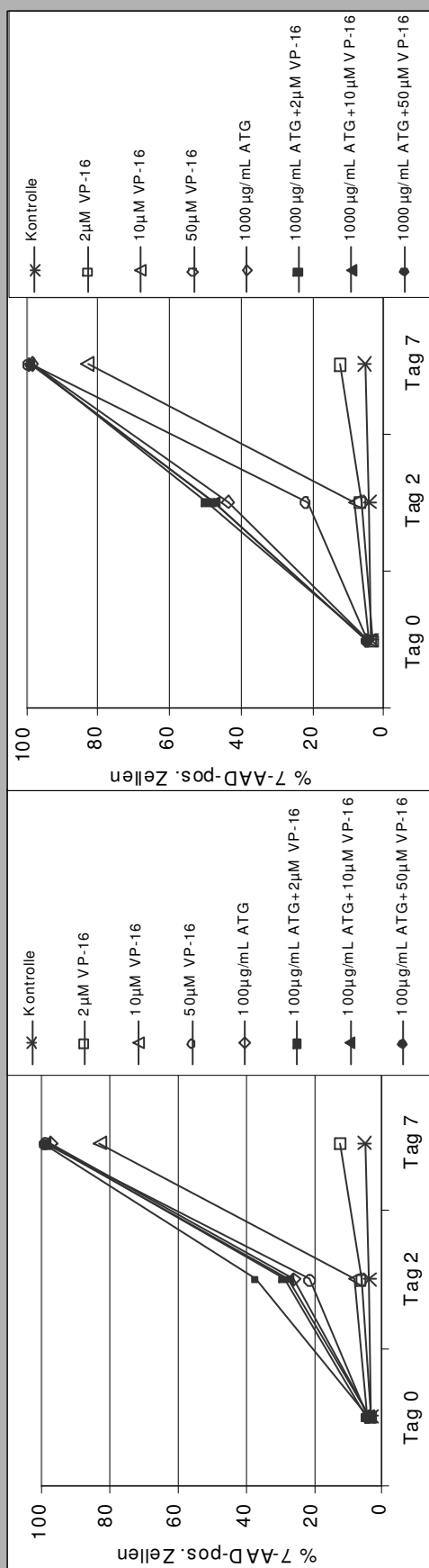


Abb. 4.6d

Abb. 4.6a-d: Koinkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und Etoposid (VP-16).
 Prozent der 7-AAD-positiven KG-1a-Zellen nach Inkubation mit Tecelac (1 µg/mL Abb. 4.6a; 10 µg/mL Abb. 4.6b; 100 µg/mL Abb. 4.6c; 1000 µg/mL Abb. 4.6d) in Kombination mit VP-16 (2 µM, 10 µM, 50 µM).

4.5.2 Koinkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und dem Wachstumsfaktor G-CSF

Da G-CSF bei hämatologischen Erkrankungen wie aplastischer Anämie oder myelodysplastischen Syndromen oftmals mit der immunsuppressiven Therapie kombiniert wird und darüber hinaus als Wachstumsfaktor mit antiapoptotischer Wirkung bekannt ist, sollten durch eine Koinkubation mit G-CSF und ATG eventuell vorhandene antagonistische Effekte des Wachstumsfaktors auf die ATG-vermittelte Apoptose untersucht werden.

Die Zelllinie KG-1a wurde bis zu 7 Tage mit Lymphoglobulin in Konzentrationen von 1 µg/mL-1000 µg/mL und G-CSF (5 ng/mL und 500 ng/mL) koinkubiert und durch eine Annexin/7-AAD-Färbung der Anteil apoptotischer Zellen an den Tagen 0, 2 und 7 bestimmt (siehe Abb. 4.7a-d).

Die mit ATG in den Konzentrationen von 100 µg/mL, 1000 µg/mL und Etoposid inkubierten Ansätze zeigten nach 7 Tagen 51,7%, 98,4% und 99,0% apoptotische Zellen. In den Ansätzen mit 1 µg/mL und 10 µg/mL ATG sowie in der Kontrolle blieb die Rate der 7-AAD-positiven Zellen an allen Tagen unter 9,0%. Auch bei den nur mit dem Wachstumsfaktor inkubierten Zellen blieb die Rate der 7-AAD-positiven Zellen stets unter 7,3%. In den Koinkubationsansätzen mit ATG und G-CSF konnte keine Verminderung der ATG-induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Auch die Etoposid induzierte Apoptose konnte durch Koinkubation mit dem Wachstumsfaktor nicht vermindert werden.

In vitro konnten somit keine antagonistischen Effekte des G-CSF auf die ATG-vermittelte Apoptose nachgewiesen werden.

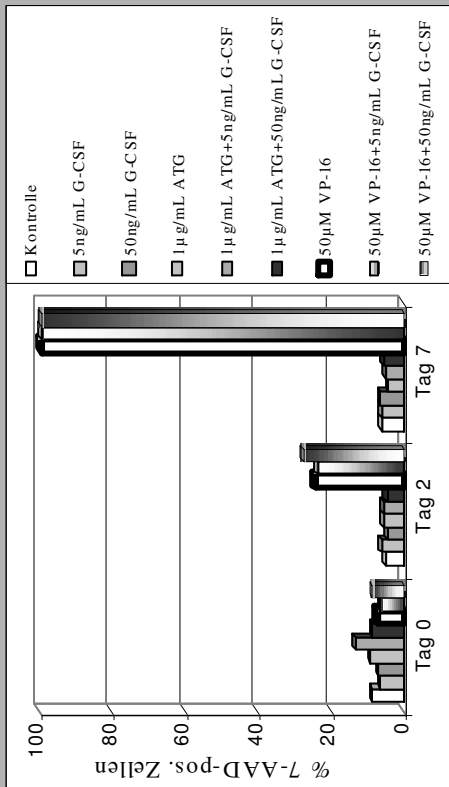


Abb. 4.7a

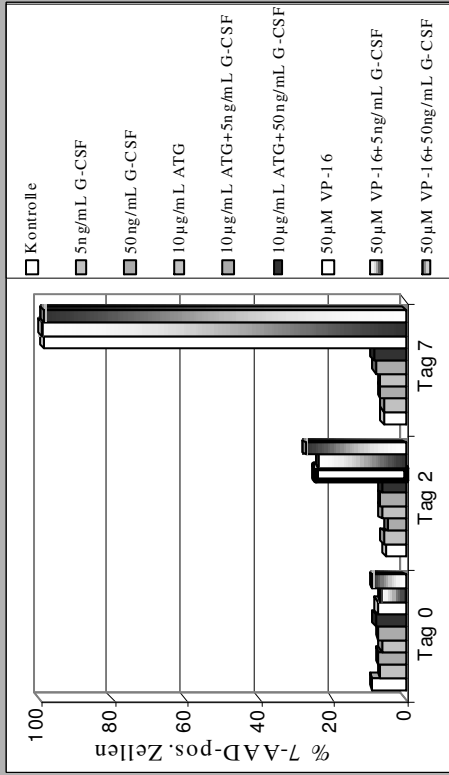


Abb. 4.7b

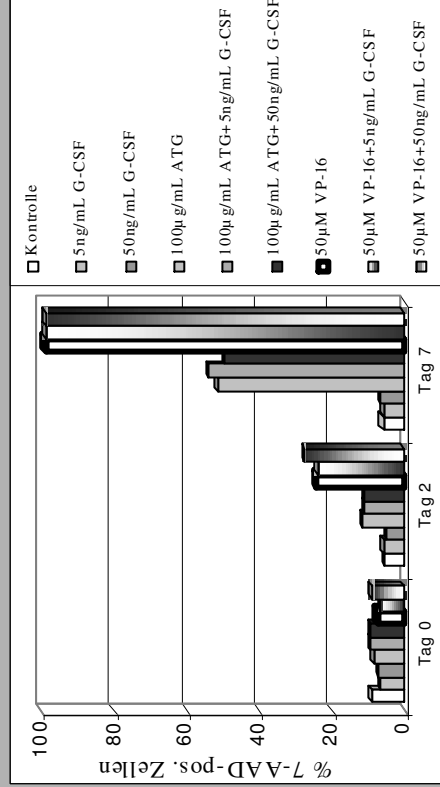


Abb. 4.7c

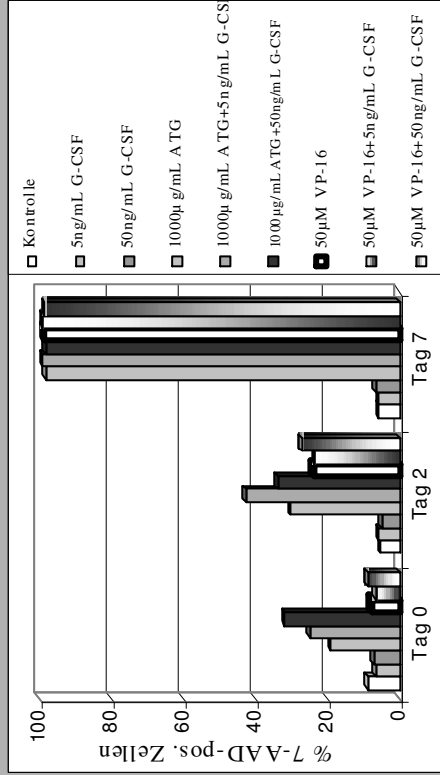


Abb. 4.7d

Abb. 4.7a-d: Koinkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und G-CSF.

Anteil der 7-AAD-positiven KG-1a-Zellen an den Tagen 0, 2, 7 nach Inkubation mit Lymphoglobulin (1 µg/mL Abb. 4.7a; 10 µg/mL Abb. 4.7b; 100 µg/mL Abb. 4.7c; 1000 µg/mL Abb. 4.7d), G-CSF (5 ng/mL, 50 ng/mL) und VP-16 (50 µM) solitär oder in Kombination.

4.5.3 Inkubation von KG-1a-Zellen mit ATG und Cyclosporin A

Im Rahmen der Koinkubationsexperimente sollte auch ein möglicher Effekt des Cyclosporin A (CsA) auf die ATG-induzierte Apoptose untersucht werden. Cyclosporin A hemmt die Produktion und Freisetzung von Interleukin-2 und wird ebenfalls wie ATG zur immunsuppressiven Therapie eingesetzt. Außerdem ist bekannt, dass CsA mit dem Glykoprotein-P interagiert und dessen Funktion beeinträchtigt. Das Glykoprotein-P ist ein transmembranöses Protein, welches amphipathische Stoffe unter ATP-Verbrauch aus den Zellen ausschleust und somit für die *multiple drug resistance* einiger Zellen verantwortlich ist.

Die Zelllinie KG-1a wurde über 7 Tage mit Lymphoglobulin oder Tecelac in Konzentrationen von 10 µg/mL und 100 µg/mL, Verapamil (20 µM), Cyclosporin A (250 µg/L und 5000 µg/L) oder 1 µM Arsentrioxid inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde an den Tagen 0, 4 und 7 mittels 7-AAD-Färbung bestimmt (siehe Abb. 4.8).

Nicht dargestellt sind die Messergebnisse an Tag 0. Hier lag die Rate apoptotischer Zellen bei allen Messwerten unter 7,4%.

Aufgrund der Ergebnisse der bisherigen Versuche, die eine konstante ATG-Wirkung für 100 µg/mL jedoch nicht für 10 µg/mL ergaben, wurde dieser Versuch mit diesen beiden Konzentrationen durchgeführt, um einen eventuell vorhandenen Apoptose verstärkenden bzw. auslösenden Effekt durch die Koinkubation beobachten zu können.

Der Anteil apoptotischer Zellen an Tag 4 lag für die Kontrolle bei 3,4%, für Verapamil bei 5,3% bzw. 6,5%, für 250 µg/mL CsA bei 4,6% bzw. 3,6% und für 5000 µg/mL CsA bei 9,8% bzw. 5,5%. Eine Erhöhung des Anteils 7-AAD-positiver Zellen im Vergleich zu der Kontrolle konnte jedoch bei den mit 100 µg/mL Tecelac (11,2%) und Arsentrioxid (18,9%) inkubierten Zellen beobachtet werden. Bei Lymphoglobulin war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt (Kontrolle 3,4%, 100 µg/mL 6,7%, Arsentrioxid 13,3%). Eine Steigerung der Rate apoptotischer Zellen konnte in den Koinkubationsansätzen mit Arsentrioxid und Cyclosporin A 5000 µg/L (30,0%, 40,0%) und bei Arsentrioxid und Verapamil (18,3%, 26,7%) gezeigt werden. Ein geringer Effekt konnte auch bei 100 µg/mL Tecelac und Cyclosporin A 5000 µg/L erkannt werden (Steigerung von 11,2% auf 19,0%).

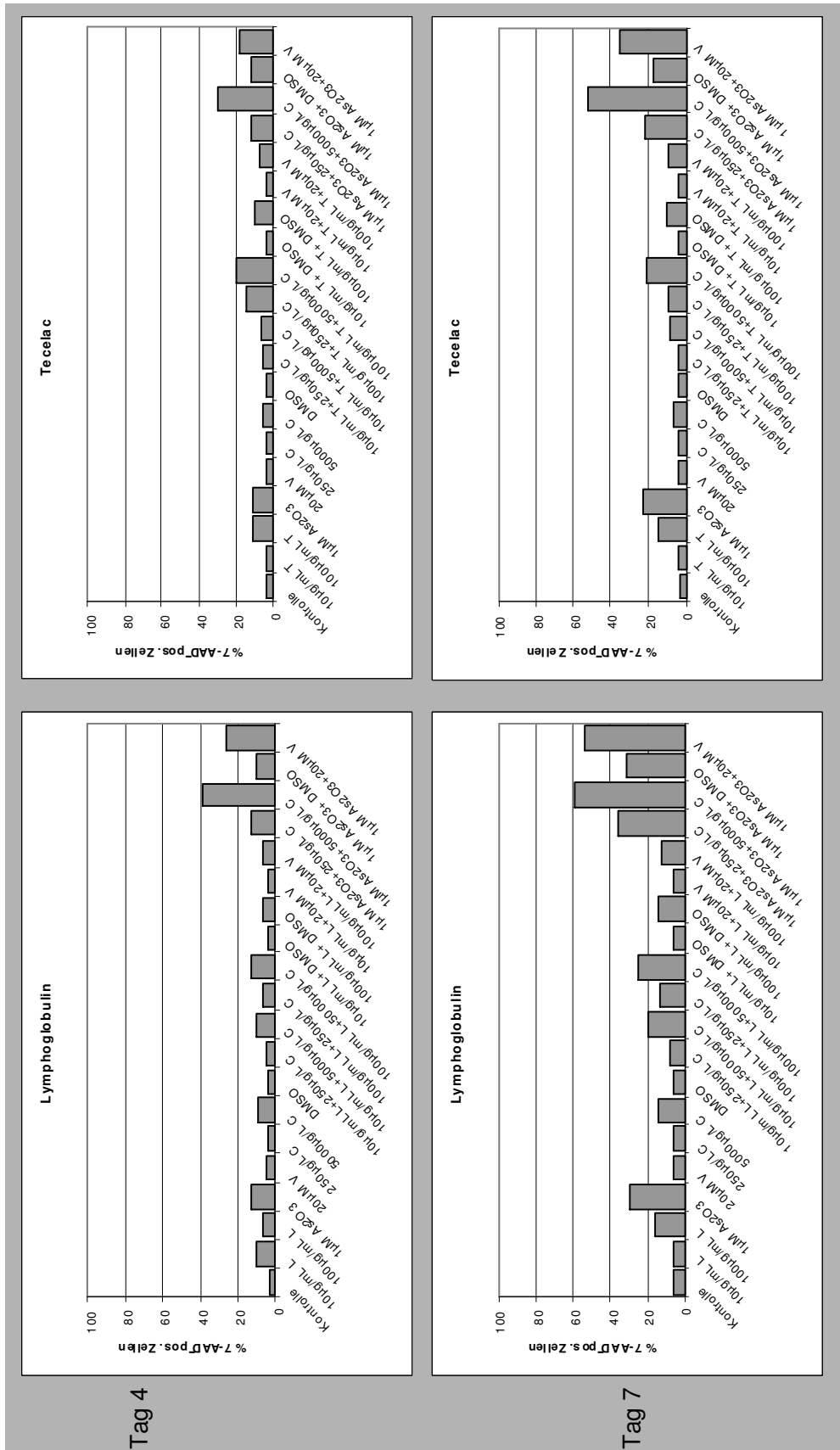


Abb. 4.8: Apoptoseinduktion in KG-1a-Zellen durch Koinkubation mit ATG und Cyclosporin A.
 Dargestellt ist der Anteil 7-AAD-positiver Zellen an den Tagen 4 und 7 nach Inkubation der Zelllinie KG-1a mit Lymphoglobulin und Tece lac (10 µg/mL und 100 µg/mL) in Kombination mit 20 µM Cyclosporin A (250 µg/L und 500 µg/L) und A (1000 µg/L).

An Tag 7 zeigte sich für die Kontrolle ein Anteil von 4,0%, für Verapamil von 3,5% bzw. 3,6%, für 250 µg/mL CsA von 6,4% bzw. 3,8% und für 5000 µg/mL CsA von 14,4% bzw. 6,4% apoptotischer Zellen. Für die Ansätze mit 100 µg/mL Tecelac zeigte sich ein Prozentsatz von 15,3%, für Lymphoglobulin von 16,5% und für Arsentrioxid von 24,0% bzw. 29,0% 7-AAD-positiven Zellen. Die Anzahl apoptotischer Zellen konnte für Arsentrioxid in den Koinkubationsansätzen mit Cyclosporin A (5000 µg/L) und Verapamil (20 µM) auf 52,0%, 58,0% bzw. 35,0%, 53,0% gesteigert werden. Lediglich in den Ansätzen mit 100 µg/mL Tecelac und 5000 mg/L Cyclosporin A zeigte sich eine leicht erhöhte Rate 7-AAD-positiver Zellen. Diese lag bei 21,0% im Vergleich zu den Ansätzen nur mit 100 µg/mL Tecelac mit 15,0% apoptotischer Zellen. Bei Lymphoglobulin stieg der Anteil 7-AAD-positiver Zellen von 16,5% auf 24,8% bei Koinkubation mit 100 µg/mL Lymphoglobulin und 5000 µg/L Cyclosporin A. In den Koinkubationsansätzen mit Verapamil und Tecelac bzw. Lymphoglobulin konnte keine Zunahme der Apoptoserate erreicht werden. Für die Ansätze mit 10 µg/mL ATG konnte zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung der 7-AAD-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle gesehen werden. Es zeigte sich, dass es durch die Koinkubation der Zellen mit ATG und Verapamil bzw. Cyclosporin A zu keiner deutlich erhöhten Apoptose kam. Die durch Arsentrioxid induzierte Apoptose konnte jedoch durch die Koinkubation vor allem mit Cyclosporin A deutlich erhöht werden.

4.5.4 Apoptoseinduktion bei der Zelllinie Jurkat durch Koinkubation mit ATG und dem induzierenden monoklonalen CD95-Antikörper 7C11

Nach den vorangegangenen Koinkubationsversuchen sollte nun untersucht werden, ob durch eine zusätzliche Stimulation des CD95-Rezeptors eine Verstärkung der allein durch ATG erzielten Apoptose erreicht werden kann.

Zunächst wurde in Vorversuchen sowohl die zur Apoptoseinduktion benötigte Konzentration des induzierenden Antikörpers 7C11 als auch des blockierenden Antikörpers SM 1/23 bestimmt (Daten nicht dargestellt).

Jurkat-Zellen wurden mit ATG Tecelac und Lymphoglobulin (1 µg/mL-1000 µg/mL) und dem Apoptose-induzierenden CD95-Antikörper 7C11 (5 ng/mL) koinkubiert. Nach 0 und 24 Stunden wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels 7-AAD-Färbung bestimmt (siehe Abb. 4.9).

Durch die Inkubation mit Lymphoglobulin in den Konzentrationen 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL konnten nach 24-stündiger Inkubation Raten von 40,5%, 50,9%, 64,8% und 82,8% 7-AAD-positiven Zellen erreicht werden. Bei Tecelac lagen die Raten für die jeweiligen Konzentrationen bei 28,8%, 27,4%, 42,0% und bei 48,8%. Der Anteil der durch den induzierenden CD95-Antikörper 7C11 7-AAD-positiven Zellen lag nach 24 Stunden bei 68,2%. Die Spezifität der durch 7C11 induzierten Apoptose wurde durch spezifische Inhibition mit dem hemmenden CD95-Antikörper SM 1/23 nachgewiesen. Die 68,2% 7-AAD-positiven Zellen durch 7C11 konnten durch den hemmenden Antikörper SM 1/23 auf 22,0% reduziert werden. Durch die Koinkubation mit dem induzierenden CD95-Antikörper 7C11 konnte die Anzahl 7-AAD-positiver Zellen bei Lymphoglobulin auf 92,0% bei 100 µg/mL und auf 93,6% bei 1000 µg/mL gesteigert werden. Für die Ansätze mit 1 µg/mL und 10 µg/mL Lymphoglobulin sowie für alle Koinkubationsansätze mit Tecelac konnte keine eindeutige Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu der mit 7C11 induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Somit konnte weder ein synergistischer Effekt noch ein eindeutig additiver Effekt der Koinkubation von ATG und 7C11 auf die Apoptose gezeigt werden.

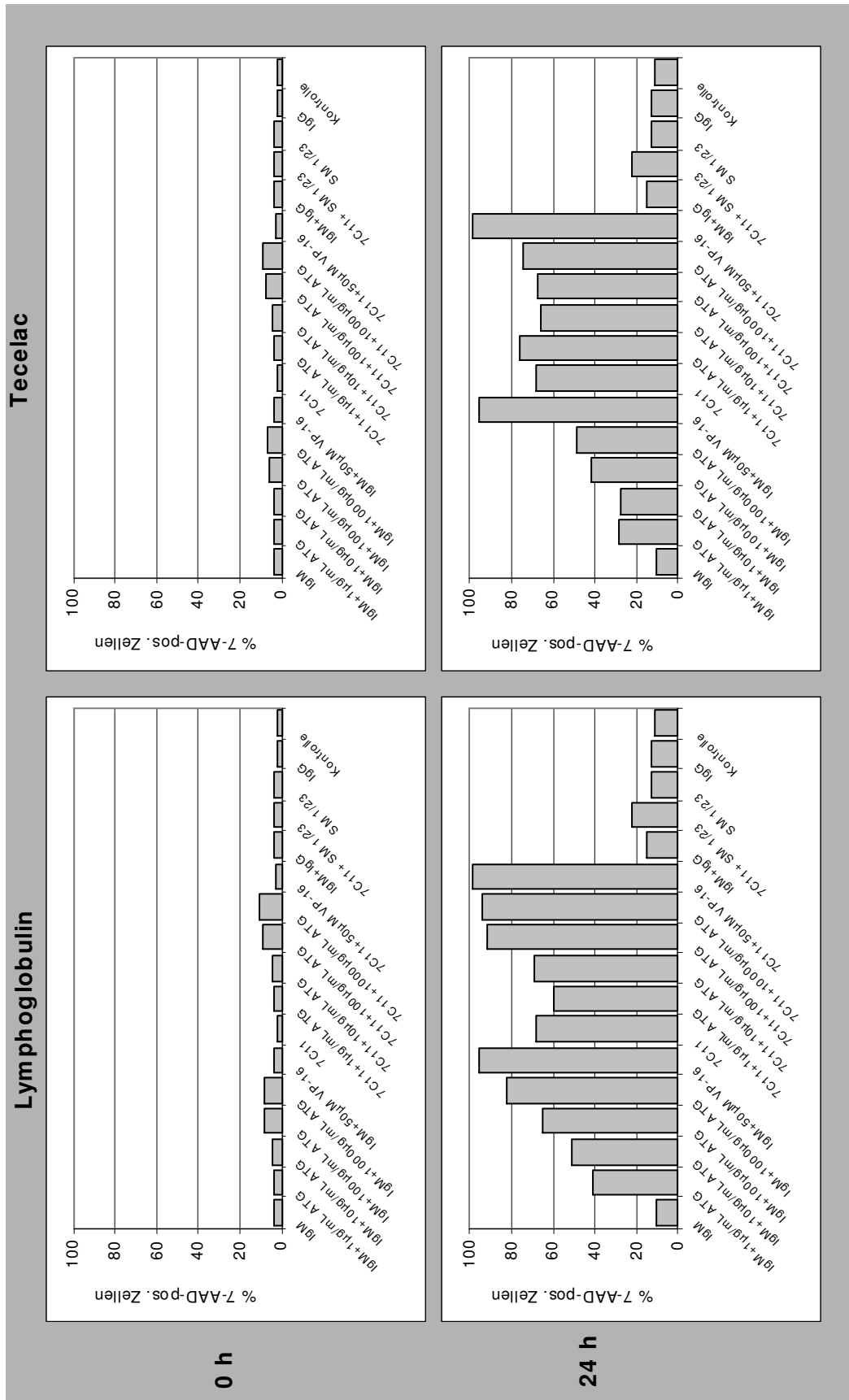


Abb. 4.9: Koinkubation von Zellen der Zelllinie Jurkat mit ATG und dem induzierenden CD95-Antikörper 7C11. Anteil der 7-AAD-positiven Jurkat-Zellen zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h nach Inkubation mit Lymphoglobulin oder Tecelac in Konzentrationen von 1 µg/mL-1000 µg/mL und dem induzierenden CD95-Antikörper 7C11 (5 ng/mL).

4.5.5 *Koinkubation von Jurkat-Zellen mit ATG und dem Apoptose inhibierenden monoklonalen CD95-Antikörper SM 1/23*

Durch eine Koinkubation von Jurkat-Zellen mit ATG und dem inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23 wurde schließlich noch untersucht, ob ATG CD95-Antikörper enthält, welche die ATG-induzierte Apoptose über CD95 vermitteln und diese somit durch den hinzugefügten CD95-Antikörper SM 1/23 inhibiert werden kann.

Um diese Fragen zu klären, wurden Jurkat-Zellen mit ATG Tecelac und Lymphoglobulin (100 µg/mL und 1000 µg/mL) und dem inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23 (500 ng/mL) inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden und 48 Stunden wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels 7-AAD-Färbung bestimmt (siehe Abb. 4.10).

Zu Beginn der Messung (0 Stunden) lag der Anteil 7-AAD-positiver Zellen für alle Messwerte unter 9,0%. Nach 48-stündiger Inkubation blieb der Prozentsatz apoptotischer Zellen der jeweiligen Isotypenkontrollen und des CD95-Antikörper SM 1/23 stets geringer als 20,0% (IgM (für 7C11) 7,3%, IgG (für SM 1/23) 8,0%, SM 1/23 16,0%, IgM+ IgG 17,9%). Mit dem induzierenden Antikörper 7C11 wurde jedoch eine Rate von 80,0% 7-AAD-positiver Zellen erzielt, die auf 16,0% 7-AAD-positiver Zellen durch den inhibierenden Antikörper SM 1/23 reduziert werden konnten. Die durch ATG induzierte Rate apoptotischer Zellen lag für 100 µg/mL Lymphoglobulin nach 48 Stunden bei 77,0% der Zellen und konnte durch den SM 1/23 Antikörper auf 66,0% gesenkt werden. Für 1000 µg/mL Lymphoglobulin lag der Anteil 7-AAD-positiver Zellen nach 48 Stunden bei 81,9%. Hier konnte keine Verringerung der Apoptoserate durch Zugabe des inhibierenden Antikörpers erreicht werden. Mit Tecelac (100 µg/mL und 1000 µg/mL) bzw. Etoposid (50 µM) waren nach 48 Stunden 46,2%, 67,8% und 84,3% der Zellen 7-AAD-positiv. Dieser Prozentsatz konnte durch Zugabe des inhibierenden CD95-Antikörpers bei 100 µg/mL Tecelac auf 34,0% und bei 1000 µg/mL auf 64,3% gesenkt werden. Der Anteil der apoptotischen Zellen durch Etoposid konnte durch die Koinkubation mit dem inhibierenden CD95-Antikörper nicht gesenkt werden, sondern stieg noch auf 96,9%.

Somit konnte eine Reduktion der durch ATG-induzierten Apoptose durch Zugabe des inhibierenden CD95-Antikörpers SM 1/23 in geringem Maße nur bei 100 µg/mL ATG (Lymphoglobulin und Tecelac) erzielt werden. Bei 1000 µg/mL wurde keine Reduktion festgestellt.

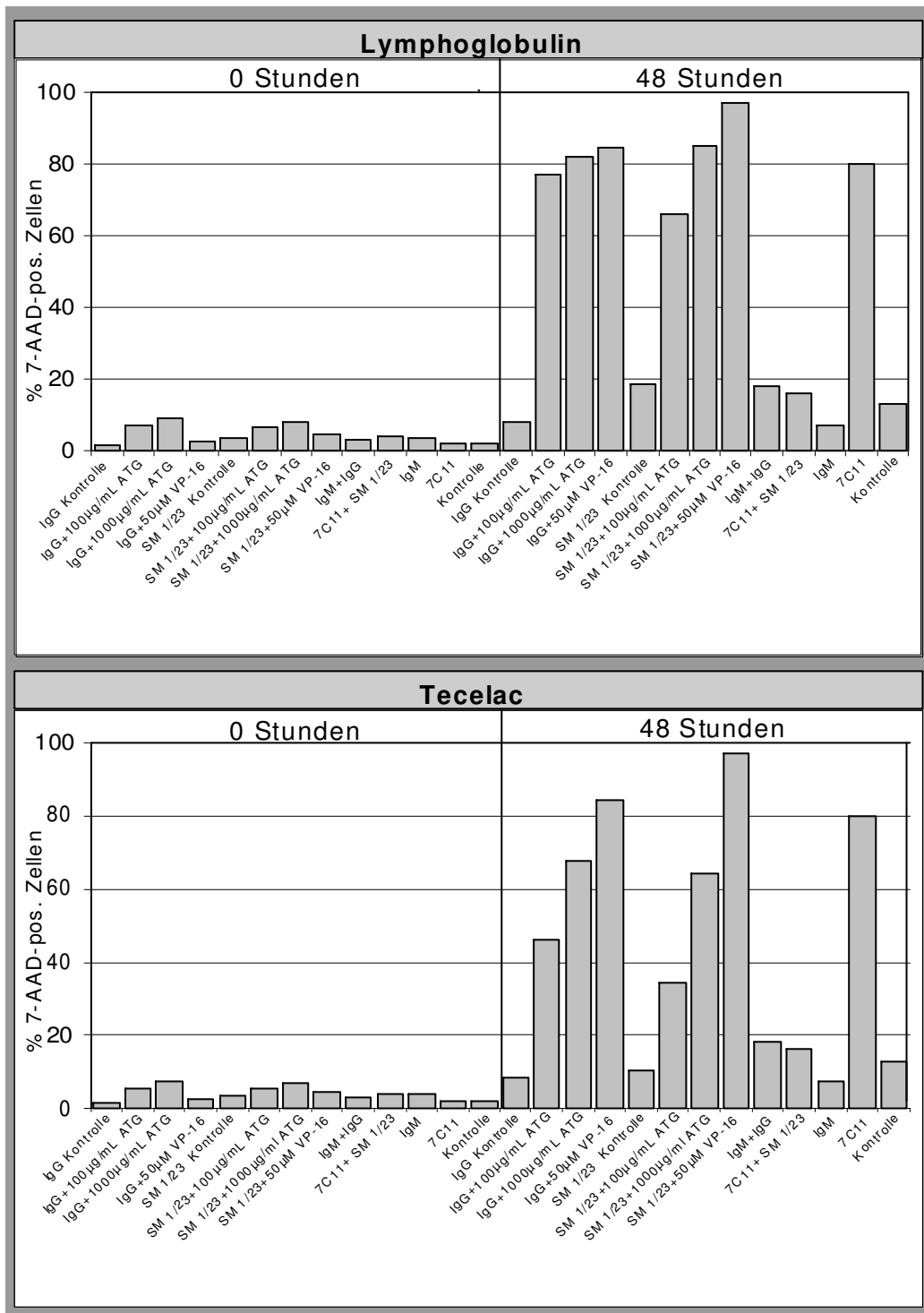


Abb. 4.10: Koinkubation von Zellen der Zelllinie Jurkat mit ATG und dem inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23.

Anteil der 7-AAD-positiven Zellen zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h nach Inkubation mit Lymphoglobulin oder Tecelac (100 µg/mL und 1000 µg/mL) und dem inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23 (500 ng/mL).

4.6 Kompetitive Bindungsstudien

Um weitere Einblicke in den Wirkungsmechanismus des ATG zu erlangen, wurden, obwohl die ATG-induzierte Apoptose nicht eindeutig durch den inhibierenden, an den Fas-Rezeptor bindenden Antikörper SM 1/23 erniedrigt werden konnte, noch weitere Experimente zu einer eventuell über das Fas-Rezeptor/Fas-Ligandensystem vermittelten ATG-induzierten Apoptose durchgeführt.

Hierbei wurde mit Hilfe von kompetitiven Bindungsstudien geprüft, ob ATG Komponenten enthält, die an den Fas-(CD95)Rezeptor binden und dadurch möglicherweise die ATG-induzierte Apoptose getriggert wird.

Dargestellt sind die nach korrekter Geräteeinstellung erhaltenen Werte im Histogramm. Die Kurven der unterschiedlichen ATG-Konzentrationen des jeweiligen Ansatzes wurden in den Abbildungen übereinander projiziert.

4.6.1 Färbung des CD95-Rezeptors mit dem FITC-markierten CD95-Antikörper DX2

Mit den Zellen der Zelllinie KG-1a wurde nach ATG-Zugabe (Tecelac, Lymphoglobulin, Thymoglobulin und ATG-Fresenius S) in Konzentrationen von 0,1 µg/mL-1000 µg/mL eine spezifische Färbung mit dem monoklonalen FITC-konjugierten, Apoptose-induzierenden CD95-Antikörper DX2 durchgeführt (siehe Abb. 4.11).

In der jeweils linken Abbildung ist die Färbung mit der Isotypenkontrolle dargestellt, in der jeweils rechten die Färbung mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper.

Bei den ATG-Präparationen Thymoglobulin, ATG-Fresenius S und Tecelac zeigte sich für 100 µg/mL und 1000 µg/mL jeweils eine geringe Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Kontrolle. Für 10 µg/mL lag bei Thymoglobulin und Tecelac ebenfalls eine geringfügige Verschiebung des Fluoreszenzgifels vor. Bei den mit Lymphoglobulin inkubierten Zellen zeigte sich die größte Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 0,1 µg/mL ATG. Die Änderungen in der Fluoreszenzintensität für die übrigen Konzentrationen waren im Vergleich zur Kontrolle minimal.

Es zeigte sich, dass keine der ATG-Präparationen zu einer wesentlichen Inhibition der Bindung von DX2 führte, so dass zumindest Antikörper gegen die Epitope, an die DX2 bindet, nicht in relevanter Konzentration in den untersuchten Präparationen vorhanden waren.

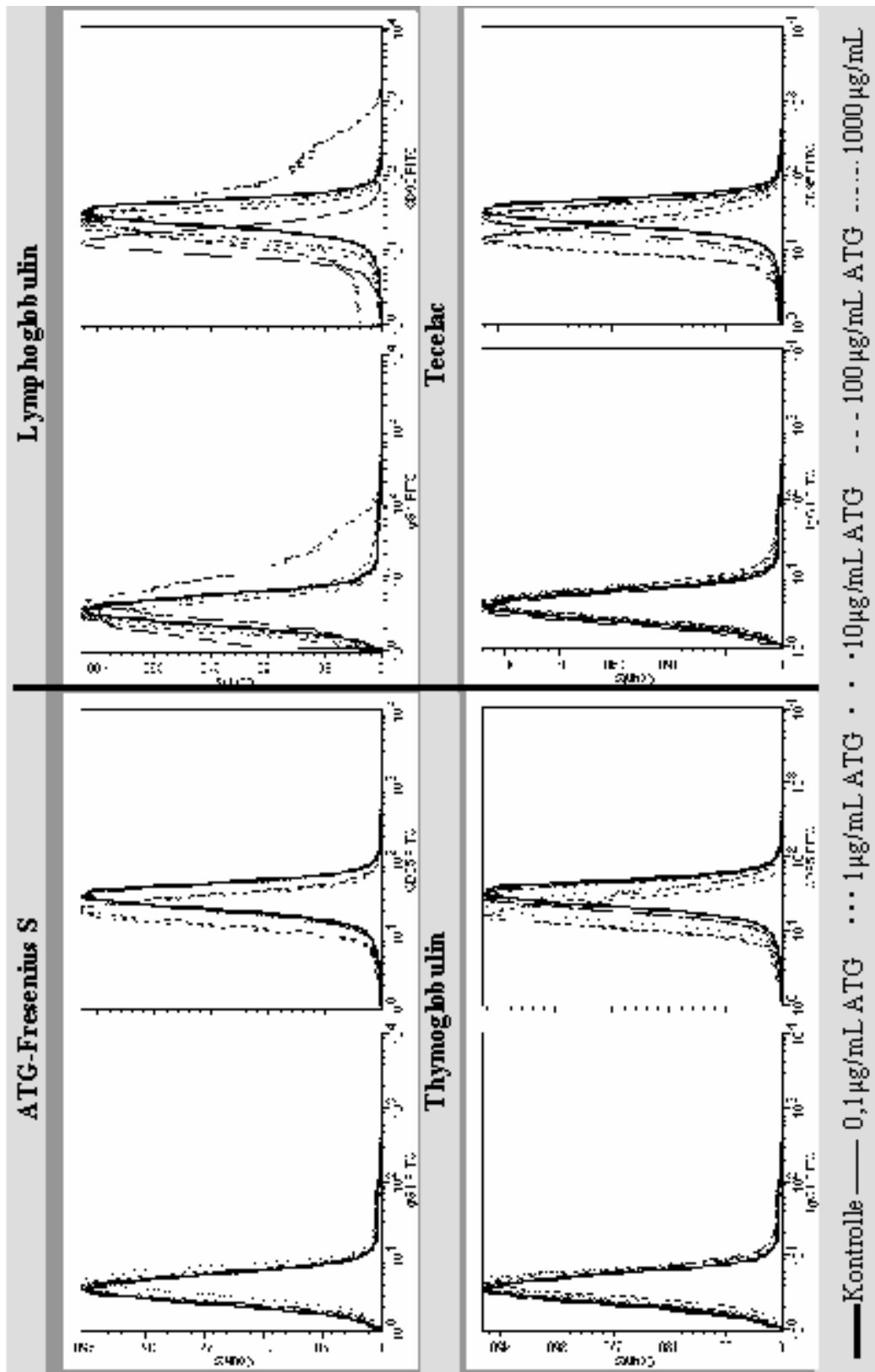


Abb. 4.11: Kompetitive Bindung von ATG und DX2 an den CD95-Rezeptor.
 Nach einer 30-minütigen Inkubation mit ATG in den Konzentrationen 0,1 µg/mL - 1000 µg/mL erfolgte die spezifische Färbung des CD95-Rezeptors mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper CD95 DX2 (jeweils rechts dargestellt). Die jeweils linke Abbildung zeigt die Isotypenkontrolle.

4.6.2 Indirekte Färbung des CD95-Rezeptors mit dem CD95-Antikörper SM 1/23

In einem weiteren Versuch wurde eine indirekte Färbung der mit ATG in den Konzentrationen von 0,1 µg/mL-1000 µg/mL inkubierten KG-1a-Zellen mit dem monoklonalen, Apoptose-inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23 durchgeführt (siehe Abb. 4.12).

Hierzu wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt, in dem der FITC-markierte sekundäre Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG mit ATG in den Konzentrationen 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL inkubiert wurde, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers an ATG zu verhindern (siehe Abb. 4.13).

Die jeweils linke Abbildung zeigt die Isotypenkontrolle, die jeweils rechte Abbildung die spezifische Färbung mit dem CD95-Antikörper SM 1/23 für die Ansätze mit 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL Lymphoglobulin. Für die Titration des ATG im sekundären Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG-FITC zeigte sich, dass ATG die Bindung des sekundären Antikörpers an den CD95-Antikörper SM 1/23 nicht beeinflusste.

Dieser Versuch wurde auch mit Thymoglobulin (nicht dargestellt) durchgeführt. Die Ergebnisse des Versuches entsprechen den hier gezeigten.

Abbildung 4.12 zeigt die indirekte Färbung des CD95-Rezeptors mit dem CD95-Antikörper SM 1/23. Jeweils links ist die Färbung mit der Isotypenkontrolle abgebildet und jeweils rechts die Färbung mit dem spezifischen, monoklonalen Antikörper.

Bei Tecelac zeigte sich nur für 1000 µg/mL eine leichte Fluoreszenzabnahme der spezifisch gefärbten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle. Bei ATG-Fresenius S war für alle eingesetzten ATG Konzentrationen eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu erkennen. Diese war am stärksten ausgeprägt bei 1000 µg/mL. Bei den mit Lymphoglobulin und Thymoglobulin inkubierten Zellen zeigten sich starke Abnahmen der Fluoreszenzintensitäten bei fast allen ATG Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Am stärksten war die Fluoreszenzintensitätsabnahme bei 1000 µg/mL Thymoglobulin, gefolgt von 0,1 µg/mL und 10 µg/mL. Bei 1 µg/mL und 100 µg/mL zeigte sich keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums. Bei Lymphoglobulin war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 0,1 µg/mL am stärksten ausgeprägt, gefolgt von 1 µg/mL und 1000 µg/mL.

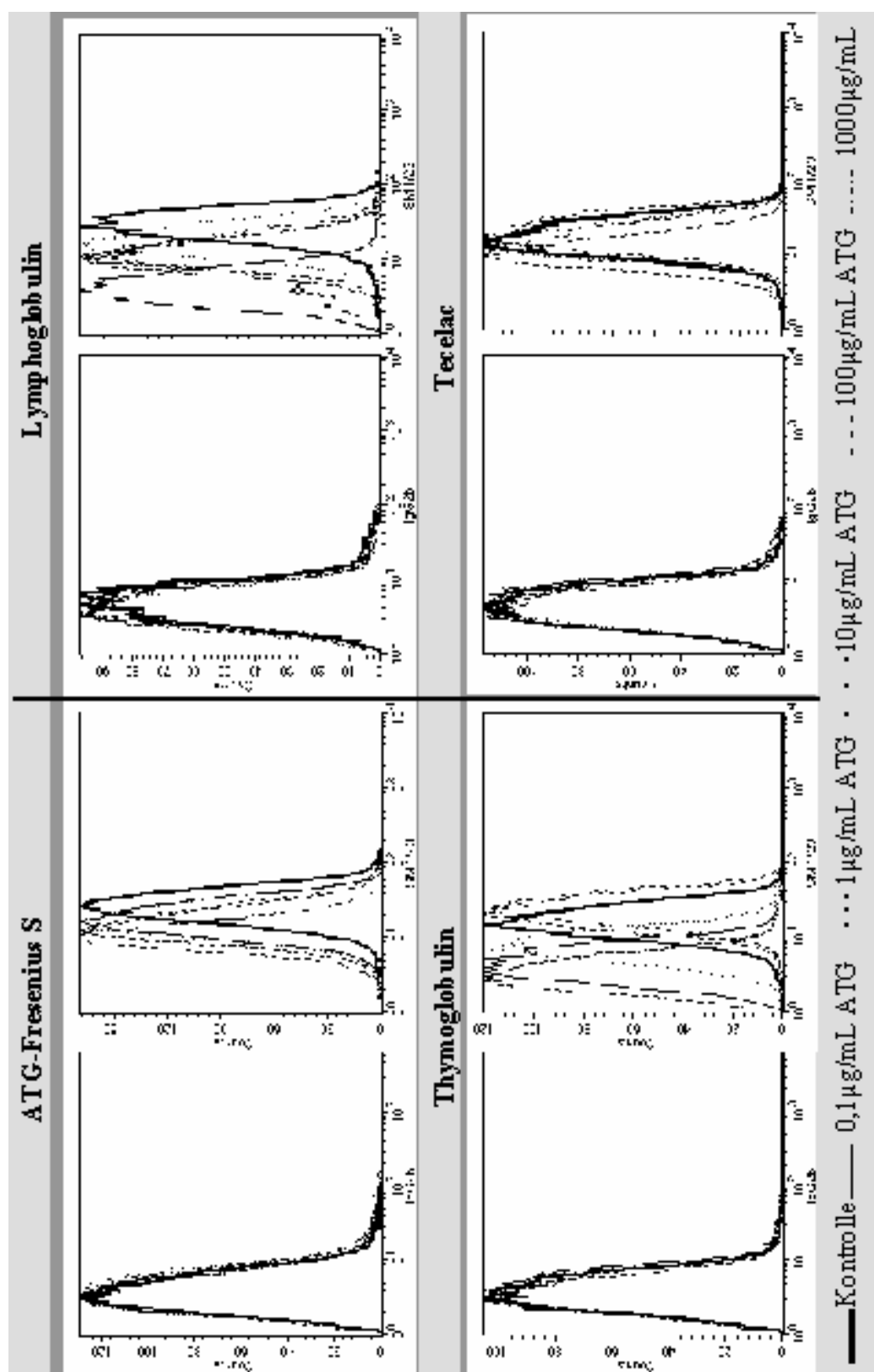


Abb. 4.12: Kompetitive Bindung von ATG und SM 1/23 an den CD95-Rezeptor.

Nach einer 30-minütigen Inkubation mit ATG in den Konzentrationen 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL erfolgte die indirekte Färbung des CD95-Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper CD95 SM 1/23 (jeweils rechts dargestellt). Die jeweils linke Abbildung zeigt die Isotypenkontrolle.

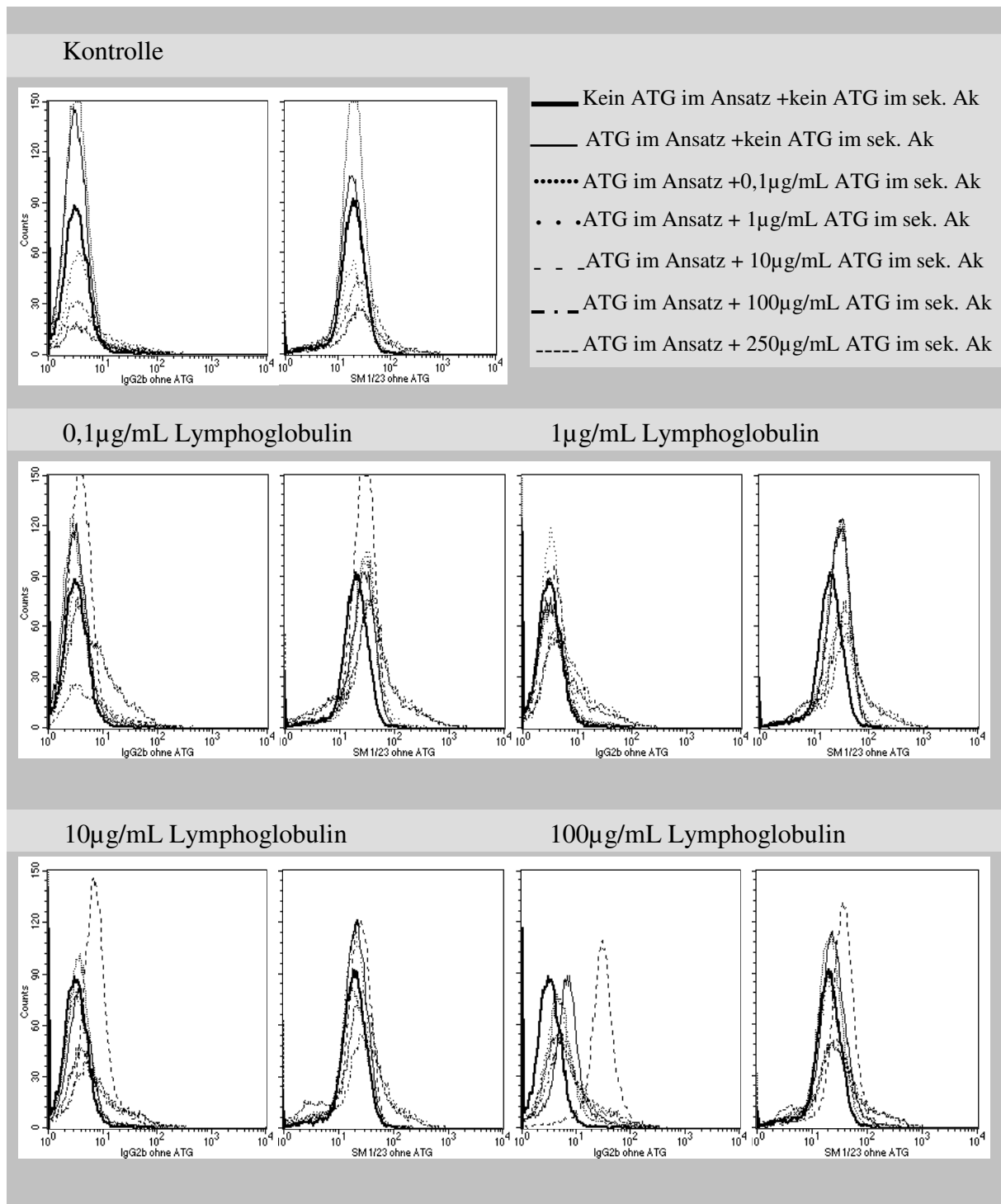


Abb. 4.13: Titration der ATG-Konzentration im sekundären Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG-FITC.

Nach 30-minütiger Inkubation der KG-1a-Zellen mit Lymphoglobulin (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) erfolgte eine indirekte Färbung mit dem CD95-Antikörper SM 1/23 (jeweils rechts dargestellt). Jeweils links dargestellt ist die Isotypenkontrolle. Anschließend erfolgte eine Färbung mit dem sekundären Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG_{2b}-FITC, welcher zuvor mit Lymphoglobulin in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inkubiert wurde.

Bei diesem Versuch zeigte sich, dass keine der ATG-Präparationen zu einer konzentrations-abhängigen Inhibition der Bindung von SM 1/23 führte, so dass die beobachtete Inhibition auf unspezifische Effekte zurückzuführen war. Somit waren auch Antikörper, die an Epitope an die SM 1/23 bindet, nicht in relevanter Konzentration vorhanden.

4.6.3 Expressionserhöhung des CD95-Rezeptors durch ATG

Als nächstes wurde untersucht, ob ATG zu einer erhöhten Expression des CD95-Rezeptors führt und auf diese Weise eventuell die Apoptose triggert.

Aufgrund der bis dato durchgeführten Experimente wurde dieser Versuch nur mit den ATG-Konzentrationen durchgeführt, die eindeutig Apoptose induzieren.

Hierfür wurden KG-1a-Zellen mit ATG (Tecelac, Lymphoglobulin, Thymoglobulin und ATG-Fresenius S) in Konzentrationen von 100 µg/mL und 1000 µg/mL inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden erfolgte eine spezifische Färbung des CD95-Rezeptors mit dem FITC-markierten monoklonalen Antikörper DX2 (siehe Abb. 14 und 15).

Es zeigte sich, dass keine der ATG-Präparationen nach 12 oder 24 Stunden zu einer messbar veränderten Expression des CD95-Rezeptors führte.

Durch diesen Versuch wurden die Ergebnisse des zuvor durchgeführten Experimentes (siehe 4.6.1) nochmals bestätigt.

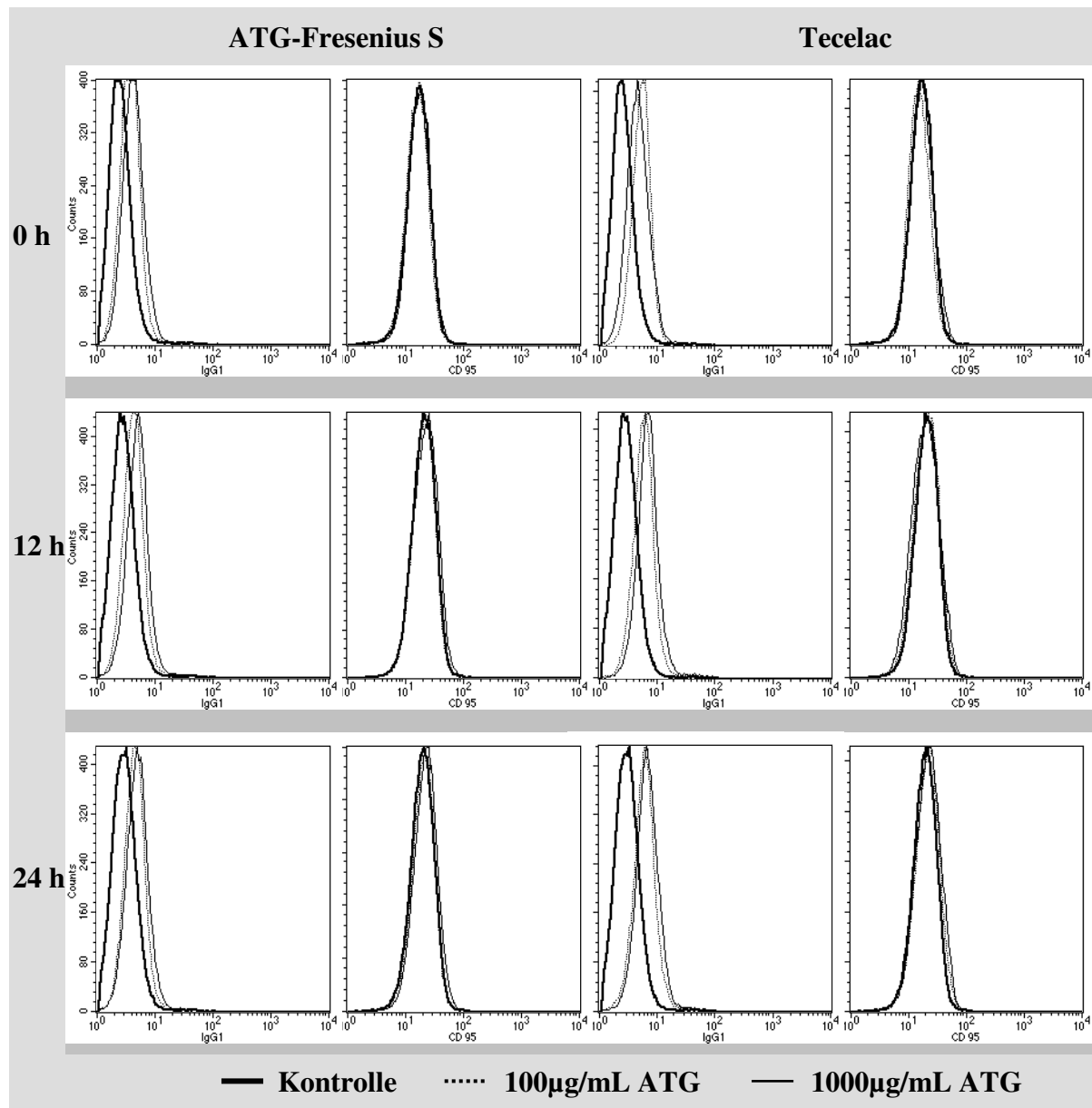


Abb. 4.14: Expression des CD95-Rezeptors (gemessen mit DX2) nach ATG-Inkubation.

KG-1a-Zellen wurden mit ATG-Fresenius S und Tecelac (100 µg/mL und 1000 µg/mL) bis zu 24 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h und 24 h erfolgte eine spezifische Färbung des CD95-Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper DX2 (jeweils rechts dargestellt). Die jeweils linke Abbildung zeigt die Isotypenkontrolle.

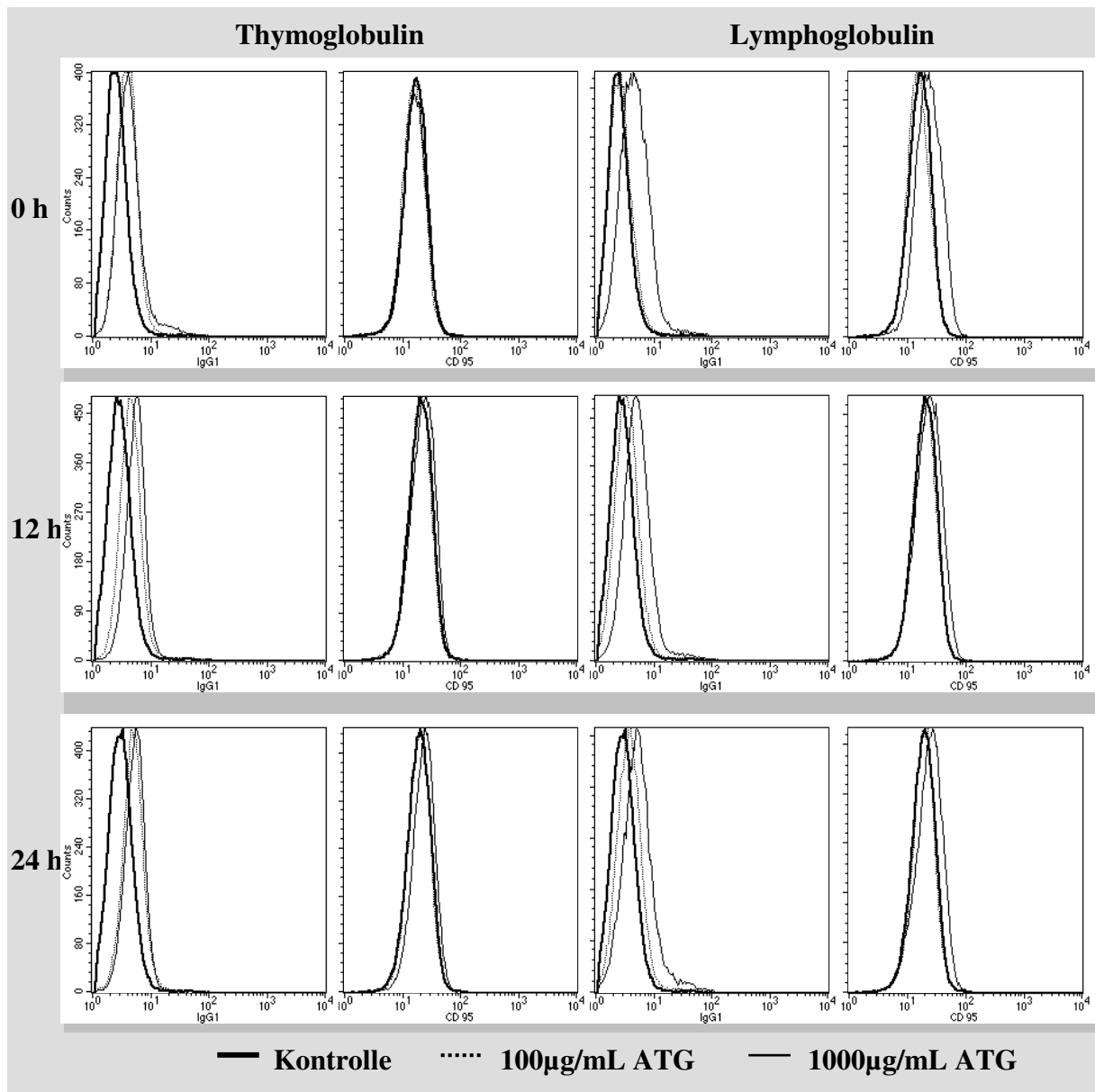


Abb.4.15: Expression des CD95-Rezeptors (gemessen mit DX2) nach ATG-Inkubation.

KG-1a-Zellen wurden mit Thymoglobulin und Lymphoglobulin (100 µg/mL und 1000 µg/mL) bis zu 24 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h und 24 h erfolgte eine spezifische Färbung des CD95-Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper DX2 (jeweils rechts dargestellt). Die jeweils linke Abbildung zeigt die Isotypenkontrolle.

4.7 Caspasen-Aktivierung

Wie die bislang durchgeführten Experimente zeigten, konnte mit ATG in malignen myeloischen und lymphatischen Zellen Apoptose ausgelöst werden. Um zu klären, ob es unter ATG zu einer Caspasen-Aktivierung kommt, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

Die exponentiell wachsende Zelllinie KG-1a wurde über 7 Tage mit ATG (Tecelac, Lymphoglobulin, Thymoglobulin und ATG-Fresenius S) in den Konzentrationen 10 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL inkubiert. Caspasen-Aktivierung wurde durch Verwendung fluoreszierender Caspasen-Inhibitoren (FITC-VAD-FMK), von Caspasen-Substraten (PhiPhiLux-G₂D₂) oder durch direkt gegen aktivierte Caspase-3 gerichtete fluoreszierende Antikörper an den Tagen 0, 2, 4 und 7 durchflusszytometrisch nachgewiesen (siehe Abb. 4.17, 4.18 und 4.19). Eine Aktivität der Caspasen im Rahmen der Apoptose wurde auch mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten, gegen das Caspasen-Substrat PARP gerichteten, polyklonalen Antikörpers an den Tagen 0, 2, 4 und 7 durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abb. 4.20).

Der Nachweis der zytoplasmatischen Proteine PARP und Caspase-3 erfolgte nach Fixierung, Permeabilisierung und Inkubation mit sog. *cleavage site specific* Antikörpern. Diese Antikörper erkennen nur Epitope, welche von gespaltenen (aktivierten) Caspasen oder von bestimmten gespaltenen Caspasen-Substraten präsentiert werden. So wurde sichergestellt, dass nur die von Caspasen gespaltenen Produkte nachgewiesen wurden.

Bei PhiPhiLux-G₂D₂ handelt es sich um ein Substrat der Caspase-3, welches nach Spaltung fluoresziert.

Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurde an allen Tagen eine Färbung mit dem entsprechenden IgG-Kontrollantikörper durchgeführt (siehe Abb. 4.16). Mit dem Kontrollantikörper wurde keine Veränderung der Fluoreszenzintensität der Zellen in den ATG-haltigen Ansätzen im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt. Dargestellt sind die nach korrekter Geräteeinstellung erhaltenen Werte im Histogramm. Die im Text genannten Prozentangaben wurden wie unter 4.1 beschrieben ermittelt.

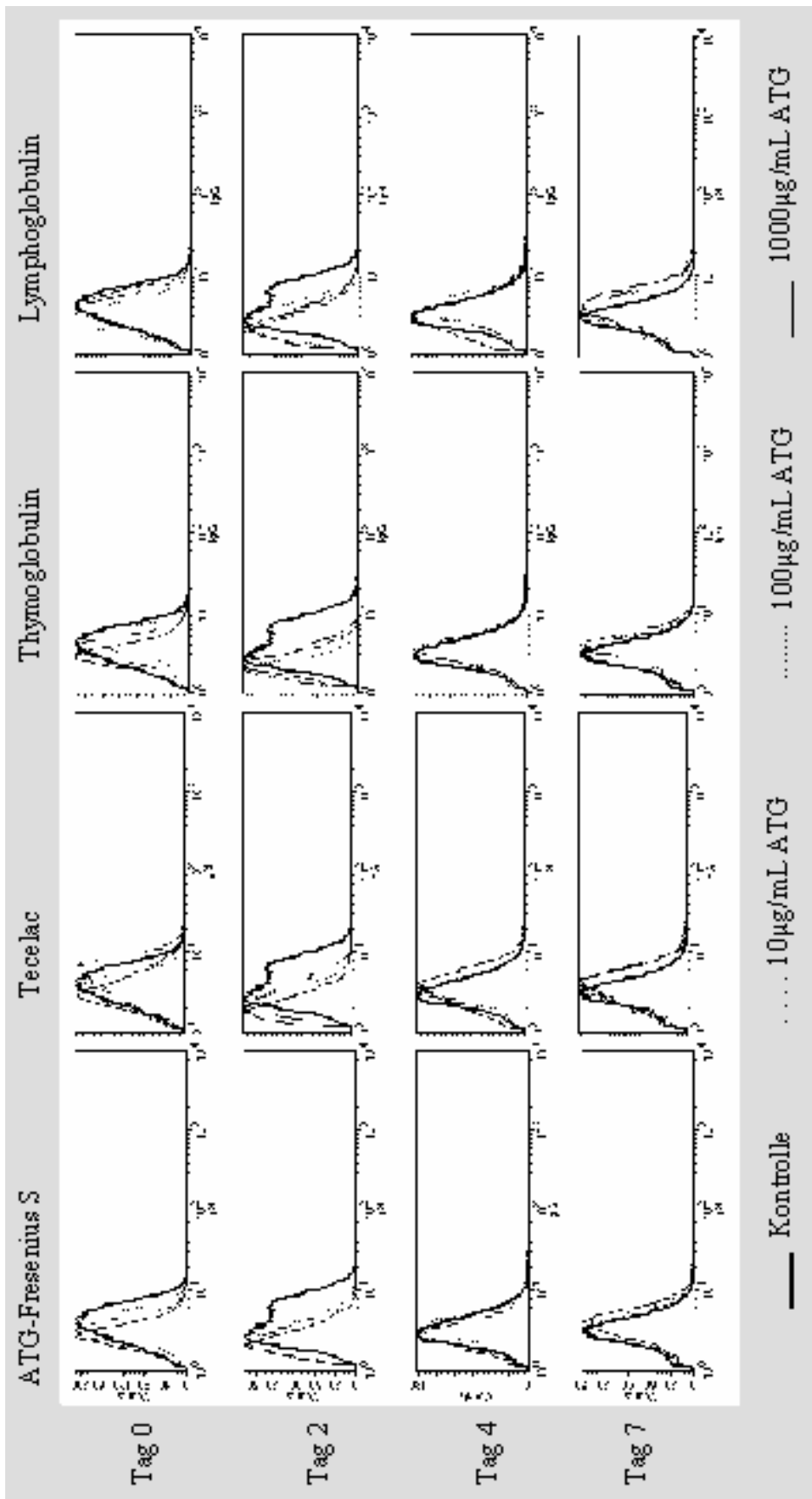


Abb. 4.16: IgG-Kontrolle in KG-1a-Zellen nach der Behandlung mit A TG.
 KG-1a-Zellen wurden über 7 Tage mit A TG (A TG-Fresenius S, Tecelac, Thymoglobulin, Lymphoglobulin) in den Konzentrationen 10 µg/ mL-1000 µg/mL incubiert. Die IgG-FITC Färbung und eine anschließende Messung erfolgten an den Tagen 0, 2, 4 und 7.

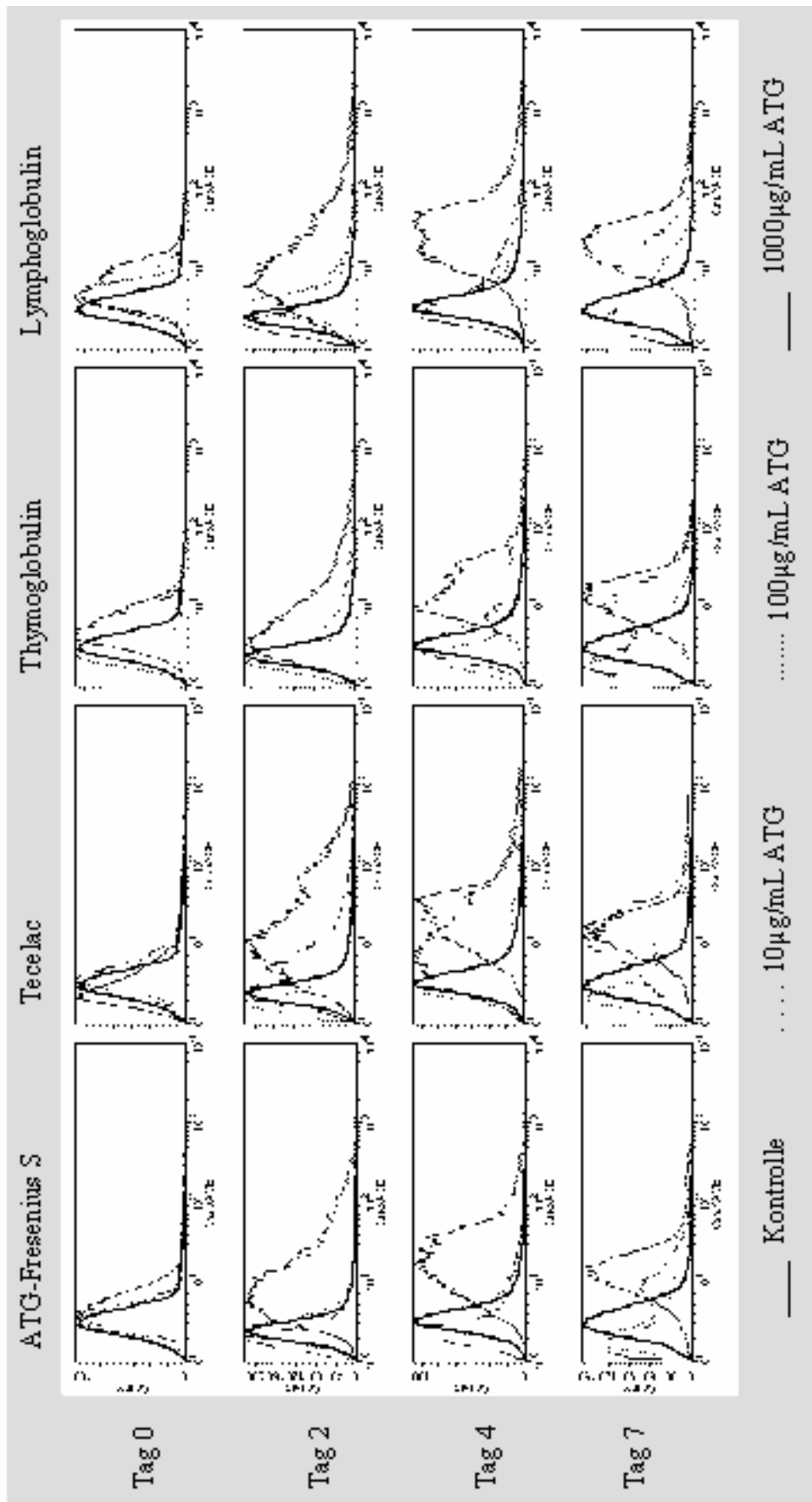


Abb. 4.17: Nachweis aktivierter Caspasen durch FITC-VAD-FMK (CaspACE) Bindung.
 KG-1a-Zellen wurden über 7 Tage mit ATG (ATG-Fresenius S, Tecelac, Thymoglobulin, Lymphoglobulin) in den Konzentrationen 10 µg/mL - 1000 µg/mL inkubiert. Die Färbung mit CaspACE (FITC-markiertes Konjugat des irreversiblen Caspaseinhibitors VAD-FMK) und eine anschließende Messung erfolgten an den Tagen 0, 2, 4 und 7.

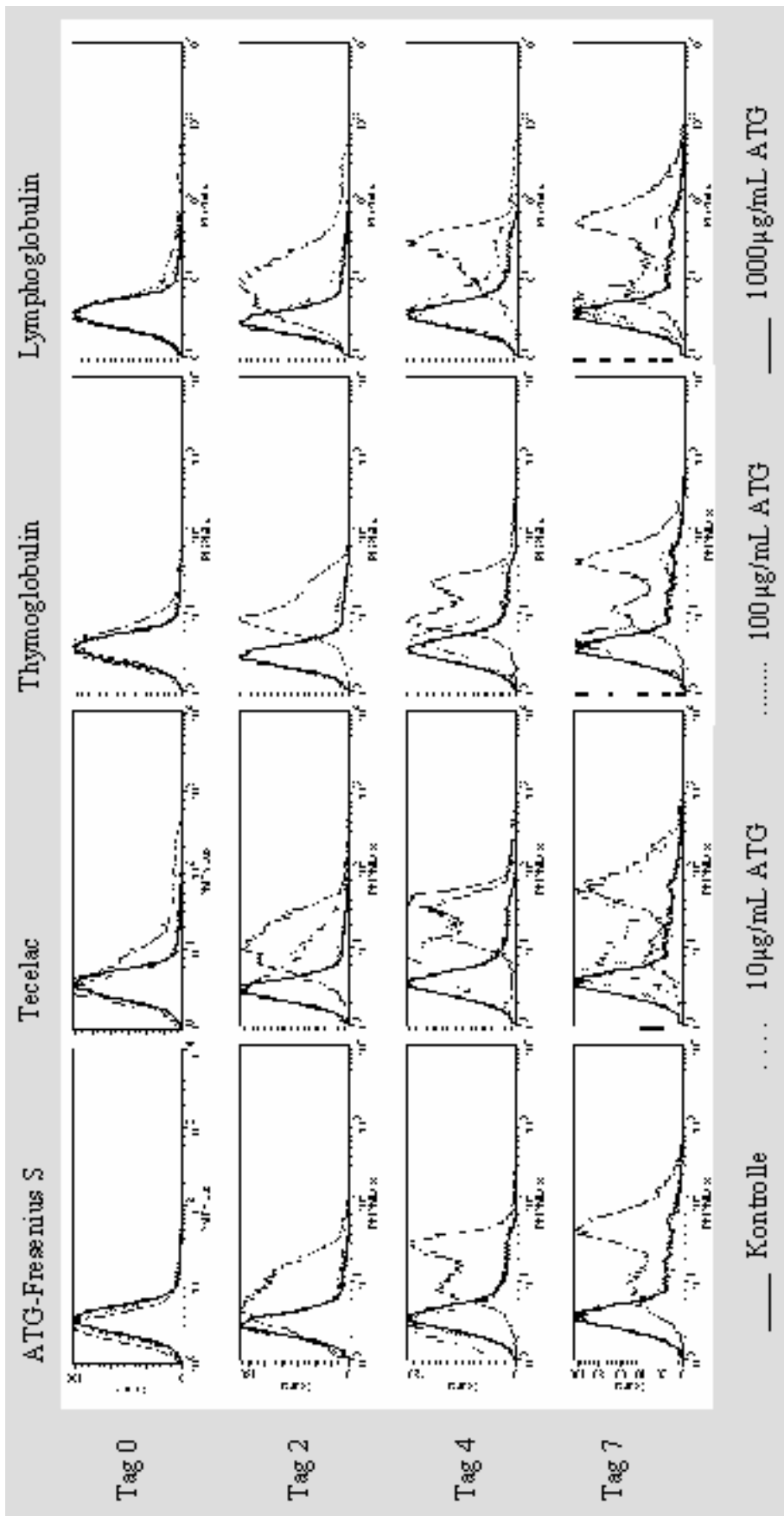


Abb. 4.18: Nachweis aktivierter Caspasen durch PhiPhiLux-G₂D₂-Spaltung.
 KG-1a-Zellen wurden über 7 Tage mit ATG (ATG-Fresenius S, Tecelac, Thymoglobulin, Lymphoglobulin) in den Konzentrationen 10 µg/mL - 1000 µg/mL inkubiert. Die Färbung mit PhiPhiLux-G₂D₂ (DEVD-GH) und eine anschließende Messung erfolgten an den Tagen 0, 2, 4 und 7.

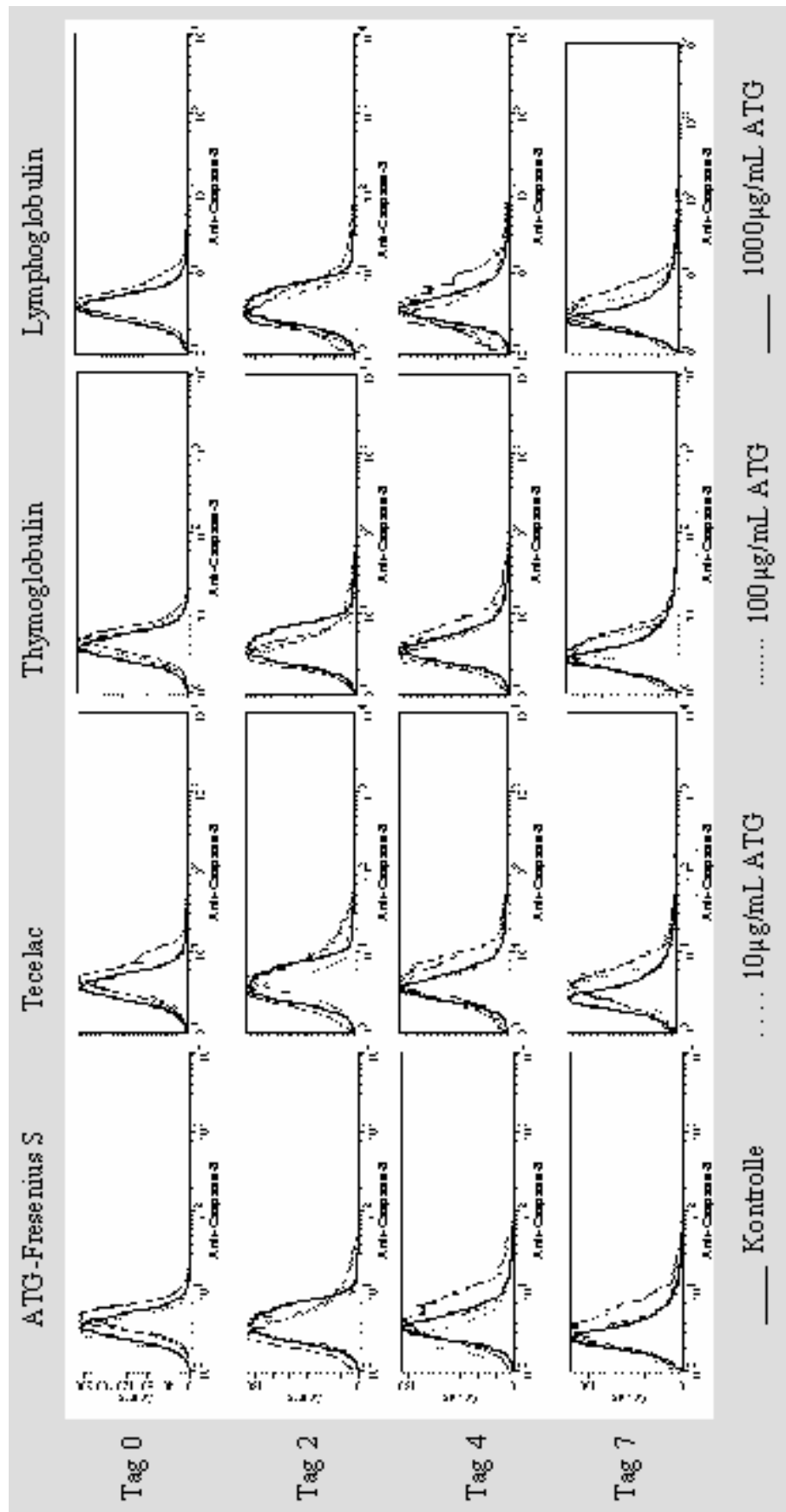


Abb. 419: Nachweis aktivierter Caspasen durch den PE-markierten polyklonalen Antikörper Kaninchen-Anti-Human-Aktivierte-Caspase-3. KG-1a-Zellen wurden über 7 Tage mit ATG (— ATG-Fresenius S, Tecevac, Thymoglobulin, Lymphoglobulin) in den Konzentrationen 10 µg/mL - 1000 µg/mL inkubiert. Die Färbung mit dem Antikörper Kaninchen-Anti-Human-Aktivierte-Caspase-3 und eine anschließende Messung erfolgten an den Tagen 0, 2, 4 und 7.

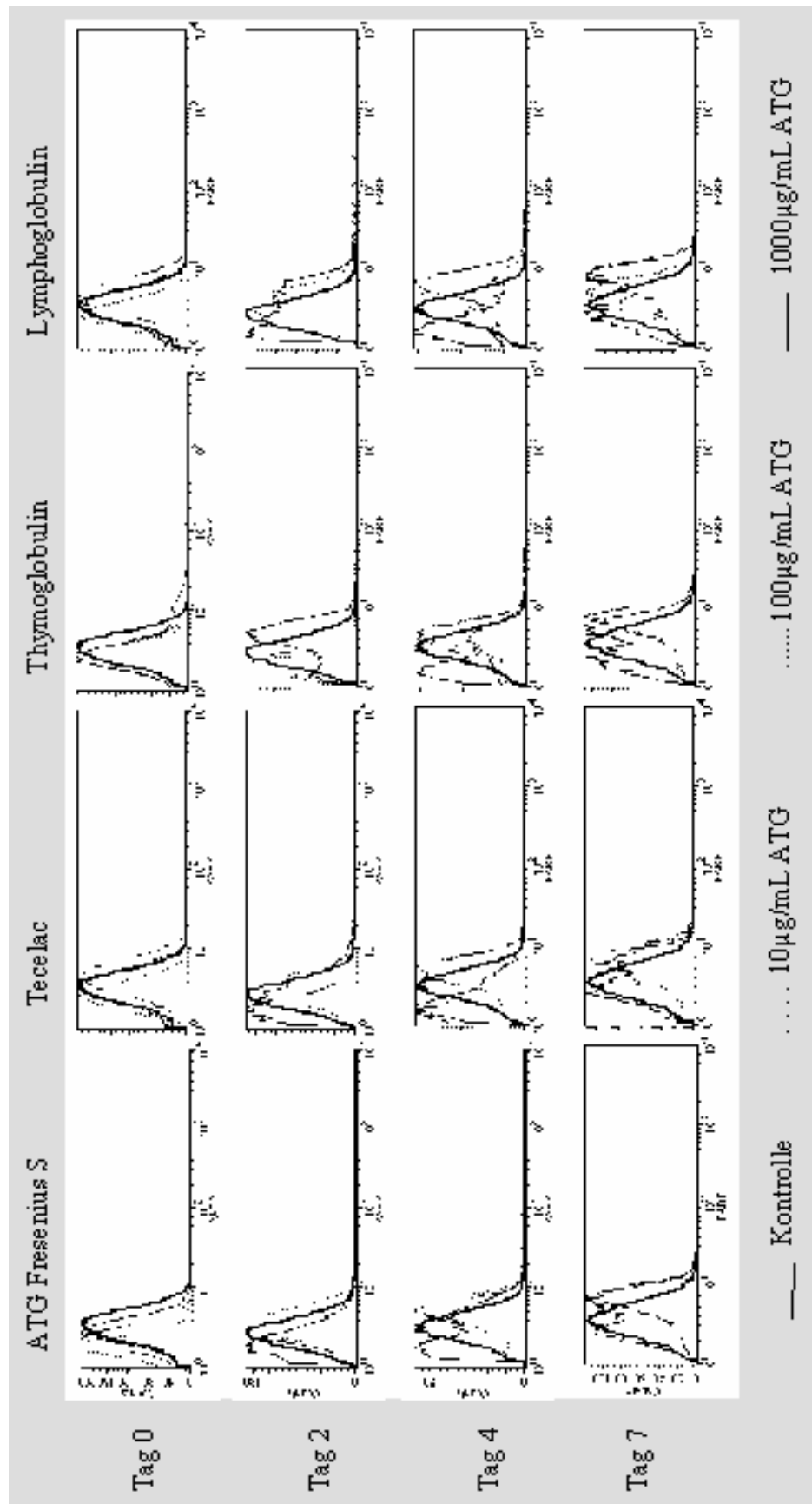


Abb. 4.20: Nachweis aktivierter Caspasen durch Spaltung des polyklonalen Antikörpers Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-FITC in der Zelllinie KG-1a nach ATG-Behandlung.

KG-1a-Zellen wurden über 7 Tage mit ATG (ATG-Fresenius S, Tecelac, Thymoglobulin, Lymphoglobulin) in den Konzentrationen 10 µg/ mL-1000 µg/mL inkubiert. Die Färbung mit Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-FITC und eine anschließende Messung erfolgten an den Tagen 0, 2, 4 und 7.

4.7.1 Nachweis aktivierter Caspasen durch das FITC-markierte Konjugat des irreversiblen Caspasen-Substrates VAD-FMK

Bereits an Tag 2 (Abb. 4.17) konnten in einem Teil der Zellen, die mit 1000 µg/mL ATG inkubiert worden waren, durch das FITC-markierte Konjugat des irreversiblen Caspasen-Substrates VAD-FMK (CaspACE) aktivierte Caspasen nachgewiesen werden (Lymphoglobulin 48,0%, Thymoglobulin 25,3%, Tecelac 59,8% und ATG-Fresenius S 48,7%). Bis Tag 7 erhöhte sich der Prozentsatz 7-AAD-positiver Zellen für alle ATG-Präparationen noch deutlich (Lymphoglobulin 97,4%, Thymoglobulin 92,3%, Tecelac 94,7% und ATG-Fresenius S 91,4%). Für 100 µg/mL konnte an Tag 2 nur für Tecelac eine Aktivierung der Caspasen in einem Teil der Zellen gezeigt werden (14,3%). Der Anteil der Zellen mit aktivierter Caspase steigerte sich jedoch auch hier bis Tag 7 (81,5%). Für 100 µg/mL ATG (Lymphoglobulin, Thymoglobulin, ATG-Fresenius S) konnte ab Tag 4 eine Erhöhung der Caspasenaktivität beobachtet werden (13,4%, 13,5% und 7,6%), die an Tag 7 schließlich für alle ATG-Präparationen deutlich ausgeprägt vorhanden war (Lymphoglobulin 57,4%, Thymoglobulin 52,0%, ATG-Fresenius S 39,4%). Für die Ansätze mit 10 µg/mL ATG konnte an Tag 7 in 33,9%, 22,4%, 34,4% und 22,3% der Zellen für Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac und ATG-Fresenius S eine Aktivierung von Caspasen gezeigt werden. In den Kontrollansätzen blieb der Anteil gemessener Zellen mit aktivierten Caspasen unter 7,0%.

4.7.2 Nachweis aktivierter Caspasen durch Spaltung des Caspasen-Substrates PhiPhiLux-G₂D₂ (DEVDGI)

Mit dem Substrat aktivierter Caspasen PhiPhiLux-G₂D₂ konnte für alle ATG-Präparationen bei 1000 µg/mL und für Tecelac bei 100 µg/mL an Tag 2 eine Aktivierung von Caspasen in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Für 1000 µg/mL Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac und ATG-Fresenius S lag der Anteil der Zellen mit aktivierten Caspasen an Tag 2 bei 66,0%, 78,6%, 83,7% und 47,7% (Kontrolle 9,0%). An Tag 7 war dies noch deutlicher ausgeprägt (1000 µg/mL Lymphoglobulin 74,5%, Thymoglobulin 79,9%, Tecelac 80,6% und ATG-Fresenius S 73,4%). Eine deutliche Caspasen-Aktivierung bei 100 µg/mL war für Tecelac an Tag 2 (37,0%) und für die ATG-Präparationen Thymoglobulin und Lymphoglobulin ab Tag 4 zu beobachten (14,8% und 20,3%). Bei ATG-Fresenius S war

selbst an Tag 7 für 100 µg/mL, ebenso wie für alle Ansätze mit 10 µg/mL, keine erhöhte Caspasenaktivität zu erkennen.

4.7.3 Nachweis aktivierter Caspasen durch den PE-markierten polyklonalen Antikörper Kaninchen-Anti-Human-Aktivierete-Caspase-3

Mit dem polyklonalen Antikörper Kaninchen-Anti-Human-Aktivierete-Caspase-3-PE konnten nur geringe Aktivierungen der Caspase-3 beobachtet werden (Abb. 4.19). Lediglich bei 1000 µg/mL ATG erfolgte ab Tag 4 eine leichte Verschiebung des Fluoreszenzmaximums (Lymphoglobulin 10,5%, Thymoglobulin 9,9%, Tecelac 11,0% und ATG-Fresenius S 17,1%) im Vergleich zur Kontrollfärbung 4,5%. Der Anteil der Zellen mit aktivierter Caspase-3 stieg an Tag 7 noch geringfügig an (19,5%, 10,6%, 21,3% und 17,8%). Für 100 µg/mL konnte nur für Tecelac ein erhöhter Anteil von Zellen mit aktivierter Caspase nachgewiesen werden (Tag 4 12,5%, Tag 7 18,5%).

4.7.4 Nachweis aktivierter Caspasen durch den polyklonalen Antikörper Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-FITC

Bei dem Nachweis der Spaltprodukte des Substrates aktivierter Caspasen PARP konnte ab Tag 2 für 1000 µg/mL Thymoglobulin eine Aufspaltung des Fluoreszenzgipfels gesehen werden (Abb. 4.20). Es entstanden zwei Gipfel mit unterschiedlich starker Fluoreszenz. Bei ATG-Fresenius S und Lymphoglobulin konnte diese Spaltung dann ab Tag 4 beobachtet werden. Für Tecelac zeigte sich dieses Phänomen erst an Tag 7.

Bei 10 µg/mL und 100 µg/mL ATG zeigte sich für die Präparationen Lymphoglobulin, Thymoglobulin und ATG-Fresenius S an den Tagen 4 und 7 eine geringe Verlagerung der Fluoreszenzmaxima im Vergleich zur Kontrolle. Bei Tecelac war eine deutliche Aufspaltung des Fluoreszenzgipfel für 100 µg/mL an den Tagen 4 und 7 zu erkennen. Bei 10 µg/mL konnte lediglich eine Verlagerung der Kurve wie bei Thymoglobulin, Lymphoglobulin und ATG-Fresenius S beobachtet werden.

4.8 Inhibition ATG-induzierter Apoptose durch den irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK

Die zuvor durchgeführten und beschriebenen Experimente zeigten, dass im Rahmen der ATG-vermittelten Apoptose Caspasen aktiviert werden. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob die ATG-induzierte Apoptose durch Caspasen-Inhibitoren gehemmt werden kann.

Hierfür wurde die exponentiell wachsende Zelllinie NB-4 mit ATG (Tecelac, Lymphoglobulin, Thymoglobulin und ATG-Fresenius S) in Konzentrationen von 10 µg/mL-1000 µg/mL, 50 µM Etoposid und dem irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK (50 µM) inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde zu den Zeitpunkten 0 Stunden und nach 48 Stunden mittels 7-AAD-Färbung bestimmt (siehe Abb. 4.21).

Zu dem Zeitpunkt 0 Stunden ergab sich für keinen der Messwerte ein Prozentsatz von über 10,0% 7-AAD-positiver Zellen. Auch nach 48 Stunden stieg der Anteil apoptotischer Zellen in den Kontrollansätzen mit DMSO und DEVD nicht über 7,0%. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz, in dem die Apoptose durch Etoposid induziert wurde. Hier konnten die 96,0% 7-AAD-positiven Zellen auf 26,0% in Verbindung mit dem Caspasen-Inhibitor gesenkt werden. Nach 48-stündiger Inkubation überstieg der Anteil 7-AAD-positiver Zellen bei den mit 10 µg/mL ATG inkubierten Zellen 10,0% nicht (Lymphoglobulin 8,0%, Thymoglobulin 6,5%, Tecelac 8,8% und ATG-Fresenius S 7,5%). Bei 100 µg/mL Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac und ATG-Fresenius S lag der Anteil apoptotischer Zellen bei 14,6%, 11,5%, 26,2% und 63,6%. In den Kombinationsansätzen mit dem Caspasen-Inhibitor konnte nur bei ATG-Fresenius S der Anteil 7-AAD-positiver Zellen von 63,6% auf 50,4% gesenkt werden. Bei den übrigen ATG-Präparationen stieg der Anteil apoptotischer Zellen sogar noch an (Lymphoglobulin von 14,6% auf 27,9%, Thymoglobulin von 11,5% auf 19,4%, Tecelac von 26,2% auf 48,7%). Für 1000 µg/mL Lymphoglobulin, Thymoglobulin, Tecelac und ATG-Fresenius S lag der Prozentsatz apoptotischer Zellen bei 80,6%, 56,7%, 96,5% und 92,5%. Eine deutliche Reduktion bei Koinkubation mit dem Caspasen-Inhibitor konnte nicht beobachtet werden (Lymphoglobulin von 80,6% auf 75,6%, Thymoglobulin von 56,7% auf 58,3%, Tecelac von 96,5% auf 92,8% und ATG-Fresenius S von 92,5% auf 86,8%).

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die ATG-induzierte Apoptose durch den irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK in den eingesetzten Konzentrationen nicht gehemmt werden konnte.

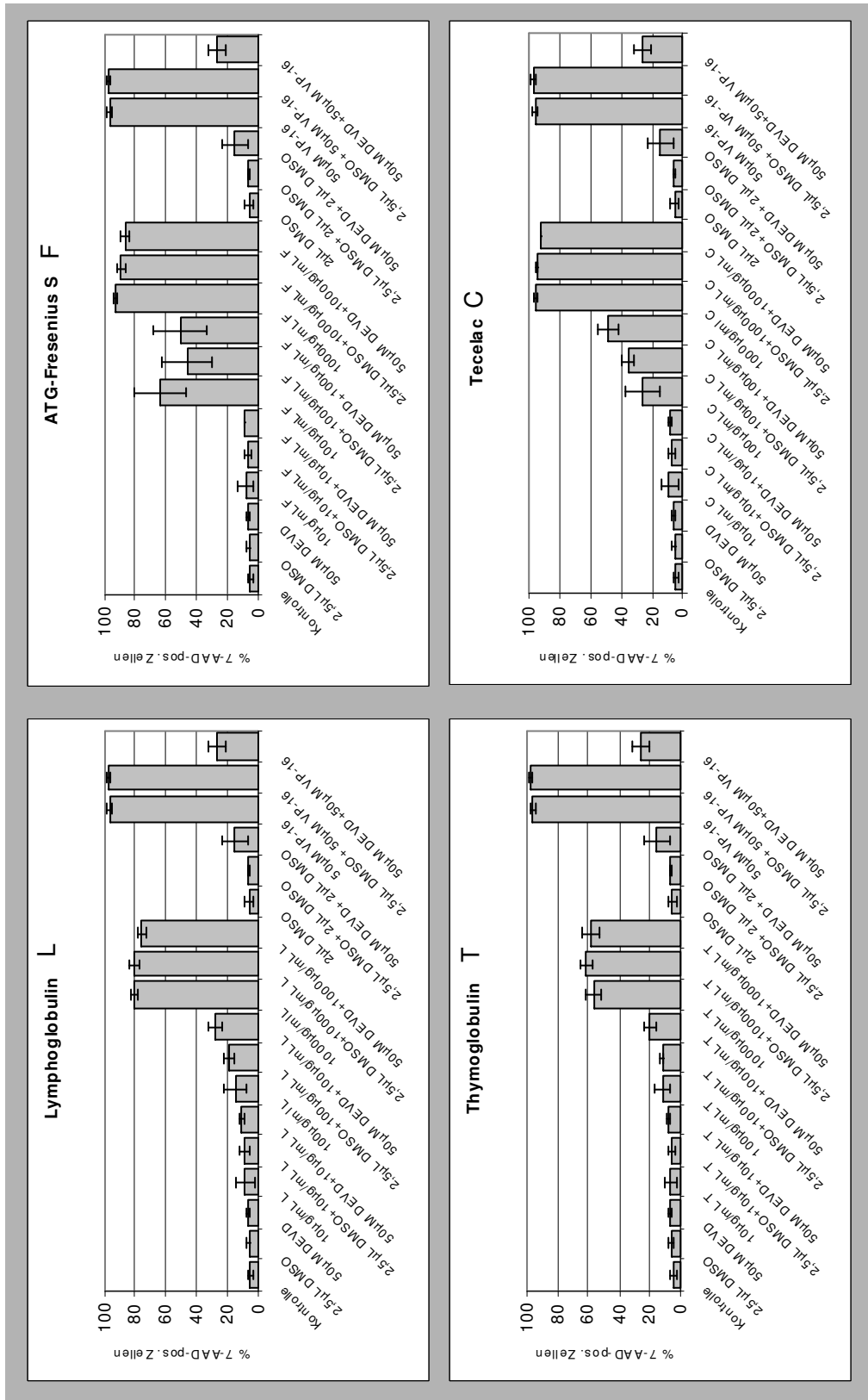


Abb. 4.21: Inkubation von Zellen der Zelllinie NB-4 mit ATG und dem irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK. Dargestellt ist der Anteil 7-AAD-positiver NB-4-Zellen nach 48 h Inkubation mit Lymphoglobulin (L), Thymoglobulin (T), ATG Fresenius S (F) und Tecelac (C) in Konzentrationen von 10 µg/mL-1000 µg/mL und Etoposid (VP-16 (50 µM)) in Koinkubation mit dem Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK (50 µM). Die zum Zeitpunkt 0 h erfolgte Messung zeigte für alle Proben < 12,0 % 7-AAD-Positive Zellen.

4.9 Proliferationsinhibition

Um weitere potentielle Möglichkeiten des ATG-Wirkungsmechanismus zu untersuchen, wurden Proliferationsuntersuchungen mit dem stabilen, nicht toxischen Membranfarbstoff PKH26 durchgeführt. In die Zellmembran integriert, nimmt die Konzentration von PKH26 bei jeder Zellteilung ab, da der Farbstoff gleichermaßen auf die bei jeder Zellteilung entstehenden Tochterzellen weitergegeben wird.

Die exponentiell wachsende Zelllinie KG-1a wurde mit ATG (Tecelac und Lymphoglobulin) in den Konzentrationen von 10 µg/mL und 100 µg/mL nach PKH-Färbung über 16 Tage inkubiert. Die Messung der PKH26-Fluoreszenzintensität, kombiniert mit einer zusätzlichen Annexin V-FITC-Färbung, erfolgte jeden zweiten Tag (siehe Abb. 4.22). Durch die kombinierte Anwendung einer Annexin V-FITC und PKH-Färbung war es möglich, das Proliferationsverhalten der nicht apoptotischen Zellen selektiv zu untersuchen. Hierfür wurde bei der Datenauswertung das *gate* um die Annexin-negative Zellpopulation gesetzt, wodurch selektiv nur die lebenden Zellen dargestellt werden konnten.

Für die Abbildung wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der nicht mit PKH26 gefärbten Annexin-negativen Zellen von der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der mit PKH26 gefärbten Annexin-negativen Zellen subtrahiert.

Hierbei zeigte sich bereits ab Tag 4 für die Konzentrationen von 100 µg/mL ATG ein deutlich geringerer Abfall der Differenz der Fluoreszenzintensität im Gegensatz zu den Ansätzen mit 10 µg/mL und der Kontrolle. Dieser Effekt steigerte sich bis zum letzten Tag der durchgeführten Messung kontinuierlich. Insgesamt war der Effekt bei 100 µg/mL Lymphoglobulin etwas ausgeprägter als bei 100 µg/mL Tecelac.

Das durchgeführte Experiment zeigte, dass ATG in Konzentrationen, die auch Apoptose auslösen, antiproliferative Effekte auf die nicht apoptotische Population bei malignen myeloischen Zelllinien besitzt.

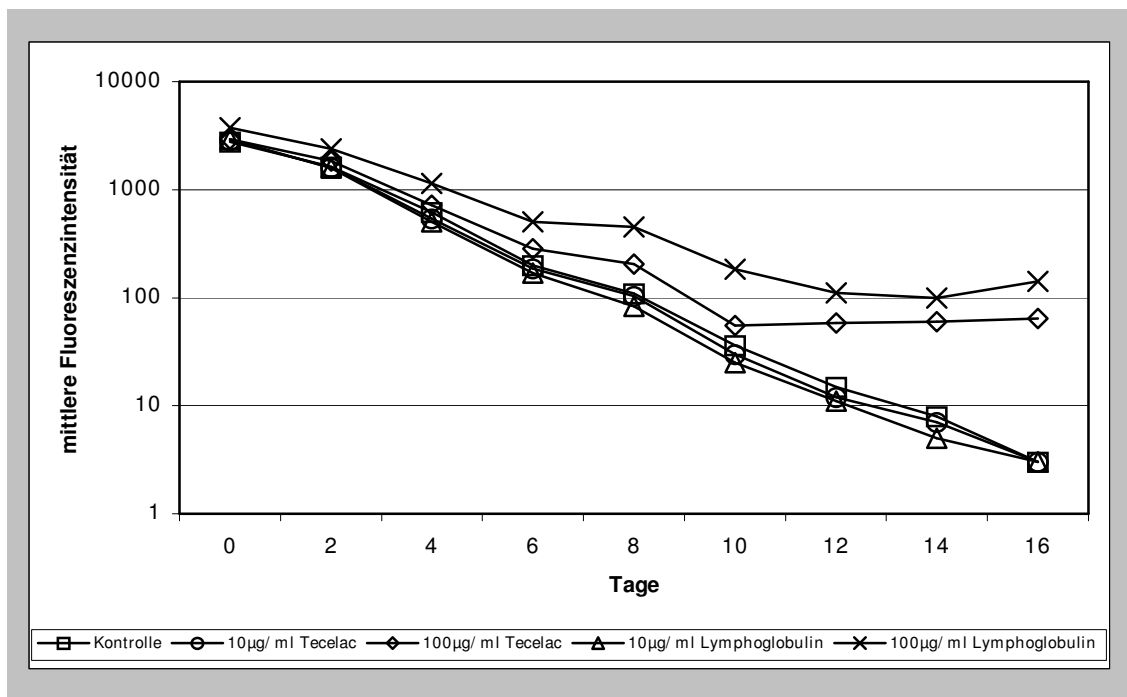


Abb. 4.22: Nachweis der ATG-induzierten Proliferationsinhibition in der Zelllinie KG-1a. Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität der nicht apoptotischen KG-1a-Zellen nach einer PKH26 Färbung. Die Messungen erfolgten über 16 Tage an jedem zweiten Tag. Inkubiert wurde mit Tecelac und Lymphoglobulin in Konzentrationen von 10 µg/mL und 100 µg/mL.

4.10 Proliferative ATG-Effekte auf die aus dem Knochenmark von MDS-Patienten isolierten mononukleären Zellen

Um den bereits mehrfach in der Literatur beschriebenen proliferativen Effekt geringer ATG-Konzentrationen auf primäre Zellen zu untersuchen, wurden mit den aus dem Knochenmark von MDS-Patienten isolierten mononukleären oder aufgereinigten CD34+-Zellen Koloniewachstumsstudien durchgeführt (siehe Tab. 4.1, 4.2 und 4.3).

Hierfür wurden die mononukleären (siehe Tab.4.1 und 4.2) oder die aufgereinigten CD34+-Zellen (siehe Tab. 4.3) mit Thymoglobulin oder Lymphoglobulin in den Konzentrationen 0 µg/mL-1000 µg/mL und Arsentrioxid (1 µM) im Feuchtbrutschrank kultiviert. Nach 14 Tagen erfolgte die Bestimmung der entstandenen *Cluster* und Kolonien. Gruppen von mehr als 40 Zellen wurden als Kolonie definiert.

I.D. 10	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	6	9	2	2
0,1µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml	8	10	3	4
10µg/ml	5	5	1	4
100µg/ml	1	0	0	1
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 1	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	5	2	0	1
0,1µg/ml	9	4	0	3
1µg/ml	8	1	0	3
10µg/ml	8	1	0	3
100µg/ml	0	1	0	1
1000µg/ml	0	0	0	1
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 3	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	2	4	2	6
0,1µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml	3	2	1	3
10µg/ml	0	3	1	1
100µg/ml	1	0	0	1
1000µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 5	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	6	4	0	3
0,1µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml	6	5	4	2
10µg/ml	3	1	0	1
100µg/ml	2	0	2	0
1000µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 8	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	20	24	2	1
0,1µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml	16	21	1	1
10µg/ml	x	x	x	x
100µg/ml	2	0	0	5
1000µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 20	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	43	24	1	2
0,1µg/ml	43	21	2	4
1µg/ml	50	17	2	6
10µg/ml	47	17	2	5
100µg/ml	14	6	2	5
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	0	0	0	0

I.D. 6	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	3	7	1	0
0,1µg/ml	6	8	1	3
1µg/ml	7	4	2	2
10µg/ml	5	5	3	7
100µg/ml	3	2	1	5
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 19	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	8	36	1	1
0,1µg/ml	12	30	2	1
1µg/ml	11	43	4	3
10µg/ml	10	36	4	6
100µg/ml	9	14	0	3
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 21	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	5	1	0	1
0,1µg/ml	3	0	0	2
1µg/ml	4	1	0	2
10µg/ml	4	1	0	2
100µg/ml	4	1	0	4
1000µg/ml	2	0	0	1
1µg/ml As2O3	0	0	0	0

I.D. 4	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	13	20	2	1
0,1µg/ml	8	22	1	0
1µg/ml	11	22	1	1
10µg/ml	8	16	1	1
100µg/ml	8	13	0	3
1000µg/ml	2	11	0	3
1µg/ml As2O3	0	0	0	0

X: Aufgrund des geringen Probenmaterials und einer damit verbundenen geringen Anzahl isolierter mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark war es nicht möglich, für diese Konzentrationen CFUs anzusetzen. CFU-GEMM entstanden keine. Mehr als 40 Zellen wurden als Kolonie definiert.

Tab. 4.1: Cluster, CFU-GM, BFU-E, CFU-E nach 14-tägiger Inkubation von mononukleären Zellen mit ATG

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Kulturen der entstandenen Anzahl von Cluster, CFU-GM, BFU-E, CFU-E nach 14-tägiger Inkubation mit Lymphoglobulin in den Konzentrationen von 0 µg/mL-1000 µg/mL und Arsentrioxid (1µM).

I.D. 6	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	2	6	1	1
0,1µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml	6	6	2	2
10µg/ml	4	7	2	2
100µg/ml	x	x	x	x
1000µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 10	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	1	0	0	0
0,1µg/ml	1	0	0	0
1µg/ml	8	4	1	4
10µg/ml	1	0	1	1
100µg/ml	5	0	0	1
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 1	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	9	2	1	3
0,1µg/ml	11	2	1	4
1µg/ml	10	3	0	2
10µg/ml	6	1	0	1
100µg/ml	1	1	0	2
1000µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 4	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	4	12	0	0
0,1µg/ml	8	17	4	1
1µg/ml	5	11	0	0
10µg/ml	5	11	0	0
100µg/ml	5	10	1	1
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 11	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	1	1	0	1
0,1µg/mL	1	1	0	1
1µg/mL	1	2	0	1
10µg/mL	0	1	1	2
100µg/mL	1	1	0	1
1000µg/mL	0	0	0	1
1µg/mL As2O3	x	x	x	x

I.D. 10	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	0	0	0	0
0,1µg/mL	0	0	0	0
1µg/mL	3	2	1	1
10µg/mL	6	5	1	3
100µg/mL	1	0	0	0
1000µg/mL	0	0	0	0
1µg/mL As2O3	x	x	x	x

I.D. 17	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	0	0	0	0
0,1µg/mL	0	0	0	1
1µg/mL	1	0	0	1
10µg/mL	0	0	0	1
100µg/mL	0	0	0	1
1000µg/mL	0	0	0	1
1µg/mL As2O3	0	0	0	0

I.D. 20	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	59	25	3	5
0,1µg/ml	59	21	1	4
1µg/ml	61	24	1	3
10µg/ml	37	18	3	3
100µg/ml	7	2	0	2
1000µg/ml	x	x	x	x
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 21	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	5	0	0	2
0,1µg/ml	4	0	0	1
1µg/ml	4	0	0	3
10µg/ml	4	1	0	2
100µg/ml	3	0	0	2
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

I.D. 19	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	8	53	5	2
0,1µg/ml	10	42	2	2
1µg/ml	19	55	6	6
10µg/ml	16	32	4	8
100µg/ml	5	6	0	0
1000µg/ml	0	0	0	0
1µg/ml As2O3	x	x	x	x

Tab. 4.2: Cluster, CFU-GM, BFU-E, CFU-E nach 14-tägiger Inkubation von mononukleären Zellen mit ATG
Dargestellt sind die Mittelwerte der entstandenen Cluster, CFU-GM, BFU-E, CFU-E aus drei Kulturen nach 14 -tägiger Inkubation mit Thymoglobulin in den Konzentrationen von 0 µg/mL-1000 µg/mL und Arsentrioxid (1 µM).

I.D. 11	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	1	2	0	2
0,1µg/mL	1	2	1	2
1µg/mL	1	1	0	2
10µg/mL	2	1	0	3
100µg/mL	1	1	0	2
1000µg/mL	0	0	0	0
1µg/mL As2O3	x	x	x	x

I.D. 10	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	1	0	0	0
0,1µg/mL	6	6	1	1
1µg/mL	0	0	0	1
10µg/mL	1	0	0	0
100µg/mL	0	0	0	0
1000µg/mL	0	0	0	0
1µg/mL As2O3	x	x	x	x

I.D. 17	Cluster	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	0	0	0	0
0,1µg/mL	0	0	0	0
1µg/mL	0	0	0	0
10µg/mL	0	0	0	1
100µg/mL	0	0	0	0
1000µg/mL	0	0	0	0
1µg/mL As2O3	x	x	x	x

X: Aufgrund des geringen Probenmaterials und einer damit verbundenen geringen Anzahl isolierter CD34+-bzw. mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark war es nicht möglich, für diese Konzentrationen CFUs anzusetzen.

CFU-GEMM entstanden keine. Mehr als 40 Zellen wurden als Kolonie definiert.

Tab. 4.3: Cluster, CFU-GM, BFU-E, CFU-E nach 14-tägiger Inkubation von CD34+-Zellen mit ATG

Dargestellt sind die Mittelwerte der entstandenen Cluster, CFU-GM, BFU-E, CFU-E aus drei Kolonien nach 14-tägiger Inkubation mit Lymphoglobulin (links dargestellt) oder Thymoglobulin (rechts dargestellt) in den Konzentrationen von 0 µg/mL-1000 µg/mL und Arsentrioxid (1 µM).

Für die mit Thymoglobulin inkubierten mononukleären Zellen zeigte sich bei geringen Konzentrationen (0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL) keine Erhöhung der entstandenen *Cluster* und Kolonien. Eine Reduktion der Kolonie- und *Clusterzahlen* zeigte sich jedoch stets bei 1000 µg/mL und teilweise bei 100 µg/mL Thymoglobulin (siehe Tab. 4.2).

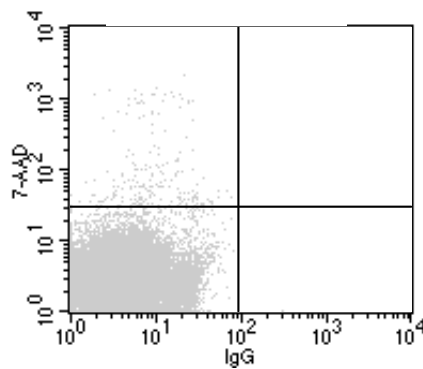
Ein ähnliches Bild ergab sich für die mit Lymphoglobulin inkubierten mononukleären Zellen. Auch hier konnte keine Steigerung der Kolonie- oder *Clusterzahlen* durch geringe ATG-Konzentrationen erreicht werden. Für 1000 µg/mL war auch hier eine deutliche Reduktion des Kolonie- und *Clusterwachstums* zu erkennen, welche teilweise auch schon bei 100 µg/mL vorhanden war (siehe Tab. 4.1).

Für die aufgereinigten CD34+-Zellen (siehe Tab. 4.3) war insgesamt nur ein sehr geringes Wachstum zu verzeichnen, so dass keine Aussagen zu einem eventuell gesteigerten *Cluster*- und Koloniewachstum bei geringen Lymphoglobulin- oder Thymoglobulin-Konzentrationen bzw. zu einem supprimierten Wachstum bei hohen ATG-Konzentrationen gemacht werden konnten.

4.11 Anteil apoptotischer CD3+-und CD34+-Zellen im peripheren Blut von MDS-Patienten

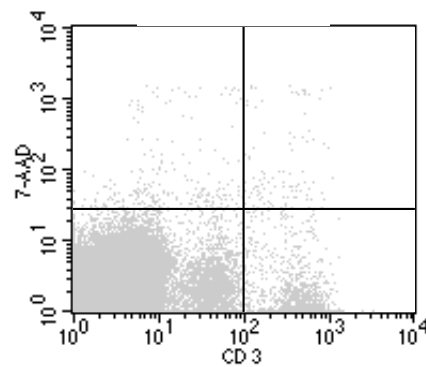
Um den Effekt des ATG auf primäre Zellen zu untersuchen, wurden die aus dem peripheren Blut von MDS-Patienten isolierten mononukleären Zellen über 4 Tage mit Lymphoglobulin oder Tecelac in den Konzentrationen von 0 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL inkubiert. Mit den Zellen wurde an den Tagen 0 und 4 eine CD3/7-AAD- oder CD34/7-AAD-Doppelmarkierung durchgeführt, um anschließend den Prozentsatz 7-AAD-positiver Zellen der CD3+- oder CD34+-Zellen bestimmen zu können.

Die Auswertung der am Durchflusszytometer erhaltenen Werte für diesen Versuch wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden die Gitternetzlinien des *Dot Plot* so eingestellt, dass der größte Teil der Zellen der IgG-Kontrolle im linken unteren Quadranten lagen (siehe Abb. 4.23a). Für die CD3- bzw. CD34-gefärbten Zellen konnte nun der Anteil positiver Zellen in den rechten Quadranten abgelesen werden (siehe Abb. 4.23b).



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	179	0.37	0.36
UR	9	0.02	0.02
LL	47725	99.32	95.45
LR	140	0.29	0.28

Abb. 4.23a



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	138	0.29	0.28
UR	132	0.28	0.26
LL	44450	93.01	88.90
LR	3073	6.43	6.15

Abb. 4.23b

Abb. 23a u. b: Einstellung der Zellen im Dot Plot,

so dass die Zellen der IgG-Kontrolle im linken unteren Quadranten und die CD3- bzw. CD34-gefärbten Zellen im rechten unteren Quadranten zur Darstellung kommen.

Um den Anteil der 7-AAD-positiven Zellen an den CD3- bzw. CD34-positiven Zellen zu bestimmen wurde eine Region 1 gewählt, die den beiden rechten Quadranten im *Dot Plot* entsprach. Diese selektiv ausgewählten Zellen wurden in einem Histogramm dargestellt und der Marker M1 gesetzt (siehe Abb. 4.24). Anhand des gesetzten Markers konnte nun der Prozentsatz 7-AAD-positiver Zellen der CD3+- oder CD34+-Zellen abgelesen werden.

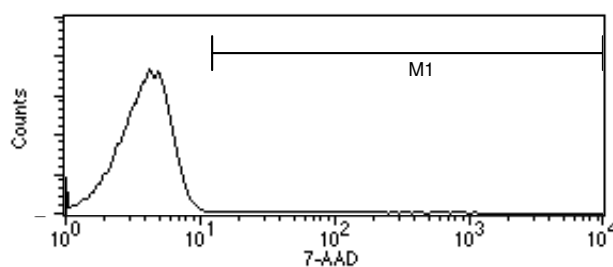


Abb. 4.24: Setzen des Markers M1 um den Prozentsatz 7-AAD-positiver Zellen der zuvor selektiv ausgewählten CD3+- oder CD34+-Zellen abzulesen.

Damit sollten Aussagen über eventuell im Blut vorhandene CD34+-Zellen und deren Prozentsatz apoptotischer Zellen sowie über den Prozentsatz apoptotischer CD3+-Zellen im peripheren Blut von MDS-Patienten gemacht werden. Die in Tab 4.4 dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus 13 Messungen von 8 Patienten.

Es zeigte sich, dass der Anteil der CD3-positiven Zellen im Durchschnitt 9,0% der insgesamt gemessenen Zellen betrug. Der Anteil 7-AAD-positiver Zellen der CD3-positiven Zellen lag an Tag 0 bei durchschnittlich 12,6% und war im Vergleich zur Kontrollfärbung mit IgG (nicht dargestellt) nicht erhöht. An Tag 4 lagen die Raten der 7-AAD-positiven Zellen insgesamt deutlich höher. Es zeigte sich darüber hinaus eine erhöhte Apoptoserate der mit 10 µg/mL und 100 µg/mL ATG inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen.

Mit dem spezifischen Anti-CD34-Antikörper konnten keine CD34+-Populationen unter den isolierten mononukleären Zellen nachgewiesen werden, so dass eine Wertung des Anteils apoptotischer CD34+-Zellen nicht sinnvoll erschien.

	Tag 0			Tag 4		
	% CD3+-Zellen total		% 7-AAD-pos. Zellen der CD3+-Zellen	% CD3+-Zellen total		% 7-AAD-pos. Zellen der CD3+-Zellen
	IgG	CD3		IgG	CD3	
Kontrolle	2,9±3,0	7,4±4,8	10,5±3,0	4,6±3,5	10,7±7,7	47,4±27,9
10 µg/mL ATG	2,1±2,3	8,3±5,4	11,5±4,2	4,4±3,6	9,9±8,6	63,0±31,8
100 µg/mL ATG	2,6±2,7	10,0±8,4	15,8±6,7	5,3±4,9	7,8±5,7	75,2±28,3
	% CD34+-Zellen total		% 7-AAD-pos. Zellen der CD34+-Zellen	% CD34+-Zellen total		% 7-AAD-pos. Zellen der CD34+-Zellen
	IgG	CD34		IgG	CD34	
	Kontrolle	2,9±2,7	2,2±1,6	16,3±9,9	4,6±3,7	3,7±2,9
10 µg/mL ATG	2,2±1,9	2,4±1,7	16,8±9,1	4,5±3,8	4,7±3,8	76,8±33,5
100 µg/mL ATG	2,8±2,4	2,9±2,2	21,2±11,5	5,6±5,5	5,7±5,9	84,7±26,1

Tab. 4.4: Anteil 7-AAD-positiver CD3+- und CD34+-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 13 Messungen von 8 Patienten, bei denen der Anteil 7-AAD-positiver CD3+- bzw. CD34+-Zellen ermittelt wurde.