

## 5 DISKUSSION

Die aplastische Anämie und die myelodysplastischen Syndrome sind lebensbedrohliche hämatologische Erkrankungen. Die einzige kurative Therapieoption stellt derzeit eine allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation dar. Für Patienten, die für diese Therapieform nicht geeignet sind, zählen ATG bzw. ALG zu der Standardtherapie bei der aplastischen Anämie (Marsh, 1999; Bacigalupo, 2000b; Frickhofen, 2000; Frickhofen, 2002). Auch bei Subgruppen von Patienten mit *low-risk* MDS wurde ATG bereits erfolgreich eingesetzt (Tichelli, 1988; Biesma, 1997; Molldrem, 1997; Molldrem, 1998; Molldrem, 2002). Es ist bis jetzt allerdings noch unklar, welche Mechanismen für die Wirksamkeit der polyklonalen Antilymphozyten- (ALG) bzw. Antithymozyten-Präparationen (ATG), die ansonsten hauptsächlich in der immunsuppressiven Therapie im Rahmen von Abstoßungsreaktionen Anwendung finden (Agha, 2002; Arns, 2002; Cohen, 2002; Krasinskas, 2002; Yu, 2002), bei diesen monoklonalen Erkrankungen verantwortlich sind.

Einige Wirkungsmechanismen des ATG wurden bereits untersucht und beschrieben. So wurde schon 1983 gezeigt, dass ATG an viele menschlichen Zelltypen wie Granulozyten und Thrombozyten bindet, aber auch mit B- und T-Lymphozyten (Fisher, 1982; Greco, 1983) reagiert und vor allem auf diese Zellen zytotoxisch wirkt. Des Weiteren wurden einerseits immunsuppressive, antiproliferative (Bonneyoy-Bérard, 1992a; Bonneyoy-Bérard, 1992b), apoptoseinduzierende (Bonneyoy-Bérard, 1994; Genestier, 1998; Bonneyoy-Bérard, 1999) und andererseits jedoch auch stimulierende (Huang, 1987; Kawano, 1988; Kawano, 1990; Taniguchi, 1990; Huang, 1994) und T-Zell-aktivierende Mechanismen (Bonneyoy-Bérard, 1998) des ATG beschrieben.

### 5.1 Keine Apoptoseinduktion in malignen myeloischen Zellreihen durch Kontrollantikörper von Pferd und Kaninchen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde untersucht, ob Kontroll-IgG-Antikörper von Pferd oder Kaninchen in malignen Zellen Apoptose auslösen. Ein vor den Experimenten zur Apoptoseinduktion mit ATG durchgeführtes Experiment mit polyklonalem Kaninchen- und Pferde-IgG zeigte keine proapoptotische Wirkung. Die polyklonalen Kaninchen- und Pferde-IgG-Präparationen wurden in den gleichen Konzentrationen eingesetzt, in denen ATG in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse, sowie dem

bereits mehrfach in der Literatur beschriebenen neutralen Verhalten von Kaninchen- und Pferde-IgG auf das Apoptoseverhalten der Zellen (Bonney-Bérard, 1992c; Bonney-Bérard, 1994; Genestier, 1998; Bonney-Bérard, 1999; Killick, 2000c), konnte in den folgenden Experimenten mit ATG darauf verzichtet werden, der Kontrolle polyklonale IgG-Antikörper von Pferd oder Kaninchen hinzuzufügen. Darüber hinaus wäre es nicht möglich gewesen, für die jeweiligen ATG-Präparationen eine entsprechend korrekte Isotypenkontrolle zu erhalten, da diese aus dem Präimmenserum desselben Tieres hergestellt hätte werden müssen.

In den folgenden Versuchen wurden die Kontrollzellen ebenso behandelt wie die mit ATG inkubierten Zellen, so dass aus einer nicht vorhandenen Apoptose in den Kontrollansätzen und der vorhandenen Apoptose bei den mit ATG inkubierten Zellen auf eine durch das ATG-vermittelte Wirkung geschlossen werden konnte.

## **5.2 Vergleich des Apoptosenachweises mittels 7-AAD und Annexin V-FITC**

Im Rahmen von Langzeittitrationen wurden 905 Annexin/7AAD Doppelmarkierungen durchgeführt. In der einfachen Regressionsanalyse ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0,943$  mit  $p < 0,001$ . Sowohl Lecoer (Lecoer, 1997) als auch Rojewski (Rojewski, 2002) beschrieben statistisch nachgewiesene gleiche Werte des Apoptosenachweises für 7-AAD und Annexin. Aufgrund dieser hohen Korrelation wurde in einigen Versuchen auf eine Doppelmarkierung verzichtet und eine solitäre Annexin V-FITC oder 7-AAD-Färbung durchgeführt, zumal eine kombinierte Annexin V-FITC und 7-AAD-Färbung technisch nicht bei allen Versuchen durchführbar war. Zum Beispiel konnte eine Doppelmarkierung der Zellen bei dem Nachweis der Zellproliferation durch PKH26 nicht durchgeführt werden, da 7-AAD und PKH26 ein ähnliches Emissionsspektrum besitzen.

## **5.3 Apoptoseinduktion durch ATG in malignen myeloischen und lymphatischen Zelllinien**

Bei den polyklonalen ATG-Präparationen handelt es sich um Naturprodukte, deren Zusammensetzung variieren kann. Darüber hinaus werden zur Herstellung unterschiedliche Zellursprünge (Thymozyten von Pferd oder Kaninchen, menschliche Lymphoblasten) und

unterschiedliche Reinigungsverfahren angewendet. Trotz der zwangsläufig resultierenden Heterogenität bezüglich des Antikörpergehaltes von Hersteller zu Hersteller, aber auch von Charge zu Charge (Smith, 1985), konnte dennoch eine Apoptose-induzierende Wirkung bei malignen Zelllinien für alle vier eingesetzten und kommerziell erhältlichen ATG-Präparationen gezeigt werden.

Anhand der in dieser Arbeit systematisch durchgeführten Langzeittitrationsexperimente konnte eine Apoptoseinduktion durch therapeutisch erzielbare ATG-Konzentrationen (Bunn, 1996; Guttman, 1997; Merion, 1998; Eiermann, 1999; Regan, 2001) für lymphatische Zelllinien (Jurkat) und auch für myeloische Zelllinien (KG-1a, K-562, NB-4, U-937 und HL-60) nachgewiesen werden. Die Zelllinien wiesen untereinander jedoch eine gewisse Heterogenität in ihrer Sensitivität gegenüber ATG auf. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bereits ab Tag 2 bei einigen Zelllinien (NB-4, KG-1a, Jurkat) ein Anstieg der apoptotischen Zellen bei Konzentrationen von 100 µg/mL und 1000 µg/mL ATG, bei anderen wiederum (U-937, HL-60) konnte ein Anstieg der Rate apoptotischer Zellen (vor allem bei 100 µg/mL ATG) erst ab Tag 7 beobachtet werden. Bei der Zelllinie K-562 konnte mit 100 µg/mL ATG keine Apoptose induziert werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Zellen oder deren Ursprungsgewebe und deren Sensitivität gegenüber ATG konnte nicht gefunden werden. Ebenso bestand kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der Zellen auf ATG und deren genetischem Hintergrund bzw. dem Expressionsgrad des CD95-Rezeptors der Zellen (CD95 negativ: NB-4- (Kitamura, 2000) sowie K-562-Zellen (Dirks, 1997; Kim, 2000); CD95 positiv: U-937- (Dirks, 1997; Kim, 2000; Salih, 2002), KG-1a- (Ergebnisse der Arbeitsgruppe und eigene Ergebnisse (nicht dargestellt)), Jurkat- (Dirks, 1997; Kim, 2000) und HL-60-Zellen (Dirks, 1997; Kim, 2000; Salih, 2002)). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten reagierten die Jurkat-, KG-1a-, NB-4- und HL-60-Zelllinien sensibel auf ATG. Eine geringere Apoptoseinduktion konnte bei der CD95 negativen K-562- und der CD95 positiven U-937-Zelllinie beobachtet werden. Doch auch hier waren Unterschiede im Apoptoseverhalten zu erkennen, so dass bei den U-937-Zellen mit 1000 µg/mL und teilweise auch mit 100 µg/mL Apoptose mit allen 4 ATG-Präparationen erzielt werden konnte, bei den K-562-Zellen war dies nur mit Lymphoglobulin der Fall und dies auch nur bei 1000 µg/mL ATG.

Die Fähigkeit des ATG in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien Apoptose auslösen zu können, wurde auch von Bonnefoy-Bérard et al. (Bonnefoy-Bérard, 1994) beschrieben.

Hierbei zeigte sich, dass myelomonozytäre und T-Zelllinien weniger empfindlich waren als B-Zelllinien. Eine von Bonnefoy-Bérard beschriebene Unempfindlichkeit der U-937 konnte nicht bestätigt werden. Dies könnte jedoch an der kürzeren Inkubationszeit (20h bei Bonnefoy-Bérard im Vergleich zu bis zu 10 Tagen im Rahmen dieser Arbeit) und der geringeren ATG Konzentration (100 µg/mL und 500 µg/mL ATG bei Bonnefoy-Bérard im Vergleich zu bis zu 1000 µg/mL bei den hier durchgeführten Experimenten) liegen. Des Weiteren wurde von der ATCC (Sundstorm, 1976; ATCC, 2002b) darauf hingewiesen, dass U-937-Zellen, die vor 1994 geliefert wurden, in geringem Maße mit K-562-Zellen kontaminiert waren. Da die Arbeit von Bonnefoy-Bérard (1994) vermutlich vor dieser Zeit erstellt wurde, besteht somit die Möglichkeit einer unbeabsichtigten Kontamination. K-562-Zellen zeigten das von Bonnefoy-Bérard beobachtete Verhalten auch bei den Experimenten dieser Arbeit. Auch hier zeigten sich die K-562-Zellen am unsensibelsten gegenüber der ATG-induzierten Apoptose. Lediglich mit 1000 µg/mL Lymphoglobulin konnte eine erhöhte Anzahl 7-AAD-positiver Zellen nachgewiesen werden.

Bonnefoy-Bérard (Bonnefoy-Bérard, 1994) beschrieb, dass die meisten Zelllinien, die eine hohe Expressionsrate von CD95 hatten, sensibel gegenüber ATG waren. Auf der anderen Seite gelang es jedoch auch in CD95-negativen Zelllinien Apoptose auszulösen, während eine Apoptoseinduktion bei einigen CD95-exprimierenden Zelllinien nicht möglich war.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Annexin V/7-AAD-Doppelmarkierung bzw. der solitären 7-AAD-Färbung war es möglich, zwischen lebenden, früh-apoptotischen und spät-apoptotischen (Philpott, 1996; Lecoecur, 1998) bzw. nekrotischen Zellen zu differenzieren. Durch die angewandten Methoden konnte gezeigt werden, dass der Zytotoxizität des ATG ein durch Apoptose vermittelter Zelltod zugrunde lag.

Für einige Titrationen wurden mehrere Messreihen erhoben. Es zeigte sich, dass eine gewisse Interassayvarianz für die jeweilige Zelllinie bestand. Die Fähigkeit des ATG Apoptose zu induzieren konnte jedoch immer gezeigt werden.

Anhand dieser Experimente erfolgte der Beschluss, für die weiteren Versuche, eine den bei myelodysplastischen Syndromen vermutlich erkrankten Stammzellen möglichst nahe verwandte, also weitgehend undifferenzierte Zelllinie, zu verwenden. Die Zelllinie sollte daher myeloischen Ursprungs und noch möglichst undifferenziert sein. Die Wahl fiel auf die noch sehr undifferenzierten Zelllinien KG-1a (akute myelogene Leukämie) und NB-4 (akute Promyelozyten-Leukämie).

Hervorzuheben bleibt, dass die in den Experimenten eingesetzten ATG-Konzentrationen durchaus denen im Plasma von mit ATG behandelten Patienten entsprachen (Bunn, 1996; Guttman, 1997; Merion, 1998; Eiermann, 1999; Killick, 2000c; Regan, 2001). So lagen bei Bunn (Bunn, 1996) die erzielten Plasma-ATG-Konzentrationen auch 50 Tage nach erstmaliger ATG-Gabe noch über 100 µg/mL. Außerdem erreichten sie schon nach 4 Tagen bei den meisten Patienten Werte von über 100 µg/mL mit Spitzenwerten von über 300 µg/mL. Auch Merion (Merion, 1998) beschrieb ATG-Konzentrationen konstant zwischen 200 µg/mL und 300 µg/mL. Andere Autoren berichteten sogar von Spitzenwerten von über 900 µg/mL (Eiermann, 1999) 3 Tage und von 170 µg/mL 10 Tage (Regan, 2001) bzw. 650 µg/mL 14 Tage (Killick, 2000c) nach Therapiebeginn.

Die Inkubationszeit der Zellen entsprach ebenfalls dem Behandlungszeitraum (4-10 Tage) von Patienten mit AA und MDS, die eine ATG-Therapie erhalten (Paquette, 1995; Guinan, 1997; Molldrem, 1997; Killick, 1999; Stadler, 2000).

Zu beachten bleibt jedoch noch die bereits von mehreren Autoren beschriebene Antikörperbildung gegen die ATG-Präparationen bei Patienten, die eine ATG-Therapie erhalten haben. Bisher wurde dies nur bei Patienten mit intakter Hämatopoese untersucht, die in Rahmen von Organtransplantationen ATG erhalten haben (Guttman, 1997; Regan, 2001). Ungeklärt ist bisher noch, in welchem Ausmaß hämatopoetisch insuffiziente AA- und MDS-Patienten Antikörper bilden und sich dies auf die ATG-Elimination und den Plasmaspiegel im Therapieverlauf auswirkt.

## **5.4 Koinkubationsexperimente**

Anhand der durchgeführten Koinkubationsexperimente sollten Informationen darüber gewonnen werden, ob es durch die Zugabe der verschiedenen Reagenzien, die teilweise auch in der Therapie der Erkrankungen in Verbindung mit ATG gegeben werden, zu einer Veränderung der ATG-induzierten Apoptose kommt.

### *5.4.1 Keine Beeinflussung des ATG-induzierten Apoptoseverhaltens von KG-1a-Zellen durch Koinkubation mit Etoposid*

In mehreren Studien (Ogata, 1992; Knauf, 1994; Kuriya, 1996; Doll, 1998) wurde Etoposid (VP-16) zur Behandlung von Patienten mit MDS eingesetzt. Vorwiegend bei Patienten mit

Hochrisiko MDS und leukämisch transformierten MDS ergaben sich vielversprechende Ergebnisse im Rahmen oraler oder intravenöser Etoposidgaben. Mehrfach wurde beschrieben, dass Etoposid in relativ niedriger Konzentration bei menschlichen leukämischen Zelllinien zu einer Differenzierung von Myelo- und Monoblasten führt (Nakaya, 1991; Rius, 1991). Neben der Fähigkeit der Differenzierungsinduktion des Etoposids in leukämischen Zellen, wird zusätzlich ein direkt toxischer Effekt auf den malignen Zellklon vermutet.

Es stellte sich nun die Frage, ob *in vitro* durch Etoposid eine Wirkungsverstärkung bezüglich der Apoptoseinduktion durch ATG erzielt werden kann.

Weder mit therapeutisch erzielbaren Plasmakonzentrationen (2  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) (Chen, 2001) noch bei einer Dosissteigerung (50  $\mu\text{M}$ ) konnten eine synergistische oder eine additive Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu den Einzelsubstanzen erzielt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die ATG-induzierte Apoptose nicht durch eine Topoisomerase-II-inhibitor-induzierte Apoptose (Etoposid) gesteigert werden konnte.

#### 5.4.2 Keine Veränderung der ATG-induzierten Apoptose durch Koinkubation mit dem Wachstumsfaktor G-CSF

Verschiedene Autoren beschrieben bei der AA und den MDS sowohl eine gestörte Proliferation als auch eine gestörte Differenzierung der hämatopoetischen Zellen (Greenberg, 1987; Carlo-Stella, 1989; Greenberg, 1992; Richert-Boe, 1992; Gomez-Morales, 1998; Martinez-Jaramillo, 1999; Cox, 2000; Martinez-Jaramillo, 2002). Als mögliche Ursachen werden u. a. ein verändertes *Microenvironment* sowie eine veränderte Abgabe von Wachstumsfaktoren und eine verminderte Ansprechrate auf Wachstumsfaktoren bei diesen Patienten diskutiert (Bacigalupo, 1991; Nissen, 1991; Greenberg, 1992; Greenberg, 1996; Teramura, 1996; Marsh, 2000). Eine therapeutische Gabe von Wachstumsfaktoren (G-CSF) erfolgte meist im Rahmen kontrollierter Studien (Greenberg, 1991; Bacigalupo, 1995; Negrin, 1996; Hellstrom-Lindberg, 1998; Bacigalupo, 2000b). Eingesetzt wurden Wachstumsfaktoren bei der Behandlung der MDS (Ganser, 1991). Gute Ergebnisse konnten jedoch vor allem bei der Behandlung von AA-Patienten mit ATG in Verbindung mit G-CSF erzielt werden (Bacigalupo, 1995; Di Bona, 1999; Bacigalupo, 2000b). Es stellte sich nun die Frage, ob sich ATG und G-CSF eventuell gegenseitig in ihrer therapeutischen Wirkung beeinflussen.

*In vitro* zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der ATG-vermittelten Apoptoseinduktion durch Zugabe von G-CSF in therapeutisch erzielbaren Plasmakonzentrationen (Stute, 1992;

Shimazaki, 1995). Somit wurde gezeigt, dass G-CSF *in vitro* weder die Apoptoseinduktion durch ATG bei malignen myeloischen Zellen verminderte noch steigerte. Weiterhin unklar ist jedoch, ob eventuell das ATG die Wirkung des G-CSF *in vivo* in der Therapie der AA oder des MDS beeinflusst.

#### *5.4.3 Keine Steigerung der ATG-induzierten Apoptoserate durch Koinkubation mit Cyclosporin A (CsA)*

Das mit dem IL-2 Signaltransduktionsweg interferierende Cyclosporin A (CsA) wird häufig als Immunsuppressivum eingesetzt. Darüber hinaus wird CsA vor allem bei der Behandlung der AA in Verbindung mit ATG erfolgreich eingesetzt (Frickhofen, 1991; Bacigalupo, 1995; Rosenfeld, 1995; Marsh, 1999; Frickhofen, 2000; Bacigalupo, 2000b; Frickhofen, 2002). Hierbei ist noch unklar, ob die immunsuppressive Wirkung oder vielleicht andere Wirkungsmechanismen des CsA für den Therapieerfolg verantwortlich sind.

Bonnefoy-Bérard (Bonnefoy-Bérard, 1999) hat bereits gezeigt, dass Immunsuppressiva, welche mit dem Interleukin-2 Signaltransduktionsweg interferieren, die ATG-induzierte Apoptose verringern. Dies konnte jedoch nur bei aktivierten peripheren Blutzellen nachgewiesen werden, welche 3 Tage mit PHA und CsA vorinkubiert und anschließend mit ATG versetzt wurden. Nach Zugabe von rekombinantem IL-2 in den letzten 24 h der Inkubation, stieg die Apoptoserate durch ATG wieder an. Auch im Rahmen der Therapie von MDS könnte CsA eine Alternative darstellen, egal ob die Patienten Normo-, Hyper-, oder Hypozellularität aufweisen (Jonasova, 1998).

CsA ist darüber hinaus auch dafür bekannt, die Funktion des Glykoprotein-P (MDR) zu blockieren (He, 2002). Glykoprotein-P (MDR) ist in den Zellen oftmals für eine Zytostatikaresistenz verantwortlich, da es Zytostatika oder toxische Stoffwechselprodukte aus den Zellen ausschleust (Johnstone, 2000). Eine Blockade des Glykoproteins-P durch CsA verhindert das Ausschleusen der Zytostatika aus den Zellen und diese werden wieder sensibler gegenüber Chemotherapeutika (Pu, 1999). Durch Koinkubation von MDR-positiven KG-1a-Zellen (Efferth, 1997; Mongkonsritragoon, 1998) mit ATG und CsA im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine Veränderung der ATG-induzierten Apoptose beobachtet werden. Eine leicht erhöhte Apoptoserate in den Koinkubationsansätzen lässt im Rahmen der Interassayvarianz nicht zwingend auf einen Synergismus schließen.

Die Koinkubation von KG-1a-Zellen mit CsA und ATG hatte somit keine Auswirkungen auf die Apoptoserate der Zellen. Es kam weder, wie bei Bonnefoy-Bérard (Bonnefoy-Bérard, 1999) beschrieben, zu einer Verminderung der Apoptoserate, noch zu einer Erhöhung, wie es im Rahmen der Glykoprotein-P blockierenden Eigenschaften des CsA zu vermuten gewesen wäre.

Im Gegensatz hierzu konnte bei den mit Arsentrioxid inkubierten Zellen in Verbindung mit CsA eine erhöhte Apoptoserate, im Vergleich zu der durch die Einzelsubstanzen hervorgerufenen Rate, festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die für die Apoptoseauslösung durch ATG verantwortlichen Substanzen nicht wie Arsen im Zellinneren Apoptose auslösen, sondern die Apoptose durch Angriffspunkte an der äußeren Zellmembran der Zellen triggern. Somit wäre auch eine durch das Glykoprotein-P vermittelte Ausschleusung zytotoxischer Substanzen im Rahmen der Zytostatikaresistenz der Zellen nicht vorhanden.

Auch die Vermutung, dass durch die ATG-Bindung eventuell toxische Stoffwechselprodukte in der Zelle anfallen und diese durch das MDR aus der Zelle ausgeschleust werden, konnte durch diese Ergebnisse nicht unterstützt werden.

Ein Einfluss des Glykoprotein-P auf die ATG-vermittelten Apoptose konnte somit nicht nachgewiesen werden.

### **5.5 Keine Beteiligung des Fas-Rezeptor/Fas-Liganden Systems bei der durch ATG-induzierten Apoptose**

Ein klassischer Weg der Apoptoseinduktion wird über das zum Teil extrazellulär gelegene Fas-Rezeptor (CD95 oder APO-1)/Fas-Ligandensystem vermittelt. Bei den Zelloberflächenantigenen die als potenzielle Kandidaten bei der ATG-induzierten Apoptose in Frage kommen, sollte daher als erstes an das Fas/Fas-L-System gedacht werden. Da die CD95-vermittelte Apoptose bei vielen Vorgängen wie z. B. bei der Zytostatika-induzierten Apoptose (Hug, 1997) eine bedeutende Rolle spielt und ein Einfluss des ATG auf das Fas-System vermutet wird (Genestier, 1998; Bonnefoy-Bérard, 1999; Killick, 2000a), wurde ein Schwerpunkt der Arbeit auf die Stimulierung und Expression des CD95-Rezeptors durch ATG gelegt.

Um zu untersuchen, ob ATG Komponenten enthält, die an den CD95-Rezeptor binden, wurden kompetitive Bindungsstudien durchgeführt. Es zeigte sich, dass die in dieser Arbeit eingesetzten ATG-Präparationen und Chargen keine Komponenten besaßen, die an diejenigen Epitope des Fas-Rezeptors gebunden haben, an welche der stimulierende (DX2) bzw. der inhibierende (SM 1/23) CD95-Antikörper gebunden hat. Da nachgewiesen werden konnte, dass ATG nicht direkt an den CD95-Rezeptor bindet und dadurch Apoptose triggert, wurde als nächstes geprüft, ob ATG den CD95-Rezeptor hochreguliert und somit die Zellen sensitiver für Apoptose-induzierende Signale macht. Es zeigte sich jedoch auch hier, dass es durch ATG nicht zu einer Hochregulation des Fas-Rezeptors kam.

Genestier (Genestier, 1998) beschrieb allerdings, dass ATG in PBL die CD95- und Fas-L-Expression steigerte. Dies konnte jedoch nur bei ATG-Präparationen beobachtet werden, die CD2 und CD3 enthielten. Eine Apoptoseinduktion in aktivierten Lymphozyten war durch Präparation ohne CD2 und CD3 nicht möglich. Andere Studien (Killick, 2000a) hingegen zeigten, dass ATG bei CD34+-Zellen von AA-Patienten *in vivo* die Fas-Expression herabreguliert. Es könnte somit vermutet werden, dass der Einfluss des ATG auf die Expression des Fas-Rezeptors von der Reife (Differenzierung) der Zellen abhängig ist.

Um Effekte von ATG auf mögliche autokrine oder parakrine CD95/CD95-L-Mechanismen zu untersuchen, wurden Experimente mit Antikörpern durchgeführt, welche die CD95-vermittelte Apoptose hemmen (SM 1/23). Als Positivkontrolle diente der über CD95 Apoptose-induzierende Antikörper 7C11. Es stellte sich heraus, dass der blockierende Antikörper SM 1/23 zwar die durch den induzierenden Antikörper 7C11 induzierte Apoptose, nicht jedoch die durch ATG ausgelöste Apoptose blockieren konnte. Auch eine durchgeführte Koinkubation der Zellen mit ATG und 7C11 ließ keine Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu der durch die Einzelsubstanzen ausgelösten erkennen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Genestier (Genestier, 1998), der in aktivierten Lymphozyten durch ATG Apoptose auslösen konnte. Es zeigte sich für aktivierte Lymphozyten, dass durch eine gleichzeitige Gabe von ATG und einem Apoptose-induzierenden CD95-Antikörper (CH11) die Zahl der apoptotischen Zellen nicht die Anzahl derer, durch die Einzelsubstanzen ausgelösten, überschritt. Ebenfalls war es Genestier nicht möglich, eine nennenswerte Reduktion der ATG-induzierten Apoptose durch einen inhibierenden CD95-Antikörper (ZB4) bei nicht aktivierten T-Lymphozyten zu erreichen. Dies gelang nur in zuvor aktivierten T-Zellen.

Ein parakriner oder autokriner Mechanismus, welcher eine Apoptoseinduktion über CD95/CD95L involviert, konnte somit ausgeschlossen werden.

Mit der hier angewandten Durchflusszytometrie konnte kein Einfluss des ATG auf den CD95-Rezeptor festgestellt werden. Es muss daher überlegt werden, welche weiteren Mechanismen für die Apoptoseinduktion durch ATG verantwortlich sein können, wie z. B. TNF- $\alpha$ , oder TRAIL.

Auch Bonnefoy-Bérard (Bonnefoy-Bérard, 1994; Bonnefoy-Bérard, 1996) kam zu dem Schluss, dass zusätzlich zu dem durch den Fas/Fas-L-vermittelten Mechanismus noch weitere Oberflächenmoleküle und Mechanismen in die ATG-induzierte Apoptose involviert sein müssen.

## **5.6 CD95-unabhängige Aktivierung von Caspasen im Rahmen der ATG-induzierten Apoptose**

Die bisherigen Ergebnisse schließen eine über CD95-vermittelte Apoptose in malignen lymphatischen und myeloischen Zellen mit den verwendeten Präparaten als Hauptmechanismus aus.

Untersuchungen darüber, über welche Mechanismen die ATG-induzierte Zytotoxizität intrazellulär geregelt wird, liegen bislang noch nicht vor.

Um den Mechanismus der ATG-induzierten Zytotoxizität noch etwas näher zu untersuchen und noch einmal zu klären, ob tatsächlich der Mechanismus der Apoptose und nicht vielleicht auch Paraptose (programmierter, alternativer Zelltod, jedoch ohne apoptosetypische Zellveränderungen wie z. B. DNA-Fragmentierung) (Sperandio, 2000; Wyllie, 2001) für die Zytotoxizität des ATG bei malignen Zelllinien verantwortlich ist, waren Experimente zur Beteiligung von Caspasen im Apoptoseverlauf von besonderem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Untersuchungen zum Nachweis von aktivierten Caspasen im Allgemeinen (CaspACE<sup>TM</sup>FITC-VAD-FMK), sowie zum gezielten Nachweis einzelner aktivierter Caspasen durchgeführt. Der Nachweis aktivierter Caspase-3 erfolgte durch Anti-Caspase-3 spezifische Antikörper, sowie durch die Spaltung des Caspase-3 spezifischen Substrates PhiPhiLux-G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> und der Nachweis aktivierter Caspase-3, Caspase-7 und Caspase-9 durch *cleavage site specific* Antikörper für deren Substrat PARP.

Der direkte Nachweis aktivierter Caspase-3 war jedoch nur bedingt möglich. Auch der Nachweis von Spaltprodukten der Caspasen-3, -7 und -9 (PARP) war nicht ganz eindeutig. Da es sich um eine enzymatische Nachweismethode handelt, lieferte die Färbung mit dem Substrat aktivierter Caspasen PhiPhiLux-G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> das sensitivste Ergebnis. Hiermit konnte eine Aktivierung von Caspasen bei den hohen, die Apoptose induzierenden Konzentrationen von 100 µg/mL ATG und 1000 µg/mL ATG, eindeutig gezeigt werden. Mit einer Färbung durch den FITC-konjugierten irreversiblen Caspasen-Inhibitor VAD-FMK (CaspACE) konnte dies bestätigt werden. Ebenso sprachen die Ergebnisse der durchgeführten PARP-Färbung mit einer zu erkennenden Aufspaltung des Fluoreszenzpeaks für die Aktivierung von Caspasen.

Es zeigte sich eine gewisse Heterogenität der Sensitivität der eingesetzten Zelllinie (KG-1a) gegenüber den unterschiedlichen ATG-Präparationen. Am sensibelsten zeigten sich die Zellen gegenüber Tecelac, was auch die Ergebnisse der Titration bestätigte, bei der die Zellen der Zelllinie KG-1a die höchste Apoptoserate bei Tecelac zeigten.

Die zur Caspasen-Aktivierung durchgeführten Untersuchungen bestätigten eindeutig, dass es sich bei der Zytotoxizität des ATG um den Mechanismus der Apoptose handelt, in deren Verlauf Caspasen aktiviert werden. Hierbei scheint die Caspase-3 eine zentrale Rolle zu spielen.

### **5.7 Keine Verminderung der Anzahl apoptotischer Zellen durch den irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK**

Nachdem eine eindeutige Beteiligung von Caspasen und vor allem der Caspase-3 im Verlauf der Apoptose durch ATG gezeigt wurde, war es von Interesse, ob es durch einen Caspasen-Inhibitor möglich ist, die Zahl der apoptotischen Zellen zu vermindern.

Hierbei wurde der irreversible Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK, welcher vorwiegend die Caspasen-3 und -8 und in geringem Maße auch die Caspasen-6, -7 und -10 inhibiert, eingesetzt. Bei keiner der vier ATG-Präparationen war es möglich, die Anzahl apoptotischer Zellen durch eine Koinkubation mit dem irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK zu vermindern.

Die Veränderungen der Zahl apoptotischer Zellen, die bei Koinkubation mit dem irreversiblen Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK aufgetreten sind, müssen im Rahmen der Messgenauigkeit

betrachtet werden, denn bei der Kontrollsubstanz VP-16 waren eindeutige Ergebnisse zu erzielen.

Die fehlende Reduktion apoptotischer Zellen könnte durch eine nicht ausreichende Hemmung aller involvierten Caspasen durch Z-DEVD-FMK bedingt gewesen sein, oder auf eine Beteiligung Caspasen-unabhängiger Mechanismen bei der ATG-induzierten Apoptose hinweisen. Somit wäre die ATG-vermittelte Apoptose vielleicht durch einen Caspasen-Inhibitor mit einem breiteren Spektrum zu inhibieren.

Möglich wäre darüber hinaus, dass es bei der ATG-induzierten Apoptose neben der gezeigten Caspasen-Aktivierung zusätzlich Mechanismen gibt, die den programmierten Zelltod durch weitere Stimuli triggern können, welche die Caspasen nicht einbeziehen.

Von mehreren Autoren (Mollereau, 1996; Deas, 1998; Dumont, 2000) wurde bereits beschrieben, dass Anti-CD2 monoklonale Antikörper bei aktivierten T-Zellen den Zelltod hervorgerufen haben, mit einigen charakteristischen Anzeichen von Apoptose, wie Zytoplasmaschrumpfung, Membranauflösung, Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und Phosphatidylexpositon auf die Zellmembranaußenseite. Diese Veränderungen wurden unter anderem auch in Anwesenheit der Breitbandspektrum Caspasen-Inhibitoren Z-VAD-FMK und BOC-D-FMK beobachtet, so dass auf eine caspasunenabhängige Apoptoseinduktion geschlossen werden musste.

Da Anti-CD2 von den Herstellern als wirksamer Bestandteil des ATG angegeben wird, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass es bei der ATG-vermittelten Apoptose zusätzliche Mechanismen gibt, die eine Caspasen-Aktivierung umgehen.

## **5.8 Proliferationsinhibitor durch ATG in nicht apoptotischen KG-1a-Zellen**

Da es im Rahmen der MDS zu einem hyperzellulären Knochenmark mit vermehrter Proliferation der Zellen kommt, war es unter anderem interessant, ob ATG neben der Apoptoseinduktion noch weitere Mechanismen besitzt, durch welche das Zellwachstum beeinflusst werden kann. In den durchgeführten Proliferationsuntersuchungen zeigte sich, dass ATG in einer Konzentration von 100 µg/mL in der Zelllinie KG-1a zu einer deutlichen Proliferationshemmung nichtapoptotischer Zellen führte. Somit konnte gezeigt werden, dass ATG in Konzentrationen, die im Rahmen einer ATG-Therapie im Plasma der Patienten

durchaus erreicht werden können (Bunn, 1996; Guttman, 1997; Merion, 1998; Eiermann, 1999; Killick, 2000c; Regan, 2001), zu einer apoptoseunabhängigen Proliferationsinhibition führte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Bonnefoy-Bérard, Merion und Eiermann, die ebenfalls eine Proliferationsinhibition durch ATG für B-Zellen, B-Zelllinien (Bonnefoy-Bérard, 1992a), T-Zellen (Bonnefoy-Bérard, 1992b; Merion, 1998) und normale mononukleäre Zellen (Eiermann, 1999) beschrieben haben. Neben der Apoptoseinduktion in malignen Zellen könnte die gezeigte Proliferationsinhibition im Rahmen der Therapie von MDS für ein Ansprechen der Patienten mitverantwortlich sein.

Die Zelllinie KG-1a schien für diese Untersuchung besonders geeignet zu sein, da sie sich im Gegensatz zu den ursprünglichen KG-1-Zellen nicht spontan in makrophagen- und granulozytenähnliche Zellen differenziert, sich auch durch Phorbol ester nicht mehr differenzieren lässt und nicht auf CSF anspricht (Koeffler, 1983; ATCC, 2002a). Dies könnte unter anderem erklären, weshalb bei 10 µg/mL ATG noch keine Proliferationsinhibition zu beobachten war, sondern diese erst bei höheren Konzentrationen stattfand.

Die Proliferationsinhibition im Rahmen der Inkubation mit ATG könnte auf eine differenzierungsunabhängige Proliferationsinhibition, aber auch auf eine durch eine Differenzierung hervorgerufene Proliferationsinhibition zurückzuführen sein, da Differenzierung oftmals mit Proliferationsinhibition einhergeht.

Eine durch Differenzierung hervorgerufene Proliferationsinhibition würde mit Ergebnissen von Hunter in Einklang stehen. Hunter et al. (Hunter, 1985) beschrieben bereits 1985 eine durch ATG-vermittelte Differenzierung von normalen Knochenmarkzellen und HL-60-Zellen. Nach einer 3- bis 4-tägigen Kulturzeit wurden Kolonien mit reifen myeloiden Elementen in den mit ATG inkubierten Ansätzen im Gegensatz zu den Kontrollansätzen gefunden. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass ATG an HL-60-Zellen bindet, wodurch die Zellen zu reifen Granulozyten wurden und die Fähigkeit der Proliferation verloren haben.

Es ist somit vorstellbar, dass ATG die Differenzierung der Zellen bei Patienten mit Stammzelldefekten verbessert. Diese Eigenschaft des ATG ist möglicherweise ein Mechanismus, der hinter der hämatologischen Remission bei einigen MDS/AA-Patienten stehen könnte.

## 5.9 ATG-Wirkung auf mononukleäre Zellen von MDS-Patienten

Um einen Eindruck davon zu erhalten, welche Effekte das ATG bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen hat, wurden der Anteil apoptotischer Zellen im peripheren Blut dieser Patienten bestimmt, sowie anhand des Knochenmarkes Koloniewachstumsstudien durchgeführt.

### 5.9.1 *Kein erhöhtes Koloniewachstum bei mononukleären oder CD34+-Zellen von MDS-Patienten*

Bereits mehrfach wurden Wirkungen des ATG auf die Myelopoese (Gascon, 1985; Taniguchi, 1990) beschrieben. Wie bereits erwähnt, wurde ein direkter Effekt auf die Proliferation und Differenzierung von HL-60-Zellen und normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen gezeigt (Hunter, 1985; Huang, 1987; Huang, 1994). Darüber hinaus werden auch indirekte Mechanismen diskutiert. Hierbei wird vermutet, dass das ATG unter anderem Stromazellen dazu bringt, Wachstumsfaktoren abzugeben (Barbano, 1988; Kawano, 1988; Rameshwar, 1992). Durch seine Fähigkeit, Wachstumsfaktoren abzugeben, resultierte *in vitro* ein erhöhtes Koloniewachstum (Kawano, 1988).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Koloniewachstum von aus dem Knochenmark von MDS-Patienten isolierten mononukleären Zellen und CD34+-Zellen konnte bei den geringen Konzentrationen weder bei Thymoglobulin noch bei Lymphoglobulin eine Zunahme des Koloniewachstums beobachtet werden. Bei 100 µg/mL und 1000 µg/mL ATG zeigte sich jedoch ein vermindertes Koloniewachstum. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit den Beobachtungen von Killick (Killick, 2000c), der bei von MDS-Patienten isolierten CD34+-Zellen einen leichten Anstieg des Koloniewachstums für niedrige Konzentrationen beschrieb. Killick hatte jedoch neben dem ATG verschiedene Wachstumsfaktoren wie EPO, GM-CSF und IL-3 zu dem eingesetzten Medium hinzugefügt und somit ein klar definiertes Medium erhalten. Das in dieser Arbeit eingesetzte Medium (MethoCult H4431) enthält, da es aus konditioniertem Leukozytenmedium hergestellt ist, auch Wachstumsfaktoren, die jedoch nicht notwendigerweise optimal für das Wachstum von KM-Zellen von MDS-Patienten sein müssen. Bei höheren Konzentrationen (100 µg/mL und 1000 µg/mL ATG) wurde auch bei Killick ein inhibitorischer Effekt auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen beschrieben.

Taniguchi (Taniguchi, 1990) hingegen zeigte bei hämatopoetischen Vorläuferzellen von gesunden Knochenmarkspendern ebenfalls keine Zunahme des Koloniewachstums bei ATG-Zugabe ohne einen exogenen koloniestimulierenden Faktor.

Die hier durchgeführten Experimente lassen vermuten, dass ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren keine koloniestimulierenden Effekte des ATG auf mononukleäre und CD34+-Zellen von MDS-Patienten vorhanden sind.

Neben diesen direkten Mechanismen der ATG-Wirkung, welche vermutet werden, sollten aber auch indirekte Mechanismen in Betracht gezogen werden. So könnte es durch unterschiedliche Methoden der Zellgewinnung zu einer unterschiedlichen Reinheit der Zellen gekommen sein, so dass die eventuell vorhandenen indirekten Effekte über eine Proliferation von Stromazellen mit Wachstumsfaktorabgabe in unterschiedlich hohem Ausmaß zum Tragen kommen.

Das insgesamt geringe Koloniewachstum der Zellen bei den Experimenten dieser Arbeit könnte unter Umständen auch darauf zurückzuführen sein, dass nicht immer frisch isolierte Zellen, sondern teilweise kryokonservierte Präparate Anwendung fanden.

### *5.9.2 Nachweis eines erhöhten Anteils CD3+- oder CD34+-Zellen im peripheren Blut bei MDS-Patienten nicht möglich*

Bereits von mehreren Autoren wurden erhöhte Apoptoseraten bei hämatopoetischen Vorläuferzellen von MDS-Patienten beschrieben (Yoshida, 1995; Rajapaksa, 1996; Parker, 1998; Killick, 2000a).

Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden konnte jedoch kein erhöhter Anteil apoptotischer CD34+- oder CD3+-Zellen im peripheren Blut von MDS-Patienten nachgewiesen werden. Dies war weder bei frisch isolierten mononukleären Zellen, noch bei kryokonservierten der Fall.

## **5.10 Schlussfolgerung**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATG in malignen lymphatischen und myeloischen Zellen Apoptose auslöst, Caspasen aktiviert und die Zellproliferation apoptoseunabhängig inhibiert.

Die ATG-induzierte Apoptose konnte allerdings nicht durch Caspasen-Inhibitoren vermindert werden. Dies und die Tatsache, dass Anti-CD2 monoklonale Antikörper (von den Herstellern als wirksamer Bestandteil des ATG angegeben) bei aktivierten T-Zellen den Zelltod mit Apoptose-charakteristischen Anzeichen sogar in Anwesenheit von Breitbandspektrum Caspasen-Inhibitoren hervorgerufen haben (Mollereau, 1996; Deas, 1998; Dumont, 2000), legt die Vermutung nahe, dass es bei der ATG-vermittelten Apoptose zusätzlich Mechanismen gibt, die eine Caspasen-Aktivierung umgehen.

Ein Einfluss der hier angewandten ATG-Präparationen auf die Expression des als Apoptoseinduktor vermutete Fas/ Fas-L-System konnte ausgeschlossen werden. Des Weiteren enthielt keine der in dieser Arbeit eingesetzten ATG-Präparationen CD95-Antikörper in einer zur Apoptose ausreichenden Konzentration, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Apoptose-induzierende Wirkung des ATG nicht über CD95 vermittelt wird.

Andere Wege der Apoptoseinduktion müssen daher in Betracht gezogen werden. Zur Diskussion stehen hierbei die Apoptoseinduktion über Rezeptoren wie DR3, DR4, DR5, DR6 (TRAIL) oder TNF- $\alpha$ . Ferner ist weiterhin unklar, durch welche Antikörper und über welche Rezeptoren ATG die Apoptose vermittelt und ob diese Rezeptoren letztendlich auf den myeloischen Vorstufen und CD34+-Zellen im Knochenmark vorhanden sind.

Da die Apoptose des ATG nicht über Fas vermittelt wird, kann keine Aussage über den vermutlich betroffenen Zellklon bei MDS-Patienten gemacht werden. Würde ein Hauptmechanismus der Apoptoseinduktion durch Fas vermittelt, hätte man schließen können, dass am Krankheitsgeschehen Zellen beteiligt sind, die CD95 exprimieren, wie z. B. aktivierte B- und T-Zellen im Rahmen einer Immunreaktion.

Für den Therapieerfolg bei MDS-Patienten in frühen Stadien mit hyperzellulärem Knochenmark könnten vermutlich die differenzierenden oder antiproliferativen Eigenschaften verantwortlich sein. In den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung mit Expansion unreifer blastärer Zellen könnte die Fähigkeit des ATG, Apoptose zu induzieren, zu einer erfolgreichen Therapie beitragen.

Bei der Therapie der AA geht man unter anderem davon aus, dass die immunsuppressive Wirkung des ATG wesentlich zum Therapieerfolg beiträgt (Teramura, 1997). Durch den in dieser Arbeit gezeigten myelotoxischen Effekt des ATG stellt sich jedoch die Frage, in wieweit das ATG die hämatologische Remission der Patienten behindert. Es wurde gezeigt, dass die hämatologische Erholung von AA-Patienten nach ATG-Therapie erst ca. nach einem

Monat einsetzt (Frickhofen, 1991; Frickhofen, 2002). Dies könnte mit der Tatsache in Zusammenhang stehen, dass ATG-Spiegel noch mehrere Wochen im Serum von Patienten nachzuweisen sind (Killick, 2000c). Somit könnte der myelotoxische Effekt des ATG durchaus einen negativen Einfluss bei der Therapie von AA-Patienten haben.

Weitere Untersuchungen, ob durch ATG-Präparationen mit anderem Verhältnis von immunsuppressiver und myelotoxischer Wirkung eine bessere Ansprechrate und vor allem eine frühere Remission erreicht werden kann, erscheinen daher sinnvoll.