

**Aus der Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des
Onkologischen Zentrums am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel R. Zander

**Zytotoxizität polyklonaler Antithymozytenglobuline an Zellen der
Chronischen Lymphatischen Leukämie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Nabil Al-Atassi

geboren in: Lüdenscheid

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am: 19.01.2010

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. med. Francis Ayuketang

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Nikolaus Kröger

Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL) bleibt trotz der weit reichenden Fortschritte in ihrer Behandlung mit den bisher bekannten Standardtherapien unheilbar. Ein kurativer Therapieansatz für Patienten mit CLL ist die allogene Stammzelltransplantation. Polyklonale Antithymozytenglobuline (ATG) werden unter anderem aufgrund ihrer Anti-T-Zell-Aktivität für die Konditionierung bei der allogenen Stammzelltransplantation verwendet. ATG enthalten jedoch auch Antikörper, die Antigene auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, darunter B-Zellen, binden. Die in-vitro Zytotoxizität von ATG gegen B-Zell Malignome wurde bereits für das Multiple Myelom gezeigt. Diese Arbeit untersucht die in-vitro Anti-CLL Aktivität zweier kommerziell erhältlicher ATG-Präparate in klinisch relevanten Konzentrationen (10 – 500µg/ml) in CLL Proben von insgesamt 19 Patienten. Weiterhin wird die in-vitro Anti-CLL Aktivität von ATG mit derzeit in der Klinik für die CLL verwendeten monoklonalen Antikörpern Alemtuzumab und Rituximab verglichen. Ein eventueller synergistischer Effekt mit dem Purinanalogon Fludarabin wird untersucht. Fludarabin ist ein Standardpräparat und Eckpfeiler in der Therapie der CLL. Weiterhin werden potentielle Wirkmechanismen der Anti-CLL-Aktivität von ATG untersucht. Durch die Adsorption von ATG auf verschiedenen Zellen soll der Grad der spezifischen Wirkung von ATG auf CLL-Zellen herausgestellt werden.

Inhalt

I. Einleitung	7
I.1 Chronische Lymphatische Leukämie	7
Ätiologie	7
Pathogenese	8
Einteilung	8
Diagnose	10
Klinik	10
I.2 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie	11
Die konventionelle Therapie der CLL	12
Monoklonale Antikörper in der Therapie der CLL	13
Autologe Stammzelltransplantation	15
Allogene Stammzelltransplantation/Knochenmarktransplantation	16
I.3 Wichtige Wirkmechanismen bei der Therapie der CLL	17
Komplement-vermittelte Zytotoxizität	17
Antikörper-vermittelte Zytotoxizität	18
Apoptose	19
I.4 Fazit	23
I.5 Antithymozytenglobuline	23
I.6 Fragestellung der Arbeit	26
II. Material und Methoden	27
II.1 Material	27
Reagenzien und Chemikalien	27
Lösungen, Puffer und Medien	28
Medien	28
Zellen und Zelllinien	29
Plastikware	30
Geräte	31
II.2 Isolierung von CLL-Zellen aus Vollblut mittels Ficoll-Trennung	32
II.3 Gewinnung von Komplement-haltigem Serum aus Vollblut mittels Zentrifugation	33
II.4 Gewinnung von T-Zellen aus peripherem Blut durch Isolierung mit Antikörper-Cocktail und anschließender Dichtegradzentrifugati	33
II.5 Zellkultur	34
II.6 Durchführungs-Protokolle	34

II.7	Durchflußzytometrie (FACS-Analyse).....	44
II.8	Statistische Auswertung	44
III.	Ergebnisse.....	45
III.1	ATG induziert <i>Komplement-unabhängige</i> Zytotoxizität in primären CLL-Zellen.....	45
III.2	Vergleich von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin®	47
III.3	Vergleich der <i>Komplement-abhängigen</i> und der <i>Komplement-unabhängigen</i> Wirkung von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin®	50
III.4	ATG und Alemtuzumab induzieren vergleichbare, <i>Komplement-abhängige</i> Zytotoxizität in primären CLL-Zellen	51
III.5	ATG induziert stärkere Komplement-unabhängige Zytotoxizität als Alemtuzumab in primären CLL-Zellen	52
III.6	ATG induzieren stärkere Komplement-abhängige und Komplement-unabhängige Zytotoxizität als Rituximab	54
III.7	Die Anti-CLL Zytotoxizität von ATG ist stärker als die bei Myelomzellen beobachtete Zelltoxizität.	55
III.8	Der synergistische Effekt von ATG in Kombination mit Fludarabin bei CLL Zellen.....	56
III.9	Die ATG-induzierte, <i>Komplement-abhängige</i> Zytotoxizität wird von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt.....	57
III.10	Die Rolle der Nicht-T-Zell-Antikörper beim Anti-CLL Effekt von ATG.....	59
IV.	Diskussion	62
IV.1	Therapieansätze für die CLL.....	62
IV.2	Antithymozytenglobuline	65
	Antithymozytenglobuline im Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper Alemtuzumab.....	65
	Antithymozytenglobuline im Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab	66
	ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® im Vergleich.....	66
	Der synergistische Effekt von ATG in Kombination mit Fludarabin bei CLL Zellen	67
	Die Rolle spezifischer Antikörper für den Anti-CLL Effekt von ATG	67
	Mechanismen der Zytotoxizität von ATG	68

Wirkung der ATG bei der CLL im Vergleich zur Wirkung beim Multiplen Myelom	70
Die Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	70
IV.3 Ausblick auf eine mögliche klinische Anwendung von Antithymozytengloulin.....	71
V. Zusammenfassung	73
Literatur	75
Danksagung	85
Curriculum vitae.....	86
Erklärung	87

I. Einleitung

I.1 Chronische Lymphatische Leukämie

Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL) zählt zu den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen [1]. Durch ungehemmte Vermehrung, sowie (als Besonderheit der CLL) verminderter Apoptose kommt es zur Akkumulation eines malignen Lymphozytenklons [2], sowie zur Streuung ins Blut und Infiltration von Knochenmark, Lymphknoten und Milz und zur Verdrängung immunkompetenter Lymphozyten. Bei mehr als 95% der Fälle handelt es sich um B-Lymphozyten, selten nur um T-Lymphozyten (ca.5%) [3].

Die CLL ist in der westlichen Welt mit rund 30% die häufigste aller Leukämien im Erwachsenenalter [4]. Die Inzidenz liegt bei etwa 2,2-3,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner [5].

Ätiologie

Von der Entartung sind bei der CLL meist reife B-Zellen betroffen. Ihre Vermehrung resultiert aus einer verminderten Apoptose, deren Ursache bislang nicht ganz geklärt ist. Seit den 80er Jahren sind immer mehr genetische Aberrationen bekannt geworden, die in der Pathogenese und Prognose der CLL eine Rolle spielen, u.a die Trisomie 12 [6], 6q21 -, 13q14 -11q22/23 -, 14q32 (IgH-Schwerkettengene), 17p13 (p53 Tumorsuppressor-Gen) [7]) mit unterschiedlichen Prognosen und klinischen Charakteristika [8,9]. Bei 1-4 % der B-CLL Patienten findet sich eine Translokation des BCL-2 Gens (anti-Apoptose-Gen) auf Chromosom 18q21, die zu einer Überexpression von BCL-2 Proteinen führt. [2,10]. Weiterhin ist eine reduzierte Expression von Bax, einem pro-apoptotischen Protein aus der BCL-2 Familie mit einer schlechten Prognose verbunden [11]. Döhner et al. fanden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) heraus, dass bei insgesamt über 80% der Patienten chromosomale Auffälligkeiten bestehen [7]. CLL-Patienten mit normalem Karyotyp haben einen deutlich höheren Überlebensmedian [12].

Pathogenese

Die bei der CLL klonal proliferierenden reifen B-Zellen sind atypisch und immuninkompetent [3]. Sie koexprimieren an der Oberfläche in niedriger Dichte CD5, ein Antigen, das sonst nur von T-Zellen exprimiert wird zusammen mit monoklonalen Immunglobulinen, meist IgM und nur einem Leichtkettenglobulin (Kappa oder Lambda) [3, 13]. Stimuliert werden die B-CLL Zellen möglicherweise über den B-Zell-Rezeptor durch B-Zell-Superantigene [14]. Eine neue Hypothese ist, dass sowohl die Proliferation der CLL-Zellen, als auch die verminderte Apoptose durch Stimulations- und Wachstumssignale am B-Zell Rezeptor im Zusammenhang mit Interaktionen mit akzessorischen Zellen und Zytokinen aus der Umgebung, verursacht wird [15,16].

Die neoplastischen Zellen haben eine erheblich verlängerte Überlebenszeit: dadurch kommt es zur Akkumulation in immunkompetenten Organen wie Lymphknoten und Milz. Blut, Knochenmark und gar die Leber können betroffen sein. Ursache für die verlängerte Lebenszeit ist eine Hemmung der Apoptose [2].

Einteilung

Für die CLL existieren zwei verschiedene Einteilungen. Beide beruhen auf der Tatsache, dass die CLL langsam progredient verläuft.

Die Einteilung nach Rai et al. aus dem Jahre 1975 stützt sich auf die Zahl der Lymphozyten im Blut (Tabelle I.1) [17].

Stadium	Definition	Mittlere Überlebenszeit in Monaten
0	Lymphozytose >15.000/ μ l Knochmark-Infiltration >40%	150
I	Lymphozytose mit Lymphknotenvergrößerung	100
II	Lymphozytose mit Splenomegalie und/oder Hepatomegalie	71
III	Lymphozytose mit Anämie (+/- Hepatosplenomegalie oder Lymphknotenvergrößerung)	19
IV	Lymphozytose mit Thrombozytopenie < 100.000/ μ l (+/- Hepatosplenomegalie oder Lymphknotenvergrößerung)	19

Tabelle I.1: Stadieneinteilung der CLL nach Rai et al., 1975 [aus 18]

Die Einteilung nach Binet et al. aus dem Jahre 1981 orientiert sich sowohl an der Lymphozytenzahl als auch an der Anzahl der infiltrierten Lymphknotenregionen, sowie am Hämoglobinwert (Tabelle I.2) [19].

Stadium	Definition	Mittlere Überlebenszeit in Monaten
A	Lymphozytose <3LK-Regionen, Hb >10g/dl Thrombozyten >100000/ μ l	> 120
B	>3LK-Regionen, Hb >10g/dl Thrombozyten >100000/ μ l	60
C	Hb >10g/dl und Thrombozyten >100000/ μ l	24

Tabelle I.2: Stadieneinteilung der CLL nach Binet, 1981 [aus 18]

Beide Einteilungen sind nach wie vor Eckpfeiler in der klinischen Beurteilung des Krankheitsstadiums der CLL. Chiorazzi et al. sehen allerdings eine Schwäche bei der Differenzierung in frühen Krankheitsstadien (Rai Stadium 0 und I, Binet Stadium A) [15].

Diagnose

Die Diagnose einer Chronischen lymphatischen Leukämie erfolgt oft zufällig bei einer Routineuntersuchung mit Blutbildkontrolle. Dabei findet sich im Blutbild fast immer eine Lymphozytose von $> 5 \times 10^9$ Lymphozyten/l. Im Differentialblutbild finden sich dann ebenfalls vermehrt kleine, reife Lymphozyten, die beim Ausstrich wegen Ihrer Instabilität häufig platzen und dann als sogenannte „Gumprecht’sche Kernschatten“ imponieren [8]. Der Beweis einer CLL wird jedoch per Immunphänotypisierung aus peripherem Blut erbracht. Hierbei werden auf den B-Zellen spezielle Oberflächenantigene (CD5, CD19, CD20, CD23 und CD79b) nachgewiesen, oft in charakteristischen Kombinationen wie CD5, CD23 und CD79b. Ebenfalls exprimiert werden membranständige Immunglobuline wie IgM und IgG (meist IgM). Durch ein von Matutes et al. entwickeltes „scoring“-System, welches auf der Detektion von 5 Antigenen (SigM, CD5, CD23, CD79b, FMC7) basiert, kann die CLL von anderen Non-Hodgkin Lymphomen abgegrenzt werden. [4]

Klinik

Die Chronische Lymphatische Leukämie hat eine extrem variable klinische Ausprägung und beginnt oft asymptomatisch. [20]. Erste Symptome sind meist zervikale Lymphknotenschwellungen (bei 70-80% der Patienten) [21,22] begleitet von Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Leistungsminderung. Nach Diagnosestellung imponieren klinisch vor allem die progrediente Lymphknotenschwellung, Splenomegalie (47%), Vergrößerung der Leber (45-75%) und Hautinfiltrationen. Entscheidend für die Therapie sind die auftretenden Komplikationen: Granulozytopenie und Antikörpermangelsyndrom können bei der CLL zu gehäuften Infekten wie Pneumonien und Sepsis führen. Häufig sind infektiöse Komplikationen auch durch die Gabe von Chemotherapeutika wie Purinanaloga und Alkylantien bedingt. Sie stellen die häufigste durch die CLL bedingte Todesursache dar [23-25]. Eine Therapieindikation sind Leukozytenzahlen $> 500.000/\mu\text{l}$. Kommt es zur Leukozytose, kann ein zelluläres Hyperviskositätssyndrom auftreten [26].

Eine weitere Komplikation der CLL sind Autoimmunerscheinungen:

- Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA)
- Idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP)
- Pure red cell aplasia (PRCA)

Im Vordergrund steht die AIHA. Etwa 11% der Patienten im fortgeschrittenen Stadium der CLL entwickeln eine Coombs-positive Hämolyse. Ihr Auftreten ist daher wegweisend für die Therapieentscheidung [27]. In seltenen Fällen möglich ist die als Richter-Syndrom (RS) bezeichnete Transformation in ein höher malignes Non-Hodgkin-Lymphom (3%), ein Hodgkin-Lymphom (0,5%) oder ein Plasmozytom (0,1%) [28]. Mögliche Trigger für ein RS könnten genetische Abberationen (Trisomie 12, 11q-Deletionen), sowie eine Epstein-Barr-Virus Infektion sein. Bei Transformation in ein höher malignes Non-Hodgkin-Lymphom ist die Prognose ungünstig, da die meisten Patienten nicht auf die darauffolgende Chemotherapie ansprechen [29]. Die CLL ist im Verlauf eine sehr heterogene Erkrankung: manche Patienten leben jahrelang ohne jegliche Therapie, andere sterben rasch nach fulminantem Verlauf trotz aggressiver Therapie [14].

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine durchgreifende Therapiestruktur für die CLL. Eine solche Therapiestruktur zu finden, ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. In dieser Arbeit werden zwei bekannte für die Behandlung der aplastischen Anämie und für die allogene Organ – und Stammzelltransplantation zum Teil bereits zugelassene polyklonale Antithymozytenglobuline (ATG) *in-vitro* auf ihre Wirkung auf die CLL hin überprüft.

I.2 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie

Obwohl sich die Mehrzahl der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose im asymptomatischen Zustand befindet, werden die meisten später aufgrund der fortschreitenden Erkrankung eine Therapie benötigen.

Therapieindikationen sind Leukozytose ($> 500.000 /\mu\text{l}$), Knochenmarkinsuffizienz, Thrombozytopenie oder Anämie.

Die konventionelle Therapie der CLL

Die ersten Medikamente, die bei der CLL zum Einsatz kamen, waren Alkylantien (Chlorambucil, Cyclophosphamid) und Glukokortikoide (Prednisolon) [30]. Alkylantien wie Chlorambucil oder Cyclophosphamid (häufig kombiniert mit Glukokortikoiden) werden auch heute noch bei der CLL verwendet. Die Zielsetzung ist dabei stets palliativ [31].

Die Einführung des Purinanalogs Fludarabin brachte eine deutliche Progressionsminderung mit gleich langem Überleben bei verbesserten Ansprechraten [32,33]. Ein weiterer wirksamer Ansatz für die CLL ist die autologe Stammzelltransplantation (Auto-SZT). Allerdings entwickeln die meisten Patienten im Verlauf ein Rezidiv [34]. Bei jüngeren Patienten gibt es die Möglichkeit einer allogenen Blutstammzelltransplantation (Allo-SZT) oder Knochenmarktransplantation (Allo-KMT) mit vorausgehender Hochdosischemotherapie [35]. Die Dosis-reduzierte Konditionierung (Reduced-Intensity-Conditioning, RIC) profitiert von der Spender-gegen-Leukemie – Reaktion (Graft-versus-Leukemia reaction) und umgeht dabei die hohe behandlungsassoziierte Morbidität und Mortalität, welche sonst mit myeloablativen Therapieschemen einhergehen [36]. Insgesamt stehen für die CLL mehrere Schemata für Kombinationstherapie zur Verfügung. Diese brachten signifikant bessere Ansprechraten, jedoch konnte kein Schema eine generelle Überlebensverbesserung zeigen [37].

Fludarabin

Das Purinanalogon Fludarabin (9- β -d-arabinofuranosyl-2-fluoro-adeninmonophosphat) ist ein wirksames Apoptose-induzierendes Medikament zur Behandlung der Chronischen Lymphatischen Leukämie. Für die Darreichung liegt es als Fludarabinmonophosphat vor. Im Körper wird es zügig in seine Fludarabin-Nukleosidform F-Ara-A überführt, gelangt so in die Zelle und wird dort in F-Ara-ATP, einen aktiven Metaboliten für Zellenzyme, umgewandelt [38]. Hauptsächliche Wirkweise ist dann die zytotoxische Aktivität durch Inhibition der DNA-Synthese, aber auch andere Mechanismen wie die Inhibierung der RNA-Transkription und die

Induktion von Apoptose in CLL-Zellen wurden in verschiedenen Studien nachgewiesen [39,40]. Auch in klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Fludarabin bei der CLL gezeigt werden. So konnten bei vorher mit anderen Zytostatika behandelten CLL-Patienten (n=68) zwischen 50% und 64% (Rai Stadium 0-4) Remissionen erreicht werden (darunter 44% Komplettremissionen) [41]. Johnson et al. verglichen Fludarabin mit einer Kombination aus Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednisolon in einer Studie mit 196 Patienten mit CLL in klinisch fortgeschrittenen Stadien (Binet B oder C). Die Ansprechraten unter Fludarabin waren mit 60% im Vergleich zu 44% deutlich höher [32]. Ebenfalls im Vergleich zu Chlorambucil konnte Fludarabin signifikant höhere Ansprechraten (63% versus 37%, davon 23-37% Komplettremissionen) erzielen [33]. Patienten, die nicht auf Fludarabin ansprechen, haben eine sehr schlechte Prognose mit einem Überlebensmedian von nur rund 8 Monaten [42].

Monoklonale Antikörper in der Therapie der CLL

Charakteristisch für CLL-Zellen ist das Expressieren der B-Zell Antigene CD5, CD19, CD20, CD23 und CD52. Gegen nahezu jedes stehen heute monoklonale Antikörper zur Verfügung. (Tabelle I.3) Allerdings sind nur zwei bisher für die Klinik zugelassen: Alemtuzumab und Rituximab [43]. Mit der Einführung der monoklonalen Antikörper haben sich die Therapiemöglichkeiten der CLL weiter verbessert und erweitert [37]. Meist werden sie in Kombination mit Fludarabin und Cyclophosphamid oder Chlorambucil gegeben, können aber auch durchaus als Monotherapien wirksam sein. Im Folgenden wird zunächst auf die Antikörper Rituximab und Alemtuzumab und ihre Verwendung in der Therapie der CLL eingegangen. Anschließend werden Wirkmechanismen von Antikörpern beschrieben, die zum Zelltod führen.

Antikörper	Ziel-Antigen	Zulassungsstatus im den USA (2005)
Alemtuzumab	CD52	zugelassen
Rituximab	CD20	zugelassen
Lumiliximab (IDEC-152)	CD23	Phase I
hA20s	CD20	Phase I
Bevacicumab	VEGF	Phase II

A

Tabelle I.3: monoklonale Antikörper für die CLL. (aus Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. Cancer Immunol Immunother 2006. 55: 188-196)

Rituximab

Rituximab war der erste für die Behandlung von B-Zell-Lymphomen zugelassene, monoklonale Antikörper. Es handelt sich um einen chimären Maus/-Mensch IgG1-Antikörper, der an das Antigen CD20 bindet.

Rituximab induziert Apoptose über einen CD20-vermittelten, MAP-Kinase (P38-Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase) abhängigen Signalweg [44].

Byrd et al fanden *in-vivo* einen Anstieg der Caspasen 3- und 9 direkt nach der Infusion von Rituximab. Ebenfalls fiel ein signifikanter Abfall der anti-apoptischen Proteine XIAP und Mcl-1 auf. Dies könnte eine Erklärung für die gute Synergie von Rituximab mit Chemotherapeutika wie Fludarabin sein [45]. Diese wurde in jüngst durchgeführten Studien bestätigt. Schulz et al behandelten 31 CLL-Patienten (20 zuvor unbehandelt, 11 im Rezidiv befindlich) mit einer Kombination aus Rituximab und Fludarabin und erreichten eine gute Gesamtansprechrate von 87%. 32 % erreichten gar eine Komplettremission [46]. Byrd et al. bestätigen diese Ergebnisse mit einer retrospektiven Vergleichsstudie. Getestet wurde die Behandlung mit Fludarabin mono versus Fludarabin + Rituximab. Letztere Kombination erzielte deutlich bessere Gesamtansprechraten [47]. Trotz dieser guten Ergebnisse einiger Studien, konnte Rituximab in der first-line Therapie keine durchschlagende Wirkung zeigen [48-50]. Ein Grund für die eingeschränkte Wirkung als Einzelmedikament bei der CLL könnte die niedrigere Dichte von CD20 Antigenen auf CLL-Zellen zum einen im Vergleich zu anderen Non-Hodgkin Lymphomen und zum anderen im Vergleich zur CD52 Dichte auf CLL Zellen sein [50].

Alemtuzumab

Alemtuzumab (Campath-1H) ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, der an das Antigen CD52 bindet, welches sich auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen und Eosinophilen befindet [51].

In-vivo ist die Wirkung von Alemtuzumab erwiesen: Keating et al. beobachteten in einer großen, multizentrischen Studie (n=93), dass 33% (2% partielle Remission, 3% komplette Remission) der behandelten CLL-Patienten, bei denen weder mit Alkylanzien, noch mit Fludarabin eine Wirkung erzielt werden konnte, auf Alemtuzumab ansprachen [52]. Auch in der first-line Therapie der CLL scheint Alemtuzumab wirksam zu sein. So zeigte eine aktuelle Phase II –Studie eine Gesamtansprechrate von 87%, Komplettremission wurde bei 18% der Patienten erreicht [53]. Diese Erkenntnisse zeigen, dass Alemtuzumab eine potente und effektive Behandlungsmethode darstellt [54]. Alemtuzumab wurde 2001 von der European Medicines Agency (EMA) für die CLL zugelassen.

In-vitro konnte der Wirkmechanismus von Alemtuzumab untersucht werden: Nüchel et al stellten mit Durchflußzytometrie in B-Zellen von CLL-Patienten fest, dass Alemtuzumab in mononukleären Zellen zwar Apoptose induzieren kann, allerdings nicht allein: der Effekt ist nur durch die Anwesenheit quervernetzender Anti-Fc-Zweitantikörpers möglich. Verstärkt wird er durch Kombination mit Fludarabin [55-57].

Autologe Stammzelltransplantation

Für die autologe Stammzelltransplantation (Auto-SZT) werden Stammzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut vom Patienten selbst gewonnen und nach Durchführung einer Hochdosis Chemotherapie reinfundiert. Für die CLL konnten hier gute Ergebnisse erzielt werden: so zeigten Dreger et al. 2004 in einer Patientenstudie (n=88, Patientenkollektiv mit unmutiertem V_H-Genstatus, CLL im fortgeschrittenen Stadium), dass die Auto-SZT im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie (Chlorambucil mit oder ohne Fludarabin) zu einer deutlich

längeren Überlebenszeit führt [58]. Auto-SZT führt also zu langanhaltenden Remissionen mit einer relativ niedrigen Transplantations-assoziierten Mortalitätsrate (<10%). Dennoch zeigten frühere Studien, sowie die Langzeitbeobachtung dieser Patienten, dass ein Großteil der Komplettremissionen nach Auto-SZT dennoch in ein Rezidiv mündet und die Auto-SZT nicht als kurativer Ansatz zu betrachten ist [58-61].

Allogene Stammzelltransplantation/Knochenmarktransplantation

Bei der allogenen Stammzelloperation (Allo-SZT) werden den Patienten nach myeloablativer oder nicht-myeloablativer Radio-/Chemotherapie Stammzellen eines HLA-identischen Spenders transplantiert. Initial waren die Ergebnisse bei der Allo-SZT mit einer hohen, nicht rezidivbedingten Mortalitätsrate von bis zu 46% enttäuschend. Ansprechraten von 79-87% lassen jedoch hoffen, dass die Allo-SZT kuratives Potential bei Patienten mit CLL haben könnte. Dennoch bleiben Mortalität und Morbidität im Zusammenhang mit der Behandlung beachtlich hoch (18-100%) [59,62-67]. Michallet et al. untersuchten den Effekt der allogenen Knochenmarktransplantation bei einer großen retrospektiven Kohortenstudie (n=54). Nach myeloablativer Behandlung mit Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung wurden den Patienten Knochenmark von HLA-identischen Geschwistern transplantiert. Dabei zeigten 70% eine hämatologische Remission bei einer drei Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 46% [62]. Die Potenz der Allo-SZT fußt möglicherweise auf einem Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt [68]. Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation wurden kürzlich im „Transplant-consensus“ der EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) zusammengestellt. Demnach kommen für eine Allo-SZT vor allem jüngere Patienten,

- die auf eine Behandlung mit Purinanaloga nicht oder nur ungenügend ansprechen (frühes Rezidiv innerhalb von 12 Monaten)
- die nach initialem Ansprechen auf Purinanaloga-haltige Kombinationstherapien oder Auto-SZT innerhalb von 24 Monaten ein Rezidiv entwickeln

- mit p53 Abnormalitäten

in Frage. Die allogene SZT ist nach wie vor der einzige kurative Ansatz in der Therapie der CLL. Dennoch muss sie weiterhin in Studien auf ihre genaue Indikation und Effektivität hin untersucht werden [69].

I.3 Wichtige Wirkmechanismen bei der Therapie der CLL

Die verschiedenen bei der Therapie der CLL verwendeten Substanzen vermitteln ihre Wirkung über verschiedene Wirkmechanismen und Signalwege. Die meisten sind bis jetzt nicht bis ins Detail verstanden. Von Bedeutung für diese Arbeit sind vor allem die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (complement-dependent-cellular-cytotoxicity, CDC), die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity, ADCC) und für die Apoptose relevante Proteine wie die Caspasen und Cathepsine sowie Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS).

Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Zent et al. fanden in einer Studie mit dem monoklonalen Antikörper Alemtuzumab heraus, dass dieser nur wenig oder keine Apoptose bei CLL Zellen induziert, wenn die CLL Zellen in Serum freiem Medium kultiviert werden [70]. 2008 zeigte dieselbe Arbeitsgruppe dann den Effekt der Komplement-vermittelten Zytotoxizität (complement-dependent-cellular-cytotoxicity, CDC) an CLL Proben, die mit dem monoklonalen Antikörper Alemtuzumab und 10 % humanem Serum inkubiert wurden. Dieser Effekt setzte innerhalb kurzer Zeit ein [71]. Die CDC wird vermutlich über Komplement-Komponenten vermittelt, die sich an Antigen-Antikörper-Komplexen anlagern und sogenannte Immunkomplexe bilden. Diese bilden dann Angriffs-Komplexe an der Zellmembran (membrane attack complex), die Poren in der Zellmembran erzeugen und so zytotoxisch wirken [72].

Antikörper-vermittelte Zytotoxizität

Die Wirkung monoklonaler Antikörper gegen Leukämien und Lymphome wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen, doch die Vermittlung der Zelltoxizität *in-vivo* ist nach wie vor Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [73-75]. Die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity, ADCC), also die Erkennung einer antigen-präsentierenden Zelle und deren anschließende Lysierung über eine Effektorzelle gehört zu den wichtigsten Zelltötungsmechanismen monoklonaler Antikörper. Die Wirkung therapeutischer Antikörper kann über die Aktivierung sogenannter Fas-„Todesrezeptoren“ also über den extrinsischen Apoptose-Signalweg (siehe unten), über die direkte Induktion von Apoptose oder die Blockierung von Rezeptor-vermittelten Wachstumssignalen erfolgen (Abb.I.1) [73]. Effektorzellen der ADCC sind vor allem natürliche Killerzellen (natural killer cells/NK-Zellen), die unter anderem durch Interleukin-2 als Zytokin aktiviert werden [76].

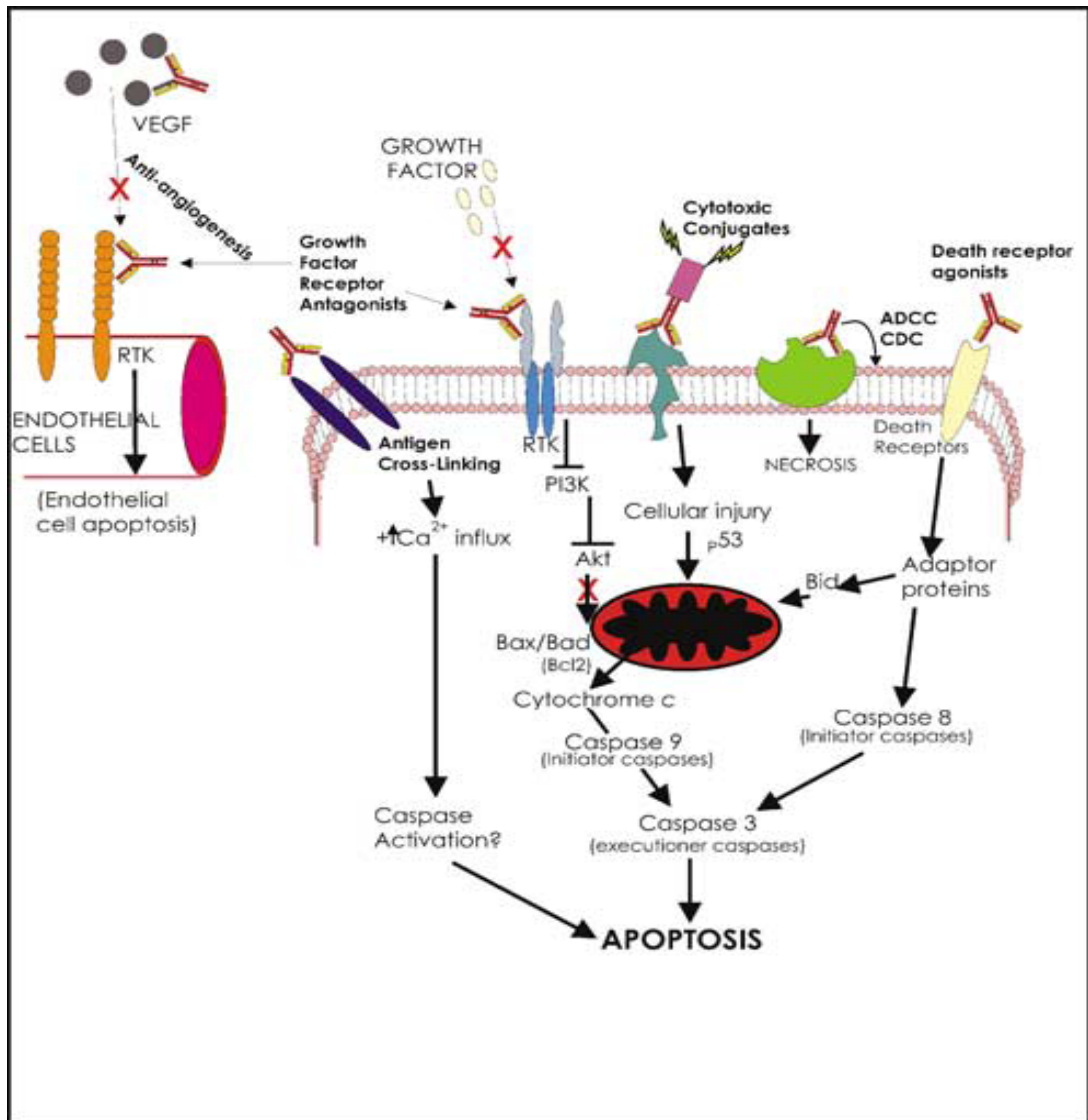


Abbildung I.1: Signalwege von Antikörpern, die zur Apoptose-Induktion führen können (aus Ludwig DL, Pereira DS, Zhu Z, et al. Monoclonal Antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene*. 2003, 22: 9097-9106)

Apoptose

Als Apoptose (griechisch: *ἀπόπτωση*, das Abgehen, der Niedergang) bezeichnet man einen physiologischen, genetisch kodierten Vorgang zur Eliminierung von Zellen [77]. Im gesunden Organismus ist das Verhältnis zwischen Zellproliferation und Apoptose geregelt. Eine Störung dieser Balance kann schwerwiegende Folgen haben: so ist eine Suppression der Apoptose mitentscheidend für die maligne Transformation von Zellen [78]. Verminderte Apoptose ist auch bei der CLL Ursache für die Akkumulation des malignen B-Zellklons (siehe I.1). Verantwortlich dafür kann die

Inaktivierung pro-apoptotischer Gene sein, die zu einer verminderten Expression eines pro-apoptotischen Proteins (z.B. Bax) führt. Eine weitere Ursache kann die Überexpression anti-apoptotischer Faktoren und damit verbunden die erhöhte Präsenz anti-apoptotischer Proteine wie BCL-2 sein [79]. Je nach auslösendem pro-apoptotischem Reiz kann die Apoptose über verschiedene Signalwege aktiviert werden. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen extrinsischem (z.B. TNF und CD95 getriggert) und intrinsischem (z.B. p53 getriggert) Signalweg [80]. Der Extrinsische oder Zytoplasmatische Signalweg wird über einen externen Stimulus ausgelöst und über den Fas-Rezeptor (sogenannter Todesrezeptor) getriggert (siehe Abb.I.2). Der intrinsische Signalweg wird auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet. Schlüsselregulatoren des intrinsischen Signalwegs sind die Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie (Tabelle I.4). Die Überexpression von BCL-2 wird in vielen malignen Erkrankungen (darunter auch die Chronische Lymphatische Leukämie) gefunden und spielt ebenfalls eine Rolle für die Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie [81]. Anti-apoptotische BCL-2 Proteine verhindern die Apoptose, indem sie die Freisetzung von Cytochrom-c blockieren. Pro-apoptotische BCL-2 Proteine fungieren hingegen als Promotoren. Welcher dieser Effekte greift, hängt im Wesentlichen von der Balance aus BCL-2 und Bax ab (Rheostat-Modell) [82].

Die BCL-2 Familie	
Pro-apoptotische Mitglieder	Anti-apoptotische Mitglieder
Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Nbk/Bik, Bim, Hrk	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1

Tabelle I.4: Die BCL-2 Familie (aus Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: BCL-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukemia. Immunology. 2005, 114: 441-449)

Eine wichtige Rolle für die Induktion der Apoptose spielen die Caspasen.

Funktion der Caspasen in der Apoptose

Der Begriff „Caspasen“ steht für „Cystein-abhängige-Aspartat-spaltende Proteasen“. Caspasen umfassen eine Familie intrazellulärer Cystein-Proteasen und sind von zentraler Bedeutung für die Apoptose. Die humane Caspasenfamilie beinhaltet elf Mitglieder, von denen aber nur sieben (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10) in die Apoptose involviert sind [83]. Caspase-2, -8, -9 und -10 sind in der Initiationsphase der Apoptose aktiv, Caspase-3, -6, und -7 sind Effektor-Caspasen [84]. Da Caspasen proteolytische Wirkung haben, werden sie als inaktive Proenzyme synthetisiert und müssen aktiviert werden. Diese erfolgt autokatalytisch oder durch andere Proteasen [85]. Die Aktivierung der Caspasen bildet die gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs, welche im Zelltod ihren Abschluss findet [86].

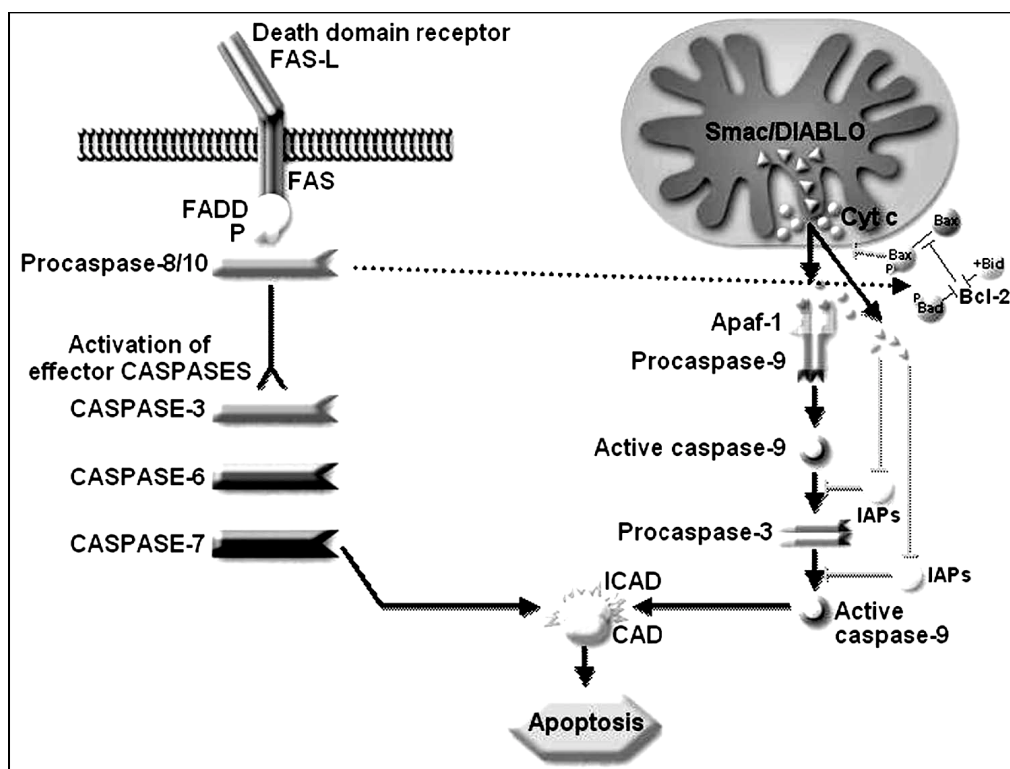


Abbildung I.2: Induktion der Apoptose. Die Apoptose wird über zwei Signalwege vermittelt, extrinsischer und intrinsischer Signalweg. Der extrinsische Signalweg wird über den FAS-Todesrezeptor getriggert, der intrinsische hauptsächlich über den Transkriptionsfaktor p53. Beide Signalwege laufen in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen, in die Caspasen involviert sind, die regulatorische Moleküle und Strukturproteine spalten, was zum programmierten Zelltod führt. (Abbildung aus [87])

Cathepsine in der Apoptose

Cathepsine gehören wie die Caspasen zu den Cysteinproteasen und sind in den Lysosomen der Zelle lokalisiert [88]. Die Cathepsin-Familie umfasst zahlreiche Mitglieder wie Cathepsin-B, -D, -W, -L, -H, -F, -C, -O und -S. Cathepsin-B und -D kommen am häufigsten in den Lysosomen vor und werden deshalb hier besonders erwähnt. Beiden Cathepsinen werden (unter anderem auf Grund ihrer Stabilität bei zytoplasmatischem pH-Wert) Funktionen bei der Apoptose zugesprochen, so wird Cathepsin-B eine Mediator-Funktion bei FAS-induzierter Apoptose, also im extrinsischen Signalweg zugeschrieben [89]. Im Lysosom liegen Cathepsine in aktiver Form vor, können aber während der Apoptose ins Zytosol gelangen. Hierfür muss aber die lysosomale Membran permeabilisiert werden. Verantwortlich dafür sind unter anderem wahrscheinlich Reaktive Sauerstoffspezies (Reaktive Oxygen Species/ ROS) [90].

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species/ROS, z.B. H_2O_2) sind molekulare Sauerstoffderivate. Im Organismus entstehen sie zumeist bei der oxidativen Phosphorylierung als Nebenprodukt der Atmungskette im Mitochondrium. Bei Überproduktion von ROS kommt es zum sogenannten „oxidativen Stress“ [91]. ROS kann die innere Mitochondrienmembran so schädigen, dass durch den Eintritt von H_2O in den Zwischenmembranraum die äußere Membran platzt: es kommt zur Apoptose [92]. Dass ROS auch Lysosomen destabilisieren und damit Apoptose indizieren können, wurde von zwei Studien an Jurkat T-Zellen und Astrozytom D384 Zellen nachgewiesen [93,94]. In einer Studie mit CLL-Zellen stellte sich heraus, dass die Wirkung des Estradiol-Metaboliten 2-Methoxyestradiol durch die Anwesenheit von ROS oder die Zugabe exogener, ROS-produzierender Mittel deutlich verbessert wurde [95]. Ein positiver Beitrag von ROS zur Wirkung von Adaphostin (unter anderem bei der CLL) wurde ebenfalls nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die Wirkung von Adaphostin durch das Antioxidans (ROS-Fänger) N-Acetyl-Cystein (NAC, siehe II.6.8) signifikant blockiert wurde [96]. Diese Erkenntnis wurde kürzlich von

Shanafelt et al. ausschließlich an CLL-Zellen bestätigt [97]. Der wahrscheinliche Mechanismus von Relevanz für diese Arbeit ist allerdings das Mitwirken von ROS an der Komplement-vermittelten Zytotoxizität. Dieses wird nach Peng et al. über den membranösen C5b-9 Komplex aktiviert, der ROS aktiviert und damit die dem Komplement eigene Wirkung der Lyse von Zellen auf den Weg bringt [98]. Reaktive Sauerstoffspezies sind also zum einen wichtige Mediatoren der Apoptose und über ihr Mitwirken an der CDC möglicher Teil einer ATG Wirkung und wurden daher in dieser Arbeit untersucht.

I.4 Fazit

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich in den letzten Jahren viel auf dem Gebiet der Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie getan hat. Die Behandlung mit Purinanaloga wie Fludarabin, der Einsatz monoklonaler Antikörper (Alemtuzumab und Rituximab), führen zwar zu einer Verbesserung der Prognose dieser Patienten, aber nicht zur Heilung. Einziger kurativer Ansatz in der CLL-Therapie ist die allogene Stammzelltransplantation, allerdings ist diese noch nicht hinreichend auf Indikation und Überlebensraten hin untersucht worden. Daher ist die Entdeckung und Erprobung neuer Substanzen für die Therapie der CLL von grundlegender Bedeutung.

I.5 Antithymozytenglobuline

Antithymozytenglobuline (ATG) sind polyklonale Immunglobuline, die aus Kaninchen oder Pferden gewonnen werden. Bisher dienen sie als Immunsuppressiva zur Abstoßungsprophylaxe bei soliden Transplantationen, zur GvHD-Prophylaxe bei autologen Stammzell- und Knochenmarktransplantationen, sowie zur Therapie der aplastischen Anämie [99,100]. Die in dieser Arbeit verwendeten ATG waren Thymoglobulin® (Genzyme, Cambridge, Endland und Sangstad, Lyon, Frankreich) und ATG-Fresenius® (Fresenius Biotch, Gräfeling). ATG-Fresenius® (ATG-F) wird aus Immunsereen von Kaninchen, die vorher mit

Zellen einer menschlichen T-Lymphoblastischen Zelllinie immunisiert wurden, gewonnen. Thymoglobulin® enthält polyklonale Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen mit humanen Thymozyten gewonnen werden [101,102]. ATG besitzen zytotoxische Aktivität gegen T- und B-Lymphozyten, sowie gegen Plasmazellen und dendritische Zellen [101-104]. Beide ATG-Präparate induzieren *in-vivo* deutliche T-Zelldepletion durch Komplement-vermittelte Zellyse, Antikörper-vermittelte Zelltoxizität, sowie Opsonierung mit nachfolgender Phagozytose durch Makrophagen [103,104]. In der klinischen Praxis werden ATG unter anderem für die Konditionierung bei der allogenen SZT genutzt [105]. Auch in der intensitätsreduzierten Konditionierung (Reduced-Intensity Conditioning, RIC) kommen ATG zum Einsatz. Bei RIC-Protokollen profitiert man vom Spender-gegen-Leukämie Effekt (Graft-versus leukemia effect) der ATG und umgeht dabei die hohe, bei myoablativen Therapieprotokollen assoziierte, Mortalität [106]. ATG sind wichtige Bestandteile von Reduced-Intensity Conditioning (RIC) -Protokollen: sie zeigten im Rahmen des RIC eine Steigerung des Engraftments und eine Reduktion der Spender-gegen-Wirt Reaktion (Graft-versus-host disease, GvHD) [107-109].

Für unterschiedliche ATG-Präparate wurde eine Apoptose-Induktion in verschiedenen malignen B-Zelllinien (EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien, Burkitt-Lymphom Zellen) nachgewiesen [110]. Zand et al. zeigten 2005 eine ATG-induzierte Zytotoxizität bei naiven und aktivierten B-Zellen, sowie bei Plasmazellen. Sie fanden zudem heraus, dass ATG aktiv an verschiedene B-Zell-Oberflächen-Antigene wie CD30, CD38, CD95 und CD80 bindet [111]. Ayuk et al. zeigten 2005, dass ATG-Fresenius® auch in Myelom-Zelllinien und Patientenproben von Myelompatienten Apoptose induziert. Dabei konnte ATG in den Patientenproben bei einer Konzentration von 500µg/ml bis zu über 90% Komplement-abhängige Zellyse induzieren. Ohne Komplement konnten 60-80% Zelltod nachgewiesen werden. Die Zugabe des Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk zeigte, dass die ATG-induzierte Apoptose Caspase-abhängig ist [112]. Ähnliche Ergebnisse wurden kurz darauf von Thymoglobulin® berichtet [102,113]. Timm et al. konnten dabei sowohl *in-vitro* an Myelom-Zelllinien und frisch isolierten Myelomzellen als auch *in-vivo* am Maus-Modell eine

dosisabhängige Zytotoxizität feststellen. Sie bestätigten am Beispiel der Myelomzellen, dass Thyoglobulin[®] an verschiedenen Oberflächen-Antigenen (CD20, CD138, CD38, CD45, CD126, CD49d) bindet [102]. Die zytotoxische Wirkung von ATG am Beispiel von CLL-Zellen ist Hauptbestandteil dieser Arbeit.

I.6 Fragestellung der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit definieren sich über die Entwicklung der Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie. Diese befindet sich derzeit in einem regen Wandel. Die Entdeckung und Erprobung monoklonaler Antikörper und die damit erzielten guten Ergebnisse eröffnen eine neue therapeutische Option für die CLL. Polyklonale Antithymozytenglobuline (ATG) sind auf diesem Gebiet bisher noch nicht auf ihre Wirkung hin überprüft worden. Ziele der Arbeit waren daher:

- die Zytotoxizität zweier kommerziell erhältlicher ATGs (ATG-Fresenius® und Thymoglobulin®) auf CLL-Zellen zu überprüfen
- Die Rolle von Komplement bei der Zytotoxizität zu überprüfen
- zu untersuchen, ob ATG direkt die Apoptose von CLL-Zellen induzieren können.
- die Art der Apoptose-Induktion von ATG anhand der Blockierung essentieller Apoptose-Faktoren wie Caspasen und Cathepsin-B und -D nachzuvollziehen
- die Rolle des mitochondrialen Apoptosewegs und damit der regulierenden Proteine BCL-2 und Bax bei der Apoptose-Induktion von ATG zu ermitteln
- die Rolle Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu evaluieren.
- Einen eventuellen Kombinationseffekt von ATG mit bereits in der CLL-Therapie etablierten Substanzen wie Fludarabin zu ermitteln
- durch Absorption von ATG auf unterschiedliche Zellen den Grad der spezifischen Wirkung von ATG auf CLL-Zellen herauszustellen.

II. Material und Methoden

II.1 Material

Reagenzien und Chemikalien

Antitymozytenglobuline:

- Rabbit ATG-Fresenius[®] (Fresenius, Gräfelfing, Deutschland)
- Thymoglobulin[®] (Genzyme, Cambridge, England)
(Sangstad, Lyon, Frankreich)

Monoklonale Antikörper :

- Rituximab (MedacSchering GmbH, Berlin)
- Alemtuzumab (Mab-Campath, MedacSchering GmbH, Berlin)
- IgG mouse-Anti-Human CD 52, FITC (AbD Serotec, Oxford, England)
- IgG mouse-Anti-Human-BCL-2 Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Monoclonal Mouse Anti-Human BCL-2, FITC (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
- Mouse Anti-Human CD19 (Immunotech, Marseille, Frankreich)
- Goat-Anti-human IgG (Immunotech, Marseille, Frankreich)

Annexin V-FITC (BD Pharmingen, Darmstadt)

RosetteSep[®] T-Zell-Separations-Cocktail (StemCell Technologies, St. Katharinen)

7-Amino-actinomycin-D (7-AAD; BD Pharmingen, San Diego, USA)

Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk (BD, Pharmingen, Darmstadt)

Cathepsin-Inhibitor CA074 (Calbiochem, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, Irvine, UK)

3,3'-dihexyloxycarbocyanin-iodid (DIOC) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

Ficoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin)

IntraStain Fixations-und Permeabilisations-Kit (Dako, Glostrup, Dänemark)

Pepstatin A (Calbiochem, Darmstadt)

N-acetyl-Cystein (NAC) (Alexis Biochemicals, San Diego, USA)

Fludarabinphosphat (2-Fluoroadenine-9-β-D-arabinofuranosid)
(Fludara[®], Schering, Berlin) (SIGMA, St.Louis, USA)

Lösungen, Puffer und Medien

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe)
Serum freies Medium X-Vivo 10 (Bio-Whittaker, Walkersville, USA)
Natriumpyruvat-Lösung (Gibco, Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco, Karlsruhe)
Foetales Kälberserum (FCS) (Gibco, Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Darmstadt)
DMF (Dimethylformamid) (Merck, Darmstadt)
Trypan Blau (Gibco, Karlsruhe)
Phosphate-buffered saline solution (PBS) (Gibco, Karlsruhe)

Erylysepuffer

KHCO₃ 1,0g
NH₄CL 8,3g
EDTA 0,04g

auf 1l Volumen mit Aqua dest. auffüllen, pH-Wert einstellen

Hämolysepuffer

KHCO₃ 1,0g
NH₄CL 8,3g
Mg-Titriplex 0,0372g

auf 1l Volumen mit Aqua dest. auffüllen, pH einstellen

Medien

Medium für CLL-Zellen und Versuchsprotokolle¹ (M1)

RPMI 1640 mit L-Glutamin
+ 20% FCS
+ 1% Natriumpyruvat
+ 1% Penicillin/Streptomycin

Medium für JVM-2-Zellen und Versuchsprotokolle² (M2)

RPMI 1640 mit L-Glutamin

¹ Medium M1 wurde bei allen durchgeführten Versuchen mit CLL-Zellen verwendet

² Medium M2 wurde bei allen durchgeführten Versuchen mit JVM-2-Zellen verwendet

- + 10% FCS
- + 1% Natriumpyruvat
- + 1% Penicillin/Streptomycin

Medium für NCI H929 und KMS_12-Zellen (M3)

- RPMI 1640 mit L-Glutamin
- + 20% FCS
- + 1% Natriumpyruvat
- + 1% Penicillin/Streptomycin

Medium für RPMI 8226-Zellen (M4)

- RPMI 1640 mit L-Glutamin
- + 10% FCS
- + 1% Natriumpyruvat
- + 1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium³

- 90% FCS + 10% DMSO

Zellen und Zelllinien

Die *CLL-Zellproben* (n=16) wurden aus Patientenvollblut gewonnen, welches nach vorheriger Einwilligung der Patienten auf den Onkologischen Stationen, sowie der Onkologischen Ambulanz in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, entnommen wurde. Es handelt sich dabei um Reste der Proben, die zur Blutbildbestimmung verwendet wurden. Die Patientendaten wurden codiert und damit anonymisiert. Sie sind weder direkt, noch indirekt identifizierbar. Es handelt sich um Patienten, deren Erkrankung nach aktuellem Kenntnisstand klinisch sicher diagnostiziert wurde. 11 Patienten befanden sich im unbehandelten Stadium, 2 Patienten waren zuvor erfolglos mit Fludarabin behandelt worden und 3 Patienten befanden sich im Rezidiv nach autologer Stammzelltransplantation. Zum Zeitpunkt der Probengewinnung war keiner der Patienten in Behandlung. Alle Proben

³ Das Einfriermedium wurde im Labor hergestellt und für als Medium für die Lagerung der Zellen bei -80°C verwendet

hatten einen überdurchschnittlich hohen B-Zell-Anteil. (Mittelwert: 91%, Intervall: 76,2%-95,5%, Quantifizierung durch Färbung mit Mouse-Anti-Human CD-19, FITC Antikörper). Die Vitalitätskontrolle wurde bei jedem Versuch mittels Durchflußzytometrie neu durchgeführt und gesichert.

JVM-2 Zellen: Die B-CLL-Zelllinie JVM II stammt ursprünglich aus dem peripheren Blut einer 63-Jährigen Frau mit einer B-Prolymphozyten-Leukämie (B-PLL). Die Zelllinie wurde durch eine EBV-Transformation während der Behandlung mit Phorbol-Ester etabliert. JVM-2 Zellen exprimieren die m-RNA des Proto-Onkogens BCL-2⁴.

K-562 Zellen: Die Zellen aus der CML-Zelllinie wurde als Absorptionzellen für die Absorptionsprotokolle verwendet. Sie stammt von einer 53-Jährigen Frau mit einer chronischen myeloischen Leukämie in der Blastenkrise im Jahre 1970. Sie exprimieren das BCR-ABL Fusionsgen⁴.

Myelomzellen: Die Vortestungen und Vorversuche wurden mit folgenden, zuvor in Medium M3 und M4 kultivierten und alle 2-3 Tage passagierten Myelom-Zelllinien durchgeführt:

- RPMI 8226
- KMS_12
- NCI H929

Plastikware

Zellkulturflaschen (250ml, 75cm²) (Greiner bio-one, Frickenhausen)

Reaktionsgefäße (SafeSeal, Sarstedt, Nümbrecht)

1ml

1,5ml

Weißdeckel-Gefäße (30ml Container, Greiner bio-one, Frickenhausen)

Blue Cap PP-Test tubes 50 ml (Greiner bio-one, Frickenhausen)

FACS-Röhrchen (5ml Polystyrene Round Bottom Tube) (BD Falcon, Bedford, USA)

96-Well-Platten (steril) (Greiner bio-one, Frickenhausen)

⁴ Quelle: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Pipettenspitzen:

0,5-10 μ l (Sarstedt, Nümbrecht)

2-200 μ l (Sarstedt, Nümbrecht)

100-1000 μ l (Greiner, Frickenhausen)

Einmalpipetten:

5ml, 10ml, 25ml, 10ml („Shorty“) (BD Falcon, Bedford, USA)

Spritzen (Braun AG, Melsungen)

2ml, 5ml, 10ml, 20ml

Kanülen (Braun AG, Melsungen)

0,90x40mm

0,80x40mm

0,45x12mm

Einmalhandschuhe (Kimbery-Clark, Roswell, GA, USA)

Geräte

Die folgende Geräte wurden eingesetzt⁵:

Pipetten: (Eppendorf, Hamburg)

0,5-10 μ l

2-20 μ l

10-100 μ l

100-1000 μ l

Pipetboy acu (Integra Biosciences)

Brutschrank (37°C, 5%CO₂/95% Luft, Heraeus, Osterrode)

FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ, USA)

Computer (Macintosh, USA)

Drucker:

Farb-Tintendrucker (Hewlett-Packard, USA)

Farb-Laserdrucker (Tektronix, Köln)

+4°C/-20°C-Kühlgefrierkombination (Liebherr, Ochsenhausen)

-20°C-Gefrierschrank (Bauknecht, Stuttgart)

-80°C-Gefriertruhe (Kryotec, Hamburg)

Stickstofftanks (MVE, Cryosystem 4000, USA)

Zentrifuge (Sigma, 6K10)

⁵ teilweise wurden im Labor bereits vorhandene Geräte genutzt und mit anderen Mitarbeitern des Labors geteilt.

Megafuge 1.0R (Heraeus, Osterode)
Microzentrifuge (Micon, Heraeus, Osterode)
Wasserbad (GFL, Burgwedel)
Thermocycler (Eppendorf, Hamburg)
Mikroskope:
 Inversmikroskop (Hund, Wetzlar)
 Durchlichtmikroskop (Leitz, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer *improved*
Vortexer (Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau)

II.2 Isolierung von CLL-Zellen aus Vollblut mittels Ficoll-Trennung

Ficoll-Separationslösung wurde von der Biochrom AG, Berlin bezogen und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert.

Vorgehen:

Die Patientenproben wurden 1:2 mit PBS verdünnt. In einem weiteren Zentrifugationsröhrchen (30ml) wurden 5-15ml Ficoll-Lösung (je nach Blutvolumen) gegeben und mit bis zu 25ml verdünntem Blut langsam und vorsichtig überschichtet, um eine Phasenvermischung zu vermeiden. Anschließend wurde das verschlossene Röhrchen bei 1400 U/min für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation bildete sich zwischen Ficoll und Serum eine Interphase aus mononukleären Zellen, welche dann vorsichtig mit der Pipette abgezogen wurde. Die gewonnenen Zellen wurden dann zwei Mal mit 10-30ml PBS gewaschen und anschließend nochmals bei 1400 U/min für 7 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des PBS-Überstandes wurde das Zellpellet kurz mit dem Vortexer aufgelockert und anschließend je nach Zellzahl in 10-15 ml Einfriermedium (bestehend aus 90% FCS mit 10 % DMSO) aufgenommen und zügig auf 10-15 Kryo-Röhrchen (Vol.: 30ml) aufgeteilt. Diese wurden bei einer Temperatur von -80°C zunächst eingefroren und dann in Stickstoff gelagert.

II.3 Gewinnung von Komplement-haltigem Serum aus Vollblut mittels Zentrifugation

Komplement-haltiges Serum wurde für die Testung der ATG-Wirkung mit Komplement benötigt und während der experimentellen Phase aus dem Blut gesunder Spender mit deren Einverständnis mehrfach hergestellt und diente – bei -80°C gelagert – als Quelle für Komplement. Blutproben von mindestens drei Spendern wurden benötigt, um eine interindividuelle Variabilität zu minimieren.

Herstellung:

Venöses Blut von mindestens drei Spendern wurde per venöser Punktion entnommen. Das Blut wurde anschließend für 7 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgezogen und in 50ml Gefäßen (BD Falcon) gesammelt. Dabei war stets zu beachten, dass Serum von verschiedenen Spendern in den Röhrchen gemischt wurde (sog. „pooling“). Das Serum wurde dann nochmals für 7 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Das Serum wurde dann zur Lagerung in Reaktionsgefäßen (Volumen: 1ml) aliquotiert und anschließend bei -80°C eingefroren und gelagert. Es wird im weiteren Verlauf als „aktives Serum“ bezeichnet.

II.4 Gewinnung von T-Zellen aus peripherem Blut durch Isolierung mit Antikörper-Cocktail und anschließender Dichtegradientenzentrifugation

Peripheres Blut wurde in Form sogenannter „Buffy-coats“ (Lymphozyten- und Thrombozytenkonzentrate) aus der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen. Sie stammten von gesunden Spendern.

Vorgehen:

10 ml des Buffy-Coats werden in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Anschließend wurden 500 μl (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Blut) RosetteSep T-Zell-Antikörper-Cocktail hinzugegeben und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde 1:2 mit PBS verdünnt und es erfolgte eine Ficoll-Trennung (siehe auch II.2). Dabei wurden die 10ml BuffyCoat in einem 50ml Falcon-Röhrchen mit 10ml PBS verdünnt auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Aus der Interphase zwischen Ficoll und Serum ließen sich dann die T-Zellen gewinnen.

II.5 Zellkultur

Die kultivierten Zelllinien wurden in sterilen Zellkulturflaschen (250ml, 75 cm²) bei 37°C unter 5% CO₂ in einem Brutschrank in feuchter, mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre gehalten.

JVM-2 Zellen

Diese B-CLL-Zelllinie JVM-2 wurde in Medium M2 in einer Konzentration von ca. 0,1-0,5 x 10⁶ Zellen/ml in 250ml Zellkulturflaschen (75cm²) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Da die Zellen langsam wachsen wurden sie alle 3 Tage im Verhältnis 1:3 passagiert.

K-562 Zellen

Die CML-Zelllinie wurde in Medium M2 bei in einer Konzentration von etwa 0,5 x 10⁶/ml in sterilen Zellkulturflaschen (250ml, 75cm²) kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert.

II.6 Durchführungs-Protokolle

Zytotoxizitäts-Assays: Inkubation von CLL-Zellen mit ATG, Rituximab und Alemtuzumab (CLL+AK)

Für die Komplement-vermittelte Zelltoxizität durch Antikörper (nachfolgend bezeichnet als CDC = Complement-Dependent-Cytotoxicity) wurden die CLL-Zellen in einer Konzentration von 1x10⁶ /ml in 96-Loch-Platten in Medium M1 (siehe II.1.2) kultiviert. Bei einem Gesamtvolumen

von 200µl pro Well wurden den im Medium enthaltenen 2×10^5 Zellen ATG-Fresenius[®], Thymoglobulin[®], Alemtuzumab (MabCampath[®]) und Rituximab in klinisch relevanten Konzentrationen (siehe Tabelle II.1), sowie 25% Komplement hinzugefügt.

	ATG-F[®]	Thymo- globulin[®]	Alemtuzumab	Rituximab
Konzentration	10 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	10µg/ml
	50 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml
	100 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
	500 µg/ml	500 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml

Tabelle II.1

Nach Inkubation für 20-24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen in jeweils 400µl Medium in FACS-Röhrchen (BD Falcon, New Jersey, USA) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 4µl 7-AAD gefärbt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um dann schließlich durch Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) die Viabilität festzustellen.

Für die Messung Komplement-unabhängiger Zytotoxizität wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in 96-Loch-Platten in Medium M1 angereichert und mit 20% FCS oder X-Vivo 10 Serum-freiem Medium (Bio-Whittaker, Walkersville, USA) kultiviert. Bei einem Gesamtvolumen von 200µl wurden die Zellen mit den in Tabelle II.1 aufgeführten Konzentrationen von ATG-Fresenius[®], Thymoglobulin[®], Alemtuzumab (MabCampath[®]) und Rituximab ebenfalls für 20-24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf von 20-24h wurden die Zellen in jedem Well mit jeweils 4µl 7-AAD markiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und dann mit der FACS-Analyse quantifiziert.

In 12 Versuchen wurde Goat-Anti-human-IgG in einer Konzentration von 50µg/ml als quervernetzender Zweit-Antikörper zu Alemtuzumab (MabCampath) hinzugefügt.

Die Anzahl der Ansätze pro getesteter Probe belief sich bei diesem Protokoll auf 18-24, je nach Anzahl der Negativkontrollen und hinzugefügten Zweitantikörper.

Markierung der CLL+AK-Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD

Um den Zelltod durch Apoptose nachzuweisen wurden in 5 Experimenten die mit ATG, Alemtuzumab und Rituximab inkubierten Zellen mit Annexin V-FITC markiert und mit Durchflußzytometrie die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Annexin V-FITC ist ein Phospholipid bindendes Protein, welches eine besondere Affinität zu Phospholipid-Phosphatidylserin (PS) besitzt. PS ist ein Membranprotein, das schon früh beim apoptotischen Niedergang der Zelle von der inneren an die äußere Membran verschoben wird.

Vorgehen:

Die CLL+AK-Zellen wurden zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen, dann bei 1400 U/min für 7 Minuten zentrifugiert und anschließend in einer Konzentration von 1×10^6 /ml resuspendiert. 100µl (1×10^5 Zellen) der Lösung wurden in ein 5ml FACS-Röhrchen gegeben und 5µl Annexin V-FITC und 4µl 7-AAD hinzugegeben. Nach kurzer Durchmischung mit dem Vortexer wurden die Zellen für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend per Durchflußzytometrie analysiert (siehe Tabelle II.2)

Färbung	Zellen
Annexin neg.,7-AAD neg.	Vital
Annexin pos.,7-AAD neg.	frühapoptotisch
Annexin pos.,7-AAD pos.	Spätapoptotisch/nekrotisch

Tabelle II.2

Hemmung der Apoptose Z-VAD-fmk, CA-074 und Pepstatin A

Z-VAD-fmk

Zur Bestimmung der Rolle der Caspasen wurden die Zellen mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk für eine Stunde vor Zugabe der Antikörper inkubiert. Z-VAD-fmk wurde in DMSO aufgelöst, bei -20°C gelagert und erst kurz vor der Inkubation aufgetaut. Die Inkubation erfolgte in einem gesonderten Weißdeckel-Röhrchen (BD, Falcon). Hierfür wurden einer zuvor hergestellten Arbeitssuspension der CLL-Zellen (Konzentration der Zellen: 1×10^6 /ml, Volumen der Suspension: 5ml –10ml je nach Anzahl der Ansätze) nach vorheriger Durchmischung 1ml Volumen entnommen und anschließend mit Z-VAD-fmk in einer Konzentration von 100mM inkubiert. Nach einer Stunde wurden dem Ansatz in einer 96-Loch-Platte (Gesamtvolumen pro Well: 200 μ l) Antikörper gemäß der in Tabelle II.3 dargestellten Konzentrationen hinzugefügt.

	ATG-F	Thymoglobulin[®]	Alemtuzumab	Z_VAD-fmk
Konzentration	-	50 $\mu\text{g/ml}$	-	100mM
	-	100 $\mu\text{g/ml}$	-	100mM
	-	-	10 $\mu\text{g/ml}$ + 2.AK ⁶	100mM
	100 $\mu\text{g/ml}$	-	-	100mM
Negativkontrolle	-	-	-	100mM

Tabelle II.3

Anschließend wurden die Ansätze für 20-24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und wie bereits in II.6.1 beschrieben mit 7-AAD markiert und der Anteil der vitalen Zellen per Durchflußzytometrie bestimmt. Insgesamt wurden sechs CLL-Zellproben mit Z-VAD-fmk inkubiert.

⁶ Goat-Anti-human-IgG in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ als quervernetzender Zweit-Antikörper

CA-074

Ähnlich wie mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk beschrieben wurde auch mit dem Cathepsin-B-Inhibitor CA-074 verfahren. Das CA-074 (Calbiochem, Darmstadt) wurde ebenfalls nach Auflösung in DMSO bei -20°C gelagert und erst unmittelbar vor Verwendung aufgetaut. Wie bei Z-VAD-fmk wurden die CLL Zellen (in einer Arbeitssuspension mit der Konzentration 1×10^6 /ml) in einem gesonderten Gefäß (Weißdeckel-Röhrchen, BD Falcon, NJ, USA) vor Zugabe der Antikörper für eine Stunde mit CA-074 in der Konzentration von 100mM inkubiert. Die Ansätze und die darin enthaltenen Konzentrationen stellten sich wie in Tabelle II.4 beschrieben zusammen.

	Thymoglobulin®	CA-074
Konzentration	50 µg/ml	100mM
	100 µg/ml	100mM
	-	-
Negativkontrolle	-	100mM

Tabelle II.4

Anschließend wurden die Ansätze für 20 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und wie bereits in II.6.1 und II.6.2 beschrieben mit 7-AAD markiert und der Anteil der lebenden Zellen per Durchflußzytometrie bestimmt.

Insgesamt wurden vier CLL-Zellproben mit dem Cathepsin-B-Inhibitor CA-074 inkubiert.

Pepstatin-A

Ebenfalls nach dem beschriebenen Prinzip wurden die CLL-Zellen mit dem Cathepsin-D-Inhibitor Pepstatin-A inkubiert. Das Pepstatin-A (Calbiochem, Darmstadt) wurde wie CA-074 eine Stunde vor Zugabe des Thymoglobulins den CLL-Zellen (in einer Arbeitssuspension mit der Konzentration 1×10^6 /ml) in einem gesonderten Röhrchen zugefügt. Die

Konzentration von Pepstatin-A betrug ebenfalls 100µM. Die Ansätze wurden wie in Tabelle II.5 beschrieben zusammengestellt.

	Thymoglobulin®	Pepstatin-A
Konzentration	50 µg/ml	100mM
	100 µg/ml	100mM
	-	-
Negativkontrolle	-	100mM

Tabelle II.5

Markierung von CLL+AK-Ansätzen mit DIOC (3,3'-dihexyloxycarbocyanin-iodid) zur Überprüfung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs

3,3'-dihexyloxycarbocyanin-iodid (DIOC) ist ein zell-permeabler, grün fluoreszierender, lipophiler Farbstoff, der selektiv für die Mitochondrien von lebenden Zellen ist. Insgesamt wurden bei vier CLL-Proben Ansätze mit DIOC markiert. Hierfür wurden die zuvor mit ATG-Fresenius®, Thymoglobulin®, Alemtuzumab und Rituximab für 20 Stunden im Brutschrank inkubierten Ansätze nicht mit 7-AAD, sondern mit DIOC (4µl/ml Zellsuspension) markiert. Anschließend wurde wie bei allen anderen Ansätzen mit Durchflußzytometrie der Anteil der lebenden Zellen bestimmt.

Markierung von CLL+AK-Zellen mit Monoklonalen-Anti-Human-BCL-2-Antikörpern (und Anti-Bax-Antikörpern) zur Messung der Verschiebung von BCL-2 und Bax im Rahmen der Apoptose-Induktion

Bei einer Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Pathway kann es zu Verschiebungen der Pro- und Anti-apoptotischen Mitglieder der BCL-2 Familie (siehe I.2) kommen. Das BCL-2 Protein befindet sich in der Mitochondrien-Membran und im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Im aktivierten Zustand spielt es eine wichtige Rolle bei der Inhibierung der Apoptose. Der Monoklonale Maus-Anti-Human-BCL-2 Antikörper bindet

spezifisch an das BCL-2 Protein. Er lag als Fluorescein Isothiocyanat Isomer-1(FITC)-konjugierte Lösung vor (1% Bovine Serum Albumin und 15mMol /l NaN₃, pH:7,2) und wurde bei 4°C lichtgeschützt gelagert⁷.

Ein Kit zur Fixation und Permeabilisation der Firma DakoCytomation (IntraStain) enthielt Reagenz A (Fixierung, mit Formaldehyd) und Reagenz B (Permeabilisation) .

Vorgehen:

Zunächst wurden aus den zu messenden, zuvor für 20h inkubierten CLL+AK- Ansätzen (ATG, Alemtuzumab, Rituximab, siehe II.6.1) je 50µl in zwei verschiedene FACS-Röhrchen (1 und 2) gegeben. Anschließend wurde zur Fixierung in jedes Röhrchen 100µl Reagenz A gegeben, jeweils mit dem Vortexer durchgemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 2ml PBS hinzugegeben, gut gemischt und bei 1400 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand so abgezogen, dass ca. 10µl Restvolumen im Gefäß verblieben, dem dann in beide Gefäße 100µl Reagenz B zugesetzt wurde. Zusätzlich wurden in Reagenz 1 10µl des Anti-Human-BCL-2-Antikörpers und in Reagenz 2 10µl IgG mouse-Anti-Human FITC (DAKO, Glostrup, Dänemark) als Negativkontrolle, gegeben. Jedes Gefäß wurde gut durchgemischt (um zu gewährleisten, dass sich die Zellen in Suspension befinden) und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederrum wurden 2 ml PBS zugegeben und bei 1400 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand bis zum Verbleib von 50µl in jedem Röhrchen abgegossen. Die Pellets wurden in PBS resuspendiert und per Durchflußzytometrie analysiert.

Ähnlich wurde auch bei mit dem monoklonalen Antikörper Human Bax (Immunotech, Marseille, Frankreich) verfahren. Bax ist der intrazelluläre Gegenspieler von BCL-2. Das Protein ist ähnlich strukturiert wie BCL-2, es entstehen BCL-2/Bax Homo- und Heterodimere. Die Apoptose hängt vom

⁷ aus dem Datenblatt zum Anti-Human BCL-2 Markierungs-Kit der Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Gleichgewicht der beiden Proteine ab. Eine Überexpression von Bax führt folglich zu vermehrtem Zelltod⁸.

Inkubation von CLL+AK-Zellen mit N-Acetyl-Cystein (NAC) zur Bindung von Sauerstoffradikalen

N-acetyl-Cystein (NAC) ist die stabile Form der Aminosäure Cystein. In seiner Eigenschaft als Radikalfänger und damit als Antioxidans wird NAC in der Klinik als Mykolytikum eingesetzt. Zudem bewirkt es einen Anstieg des Glutathion-Spiegels (Glutathion ist selbst ein körpereigenes Antioxidans) und wird daher als Antidot bei Paracetamol-induziertem Leberversagen verwendet. Die Fähigkeit von NAC, ATG-induzierte Zytotoxizität zu blockieren, würde zeigen, dass diese Zellyse von Sauerstoffradikalen vermittelt wird.

NAC wurde in RPMI 1640-Medium (Gibco, Karlsruhe) aufgelöst und zur pH-Neutralisierung (pH-Zielwert: 7,4) mit NAOH titriert. Nach Verwendung wurde die Lösung verworfen.

Eine Arbeitslösung der CLL-Zellen (in Medium M1) mit der Konzentration 1×10^6 /ml wurde hergestellt und dann abzüglich der NAC-Volumina in eine 96-Loch-Platte eingebracht. Das Gesamtvolumen (CLL-Zelllösung 1×10^6 /ml + NAC-Arbeitslösung 1 Molar) pro Well betrug 200µl. Anschließend wurde das NAC in den Konzentrationen 20mM, 40mM, 50mM, 60mM, 100mM (Tabelle II.6) hinzugegeben und die Ansätze im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde inkubiert. Nach 1 h wurde Thymoglobulin[®] in den in Tabelle II.6 dargestellten Konzentrationen hinzugegeben.

Die Versuche wurden in einem Ansatz ohne Komplement und in einem zweiten Ansatz mit Zugabe von Komplement durchgeführt. Das Komplement wurde dabei erst kurz vor der Verwendung aus -80°C aufgetaut (siehe Tabelle II.7)

⁸ aus dem Datenblatt zum Anti-Bax Markierungs-Kit der Firma Immunotech, Marseille, Frankreich

	Thymoglobulin®	NAC
Konzentration	100 µg/ml	20/40/50/60/100mM
	500 µg/ml	20/40/50/60/100mM
	100µg/ml	-
Negativkontrolle	500µg/ml	-
	-	20/40/50/60/100mM

Tabelle II.6

	Komplement	Thymoglobulin®	NAC
Konzentration	25% ⁹	100 µg/ml	20/40/50/60/100mM
	25%	500 µg/ml	20/40/50/60/100mM
Negativkontrolle	25%	100µg/ml	-
	25%	500µg/ml	-
	25%	-	20/40/50/60/100mM

Tabelle II.7

Anschließend wurden die Ansätze für 20-24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und wie bereits in II.6.1 und II.6.2 beschrieben mit 7-AAD markiert. Der Anteil der lebenden Zellen wurde per Durchflußzytometrie bestimmt. Auch bei diesen Ansätzen wurde wie in II.6.4 beschrieben zusätzlich mit DIOC und DHE markiert.

Inkubation von CLL-Zellen mit ATG und Fludarabin zur Evaluation eines Kombinationseffekts beider Substanzen

Das Purinanalogon Fludarabin (Fludarabinphosphat) ist ein Zytostatikum und ein Standardmedikament für die Behandlung der Chronischen Lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ bei Patienten mit ausreichender Knochenmarkreserve. Die durchgeführten Ansätze mit Fludarabin dienen der Messung eines Kombinationseffekts von ATG und Fludarabin bei CLL-Zellen. Fludarabin wurde in Dimethylformamid (DMF) aufgelöst und in einer Stammlösung (100mM) im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert. Wie zuvor beschrieben (II.6.1 – II.6.6) wurde eine Arbeitskonzentration der Testzellen (hier: CLL-Proben und JVM-2-Zellen) in der Konzentration 1 x 10⁶ /ml hergestellt. In einer 96-Loch-Platte (Gesamtvolumen pro Well:

⁹ Gesamtvolumen im Well: 200µl, daher betrug die Menge an Komplement bei einem Anteil von 25% 50µl. (Standard bei allen Versuchen mit Komplement-Zugabe)

200µl) wurden Ansätze mit Fludarabin (50µM) hergestellt. Anschließend wurden ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® in einer Konzentration von 50µg/ml hinzugefügt. Die Ansätze wurden dann für 20 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und (wie beschrieben in II.6.1-II.6.6) mit 7-AAD markiert und der Anteil der lebenden Zellen per Durchflußzytometrie bestimmt.

Absorptionsprotokolle

Für die Absorption wurden neben den CLL-Proben auch T-Zellen als Testzellen verwendet. Die Absorption erfolgte auf CLL-Zellen, T-Zellen und auf Zellen der Zelllinie K562 (im folgenden als Absorptionszellen bezeichnet). Pro durchgeführter Absorption und getestetem ATG wurden 1×10^7 Zellen benötigt. Bei vier durchgeführten Absorptionen betrug die bereitzustellende Zellzahl der Absorptionszellen also 4×10^7 Zellen. Die Testzellen wurden in einer Arbeitssuspension mit der Konzentration 1×10^6 /ml bereitgestellt.

Vorgehen:

Pellets der Absorptionszellen (Zellzahl/Pellet: 1×10^7) wurden in 1ml Medium (RPMI 1640) aufgelöst, welches Thymoglobulin® in einer Konzentration von 400µg/ml enthielt. Diese Lösung wurde für insgesamt 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und dabei alle 5-10 Minuten durch leichtes Schütteln die Zellen resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 1400 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgenommen und wieder für 5 Minuten bei 1400 U/min in einem neuen Gefäß zentrifugiert, um eine Kontamination durch Zellen zu vermeiden. Nach diesem Muster wurden 4 Absorptionen durchgeführt. Nach jeder Absorption wurde die verbliebene zytotoxische Aktivität von Thymoglobulin® gemessen, indem 50µl des 2 Mal zentrifugierten Überstandes zu 100µl Testzell-Lösung (aus der o.g. Arbeitssuspension) und 50µl aktivem Serum (Komplement, 25%) gegeben wurden. Der restliche Überstand wurde dann für die nächste Absorption auf ein neues Pellet (Zellzahl 1×10^7) gegeben.

Insgesamt wurden 6 Experimente durchgeführt, 3 Mal mit CLL-Zellproben und 3 Mal mit primären T-Zellen als Testzellen. Pro Experiment wurden 4 Absorptionen mit jeder Absorptionszelllinie (CLL, T-Zellen und K-562-Zellen) durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Absorption der Antikörper nicht vom Plastik der Gefäße herrührt, wurde zusätzlich eine Absorption ohne Absorptionszellen durchgeführt.

II.7 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Zellviabilität (Anteil der lebenden Zellen) wurde per Durchflußzytometrie bestimmt. (BD FACScan, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Dafür wurden die Ansätze mit den Testzellen nach 20h Inkubationszeit mit 7-AAD oder DIOC-3(6) markiert, für 5 Minuten bei Dunkelheit inkubiert und anschließend im FACScan analysiert. Mindestens 10.000 Ereignisse wurden gemessen und mit der „Cellquest“-Software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) analysiert.

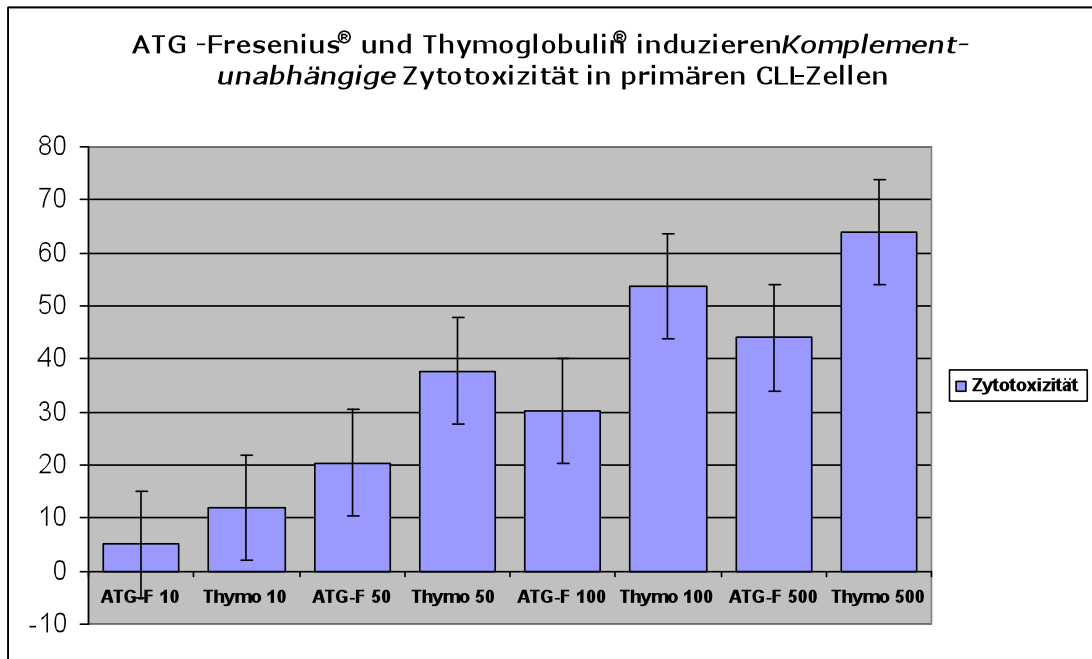
II.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays mit einzelnen Wirkstoffen wie ATG-Fresenius® oder Thymoglobulin® in der Einzelgabe wurden mit dem *wilcoxon rank-sum* Test verglichen. Die Kombinationseffekte von Thymoglobulin® und Fludarabin wurden mit der Calcsyn® - Software analysiert. Sie verwendet den von Chou und Talalay beschriebenen Median-Effekt-Methoden [118]. Hierbei deutet ein Kombinations-Index (combination index – CI) von 1 einen additiven Effekt an, ein $CI < 1$ deutet auf einen synergistischen Effekt hin. Ein $CI > 1$ deutet demnach einen antagonistischen Effekt der Medikamentenkombination an.

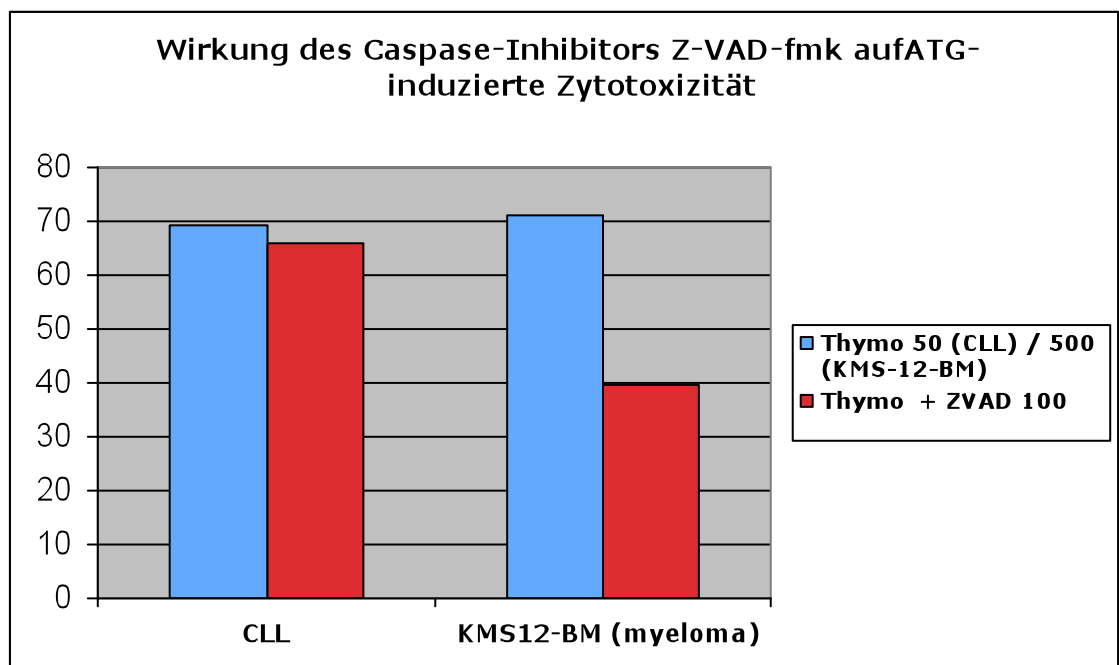
III. Ergebnisse

III.1 ATG induziert *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität in primären CLL-Zellen

Sowohl ATG-Fresenius[®] als auch Thymoglobulin[®] induzierten messbare, *komplement-unabhängige* Zytotoxizität in primären CLL-Zellproben (Grafik III.1, Grafiken III.4 – III.6). Die zytotoxische Aktivität war dosisabhängig sowohl für ATG-Fresenius[®] ($p < 0.0003$) als auch für Thymoglobulin[®] ($p < 0.0003$). In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen konnte die ATG-induzierte, *komplement-unabhängige* Zytotoxizität in CLL-Zellen weder durch die Zugabe des Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk, noch von der Zugabe des Cathepsin-B Inhibitors CA-074 und des Cathepsin-D Inhibitors Pepstatin A, verhindert werden (Grafik III.2). Auch die Zugabe des Radikalenfängers N-Acetyl-Cystein (NAC) konnte diese Wirkung nicht vermindern (Kapitel III.9, Grafik III.10). Die Markierung der CLL-Zellen mit Annexin V-PE und 7-AAD vor der Durchführung der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) veranschaulichte den Eintritt des Zelltods durch Apoptose (Grafik III.3).

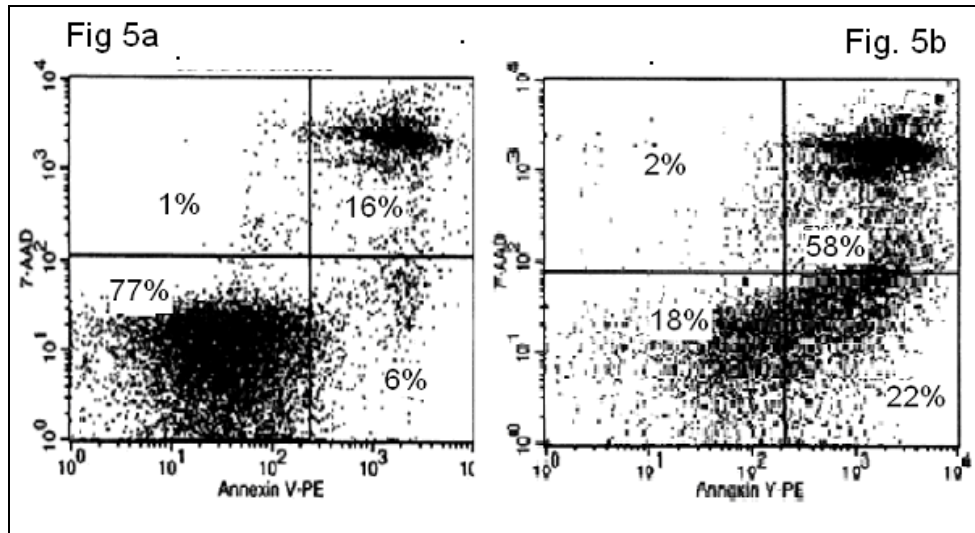


Grafik III.1: Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten (n=19) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (10-500µg/ml) und Thymoglobulin® (10-500µg/ml) mit 25% aktivem Serum inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde der Anteil der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt



Grafik III.2: ATG-induzierte komplement-unabhängige Zytotoxizität ist Caspase-unabhängig in CLL-Zellen. Maligne Zellen wurden vor Inkubation mit Thymoglobulin® mit dem Caspase Inhibitor ZVAD-fmk (100µM, 1h Inkubation bei 37°C) versehen. Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten wurden dann in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit Thymoglobulin® (100µg/ml) inkubiert. KMS-12-

BM Myelom Zellen wurden zum Vergleich mit Thymoglobulin® (500µg/ml) inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde die Anzahl der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Gezeigt werden die Mittelwerte aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in doppelter Ausführung durchgeführt wurden.



Grafik III.3: ATG induzieren Apoptose in primären CLL-Zellen. Primäre CLL-Zellen aus peripheren venösem Blut von Patienten wurde in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (100µg/ml) oder Thymoglobulin® (100µg/ml) inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde der Anteil der lebenden Zellen durch Markierung mit Annexin-V-PE oder 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Gezeigt werden representative Dot Plots aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei (a) eine Negativkontrolle darstellt (Zellen in Medium inkubiert) und (b) die Zellen zeigt, welche mit Thymoglobulin® behandelt wurden. Nach 20 h Inkubation mit Thymoglobulin® war ein Großteil der Zellen Annexin-positiv und gleichzeitig 7-AAD negativ – eine Eigenschaft, die frühapoptotischen Zellen zugerechnet wird.

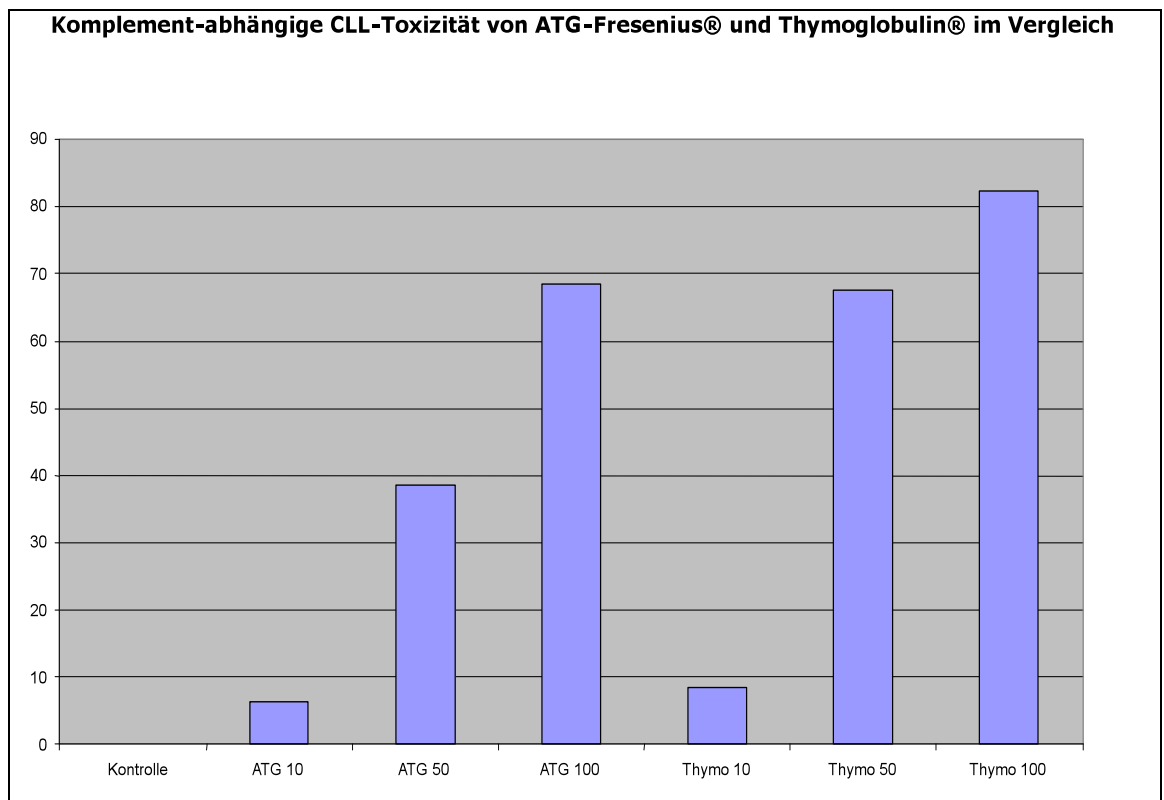
III.2 Vergleich von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin®

ATG-Fresenius® wird in der Klinik in etwa 2-10mal höheren Dosen verabreicht als Thymoglobulin®. In Grafik III.4 ist zu sehen, dass bei gleicher Konzentration der zytotoxische Effekt von Thymoglobulin® gegen primäre CLL-Zellen wesentlich höher ist als der Effekt von ATG-Fresenius®. Dies gilt für die *Komplement-abhängige* und für die *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität (Grafik III.6).

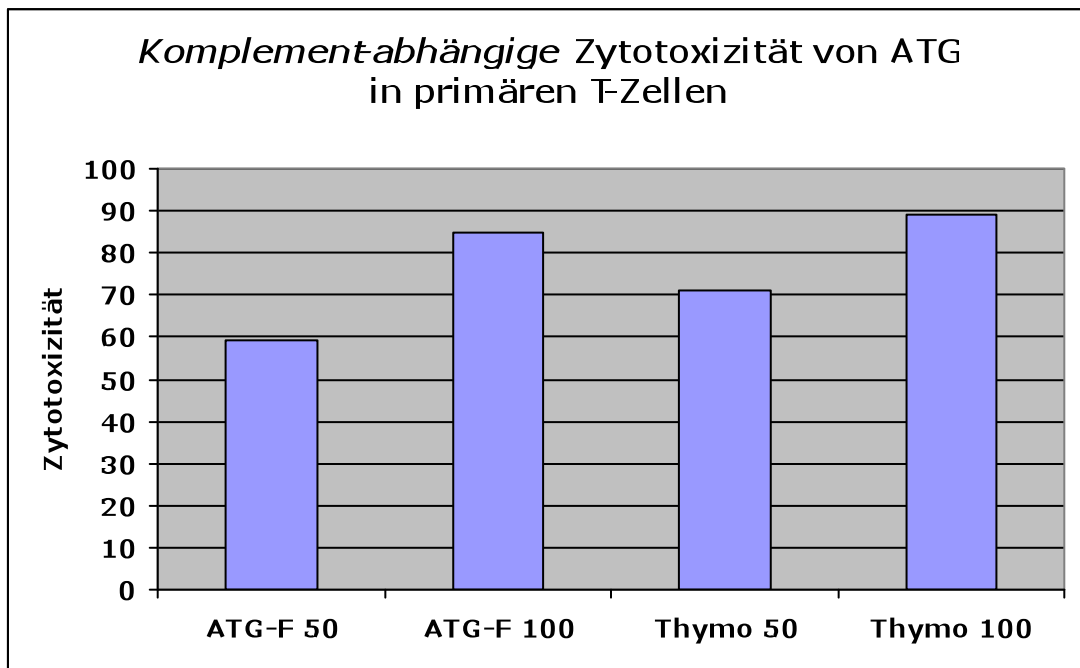
mit Komplement: $p < 0.005$ bei 50µg/ml, $p < 0.03$ bei 100µg/ml
 ohne Komplement: $p < 0.0009$ bei 50µg/ml, $p < 0.0007$ bei 100µg/ml

Dennoch ergab sich kein nennenswerter Unterschied zwischen ATG-Fresenius® bei 100µg/ml verglichen mit Thymoglobulin® bei 50µg/ml mit oder ohne Komplement ($p < 0,95$ mit Komplement, $p < 0,065$ ohne Komplement).

Vergleichbare zytotoxische Effekte wurden in primären T-Zellen von 3 gesunden Spendern beobachtet (Grafik III.5).



Grafik III.4: Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten ($n=19$) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (10-100µg/ml), Thymoglobulin® (10-100µg/ml) inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde der Anteil der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt

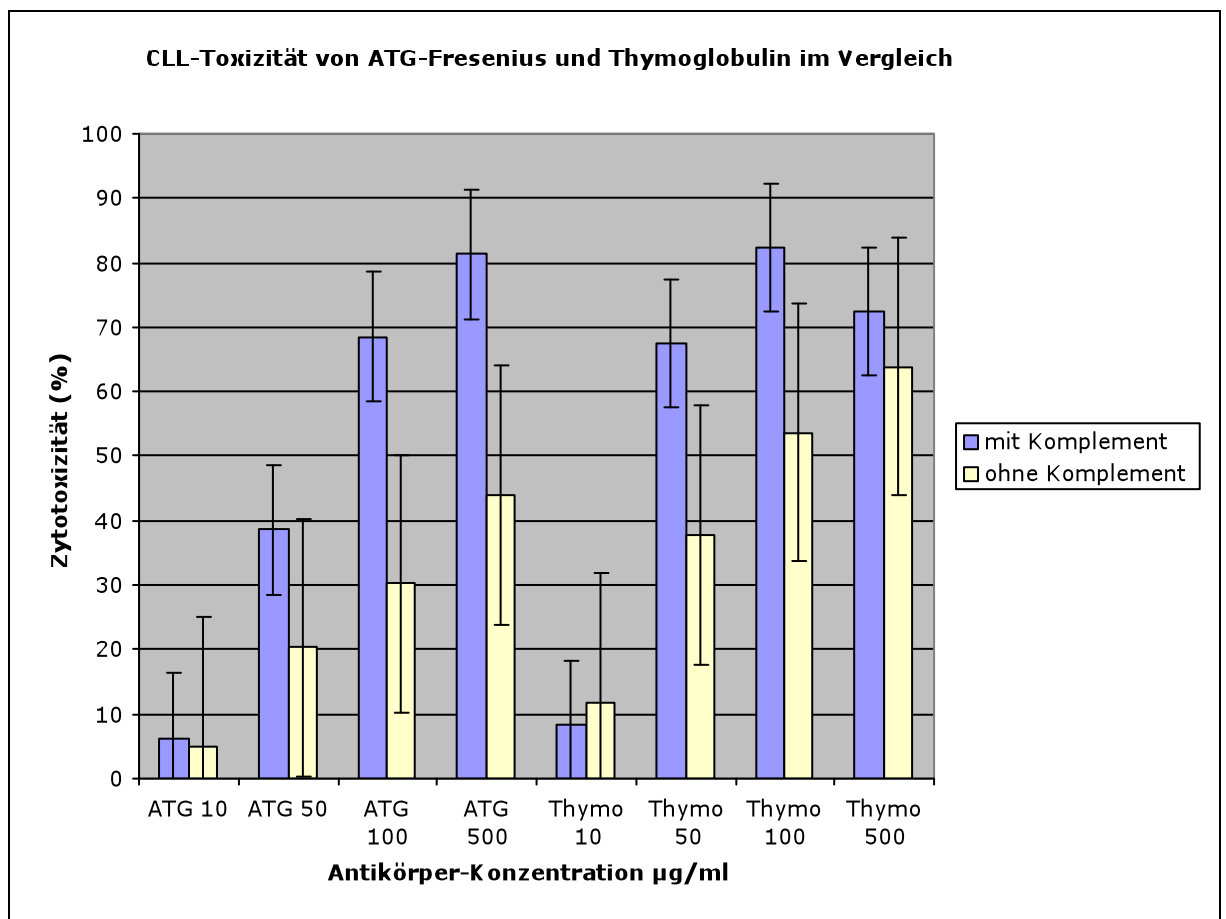


Grafik III.5: Komplement-abhängige Zytotoxizität von ATG in primären T-Zellen. Primäre T-Zellen wurden aus peripher-venösem Blut von 3 gesunden Spendern gewonnen. Hierfür wurde das abgenommene Vollblut mit Rosettesep zur T-Zell-Separation nach Anweisung des Herstellers inkubiert. Anschließend wurde eine Ficoll Trennung durchgeführt. Die T-Zellen wurden dann in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (50-100µg/ml) oder Thymoglobulin® (50-100µg/ml) mit 25% aktivem Serum inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde der Anteil der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit 3 T-Zell-Proben gezeigt. Sie wurden jeweils in doppelter Ausführung durchgeführt.

Komplement-abhängige Wirkung von ATG auf primäre CLL Proben					
	ATG-F 50	ATG-F 100	Thymo 50	Thymo 100	Alem 5
CLL01 (keine)*	27,88	62,75	64,36	81,82	47,28
CLL02 (keine)	70,98	84,93	76,99	81,11	45,58
CLL04 (keine)	55,68	71,79	74,72	80,45	53,97
CLL05 (keine)	33,17	77,71	58,72	88,05	76,38
CLL06 (Fludarabin)	18,75	62,18	54,69	82,16	36,42
CLL07 (keine)	37,33	60,74	46,83	78,49	71,69
CLL08 (auto-transplant)	16,55	50,23	65,97	87,05	59,53
CLL09 (auto-transplant)	35,29	71,93	80,95	86,47	55,06
CLL10 (auto-transplant)	57,98	77,34	77,9	84,74	58,49
CLL12 (keine)	32,7	65,75	73,58	73,62	19,22
CLL13 (keine)	59,65	56,64	79,05	85,71	66,33
CLL15 (keine)	81,8	88,6	88,6	93,2	16
CLL17 (keine)	98,4	99,6	99,6	98,5	50,6
CLL18 (keine)	39,3	96,4	69	97,6	62
CLL19 (keine)	69,9	95	93	96,3	66,5
Komplement-unabhängige Wirkung von ATG auf primäre CLL Proben					
	ATG-F 50	ATG-F 100	Thymo 50	Thymo 100	Alem 5 + X-link
CLL01 (keine)	2,85	4,6	0,15	33,48	13

III.3 Vergleich der *Komplement-abhängigen* und der *Komplement-unabhängigen* Wirkung von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin®

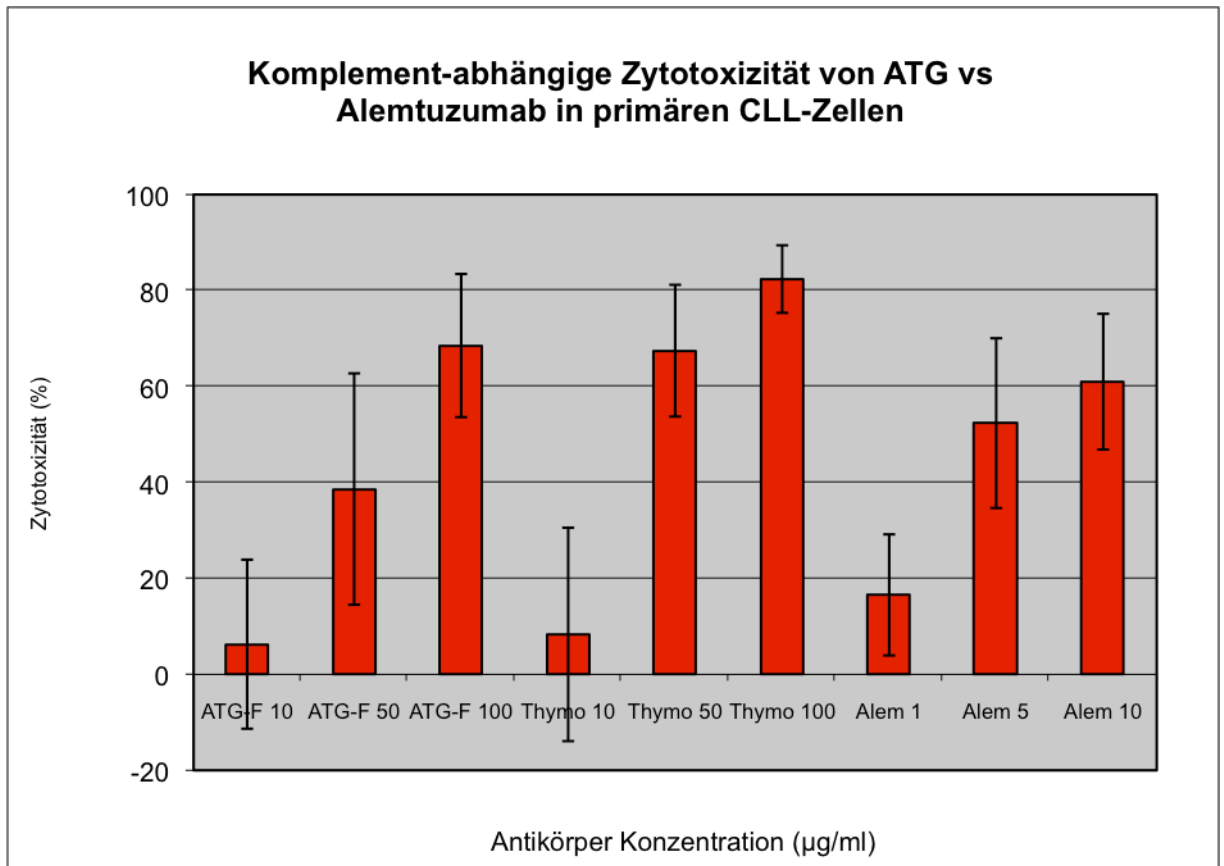
Die Zugabe von Komplement erhöhte die Zytotoxizität beider ATG in verschiedenen Konzentrationen signifikant: ATG-Fresenius® 50µg/ml ($p < 0.0002$), ATG-Fresenius® 100µg/ml ($p < 0.0006$), Thymoglobulin® 50µg/ml ($p < 0.0006$), Thymoglobulin® 100µg/ml ($p < 0.0006$) (Grafik III.6).



Grafik III.6: Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten (n=16) wurde in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (10-500µg/ml), Thymoglobulin® (10-500µg/ml) mit oder ohne 25% aktivem Serum inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde der Anteil der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt

III.4 ATG und Alemtuzumab induzieren vergleichbare, *Komplement-abhängige* Zytotoxizität in primären CLL-Zellen

Zunächst haben wir den *Komplement-abhängigen* Anti-CLL Effekt von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® mit dem der monoklonalen Antikörper Alemtuzumab und Rituximab verglichen, indem wir CLL-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle II.1 und Tabelle III.1) der Antikörper und für 20 Stunden in Medium mit 25% aktivem Serum (als Quelle von Komplement) inkubierten. Die verwendeten Konzentrationen der Antikörper entsprechen *in-vivo* Erfahrungswerten aus der Stammzelltransplantation oder der Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie. Die ATG-, sowie die Rituximab – Konzentrationen sind dabei 10 bis 100-fach höher als die von Alemtuzumab (Campath-1H). Wie in Grafik III.7 zu sehen, war die zytotoxische Aktivität von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® dosisabhängig und erreichte ein mindestens so hohes Niveau wie die beobachtete Zytotoxizität von Alemtuzumab bei vergleichbaren klinischen Konzentrationen. Die gemessene Zytotoxizität von Thymoglobulin® bei einer Konzentration von 50µg/ml und 100µg/ml war maßgeblich höher als die von Alemtuzumab bei 5µg/ml und 10µg/ml ($p < 0,002$). Kein bedeutender Unterschied wurde zwischen der Zytotoxizität von ATG-Fresenius® verglichen mit Alemtuzumab in verschiedenen Konzentrationen gemessen.

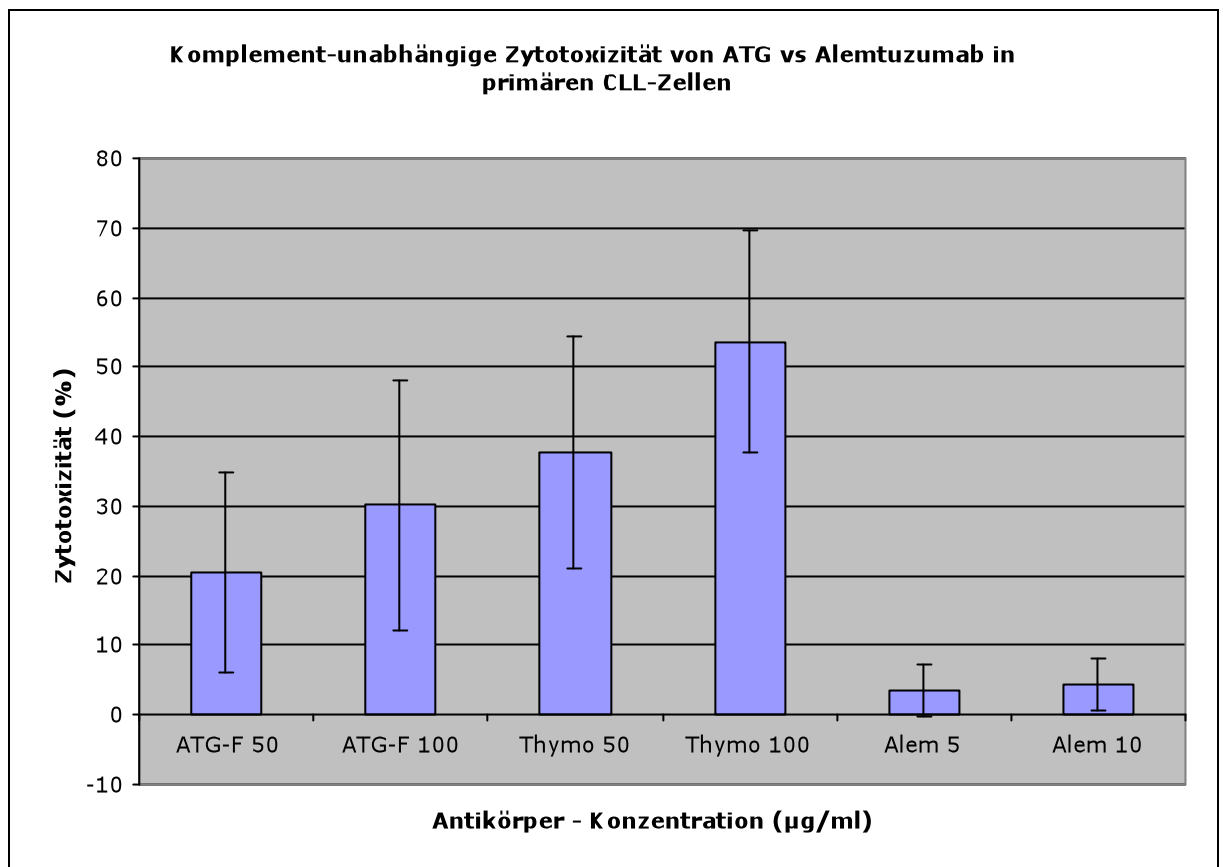


Grafik III.7: Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten (n=16) wurde in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (10-100µg/ml), Thymoglobulin® (10-100µg/ml) oder Alemtuzumab (1-10µg/ml) und 25% aktivem Serum inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde die Anzahl der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse (nur 10, 50 und 100 µg/ml dargestellt) werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt

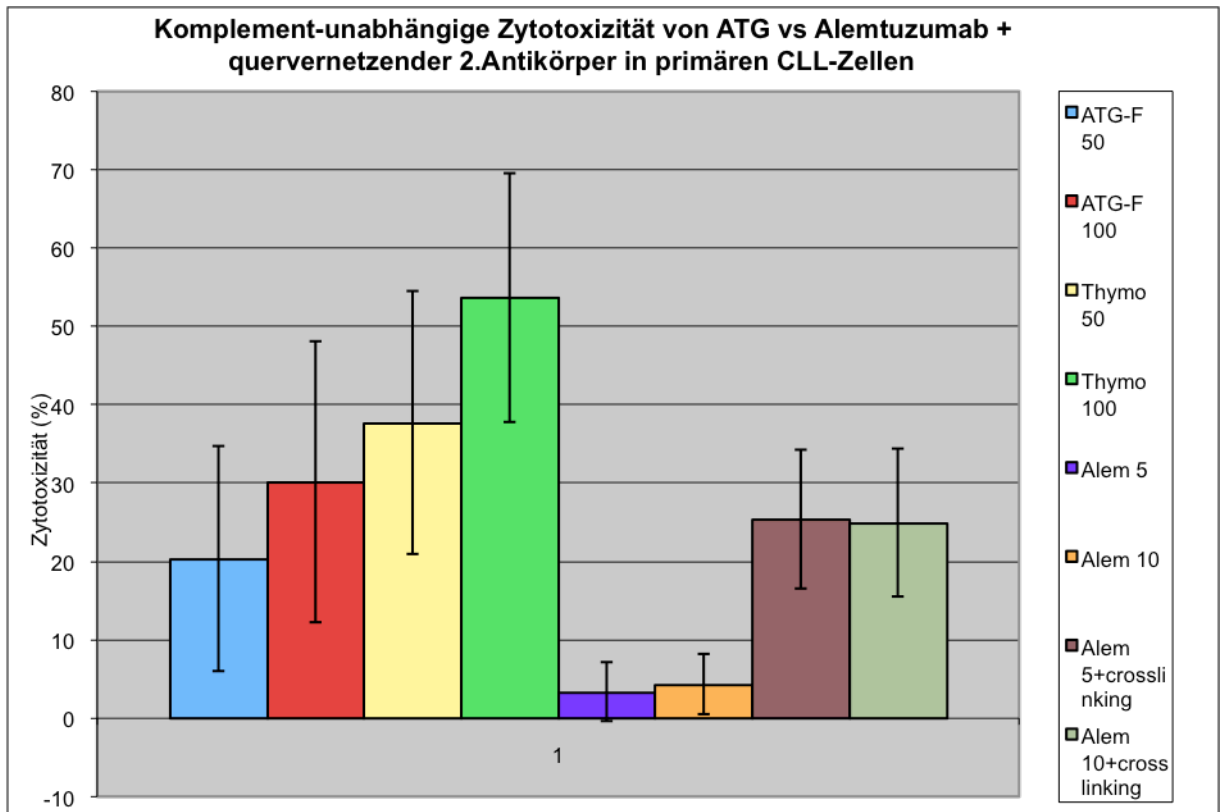
III.5 ATG induziert stärkere Komplement-unabhängige Zytotoxizität als Alemtuzumab in primären CLL-Zellen

In Abwesenheit von Komplement hatte Alemtuzumab praktisch keinen zytotoxischen Effekt auf CLL-Zellen (Grafik III.8). Erst die Zugabe eines quervernetzenden, 2. Antikörpers führte zu messbarer Zytotoxizität (Grafik III.9). Der Anti-CLL Effekt von ATG-Fresenius® bei einer Konzentration von 10µg/ml und 100µg/ml war bedeutend höher als der Anti-CLL Effekt von Alemtuzumab bei 5µg/ml und 50µg/ml ($p < 0,004$ und $0,0002$ respektive). Der Effekt von Thymoglobulin® bei 50µg/ml und 100µg/ml war gleichermaßen wesentlich höher als der Effekt von Alemtuzumab bei 5µg/ml und 10µg/ml ($p < 0,00005$ und $0,0003$

respektive). Die Zugabe eines quervernetzenden 2. Antikörpers in der Form eines Ziege Anti-Mensch IgG (Goat anti-human IgG) zu Alemtuzumab führte zu einer Zytotoxizität vergleichbar mit der von ATG-Fresenius®, aber wesentlich niedriger als die bei Thymoglobulin® beobachtete Zytotoxizität ($p < 0,03$ bei $50\mu\text{g/ml}$ vs. $5\mu\text{g/ml}$ und $p < 0,001$ bei $100\mu\text{g/ml}$ vs. $10\mu\text{g/ml}$). (Grafik III.8 und Grafik III.9)



Grafik III.8: Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten ($n=16$) wurde in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit ATG-Fresenius® ($10\text{-}100\mu\text{g/ml}$), Thymoglobulin® ($10\text{-}100\mu\text{g/ml}$) oder Alemtuzumab ($1\text{-}10\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde die Anzahl der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse (nur 50 und $100\mu\text{g/ml}$ dargestellt) werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt



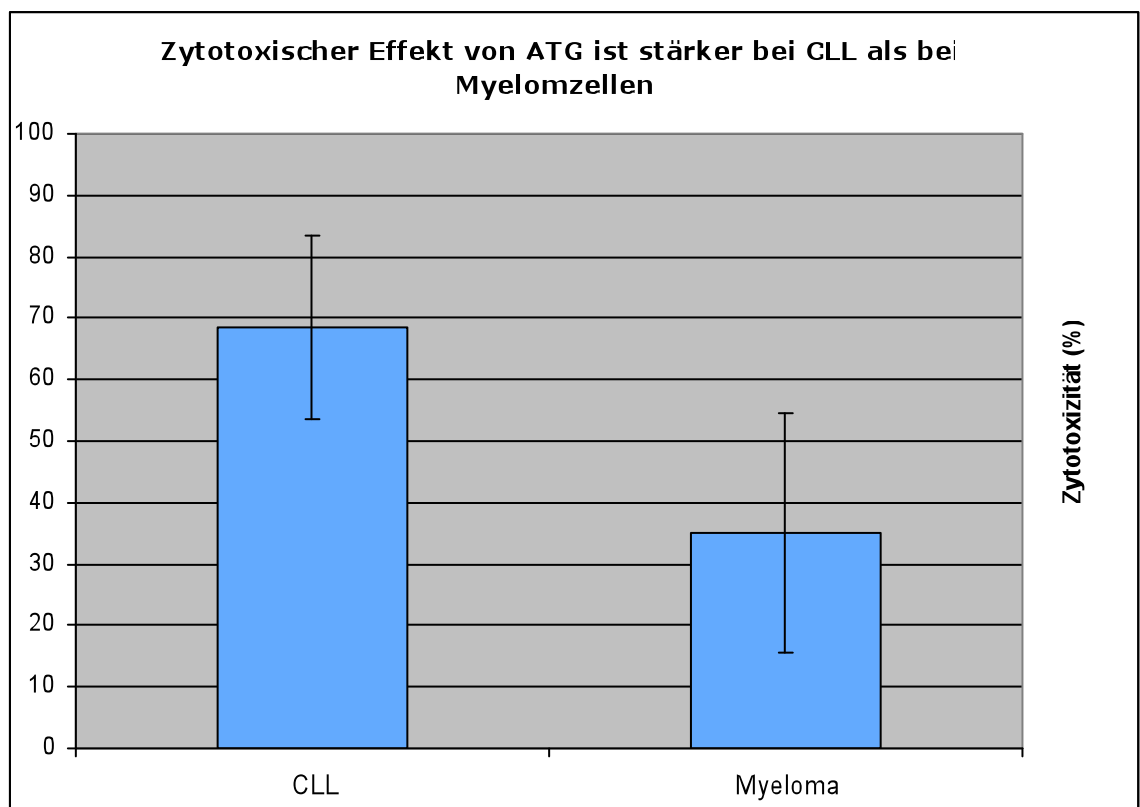
Grafik III.9: Primäre CLL-Zellen aus peripherem Blut von Patienten (n=16) wurde in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (50 und 100µg/ml), Thymoglobulin® (50 und 100µg/ml) oder Alemtuzumab (5 und 10µg/ml) mit (n=6) oder ohne (n=16) quervernetzendem goat-Anti-Human IgG Zweitantikörper (2. AK) inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde die Anzahl der lebenden Zellen durch Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

III.6 ATG induzieren stärkere Komplement-abhängige und Komplement-unabhängige Zytotoxizität als Rituximab

Der Wirkungsunterschied zwischen ATG und Rituximab ist deutlich höher als der zwischen ATG und Alemtuzumab. Rituximab konnte in-vitro keine Signifikante Zytotoxizität bei CLL-Zellen zeigen. Dies galt für alle Konzentrationen von 10-500 µg/ml. (Daten werden nicht gezeigt).

III.7 Die Anti-CLL Zytotoxizität von ATG ist stärker als die bei Myelomzellen beobachtete Zelltoxizität.

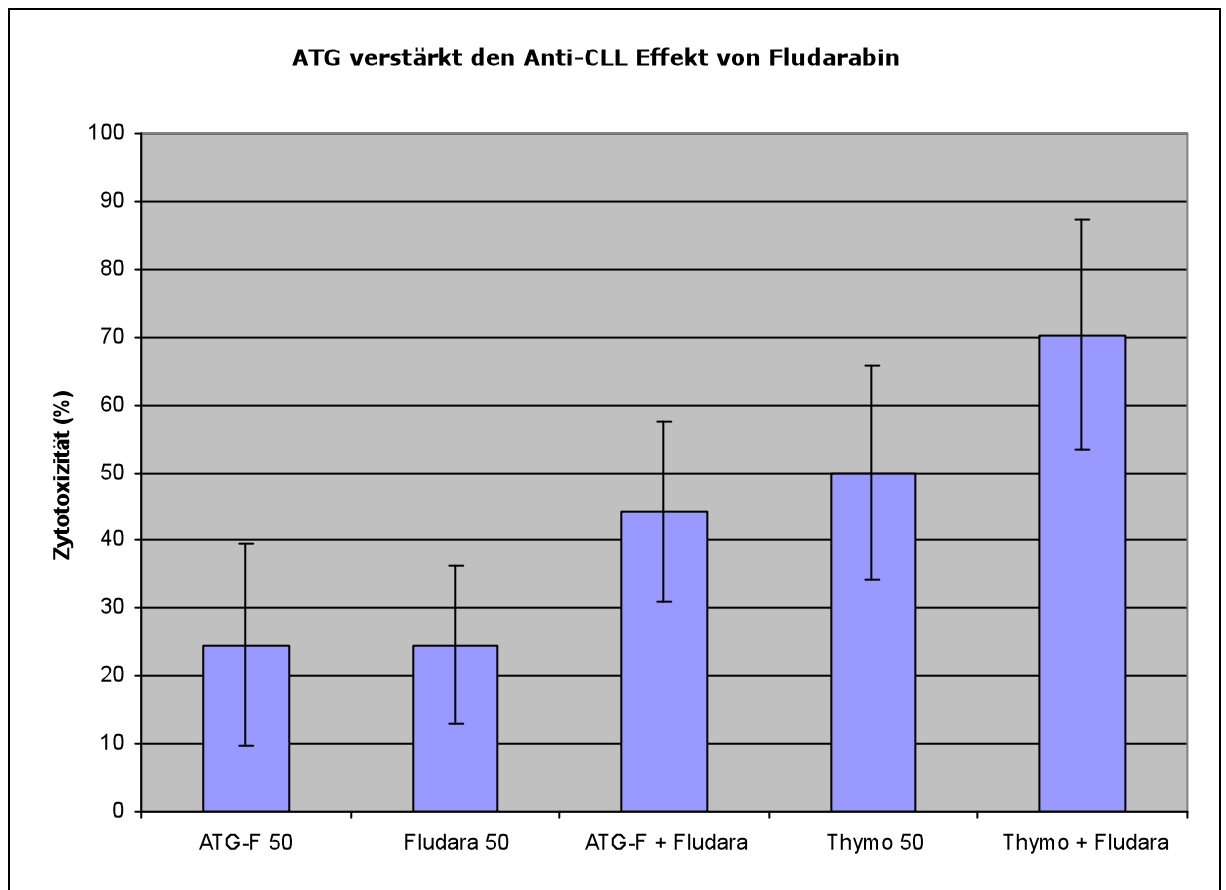
Ayuk et al. berichteten bereits über die starke Zytotoxizität von Antithymozytenglobulinen (ATG) gegen Myelomzellen, die sie bei Konzentrationen zwischen 100 und 1000µg/ml beobachtet hatten [112]. Einen Anti-CLL Effekt von ATG konnten wir sogar bereits bei niedrigeren Dosen feststellen. Um diese Beobachtung zu verifizieren, verglichen wir den Effekt von 100µg/ml ATG auf CLL-Zellen und Myelomzellen in Anwesenheit von Komplement. Die hier vorliegenden Daten demonstrieren, dass ATG eine höhere Zytotoxizität auf CLL Zellen im Vergleich zu Myelomzellen aufweist (Grafik III.10).



Grafik III.10 : Knochenmarkproben von Myelompatienten (n=6) und primäre CLL-Proben (n=16) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (100µg/ml) und 25 % für 20 Stunden inkubiert. Der Zelltod wurde nach Markierung mit 7-AAD (Myelomzellproben zuvor mit Anti-CD138 markiert) mittels Durchflußzytometrie festgestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

III.8 Der synergistische Effekt von ATG in Kombination mit Fludarabin bei CLL Zellen

Fludarabin ist einer der Eckpfeiler in der heutigen Behandlung der Chronischen lymphatischen Leukämie. Deshalb war es wichtig, mögliche Interaktionen zwischen ATG und Fludarabin zu erforschen. Hierzu wurden CLL-Proben von 5 Patienten in 4 unabhängigen Experimenten (jeweils reproduziert) mit ATG-Fresenius® oder Thymoglobulin® allein (10, 50 oder 100µg/ml) oder in Kombination mit Fludarabin (10, 50 oder 100 µM) inkubiert. Grafik III.11 zeigt, dass sowohl Thymoglobulin®, als auch ATG-Fresenius® den Anti-CLL Effekt von Fludarabin verstärken. Die insgesamt effektivste Wirkung konnte dabei von Thymoglobulin® 50 µg/ml in Kombination mit Fludarabin 50 µM erzielt werden (Grafik III.11). Analysen der Kombinationseffekte, die mit der Clcусyn® Software durchgeführt wurden, zeigten synergistischen Kombinationseffekt mit einem Kombinationsindex von 0,69, 0,25 und 0,29 bei ED50, ED75 und respektive ED90.



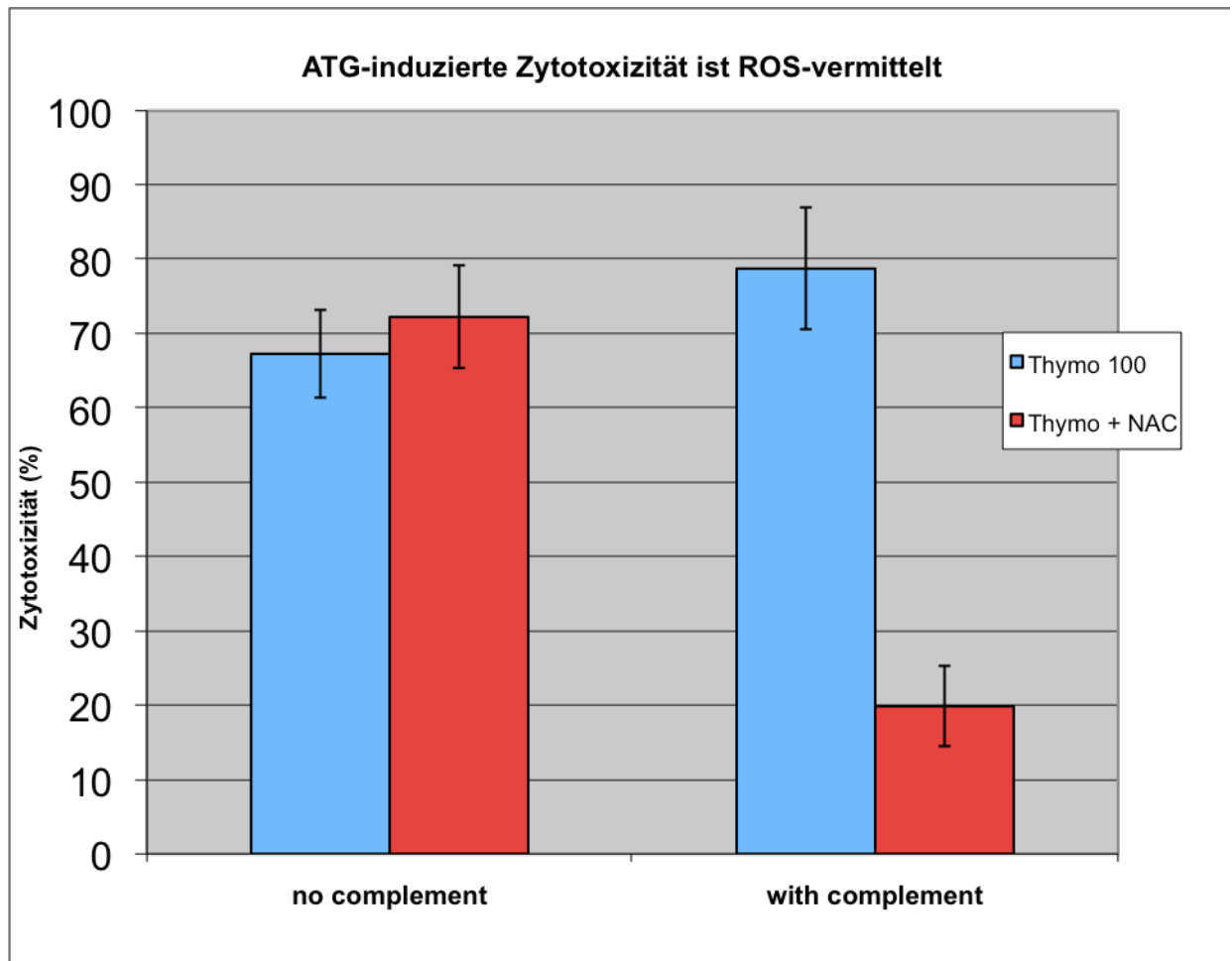
Grafik III.11: Primäre CLL-Zellen von peripherem Blut von 5 Patienten wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit Fludarabin $50 \mu\text{M}$ und ATG-Fresenius® ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder Thymoglobulin® ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) jeweils allein und in Kombination für 20 Stunden inkubiert. Der Zelltod wurde nach Markierung mit 7-AAD mittels Durchflußzytometrie festgestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt

III.9 Die ATG-induzierte, *Komplement-abhängige* Zytotoxizität wird von *Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)* vermittelt.

Über die von Alemtuzumab und Rituximab induzierte, „nicht-klassische“ Apoptose oder „para-Apoptose“ in CLL-Zellen, wurde bereits in einigen Publikationen berichtet. In dieser Arbeit konnte die ATG-induzierte *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität weder durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk, den Cathepsin-B Inhibitor CA-074, den Cathepsin-D Inhibitor Pepstatin-A, noch durch den (ROS-) Radikalfänger N-acetyl-Cystein, blockiert werden.

Die oben genannten Caspase- und Cathepsin-Inhibitoren konnten die *Komplement-abhängige* Zytotoxizität von ATG ebenfalls nicht hemmen.

Anders zeigte sich N-acetyl-Cystein: die *Komplement-abhängige* Zytotoxizität konnte durch die pre-Inkubation der CLL-Zellen durch N-acetyl-Cystein vor der Behandlung mit ATG und Komplement, sehr stark Inhibiert werden. (Grafik III.12)

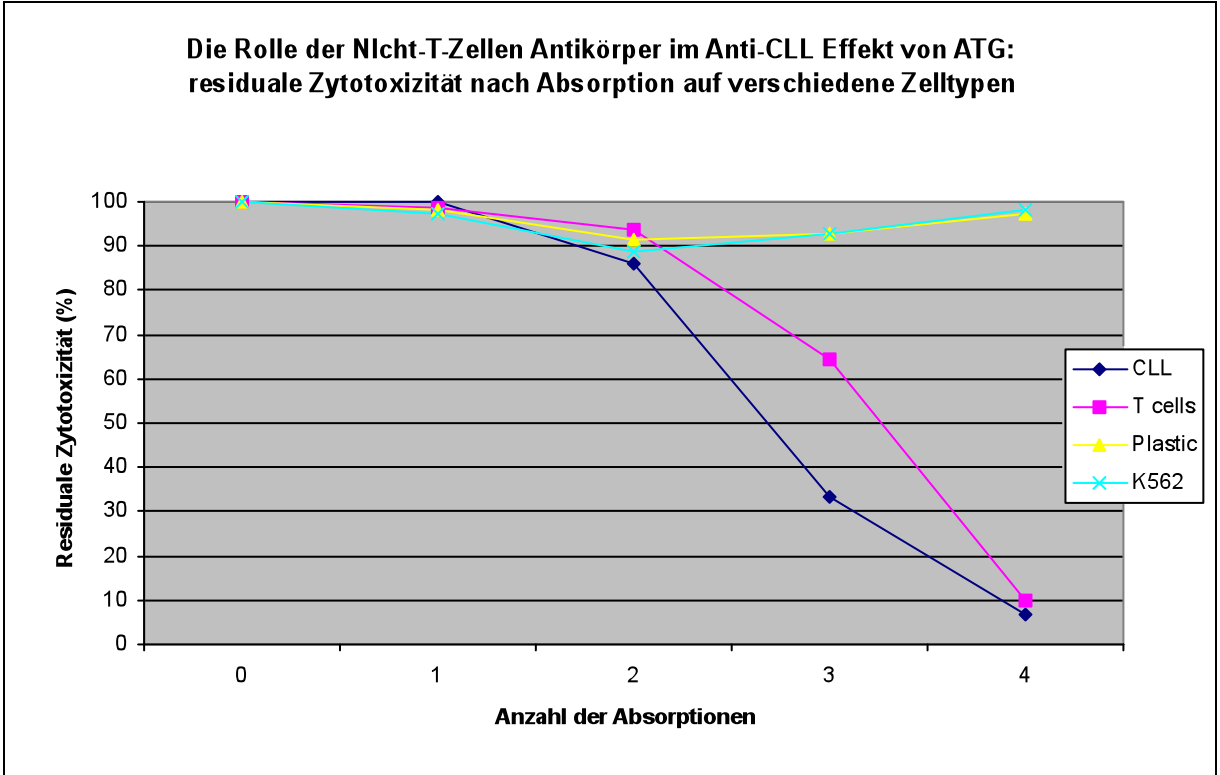


Grafik III.12: Primäre CLL-Zellen von peripherem Blut von insgesamt 3 Patienten wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit ATG-Fresenius® (100µg/ml) oder Thymoglobulin® (100µg/ml) mit oder ohne 25% aktivem Serum als Quelle für Komplement für 20 Stunden inkubiert. Zum Abfangen der ROS wurden die Zellen vor der Inkubation mit ATG-F oder Thymoglobulin® für 1 Stunde mit 40 µM N-acetyl-Cystein inkubiert. Der Zelltod wurde nach Markierung mit 7-AAD mittels Durchflußzytometrie festgestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen von insgesamt 6 unabhängigen Experimenten aus 3 CLL-Proben dargestellt.

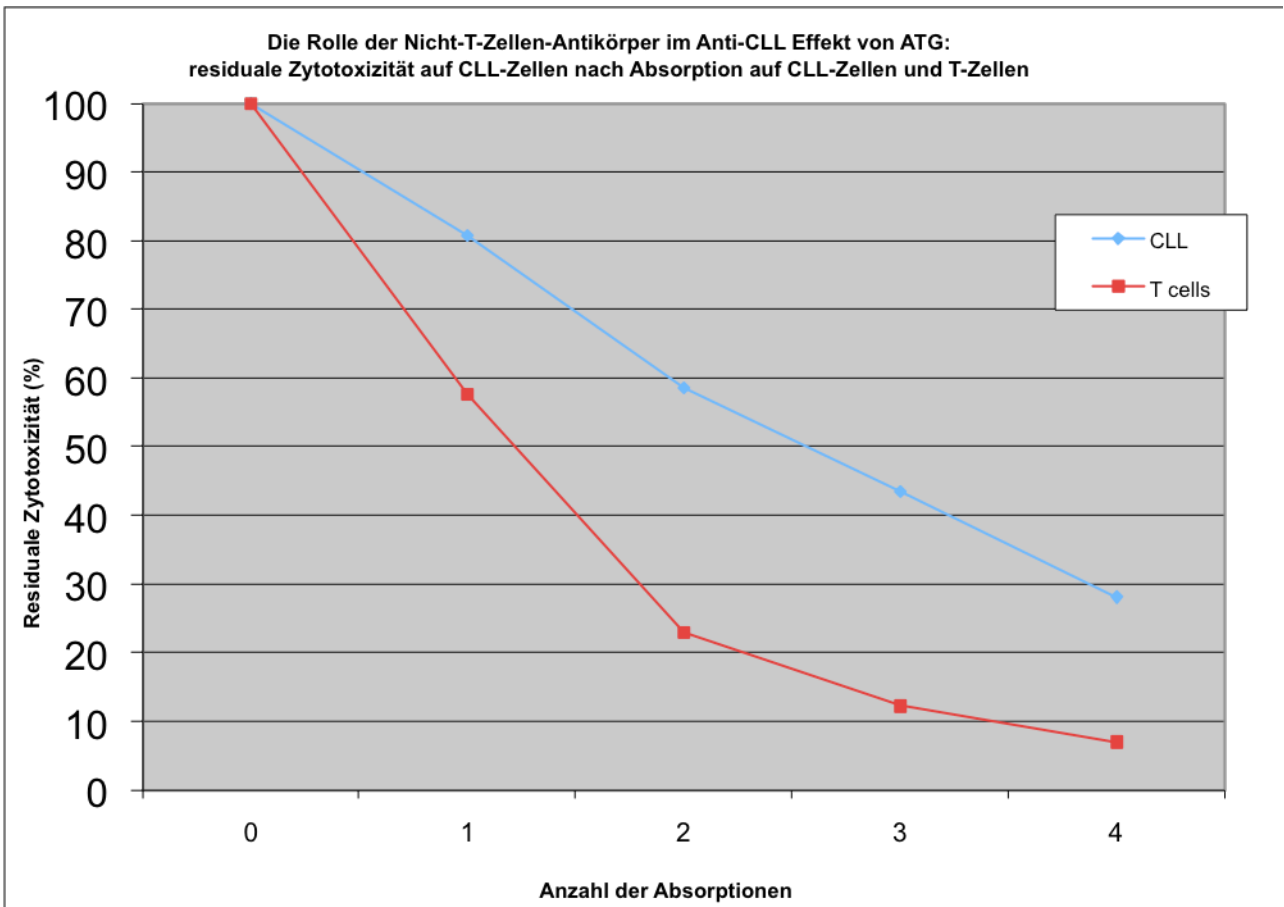
III.10 Die Rolle der Nicht-T-Zell-Antikörper beim Anti-CLL Effekt von ATG

Sowohl ATG-Fresenius® als auch Thymoglobulin® enthalten bekanntermaßen eine Vielfalt an Antikörpern gegen T-Zellen, B-Zellen, sowie dendritische Zellen und Plasmazellen. Wie spezifisch die Wirkung von ATG gegen CLL-Zellen ist, haben wir durch Absorptionsversuche untersucht. Interessanterweise hebt die Absorption von Thymoglobulin® auf primäre T-Zellen die Anti-CLL Aktivität weniger stark auf als die Absorption auf CLL-Zellen. Auf der anderen Seite wurde die Anti-T-Zellen Aktivität stärker durch die Absorption auf T-Zellen aufgehoben als durch die Absorption auf CLL-Zellen. Am deutlichsten wird dieser Zusammenhang bei Vergleich der residualen Zytotoxizität nach 3 Absorptionen (Grafik III.13a und III.13b). Eine Negativkontrolle wurde durch Absorption auf Plastik (also ohne Absorptionszellen) oder auf ATG resistente K562 Zellen durchgeführt. Sowohl Plastik als auch K562 Zellen hoben weder die Anti-Zellen Aktivität, noch die Anti-CLL Aktivität von Thymoglobulin® auf (Grafik III.13a und III.13b). Diese Daten weisen darauf hin, dass der Anti-CLL Effekt von ATG teilweise auf Antikörper zurückzuführen ist, die Antigene angreifen, welche auf CLL-Zellen vorkommen, aber von primären T-Zellen nicht oder nur in geringer Anzahl exprimiert werden.

**Die Rolle der Nicht-T-Zellen Antikörper im Anti-CLL Effekt von ATG:
residuale Zytotoxizität nach Absorption auf verschiedene Zelltypen**



**Die Rolle der Nicht-T-Zellen-Antikörper im Anti-CLL Effekt von ATG:
residuale Zytotoxizität auf CLL-Zellen nach Absorption auf CLL-Zellen und T-Zellen**



Grafik III.13a und 13b: Thymoglobulin® wurde in einer Konzentration von 400 µg/ml auf Zellpellets (Konzentration 2×10^7 /ml) mit CLL-Zellen, T-Zellen oder K562-Zellen absorbiert. Nach jeder Absorption wurde die residuale zytotoxische Aktivität im Überstand durch Inkubation für 20 h in Medium mit 25% aktivem Serum und anschließender Markierung mit 7-AAD per Durchflußzytometrie gemessen. Die Absorptionen im Reaktionsgefäß ohne Zellpellets (Plastik) dienten als Negativkontrolle. Die Zytotoxizität vor der ersten Absorption ist als Richtwert mit 100 % zu verstehen.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytotoxizität von Antithymozytenglobulinen (ATG) an Zellen der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) untersucht. Hierbei konnte erstmals herausgestellt werden, dass ATG einen zytotoxischen Effekt auf CLL-Zellen hat. Dieser Effekt ist *Komplement-unabhängig*, verstärkt sich aber in Anwesenheit von Komplement deutlich. ATG mit seiner bekannten Anti-T-Zell-Aktivität wird derzeit als immunsuppressive Substanz in der Transplantation solider Organe, sowie zur Prophylaxe der Spender-gegen-Wirt-Krankheit (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) und der Aplastischen Anämie verwendet [99,100]. Bonnefoy-Berard et al. waren es, die 1994 herausfanden, dass ATG neben ihrer Aktivität gegen T-Zellen auch eine Anti-B-Zell-Aktivität besitzen [110]. Ayuk et al. zeigten *in-vitro* einen zytotoxischen Effekt von ATG durch Induktion von Apoptose bei Myelomzellen auf [112]. Diese und weitere Studien bildeten die Grundlage für die Durchführung dieser Arbeit.

IV.1 Therapieansätze für die CLL

Die Mehrzahl der CLL Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnose symptomfrei, jedoch wird ein Großteil später aufgrund der fortgeschrittenen Erkrankung eine Therapie benötigen. Die konventionellen Therapiemöglichkeiten bei der CLL verfolgen zumeist eine palliative Zielsetzung: Alkylantien wie Chlorambucil oder Cyclophosphamid werden heute in Kombination mit Glukokortikoiden wie Prednisolon gegeben. Das Purinanalogon Fludarabin brachte eine weitere Therapieoption mit verbesserten Ansprechraten und Progressionsminderung bei gleich langem Überleben [32,33]. Es eröffnete gleichzeitig neue Kombinationsmöglichkeiten mit anderen für die CLL wirksamen Substanzen. Standardintial Behandlung ist heutzutage die Kombination aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab. Einen kurativen Therapieansatz bildet diese Kombinationstherapie jedoch nicht.

Die allogene Stammzelltransplantation ist der bisher einzige kurative Therapieansatz bei der CLL, allerdings vergesellschaftet mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate [59,62-67]. Daher kommt die allogene Stammzelltransplantation als first-line Therapie nicht in Frage, sondern wird meist bei jüngeren Patienten durchgeführt, die auf eine Initialtherapie mit Fludarabin nicht angesprochen oder ein Rezidiv erlitten haben. Ein Hauptproblem der allogenen Stammzelltransplantation ist die hohe Therapie-bedingte Sterblichkeit insbesondere durch Infektionen und Spender-gegen-Wirt-Krankheit (Graft versus Host Disease, GvHD). Auch nach der allogenen SZT kann es noch zum Rezidiv kommen. Bei der Entwicklung neuer Ansätze wäre es also wichtig, die Therapie-bedingte Sterblichkeit zu Senken, z.B. durch Senkung der Inzidenz und Schwere der GvHD. Gleichzeitig müsste das Ansprechen auf die allogene SZT erhöht und die Rezidivrate gesenkt werden. Dass dies möglich ist, ist für das Multiple Myelom gezeigt worden [114]. Weitere Langzeitstudien werden also weiterhin durchzuführen sein, um die genaue Wirkung und Indikation, sowie die Effektivität der allogenen Stammzelltransplantation zu untersuchen [69].

Neue Therapieansätze für die CLL sind also nach wie vor notwendig. Die bisher hoffnungsvollsten Vertreter sind dabei die monoklonalen Antikörper, von denen sich die meisten noch in Phase-I bis Phase-II Studien befinden, zwei jedoch bereits für den klinischen Gebrauch zugelassen sind - Alemtuzumab und Rituximab: sie haben die therapeutischen Möglichkeiten noch einmal erweitert und spielen so derzeit eine Schlüsselrolle in der Behandlung der CLL Patienten.

Die monoklonalen Antikörper Rituximab und Alemtuzumab

Die monoklonalen Antikörper Rituximab und Alemtuzumab spielen zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Schlüsselrolle in der Behandlung der CLL Patienten. Rituximab bindet das CD20 Antigen, welches auf der Oberfläche reifer B-Zellen und auf den meisten malignen B-Zell Lymphomen exprimiert wird. Alemtuzumab bindet CD52, ein Antigen, welches auf T-, B- und NK-Zellen exprimiert wird [115].

Die Wirksamkeit von Rituximab bleibt bei der CLL mäßig stark. Vor allem bei der therapierefraktären CLL konnte Rituximab als Monotherapeutikum keinen Erfolg erzielen [48]. Das bestätigen die hier vorliegenden *in-vitro* Ergebnisse. Eine Wirkung von Rituximab bei der CLL wurde *in-vivo* durch einige Studien belegt [45-47]. Ursache dafür könnte die niedrige Dichte der CD20 Antigene auf der Oberfläche der CLL Zellen sein [116]. Die Erniedrigung der Dichte zeigt sich zum einen im Vergleich zu anderen Non Hodgkin Lymphomen, zum anderen im Vergleich zur Dichte des CD52 Antigens [50]. Eine weitere Erklärung könnte ein durch die Vorbehandlung entstandener Mangel an Effektorzellen sein. Diese werden für die Antikörper-vermittelte Zelltoxizität (antibody-dependent-cytotoxicity, ADCC) benötigt. In vorher unbehandelten Patienten zeigte Rituximab folglich bessere Ansprechraten [48,49]. Eine von O'Brien et al. untersuchte ca. 6-fache Steigerung der Dosis von Rituximab zeigte keine Erhöhung der Ansprechraten [117]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Rituximab *in-vitro* unabhängig von den verwendeten Konzentrationen nur geringe Zytotoxizität bei CLL-Zellen zeigen konnte.

Alemtuzumab (Campath-1H) wurde in zahlreichen Studien vorwiegend in der second-line Therapie untersucht [43]. Hier steht einer eigentlich guten Wirkung die schwere immunsuppressive Nebenwirkung gegenüber: sie ist der limitierende Faktor in der Therapie der CLL mit Alemtuzumab. In einer randomisierten Studie von Wendtner et al. mit CLL Patienten im ersten Remissionsstadium führte die Behandlung (Konsolidierung) mit Alemtuzumab zu einem signifikanten Anstieg von progressionsfreiem Überleben. Die Studie musste aber wegen der hohen Infektionsrate im Alemtuzumab-Arm abgebrochen werden [118]. Eine ebenfalls hohe Infektionsrate zeigte eine Studie von Keating et al. aus dem Jahre 2002. Bei insgesamt 93 untersuchten Patienten wurde neben einer Infektionsrate von insgesamt 55 % bei 7 Patienten (7,5 %) die Reaktivierung eines Cytomegalovirus (CMV) beobachtet. 6 Patienten (6%) zeigten die Reaktivierung eines Herpes-simplex-Virus (HSV). Insgesamt war bei 18 % der Patienten eine Infektion die Todesursache [52]. Alemtuzumab ist also ein effektiver Therapieansatz für die CLL, aber verbunden mit ausgeprägten und häufig lethal endenden Infektionen.

IV.2 Antithymozytenglobuline

ATG-Fresenius® besteht aus polyklonalen Immunglobulinen aus Kaninchenserum, welches nach Immunisation mit der Jurkat-T-Zelllinie gewonnen wird. Thymoglobulin® enthält polyklonale Immunglobuline aus Kaninchenserum, die durch Immunisierung mit humanen Thymozyten gewonnen werden. Beide ATG enthalten aufgrund ihrer Herstellungsmethode Antikörper, die eine große Auswahl an Oberflächenantigenen erkennen können. Diese Antigene werden auf T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, als auch auf dendritischen Zellen exprimiert. Eine frühere Studie von Bonnefoy-Berard et al. hatte gezeigt, dass ATG unterschiedlicher Herkunft die Proliferation von B-Zellen verschiedener B-Zelllinien inhibiert [101]. Eine aktuellere Studie von Zand et al. zeigte einen pro-apoptotischen Effekt von Thymoglobulin® in naiven B-Zellen, aber auch in aktivierten B-Zellen und B-Gedächtniszellen *in-vitro* [111]. In dieser Arbeit wird die Anti-CLL Wirkung von zwei zugelassenen ATG-Sorten, ATG-Fresenius® und Thymoglobulin®, demonstriert. Des Weiteren wurden die Mechanismen der Zytotoxizität von ATG bei CLL Zellen genauer betrachtet und die beiden ATG auf ihre Zytotoxizität bei CLL Zellen mit Rituximab und Alemtuzumab (Campath 1-H) verglichen.

Antithymozytenglobuline im Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper Alemtuzumab

Zu den Ergebnissen dieser Arbeit gehört der Vergleich der Anti-CLL Aktivität zweier auf dem Markt erhältlicher Antithymozytenglobuline – ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® – mit Alemtuzumab. Die Konzentrationen der Antikörper wurden auf die beobachteten *in-vivo* Konzentrationen bei der CLL-Therapie und der allogenen Stammzelltransplantation [119-121] abgestimmt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die klinisch applizierten Dosen, sowie die gemessenen Plasma-Konzentrationen von ATG-Fresenius® 2-10mal höher sind als die von Thymoglobulin® [56].

Im Gegensatz zu Alemtuzumab zeigten beide ATG eine potente *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität gegen primäre CLL-Zellen. Dieser Effekt konnte weder durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk, noch durch

den Cathepsin-B Inhibitor CA-074 und den Cathepsin-A Inhibitor Pepstatin A blockiert werden. Eine solche Antikörper-induzierte, nicht-klassische, Caspase-unabhängige Apoptose wurde zuvor bereits an CLL-Zellen beschrieben [56].

Eine durch Alemtuzumab induzierte, *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität wurde nur in Anwesenheit eines zweiten, quervernetzenden Antikörpers beobachtet. Dieser Wirkungsmechanismus würde *in-vivo* eine untergeordnete Rolle spielen, da Patienten nur selten Anti-Globulin-Antikörper als Reaktion auf eine Behandlung mit Alemtuzumab bilden [122]. In Anwesenheit von Komplement war die gemessene Zytotoxizität von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® jedoch mindestens so hoch wie die bei Alemtuzumab gemessene. Erwähnenswert ist auch die Beobachtung, dass die Zytotoxizität gegen primäre CLL-Zellen wesentlich geringere Konzentrationen beider getesteten ATG erforderte als die für die Eliminierung von Myelomzellen notwendig war [112]. Nicht zuletzt diese Erkenntnisse zeigen, dass die Integration von ATG in Behandlungskonzepte für die Chronische Lymphatische Leukämie vielversprechend sein könnte.

Antithymozytenglobuline im Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab

Der Vergleich von ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® mit Rituximab fällt deutlich aus: unabhängig von der Anwesenheit von Komplement ist die Zytotoxizität gegen primäre CLL-Zellen der beiden ATG signifikant höher als bei Rituximab. Unsere Ergebnisse zeigen zudem, dass Rituximab konnte *in-vitro* unabhängig von den verwendeten Konzentrationen keine signifikante Zytotoxizität bei CLL-Zellen zeigen konnte.

ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® im Vergleich

Beide ATG zeigten eine signifikante zytotoxische Wirkung auf CLL-Zellen. Die dafür benötigten Dosen waren deutlich niedriger als die von Ayuk et al. für Myelomzellen gebrauchte Dosis. ATG-Fresenius® erreichte seine höchste in dieser Arbeit gemessene Wirkung mit und ohne Komplement bei einer Konzentration von 500µg/ml, Thymoglobulin® erreichte seine maximale gemessene Wirkung mit Komplement bei 100µg/ml und ohne

Komplement bei 500µg/ml. Bei vergleichbarer Konzentration ist der Anti-CLL Effekt von Thymoglobulin® also höher ist als der bei ATG-Fresenius® gemessene. Dies gilt sowohl für die *Komplement-abhängige* als auch für die *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität. Für die Hypothese einer klinischen Verwendung von ATG bei der CLL würde demnach wahrscheinlich eine geringere Konzentration von Thymoglobulin® benötigt, um einen relevanten zytotoxischen Effekt zu erzielen.

Der synergistische Effekt von ATG in Kombination mit Fludarabin bei CLL Zellen

Purinanaloga wie Fludarabin spielen heute eine zentrale Rolle in der CLL Therapie. Zusammen mit ATG fanden sie bei der CLL bisher nur in der Konditionierung für die allogene Stammzelltransplantation Verwendung [123]. Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass ATG den zytotoxischen Effekt von Fludarabin bei der CLL *in-vitro* verstärken. Dabei zeigt sich ein additiver Effekt in allen getesteten Proben. Der synergistische Effekt zeigte sich sowohl bei ATG-Fresenius® als auch bei Thymoglobulin®. Eine gemeinsame klinische Verwendung wäre also denkbar und muss ebenfalls in weiteren Studien geprüft werden.

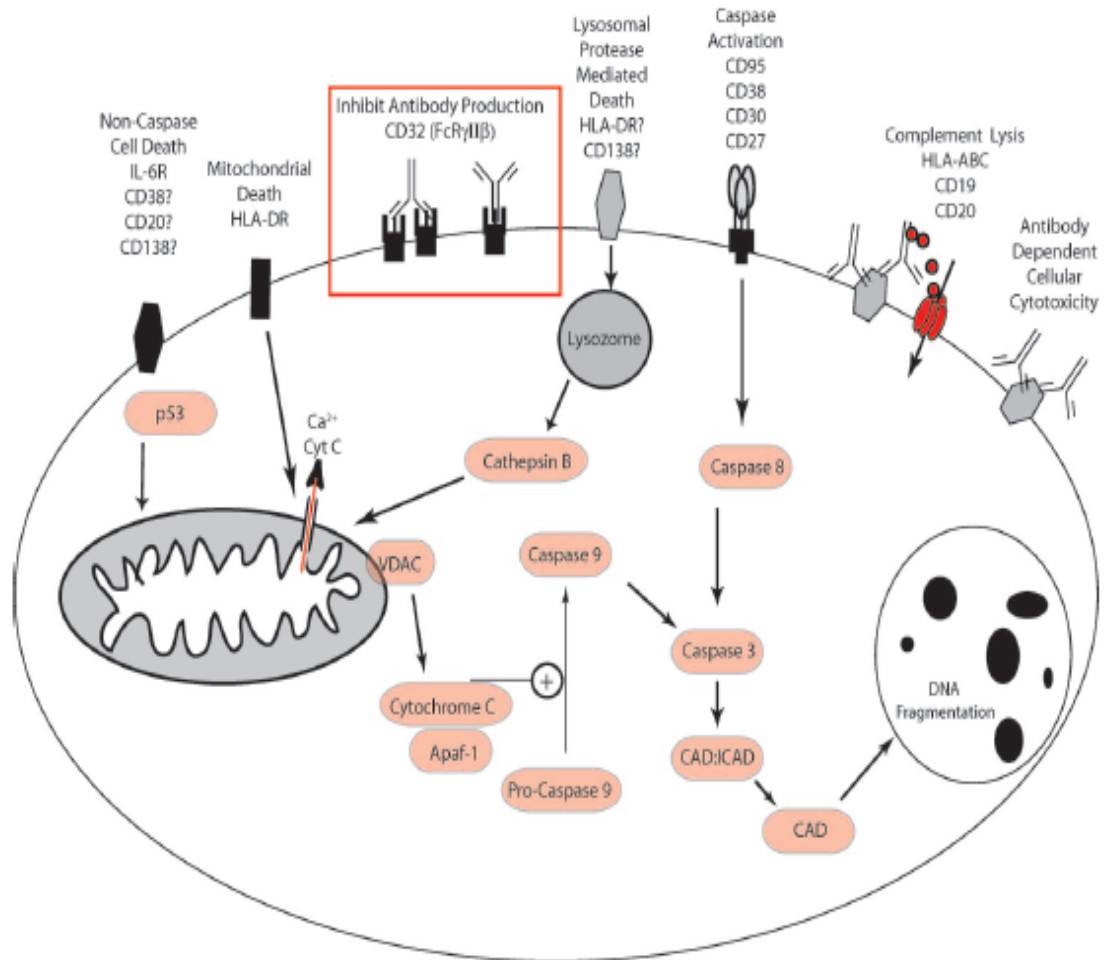
Die Rolle spezifischer Antikörper für den Anti-CLL Effekt von ATG

Der Anti-CLL Effekt von ATG wird durch die darin enthaltenen Antikörper bedingt: sie greifen zum Teil Epitope an, die von CLL-Zellen und primären T-Zellen geteilt werden. Dennoch enthalten sowohl ATG Fresenius als auch Thymoglobulin® aufgrund der Art ihrer Herstellung ebenfalls Antikörper gegen Epitope, die nicht auf primären T-Zellen exprimiert werden. Zu den Zielantigenen, die von beiden ATG Präparaten gebunden werden, gehören beispielsweise B-Zell spezifische Antigene wie CD21 oder CR2 (complement receptor type 2), sowie Antigene wie HLA-DR, β 2-Mikroglobulin, CD18 und CD11a, die auf B- und T-Zellen exprimiert werden [98]. Über Thymoglobulin® wurde berichtet, dass es Antikörper enthält, die weitere B-Zell spezifischere Antigene binden, darunter CD19, CD20, CD80 und CD40 [111]. Daher untersuchte diese Arbeit die Rolle der Nicht-T-Zell Antikörper für den zytotoxischen Effekt von ATG. Die Absorption von Thymoglobulin® auf primäre T-Zellen setzte die Anti-CLL

Aktivität von ATG weniger herab als die Absorption auf CLL-Zellen. Man könnte argumentieren, dass dieses Ergebnis aufgrund der höheren unspezifischen Bindung von ATG an CLL – als an T-Zellen entstand, jedoch ist gleichzeitig die Anti-T-Zell Aktivität stärker durch die Absorption auf T-Zellen herabgesetzt worden als durch die Absorption auf CLL-Zellen. Die hier vorliegenden Daten zeigen folglich, dass ein Teil der Anti-CLL Aktivität von Thymoglobulin® von Antikörpern vermittelt wird, welche Antigene binden, die zwar auf CLL-Zellen, also auf B-Zellen, exprimiert werden, jedoch nicht oder nur in sehr geringer Dichte auf primären T-Zellen.

Mechanismen der Zytotoxizität von ATG

Durch die Fülle an potenziell durch ATG gebundenen Antigenen ist die Möglichkeit der verwendeten Signalwege ebenso vielfältig. *Grafik 4.1* verdeutlicht diese komplexen Zusammenhänge: ATG induziert Apoptose über mindestens drei mögliche Wege, Caspase-abhängig, Cathepsin-B-abhängig und über die Depolarisierung der Mitochondrien-Membran. Weiterhin kommen als Wirkmechanismen eine Komplement-vermittelte Zelllyse (CDC) und der Mechanismus der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) als Vermittlungswege in Frage. [121]. Gerade diese Vielfalt an Möglichkeiten erschwert eine klare Aussage über den genauen Signalweg bei einzelnen Erkrankungen wie der CLL.



Grafik 4.1: mögliche Signalwege der ATG-induzierten B-Zell Apoptose. [aus: Zand MS. B-cell activity of polyclonal Antothymocyte globulin. Transplantation. 2006, 82:1387-95]

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass ATG ihre Wirkung unter anderem über die Induktion von Apoptose vermitteln. Zur Ermittlung des genauen Signalweges wurden die CLL-Zellen vor der Inkubation mit ATG mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk und den Cathepsin A-/und B-Inhibitoren Pepstatin A und CA-074 behandelt. Sie alle konnten den Anti-CLL Effekt von ATG nicht signifikant vermindern. Diese Erkenntnis spricht für das Vorliegen einer Antikörper-induzierten, Komplement-vermittelten, nicht-klassischen, Caspase-unabhängigen Apoptose. Ein weiterer Wirkmechanismus von ATG ist die *Komplement-vermittelten Zytolyse* (Complement-dependent Cytotoxicity, CDCC), die den Effekt der Apoptose verstärkt.

Wirkung der ATG bei der CLL im Vergleich zur Wirkung beim Multiplen Myelom

Ayuk et al. berichteten bereits 2005 über die Zytotoxizität von Antithymozytenglobulinen (ATG) gegen Myelomzellen, die sie bei Konzentrationen zwischen 100 und 1000 µg/ml beobachtet hatten [112]. Ein Anti-CLL Effekt von ATG konnte hier bereits bei niedrigeren Dosen (100 µg/ml) festgestellt werden. Ein Grund hierfür könnte sein, daß in ATG mehr Antikörper gegen B-Zellen als gegen Myelomzellen gerichtet sind.

Die Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welchen Signalweg die Anti-CLL Wirkung von ATG nimmt. Von Zentraler Bedeutung war dabei die Rolle der Reaktiven-Sauerstoffspezies (ROS). Es konnte gezeigt werden, dass der Radikalfänger N-Acetyl-Cystein (NAC) die Anti-CLL Wirkung signifikant vermindert, was die Schlussfolgerung nahe legt, dass diese CLL- toxische Wirkung von ROS vermittelt wird. Die Rolle von ROS bei der Wirkung anderer Substanzen wie Adaphostin war ja bereits nachgewiesen worden [96]. Ausgehend von den durch Peng et al. gesammelten Erkenntnissen über den membranösen C5b-9 Komplex, der ROS aktiviert und damit die dem Komplement eigene Wirkung der Lyse von Zellen auf den Weg bringt [98], bestätigt diese Arbeit die vorangegangene These der von ATG ausgehenden, *Komplement-vermittelten* Zelllyse. ROS allein scheint also nicht verantwortlich für die Apoptose der CLL – Zellen zu sein, sondern vielmehr als Vermittler der *komplement-vermittelten* Zytolyse (Complement-dependent Cytotoxicity, CDC) Die genaue Rolle der ROS bleibt jedoch auch weiter unklar und bedarf einer genaueren Untersuchung.

IV.3 Ausblick auf eine mögliche klinische Anwendung von Antithymozytengloulin

ATG wird in der Klinik als ein enorm potentes immunmodulatorisches Agens in der Transplantation solider Organe, sowie zur Prophylaxe der Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) und der Aplastischen Anämie verwendet [99,100].

Fallberichte von Patienten mit CLL und pure red cell anemia weisen auf einen möglichen klinischen Anti-CLL Effekt von ATG hin [124,125]. Ein limitierender Faktor für die Verwendung von ATG bei der Chronischen Lymphatischen Leukämie ist sicherlich die starke Immunsuppression, sowie eine hohe Infektionsrate mit teils beträchtlichen Folgen, die mit ihrer Applikation assoziiert sein könnte. Einige in ATG enthaltene Antikörper binden Antigene, die auch auf nicht-lymphoiden Zellen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophilen und Endothelzellen vorkommen und damit bei hoher Dosierung schwere Nebenwirkungen verursachen können [126].

Eine weitere Schwierigkeit bei der Verwendung von ATG in der Standard-Behandlung für die CLL wäre die Entwicklung von Antiglobulinen (Anti-rabbit) Antikörpern. Sie würden die wiederholte Gabe von ATG erheblich erschweren. Im Kontext der autologen oder allogenen Stammzelltransplantation könnte ATG jedoch schon bald in die Konditionierungsschemata zur Verbesserung des Effekts der Chemotherapie eingebracht werden. In einer aktuellen Studie von Lowsky et al. aus dem Jahre 2005 zur Allogenen Stammzelltransplantation mit Reduced intensity conditioning (RIC) und einer Total-Lymphatischen Bestrahlung (total- lymphoid radiation – TLI) mit 800cGy und Thymoglobulin® (Dosis: 5 x 1,5mg/mg KG) zeigte sich bei 7 der 16 Patienten mit malignen lymphatischen Erkrankungen ein Tumorrückgang außerhalb des TLI-Feldes. Die Autoren schrieben diesen Effekt einem Graft-versus-lymphoma Effekt zu, obgleich die Inzidenz von Graft-versus-Host-Disease (GvHD) bei diesen Patienten bemerkenswert niedrig blieb [127]. In diesem Kontext drängt sich aber der Hinweis auf, dass der Tumorrückgang auch durch einen direkten Effekt von Thymoglobulin® auf die Lymphom-Zellen bedingt sein könnte. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den zytotoxischen Effekt von ATG auf Lymphom-Zellen (also auch auf CLL-

Zellen). Dieser Effekt wird bei der Planung von Konditionierungsregimen bei der Stammzelltransplantation in Betracht zu ziehen sein.

All diese Fragen werden in weiteren klinischen Studien speziell für die CLL zu prüfen sein. Diese Arbeit legt im Bezug auf die CLL einen Grundstein, indem sie die *in-vitro* Zytotoxizität von ATG aufzeigt und darüber hinaus einen wichtigen Hinweis auf die Wirkmechanismen gibt.

V. Zusammenfassung

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist eine nach wie vor unheilbare Erkrankung. Ein bisheriger Eckpfeiler der Therapie ist das Purinanalogon Fludarabin. Neuere für die CLL zugelassene und verwendete monoklonale Antikörper sind Rituximab und Alemtuzumab (Campath-1H). Der einzige bisher bekannte potentielle kurative Ansatz ist die allogene Stammzelltransplantation, allerdings vergesellschaftet mit hohen Morbiditäts – und Mortalitätsraten. Antithymozytenglobuline (ATG) werden als Immunsuppressiva zur Abstoßungsprophylaxe bei soliden Transplantationen, zur GvHD-Prophylaxe bei autologen Stammzell- und Knochenmarktransplantationen, sowie zur Therapie der aplastischen Anämie verwendet. Bei der GvHD-Prophylaxe mit ATG als Teil eines Reduced intensity conditioning (RIC) mit einer Total-Lymphatischen Bestrahlung (total- lymphoid radiation – TLI) zeigte sich bei Patienten mit malignen lymphatischen Erkrankungen ein Tumorrückgang außerhalb des TLI-Feldes, welcher auf einen alleinigen Anti-Lymphom Effekt von ATG schließen lässt. Ein zytotoxischer Effekt von ATG gegen Zellen des multiplen Myeloms wurde bereits nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit zeigt nun die *in-vitro* Zytotoxizität zweier kommerziell erhältlicher ATG - ATG-Fresenius® und Thymoglobulin® - gegen CLL-Zellen. Beide ATG-Präparate induzierten deutlich *Komplement-unabhängige*, dosis-abhängige Zytotoxizität in allen gemessenen Proben. Die Anwesenheit von Komplement konnte diesen Effekt nochmals deutlich verstärken.

Im Vergleich konnte Alemtuzumab keine signifikante *Komplement-unabhängige* Zytotoxizität zeigen. Die *Komplement-abhängige* Zytotoxizität beider ATG ist bei klinisch relevanten Dosen immer mindestens so hoch wie bei Alemtuzumab. Rituximab konnte im Vergleich gar keine nennenswerte Zytotoxizität erzielen. Beide ATG konnten die Wirkung von Fludarabin *in-vitro* im Sinne eines Synergismus verstärken. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, einen Hinweis auf die intrazelluläre Vermittlung der Apoptose durch ATG zu geben. ATG-induzierte Zytotoxizität konnte weder durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk, noch

durch die Cathepsin-Inhibitoren CA-074 und Papstatin-A gehemmt werden, jedoch durch den Radikalfänger N-acetyl-Cystein. Folglich wird ATG-induzierte Zytotoxizität durch Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS) vermutlich als Teil einer *Komplement-vermittelten* Zytolyse (Complement-dependent Cytotoxicity, CDC) vermittelt. Die Absorption von ATG auf primäre T-Zellen zeigte, dass der Anti-CLL Effekt von ATG offenbar auf Antikörper zurückzuführen ist, die Antigene binden, welche nicht auf primären T-Zellen exprimiert werden. Dies lässt auf eine B-Zell-spezifische Wirkung von ATG schließen.

Antithymozytenglobuline sind also ein effektiver Wirkstoff gegen die CLL *in-vitro*. Die vorliegenden Ergebnisse erfordern nachfolgend eine weitergehende klinische Untersuchung zur Bestätigung dieses Effekts *in-vivo*. ATG könnte dann in Zukunft eine wichtige Substanz zur Behandlung der Chronischen Lymphatischen Leukämie und anderer B-Zell Lymphome werden.

Literatur

- [1] Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. Kompendium internistische Onkologie. Kapitel Chronische Lymphatische Leukämie (Emmerich B, Hallek M). 3.Auflage, Springer Berlin. 1999, S.208-242
- [2] Bannerji R, Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leucemia. *Curr. Opin in Oncology*. 2000: 22-29
- [3] Rozman C, Montserrat E. chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995, 333:1052-1057
- [4] Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cells disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994, Vol.8:1640-1645
- [5] Kokhaei P, Palma M, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Oncology*. 2005, 16(Supplement 2):ii113-ii123
- [6] Gahrton et al, Extra Chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia, *Lancet* 1:146-147 (letter). 1980
- [7] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in Chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*. 2000
- [8] Hallek, Emmerich – Chronische, lymphatische Leukämie, 2.Auflage, Unimed. 2005
- [9] Juliusson G, Merup M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin oncol*. 1998, 25:19-26
- [10] Shanafelt TD, Kay NE. The Clinical and Biologic Importance of Neovascularization and Angiogenic Signaling Pathways in chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol*. 2006, 33(2):174-185
- [11] Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. BCL2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Current treat options oncol*. 2003, 4(3):211-218
- [12] Juliusson et al, Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities, *N Engl J Med*. 1990
- [13] Hiddemann, Huber, Bartram. *Die Onkologie*. Band 2, Springer, Berlin. 2004:pp.1976-1995
- [14] Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998, 102:1515-1525

- [15] Chiorazzi et al. Mechanisms of disease: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005, 352(8): 804-815
- [16] Chiorazzi N, Ferrarini M. B-cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003. 21:841-894
- [17] Rai KR, Sawitzky A, Cronkite EP et al., clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975, 46:219-234
- [18] Classen, Diehl, Kochsiek – *Innere Medizin*, 5.Auflage, Urban&Fischer. 2004, S.769-772
- [19] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981, 48:198-206
- [20] Seiler T, Döhner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol.* 2006, 33(2):186-194
- [21] Hansen MM, Chronic lymphocytic leukemia. *Scand J Haemat Suppl* 18. 1973
- [22] Lima de M, O'Brien S, Lerner S, Keating MJ. Chronic Lymphocytic Leukemia in the young patient. *Semin Oncol.* 1998, 25:107-116
- [23] Molica S, Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors and impact on survival and treatment, *Leuk Lymphoma.* 1994, 13:203-214
- [24] Morrisson VA, The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia *Semin Oncol.* 1998, 25:98-106
- [25] Wadhwa PD, Morrisson VA. Infectious complications of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol.* 2006, 33(2): 240-249
- [26] Baer MR, Stein RS, Dessypris EN. Chronic lymphocytic leukemia with hyperleukocytosis. The hyperviscosity syndrome. *Cancer.* 1985, 15:2865-2869
- [27] Hamblin TJ, Autoimmune Complications of Chronic Lymphocytic Leukemia *Semin Oncol.* 2006,33(2):230-239
- [28] Gilles FJ, O'Brien SM, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation, *Semin Oncol.* 1998, 25:117-125
- [29] Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter's Transformation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol.* 2006, 33(2): 250-256
- [30] Idestrom K, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia and well differentiated lymphocytic lymphoma with continuous low-or intermittent

high-dose prednumustine versus chlorambucil/prednisolon. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1982, 18(11):1117-1123

- [31] Brugiatelli M, Bandini G, et al. Management of chronic lymphocytic leukemia: practice guidelines from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2006, 91(12):1664-1673
- [32] Johnson S, Smith AG, Loffler H, et al. Multicentre prospective randomised trial of Fludarabine vs. cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone (CAP) for treatment of advanced stage chronic lymphocytic leukemia
- [33] Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000, 343:1750-1757
- [34] Dreger P, Stilgenbauer S, Benner A, et al. The prognostic impact of autologous stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia: a risk-matched analysis based on the VH gene mutational status. *Blood.* 2004, 103:2850-2858
- [35] Pavletic ZS, et al. Outcome of allogeneic stem cell transplantation for B cell chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(7):717-722
- [36] Dreger P, Brand R, Niederwieser D et al. RIC lowers TRM of allogeneic stem Cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: a population-matched analysis. *Leukemia* 2005, 19: 1029-103
- [37] Kasamon YL, Flinn IW. Management of symptomatic, untreated, chronic lymphocytic leukemia. *Blood reviews.* 2006, doi:10.1016/j.blre.2006.10.001
- [38] Faria JR, Yamamoto M, et al. Fludarabine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia – the role of p53, BCL-2, Bax, Mcl-1 and Bag-1 proteins. *Braz J Med Biol Res.* 2006, 39:327-333
- [39] Huang P, Sandoval A, et al. Inhibition of RNA transcription : a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia.* 2000, 14:1405-1413
- [40] Consoli U, El-Tounsi I, Sandoval A, et al. Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in Chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2000, 91:1742-1748
- [41] Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz J, et al. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1989, 74(1): 19-25
- [42] Keating MJ, O'Brien S, Kontoyiannis d, et al. Results of first salvage therapy for patients refractory to a Fludarabine regimen in chronic, lymphatic leucemia. *Leuk Lymphoma,* 2002;43:1755-1762

- [43] Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55: 188-196
- [44] Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, et al. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood*. 2002, 99(4):1314-19
- [45] Byrd JC, Shinichi K, Flinn IW, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 2002,99(3): 1038-1043
- [46] Schulz H, Klein SK, Rehwald U, et al. on behalf of the German CLL study group (GCLLSG). Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002, 100(9):3115-20
- [47] Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005, 105:49-53
- [48] Hainsworth JD, Litchy S, et al. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's-lymphoma. *J clin oncol*. 2002, 20: 4261-67
- [49] Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, et al. Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003, 21:1746-51
- [50] Huhn D, von Schilling C, Emmerich B, et al. for the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Rituximab therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001, 98(5): 1326-1331
- [51] Hale G. CD52 (Campath-1). *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001, 15:386-391
- [52] Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 2002, 99(10):3554-3561
- [53] Lundin J, Kimby E, Bjorkholm M, et al. Phase-II trial of subcutaneous anti CD-52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first line treatment for patients with B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2002, 100:768-773
- [54] Faderl S, Coutré S, Byrd JC, et al. The evolving role of Alemtuzumab in management of patients with CLL. *Leukemia*. 2005, 19:2147-2152

- [55] Nüchel H, Frey UH, Roeth A, Duehrsen U, Siffert W. Alemtuzumab induces enhanced apoptosis in vitro in B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by antibody-dependent cytotoxicity. *Europ J of Phram.* 2005, 514:217-224
- [56] Stangelmaier M, Reis S, Hallek M. Rituximab und Alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2004, 83:634-645
- [57] Mone AP, Cheney C, Byrd JC, et al. Alemtuzumab induces caspase-independent cell death in human chronic lymphocytic leukemia cells through a lipid raft-dependent mechanism. *Leukemia.* 2006, 20:272-279
- [58] Montserrat E, Esteve J, Schmitz N, Dreger P, et al. Autologous stem cell transplantation for CLL: analysis of the impact on overall survival in 107 patients from The International Project for CLL/Transplants. *Blood.* 1999; 94 (Suppl. 1): 397a
- [59] Esteve J, Montserrat E, Dreger P, et al. Stem cell transplantation (SCT) for chronic lymphocytic leukemia (CLL): outcome and prognostic factors after autologous and allogeneic transplants. *Blood.* 2001; 98: 482a.
- [60] Dreger P, Montserrat E. Allogenic and autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002, 16: 985-992
- [61] Milligan DW, Fernandes S, Dagupta R, et al. Results of the MRC pilot study show autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and archives a high percentage of molecular responses. *Blood.* 2005, 105:397-404
- [62] Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, et al. for the EBMT and IBMT. HLA-identical sibling bone marrow transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Internal medicine.* 1996,3:311-315
- [63] Jarque I, Palau J, Sanz G, et al. Delayed complete response after allogenic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1993,82:1036-1038
- [64] Michallet M, Corront B, et al. Allogenic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia: 17 cases report from the EBMTG. *Bone Marrow Transplant.* 1991: 7(4):275-279
- [65] Mehta J, Powles R, Singhal S, et al. Clinical and hematologic response of chronic lymphocytic and prolymphocytic leukemia persisting after allogenic bone marrow transplantation with the onset of acute graft-versus-host-disease: possible role graft-versus-leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996, 17:371-375
- [66] Ritgen M, Stilgenbauer S, von Neuhoff N, et al. Graft-versus-leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status:

implications of minimal residual disease measurement with quantitative PCR. *Blood*. 2004, 104:2600-2602

- [67] Dreger P, Brand R, Hansz J, et al. on behalf of the Chronic Leukemia working party of the EBMT. Treatment-related mortality and graft-versus-leukemia activity after allogenic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia using intensity-reduced conditioning. *Leukemia*. 2003, 17:841-848
- [68] Schetelig J, Thiede C, Zander AR, Siegert W, et al. Evidence of a Graft-Versus-Leukemia Effect in Chronic Lymphocytic Leukemia After Reduced-Intensity Conditioning and Allogeneic Stem-Cell Transplantation: The Cooperative German Transplant Study Group. *J of clin oncol*. 2003,21(14): 2747-2753
- [69] Dreger P, Corradini P, Montserrat E, et al, on behalf of the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. Indications for allogenic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 2007, 21:12-17
- [70] Zent CS, Chen JB, Schichman SA et al. Alemtuzumab (Campath 1H) does not kill chronic lymphocytic leukemia cells in serum free medium. *Leuk Res* 2004, 28: 495-507
- [71] Zent CS, Secreto RS, Shanafelt TD, et al. Direct and complement dependent cytotoxicity in CLL cells from patients with high-risk early-intermediate stage chronic lymphocytic leukemia (CLL) treated with alemtuzumab and rituximab. *Leuk Res* 2008, 32: 1849-1856
- [72] Browning JB. B cells move to center stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nature reviews* 2006, July, Volume 5: 564-576
- [73] Ludwig DL, Pereira DS, Zhu Z, et al. Monoclonal Antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene*. 2003, 22: 9097-9106
- [74] Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 2002,88(3):1038-43
- [75] Clynes RA, Towers L, Presta LG, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000, 29:70-74
- [76] Golay J, Manganini M, Fachinetti V, et al. Rituximab mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against neoplastic B-cells is stimulated strongly by Interleukin-2. *Hematologica*. 2003, 88:1002-1012
- [77] Kerr JF, Wyllie AH, et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972, 26: 239-257.

- [78] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 2005, 84: 627-639.
- [79] Danilov AV, Danilova OV, Klein AK, Huber BT. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Mol Med.* 2006,6(6):665-675
- [80] Galuzzi L, Zamzami N, Kroemer G, et al. Methods for the assessment of mitochondrial membran permeabilization in apoptosis. *Apoptosis.* 2007, DOI 10.1007/s10495-007-0720-1
- [81] Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: BCL-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukemia. *Immunology.* 2005, 114: 441-449
- [82] Reed JC. BCL-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 1997, 34:9-19
- [83] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998, 281:1312-1316.
- [84] Adams JM. Ways of dying. Multiple pathways to apoptosis. *Genes and Dev.* 2003, 17:2481-2495
- [85] Wagener C. Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren. 2.Auflage 1999, Thieme Verlag Stuttgart. S. 121
- [86] Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem.* 2001, 11:526-534
- [87] Ghobrian IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005,55:178-194
- [88] Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin chim acta.* 2004, 342(1-2):41-69 (abstract)
- [89] Deiss LP, Galinka H, Barissi H, et al. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* 1996, 15: 3861-3870
- [90] Öllinger K, Brunk UT. Oxidative stress-induced cellular injury is mediated through lysosomal damage. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 19: 565-574
- [91] Oberdanner CB. Reactive Oxygen Species (ROS) in biologischen Systemen und ihre Rolle in der Apoptose. Diplomarbeit Uni Salzburg, Institut für Physik und Biophysik. 2004, S. 53.
- [92] Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic Therapy-induced Apoptosis in Epidermoid Carcinoma Cells - Reactive Oxygen Species and

- mitochondrial inner membrane permeabilisation. *J of Biol Chem.* 2001, 276 (50): 47379-47386
- [93] Antunes F, Cadenas E, Brunk UT. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J.* 2001, 356:549-555
- [94] Dare E, Li W, Zhivotovsky B, et al. Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radical Biol Med.* 2001, 30(12):1347-1356
- [95] Zhou Y, Hileman EO, Keating MJ, et al. Free Radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood.* 2003, 101(10):4098-4104
- [96] Chandra J, Hackbarth J, Le S, et al. Involvement of reactive oxygen species in adaphostin-induced cytotoxicity in human leukemia cells. *Blood.* 2003, 122(13): 4512-19
- [97] Shanafelt TD, Lee YK, Bone ND, et al. Adaphostin induced apoptosis in CLL-B cells is associated with induction of oxidative stress and exhibits synergy with fludarabine. *Blood.* 2005, 105(5): 2099-2106
- [98] Peng H, Takano T, Cybulsky AV, et al. Complement Activates the c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase in Glomerular Epithelial Cells. *J Immunol.* 2002, 169(5): 2594-2601
- [99] Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow transplant* 2005, 35(3): 225-31
- [100] Gluckmann E et al. Multicenter randomized study comparing cyclosporine-A alone and antithymocyte globulin with prednisone for treatment of severe aplastic anaemia. *Blood* 1992, 15;79(10): 2540-46
- [101] Bonnefoy-Berard N, Flacher M, Revillard JP. Antiproliferative Effect of Antilymphocyte Globulins on B Cells and B-Cell lines. *Blood.* 1992, 79(8): 2164-70
- [102] Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, et al. Thymoglobulin[®] targets multiple plasma cell antigens and has in vitro and in vivo activity in multiple myeloma. *Leukemia.* 2006, 20:1863-1869
- [103] Crowe JS, Hall VS, Smith MA, et al. Humanized monoclonal antibody ALEMTUZUMAB: myeloma cell expression of genomic constructs, nucleotide sequence of cDNA constructs and comparison of effector mechanisms of myeloma and Chinese Hamster ovary-cell-derived material. *Clin Exp Immunol.* 1992, 8:105-110
- [104] Bonnefoy-Berard N, Reveillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant.* 1996, 15:435-442

- [105] Basara N, Roemer E, Fauser AA, et al. Non-myeloablative stem cell transplants: Reduced intensity preparative regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. *Bone marrow transplant.* 2002, 30: 651-659
- [106] Dreger P, Milligan D, Niederwieser D et al. Reduced Intensity conditioning lowers treatment-related mortality of allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a population- matched analysis. *Leukemia* 2005, 19: 1029-1033
- [107] Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood.* 2002, 1;99(3): 1071-8.
- [108] Kroger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, et al. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood.* 2002 1;100(3):755-60
- [109] Nagler A, Aker M, Or R, et al. Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* 2001 29(3):362-70
- [110] Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, et al. Apoptosis induced by Polyclonal Antilymphocyte Globulins in Human B-Cell Lines. *Blood.* 1994., 83 (4):1051-1059
- [111] Zand MS, Vo T, Huggins J, et al. Polyclonal Rabbit Antithymocyte Globulin Triggers B-cell and Plasma-cell Apoptosis by multiple pathways. *Transplant.* 2005, 79:1507-1515
- [112] Ayuk FA, Fang L, Kroger N, et al. Antithymocyte Globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells. *Exp Hematol.* 2005, 33:1531-1536
- [113] Zand MS, Vo T, Pellegrin T, et al. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood.* 2006, 107(7):2895-2903
- [114] Ayuk F, Perez-Simon JA, Kröger N et al. Clinical impact of human Jurkat T-cell-line-derived antithymocyte globulin in multiple myeloma patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2008 Sep; 93(9):1343-5
- [115] Hale G, Xia MQ, Tighe HP, et al. The Campath-1 antigen (CDw52). *Tissue antigens.* 1990, 35: 118-127
- [116] Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, et al. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 1992, 40: 259-263

- [117] O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2001, 19: 2165–2170
- [118] Wendtner CM, Ritgen M, Schweighofer CD et al. Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission – experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL study group (GCLLSG). *Leukemia.* 2004, 18: 1093-1101
- [119] Eiermann TH, Lambrecht P, Zander AR. Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow patients. *Bone Marrow transplant.* 1999, 23: 779-781
- [120] Rebello P, Cwynarski K, Varughese M et al. Pharmacokinetics of CAMPATH-1H in BMT patients. *Cytotherapy.* 2001, 3:261-267
- [121] Zand MS. B-cell activity of polyclonal Antithymocyte globulin. *Transplantation.* 2006, 82:1387-95
- [122] Hale G, Rebello P, Brettman LR et al. Blood concentrations of alemtuzumab and antiglobulin responses in patients with chronic lymphocytic leukemia following intravenous or subcutaneous routes of administration *Blood.* 2004, 104:948-55
- [123] Schetelig J, Thiede C, Zander AR, et al. Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group. *J Clin Oncol.* 2003, 15,21(14):2747-53
- [124] Singal R, Winfield DA and Greaves M, Bone marrow aplasia in B cell chronic lymphocytic leukaemia: successful treatment with antithymocyte globulin. *Journal of Clinical Pathology* 1991;44:954-956
- [125] Radosevich CA, Gordon LI, Weil SC, Marder RJ, Rosen ST, Complete resolution of pure red cell aplasia in a patient with chronic lymphocytic leukemia following antithymocyte globulin therapy. *JAMA* 1988; 5:723-5.
- [126] Bonnefoy-Berard N, Fournel S, Genestier L, Revillard JP et al. In vitro functional properties of antithymocyte globulins: clues for new therapeutic applications? *Transplantation Proceedings*, 1998, 30 (8): 4015-17
- [127] Lowsky R, Takahashi T, Liu YP et al. Protective conditioning for acute Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2005, 353 (13): 1321-1331

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zunächst PD Dr. med. Francis Ayuketang Ayuk, der mich in jeder Phase der Promotion mit Rat und Tat unterstützte und mich zur Fertigstellung dieser Arbeit stets motiviert hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Patienten, die durch ihr Einverständnis zur Verwendung der Blutproben die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst möglich machten.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank den medizinisch technischen Assistentinnen Sandra Hannemann, Dung Ludwig und Anita Badbaran, die mich nicht nur in die Laborarbeit einführten, sondern mich auch bei der Ausführung der praktischen Experimente unterstützten.

Danke auch an Prof. Dr. Boris Fehse, unter dessen Laborleitung hervorragende Arbeitsbedingungen für den praktischen Teil der Promotion geschaffen wurden.

Nicht zuletzt danke ich meinem Bruder Dr. med. Ziad Atassi und meiner Freundin Sarah Pospischil für die zahlreichen guten Ratschläge und die stete Motivation.

Curriculum vitae

Name	Nabil Atassi
Geburtsdatum	20. Januar 1981
Geburtsort	Lüdenscheid
Anschrift	Bundesstraße 85 20144 Hamburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

Beruf

Seit 2008	Martini-Klinik am UKE Assistenzarzt in der Facharztausbildung Urologie
-----------	---------------------------------------------------------------------------

Publikationen

2008	Complement-dependent and complement-independent cytotoxicity of polyclonal antithymocyte globulins in chronic lymphocytic leukaemia. Ayuk FA, Atassi N, Kröger N et al. Leuk Res 2008, Aug;32(8):1200-6
------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Studium

2001	Universität Hamburg Studiengang: Humanmedizin
2003	Ärztliche Vorprüfung
2003-2008	Humanmedizin im klinischen Abschnitt
2004/2005	Studienjahr an der Université Pierre et Marie Curie, Faculté Pitié-Salpêtrière in Paris, Frankreich
Juni 2008	2. Ärztliche Prüfung

Praktisches Jahr

1.Tertial	Chirurgie: Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
2.Tertial	Urologie: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
3.Tertial	Innere Medizin: Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg

Zivildienst

2000-2001	Urologische Station 9I Allgemeines Krankenhaus Eilbek, Hamburg
-----------	-------------------------------------------------------------------

Schulbildung

1987-1991	Silcher-Grundschule Eislingen, Baden-Württemberg
1991-2000	Erich Kästner Gymnasium Eislingen, Baden Württemberg Abschluss mit Abitur

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift