

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der aplastischen Anämie (AA) und den myelodysplastischen Syndromen (MDS) handelt es sich um lebensbedrohliche hämatologische Erkrankungen. Die einzige kurative Therapieform besteht derzeit in der allogenen Knochenmarktransplantation. Für Patienten, die für diese Therapieform nicht in Frage kommen (fehlender Spender, fehlende Transplantatindikation), besteht die Standardtherapie bei der AA in der immunsuppressiven Therapie, deren wichtigste Komponente Antithymozyten- (ATG) oder Antilymphozytenglobulin (ALG) ist. Im Rahmen von Studien wurde ATG bereits erfolgreich bei Subgruppen von Patienten mit *low-risk* MDS eingesetzt. Welche Antikörper in der polyvalenten Antikörper-Präparation des ATG und welche Mechanismen für die Wirksamkeit bei diesen hämatologischen Erkrankungen verantwortlich sind, ist jedoch noch unklar.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Wirkung von ATG auf die Apoptose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ATG in der Lage ist, sowohl in malignen lymphatischen als auch in malignen myeloischen Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades und Ursprungsgewebes Apoptose auszulösen. Zwar zeigten sich die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich sensibel, eine deutliche Apoptoseinduktion konnte allerdings bei den meisten untersuchten Zelllinien bei ATG-Konzentrationen von 100 µg/mL und 1000 µg/mL spätestens ab Tag 7 beobachtet werden. Die Apoptoseinduktion war unabhängig von der CD95-Expression und dem Differenzierungsgrad der Zellen.

Ein klassischer Weg der Apoptoseinduktion wird über das Fas-Rezeptor (CD95 oder APO-1)/Fas-Ligandensystem vermittelt. Um zu klären, welche Mechanismen bzw. Rezeptoren bei der ATG-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen, wurde ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Beteiligung des Fas-Rezeptor/Fas-Ligandensystem gelegt. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass die eingesetzten Chargen der ATG-Präparationen keine, mit den angewandten Methoden nachweisbare, CD95-Antikörper enthielten. Auch die Inkubation der Zellen mit ATG führte zu keiner veränderten Expression des CD95-Rezeptors auf diesen Zellen. Des Weiteren konnte weder durch Koinkubation mit einem über CD95 Apoptose-induzierenden Antikörper die Zahl apoptotischer Zellen erhöht, noch durch einen inhibierenden Antikörper die Zahl apoptotischer Zellen vermindert werden. Somit konnte das Fas-Rezeptor/Fas-Ligandensystem als Hauptmechanismus der ATG-vermittelten Apoptose ausgeschlossen

werden. Es bleibt daher weiterhin offen, über welche Bestandteile, Mechanismen und Rezeptoren die ATG-induzierte Apoptose der Zellen vermittelt wird.

Untersuchungen zur Beteiligung von Caspasen zeigten jedoch eine deutliche Aktivierung von Caspasen, insbesondere der Caspase-3. Die Caspasen-Aktivierung wurde durch mehrere unabhängige Methoden (Nachweis des zytoplasmatischen Proteins Caspase-3 und des Caspasen-Substrates PARP, Nachweis von Spaltprodukten von Caspasen (PhiPhiLux) und durch die Bindung des FITC-markierten Konjugats des irreversibeln Caspasen-Inhibitors VAD-FMK (CaspACE) an das katalytische Zentrum) bestätigt. Die Caspasen-Aktivierung zeigte, dass es sich bei dem ATG-induzierten Zelltod um Apoptose handelt. Durch Koinkubation mit einem Caspasen-Inhibitor (Z-DEVD-FMK) konnte jedoch keine Reduzierung des Anteils ATG-induzierter apoptotischer Zellen erreicht werden. Dies könnte durch nicht ausreichende Hemmung aller involvierten Caspasen durch Z-DEVD-FMK bedingt sein oder auf die Beteiligung Caspasen-unabhängiger Mechanismen bei der ATG-induzierten Apoptose hinweisen.

Durch Koinkubationsexperimente mit ATG und Etoposid zeigten sich keine Veränderungen der Apoptoseraten der Zellen. Ebenso wurde keine Veränderung des Anteils ATG-induzierter apoptotischer Zellen durch Koinkubation G-CSF und Cyclosporin A, die vor allem in der Therapie der AA in Kombination mit ATG eingesetzt werden, erreicht.

In den durchgeführten Proliferationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass ATG nicht nur zur Apoptose der Zellen führt, sondern auch zu einer apoptoseunabhängigen Proliferationsinhibition. Diese könnte sowohl durch Wachstumsinhibition als auch durch Differenzierung bedingt sein.

Aufgrund der mehrfach in der Literatur beschriebenen wachstumsstimulierenden Effekte des ATG wurden mit mononukleären Knochenmarkzellen von MDS-Patienten Langzeit-Koloniewachstumsstudien durchgeführt. Ein erhöhtes Koloniewachstum pluripotenter Knochenmarkvorläuferzellen mit Bildung von erythrozytären, granulozytären sowie pluripotenten gemischten Kolonien bei Zugabe von ATG konnte nicht beobachtet werden.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene myelotoxische und antiproliferative Effekt des ATG ist im Rahmen der Therapie der MDS durchaus positiv zu werten. Fraglich ist jedoch, ob nicht die apoptoseinduzierende Wirkung des ATG eine schnelle hämatologische Remission bei der AA verhindert.

Auf der Basis dieser Daten erscheint die Entwicklung von ATG-Präparationen mit unterschiedlichen Verhältnissen hinsichtlich immunsuppressiver und direkt myelotoxischer/antiproliferativer Wirkung sinnvoll. Präparate mit hoher myelotoxischer/antiproliferativer Wirkung würden sich für die Prüfung bei MDS, Präparate mit geringen myelotoxischer Wirkung und ausgeprägter immunsuppressiver Wirkung dagegen zur Prüfung bei AA anbieten.