

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des
Onkologischen Zentrums am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf.

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

Vergleich der Zytotoxizität von Antithymozytenglobulinen in verschiedenen hämatologischen Malignitäten

Dissertation

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

vorgelegt von:

Nadja Michaelsen, geb. Maywald
aus Paderborn

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.08.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr.med. Francis Ayuketang Ayuk

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr.med. Dr.rer.nat. Sonja Loges

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr.med. Nicolaus Kröger

I. INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINFÜHRUNG</u>	1
2	<u>EINLEITUNG</u>	2
2.1	MULTIPLES MYELOM	2
2.2	AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE	9
2.3	CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE	14
2.4	CHRONISCHE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE	18
2.5	ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION	22
2.5.1	MULTIPLES MYELOM UND ALLOGENE TRANSPLANTATION	23
2.5.2	AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE UND ALLOGENE TRANSPLANTATION	24
2.5.3	CHRONISCH MYELOISCHE LEUKÄMIE UND ALLOGENE TRANSPLANTATION	25
2.5.4	CHRONISCH LYMPHATISCHE LEUKÄMIE UND ALLOGENE TRANSPLANTATION	26
2.6	FAZIT	28
2.7	ATG UND IHRE HERSTELLUNG	28
2.8	ATG UND IMMUNMODULATION	29
2.9	ATG UND ANTI- TUMOR- WIRKUNG	30
2.10	SCHLÜSSELMECHANISMEN DER ZYTOTOXIZITÄT VON ATG	33
2.10.1	UNSPECIFISCHE UND SPEZIFISCHE IMMUNABWEHR UND KOMPLEMENTSYSTEM	33
2.10.2	APOPTOSE	36
2.11	FRAGESTELLUNG	38
3	<u>MATERIAL</u>	40
3.1	ZELLINIEN	40
3.2	ZELLKULTURMEDIEN, ZUSÄTZE UND HANDHABUNG	41
3.3	BLUTMATERIAL: PROBENGWINNUNG UND -AUFBEREITUNG	41
3.4	KOMPLEMENTGEWINNUNG	42
3.5	POLYKLONALE ANTIKÖRPER UND KONTROLLIMMUNGLOBULINE	43
3.6	CHEMIKALIEN	44
3.7	PFLEGE UND REINIGUNG DES DURCHFLUSSZYTOMETERS	44
3.8	GERÄTE	45
3.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN	46
4	<u>METHODEN</u>	47
4.1	TRENNVERFAHREN	47
4.2	KRYOKONSERVIERUNG	48
4.3	AUFTAUEN DER ZELLEN UND PATIENTENPROBEN	48
4.4	ZELLVIABILITÄTSBESTIMMUNG DURCH TRYPANBLAUFÄRBUNG	48
4.5	ZELLZAHLBESTIMMUNG UND -EINSTELLUNG	49
4.6	VERSUCHSREIHEN	50
4.6.1	<u>VERSUCHSREIHE A):</u> BELASTUNG VERSCHIEDENER ZELLINIEN MIT AUSGEWÄHLTEN ANTIKÖRPERN MIT UND OHNE KOMPLEMENT- ZUSATZ	50
4.6.2	<u>VERSUCHSREIHE B):</u> BELASTUNG VON CLL- PATIENTENPROBEN	50
4.6.3	<u>VERSUCHSREIHE C):</u> BELASTUNG VON T-ZELLEN	51
4.7	DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	51
4.8	7-AAD- FÄRBUNG UND MESSUNG AM DURCHFLUSSZYTOMETER	52
4.9	DATENAUSWERTUNG	53
4.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG	54

5	ERGEBNISSE	55
5.1	ATG- PRÄPARATIONEN ZEIGEN EINE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT GEGENÜBER PRIMÄREN T- ZELLEN IN KOMPLEMENT- ABHÄNGIGEN UND – UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN.	55
5.2	ALLE VERWENDETEN ATG- PRÄPARATIONEN WIRKEN ZYTOTOXISCH GEGENÜBER DEN UNTERSUCHTEN MYELOMZELLINIEN.	57
5.3	MIT KOMPLEMENT WERDEN AUCH PRIMÄR RESISTENTE ZELLINIEN EINER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG DURCH ATG- PRÄPARATIONEN ZUGÄNGLICH.	61
5.4	UNTERSCHIEDLICHE ZYTOTOXIZITÄT IN MYELOISCHEN ZELLINIEN.	64
5.5	ZYTOTOXIZITÄT IN LYMPHATISCHEN ZELLINIEN UND CLL- PATIENTENPROBEN.	68
6	DISKUSSION	81
6.1	EINFÜHRUNG	81
6.2	ANTIKÖRPER	82
6.3	ATG UND T- ZELLEN	82
6.4	ATG UND MULTIPLES MYELOM	83
6.5	ATG UND AKUTE BZW. CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE	85
6.6	ATG UND LYMPHOME	87
6.7	ATG- EIN KLINISCHER AUSBLICK	89
7	ZUSAMMENFASSUNG	91
8	LITERATURVERZEICHNIS	93
	DANKSAGUNG	104
	CURRICULUM VITAE	105
	ERKLÄRUNG	107

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	engl.: <i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Akzelerationsphase
ATCC	engl.: <i>American Type Culture Collection</i>
ATG	Antithymozytenglobulin
Atgam	ATGAM®
ATG-F	ATG- Fresenius®
BSG	Blutsenkungs- Geschwindigkeit
Bsp.	Beispiel
bzw.	Beziehungsweise
BC	engl.: <i>blast crisis</i>
β2M	β2- Mikroglobulin
c	gewünschte Zellzahlkonzentration
C (1-9)	engl.: <i>complement</i>
ca.	circa
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CDC	engl.: <i>complement- dependent cytotoxicity</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Chronische Phase
DCLLSG	Deutsche CLL Studiengruppe
DMSO	Dimethyl- Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
evtl.	eventuell
F	Verdünnungsfaktor
Fab	Fragment engl.: <i>antigen binding</i>
FACS	engl.: <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Fas	Entspricht CD95, Apo-1
Fc	Fragment engl.: <i>crystallizable</i>
FCS	Fötale Rinderserum, engl.: <i>fetal calf serum</i>
FISH	engl.: <i>fluorescence- in- situ- hybridization</i>
FL	Fluoreszenzkanal

FSC	Vorwärtsgerichtete Streustrahlung, engl.: <i>forward light scatter</i>
G- CSF	engl.: Granulocyte- Colony stimulating factor
ggf.	gegebenenfalls
GvHD	engl.: <i>Graft-versus-host disease</i>
GvL	engl.: <i>Graft-versus-leukemia</i>
h(IgG)	engl.: <i>horse</i> (Immunglobulin G)
HLA	engl.: <i>human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IMDM	engl.: <i>Iscove 's Modified Dulbecco 's Media</i>
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
Lympho	Lymphoglobulin®
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
MM	Multiplres Myelom
MPS	Myeloproliferative Syndrome
µg/ ml	Mikrogramm pro Milliliter
NF	Neubauerkammer- Faktor
NHL	Non- Hodgkin- Lymphom
NK- Zellen	Natürliche Killer- Zellen
nm	nanometer
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
Ph (-Chromosom)	Philadelphia (-Chromosom)
PML	engl.: <i>promyelocytic leukemia</i>
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
POEMS- Syndrom	engl.: <i>polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes</i>
%	Prozent
p53	Protein 53
m ²	Quadratmeter
RIC	engl.: <i>reduced- intensity- conditioning</i>
R(IgG)	engl.: <i>rabbit</i> (Immunglobulin G)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI 1640	Zellkulturmedium, am <i>Roswell Park Memorial Institute</i> entwickelt
SOCR	engl.: <i>Statistics Online Computational Resource</i>
sog.	sogenannt

SSC	Seitwärtsgerichtete Streustrahlung, engl.: <i>side scatter</i>
SZT	Stammzelltransplantation
7-AAD	7- Amino- Actinomycin D
Thymo	Thymoglobulin®
TKI	Tyrosinkinase- Inhibitoren
TRM	engl.: treatment-/ transplantation- related mortality
z.B.	zum Beispiel
ZSg	Gesamtvolumen der Zellsuspension
ZZ	ermittelte Zellzahl
ZZa	absolute vitale Zellzahl
°C	Grad Celsius

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 2.9.1: KOMPLEMENTSYSYSTEM.	35
ABBILDUNG 2.9.2: APOPTOSE.	37
ABBILDUNG 4.1: DURCHFLUSSZYTOMETER.	52
ABBILDUNG 4.2: EICHUNG AM DURCHFLUSSZYTOMETER.	53
ABBILDUNG 5.1: ZYTOTOXIZITÄT IN PRIMÄREN T- ZELLEN.	56
ABBILDUNG 5.2.1: ZYTOTOXIZITÄT IN KMS-12-BM.	58
ABBILDUNG 5.2.2: ZYTOTOXIZITÄT IN MYELOMZELLINIEN.	59
ABBILDUNG 5.2.3: ZYTOTOXIZITÄT IN MYELOMZELLINIEN.	60
ABBILDUNG 5.3.1: ZYTOTOXIZITÄT IN EJM.	62
ABBILDUNG 5.3.2: ZYTOTOXIZITÄT IN U266.	63
ABBILDUNG 5.4.1: ZYTOTOXIZITÄT IN BV- 173.	65
ABBILDUNG 5.4.2: ZYTOTOXIZITÄT IN HL-60.	66
ABBILDUNG 5.4.3: ZYTOTOXIZITÄT IN K562.	67
ABBILDUNG 5.5.1: ZYTOTOXIZITÄT IN RAJI-ZELLEN.	69
ABBILDUNG 5.5.2: ZYTOTOXIZITÄT IN JURKAT-ZELLEN.	70
ABBILDUNG 5.5.3: ZYTOTOXIZITÄT IN JVM-2-ZELLEN.	71
ABBILDUNG 5.5.4: ZYTOTOXIZITÄT IN CLL- PATIENTENPROBEN.	72

IV. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 5.1: ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER T- ZELLEN.	73
TABELLE 5.2: ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER MYELOMZELLINIEN.	74
TABELLE 5.3: ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER MYELOMZELLINIEN.	75
TABELLE 5.4: ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER MYELOISCHEN ZELLINIEN.	76
TABELLE 5.5: ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER LYMPHATISCHEN ZELLINIEN.	78
TABELLE 5.6: ZYTOTOXIZITÄT GEGENÜBER PRIMÄREN CLL- PROBEN.	80

1 Einführung

Polyklonale Antithymozytenglobuline werden heutzutage aufgrund ihrer immunmodulatorischen Wirkung weit verbreitet in der allogenen Organ- und Stammzelltransplantation eingesetzt. Für ATG konnte ein protektiver Effekt nachgewiesen werden, da nach Transplantationen das Risiko für das Auftreten von Abstoßungsreaktionen, sowie für die akute und chronische Graft- versus- host- disease mit ATG vermindert wird. Neben der immunmodulatorischen Aktivität haben mehrere Studien überdies in vitro einen direkten ATG- anti- Malignom- Effekt aufzeigen können.

Es stellt sich die interessante Frage, ob polyklonale Antithymozytenglobuline als Antikörper mit ihrer immunmodulatorischen und direkten Anti- Malignom-Wirkung das Dilemma zwischen therapiebedingten Nebenwirkungen und assoziierter Mortalität einerseits sowie hohem Rezidivrisiko andererseits zu schwächen oder gar aufzulösen vermögen und in wie fern ATG als primäre Malignom-Therapeutika in zukünftigen Behandlungsregimes Bestand haben können.

Bevor näher auf die polyklonalen Antithymozytenglobuline und ihre Wirkungsmechanismen eingegangen wird, erfolgt die Illustration der in der vorliegenden Dissertationsarbeit in diesem Zusammenhang vordergründig betrachteten malignen Entitäten.

2 Einleitung

2.1 Multiples Myelom

Definition: Bei dem Multiplen Myelom kommt es zur malignen klonalen Expansion reifer differenzierter B- Lymphozyten. Die sogenannten Plasmazellen besitzen knochendestruktive Eigenschaften und verdrängen die physiologische Hämatopoese. Außerdem synthetisieren sie nicht-funktionsfähige, als Paraproteine bezeichnete Immunglobuline.

In 15- 20 % der Fälle werden lediglich Leichtketten, die sogenannten Bence- Jones- Proteine gebildet [1].

Seltener vorkommend ist die solitäre ossär oder extraossär lokalisierte Tumorform, das Plasmozytom. Diese Sonderform besitzt eine günstigere Prognose als das Multiple Myelom [2].

Epidemiologie: Der Häufigkeitsgipfel liegt bei dem MM zwischen dem 60.- 70. Lebensjahr. Pro Jahr gibt es 6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Europa [3]. Es handelt sich um den häufigsten Tumor von Knochenmark und Knochen.

Ätiologie: Die ätiologischen Gründe sind in den meisten Fällen unbekannt. Wichtiger Einzelfaktor für ein erhöhtes Krankheitsrisiko scheint ionisierende Strahlung zu sein, wobei diese sowohl in größeren als auch in kleineren Konzentrationen Einfluss haben kann [4; 5]. Der Kontakt zu diversen Chemikalien, darunter Benzene und Pestizide, sowie Silikon sollen eine Rolle spielen [6; 7]. Genetische prädisponierende Faktoren schienen in Familienstudien ebenso bedeutend [8].

Eine chronische Antigenexposition soll darüber hinaus Einfluss auf die Krankheitsentstehung nehmen. Für das humane Herpesvirus 8 konnte bereits ein Zusammenhang nachgewiesen werden [9; 10].

Klinik/ Diagnostik: In frühen Stadien verläuft das multiple Myelom meist asymptomatisch, im späteren Verlauf zeigen sich Auswirkungen von Knochenläsionen und Paraproteinsynthese sowie von der Knochenmarksinfiltration mit Verdrängung der normalen Hämatopoese.

Über ausgeschüttete Zytokine werden Osteoklasten in ihrer Wirkung stimuliert, Osteoblasten hingegen gehemmt, sodass es zu fortschreitenden Knochendestruktionen mit pathologischen Knochenfrakturen, damit gegebenenfalls assoziierten neurologischen Störungen und hyperkalzämischen Krisen kommen kann [11-13].

Die Patienten beklagen in vielen Fällen Knochen- und Rückenschmerzen, die Hyperkalzämie kann Beschwerden wie Übelkeit, Polydipsie und Somnolenz verursachen [14]. Eine in diesem Rahmen entstehende Dehydratation kann in eine Niereninsuffizienz münden [15].

Die massive Synthese von Paraproteinen kann im weiteren Verlauf zum komplikationsbehafteten Hyperviskositätssyndrom führen, was neben neurologischen und Sehstörungen sowie stark erhöhter Blutungsneigung, kardiopulmonale Insuffizienz und Multiorganversagen mit sich bringen kann [16]. Insbesondere die Leichtkettenproteine können in diversen Organen akkumulieren und eine dauerhafte Schädigung derselben bewirken, so kann die Niere wiederum bis hin zur Insuffizienz in Mitleidenschaft gezogen werden [17]. Zu einem nicht unwesentlichen Anteil tritt im Verlauf der Myelomerkrankung die AL- Amyloidose mit Proteinablagerungen in Organen, Gewebeumbau und damit in der Folge einhergehenden Organfunktionsstörungen, sowie einer Verschlechterung der Allgemeinprognose auf [18]. Bei ausgeprägter Proteinurie kommt es zum Nephrotischen Syndrom. Die Paraproteinämie kann zudem unter anderem über immunologische Mechanismen eine periphere Polyneuropathie verursachen [19]. Seltener tritt im Rahmen von vorliegenden Plasmazeldyskrasien der POEMS- Symptomenkomplex mit Polyneuropathie, Organvergrößerungen, Endokrinopathie, monoklonaler Gammopathie und Hautveränderungen auf [20].

Der Mangel an regelrechten Antikörpern sowie die verdrängte Hämatopoese bedingen immer wiederkehrende hartnäckige Infektionen bei den Patienten. Im Zusammenhang mit der zunehmenden Knochenmarksinfiltration treten Symptome der Anämie und der Gerinnungsstörung in Erscheinung.

Ebenso tragen Autoimmunphänomene, wie die Bindung von Gerinnungsfaktoren durch monoklonale Immunglobuline, über einen

entsprechend entstandenen Mangel an Gerinnungsfaktoren zu einer gestörten Blutgerinnung bei.

Aus dem Krankheitsverlauf ergeben sich entsprechende diagnostische Möglichkeiten. So können sich in den laborchemischen Untersuchungen Veränderungen im Blutbild, auffällige Elektrolytwerte, erhöhte Nierenretentionsparameter, Zellyseindizien, Hinweise für einen erhöhten Knochenstoffwechsel, eine auffällige Serum-Elektrophorese, sowie eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit finden. Im Urin können monoklonale Immunglobuline oder Bence-Jones-Proteine nachweisbar sein. Im Knochenmark aber auch extramedullär und seltener extraossär können sich verdächtige Plasmazellansammlungen finden.

Bildgebende Verfahren wie Röntgen, CT und MRT können Knochendestruktionen bzw. Myelomherde sichtbar machen.

Das Multiple Myelom wird dann anhand des Vorkommens der diversen Auffälligkeiten diagnostiziert.

Hauptkriterien:

1. Histologischer Plasmozytomnachweis in Gewebebiopsie
2. Nachweis von > 30% Plasmazellen im Knochenmark
3. Monoklonales Paraprotein im Serum: IgG >35 g/l, IgA > 20 g/l; Bence- Jones- Proteine (kappa- oder lambda- Leichtketten) in der Urin- Elektrophorese: > 1 g/24h

Nebenkriterien:

- A. Nachweis von 10-30 % Plasmazellen im Knochenmark
- B. Monoklonales Paraprotein nachweisbar, jedoch quantitativ geringer als im Hauptkriterium
- C. Osteolytische Knochenläsionen
- D. Antikörpermangel: normales IgM < 0,5 g/l, IgA < 1 g/l, IgG < 6 g/l

Die Diagnose eines Multiplen Myeloms wird dabei bei Nachweis von mindestens einem Haupt- und einem Nebenkriterium (1+B, 1+C, 1+D, 2+B, 2+C, 2+D, 3+A, 3+C, 3+D) oder mindestens drei Nebenkriterien (A+B+C, A+B+D) gestellt.

Beim Nachweis von myelomassozierten Störungen der Organfunktionen kann man vom Vorliegen eines klassischen symptomatischen Multiplen Myeloms ausgehen. Hier finden sich die sogenannten „CRAB“ –Kriterien [21], d.h. ein erhöhter **C**alciumspiegel, eine **r**enale Insuffizienz, eine **A**nämie und Knochenläsionen (**b**one lesions). Davon abzugrenzen sind die Myelomvarianten und die MGUS (Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance) [22]. Varianten ohne Nachweis von „CRAB“ sind das indolente Myelom mit weniger nachweisbaren Knochenläsionen und begrenztem monoklonalem Paraprotein im Serum, sowie das „smoldering“ Myelom ohne Knochenläsionen und einem Anteil von < 30 % Plasmazellen im Knochenmark [23].

Bei der Klassifikation des Multiplen Myeloms wird seit 1975 die Stadieneinordnung nach Durie und Salmon herangezogen [23]. Nach Durie und Salmon werden zur Einteilung in Stadium I bis III der Hämoglobin- Wert, der Calcium- Wert im Serum, der röntgenologische Skelettstatus hinsichtlich Knochendestruktionen und die Konzentration monoklonaler Immunglobuline oder Bence- Jones- Proteine im Urin betrachtet. Zusätzlich nimmt die Nierenfunktion gemessen am Serum-Kreatinin bei der Beurteilung und Einteilung mit der Zusatzbezeichnung A und B entscheidenden Einfluss. Die Stadien korrelieren hier mit der Überlebenszeit. Nachteile dieser Einteilung lagen vor allem in der unterschiedlichen subjektiven Beurteilung von Knochenläsionen.

Stadium	Durie-/Salmon-Kriterien
I	Hämoglobin-Wert > 10 g/dl, Calcium im Serum normwertig, Röntgenbilder unauffällig oder solitäre Osteolyse sichtbar, Konzentration monoklonaler Immunglobuline gering (IgG < 5, IgA < 3 g/dl, Urin- Leichtketten < 4 g/d)
II	erfüllt weder alle Kriterien von Stadium I noch von Stadium II

III	Hämoglobin-Wert < 8,5 g/dl, Calcium im Serum erhöht, in den Röntgenaufnahmen vielfach knochendestruktive Herde sichtbar, Konzentration monoklonaler Immunglobuline hoch (IgG > 7 g/dl, IgA > 5 g/dl, Urin- Leichtketten > 12 g/d)
-----	--

Seit 2005 nimmt die Bedeutung der Einteilung nach dem ISS (*International Staging System*) zu [24]. Nach dem ISS werden nur noch zwei Komponenten, die Serumkonzentration von β_2 -Mikroglobulin und Albumin, herangezogen, um eine Aussage über Stadieneinteilung und damit korrelierender medianer Überlebenszeit zu treffen.

Stadium	ISS-Kriterien	Prognose (medianes Überleben)
I	Serum- β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l, Serum-Albumin > 3,5 g/dl	62 Monate
II	erfüllt weder alle Kriterien von Stadium I noch von Stadium II	44 Monate
III	Serum- β_2 -Mikroglobulin > 5,5 mg/l	29 Monate

Prognose: Als wesentliche prädiktive Faktoren hinsichtlich Überlebenszeit werden heutzutage nach der ISS-Klassifikation Serumlevel von β_2 -Mikroglobulin (β_2M) und Albumin sowie zytogenetische Ausstattungsmerkmale herangezogen.

Da es sich bei dem β_2 - Mikroglobulin um einen Bestandteil des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse 1 handelt, welches renal filtriert und reabsorbiert wird, kann die Serumlevelbestimmung Auskunft über Tumormasse und renale Funktion geben. Dabei korrelieren Level und Überlebenszeit negativ, während zwischen Albuminserumlevel und Überlebenszeit eine positive Korrelation vorherrscht. Im ISS werden beide Serumparameter erfasst [24].

Hinsichtlich der zytogenetischen Prognosefaktoren wird die Translokation t(11;14) eher als günstig, während beispielsweise die Translokationen t(4;14) und t(14;16) oder eine 17p- Deletion als ungünstig angesehen werden [25]. Weitere Prognose beeinflussende Faktoren sind: Alter und Allgemeinzustand der Patienten, Anzahl der zirkulierenden Plasmazellen, Proliferationsrate und Morphologie der Zellen, Hämoglobin- und Calciumlevel, Thrombozytenzahl und renale Funktion [26].

Therapie: Bei dieser Erkrankung erfolgt die Therapie stadien-, alters- und risikoadaptiert. So erfolgt bei Stadium I ohne Nachweis von CRAB-Kriterien zunächst nur eine Beobachtung, während bei Progredienz (Stadium II-III) sowie Nachweis von CRAB-Kriterien eine Behandlung eingeleitet wird. Das bereits vor mehreren Jahrzehnten initial vorgestellte Therapieschema umfasst die konventionelle Chemotherapie mit Einsatz von Melphalan und weiteren alkylierenden Substanzen in Kombination mit Prednison [27]. Diese Therapieoption wurde Mitte der neunziger Jahre für Patienten unter 70 Jahren überwiegend durch die autologe Stammzelltransplantation mit vorangehender Hochdosis- Chemotherapie abgelöst. Das bessere Outcome hat aus diesem Behandlungsverfahren eine Art Goldstandard gemacht. Es zeigte sich eine therapieassoziierte Letalität von unter 5 %, sowie eine bessere 5-Jahres- Überlebensrate als bei der konventionellen Chemotherapie [28; 29].

Fortbestehendes Problem nach Infundierung der eigenen aufbereiteten Zellen blieb jedoch das erhöhte Rezidivrisiko. Auch Bemühungen, dabei den Anteil der malignen Zellen zu minimieren, konnten die Gesamtüberlebensrate nicht wesentlich beeinflussen [30].

Aufgrund dieser Umstände gewann das Prinzip der allogenen Stammzelltransplantation mit seinem Graft-versus-Myelom-Effekt an Attraktivität. Die herkömmliche allogene Transplantation mit ihrer

aggressiven Konditionierung war jedoch bei den MM- Patienten mit einer hohen Mortalität bis zu 40 % verknüpft und stellte daher keine zweifelsfreie Alternative [31]. Die in jüngerer Vergangenheit eingeführten dosis-reduzierten Konditionierungstherapien sollten dieser therapieassoziierten Mortalität Rechnung tragen, ohne die vorteilhafte Anti-Myelom-Wirkung einzubüßen [32].

Fortbestehende Problematiken sind Rezidivrate und die regelmäßig auftretende Spender- gegen- Wirt Krankheit [33].

Für die für Transplantationen ungeeigneten Patienten höheren Alters oder mit Ko- bzw. Multimorbiditäten, sowie für Rezidivpatienten gilt mittlerweile eine Behandlung mit Melphalan und Prednison in Kombination mit den sogenannten neuen Substanzen Thalidomid, Bortezomid oder Lenalidomid als besonders geeignet. So zeigen sich bei diesem Patientenkontinental Remissionsraten bis zu 30% [34]. Diese neuen Therapeutika in Kombination mit Dexamethason finden ebenso in der Induktionstherapie vor SCT Anwendung und werden mittlerweile in Studien auch hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in der Erhaltungstherapie nach erfolgter SCT untersucht.

Bezüglich des individuellen Risikoprofils der einzelnen Patienten erhalten dabei bestimmte Präparate den Vorzug. So sind Thromboseneigung und periphere Neuropathie bedeutsame Nebenwirkungen bei der Anwendung von Thalidomid, während Lenalidomid eine eingeschränkte Anwendung bei Nierenfunktionsstörungen finden sollte. Bortezomid und Lenalidomid zeigen positive Effekte bei prognoseungünstigen Genveränderungen. Bortezomid zeigt zudem bei fortgeschrittenen ISS-Kriterien und aufgrund seines Knochenaufbau fördernden Charakters bei Knochenschäden Wirkung. In supportiver Weise kommen die frühzeitige Bisphosphonat-Gabe zur Eindämmung des Knochenabbaus, die lokale Strahlentherapie bei Knochenherden, die operative Fixation frakturgefährdeter Skelettanteile und die analgetische Therapie bei Knochenschmerzen zum Einsatz. Ferner haben symptomatische bzw. prophylaktische antibiotische Behandlungen, sowie antianämische Therapien mit Erythropoetin Bedeutung [35]. Gerinnungshemmende Medikamente kommen bei Patienten mit erhöhtem Thromboserisiko zur Anwendung.

Derzeit lebt ein MM-Patient mit den aktuell verfügbaren Therapien durchschnittlich etwa 5-8 Jahre. Bei ungünstigen Prognosefaktoren, fortgeschrittenem Stadium oder im Rezidiv muss diese Zeitangabe jedoch oftmals nach unten korrigiert werden.

Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll neue Therapieansätze zu fördern. Diese sollten unter dem Gesichtspunkt der Effektivität und gleichzeitiger Risikominimierung hinsichtlich der Nebenwirkungsprofile entwickelt werden, um eine breite Anwendung bei diversen Myelompatienten zu bewerkstelligen.

2.2 Akute myeloische Leukämie

Definition: Die akute myeloische Leukämie gründet sich auf die maligne Transformation myeloischer Vorläuferzellen, mit anschließender klonaler Proliferation derselben.

Anders als bei dem Initialstadium der chronischen myeloischen Leukämie sind die ausgeschwemmten Zellen nicht differenziert und funktionstüchtig, sondern unreifzellig, was fast regelhaft mit einem akuten Krankheitsverlauf vergesellschaftet ist.

Epidemiologie: Pro Jahr gibt es schätzungsweise 2,9- 4,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Deutschland, wobei eine zunehmende Häufigkeit mit steigendem Lebensalter zu beobachten ist. Insgesamt macht die AML 80- 90 % aller akuten Erwachsenen-Leukämien aus [36].

Ätiologie: Als kausale Faktoren nehmen die Knochenmarkschädigung durch diverse Noxen (Zigarettenrauch, Benzol, Zytostatika, Ionisierende Strahlen), sowie vorbestehende prädisponierende hämatologische (MDS, MPS, MM, PNH etc.) oder genetische Erkrankungen (z.B. Trisomie 21, Klinefelter- Syndrom, Fanconi- Anämie, etc.) eine zentrale Rolle ein [37-43]. Darüberhinaus soll der HLA- Status des Individuum eine Bedeutung haben [44].

Pathogenese: Bei etwa 50- 60 % der AML- Fälle finden sich zytogenetische Abnormalitäten [45], häufig handelt es sich dabei um chromosomale Translokationen wie die t(15;17), t(8;21), t(9;11). In anderen Fällen sind Deletionen und numerische Aberrationen, Punktmutationen verantwortlich. 40-50 % der AML- Patienten weisen einen normalen Karyotyp auf [46], zeigen aber Mutationen, die eine veränderte Genexpression mit sich bringen. So führen Klasse 1- Mutationen wie KIT, FLT3 oder NRAS zu einer Aktivierung der Signaltransduktionskette, was die Proliferations- und Überlebensrate für Progenitorzellen erhöht. Klasse 2- Mutationen wie MLL und NMP1 haben beispielsweise Auswirkungen auf den Zellzyklus und inhibieren damit die Differenzierungsfähigkeit der Zellen.

Die Klassifikation akuter myeloischer Leukämien unterlag lange Zeit der durch die „French- American- British- Cooperative Group“ 1976 getroffenen Einteilung [47; 48], bei der morphologische und zytochemische Eigenschaften der diversen Leukämieformen berücksichtigt wurden. Die neuere Klassifikation nach WHO (World Health Organization) berücksichtigt ätiologische Faktoren, trifft demnach eine erweiterte Unterteilung der AML- Gruppen und orientiert sich an zytogenetischen Merkmalen, sowie anderen Entstehungsursachen und prognostischen Merkmalen [49]. In den letzten Jahren wurde diese WHO- Klassifikation durch Hinzufügen neu entdeckter zytogenetischer Entitäten oder Umbenennung einiger der Untergruppen modifiziert [50].

Klinik/ Diagnostik: Die normale Blutbildung im Knochenmark wird zugunsten der klonalen Expansion maligner unreifer Zellen zunehmend unterdrückt und es resultiert eine typische Symptomatik, als Ausdruck der Knochenmarkinsuffizienz. Daneben wird auch von diversen, die Differenzierung normaler hämatopoetischer Zellen inhibierenden, Chemokinen der AML- Blasten ausgegangen [51]. In der Folge treten, neben allgemeinen Begleitsymptomen wie Abgeschlagenheit, Fieber, Nachtschweiß, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Knochenschmerzen, anämische Beschwerden, erhöhte Blutungsneigung und eine deutlich erhöhte Infektanfälligkeit auf. Bei den Infektionen spielen Haut- und septische Infektionen, sowie häufig Pneumonien eine besondere Rolle. Als

wichtige pulmonale Komplikation sind bei einer hohen Blastenzahl daneben die Auswirkungen von leukämischen Thromben auf das respiratorische System zu nennen. Typisch für die AML sind des Weiteren aufgrund der Erkrankung selbst sowie im Zuge der Behandlung auftretende Stoffwechsel- bzw. Elektrolytverschiebungen und -problematiken mit multifaktorieller Genese. Auch extramedulläre Manifestationen tragen zum klinischen Erscheinungsbild bei und können den Verlauf hinsichtlich Therapieerfolg und Überlebenszeit negativ beeinflussen. So können Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, hypertrophe Gingivitis, leukämische Infiltrationen von Haut, Gehirn und Knochen und die damit möglicherweise einhergehenden Komplikationen vorkommen.

Für die Diagnosestellung sind Anamnese, Klinik, laborchemische, histo- und zytologische, molekulargenetische Befunde, sowie bildgebende Verfahren wegweisend.

Therapie: Der kurative Behandlungsansatz mit dem Ziel eine komplette Remission zu erreichen und zu erhalten, gründet sich auf der bereits in den sechziger Jahren gemachten Beobachtung, dass die Überlebenszeit positiv mit der Remissionsdauer korreliert. Definiert war dabei das Erreichen einer kompletten Remission mit der weitestgehenden Normalisierung von Blutbild und Knochenmark. Das Erreichen einer Remission hat dabei ebenso zum Ziel die Progredienz bzw. Persistenz extramedullärer Manifestationen abzuschwächen. Heutzutage wurden die Remissionskriterien modifiziert und schließen nun im klinischen sowie Studienalltag die Betrachtung responsiver Kriterien auf morphologischer, molekularer und zytogenetischer Ebene mit ein [52]. Mit der initialen Durchführung einer systemischen Chemotherapie wird zunächst das Erzeugen einer transienten Knochenmarksaplasie und weitestgehenden Remission beabsichtigt. Für Patienten unter 60 Jahren konnten dabei Remissionsraten von 65- 85 %, für Patienten ab 60 Jahren schlechtere Ansprechraten von weniger als 50 % nachgewiesen werden [53; 54]. Die Langzeitergebnisse für ein rezidivfreies Überleben lagen bei etwa 30 %, die Therapie- assoziierte Mortalität betrug etwa 5- 10 %.

Die sogenannte Induktionstherapie wird mit weiteren Chemotherapeutika- Zyklen in Form einer Konsolidierungsbehandlung fortgesetzt, um den Anteil maligner Zellen noch weiter einzudämmen und die mittlere Remissionsdauer zu verlängern. Nachfolgend wird je nach stratifiziertem Risikoprofil eine Intensivierungstherapie eingeleitet.

Die allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation (HSCT) hat in der Therapie der AML in den achtziger Jahren zunehmende Bedeutung gewonnen. So konnten damals durchgeführte Studien bereits aufzeigen, dass die allogene HSCT bei unter 50 Jahre alten Patienten mit HLA-identischem, verwandtem Spender der konservativen Chemotherapie hinsichtlich Tumorrezidivraten überlegen ist [55; 56]. Für die gute Wirksamkeit wurde dabei neben der Konditionierungstherapie zu einem großen Teil der Graft- versus- Leukämie- Effekt verantwortlich gemacht [57].

Die gegenüber anderen Behandlungsschemata jedoch stark erhöhte therapieassoziierte Mortalität bedingt auch heute noch eine alters- und vor allem risikoadaptierte Anwendung. So bilden aktuell Patienten in erster Remission mit „poor- risk“- oder „intermediate-risk“- Karyotyp eine Indikation [58], außerdem wird die allo- HSCT bei Induktions- und Remissionsversagern, sowie bei sich im frühen Rezidiv oder in der zweiten Remission befindlichen Patienten empfohlen. Bei fehlenden allogenen Spendern finden im Rahmen klinischer Studien zudem die autologische Transplantation sowie die Hochdosis- Chemotherapie Anwendung. Insbesondere für ältere und/oder komorbide Patienten sind weitere, weniger toxische Induktionsbehandlungen Gegenstand der aktuellen Forschung.

Da Infekte und schwere Blutungen maßgebliche Todesursachen bei Leukämiepatienten darstellen, kommt der Begleittherapie mit unterstützenden Maßnahmen wie der Infektprophylaxe, oder -behandlung, sowie der Gabe von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten eine große Bedeutung zu. Ebenso wichtig ist die Vermeidung des Auftretens eines Tumor- Lyse- Syndroms.

Prognose: Die sekundäre AML, d.h. die aufgrund von hämatologischen Vorerkrankungen entstandene AML- Erkrankung zeigt generell ein schlechteres Outcome als die „de novo“- AML [59]. Ausnahme bildet

dabei die Promyelozytenleukämie. Diese weist das nach Translokation als Fusionsprodukt entstandene Gen PML/ RAR- alpha auf und zeigt aufgrund der effektiven Therapiemöglichkeit eine deutlich bessere Prognose[60]. Mit Gabe von all- trans- Retinolsäure wird die Differenzierung der leukämischen unreifen Zellen zu reifen Granulozyten ohne weitere mitotische Aktivität induziert. In Kombination mit Chemotherapie findet die Retinolsäure hier somit etablierten Einsatz und führt zu einer Remissionsrate von etwa 80- 90 % [61].

Als wesentliche die Krankheitsprognose hinsichtlich Remissions-, Rezidiv- und Überlebensrate beeinflussende Faktoren gelten das Alter des Patienten sowie die Zyto- und Molekulargenetik. Dementsprechend wurde eine prognostische Einteilung der zytogenetischen Abnormalitäten in drei Gruppen vorgenommen. Während die poor-risk-Patienten mit den „*favorable cytogenetics*“ wie t(15;17) oder t(8;21) im Durchschnitt 5-Jahres- Überlebensraten von 55% zeigten, waren die durchschnittlichen 5- Jahres-Überlebensraten für die intermediate- und high-risk-Patienten mit „*intermediate*“ und „*unfavorable*“ zytogenetischer Ausstattung mit 40% und 15% deutlich schlechter [62]. Auf molekulargenetischer Ebene spielen FLT3- und NPM1- sowie viele andere Mutationen sowohl beim normalen Karyotyp als auch bei abnormaler bis hin zu hochkomplex gestörter Zytogenetik eine Rolle, wobei hier die Heterogenität bei den intermediate-risk Patienten am größten sein soll.

Während NPM1-Mutationen dabei eine bessere Prognose zeigen, wurden mehrfach schlechtere Überlebensraten für FLT3-ITD nachgewiesen [63]. Neuere Studien zeigen, dass auch vermeintlich schlechte Prognosefaktoren wie die FLT3-Mutation einer Untergruppen-Klassifizierung hinsichtlich dem Vorhandensein molekulargenetischer Co-Mutationen bedürfen, um eine erhöhte prognostische Aussagekraft zu erreichen [64]. FLT3-Inhibitoren als neue Therapeutika für die Behandlung der entsprechenden Mutations-AML konnten in der Einzelanwendung noch keine durchschlagenden Erfolge erzielen, Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika sind Gegenstand der Forschung, Langzeitergebnisse noch ausstehend.

Mitunter am schlechtesten soll die Prognose für Patienten mit monosomalen Karyotypen sein.

2.3 Chronische myeloische Leukämie

Definition: Der Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie liegt die maligne Entartung der pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks zugrunde. Da die Zellen ihre Differenzierungsmöglichkeiten beibehalten, kommt es im Rahmen dieser Fähigkeit zu einer unkontrollierten Proliferation myeloischer, monozytärer und thrombozytärer Zellreihen.

Epidemiologie: Pro Jahr erkranken in der westlichen Welt etwa 1- 2 von 100.000 Einwohnern an der CML [65]. Dabei sind vor allem Patienten im Alter zwischen 40- 60 Lebensjahren und es sind etwas mehr Personen des männlichen Geschlechts betroffen. Insgesamt macht die CML 15- 20 % der Erwachsenen- Leukämien aus [66].

Ätiologie: Ionisierende Strahlen und chemische Reagenzien (Benzol, Chemotherapeutika, Immunsuppressiva) sollen eine Rolle spielen, meist bleibt die Ätiologie jedoch unbekannt.

Pathogenese: In etwa 95 % basiert der Entartungsmodus auf einer genetischen Translokation t(9;22) in dessen Zuge das sogenannte Philadelphia- Chromosom entsteht. Das entstandene bcr/abl- Fusionsgen wiederum kodiert die vermehrte Synthese eines Proteins mit Tyrosinkinase- Aktivität. In Interaktion mit anderen Proteinen führt dieses zur fehlerhaften intrazellulären Signaltransduktion und leistet proliferationsfördernden sowie Apoptose- hemmenden Effekten Vorschub [67-69].

Klinik/ Diagnostik: Die chronische myeloische Leukämie lässt sich klassischerweise in drei Krankheitsstadien einteilen. Das erste Stadium, die sog. Chronische Phase, zeichnet sich durch einen noch stabilen Krankheitszustand aus, da neben den Ph- positiven Zellklonen noch die normale Hämatopoese fortbesteht. Der Blastenanteil im Knochenmark und peripheren Blut nimmt weniger als 10 % ein. Starke Beschwerden bestehen meist nicht, gelegentlich beklagen die Patienten Allgemeinsymptome wie Leistungseinbruch, Müdigkeit, Nachtschweiß.

Typisch für diese Phase sind die bereits vorhandene Splenomegalie und die beginnende Leukozytose als Ausdruck des proliferierenden Zellklons. Etwa 90 % der CML- Patienten werden in dieser Phase erstdiagnostiziert. Dieser klinisch stabile Zustand kann etwa 3 bis 5 Jahre andauern. Als Zeichen des zunehmenden Ungleichgewichts von krankhafter maligner und normaler Hämatopoese kommt es in der Akzelerationsphase zur Zunahme der Blasten auf bis zu 19 % im KM und peripheren Blut, zur therapierefraktären pathologisch erhöhten oder erniedrigten Thrombozytenzahl, zur progredienten Splenomegalie und Leukozytose. Typische Folgen sind das Auftreten von Infekten, leukämischen Thromben und Hyperviskositätssyndrom, seltener entstehen leukämische Tumoren. Durch die Verminderung funktionstüchtiger Thrombozyten und Erythrozyten kommt es außerdem zu Blutungen und zur Anämie. Es kann im Verlauf zur zunehmenden Myelofibrose kommen. Dieser klinisch labile Zustand kann etwa bis zu 12 Monate anhalten. Das dritte Stadium ist die sogenannte Phase der Blastenkrise und zeigt eine mittlere Überlebenszeit von lediglich etwa 3- 6 Monaten. Die Blastenkrise bezeichnet ein Eskalationsmoment mit oftmals therapieresistenter Blastenproliferation auf mehr als 20 % Anteil im Knochenmark oder peripheren Blut. Entweder versterben die Patienten bereits aufgrund der akut entstehenden Komplikationen oder sie erleiden im Verlauf den letal endenden terminalen Blastenschub. Zu 60- 70 % kommt es zur myeloischen Blastenkrise, zu 20- 30 % zur lymphatischen Blastenkrise [66], Mischformen existieren. Da die Einteilung in die unterschiedlichen Erkrankungsphasen und die damit jeweils assoziierte Prognose vor allem auf klinischen Aspekten basiert, werden spätestens seit der „Imatinib-Ära“ die Rufe diverser Wissenschaftler nach einer Reklassifizierung, beispielsweise unter Einbeziehen molekularbiologischer Gesichtspunkte, stetig lauter [70].

Bei der Diagnosefindung spielen bei der CML Befunde auf klinischer, laborchemischer, zytologischer und bildgebender Ebene eine Rolle. Der für diese Erkrankung typische zytogenetische Nachweis ist das zu etwa 90 % vorliegende Philadelphia- Chromosom.

Therapie: In der spezifischen anti- CML- Therapie bieten die Tyrosinkinasen, welche eine bedeutende Rolle bei der fehlerhaften intrazellulären Signalvermittlung und somit Tumorentstehung spielen, einen wichtigen Angriffspunkt. Im letzten Jahrzehnt zeigten diverse Untersuchungen die herausragende Bedeutung von Tyrosinkinaseinhibitoren. Im Jahre 2001 wurde von der „United States Food and Drug Administration“ der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib als erfolgversprechendes Therapeutikum der CML offiziell genehmigt. Zweite Generation- TKI wie Dasatinib und Nilotinib haben in den folgenden Jahren bei Vorliegen einer Imatinib- Intoleranz oder -Resistenz an Bedeutung gewonnen.

Die TKI zeigten mit ihrer hohen Spezifität für bcr-abl vor allem in fortgeschrittenen Krankheitsstadien ein besseres Outcome als die Verwendung von Interferon alpha [71-73] und/oder Chemotherapeutika wie Hydroxyharnstoff. Im Review- Paper von Radich 2010 [74] werden unter anderem diverse Studien illustriert, die die Wirkung von Imatinib-Hochdosistherapien, sowie eine Kombinationstherapie mit Imatinib als Standarddosis und IFN-alpha in der CML- Therapie untersuchten. Beide Behandlungsformen konnten Effekte hinsichtlich der zytogenetischen Komplettremission aufzeigen und die initiale Ansprechrate auf eine höhere Dosis Imatinib war größer. Eine Aussage über signifikante Unterschiede hinsichtlich Langzeitprognose konnte hier jedoch noch nicht gemacht werden.

Kernprobleme in der Behandlung der CML bleiben weiterhin zunehmende mutationsbedingte TKI- Resistenzen, die häufig auch positiv mit der Zuordnung in fortgeschrittene Erkrankungsphasen korrelieren, sowie die schlechte Verträglichkeit und die unzureichende Einnahmecompliance der nebenwirkungsreichen und hinsichtlich ihrer Therapieerfolge eher auf frühere Stadien limitierte IFN [75] und Chemotherapeutika.

So werden Patienten in der chronischen Phase der CML heutzutage vorwiegend mit Imatinib behandelt, Imatinib- „Versager“ und Patienten in der Akzelerationsphase werden mit TKI der zweiten Generation und es wird eine frühe allogene SZT in Erwägung gezogen. In der Blastenkrise befindliche Patienten werden mit TKI behandelt, bei Ansprechen und Rückstufung in die CP wird wiederum eine allogene SZT angestrebt. Bei

fehlendem Therapieansprechen kommen Chemotherapieprotokolle wie bei der Behandlung akuter Leukämien zum Einsatz. Neue molekulare Wirkstoffe werden derzeit untersucht.

Als supportive Maßnahmen in der Eindämmung der im Krankheitsverlauf auftretenden Komplikationen finden Thrombozytenaggregationshemmer, Thrombozytensenker, Splenektomie, Antibiotika, Allopurinol und Harn-Alkalisierung bei Hyperurikämie, sowie Bluttransfusionen und Leukozytapherese Anwendung.

Prognose: Allgemein ungünstige Bedingungen sind die etwa 5 % der Fälle betreffenden Ph- Chromosom- negativen Erkrankungsformen der CML, das Vorhandensein zusätzlicher Chromosomenaberrationen, eine Thrombozytopenie, eine schwerwiegende Anämie und eine Basophilie.

Die Einführung der Imatinib- Therapie sowie die Modifikationen und Verbesserungen im Bereich der Transplantationsmedizin haben, abhängig vom Stadium, einen positiven Einfluss auf die Prognose nehmen können [76]. Imatinib- und Posttransplantationsresultate der letzten Jahre zeigen dabei mit einer jeweiligen 3- Jahresüberlebenschance von über 90 % kaum einen Unterschied, die Transplantations- assoziierte Mortalität betrug dabei weniger als 10 %. Bei Patienten der AP wurde nach einer SZT eine 3- Jahresüberlebenschance von 59 % beschrieben. Die Behandlung in der BC ist mit einer 12- monatigen ÜLW von 25- 30% für Imatinib, 42% für Nilotinib, einer zweijährigen ÜLW von 26% und 38% (lymphoid und myeloid) für Dasatinib und 16- 22 %, nachdem posttransplantationem eine CP wiedererlangt wurde, noch als unzureichend zu bezeichnen [77].

2.4 Chronische lymphatische Leukämie

Definition: Bei der CLL kommt es zur klonalen Expansion maligner immuninkompetenter B- (zu 95 %) oder T- Lymphozyten (zu 5 %).

Die malignen Zellen weisen eine verlängerte Überlebenszeit auf und akkumulieren im peripheren Blut, in Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Meist handelt es sich bei der CLL um ein leukämisch verlaufendes B-Zell- Lymphom von niedrigem Malignitätsgrad.

Epidemiologie: Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Die Inzidenz nimmt mit dem Alter proportional zu und liegt in Deutschland bei etwa 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Männer sind etwa 1,7 mal so häufig betroffen wie Frauen. Es handelt sich in der westlichen Welt mit 30 % um die am häufigsten vorkommende Leukämieerkrankung überhaupt [78].

Ätiologie: Ursächliche Faktoren sind meist unbekannt. Eine familiäre Häufung ist gesichert. In über 80 % der Fälle finden sich chromosomale Veränderungen, die prognostische Auswirkungen haben. So wirkt sich beispielsweise eine supprimierte Expression des pro- apoptotischen Proteins Bax ungünstig aus, während sich die durch eine Translokation verursachte Überexpression anti- apoptotischer Proteine der BCL- 2- Familie ebenso ungünstig auswirkt [79; 80]. Als weitere genetische Aberrationen sind beispielsweise die Trisomie 12 sowie zytogenetische Abnormalitäten wie 17p13-, oder die 11q- Deletionen zu nennen [81; 82]. Juliusson et al. stellten dar, dass Patienten mit normalem Karyotyp eine deutlich bessere Überlebensrate zeigten, als Patienten mit Abnormalitäten [83].

Pathogenese: Der reife B- Zellklon besteht aus atypischen und immuninkompetenten Zellen. Aufgrund einer Apoptosehemmung, die vermutlich durch die Interaktion mit akzessorischen Zellen und Umgebungszytokinen sowie damit assoziierten Wachstums- und Stimulationssignalen am B- Zell- Rezeptor entsteht, zeigen diese eine

deutlich verlängerte Überlebenszeit und akkumulieren dadurch in Lymphknoten, Milz, Blut, Knochenmark und Leber.

Klinik/ Diagnostik: Allgemein zeigt sich eine sehr variable Ausprägung der klinischen Symptomatik. Im Anfangsstadium ist die CLL häufig symptomarm, so dass es sich bei der Erstdiagnose zu 70 % um einen Zufallsbefund handelt. Während vergrößerte Lymphknoten initial nur bei 50 % der Erkrankten zu finden sind, zeigen diese sich im späteren Verlauf bei nahezu allen Patienten. Neben dem eventuellen Vorfinden einer Hepato- und/ oder Splenomegalie, sind bei der CLL auch diverse Hautaffektionen wie Pruritus, chronische Urtikaria, Herpes zoster oder Mykosen möglich. Das sog. Mikulicz- Syndrom mit Schwellung der Mundspeichel- und Tränendrüsen kann ebenfalls in Erscheinung treten. Mit progredientem Krankheitsverlauf schreitet die hämatopoetische Insuffizienz fort, sodass Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie mit den bekannten Komplikationen auftreten. Auch autoimmunologische Phänomene können durch die Ausbildung von Autoantikörpern zu (hämolytischer) Anämie und Thrombozytopenie führen. Da die malignen Zellen immuninkompetent sind, kommt es außerdem im Verlauf zum Antikörpermangelsyndrom, das die erhöhte Infektneigung weiter fördert. Die aus den Infektionen resultierenden Komplikationen wie Pneumonien und Sepsis machen den Großteil der Todesursachen bei der CLL aus. Seltener kommt es bei einer massiven Lymphozytose zum Hyperviskositätssyndrom, welches durch Mikrozirkulationsstörungen wiederum neurologische und kardiale Komplikationen nach sich ziehen kann. Die in etwa 3 % der Fälle auftretende Transformation in höher maligne Non- Hodgkin- Lymphome [84], sowie andere möglicherweise auftretenden Zweitmalignome und Organinfiltrationen stellen weitere Probleme der CLL dar.

Es existieren zwei unterschiedliche Einteilungen für die CLL. Beide nehmen in Frühstadien Bezug auf die progrediente Tumorlast, in Spätstadien auf die progrediente Knochenmarksdepression und besitzen auch heutzutage noch einen Stellenwert hinsichtlich prognostischer Einschätzungen. Die Klassifikation nach Rai et al. von 1975 (modifiziert 1987) betrachtet demnach die klinischen Parameter Lymphozytose,

Lymphknotenbefall, Hepato- und Splenomegalie, Anämie und Thrombozytopenie [85]. Dabei nimmt das Risiko von niedrig bis hoch mit Zunahme der klinischen Phänomene zu und wird den Stadien 0 bis IV zugeordnet, die Werte für das mediane Überleben nehmen entsprechend dazu ab (etwa mindestens 12,5 Jahre in Stadium 0, über 6 Jahre in Stadium II, ab Stadium III lediglich 1,5 Jahre). Auch die Stadieneinteilung nach Binet (1981) zieht dementsprechend die Anzahl der befallenen Lymphknotenregionen (entscheidend in Stadium A und B) und die Merkmale Thrombozytenzahl sowie Hämoglobin- Wert (Thrombozytopenie $< 100.000/\mu\text{l}$ und Anämie mit $\text{Hb} < 10 \text{ g/dl}$ bedingen Stadium C) zur Beurteilung heran [86]. Die Stadien A- C (Risiko niedrig bis hoch) bestimmen dabei ebenso die prognostische mediane Überlebenszeit von > 10 Jahre bis etwa 2 Jahre.

Zur Diagnosestellung und -sicherung dienen Anamnese, Klinik, Labor, histologische Knochenmarksuntersuchungen, bildgebende Verfahren sowie die Durchflusszytometrie mit Immunphänotypisierung. Im Blutaussstrich finden sich infolge der Lymphozytose typischerweise in großer Zahl Gumprecht'sche Kernschatten. Diese spiegeln die beim Ausstrich geplatzten kleinen, reifen Lymphozyten wider. Die Immunphänotypisierung gilt als sehr spezifische Beweisuntersuchung, da sie typische Zell- Oberflächenantigene nachweisen kann (bei den B- Zellen beispielsweise CD5, CD19, CD20, CD23 und CD79b). Sie findet zur Malignom- Typisierung [78], aber auch im Sinne einer therapeutischen Kontrolle klinische Anwendung .

Therapie: Nach der DCLLSG (Deutsche CLL- Studiengruppe) werden alters- und risikoadaptierte Therapieprotokolle verwendet.

Hier spielen konventionelle Chemotherapien und Glukokortikoide in fortgeschrittenen symptomatischen Stadien eine Rolle, nicht jedoch im Anfangsstadium. Bei mangelndem Ansprechen auf neuere Chemotherapeutika wie Fludarabin werden heutzutage vermehrt monoklonale, gegen CLL- typische B- Zellantigene ausgerichtete, Antikörper wie Alemtuzumab und Rituximab eingesetzt, sie haben die Therapiemöglichkeiten entsprechend erweitert. Dabei finden sie sowohl als Kombinationsbehandlung mit diversen Chemotherapeutika, als auch

als Monopräparat Anwendung [87]. 2004 konnten Dreger et al. für eine sequentielle Hochdosischemotherapie inklusive autologer SZT gegenüber der konventionellen Chemotherapie einen prognostischen Vorteil für Patienten mit „poor- risk CLL“ nachweisen [88]. Mehrere Studien haben in der Langzeitbeobachtung jedoch für die autologe SZT eine bedeutsame Rezidivproblematik aufzeigen können [89; 90]. Als einzig kurativer Ansatz wird derzeit die allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation gehandelt. Als supportive Behandlungsmaßnahmen kommen für CLL- Patienten Antibiotika, Antimykotika und Immunglobuline zur Eindämmung der Infektneigung zum Einsatz. Autoimmuninduzierte Anämien und Thrombozytopenien werden durch die Gabe von Glucokortikosteroiden therapiert. Die CLL ist die niedrigst- maligne Erkrankung unter allen Leukämien. Sie zeigt eine sehr variable, von Alter, Stadium und Zytogenetik abhängige Überlebenszeit. Die Hälfte der Patienten verstirbt aufgrund der erhöhten Infektrate.

Prognose: Für eine ungünstige Prognose sprechen die Stadien III und IV nach Rai bzw. B/C nach Binet, eine Lymphozytenverdopplungszeit unter 6 Monaten [91], erhöhte Serumwerte für β_2 - Mikroglobulin und Thymidinkinase [92; 93], erhöhtes CD23 [94] sowie ein „unmutated IgHV mutational status“. Ungünstige Bedingungen stellen außerdem komplexe zytogenetische Aberrationen, die [95] bezüglich konventionellen Chemotherapeutika äußerst resistente p53- Mutation [96] und die 11q- Deletionen [81] dar. In den letzten Jahren wurde zudem ein Augenmerk auf die Bedeutung von microRNAs hinsichtlich prognostischer Wertigkeit gelegt [97]. Rossi et al. stellten 2010 den sogenannten „*mortality risk score 21FK*“ vor, welche die Untersuchung auf microRNA21- Expression, das *fluorescence in situ hybridization* (FISH)- Verfahren und eine Karyotyp- Bestimmung kombinierte [98]. Weitere aktuelle Studien konzentrieren sich auf die Identifizierung zusätzlicher biologischer Marker mit prognostisch signifikantem Stellenwert.

2.5 **Allogene Stammzelltransplantation**

Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden die von einem gesunden Spender gewonnenen pluripotenten hämato- und lymphopoetischen Stammzellen auf den zu behandelnden Patienten übertragen. Die Auswahl des Familien- oder Fremdspenders erfolgt dabei nach HLA- Typisierung, wobei bestimmte Alleldifferenzen als akzeptabel toleriert werden, andere wiederum als inakzeptabel zum Zweck der Spende abgelehnt werden müssen. Wurde eine passende Person gefunden, können die Stammzellen diesem Spender per Knochenmarkaspiration entnommen oder nach Vorbehandlung mit Granulozyten- Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) per Leukapherese aus der Blutperipherie gewonnen werden. In den letzten Jahren hat daneben die Stammzellgewinnung aus Nabelschnurrestblut an Bedeutung gewonnen. Die Übertragung an den Empfänger erfolgt per intravenöser Infusion. Vorab wird der Patient jedoch für die Transplantation vorbereitet. Als günstig hinsichtlich eines späteren Rezidivrisikos hat sich dabei zunächst eine remissionsinduzierende Vorbehandlung empfohlen. Dazu wird bei der myeloablativen Konditionierung eine intensive Chemotherapie meist in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung durchgeführt. Ziel ist dabei die weitestgehende Ausschaltung der Hämatopoese, somit auch der malignen Zellen des Empfängerorganismus. Die dann infundierten Spenderzellen tragen in der Folge zu einem neu entstehenden Blutbildungssystem bei, wohingegen die Fremderkennung des Empfängers durch die vorangegangene Behandlung nahezu ausgeschaltet und die Gefahr einer Transplantatabstoßung von Empfängerseite somit vermindert wird. Ein großer Nachteil der myeloablativen Transplantationsbehandlung ist allerdings die ausgeprägte Toxizität und somit hohe therapieassoziierte Mortalität. Schon die Konditionierung kann erhebliche strahlenbedingte oder medikamentenspezifische Nebenwirkungen mit sich bringen. Es können diverse Organe, wie z.B. Darm, Haut und Haar, Harnwege, Leber und Herz, schon sehr früh in ihrer Funktion massiv gestört werden, als Spätfolge der Therapie sind Gonadeninsuffizienz, Wachstumsstörungen bei Kindern und Folgemalignome gefürchtet. Aufgrund der

vorübergehenden Knochenmarksuppression ist die Infektneigung stark erhöht und es können septische und opportunistische Infektionen entstehen. Eine Transplantationsproblematik ergibt sich durch das mögliche Auftreten einer sogenannten Graft- versus- Host- Disease, bei der die immunologisch aktiven Spenderzellen Abwehrreaktionen gegenüber dem Empfängerorganismus in Gang setzen. Dies schlägt sich dann in Form von akut entzündlichen bzw. chronisch fibrotischen Veränderungen vor allem an Haut, Darm und Leber nieder. Als Vorteil wiederum wird für die Spenderlymphozyten nach ähnlich alloreaktivem Mechanismus außerdem eine Antimalignom- Wirkung auf verbliebene entartete Empfängerzellen beschrieben. Das alloreaktive Prinzip des sog. „Graft- versus Leukemia“- Effektes wurde in mehreren Studien beschrieben und konnte die die Rezidivrate vermindern und somit zusätzlich zur Kuration beitragen [99; 100]. Bei der sog. nicht-myeloablativen Transplantation mit dosisreduzierter Konditionierung (RIC) ist die therapieassoziierte Mortalitätsrate deutlich reduziert, sodass dieses Vorgehen in den letzten Jahren entscheidend an Bedeutung gewonnen hat und somit auch kurative Behandlungsansätze für Patienten mit, beispielsweise aufgrund des Alters, erhöhtem Mortalitätsrisiko ermöglicht. Dabei bleibt eine gewisse Empfänger- Hämatopoese bestehen, sodass myeloablative Nebenwirkungen eingedämmt werden, gleichzeitig macht man sich die zytotoxische Anti- Malignom- Wirkung der Spenderzellen zu Nutze. Studien konnten aufzeigen, dass das Auftreten der „Graft- versus- Host- Disease“ dabei positiv mit dem „Graft- versus- Leukemia“- Effekt korrelierte [101-103].

2.5.1 Multiples Myelom und allogene Transplantation

Im Vergleich zur autologen SZT konnte die allogene Transplantation in der Vergangenheit ein bemerkenswertes Therapieansprechen mit guten Remissionsraten und erniedrigtem Rezidivrisiko aufweisen [104]. Ein bedeutsamer und anwendungslimitierender Nachteil war allerdings die hohe behandlungsassoziierte Mortalität (TRM) [105], so dass in den folgenden Jahren die RIC- allo- Transplantation an Popularität gewann.

Trotz erniedrigter TRM ging dieses neue Behandlungskonzept für das multiple Myelom allerdings zu Lasten einer wiederum erhöhten Rezidivrate, sodass es keine Vorteile bezüglich des Gesamtüberlebens bieten konnte [106].

Mit dem Ziel die durch das RIC verminderte TRM mit einem ausreichenden GVL- Effekt zu verknüpfen, fanden die sog. Tandemkonzepte Überprüfung. Dabei sollte eine erste auto- SZT für eine ausreichende Reduktion maligner Zellen sorgen und im Anschluss eine zweite (RIC- allo- oder eine auto-) SZT erfolgen. Im Vergleich zeigte sich in mehreren Studien für neu diagnostizierte Stadium II- III Patienten und für prognostische Hochrisiko- Patienten im Rahmen dieser Therapien in der auto- allo- Sequenz häufig eine bessere Remissionsrate, jedoch auch eine höhere Rate an GvH- Erkrankungen und Transplantations- assoziierter Mortalität [107-110]. Oftmals zeigten sich in den Beobachtungen bis zu 3 Jahren nach Therapie keine signifikanten Vorteile in der Überlebensrate. Die Ergebnisse für Langzeitbeobachtungen stehen dabei oft noch aus. Da die Transplantationsbehandlung nach wie vor die einzige potentiell kurative Therapie bietet, konzentrieren sich aktuelle Studien bei jüngeren Patienten insbesondere darauf neue Medikamente mit in das Behandlungsregime aufzunehmen, um zukünftig ein langfristig besseres Therapie- Outcome zu erzielen.

2.5.2 Akute myeloische Leukämie und allogene Transplantation

Neueste Studien konnten für die allogene Verwandten- und Fremd- SZT für in der ersten Remission befindliche Patienten mit prognosegünstiger bis hinzu prognoseungünstiger Zytogenetik gegenüber der konventionellen Chemotherapie ohne Transplantation einen deutlichen Vorteil hinsichtlich der Überlebensrate aufzeigen [111; 112]. So entsprach das Langzeitüberleben für Hochrisiko- Patienten mit prognoseungünstiger Zytogenetik bei Gupta et al. 34- 42 % gegenüber 20 % konventionellen Therapieschemata. Dabei illustrierte die gleiche Studiengruppe ein schlechteres Outcome für Patienten höheren Alters und für das RIC- Vorgehen. Die Hauptursache für ein Therapieversagen

lag in dem Auftreten eines Leukämierезидivs. Entsprechende Untersuchungen, ob eine erweiterte chemotherapeutische Behandlung nach Erreichen einer Remission und vor einer Transplantation das Rezidivrisiko vermindern kann, konnten bisher nicht von derartigen Resultaten berichten [113; 114].

Eine Studie aus 2010 konnte für die SZT bei primär chemotherapieresistenten oder im Rezidiv befindlichen AML- Patienten ein 3- Jahresüberleben von 19 % aufzeigen. Dabei entsprach die Überlebensrate für Patienten mit geringerem Risikoprofil mit 42 % sogar dem Überleben der durch Gupta et al. behandelten, in der Remission befindlichen Hochrisikopatienten. Die 3- Jahres- Überlebensrate der Hochrisikopatienten von Duval et al. (im Rezidiv befindlich oder keine Remission erreicht) war hingegen mit 6 % wesentlich schlechter [115]. Auch hier stellte das Rezidivaufreten, vorherigen Studien gemäß, eine bedeutsame Ursache für das Therapieversagen, sodass sich gegenwärtige Untersuchungen unter anderem auf die Optimierung und Erweiterungen prä- und peritransplantationärer Behandlungen konzentrieren.

2.5.3 Chronisch myeloische Leukämie und allogene Transplantation

Vor Einführung der Tyrosinkinase- Inhibitoren stellte die CML- Erkrankung weltweit die häufigste Indikation für die Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation [116].

Da Imatinib sich seit der Zulassung 2001 als sehr effektive Therapie der Wahl für Frühstadien der CML etabliert hat und auch die TKI der zweiten Generation mittlerweile eine breite Anwendung im Falle von Imatinib-Resistenzen finden, sind die Transplantationszahlen stark gesunken [117]. Das European LeukemiaNet hat 2009 aktualisierte Leitlinien mit SZT- Indikationen für CML veröffentlicht [118]. Hierunter fallen Patienten mit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium bei der Erstdiagnose, mit Krankheitsprogression trotz Imatinib- Therapie, mit Resistenzen gegenüber TKI der zweiten Generation, sowie Patienten mit T315I- Mutation. Diese Kriterien haben auf Seiten der SZT eine

Patientenselektion bewirkt, die aufgrund eines ungünstigen Risikoprofils die Gefahr eines relativ schlechteren Outcomes hinsichtlich TRM und Rezidivrisiko birgt [119; 120]. Für Imatinib und TKI der zweiten Generation wurden bereits Vorbehandlungsprotokolle auch in Kombination mit Chemotherapeutika, für Imatinib zudem Nachbehandlungsstrategien der SZT- Therapie in Studien überprüft. Die Ergebnisse sind unterschiedlich, die Nachhaltigkeit und Bedeutung der Effekte sind weiterhin Gegenstand aktueller Untersuchungen. Für Imatinib konnten jedoch Effekte in der Rezidivprophylaxe- bzw. -behandlung nachgewiesen werden [121; 122]. Die RIC- allo- SZT konnte für Patienten im frühen Stadium der Erkrankung hinsichtlich der Überlebensrate positiven Einfluss nehmen [123], für die im fortgeschrittenen Stadium erkrankten Patienten lieferte sie allerdings weniger befriedigende Resultate [124]. Auch hier zeigte das RIC- Konzept jedoch die Nachteile eines deutlich erhöhten Rezidivrisikos gegenüber der herkömmlichen allo- SZT [125].

2.5.4 Chronisch lymphatische Leukämie und allogene Transplantation

Die allogene SZT nimmt auch in der Therapie der CLL einen Stellenwert als potentiell kurative Behandlungsform ein. Dabei wird auch hier dem GVL- Effekt als Schlüsselmechanismus für die Wirksamkeit der allogenen Transplantation eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Für die myeloablative Variante mit der Vorbehandlung mit Cyclophosphamid sowie Ganzkörperbestrahlung und anschließender KMT von HLA- identischen Geschwistern illustrierten Michallet et al. hier eine gute Ansprechrate mit einer hämatologischen Remission bei 70 % der Patienten. Die Therapie- assoziierte Mortalität war in dieser Studie mit 46 % sehr hoch und auch in diversen anderen Studien erwies sie sich prozentual gesehen bei der konventionellen SZT als sehr gewichtig [126; 127]. Um die gute Ansprechrate einer Transplantationstherapie zu nutzen, gleichzeitig jedoch die TRM- Rate einzudämmen, gewann das Prinzip der RIC- allo- SZT auch in der CLL- Therapie an Bedeutung.

Dieses konnte in mehreren Studien eine deutlich verminderte TRM- Rate von durchschnittlich etwa 20 % aufweisen [126; 128; 129]. Dreger et al. verglichen 2005 Patientendaten nach stattgehabter SZT mit myeloablativer Konditionierung und nach RIC- allo- SZT. Dabei war trotz signifikanter Diskrepanz bezüglich TRM kein grundlegender Unterschied in der Überlebensrate zu verzeichnen, da bei dem RIC die Rezidivrate höher war. Prospektive, direkt vergleichende Langzeitstudien stehen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch weitestgehend aus. Die RIC- allo- SZT brachte in jedem Fall den Vorteil der breiteren Anwendung mit sich, außerdem konnte eine gute Wirksamkeit gegen die CLL mit *poor- risk*- Bedingungen nachgewiesen werden. Die *European Group for Blood and Marrow Transplantation* stellte 2007 Indikationen für eine allogene SZT zusammen [130]. Danach eigneten sich für die kurative Therapie vor allem jüngere Patienten, die nur ungenügend auf eine Purinanaloga- Behandlung ansprachen, trotz initialem Ansprechen auf konventionelle Therapien oder autologe SZT innerhalb von 24 Monaten ein Rezidiv entwickelten oder eine prognostisch ungünstige p53- Abnormalität zeigten.

Da die TRM zu einem großen Teil auf dem Auftreten der GvHD basierte, konzentrieren sich die Bemühungen der letzten Jahren unter anderem darauf diese einzudämmen, ohne dabei den wertvollen GVL- Effekt einzubüßen. Hier haben bereits monoklonale Antikörper wie Alemtuzumab und Rituximab mit mäßigem Erfolg Einzug in das Konditionierungsregime erhalten [131; 132].

2.6 **Fazit**

Alle vorab aufgeführten Erkrankungen sind potentiell lebensbedrohlich und bedürfen weiterer, insbesondere mit kurativer Intention behaftete Behandlungsansätze. Antithymozytenglobuline wurden in diesem Rahmen bereits im Konditionierungsregime der allogenen Knochenmarks- und Stammzelltransplantation zur GVHD- Prophylaxe eingesetzt. Einige bislang in-vitro durchgeführte Studien unterstützen darüber hinaus eine direkte ATG- anti- Malignom- Wirkung. Dieser Sachverhalt könnte die Basis eines neuen kurativen Therapiekonzeptes bilden und ist daher von großem Interesse.

2.7 **ATG und ihre Herstellung**

Polyklonale Antithymozytenglobuline (ATG) werden heutzutage weit verbreitet in der allogenen Organ- und Stammzell-Transplantation (SCT), sowie in der Behandlung der GvHD eingesetzt. Zur Herstellung von ATG werden Kaninchen oder Pferde mit menschlichen Lymphoblasten oder Thymuszellen (Thymozyten) beimpft. Die von den Tieren produzierten polyklonalen Antikörper können dann gewonnen und aufgereinigt als ATG eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden vier zum Zeitpunkt der Untersuchung kommerziell erhältliche Präparate untersucht. ATG- Fresenius® wird durch die Immunisierung von Kaninchen mit der menschlichen T-lymphoblastischen Jurkat- Zelllinie produziert. Bei der Gewinnung von Thymoglobulin® werden Kaninchen mit menschlichen Thymozyten immunisiert, während die Herstellung von Lymphoglobulin® und ATGAM® über die Beimpfung von Pferden mit menschlichen Thymozyten erfolgt. Da der menschliche Thymus T-Zellen, dendritische und Stromazellen, sowie B- und Plasmazellen enthält, findet sich in Thymoglobulin®, der bislang am besten untersuchten ATG- Präparation, eine entsprechende Vielzahl an Antikörpern.

So lassen sich im Thymoglobulin® Antikörper gegen T- Zell- Antigene wie CD-2 und -3, gegen B-Zell-Antigene wie CD-19,-20 und -80 und gegen

Plasmazell- Antigene wie CD- 126 und -138 nachweisen. Auch diverse Antigene, die sich auf Leukozytenpopulationen finden, sind Target des polyklonalen Antikörpers, darunter CD-29 und -45.

Aufgrund der Unterschiede in ihrer Herstellungsweise besitzen die verschiedenen ATG folglich auch einen variablen Spezifitätsgrad und eine unterschiedliche Menge an Antikörpern. Diese Differenzen erklären die breite Dosisvariabilität, die zur Zeit bei der klinischen Anwendung vorherrscht. So hat sich beispielsweise für die allogene nicht-verwandte Stammzelltransplantation eine Thymoglobulin®- Dosis von 4,5- 8 mg/ kg Körpergewicht als sinnvoll erwiesen, während die empfohlene Dosis für ATG- Fresenius® hingegen in etwa das 10- fache beträgt. Dementsprechend wurden durch Eiermann et al. auch immens variierende ATG- Konzentrationen in den Patientenseren nachgewiesen [133].

Den klinisch erreichbaren Konzentrationen sollte bei der Interpretation von in vitro- Daten große Aufmerksamkeit zuteil werden.

In dieser Dissertationsarbeit werden erstmals die in einer klinisch relevanten Dosis in vitro erzeugten Anti- Tumor- Effekte der vier ATG- Präparate untereinander verglichen.

2.8 **ATG und Immunmodulation**

Verantwortlich für ihre breite Anwendung in der Transplantationsmedizin sind zum Einen die nachgewiesenen immunmodulatorischen Effekte.

Eine entscheidende, lebensqualitätsmindernde und potentiell lebensgefährliche Komplikation ist das im Rahmen der SZT oft regelhafte Auftreten einer Graft- versus- host- disease. Bei Patienten mit Multiplem Myelom, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen, wurde das Auftreten der chronischen GvHD sogar als prognostisch günstiger Parameter im Hinblick auf eine erhöhte rezidivfreie Überlebensrate gehandelt [134; 135].

Mehrere Studien konnten aufzeigen, dass die Verabreichung von ATG das Risiko des Auftretens einer akuten und chronischen Graft- versus- host disease nach SZT verminderte [136] [137; 138].

Ein wichtiger Wirkmechanismus ist hierbei die erwiesene Anti- T- Zell- Aktivität der ATG. Thymoglobulin® beispielsweise nimmt demgemäß über die Bindung an diverse Oberflächenantigene der T- Zellen und deren Modulation inhibitorischen Einfluss. Aufgrund der folglich verminderten Expression dieser Oberflächenantigene sind wichtige Zellfunktionen und Signalwege gestört, sodass eine Hypoaktivität der T- Zellen resultiert. Diese T- Zell- Depletion nimmt hinsichtlich immunsuppressiver, auch langfristiger Effekte eine wichtige Rolle ein und erklärt die Verwendung von ATG als Teil einer Transplantatabstoßungsprophylaxe oder -therapie [139]. Aufgrund der Art und Weise ihrer Herstellung sind ATG nicht selektiv gegen T- Zellen wirksam, sondern beinhalten viele verschiedene Antikörper, die auf eine große Bandbreite an Antigenen einwirken und auf unterschiedliche Art Einfluss nehmen können. Diese diversen Antigene befinden sich gleichzeitig auf mannigfachen physiologischen hämatopoetischen Zellen, wie z.B. T-, B-, NK-, Plasma- und dendritischen Zellen, sowie auf malignen hämatopoetischen Zellen.

2.9 **ATG und Anti- Tumor- Wirkung**

Diverse Studien der letzten Jahre konnten, neben der immunsuppressiven Bedeutung in der Transplantationsmedizin, weitere Funktionen der ATG nachweisen. Es zeigte sich, dass die polyklonalen Antikörper auch zur zytotoxischen Aktivität gegenüber hämatologischen malignen Entitäten befähigt sind, was mit der gemeinsamen Schnittmenge an Oberflächenantigenen oben genannter physiologischer und maligner hämatopoetischer Zellen korreliert. Hinsichtlich der toxischen Wirkung von ATG auf malignen T- Zellen ist die derzeitige Studienlage eher dürftig. Yoshimi et al. erbrachten 2005 jedoch den Nachweis einer guten toxischen Wirksamkeit von vom Pferd gewonnenen ATG gegen Proben T- lymphoblastischer Leukämieformen [140]. 1994 präsentierten Bonnefoy- Bérard et al. eine entsprechende Einflussnahme auf maligne T- Zelllinien und myelomonozytäre Zellen, wenn diese auch geringer ausfiel als für B- Zelllinien [141].

Gegenüber B- Zellen kam die Zytotoxizität hingegen in vielen verschiedenen Studien besonders stark zum Ausdruck. So konnte eine durch diverse ATG induzierte erhöhte Apoptoserate, sowie eine verminderte Proliferationsrate in malignen B- Zellen bereits zu Beginn der 90er- Jahre nachgewiesen werden [141]. Im Jahre 2005 wiesen auch Zand et al. eine auf mehreren Schlüsselmechanismen beruhende apoptotische ATG- Wirkung auf B- Zellen nach [142].

Kürzlich demonstrierte eine Arbeitsgruppe um Ayuk et al. durch in-vitro-Versuchen mit CLL-Zellen die mögliche klinische Relevanz der ATG-Verwendung. Es wurde ein Vergleich zwischen polyklonalen ATG und den in der Therapie der CLL zur Zeit erfolgreich verabreichten monoklonalen Antikörpern Rituximab bzw. Alemtuzumab aufgestellt. Für polyklonale ATG konnte deutliche Zytotoxizität und ein apoptotischer Effekt in An- aber auch in Abwesenheit von Komplement dargestellt werden, teils mit der Alemtuzumab- bzw. Rituximab-Therapie gleichwertigen oder sogar überlegenen Ergebnissen [143].

Neben den in- vitro- Experimenten konnte ebenso bereits in klinischen Studien der ATG- Wirksamkeit gegen die CLL Bedeutung beigemessen werden. So zeigte sich beispielsweise bei Patienten mit „pure red cell anemia“ bzw. Knochenmarksaplasie und CLL ein kombinierter immunmodulatorischer und anti- CLL- Effekt [144; 145].

2005 wurde in einer RIC- Studie von Lowsky et al. (allogene SZT mit lokaler Strahlentherapie und Thymoglobulin®- Therapie) der Graft-versus-Leukemia- Effekt auf hämatologische Malignitäten untersucht. Als Teil des Behandlungsschemas war für Thymoglobulin® dabei ein gewisser anti- Malignom- Teileffekt nicht auszuschließen [146].

Auch bei den phänotypisch heterogenen Myelomzellen ist die mögliche Wirkung der ATG durch multiple Angriffsmechanismen von großem Interesse und könnte einer Therapie mit monoklonalen und somit selektiv wirksamen Antikörpern deutlich überlegen sein.

So wurde die Einflussnahme auf das Multiple Myelom in vielen Studien in Augenschein genommen und signifikante Effekte konnten aufgezeigt werden. Die Arbeitsgruppe um Ayuk et al. untersuchte 2005 die Wirkung von ATG- Fresenius® auf unterschiedliche Myelomzelllinien, sowie auf

entsprechende primäre Patientenproben. Es gelang der Nachweis einer relevanten Komplement- abhängigen Zellyse. In Abwesenheit von Komplement konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Apoptoserate beobachtet werden [147]. Während in diesen Untersuchungen der Fokus auf ATG- Fresenius® in der Konzentration von 500 µg/ ml lag, wiesen Ayuk et al. 2008 bereits signifikante zytotoxische Einflüsse ab einer Konzentration von 100 µg/ ml bis 1000 µg/ ml nach [166].

Auch Thymoglobulin® zeigte in diesem Konzentrationsbereich ähnliche Ergebnisse. Thymoglobulin® konnte sich neben den in- vitro- Studien auch in- vivo bewähren. So arbeiteten Timm und Kollegen 2006 einerseits mit frisch isolierten primären Myelomzellen von Patienten, andererseits am direkten Tiermodell, der Plasmozytom- Maus. Thymoglobulin® zeigte in beiden Fällen Wirkung. Es induzierte in- vitro eine signifikante Apoptose, im Mausversuch konnte es die Tumorstammsrate eindämmen und somit die Überlebensrate der Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessern [148].

Es wird davon ausgegangen, dass reife B- Zellen einen Pool aus Myelom- Stammzellen bereitstellen können, welcher wiederum als wichtige Quelle für die Ausbildung eines Rezidivs nach zunächst scheinbar kompletter Remission fungieren kann.

Polyklonale ATG bergen diesbezüglich ein besonderes Potential mit ihrem Vermögen, nicht nur zytotoxisch auf reife entartete Zellen zu wirken, sondern möglicherweise auch auf deren klonogene Myelomstammzellen.

In dieser Arbeit bilden die AML, CML, CLL und das MM, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber ATG- Einflüssen, betrachtete Entitäten. Diese potentiell lebensbedrohlichen hämatologischen Erkrankungen wurden bereits an anderer Stelle dieses Kapitels ausführlich dargestellt.

Im Hinblick auf oben illustrierte Antikörpereffekte nimmt das Komplementsystem oftmals als wirkungsverstärkende Instanz eine bedeutende Stellung ein und wird in der Folge ebenfalls einer näheren Betrachtung unterzogen.

2.10 Schlüsselmechanismen der Zytotoxizität von ATG

Bezüglich der zytotoxischen Wirkungsweise von ATG sind die komplement- abhängige Zytolyse, die zellvermittelte Antikörper- abhängige Zytotoxizität, die Chemotaxis, die Kaspase- abhängige Apoptose, sowie der Genistein- sensitive Tyrosin- Kinase- Pathway als Schlüsselmechanismen zu nennen [141; 147-149].

Auf die Grundmechanismen soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden. Dazu erfolgt zunächst ein kurzer Überblick über allgemeine Prinzipien der Immunabwehr, über die Rolle des Komplementsystems und über Apoptosevorgänge. Detaillierte Prozesse sollten einem Lehrbuch für Immunologie bzw. Hämatologie entnommen werden. Die folgende Schilderung gilt lediglich der Illustration zugrunde liegender Prinzipien der Dissertationsexperimente.

2.10.1 Unspezifische und spezifische Immunabwehr und Komplementsystem

Die Immunabwehr dient der Identifizierung, Bekämpfung und Beseitigung körperfremder Strukturen. Es wird durch ein komplexes Organ-, Gewebe-, Zell- sowie Proteinsystem gebildet und durch diverse Faktoren beeinflusst.

Der Begriff „Immun“ leitet sich aus dem Lateinischen von „immunis“ ab und ist mit dem Wort „frei“, „rein“ oder „unberührt“ sinngemäß zu übersetzen. Das macht auch die Hauptaufgabe des Abwehrsystems deutlich, nämlich den Körper zu schützen und somit „rein“ zu halten. Angriffselemente bilden beispielsweise Krankheitserreger, wie Viren und Bakterien, oder auch entartete Zellen. Hinsichtlich der Transplantation körperfremder Gewebe und Organe spielt das Immunsystem ebenso eine große Rolle.

Es besitzt zwei Hauptkomponenten, die angeborene unspezifische, sowie die erworbene spezifische Abwehr. Die unspezifische, angeborene Abwehr setzt sich aus zytologischen Anteilen wie Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen, sowie aus

humoralen Komponenten wie Lysozym, Akute-Phase-Proteine beispielsweise das C-reaktive Protein, Zytokinen und Interferonen zusammen.

Das spezifische, erworbene System bilden ausgereifte T- und B-Zellen. Das Komplementsystem stellt, wie folgend geschildert, gewissermaßen eine Brücke zwischen spezifischer und unspezifischer Abwehr dar und ist ebenfalls als angeborene Komponente des Körpers einzuordnen.

Der Begriff „Komplement“ wurde um 1890 von dem Chemiker und Mediziner Paul Ehrlich eingeführt, die eigentliche Beschreibung des Komplements geht jedoch auf den Immunologen Jules Bordet zurück. Dieser entdeckte, dass Komplement sowohl in Gegenwart von Antikörpern als auch allein wirken kann.

Das Komplementsystem setzt sich aus mehr als 20, größtenteils in der Leber synthetisierten, Plasmaproteinen zusammen. C1- C9 sind dabei die zentralen Kaskadefaktoren und werden durch die Abspaltung eines Peptidfragments in die proteolytisch aktive Form überführt.

Der dazugehörige Faktor C3b wird einerseits über den sogenannten klassischen Weg in einer Antikörper-vermittelten Reaktion gebildet. Andererseits entsteht er, wie von Bordet schon im frühen 20. Jahrhundert festgestellt, alternativ Antikörper-unabhängig durch die direkte Antigeneinwirkung. C3b ist ein Schlüsselmolekül für die Entstehung des aus der Komplementkaskade hervorgehenden Lysekomplexes, der seine Wirkung über eine Porenbildung in der angegriffenen Fremdzelle ausrichtet. Neben anderen proinflammatorischen Proteinen setzt C3b des Weiteren vielfältige Reaktionen in Gang. Als Opsonin unterstützt es die Anlagerung der Phagozyten an fremde Moleküle und fördert somit indirekt die Elimination dieser antigenen Substanzen. Über chemotaktische Mechanismen bewirkt es im Gebiet aktiver Plasmaproteine die Anreicherung von Phagozyten und Natürlichen Killerzellen entlang eines Gradienten und initiiert somit die Aufnahme der Immunkomplexe bzw. der als fremd identifizierten Zellen. Andere Komplementmoleküle wiederum wirken als sogenannte Anaphylaxine und induzieren eine Mastzelldegranulation. Im Zuge dieser wird die Gefäßdurchlässigkeit im Gesamtorganismus erhöht, sodass sämtliche immunreaktive Mechanismen weiter begünstigt und beschleunigt werden.

Die durch das Komplementsystem ermöglichte Phagozytose stellt die eigentliche Verbindung zwischen unspezifischer und spezifischer Abwehr her. So können die mittels Phagozytose aufgenommenen und prozessierten Fremdstoffen anschließend über Oberflächenproteine, sogenannte HLA- Moleküle I und II, präsentiert werden und sind somit den Immunzellen der spezifischen Abwehr (T-CD4+- Helferzellen und zytotoxische T-CD8+- Zellen) zugänglich. Über die spezifische Antikörperproduktion durch Plasmazellen (differenzierte B- Zellen) findet die Antigenelimination auf humoraler, über den direkten Angriff zytotoxischer T- Zellen auf zellulärer Ebene statt.

Die Lyse der Zielzellen geschieht im Rahmen unspezifischer sowie spezifischer Immunabwehr stets unter Mitwirkung proreaktiver Zytokine (Interleukine, Tumor- Nekrose- Faktoren, Interferone, hämatopoetischer Wachstumsfaktoren) und immunmodulatorischer Mediatoren (teils Zytokine).

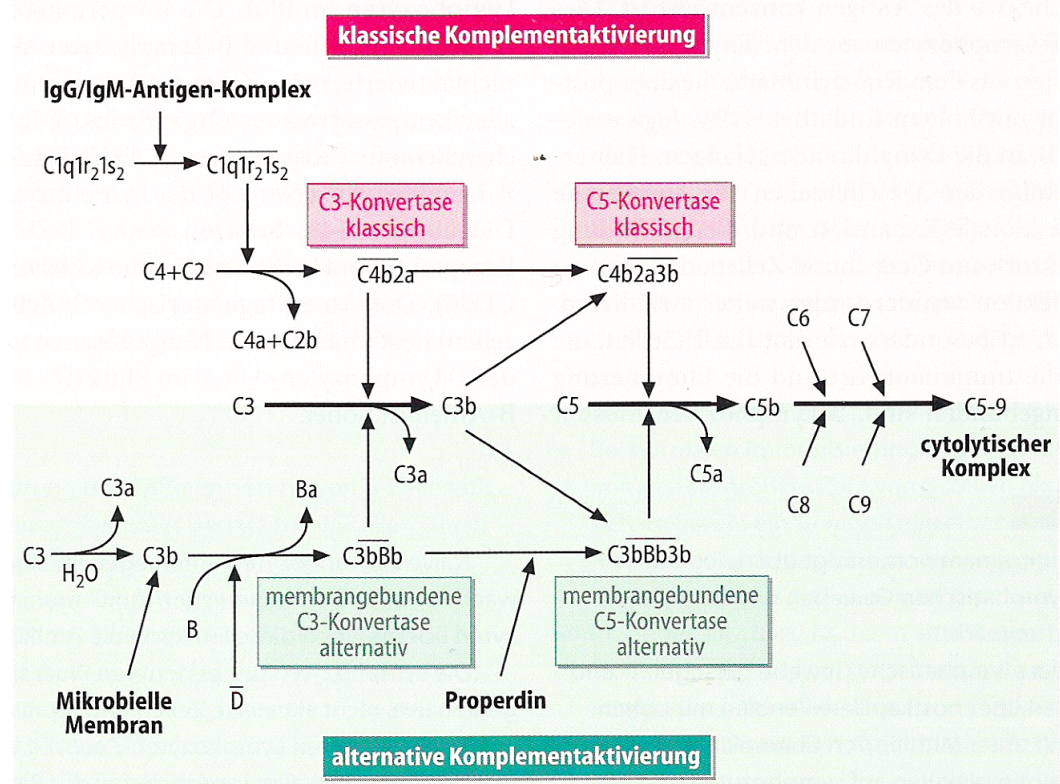


ABBILDUNG 2.9.1: KLASSISCHER UND ALTERNATIVER WEG DER KOMPLEMENTSYSTEM- AKTIVIERUNG (AUS : LÖFFLER/ PETRIDES 2006; BIOCHEMIE UND PATHOBIOCHEMIE. SPRINGER- VERLAG, 8.AUFLAGE, HEIDELBERG, KAPITEL 34, S.1130-32).

2.10.2 Apoptose

Die Apoptose bezeichnet den sogenannten programmierten Zelltod. Über genetischen Informationsfluss kann diese von der eukaryonten Zelle selbst ausgelöst und reguliert werden. Auf diese Funktion wird im Rahmen vieler physiologischer Vorgänge zurückgegriffen. So ist die Apoptose beispielsweise zentraler Mechanismus bei der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems, der Ausbildung der Autoimmuntoleranz und der Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Homöostase. Eine fehlerhafte bzw. reduzierte Apoptose kann somit zu einer massiven Störung des physiologischen Grundzustandes und infolgedessen zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen. Umgekehrt lässt sich daraus folgern, dass man heutzutage mit dem Einsatz diverser Chemotherapeutika und Antikörper, die eine Apoptose in Zellen auslösen können, das Prinzip des kontrollierten programmierten Zelltodes therapeutisch nutzen kann. Auch der Einsatz der in dieser Arbeit untersuchten polyklonalen Antikörper hat in diesem Zusammenhang eine Bedeutung.

Bei der Apoptose spielen hauptsächlich zwei Signalwege eine Rolle, dessen Endstrecke in der Aktivierung von Cysteinproteasen, sogenannten Effektorcaspasen besteht. Diese Caspasen setzen schließlich intrazellulär eine proteolytische Kaskade in Gang.

Die Caspasekaskade wird über zwei Pfade in Gang gesetzt.

Der extrinsische Signalweg führt zunächst über die Ligandenbindung an die als Todesrezeptoren bekannten Membranproteine der Tumornekrosefaktor- Rezeptorfamilie und nachfolgend über die Bindung eines Fas- assoziierten Proteins mit Todesdomäne zur Caspase- Kaskade. Der intrinsische Signalweg entspricht einer passiven Induktion, ausgelöst durch Mangel an Signalen, wie Wachstumsfaktoren oder Zytokinen zur Kaskadeaktivierung. Bei den Signaltransduktionsketten und Apoptosevorgängen spielen vermutlich auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine supportive Rolle.

Overview: Regulation of Apoptosis

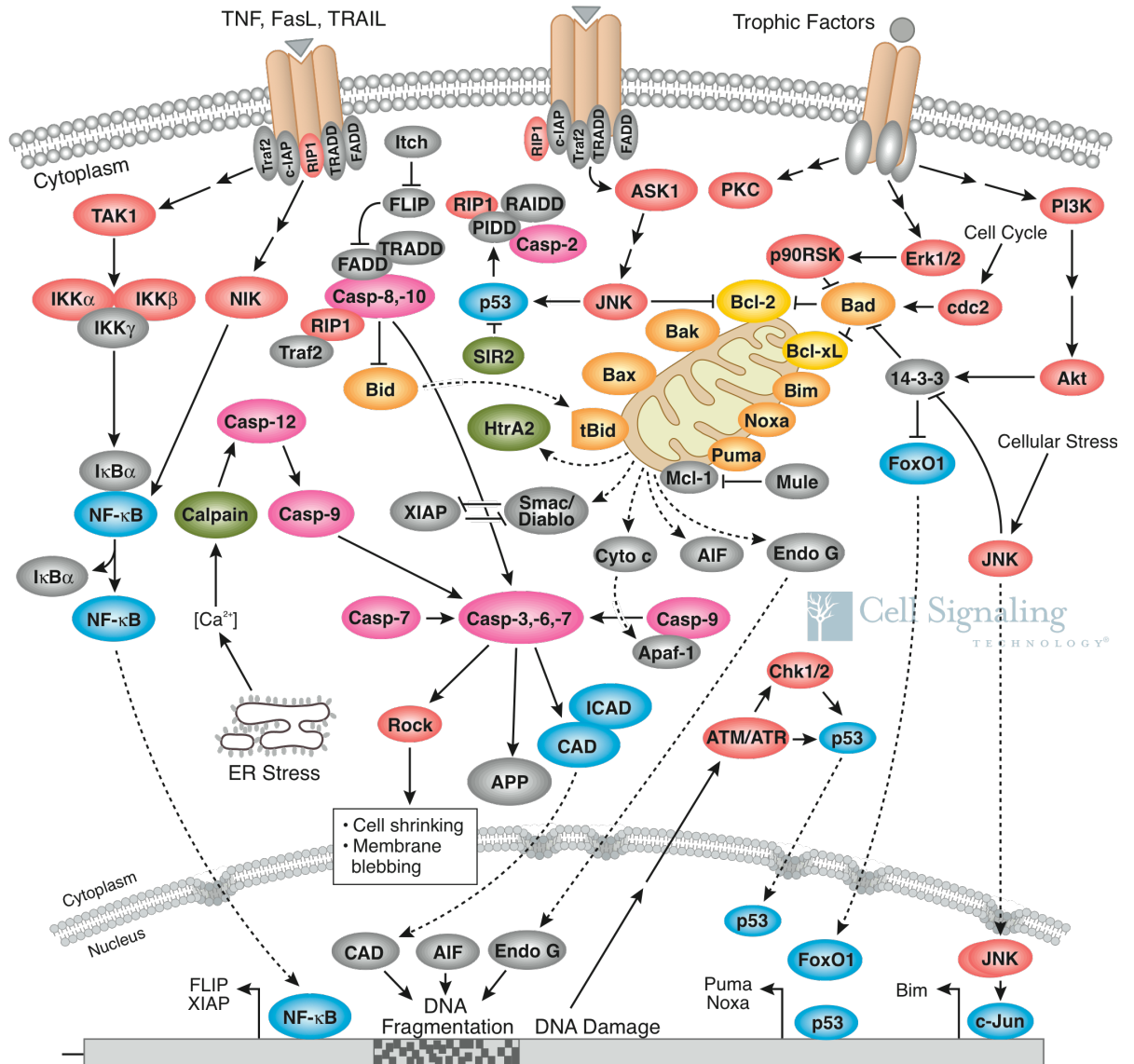
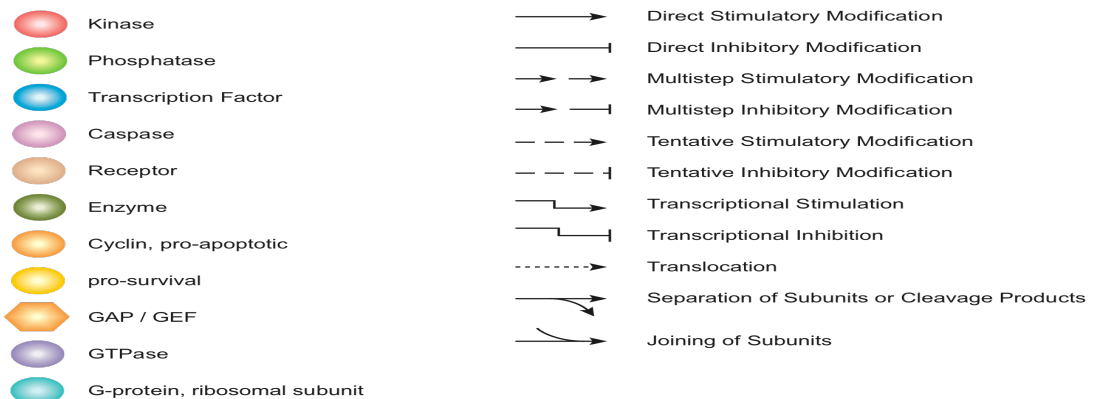


ABBILDUNG 2.9.2: SCHEMATISCHE ÜBERSICHTSDARSTELLUNG DER SIGNALWEGE DER APOPTOSE [AUS: CELL SIGNALING TECHNOLOGY, 2002].



2.11 Fragestellung

Das Multiple Myelom, die akute und die chronische myeloische Leukämie, sowie die chronische lymphatische Leukämie sind allesamt potentiell lebensbedrohliche hämatologische Erkrankungen.

Der kurative Ansatz im Rahmen einer Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation war aufgrund der therapieassoziierten Belastung und Mortalität lange Zeit oft ausschließlich jüngeren Patienten vorbehalten. Beim kurativen Behandlungskonzept in der allogenen Stammzelltransplantation ist unter den vielfältigen Konditionierungsregimes in jüngerer Vergangenheit die dosis-reduzierte Konditionierung mit nachfolgender Transplantation in den Vordergrund gerückt. Ihr Vorteil liegt in der verminderten peritherapeutischen Letalität und sie ist somit für ein größeres Patientenkollektiv geeignet, wobei hier zudem verstärkt auf den immunologischen Graft- versus- Malignom-Effekt nach RIC gesetzt wird. Die heutzutage fest in den Konditionierungsregimes verwendeten ATG können nachweislich das Risiko für das Auftreten von akuter und chronischer GvHD vermindern [137; 150; 151]. Bei dieser effektiven Immunsuppression besteht zwar ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Infektionen [152-154], das theoretisch angenommene zudem erhöhte Risiko für das erneute Auftreten von Malignomen war unter der Therapie mit ATG jedoch nicht zu verzeichnen. Dies lässt sich zum Teil dadurch begründen dass zahlreiche Studien belegen konnten, dass ATG neben seiner immunmodulatorischen Wirkung auch direkte toxische Effekte auf maligne Zellen ausübt.

Ziel dieser Arbeit ist eine Untersuchung der in vitro Aktivität von vier zum Zeitpunkt der Untersuchungen kommerziell verfügbaren Sorten von ATG (ATG Fresenius®, Thymoglobulin®, Lymphoglobulin® und ATGAM®) gegen Multiple Myelome, Non- Hodgkin- Lymphome, myeloische Leukämien, sowie gegen gesunde T- Zellen. Dabei sollen die verschiedenen ATG- Präparationen in ihrer Aktivität und Effektivität untereinander verglichen werden. Es soll untersucht werden, ob sich Wirkungsunterschiede bei den verschiedenen Zelllinien zeigen und inwiefern eine Dosisabhängigkeit für die Apoptoseinduktion besteht.

Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Gegenüberstellung des Anti-Malignom- Effektes der verschiedenen ATG in klinisch relevanten Konzentrationen.

Ferner soll die Rolle von Komplement hinsichtlich der Einflussnahme auf die unterschiedlichen ATG- Effekte begutachtet werden.

3 Material

3.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
BV-173	Humane B- Vorläuferzell- Leukämie (myeloische Leukämie)
EJM	Humanes Multiples Myelom
HL 60	Akute Promyelozyten- Leukämie (myeloische Leukämie)
Jurkat	Humane T- Zell- Leukämie (NHL)
JVM- 2	Humane Chronische B- Zell- Leukämie (NHL)
K- 562	Humane Chronische Promyelozyten- Leukämie, Blastenkrise (myeloische Leukämie)
KMS- 12- BM	Humanes Multiples Myelom
OPM- 2	Humanes Multiples Myelom
Raji	Humanes Burkitt- Lymphom (NHL)
RPMI- 8226	Humanes Multiples Myelom
U 266	Humanes Multiples Myelom

EJM, Jurkat, KMS-12-BM, OPM-2, Raji und RPMI-8266 wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur) in Braunschweig; BV-173, HL 60, JVM-2, K562 und U266 von der ATCC (American Type Culture Collection) aus Manassas, VA, USA bezogen. Alle Zelllinien wurden nach den Angaben des jeweiligen Vertreibers in Kultur genommen.

3.2 Zellkulturmedien, Zusätze und Handhabung

Medium/ Zusätze	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
IMDM	GIBCO, Karlsruhe
RPMI 1640	GIBCO, Karlsruhe
FCS (fetales Kälberserum)	GIBCO, Karlsruhe
Penicillin- Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
L- Glutamin	GIBCO, Karlsruhe
Mercaptoethanol	GIBCO, Karlsruhe
Natriumpyruvat	GIBCO, Karlsruhe

Die EJM- Zelllinie wurde im Medium IMDM, versetzt mit 20% hitze-inaktiviertem fetalem bovinem Serum (FCS), in Kultur genommen.

U266 und KMS12-BM wurden im Medium RPMI 1640 mit 20% FCS aufgenommen. Die restlichen genannten Zelllinien wurden mit RPMI 1640 und 10% FCS aufgenommen.

Als Zusatz waren die Zellkulturmedien neben FCS jeweils mit 1% Penicillin- Streptomycin- Gemisch versetzt. Die Zellkulturen wurden im feuchtwarmen Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

3.3 Blutmaterial: Probengewinnung und -aufbereitung

Die untersuchten CLL- Patientenproben entstammen einer kryokonservierten Probencharge. Dazu erfolgte vorab die Probenentnahme von peripherem Blut an aufgeklärten, informierten Patienten (n = 5) nach dessen Einwilligung. Die mononukleären Zellen wurden mittels Ficoll- Gradient- Zentrifugation (StemCell Technologies inc., Vancouver, Kanada) separiert und anschließend bei -80°C in

flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht in Therapie.

Die CLL- Proben wurden im RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, in Kultur genommen.

Die primären T- Zellen wurden ebenfalls einer kryokonservierten Charge entnommen. Die Probenentnahmen peripheren Blutes erfolgten nach gleichem Prinzip nach Information, Aufklärung und Einwilligung der gesunden Studienteilnehmer (n = 5). Dann kam die Inkubation des Vollblutes mit Rosettesep zur T- Zell- Separation (Cellsystems, St. Katharinen, Germany) und erneut das Ficoll- Zentrifugationsverfahren zum Einsatz. Die detaillierte Methodenbeschreibung bzgl. oben genannter Trenn- und Einfrierverfahren erfolgt in Kapitel 4.

3.4 Komplementgewinnung

Das dafür benötigte Blut wurde per venöser Punktion von gesunden Spendern (n = 5) gewonnen. Das entnommene Vollblut wurde für 7 Minuten bei 1400U/min zentrifugiert, sodass die korpuskulären Bestandteile sich absetzten und das im Überstand befindliche Serum abpipettiert werden konnte. Die unterschiedlichen Serumproben wurden jeweils in gleichen Anteilen miteinander vermischt, um ein „pooling“ zu gewährleisten. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation in oben beschriebener Weise, um weitere Zellbestandteile zu entfernen. Dann wurde der Überstand in jeweils gleich große Gefäße gefüllt und bei -80°C gelagert. Diese eingefrorenen Proben konnten im Verlauf als Komplementquelle dienen.

Alle Studienteilnehmer wurden vorab informiert und aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Verwendung der gewonnen Proben. Alle Daten wurden verschlüsselt, sodass keine direkte oder indirekte Verlinkung zu Personen möglich war. Sämtliche Daten wurden vor der Publikation anonymisiert.

3.5 Polyklonale Antikörper und Kontrollimmunglobuline

Zur Herstellung der unten aufgeführten ATG werden Kaninchen (ATG-Fresenius®, Thymoglobulin®) bzw. Pferde (ATGAM®, Lymphoglobulin®) mit menschlichen Lymphoblasten (ATG Fresenius®) oder Thymozyten beimpft. Die von den Tieren produzierten polyklonalen Antikörper können dann gewonnen und aufgereinigt als ATG eingesetzt werden. Um die eigene zytotoxische Aktivität der Tierseren zu berücksichtigen, wurden als Kontrollparameter Kaninchen- und Pferde- Immunglobuline eingesetzt.

Antikörper	Vertreiber
ATGAM®	Pharmacia and Upjohn GmbH, Erlangen
ATG- Fresenius®	Fresenius Biotech GmbH, Gräfelfing
Lymphoglobulin®	Genzyme Cambridge, UK
Thymoglobulin®	Genzyme Cambridge, UK

Kontrollantikörper	Vertreiber
Horse IgG	Biomeda Corp., CA, USA
Rabbit IgG	Beckman Coulter, Krefeld

3.6 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ficoll- Separationslösung	Biochrom AG, Berlin
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Trypanblau 0,4 %-ig	GIBCO, Karlsruhe
7- Amino- Actinomycin- D (7- AAD)	BD Pharmingen, San Diego, USA

Als allgemeine sterile Wasch- ,Streck- bzw. Verdünnungsmittel fanden Aqua ad injectabilia (Baxter, Unterschleißheim), Aqua dest. und PBS (GIBCO, Karlsruhe) Anwendung.

3.7 Pflege und Reinigung des Durchflusszytometers

Substanz	Vertreiber
Facs Clean	BD Biosciences, Heidelberg
Facs Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Facs Rinse	BD Biosciences, Heidelberg

3.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Berlin
FACS Calibur/ Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Mikroskop	Wild- Leitz GmbH, Biomed Nürnberg
Neubauer- Zählkammer	Assistent Germany
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten 10, 20, 100, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten, steril, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	BD Falcon, Heidelberg
Sterilwerkbank HeraSafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Berlin
Wärmewasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Sigma 6K10	Schnakenberg Medizin- und Labortechnik GmbH, Hamburg
5- Stufen- Pipette	Eppendorf, Hamburg
Computer	Macintosh, USA
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

3.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorf Reagenztubes 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Messröhrchen	BD Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen, steril	Sorenson Bioscience, Sarstedt
Zellkulturflaschen, steril, 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
96- W- Platte	Greiner, Frickenhausen

4 Methoden

4.1 Trennverfahren

Zur Isolierung der mononukleären Zellen aus Vollblut wurde die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll- Separationslösung als Trennmedium angewandt.

Hierzu wurde heparinisiertes venöses Vollblut (oder Knochenmark) im Verhältnis 1: 2 mit Ca²⁺- und Mg²⁺- freiem PBS versetzt. Die in ein Zentrifugenröhrchen pipettierte Ficoll- Lösung wurde dann mit der gleichen Menge des Blut- PBS- Gemischs vorsichtig überschichtet, sodass sich ein 2- Phasen- System ausbildet. Dieses wurde anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 400 x g unter Ausschaltung der Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation haben sich 4 Phasen ausgebildet. Im Überstand, der verworfen wird, befinden sich Plasma und Thrombozyten. Die zweite Phase besteht aus einer weißlichen Bande und wird durch die Monozyten und Lymphozyten gebildet. Die nächste Phase bildet die Ficoll´sche Trennlösung, Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren durch den Gradienten und bilden einen Pellet.

Die Mono- und Lymphozyten wurden abpipettiert, mit PBS gewaschen und nochmals bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 100 x g ohne Bremsung zentrifugiert. Das gleiche Procedere wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Danach konnten die isolierten Zellen gezählt und in RPMI 1640- Medium mit Zusatz von 20 bzw. 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin- Gemisch kultiviert oder kryokonserviert werden.

Sämtliche Schritte wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.2 **Kryokonservierung**

Sofern nicht eine direkte Weiterverarbeitung der nach Isolierung gewonnenen mononukleären Zellen erfolgte, wurden diese zur langfristigen Aufbewahrung in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C oder kurzfristig bei -80°C in der Tiefkühltruhe eingefroren.

Hierzu wurde eine Zellzahl von etwa 1×10^7 pro ml Einfriermedium eingestellt. Dieses Resuspensionsmedium besteht dabei aus RPMI 1640-Medium mit dem bekannten Zusatz von FCS und Penicillin- Streptomycin-Gemisch. Es erfolgte die Hinzugabe von 10 % DMSO als Schutzsubstanz gegen Kristallbildung.

4.3 **Auftauen der Zellen und Patientenproben**

Die kryokonservierten wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtem Medium (10 % bzw. 20 % FCS/ 1% Penicillin/ Streptomycin) aufgenommen, sodass ein Verdünnungseffekt von 1:10 entstand, und die Vitalität der Zellen aufrechterhalten wurde. Die Weiterverarbeitung erfolgte anschließend je nach Intention (Kultivieren, Versuchsansatz) per Zentrifugation ($1400 \times g$, 7 Minuten, Raumtemperatur), Zählen und Einstellen der Zellen.

4.4 **Zellviabilitätsbestimmung durch Trypanblaufärbung**

Bei der Trypanblaufärbung macht man sich das Farbstoffbarriere- Prinzip bei intakten Zellen zunutze, um tote von lebendigen Zellen unterscheiden zu können. Dabei ist die intakte Plasmamembran für bestimmte Farbstoffmoleküle unüberwindbar, somit werden intakte Zellen nicht angefärbt. Bei toten Zellen kommt es hingegen beispielsweise zur Anfärbung cytosolischer Proteine. Diese Zellen erscheinen dann lichtmikroskopisch blau.

4.5 Zellzahlbestimmung und -einstellung

Die zu verwendenden Zellsuspensionen wurden mit Trypanblau im Verhältnis 1:25 verdünnt und danach in eine Neubauerkammer überführt. Unter dem Lichtmikroskop konnten nun 16 Felder ausgezählt werden, wobei für die nachfolgenden Versuche lediglich die vitalen, somit ungefärbten Zellen von Interesse waren. Die ermittelte Zahl führte unter Berücksichtigung des Neubauerkammer- und Verdünnungsfaktor zur absoluten vitalen Zellzahl (ZZa) pro ml.

Bezogen auf das Gesamtvolumen der vorhandenen Zellsuspension (ZSg) ließ sich nun die gewünschte Ausgangszellkonzentration für den Versuch herstellen. Hierzu wurde per Dreisatzrechnung ermittelt, welches zusätzliche Mediumvolumen hinzugefügt werden muss, um jene gewünschte Zellkonzentration zu erreichen.

Zur Veranschaulichung sei folgend ein Beispiel aufgeführt.

Hierbei sei die aus 16 Feldern ermittelte Zellzahl $ZZ = 150$.

Der Verdünnungsfaktor F wie oben beschrieben sei 25, der Neubauerkammerfaktor NF 1000 und die gewünschte Zellzahlkonzentration C 4×10^6 . Der Rechenweg würde dementsprechend wie folgt aussehen:

1. Bestimmung der absoluten Zellzahl pro ml Zellsuspension:
 $150 (ZZ) / 0,4 \times 1000 (NF) \times 25 (F) = 9,375 \times 10^6 (ZZa) / \text{ml}$
2. Bezug zum Gesamtvolumen der Zellsuspension herstellen
 (Bsp.: $ZSg = 2,5 \text{ml}$):
 $9,375 \times 10^6 / \text{ml} \times 2,5 = 23,4375 \times 10^6 / 2,5 \text{ml}$
3. Dreisatz- Rechnung:
 $4 \times 10^6 (C)$ soll entsprechen: $23,4375 \times 10^6 / x$
 $\rightarrow x = 23,4375 / 4 \times 1 \text{ml} = \text{aufgerundet } 5,9 \text{ ml} - 2,5 \text{ ml (bereits vorhandene ZS)} = 3,4 \text{ ml hinzufügendes Medium.}$
 \rightarrow Unter Hinzufügen von 3,4 ml Medium zur Zellsuspension erreicht man somit die für die Versuchsreihen gewünschte Gesamtkonzentration von 4×10^6 Zellen/ ml.

4.6 **Versuchsreihen**

4.6.1 Versuchsreihe a): Belastung verschiedener Zelllinien mit ausgewählten Antikörpern mit und ohne Komplement- Zusatz

1. Vorbereiten der Zelllinien

- a) Zentrifugieren mit 1400 x g bei Raumtemperatur für 7 Minuten
- b) Trypanblaufärbung, Zellzählung und Zellzahleinstellung auf 4×10^6 Zellen pro ml

2. Belasten der Zelllinien

- a) Bei einem gewünschten Endvolumen von 200 µl pro Messröhrchen werden nach definiertem Pipettierschema Zellsuspension, Medium und Antikörper zusammengeführt, sodass sich jeweils eine Antikörperbelastung mit 10, 50, 100, 250 und 500 µg/ ml ergibt. Zwei unbelastete Versuchsproben dienen der Negativkontrolle. Es erfolgt stets ein doppelter Versuchsansatz, einer mit und einer ohne Hinzugabe von Komplement.
- b) Im Anschluss an die Antikörperbelastung wird ein Ansatz unverzüglich mit Komplement behandelt. Ebenso wird eine Negativkontrolle mit Komplement belastet.

Zur Komplementevaluation wird zusätzlich ein zellleeres Röhrchen mit Medium bereitgestellt und Komplement hinzugegeben.

3. Inkubieren im Wärmeschrank

- a) Versuchsansatz ohne Komplement wird 20- 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.
- b) Versuchsansatz mit Komplement wird für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4. Messung am Durchflusszytometer nach unter 4.7 und 4.8 erläuterten Prinzip.

4.6.2 Versuchsreihe b): Belastung von CLL- Patientenproben

Hierbei werden die kryokonservierten Proben, wie unter 4.3 beschrieben, aufgetaut. Die Vorbereitung, Einstellung, Belastung und Messung der CLL- Patientenproben erfolgt dabei nach oben genanntem Prinzip.

4.6.3 Versuchsreihe c): Belastung von T-Zellen

Die Behandlung der eingefrorenen Zellen erfolgt wie unter 4.6.2 beschrieben.

4.7 **Die Durchflusszytometrie**

Ein vom Hersteller Becton Dickinson (BD) für die Durchflusszytometrie synonym verwendeter Begriff ist die Bezeichnung „FACS“ für „fluorescence- activated- cell- sorter“. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung von Eigenschaften wie z.B. Größe und Granularität untersuchter einzelner Zellen aufgrund der Unterscheidung und Sortierung nach Fluoreszenzsignalen und Streulicht. Dabei werden die Zellen vorab mit fluoreszierenden Farbstoffen oder entsprechend markierten Antikörpern versetzt. In den hier aufgeführten Versuchen dient 7- Amino- Actinomycin (7-AAD) als Farbstoff. Nach vorne abgelenkte Strahlen sind dabei ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen (Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC)). Das in einem 90 Grad Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht nennt sich auch Sidescatter (SSC) und ist als Maß für die Zellgranularität anzusehen. Die erfassten Daten werden abschließend im Computer aufgearbeitet und können in unterschiedlicher Weise zur Darstellung gebracht werden.

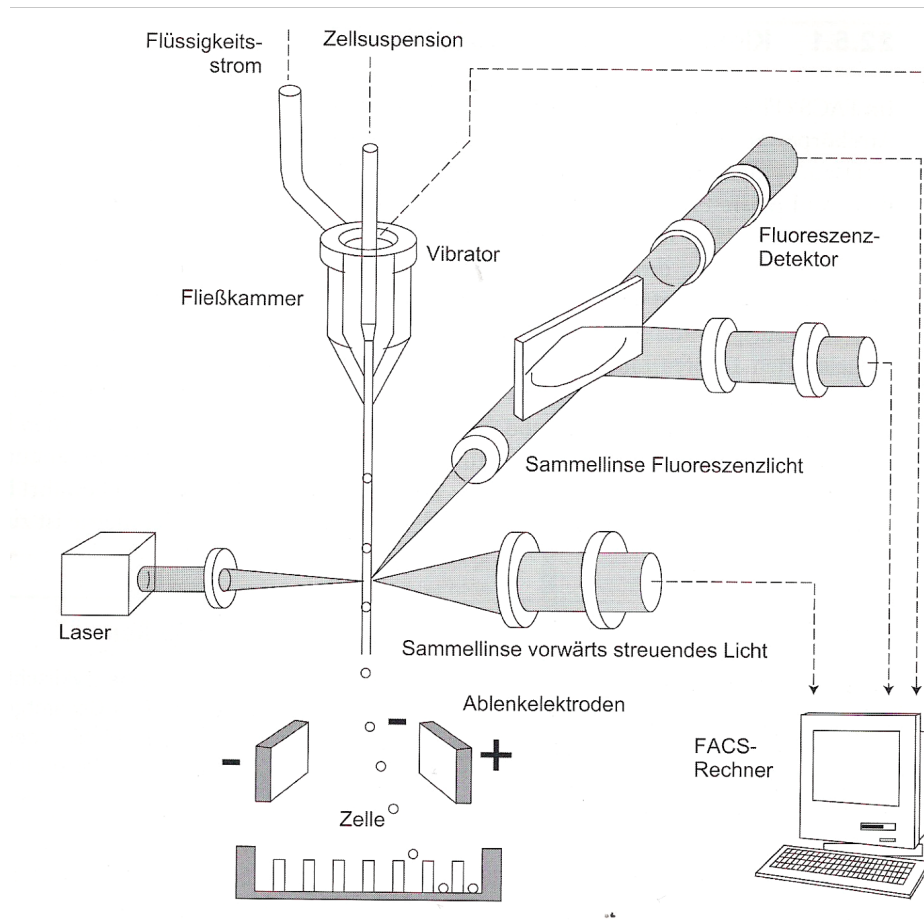


ABBILDUNG 4.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS MIT ZELLSORTIERUNG [AUS: LINDL, 6. AUFLAGE 2008, KAPITEL 22, S. 253-60].

4.8 7-AAD- Färbung und Messung am Durchflusszytometer

7- AAD ist ein Farbstoff, welcher der Quantifizierung lebendiger, apoptotischer und spätapoptotischer, toter Zellen dient. Er lagert sich in die DNA apoptotischer Zellen ein, lebende Zellen werden nicht angefärbt. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 546 nm, das Emissionsmaximum bei 647 nm. Die Versuchsansätze wurden nach der Inkubationszeit aus dem Wärmeschrank entfernt und mit je 4 µl 7-AAD versetzt, wobei eine Negativkontrolle nicht gefärbt wurde. Die 7-AAD- Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 5 Minuten in einem Dunkelraum. Anschließend erfolgte die Probenmessung am Durchflusszytometer. Dazu widmete man sich zunächst der Geräteeinstellung durch Aufnahme der Negativ- und Positivkontrollen. Es wurde dabei so geeicht, dass die untersuchte

Zellpopulation sich gut abbildete und der ganz links befindliche Zelldebris sich im Forward- und Sidescatter gerade noch darstellen ließ (siehe Abb.). Ferner erfolgte die Einstellung der Fluoreszenzen in definierten Fluoreszenzkanälen (FL) mit anschließender Fluoreszenzkomensation. Für 7-AAD wurde FL3 als Detektor für Licht der Wellenlänge um 670 nm benutzt. Es wurden pro Ansatz mindestens 10.000 Zellen gemessen.

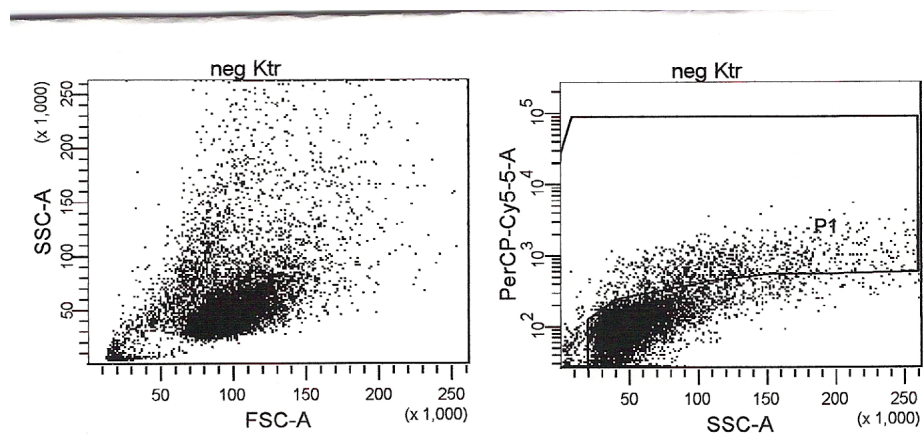


ABBILDUNG 4.2: EICHUNG AM DURCHFLUSSZYTOMETER. EINSTELLUNG VON ZELLPOPULATION UND ZELLDEBRIS.

4.9 Datenauswertung

Die Daten wurden im Computer aufgearbeitet und auf dem Monitor zur Darstellung gebracht. Die Analyse erfolgte mittels CELLQuest- Software. Dazu wurden die Messdaten als Punktdiagramm, als sogenannter Dot Plot, aufgetragen. Dies ist eine graphische Methode, um zwei Parameter untereinander zu vergleichen und eine Korrelation zur optischen Darstellung zu bringen. Dabei werden die entsprechenden Parameter, wie Forward-/ Sidescat und Fluoreszenz auf eine horizontale und eine vertikale Achse aufgetragen und die Parameterschnittstellen durch einen Punkt markiert.

Die in Mehrfachmessungen so ermittelten Daten wurden später in Microsoft Excel- Tabellen zusammengetragen. Dabei wurde die prozentuale totale Zytotoxizität aus den Rohdaten wie folgt bestimmt:

(Gemessene Gesamtzytotoxizität in % - Anteil toter Zellen in Positivkontrollen in %)/ (100- Anteil toter Zellen in Positivkontrollen in %) x 100= tatsächliche prozentuale Zytotoxizität.

4.10 **Statistische Auswertung**

Mit dem Microsoft- Programm Excel wurden für die Zytotoxizität die arithmetischen Mittelwerte sowie die jeweiligen Stichprobenstandardabweichungen der mehrfach durchgeführten Versuche ermittelt.

Mit SOCR Analysen (Statistics Online Computational Resource), entwickelt von diversen Abteilungen und Zentren der UCLA, erfolgte die Anwendung des Wilcoxon- Rangsummentests und somit die Bestimmung von p- Werten als Signifikanzparameter.

5 Ergebnisse

5.1 Die ATG- Präparationen zeigen eine zytotoxische Aktivität gegenüber primären T- Zellen in komplement- abhängigen und – unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung 5.1 zeigt die in allen ATG vorhandene zytotoxische Aktivität gegen T- Zellen unter Hinzufügen von 50 % Komplement. Eine relevante und sehr ähnliche Zytotoxizität zeigte sich ab einer Konzentration von 100 µg/ mL in ATG- Fresenius®, Thymoglobulin® und Lymphoglobulin® mit 87,4 %, 90,4 % und 82,3 %. Mit 47,8 % war die zytotoxische Wirkung von ATGAM® in dieser Konzentration noch deutlich geringer. Bei einer ATG- Konzentration von 250 µg/ mL war die apoptotische Wirkung mit 94,6 %, 95 % und 94,2 % annähernd identisch und maximal für die drei erstgenannten Präparationen. Eine wesentliche Wirkungssteigerung konnte durch eine höhere Konzentration nicht mehr erreicht werden. Der Effekt für Atgam fiel hier wiederum niedriger aus mit einer erreichten Zytotoxizität von 78,4 %. Diese konnte in einer Konzentration von 500 µg/ mL noch weiter auf 92,6 % gesteigert werden.

Insgesamt zeigen die vier unterschiedlichen Präparationen hier eine vergleichbare Zytotoxizität.

Ein signifikanter Unterschied in der Toxizitätsstärke unter Komplement-Anwendung besteht im Vergleich Thymoglobulin® und ATGAM® mit $p < 0,03$ zugunsten des Thymoglobulins®.

Obwohl sich bei ATG-Fresenius® im Vergleich mit und ohne Komplement ein Wirkungsunterschied zugunsten der Komplement- Verwendung zeigt, ist dieser Unterschied mit $p > 0,08$ jedoch nicht als signifikant anzusehen. Mit $p > 0,1$ bis $p > 0,8$ ergibt sich auch für die anderen 3 ATG- Präparationen keine signifikante Änderung in der Wirkung, bei oder ohne Hinzufügen von Komplement.

In den komplement- unabhängigen Versuchen erreicht Lymphoglobulin® mit $p = 0,03$ gegenüber ATG-Fresenius® eine bedeutsam höhere Effektivität. Thymoglobulin® zeigt hinsichtlich einer stärkeren Wirkung

auf T- Zellen gegenüber ATG-Fresenius® mit $p = 0,055$ ein grenzwertiges Signifikanzniveau. Alle anderen Konstellationen der ATG-Präparationen im komplement- unabhängigen Vergleich untereinander zeigen mit $p > 0,1$ bis $p < 0,9$ keine signifikanten Unterschiede.

ATG- Zytotoxizität gegenüber primären T- Zellen

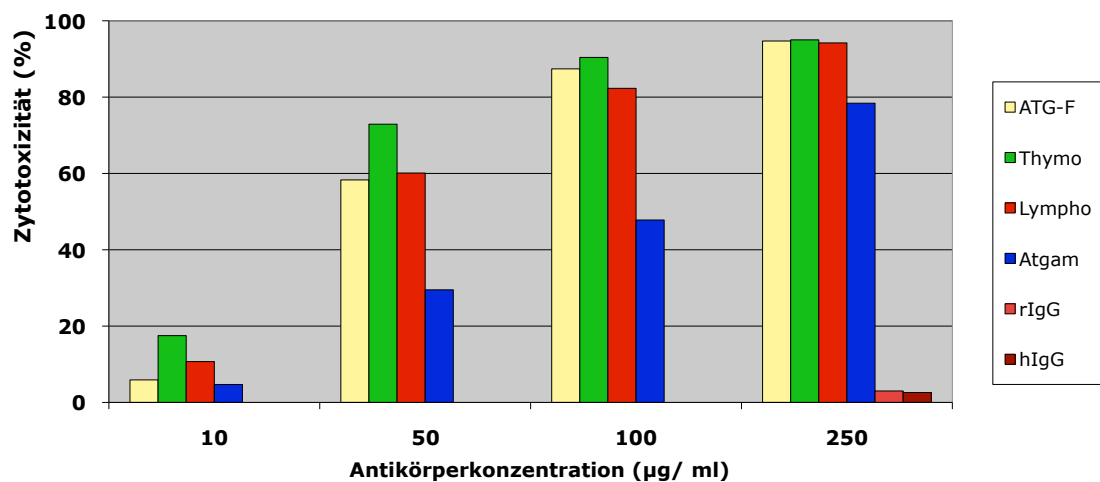


ABBILDUNG 5.1: KOMPLEMENT- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT VON ATG GEGENÜBER PRIMÄREN T- ZELLEN. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN PRIMÄREN T- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION UND UNTER HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE VON JEWEILS VIER UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHFÜHRTE EXPERIMENTEN.

5.2 Alle verwendeten ATG- Präparationen wirken zytotoxisch gegenüber den untersuchten Myelomzelllinien.

Mit p- Werten für KMS- 12-BM zwischen $> 0,06$ bis $> 0,9$; für RPMI $> 0,1$ bis $< 0,8$; für OPM-2 und U266 $> 0,2$ bis $< 0,8$ und für EJM $> 0,2$ bis $< 0,9$ sind die zelltoxischen Wirkungseffekte der diversen ATG- Präparationen unter Hinzufügen von 50 % Komplement nicht als signifikant unterschiedlich anzusehen.

Beispielhaft sei in Abbildung 5.2.1 die zytotoxische Wirkung auf die Zelllinie KMS-12-BM in Abhängigkeit von der ATG- Konzentration unter Hinzufügen von 50 % Komplement dargestellt. Zwischen einer Konzentration von 250 und 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kommt es für ATG- Fresenius®, Thymoglobulin® und Lymphoglobulin® mit 35,3 % auf 84,8 %, 26 % auf 74,3 % und mit 50,2 % auf 96 % zu einem steilen Anstieg der Wirkungskurve. Die Dosis- Wirkungskurve verläuft für ATGAM® insgesamt flacher, die maximale Steigung zeigt sich in einer Konzentration zwischen 100 und 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die höchstgemessene Zytotoxizität liegt bei einer Dosis von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei 59,1 % und fällt damit im Vergleich zu den vorab genannten Präparationen etwas geringer aus.

In den Abbildungen 5.2.2 und 5.2.3 sind die untersuchten Myelomzelllinien mit dem Anteil ihrer apoptotischen Zellen bei einer Konzentration von 250 und 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des jeweiligen ATG unter Hinzufügen von Komplement aufgeführt. Auch hier zeichnet sich die zuvor geschilderte geringere Zytotoxizität für ATGAM® ab. Eine Ausnahme bildet zum Einen die Wirkung bei 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in den KMS-12-BM- Zellen, wo es die zweithöchste Effektivität zeigt.

Zum Anderen zeigt ATGAM® auch in der Zelllinie OPM-2 mit denen der anderen drei ATG- Präparationen vergleichbare zytotoxische Nachwirkungen.

Hinsichtlich der komplement- unabhängigen Apoptosewirkung ist Lymphoglobulin® den anderen Antithymozytenglobulinen signifikant überlegen mit p- Werten gegenüber ATG-F und ATGAM® von 0,011 und gegenüber Thymoglobulin® von 0,019.

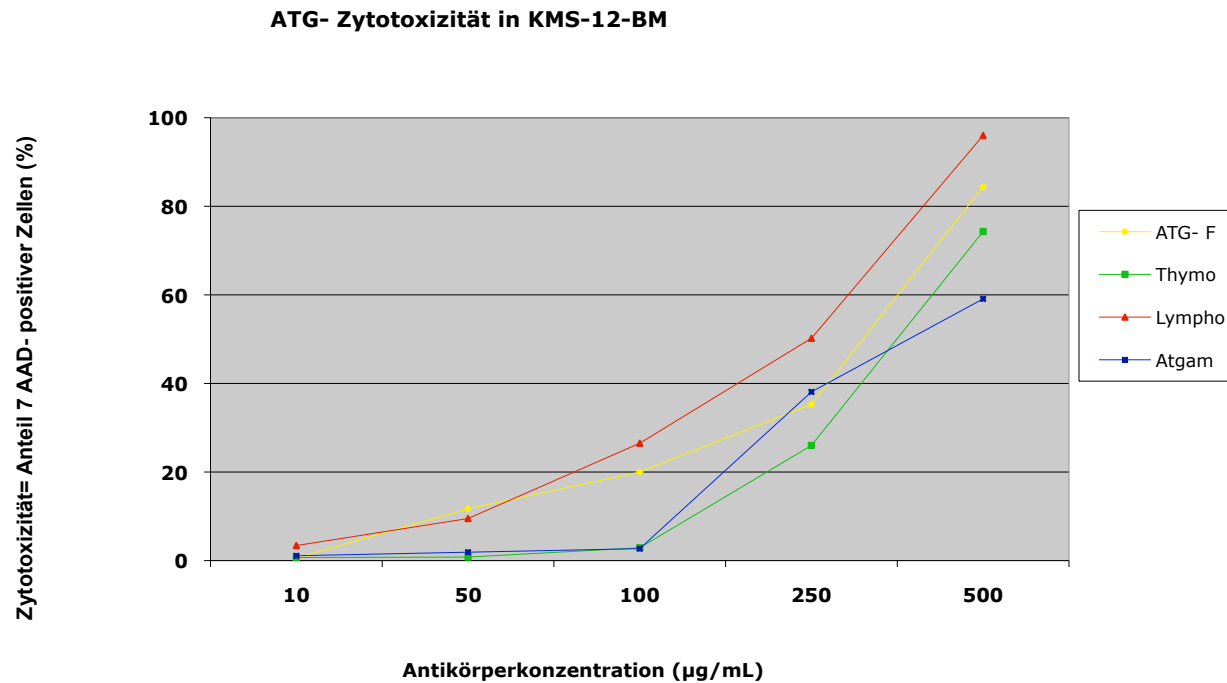


ABBILDUNG 5.2.1: KOMPLEMENTABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ATG- KONZENTRATION IN KMS12-BM.

DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DES ANTEILS TOTER ZELLEN (IN %) VON JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTEN EXPERIMENTEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN VERSCHIEDENEN ATG- PRÄPARATIONEN IN DEN KONZENTRATIONEN 10, 50, 100, 250 UND 500 µG/ ML MIT DER MYELOMZELLINIE KMS12-BM UNTER HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT.

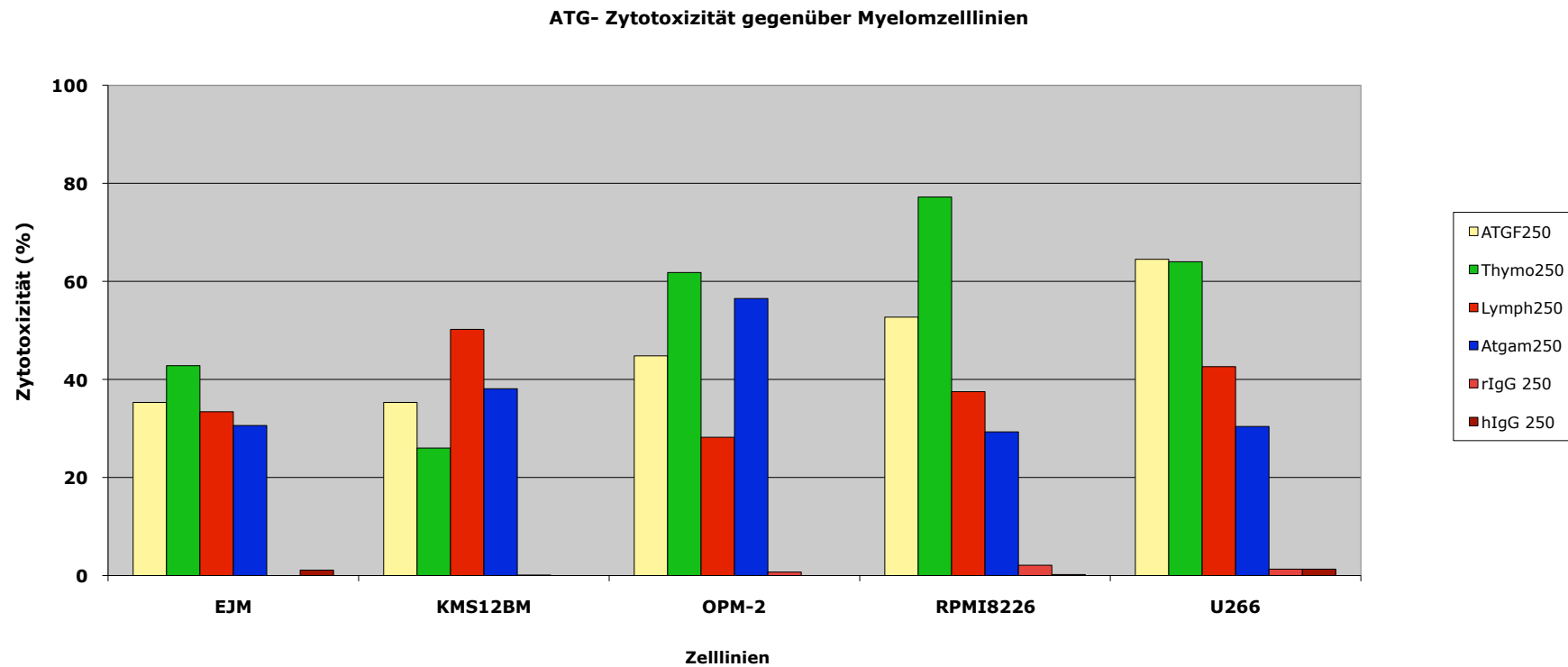


ABBILDUNG 5.2.2: KOMPLEMENT- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT VON ATG GEGENÜBER MYELOMZELLINIEN.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN DEN ZELLINIEN EJM, KMS- 12- BM, OPM-2, RPMI 8226 UND U 266 NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN (KONZENTRATION: 250 µG/ ML) BZW. DEN KONTROLLANTIKÖRPERN (KANINCHEN- UND PFERD- IG G) UND UNTER HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT.

DARGESTELLT SIND DIE STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ZELLINIE DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE.

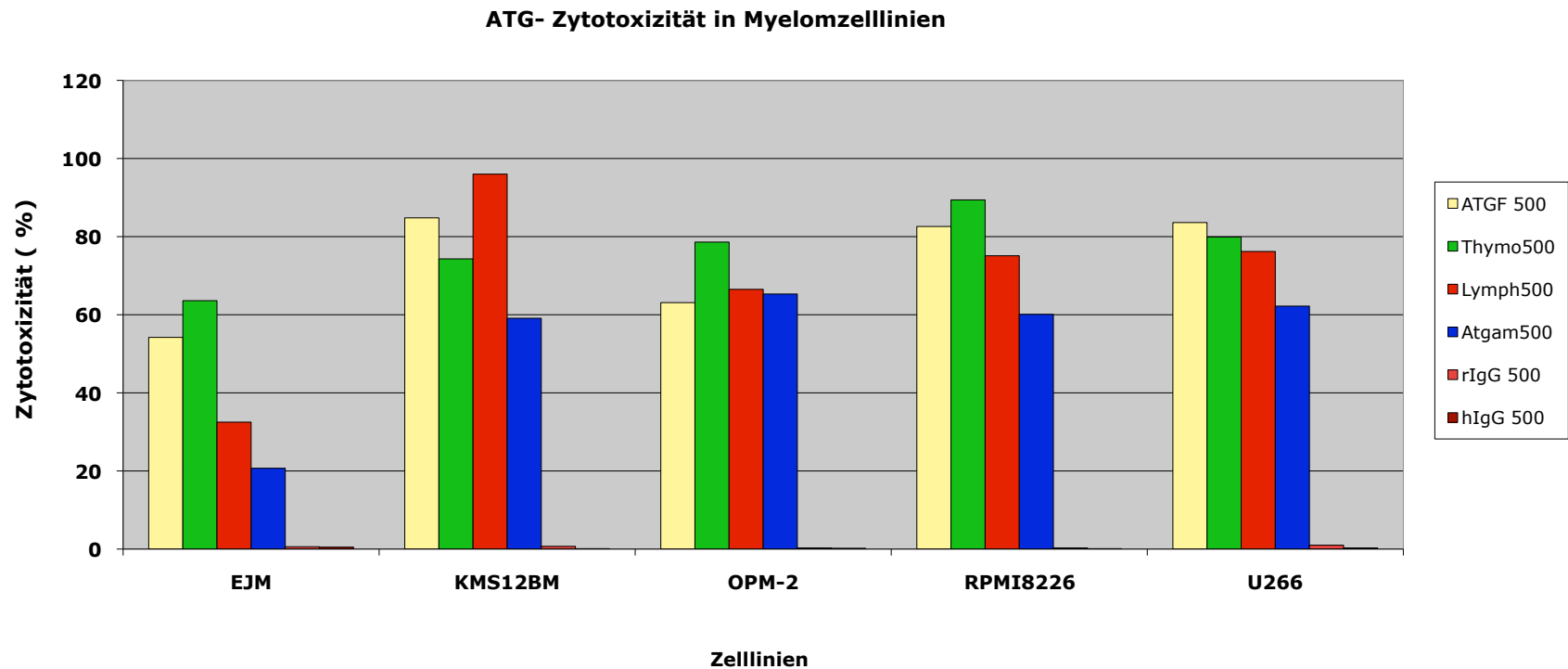


ABBILDUNG 5.2.3: KOMPLEMENT- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT VON ATG GEGENÜBER MYELOMZELLINIEN.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN DEN ZELLINIEN EJM, KMS12-BM, OPM-2, RPMI 8226 UND U 266 NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN (KONZENTRATION: 500 µG/ ML) BZW. DEN KONTROLLANTIKÖRPERN (KANINCHEN- UND PFERD- IGG) UND UNTER HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT.

DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE VON PRO ZELLINIE DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHFÜHRTE EXPERIMENTEN.

5.3 Mit Komplement werden auch primär resistente Zelllinien einer zytotoxischen Wirkung durch ATG- Präparationen zugänglich.

Während sich in den Zelllinien KMS-12-BM, OPM-2 und RPMI-8226 auch ohne Komplement eine relevante Zytotoxizität für alle ATG- Präparationen zeigte, war die Wirkung gegenüber den Zelllinien EJM und U266 ohne Komplement nur minimal. Abbildung 5.3.1 und 5.3.2 illustrieren, dass unter Addition von Komplement die primäre Resistenz der Zelllinien gegenüber den ATG- Präparationen überbrückt werden konnte. In den U266- Zellen in Abbildung 5.3.2 ist die Differenz zwischen den Versuchsergebnissen ohne und denen mit Komplement besonders stark hervorstechend. Während die Zytotoxizität bei U266 in den Versuchen ohne Komplement für ATG-F, Thymoglobulin®, Lymphoglobulin® und ATGAM® in der Konzentration 500 µg/ mL bei lediglich 7%, 9,8 %, 8,5 % und 4,1 % liegt, erfährt diese unter Komplementbeifügung einen Anstieg auf 83,6 %, 79,9 %, 76,2 % und 62,2 %.

Im Vergleich ohne und mit Komplement ergaben sich zugunsten des komplement- abhängigen Effektes p- Werte von 0,001 für ATG-F und ATGAM®, von 0,011 für Thymoglobulin® und von 0,059 mit grenzwertiger Signifikanz für Lymphoglobulin®.

Für EJM ergaben sich hier p- Werte von < 0,04 für ATGAM® und von 0,059 mit grenzwertiger Signifikanz für ATG-F.

Für Lymphoglobulin® waren mit $p > 0,7$ keine relevanten Unterschiede in der komplement- unabhängigen Apoptose und der komplement- abhängigen Zytotoxizität zu sehen.

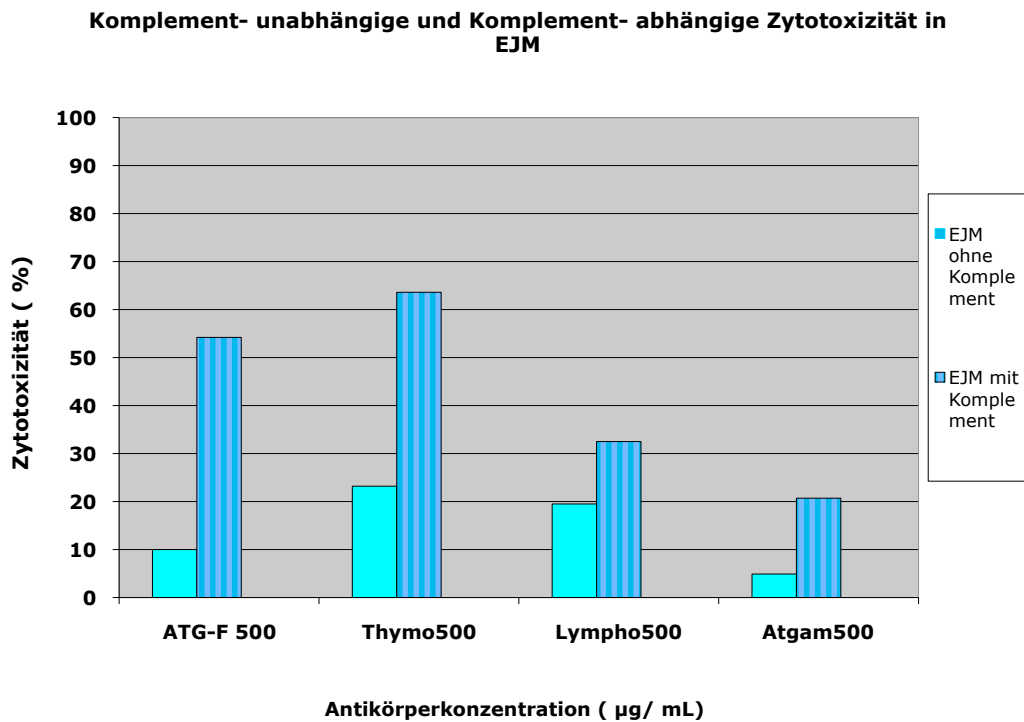


ABBILDUNG 5.3.1: KOMPLEMENT- UNABHÄNGIGE UND - ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN EJM. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN EJM- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG- PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHFÜHRTE EXPERIMENTE.

Komplement- unabhängige und Komplement- abhängige ATG- Zytotoxizität in U266

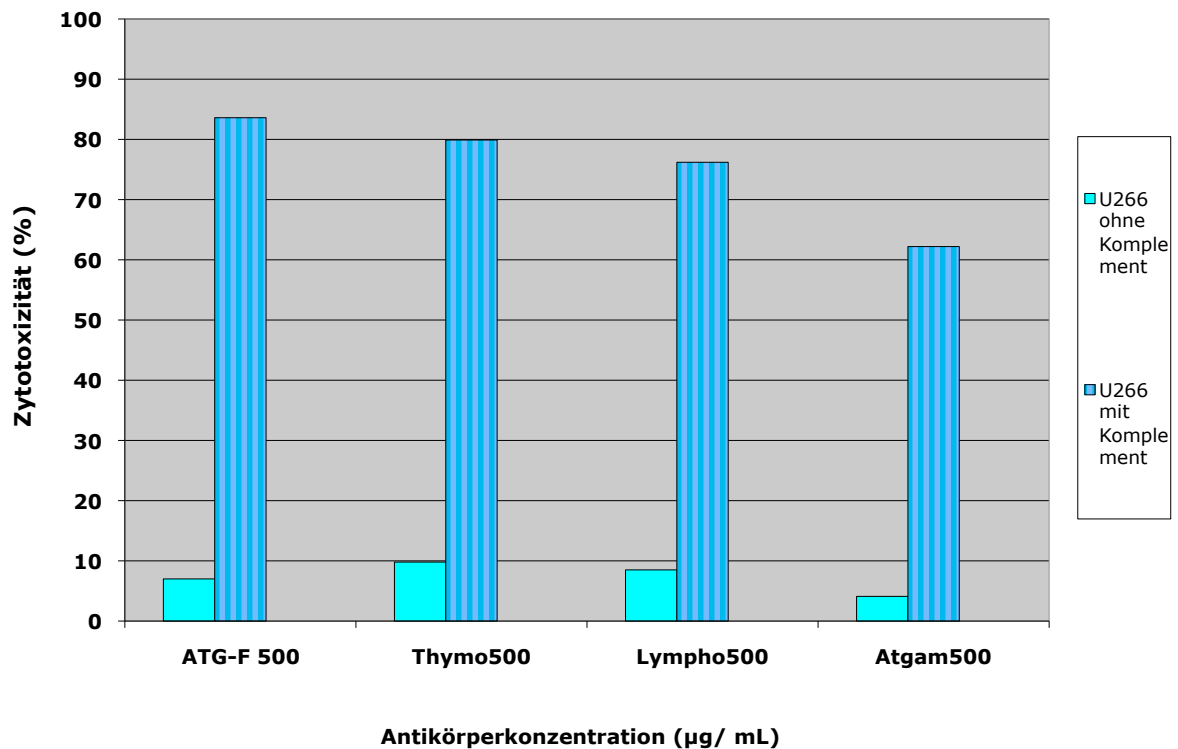


ABBILDUNG 5.3.2: KOMPLEMENT- UNABHÄNGIGE UND - ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN U266. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN U266- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG- PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTEN EXPERIMENTE.

5.4 Unterschiedliche Zytotoxizität in myeloischen Zelllinien.

Der durch Inkubation mit ATG- Präparationen erzeugte Anteil apoptotischer Zellen in den myeloischen Kulturen variierte zwischen den diversen Zellreihen immens. Untersucht wurden BV- 173, HL-60 und K562. In den komplementfreien Experimenten zeigten sich, wie aus Tabelle 5.4.1 und den Abbildungen 5.4.1 bis 5.4.3 ersichtlich, bei fast allen Zelllinien nur begrenzte zytotoxische Auswirkungen. Lediglich in der Zelllinie K 562 zeigt sich unter Inkubation mit 500 µg/ ml Lymphoglobulin® auch ohne Komplement ein deutlich zytotoxischer Effekt mit einem Anteil von 73,9 % toter Zellen.

HL-60 war im Experiment unter Komplementaddition am stärksten reagibel. Der Unterschied zu dem zytotoxischen Effekt ohne Komplement zeigte sich mit p- Werten von 0,000 und 0,001 insbesondere bei ATG-F und Thymoglobulin®.

ATG-F, Thymoglobulin® und Lymphoglobulin® zeigten ab 250 µg/ mL mit 96,6 %, 97 % und 96,7 % einen maximalen annähernd identischen zytotoxischen Effekt.

ATGAM® wies in gleicher Dosis mit 64,3 % eine niedrigere Wirkung auf. Diese war in den Versuchen mit 88,7 % in der höchst eingesetzten Konzentration von 500 µg/ mL maximal.

In den K 562- Zellen erreichten bei 500 µg/ mL ATG-F und Lymphoglobulin® komplementabhängig mit 79,9 % und 65,7 % eine relevante Zytotoxizität. Diese war für Thymoglobulin® mit 41,6 % noch mittelmäßig, für ATGAM mit 12,3 % lediglich noch unwesentlich nachweisbar.

BV- 173 zeigte bei 500 µg/ mL ATG- Fresenius® mit 9,6 %, bei ATGAM® mit 25 % nur einen geringfügigen Effekt. In der gleichen Konzentration waren die Zellen bei Thymoglobulin® mit 57,2 % und bei Lymphoglobulin® mit 46,7 % mittelmäßig reagibel.

Komplementunabhängige und komplementabhängige Zytotoxizität in BV- 173

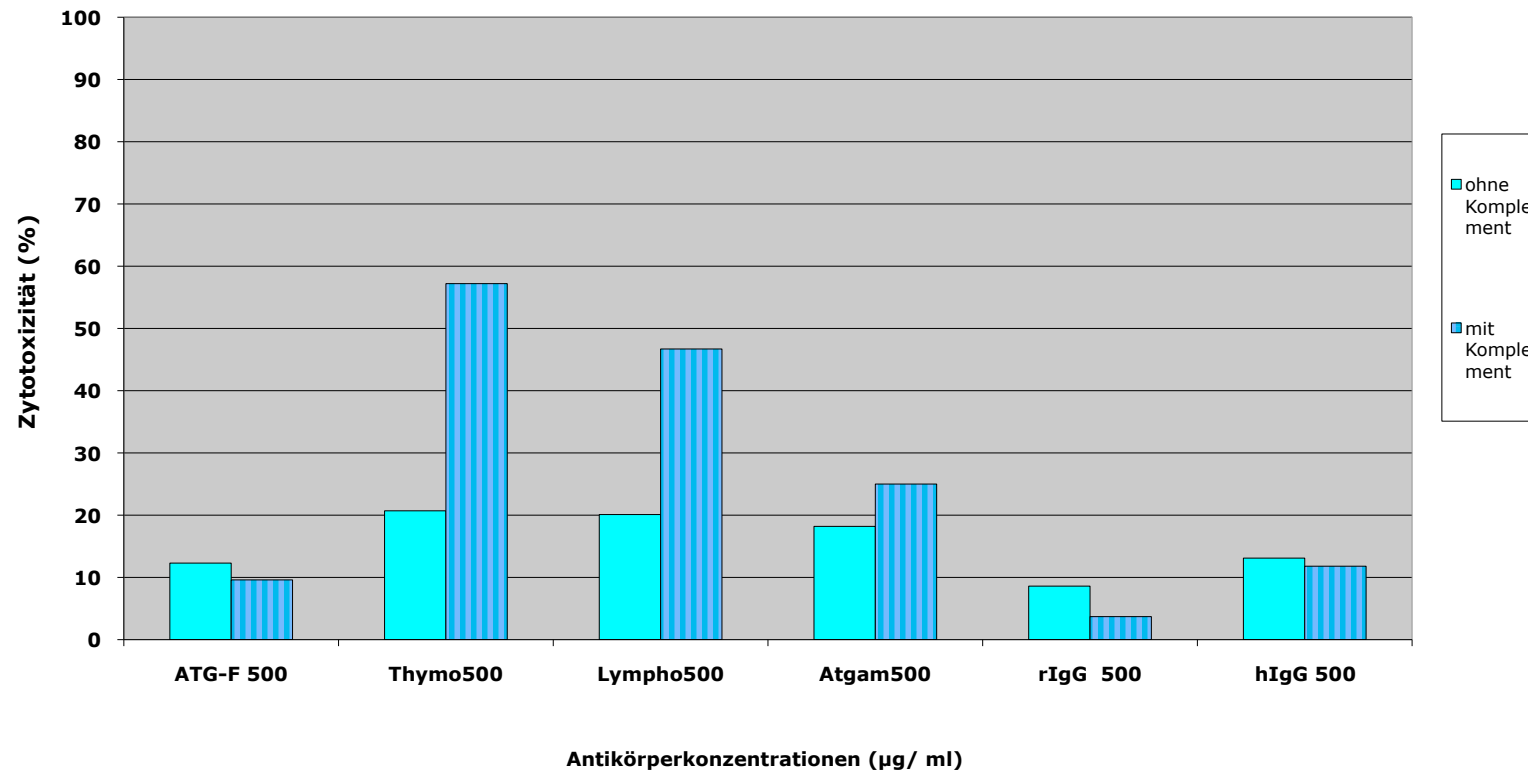


ABBILDUNG 5.4.1: KOMPLEMENTUNABHÄNGIGE UND- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN BV- 173. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN BV- 173- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG-PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE.

Komplementunabhängige und -abhängige Zytotoxizität in HL 60

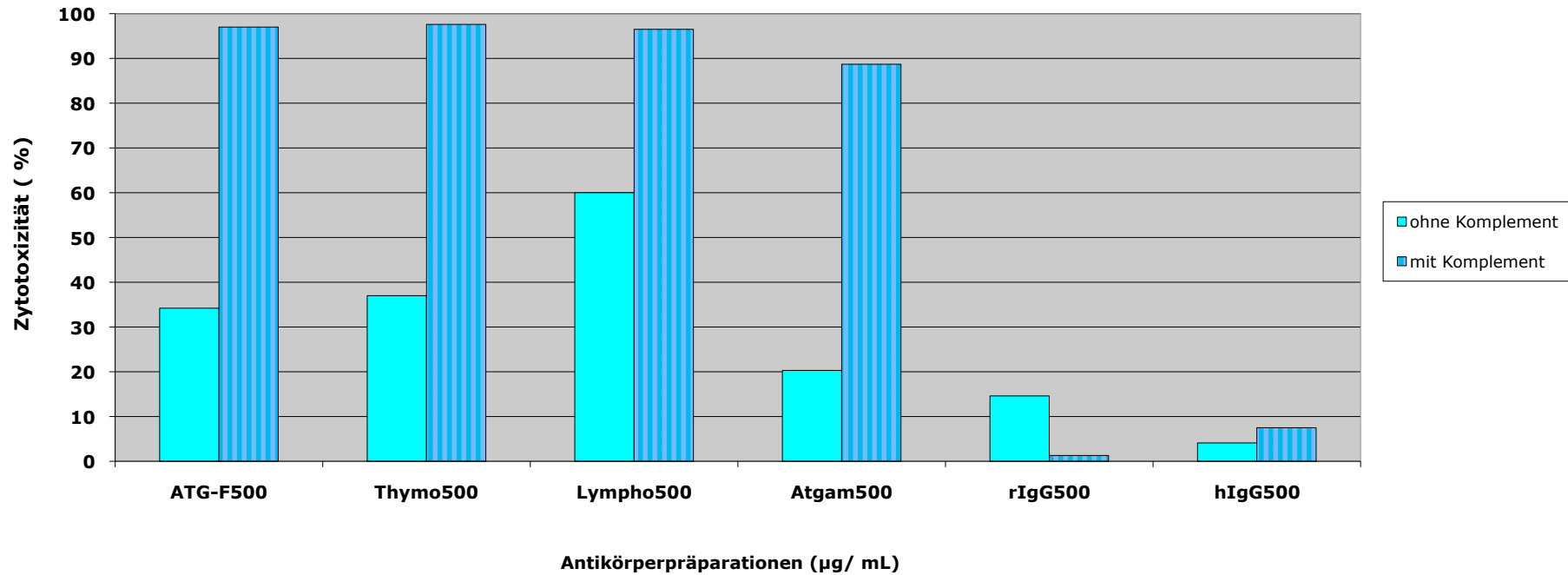


ABBILDUNG 5.4.2: KOMPLEMENTUNABHÄNGIGE UND- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN HL-60. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN HL-60- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG-PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE.

Komplementunabhängige und -abhängige Zytotoxizität in K562

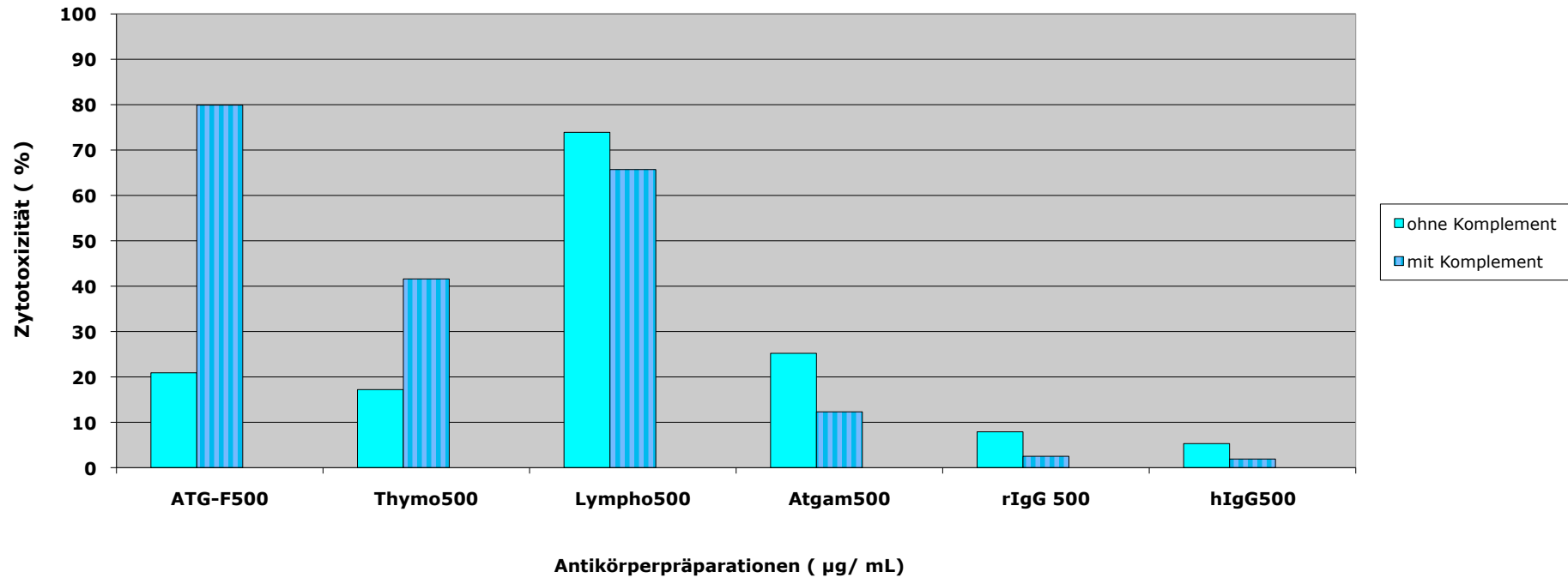


ABBILDUNG 5.4.3: KOMPLEMENTUNABHÄNGIGE UND- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN K562. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN K562- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG-PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE.

5.5 Zytotoxizität in lymphatischen Zelllinien und CLL- Patientenproben.

Alle ATG- Präparationen zeigten eine unterschiedliche Zytotoxizität gegenüber den lymphatischen Zelllinien. In JVM-2 war dieser Effekt am geringsten ausgeprägt. Komplementaddition mit relevanter Enhancerwirkung konnte in Jurkat-Zellen bei ATG-F mit $p < 0,03$, in Raji- Zellen bei Thymoglobulin® und Lymphoglobulin® mit $p = 0,001$ und $p = 0,003$, sowie in JVM-2- Zellen bei ATG-F, Thymoglobulin® und ATGAM® mit $p = 0,014$, $p = 0,042$ und $p = 0,017$ illustriert werden.

In den Abbildungen 5.5.1 bis 5.5.3 sind stellvertretend die oben genannten Zelllinien nach Inkubation mit den jeweiligen ATG in einer Konzentration von 100 µg/ml und ohne bzw. unter Hinzufügen von 50 % Komplement dargestellt.

Alle ATG- Präparate zeigten eine hohe Zytotoxizität gegenüber primären CLL- Patientenproben. Das Beifügen von Komplement verstärkte in der Gesamtheit besonders den Effekt von ATGAM® mit $p = 0,000$ und grenzwertig signifikant von ATG-F mit $p = 0,058$.

In der Gesamtheit aller Konzentrationen war ATGAM® mit $p < 0,02$ gegenüber ATG-F und mit $p = 0,021$ gegenüber Thymoglobulin® überlegen.

Beispielhaft sind in Abbildung 5.5.4 die CLL- Proben nach Inkubation mit den jeweiligen ATG in einer Konzentration von 50 und 100 µg/ml unter Hinzufügen von 50 % Komplement dargestellt.

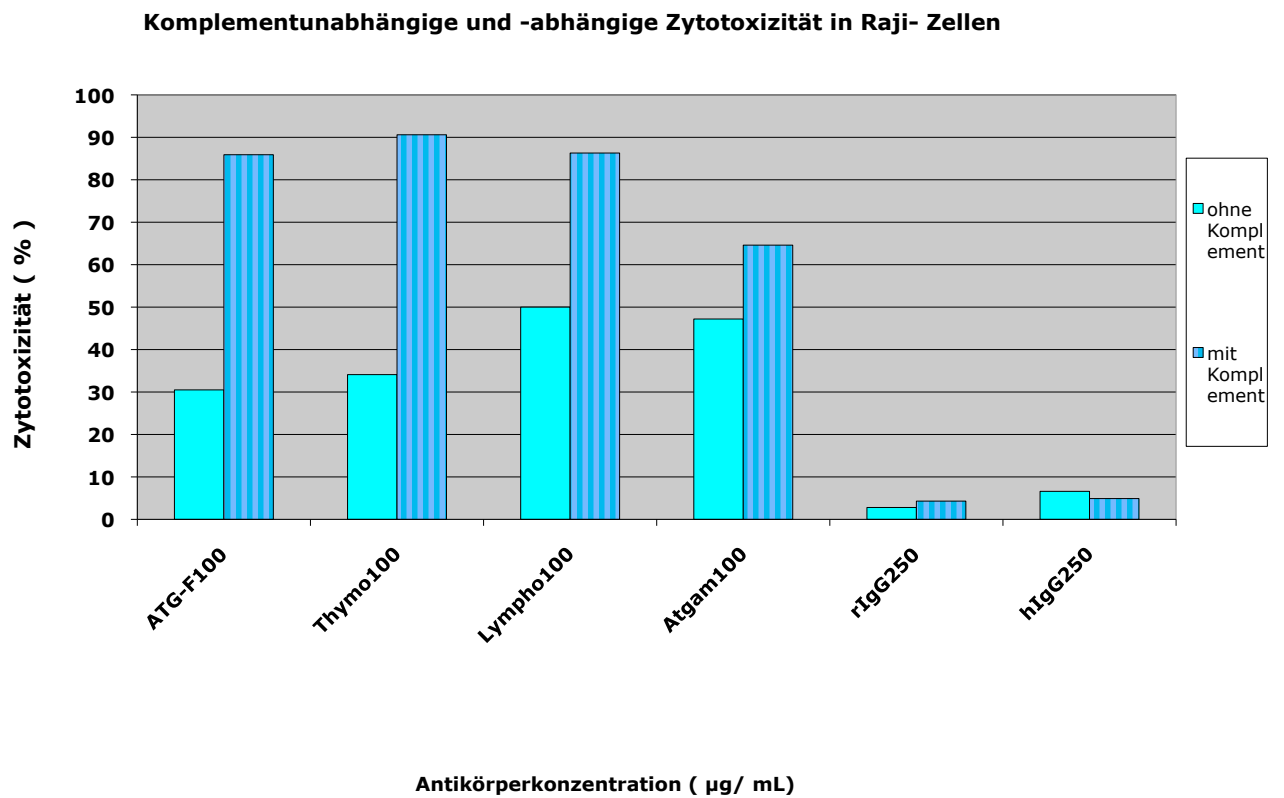


ABBILDUNG 5.5.1: KOMPLEMENT- UNABHÄNGIGE UND - ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN RAJI-ZELLEN. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN RAJI- ZELLEN NACH 45-MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE VON PRO ATG JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTEN EXPERIMENTEN.

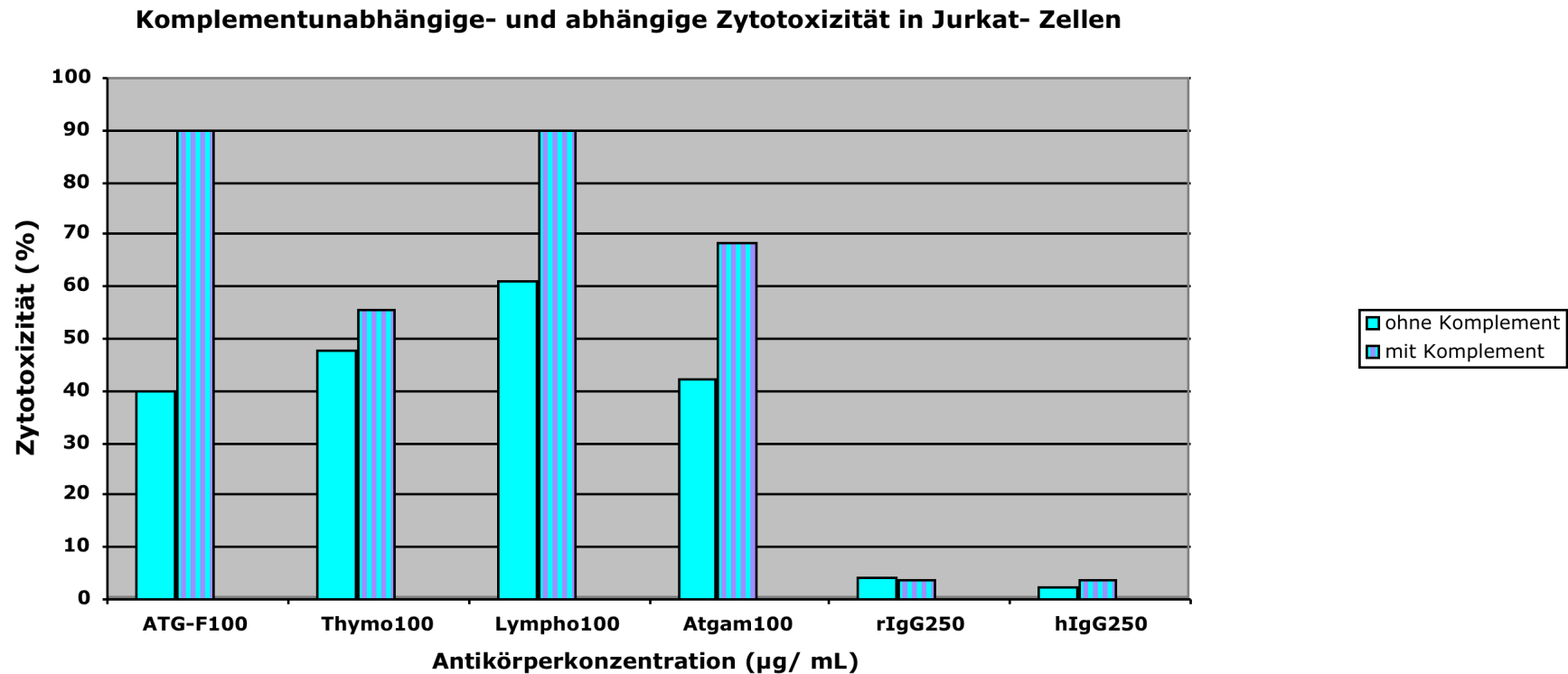


ABBILDUNG 5.5.2: KOMPLEMENT- UNABHÄNGIGE UND - ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN JURKAT-ZELLEN. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN JURKAT- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG-PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE.

Komplementunabhängige und -abhängige Zytotoxizität in JVM2- Zellen

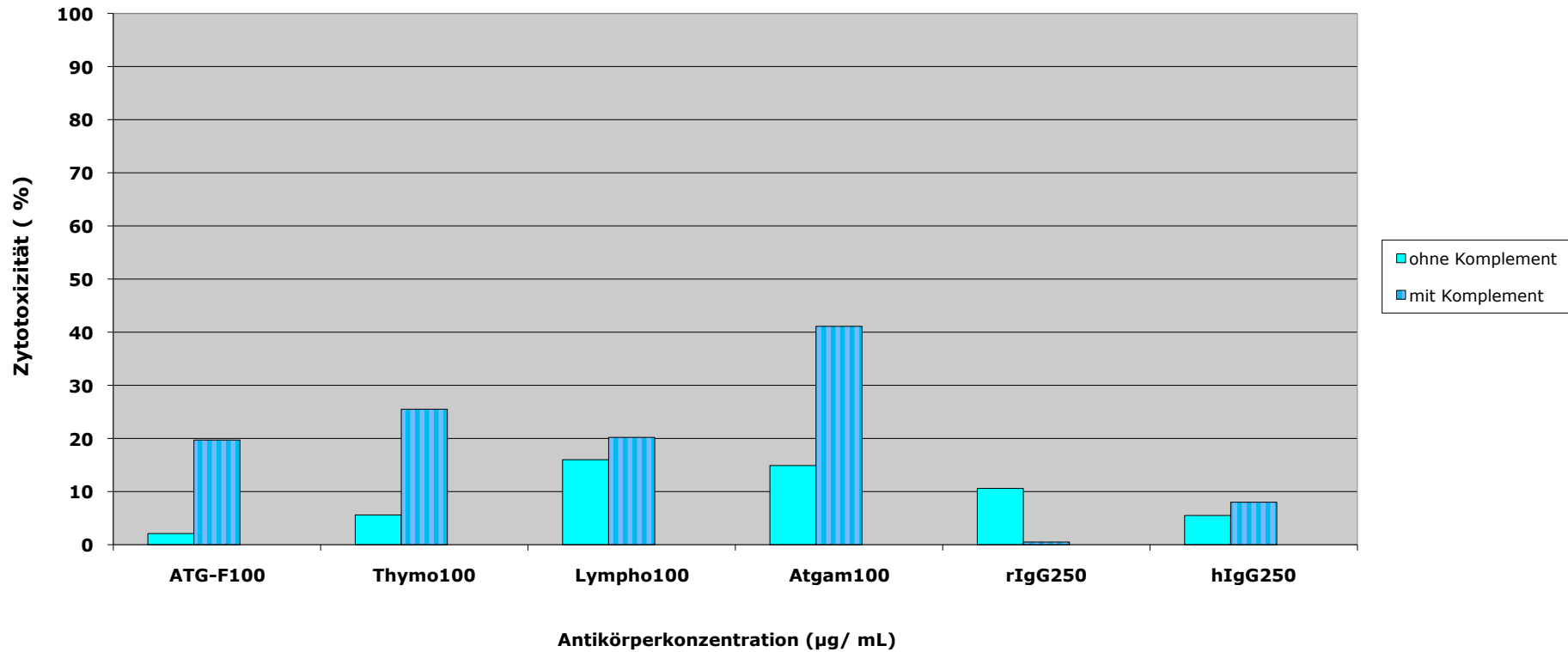


ABBILDUNG 5.5.3: KOMPLEMENT- UNABHÄNGIGE UND - ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN JVM-2-ZELLEN. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN JVM- ZELLEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN- UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, OHNE UND MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND STETS DIE MITTELWERTE DER PRO ATG-PRÄPARATION JEWEILS DREI UNABHÄNGIG VONEINANDER DURCHFÜHRTE EXPERIMENTE.

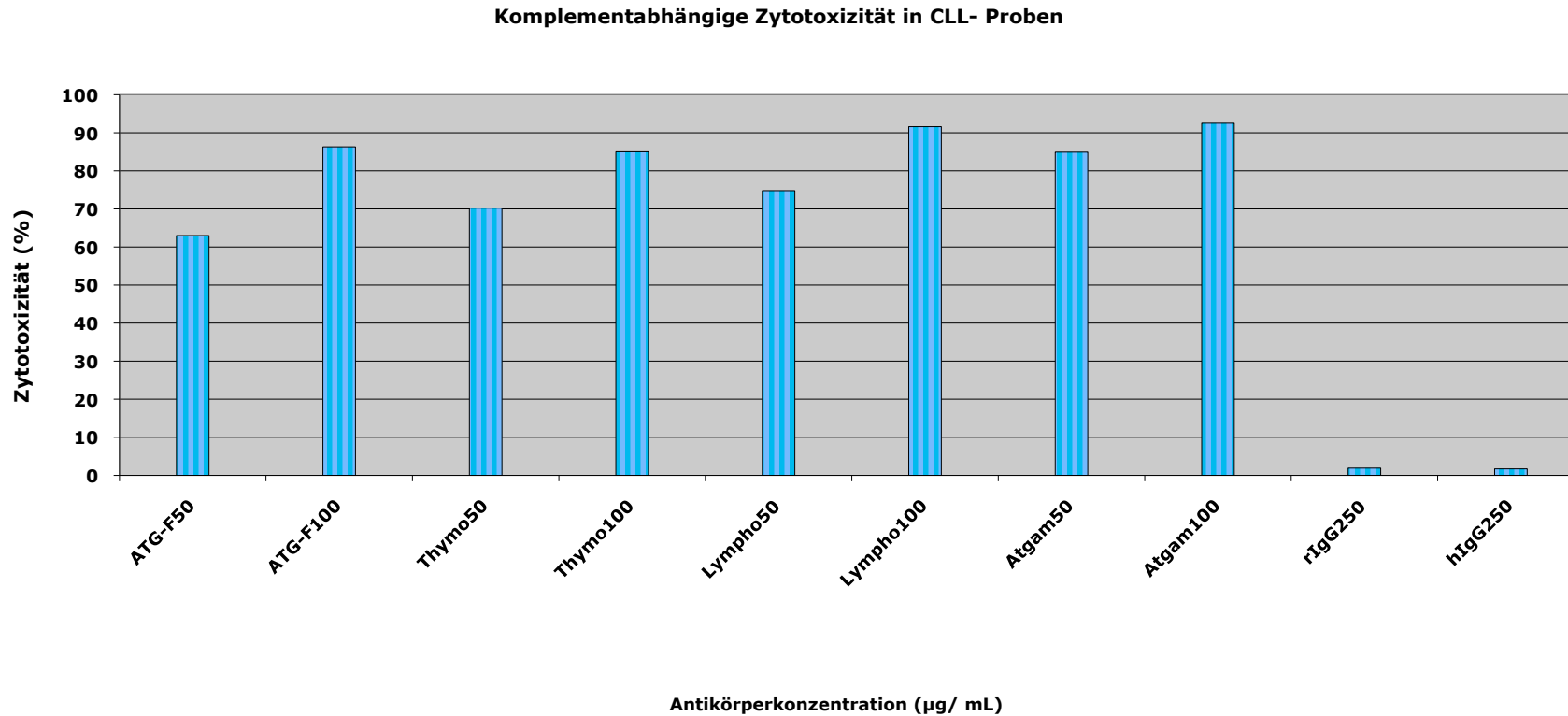


ABBILDUNG 5.5.4: KOMPLEMENT- ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT IN CLL- PATIENTENPROBEN. DURCHFLUSSZYTOMETRISCH BESTIMMTE ZYTOTOXIZITÄT IN % (= ANTEIL 7 AAD- POSITIVER ZELLEN) IN CLL- PROBEN NACH 45- MINÜTIGER INKUBATION MIT DEN UNTERSUCHTEN ATG- PRÄPARATIONEN BZW. DEN KANINCHEN UND PFERD- KONTROLLANTIKÖRPERN IN ANGEGEBENER KONZENTRATION, MIT HINZUFÜGEN VON 50 % KOMPLEMENT. DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE DER PRO ATG- KONZENTRATION FÜNF UNABHÄNGIG VONEINANDER, JEWEILS ALS DUPLIKAT DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE.

Tabelle 5.1: Zytotoxizität (%) der ATG- Präparationen gegenüber T- Zellen ohne und unter Hinzufügen von Komplement. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Zytotoxizität (M= Mean) von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und ihre Standardabweichung (SD= Standard Deviation).

	a)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml ohne Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	50	100	50	100	50	100	50	100	250	500	250	500
M +/- SD in Primären T-Zellen	33,2 +/- 17,5	75 +/- 12,3	83,2 +/- 5,1	87,8 +/- 3,3	85,4 +/- 5,3	87,8 +/- 5,9	82 +/- 9,2	84,9 +/- 6,4	4	3,9	5,7	4,8

	b)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml mit 50% Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	50	100	50	100	50	100	50	100	250	500	250	500
M +/- SD in Primären T-Zellen	58,3 +/- 14,1	87,4 +/- 9,6	72,9 +/- 8,6	90,4 +/- 4,8	60,1 +/- 14,1	82,3 +/- 11,4	29,5 +/- 16	47,8 +/- 24,1	3	2,6	3	2,8

Tabelle 5.2: Zytotoxizität (%) der ATG- Präparationen gegenüber Myelomzelllinien ohne Hinzufügen von Komplement. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Zytotoxizität (M= Mean) von pro Zelllinie drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und ihre Standardabweichung (SD= Standard Deviation).

	a)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml ohne Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500
M +/-	2,8	10	13	23,2	13,8	19,5	4	4,9	5,5	6,2	3,3	3,3
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
EJM	1,2	3,5	9,8	12,1	5,2	5,7	4,9	2,9				
M +/-	63,8	74,2	58,4	71,5	85,2	88,1	66,4	77,8	20,3	27,2	9,9	13
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
KMS12- BM	6,7	7,4	1,8	3,3	0,2	2	0,6	1,8				
M +/-	18,5	46	47	75,3	63,3	79	52,8	75,2	24	25,7	19,4	18,2
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
OPM2	16,7	11,9	15,6	8,1	18,9	5,8	40,4	18,3				
M +/-	37	61,1	41,3	52,6	50,6	57,1	26,9	36,9	31	44,1	25,7	36,5
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
RPMI- 8266	12,7	8,4	1,5	8,1	3,9	4,9	13,2	24,3				
M +/-	5	7	2,8	9,8	5,5	8,5	3,1	4,1	1	2,9	3,7	4
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
U266	2	2,7	2,8	4	1,6	3,5	3,3	2,9				

Tabelle 5.3: Zytotoxizität (%) der ATG- Präparationen gegenüber Myelomzelllinien unter Hinzufügen von Komplement. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Zytotoxizität (M= Mean) von pro Zelllinie drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und ihre Standardabweichung (SD= Standard Deviation).

	b)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml mit 50% Komplement-Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500
M +/-	35,3	54,2	42,8	63,6	33,4	32,5	30,6	20,7	0	0,6	1,1	0,5
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
EJM	29,6	7,1	0,6	2,1	0,7	15,7	22,8	12,2				
M +/-	35,3	84,8	26	74,3	50,2	96	38,1	59,1	0,1	0,7	0	0,1
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
KMS12-BM	5,9	4,3	15	17,1	40,8	2,2	47,1	6,2				
M +/-	44,8	63,1	61,8	78,6	28,2	66,5	56,5	65,3	0,7	0,3	0	0,2
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
OPM2	34,2	22,2	29	12,7	29,2	21	24,5	6,7				
M +/-	52,7	82,6	77,2	89,4	37,5	75,1	29,3	60,1	2,1	0,3	0,2	0,1
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
RPMI-8266	36,1	16,3	12,7	7,1	8,2	7,3	6,3	4,2				
M +/-	64,5	83,6	64	79,9	42,6	76,2	30,4	62,2	1,3	1	1,3	0,3
SD in	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-				
U266	30,7	14,2	10,5	0,7	22,7	9,2	10,8	7,9				

Tabelle 5.4: Zytotoxizität (%) der ATG- Präparationen gegenüber myeloischen Zelllinien ohne und unter Hinzufügen von Komplement. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Zytotoxizität (M= Mean) von pro Zelllinie drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und ihre Standardabweichung (SD= Standard Deviation).

	a)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml ohne Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500
M +/- SD in BV- 173	10,5 +/- 7,1	12,3 +/- 7,5	17,7 +/- 8,4	20,7 +/- 9,4	21,3 +/- 19,3	20,1 +/- 6,2	14,1 +/- 10,7	18,2 +/- 10,8	8,7	8,6	8,1	13,1
M +/- SD in HL60	16,6 +/- 4,5	34,2 +/- 6,9	14,3 +/- 10,8	37 +/- 10,6	19,8 +/- 13,2	60 +/- 7,3	8,5 +/- 6,7	20,3 +/- 7,5	6,7	14,6	4,1	4,1
M +/- SD in K562	15,3 +/- 5,1	20,9 +/- 5,6	11,7 +/- 5,4	17,2 +/- 6,7	37,9 +/- 6,3	73,9 +/- 7,6	13,4 +/- 1,1	25,2 +/- 6,9	5,2	7,9	6,7	5,3

	b) ATG- Konzentrationen in µg/ ml mit 50% Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500	250	500
M +/- SD in BV- 173	11,8 +/- 15,3	9,6 +/- 10,4	52,7 +/- 3,4	57,2 +/- 4,5	33,3 +/- 12,8	46,7 +/- 7	16,9 +/- 9,9	25 +/- 6,3	3,7	3,6	12,3	11,8
M +/- SD in HL60	96,6 +/- 0,5	97 +/- 0,2	97 +/- 0,2	97,6 +/- 0,4	96,7 +/- 0,7	96,5 +/- 1	64,3 +/- 53,9	88,7 +/- 13,2	0,4	1,3	3,7	7,5
M +/- SD in K562	37,5 +/- 15,2	79,9 +/- 5,9	11,5 +/- 2,6	41,6 +/- 21,3	12,7 +/- 10,9	65,7 +/- 9,9	3,8 +/- 0,3	12,3 +/- 9,8	2,6	2,5	1,8	1,9

Tabelle 5.5: Zytotoxizität (%) der ATG- Präparationen gegenüber lymphatischen Zelllinien ohne und unter Hinzufügen von Komplement. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Zytotoxizität (M= Mean) von pro Zelllinie drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und ihre Standardabweichung (SD= Standard Deviation).

	a) ATG- Konzentrationen in µg/ ml ohne Komplement- Zusatz									
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIgG	hIgG
	50	100	50	100	50	100	50	100	250	250
M +/- SD in Jurkat	12,3 +/- 2,4	39,8 +/- 6,5	30,9 +/- 3,2	47,9 +/- 13,4	26,2 +/- 10,5	61,1 +/- 14,1	24,7 +/- 10,6	42,1 +/- 12,4	4,1	2,5
M +/- SD in JVM-2	0,7 +/- 1,2	2,1 +/- 1,9	1,3 +/- 2,3	5,6 +/- 2,3	8,7 +/- 4,8	16 +/- 8,2	4 +/- 3,7	14,9 +/- 7,1	10,6	5,5
M +/- SD in Raji	15,5 +/- 5,2	30,5 +/- 9,1	24,1 +/- 3,7	34,1 +/- 8,1	25,1 +/- 6,8	50 +/- 33,3	16,1 +/- 16,5	47,2 +/- 38,6	2,8	6,6

	b) ATG- Konzentrationen in µg/ ml mit 50% Komplement- Zusatz									
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIgG	hIgG
	50	100	50	100	50	100	50	100	250	250
M +/- SD in Jurkat	56,7 +/- 25,5	90 +/- 8,4	20,8 +/- 6,7	55,6 +/- 32,7	57,8 +/- 16,6	89,9 +/- 6	36,5 +/- 2,3	68,3 +/- 17,9	3,5	3,7
M +/- SD in JVM-2	5,2 +/- 3	19,7 +/- 15,8	10,4 +/- 7,1	25,5 +/- 20,1	13,4 +/- 7,5	20,2 +/- 10,1	28,6 +/- 13	41,1 +/- 10,3	0,5	8
M +/- SD in Raji	78,3 +/- 13,7	85,9 +/- 11,4	85,1 +/- 4	90,6 +/- 5,6	86,1 +/- 4,4	86,3 +/- 4,6	48,2 +/- 57,4	64,6 +/- 25,4	4,3	4,9

Tabelle 5.6: Zytotoxizität (%) der ATG- Präparationen gegenüber primären CLL- Proben ohne und unter Hinzufügen von Komplement. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Zytotoxizität (M= Mean) von jeweils fünf unabhängig voneinander und als Duplikat durchgeführten Experimenten und ihre Standardabweichung (SD= Standard Deviation).

	a)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml ohne Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	50	100	50	100	50	100	50	100	250	500	250	500
M +/-SD in Primären CLL	60,5 +/- 19,8	66,9 +/- 16,5	73,8 +/- 16,3	75,9 +/- 13,4	73,8 +/- 18,1	71,4 +/- 22,4	68,3 +/- 18	68,8 +/- 17,2	27,7	19,6	31,1	23,1

	b)											
	ATG- Konzentrationen in µg/ ml mit 50% Komplement- Zusatz											
	ATG- F		Thymo		Lympho		Atgam		rIg G		hIgG	
	50	100	50	100	50	100	50	100	250	500	250	500
M +/- SD in Primären CLL	63 +/- 14,5	86,3 +/- 11,8	70,2 +/- 11,3	85 +/- 23,3	74,8 +/- 14,4	91,6 +/- 8,8	84,9 +/- 12,7	92,5 +/- 8,6	1,9	1,7	2,2	1,4

6 Diskussion

6.1 Einführung

Antithymozytenglobuline finden gegenwärtig eine breite Anwendung in der soliden und Stammzell- Transplantationsmedizin. Ein Grund hierfür ist die immunmodulatorische Wirkung der ATG, die das Risiko für das Auftreten der akuten und chronischen Graft- versus- Host- Disease signifikant vermindern [137; 150; 151]. Somit haben sich ATG als wichtige Eckpfeiler, vor allem im Rahmen des RIC etabliert. Diese neuere Form der minimal- Konditionierung bildet gewissermaßen eine Brücke. Denn dementsprechend kommt, durch diese Konditionierungsform vorab, die potentiell kurative Stammzelltransplantation bei bestimmten malignen hämatologischen Erkrankungen nun einem deutlich breiteren Patientenkollektiv zugute. Demgemäß wird dieser Therapieansatz jetzt auch älteren, multimorbiden Personen zugänglich, welche zuvor, wegen der stark erhöhten therapieassoziierten Letalität, von einem kurativen Behandlungsschema größtenteils ausgeschlossen waren.

Bei dem ausgelösten immunsuppressiven Effekt durch ATG ist bei deren prophylaktischer Verwendung jedoch keine erhöhte Rezidivrate für Malignome zu verzeichnen. Für diesen Sachverhalt macht man zum Einen den nach RIC ausgeprägteren direkten Graft- versus- Malignom- Effekt verantwortlich. Zum Anderen erklären die Ergebnisse diverser in den letzten Jahren durchgeführter Studien diese Beobachtung weiter. So konnten viele bislang veranlasste Untersuchungen eine direkt durch ATG erzeugte potente Wirkung gegen hämatologische Malignitäten aufzeigen [141; 147-149].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytotoxizität von vier zum Zeitpunkt der Untersuchungen kommerziell erhältlichen ATG- Präparationen an gesunden primären T- Zellen, Myelom-, myeloischen und Lymphom- Zelllinien, sowie an CLL- Patientenproben untersucht und miteinander verglichen.

6.2 Antikörper

Da die Herstellung der polyklonalen ATG sich auf der Beimpfung und der anschließenden Antikörperproduktion von Kaninchen und Pferden gründet, wurden die Zielzellen in den Experimenten, neben der jeweiligen Inkubation mit den oben genannten polyklonalen ATG, zusätzlich mit reinen Kaninchen- und Pferde- Immunglobulinen belastet. Dies erfolgte in den zwei höchsten Konzentrationen, die in den Versuchen auch für die ATG verwendet wurden.

Die Kaninchen- und Pferde- Immunglobuline fungierten als Kontroll- Antikörper, um eine allein durch die Produktionsbasis erzeugte, vermeintliche Toxizität der Antithymozytenglobuline auszuschließen.

Solch eine falsch- positive Toxizität der ATG konnte in den Experimenten nicht gesehen werden, da es keinen Hinweis auf einen proapoptotischen alleinigen signifikanten Wirkungseffekt der Kontroll- Antikörper an den untersuchten Zelllinien oder Patientenproben gab.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits die Neutralität von Kaninchen- und Pferde- IgG hinsichtlich apoptotischer Effekte auf untersuchte Zellen bestätigen [155].

6.3 ATG und T- Zellen

Weil T- Zellen einen der Hauptangriffspunkte für ATG bilden, wurde zunächst die durch Inkubation mit den verschiedenen ATG- Präparationen induzierte Apoptose in primären T- Zellen untersucht.

Thymoglobulin® zeigte hier etwas stärkere Effekte, ATGAM® eine etwas schwächere Wirkung als die anderen ATG. Insgesamt wiesen die vier unterschiedlichen Präparationen in den Komplement- freien und in den mit 50 % Komplement versetzten Experimenten jedoch ein recht ähnliches zytotoxisches Potential auf.

Diese Gegebenheit scheint auf den ersten Blick der stark unterschiedlichen Dosierungsstärke diverser ATG in der klinischen Anwendung zu widersprechen. So variieren diese von etwa 75 µg/ ml für Thymoglobulin® [156] bis hin zu etwa 1000 µg/ ml für ATG- Fresenius® [133].

Diese vermeintliche Unstimmigkeit verliert an Bedeutung, wenn man sich vor Augen führt, dass die Fähigkeit der T- Zell- Depletion zwar eine wichtige Rolle in den immunmodulatorischen Eigenschaften von polyklonalen ATG spielt und von diesen geteilt wird, jedoch nicht als einzige Schlüsselfunktion gelten kann. Demgemäß haben mehrere Studien andere ausschlaggebende immunregulatorische Phänomene nachweisen können, wie die Proliferation regulatorischer T- Zellen und NK- Zellen, die Einflussnahme auf wichtige Oberflächenadhäsionsmoleküle für Leukozyten und die Interaktion mit dendritischen und B- Zellen [142; 157; 158].

Immunologische Modifikationserscheinungen traten bereits in sehr niedrigen ATG Konzentrationen zwischen 1 und 10 µg/ ml auf. Unabhängig von der gemeinsamen Fähigkeit der T- Zell- Depletion können die ATG somit, aufgrund unterschiedlicher Methoden der Präparation, differente immunmodulatorische Potentiale innehaben. Um diese Sachlage detaillierter aufzuschlüsseln und genauere Auskunft über die klinische Relevanz zu erhalten, bedarf es weiterer Untersuchungen.

In dieser Arbeit wurden hämatologische Malignitäten betrachtet. Um maligne Zellen nachhaltig zu beeinflussen, wurde von einer hierzu notwendigen Zelldepletion ausgegangen und deswegen mit höheren ATG- Konzentrationen gearbeitet.

6.4 **ATG und Multiples Myelom**

Insbesondere beim Multiplen Myelom, welches eine der in dieser Arbeit betrachteten malignen Entitäten bildet, könnten die polyklonalen Antithymozytenglobuline zukünftig an Bedeutung gewinnen. So können sich die entarteten Zellen bei dieser Erkrankung sogar in ein und dem selben Patienten, abhängig vom Reifestadium, phänotypisch stark voneinander unterscheiden und ein variables Antigenmuster aufzeigen. Monoklonale Antikörper konnten demnach bislang nur begrenzten Erfolg als Therapeutikum aufweisen.

Ayuk et al. haben 2005 für ATG- Fresenius® einen komplement- abhängigen zytotoxischen Effekt in Myelom- Zelllinien, sowie in Myelom- Patientenproben nachweisen können [147]. Ein Jahr später zeigten Zand et al. bzw. Timm et al.

eine ähnliche Wirkung für Thymoglobulin® bei in-vitro und in- vivo Untersuchungen auf [148; 149].

In dieser Dissertationsarbeit wurden neben ATG- Fresenius® und Thymoglobulin® zwei weitere zum Zeitpunkt der Untersuchungen kommerziell erhältliche ATG- Präparationen untersucht. Auch Lymphoglobulin® und ATGAM® wiesen eine Zytotoxizität auf.

Im Vergleich untereinander besitzen die verschiedenen Präparationen ähnliche komplement- abhängige zelltoxische Potentiale, die Dosis- Wirkungskurve für ATGAM® verläuft jedoch bei den meisten Myelomzelllinien flacher und auch in der maximalen Konzentration fällt der Anteil toter Myelomzellen meist etwas geringer aus.

Erwähnenswert ist noch, dass Lymphoglobulin® in der Myelomzelllinie KMS- 12- BM in den komplement- unabhängigen eine signifikant stärkere Wirkung zeigte als die anderen drei ATG- Präparationen. Dieser Umstand relativiert sich jedoch, wenn man folgende Fakten kritisch betrachtet: Erstens zeigte sich eine solche Überlegenheit von Lymphoglobulin® nur in der einen oben genannten Zelllinie, zweitens bezieht die statistisch berechnete Signifikanz alle Gesamtwerte mit ein. Beim genauen Prüfen der Einzelmesswerte registriert man dennoch, dass die höchste Differenz in der Effektstärke sich im Vergleich zu den anderen ATG vor allem in den niedrigeren Konzentrationen niederschlägt.

Ob sich die potente zytotoxische Einwirkung auf diverse maligne Zellen auch in niedrigeren ATG- Konzentrationen, bewähren kann, müsste einer weiteren näheren Betrachtung unterzogen werden. Auch inwieweit Mechanismen wie die Antikörper- abhängige Zell- Zytotoxizität (ADCC) komplement- unabhängig eine Rolle spielen, müsste begutachtet werden.

Sehr bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass der Komplementzusatz in zwei der fünf Myelomzelllinien unverzichtbar war, um eine potente Zytotoxizität der ATG gegen die Malignitäten zu gewährleisten. So konnten die polyklonalen Antithymozytenglobuline ohne das Hinzufügen von Komplement kaum Einfluss auf die Apoptoserate von EJM- und U266- Zellen nehmen.

Um eine noch genauere Gesamtaussage bezüglich des Vergleiches der vier verschiedenen ATG- Präparationen in Myelomzellen treffen zu können, wird es zukünftig einer Evaluation bedürfen, ob ATG- Fresenius®, Lymphoglobulin® und ATGAM® ähnlich dem Thymoglobulin® in-vivo auch ihrem in- vitro beobachteten Wirkungspotential treu bleiben.

6.5 **ATG und Akute bzw. Chronische Myeloische Leukämie**

Die akute myeloische Leukämie, die den weitaus größten Anteil der im Erwachsenenalter auftretenden akuten Leukämien ausmacht, sowie die ebenfalls klinisch sehr relevante chronische myeloische Leukämie wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf ihre apoptotische Antwort hin nach Inkubation mit den diversen ATG- Präparaten geprüft.

In den untersuchten Zelllinien zeigten sich sehr variable komplement- abhängige und nahezu nicht vorhandene komplement- unabhängige Reaktionen. Lediglich in der Zelllinie K-562 war im komplementfreien Versuch ein zytotoxischer Effekt durch Lymphoglobulin® in der Konzentration 500 µg/ ml zu verzeichnen. In derselben Zelllinie ließen sich unter Komplementaddition für ATG- Fresenius® und Lymphoglobulin® in der hohen Konzentration ebenfalls Effekte nachweisen. Thymoglobulin® und ATGAM® hatten keine derartigen Auswirkungen.

In der myeloischen Zelllinie BV-173 zeigten sich auch komplement- abhängig für alle ATG- Präparationen unzureichende zelltoxische Effekte.

HL- 60 reagierte in den komplement- abhängigen Experimenten sehr sensitiv auf alle verwendeten ATG.

Die Heterogenität in der Sensitivität der myeloischen Zelllinien wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt, kann aber Anlass zu weiteren Studien geben. Gründe könnten unterschiedliche Leukämieformen und Zelldifferenzierungsgrade, sowie unterschiedliche Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen und diversen Zellproteinen sein.

Die gut reagible HL-60- Zelllinie entspricht beispielsweise einer akuten Erkrankungsform der myeloischen Leukämie. In diesem Fall sind die ausgeschwemmten malignen Zellen unreif, nicht gut differenziert.

Bei der chronischen Form der myeloischen Leukämien können die entarteten Stammzellen sich weiter zu myeloischen, monozytären und thrombozytären Zellreihen differenzieren.

Schon Bonnefoy- Bérard et al. beschrieben 1994, dass myelomonozytäre Zelllinien weniger empfindlich waren als T- und B- Zelllinien [141].

Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb auch, dass Zelllinien mit einer hohen Expression von Fas/ Apo 1-Protein, gegenüber ATG empfindlicher waren als Fas- negative Zelllinien. Kim et al. detektierten in diversen hämatopoetischen

malignen Zelllinien, beispielsweise in HL-60 eine Fas-Expression, während bei K562 keine solche vermerkt wurde [159].

In unseren Experimenten war die Zelllinie HL-60 sehr gut reagibel auf alle vier ATG- Präparationen. Die Zelllinien K562 und BV-173 waren hingegen nicht sehr sensitiv. Diese beiden für zytotoxische Effekte durch ATG nicht gut empfänglichen Zelllinien gehören der chronischen Form der myeloischen Leukämie an. Sie weisen, wie 90 Prozent aller CML das bcr/abl- Fusionsprotein, das sog. Philadelphia- Chromosom auf.

Dieses Translokationsgen nimmt bekanntermaßen Einfluss auf die Tyrosinkinase-Aktivität und wirkt proliferationsfördernd sowie apoptosehemmend auf Zellen. Dieser apoptoseprotektive Effekt ist wissenschaftlich mehrfach aufgezeigt worden [160; 161].

Interessanterweise gab es in diesem Zusammenhang diverse Untersuchungen, die eine Verknüpfung zwischen bcr/abl- Protein- Regulation und Fas- Wirkung nachweisen konnten. So wiesen McGahon et al. 1995 nach, dass die abl- Kinase-Aktivität reziprok proportional Einfluss auf den durch Fas- vermittelten Zelltod nehmen. In den aufschlussreichen Versuchen der Arbeitsgruppe waren K562-Zellen (bcr/abl-positiv, fas-negativ) nach retroviraler Überführung in eine fas-positive Form dennoch apoptoseunempfindlich. Nach Downregulation der Expression des bcr/abl- Gens waren diese jedoch deutlich empfänglich für zelltoxische Reize. Umgekehrt erhöhte sich die Resistenz der eigentlich sensiblen HL60- Zelllinie (bcr/abl- negativ, fas- positiv) gegenüber apoptosefördernden Reizen nach Überführung in eine abl- positive Form signifikant [162].

Zhao et al. und Sellerie et al. konnten außerdem eine interessante Korrelation zwischen IFN-alpha und der Downregulation des bcr/abl- Gens und ein daraufhin wiederum erhöhtes Fas- Wirkungspotential illustrieren [162-165].

Während der bereits angesprochene apoptotische Signalweg über Fas- Proteine hinsichtlich der Wirkung auf Myelomzellen laut den Untersuchungen um Ayuk et al. keine zentrale Bedeutung zu haben scheint [166], lässt sich somit bezüglich der myeloischen leukämischen Erkrankungen eine Schlüsselrolle der Fas-Proteine vermuten.

Inwieweit die in dieser Arbeit betrachteten ATG- Präparationen bei Inkubation mit den genannten Zelllinien Beziehungen zu Fas- Rezeptoren/ -Liganden eingehen, müsste in Zukunft näher dargelegt werden. Auch die Untersuchung

möglicher Kombinationseffekte von ATG mit Tyrosinkinase- Inhibitoren und Interferon- alpha sind hier, hinsichtlich einer anti- Malignom- Wirkung theoretisch vorstellbar. Die praktische Anwendung hinge dann von den Nebenwirkungen ab, die schon bei der alleinigen Einnahme der ein oder anderen genannten Substanz oft als nicht unerheblich zu bezeichnen sind.

6.6 **ATG und Lymphome**

Die Non- Hodgkin- Lymphome nehmen eine große Gruppe der malignen hämatologischen Erkrankungen ein. Die chronisch lymphatische Leukämie, die am häufigsten vorkommende Leukämieform überhaupt, ist Teil dieser Entität. Die Lymphome sind von B- oder T- Zellen ausgehend.

Unter diesem Gesichtspunkt war in dieser Arbeit ein Wirkungsvergleich der verschiedenen ATG in den verschiedenen Zelllinien und Patientenproben von großem Interesse. Dementsprechend wurden in den Versuchsreihen auch drei verschiedene Lymphom- Zelllinien, ein B-, ein T- und ein Burkitt- Lymphom, sowie multiple primäre CLL- Patientenproben hinsichtlich ihrer Sensitivität auf polyklonale ATG in Augenschein genommen.

Es zeigten sich in den durchleuchteten Lymphom- Zelllinien- Proben, im Vergleich zu den myeloischen und Myelom- Zelllinien, bereits relevante zytotoxische Auswirkungen in deutlich niedrigeren Konzentrationen.

Das Maß der Empfindlichkeit war dabei jedoch unterschiedlich ausgeprägt.

Die Burkitt- Lymphom- Zelllinie Raji und die T-Zell- Lymphom- Zelllinie Jurkat waren hochempfindlich für zelltoxische komplement- abhängige und - unabhängige ATG- Effekte. Die Zytotoxizität aller begutachteten ATG war hier sehr ähnlich, insgesamt war bei Raji Thymoglobulin® als etwas stärker, ATGAM® als etwas schwächer gegenüber den übrigen ATG einzustufen. Bei den Jurkat- Zellen waren ATG- Fresenius® und Lymphoglobulin® etwas stärkere Vertreter. Sehr effektive Einflüsse zeigten sich komplement- abhängig bereits im Konzentrationsbereich ab 50 µg/ml (Raji- Zelllinie) bis 100 µg/ml (Jurkat- Zelllinie). Diese Beobachtungen decken sich ebenso mit denen Bonnefoy- Bérards, dass B- und T- Zelllinien sensibler auf ATG reagieren als Zelllinien myelomonozytären Ursprungs [141].

In der Zelllinie JVM-2, die ein chronisches B- Zellymphom präsentiert, konnte nur in der komplement- abhängigen Variante und in den jeweils höchst eingesetzten ATG- Konzentrationen ein relevanter Anteil 7-AAD positiver und somit apoptotischer Zellen aufgezeigt werden.

Womit diese heterogene Sensitivität der Lymphom- Zellen zusammenhängt und ob sie als repräsentativ einzuordnen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender beleuchtet. Gründe hierfür könnten differente immunzytologische oder genetische Ausstattungsmerkmale der jeweiligen Zellen sein.

Gegenüber den primären CLL- Patientenproben konnte für alle vier ATG- Präparationen ein gutes komplement- abhängiges, -sowie unabhängiges zytotoxisches Potential illustriert werden. Auch hier waren dafür deutlich niedrigere ATG- Konzentrationen notwendig. Diese gute in-vitro Ansprechrate der CLL- Primärproben konnte bereits durch Ayuk et al. 2008 nachgewiesen werden. Hier wurde diesbezüglich der zytotoxische Effekt von ATG- Fresenius® und Thymoglobulin® untereinander verglichen. Thymoglobulin® konnte dabei ein stärkeres Wirkungspotential zugeschrieben werden [166].

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen wurde daneben die Wirkstärke von zwei weiteren polyklonalen Antikörpern auf die CLL erfasst. Dabei waren in den komplement- unabhängigen Experimenten Thymoglobulin® und Lymphoglobulin® dem schwächeren ATG- Fresenius® und ATGAM® signifikant überlegen. Führende ATG in den komplement- abhängigen Versuchen waren Lymphoglobulin® und ATGAM®.

In der Behandlung der CLL haben sich gegenwärtig monoklonale Antikörper als neue Hoffnungsträger herauskristallisiert, sind aber teilweise noch in der Erprobungsphase. Als mögliche potentielle Therapeutika sind der CD 20- bindende Antikörper Rituximab und das CD 52- bindende Alemtuzumab bereits für die klinische Anwendung zugelassen worden. Angesichts dieser Tatsache stellte die Arbeitsgruppe um Ayuk außerdem einen Vergleich zwischen dem zytotoxischen Potential von diesen monoklonalen Antikörpern mit dem der polyklonalen Antikörper ATG- Fresenius® und Thymoglobulin® auf. Die polyklonalen ATG waren dem monoklonalen CD20- Antikörper signifikant überlegen. Auch dem CD 52- Antikörper gegenüber waren sie entweder überlegen (im komplement- unabhängigen Versuch) oder zumindest gleich stark (mit Komplementzusatz).

Vor diesem Hintergrund sollte zukünftig insbesondere Lymphoglobulin®, das sich in unseren Versuchen als polyklonales ATG gut bewährte, ebenfalls mit den monoklonalen Antikörpern verglichen werden. Auch eine Überprüfung auf einen synergistischen Effekt mit dem in der CLL- Therapie etablierten Purinanalogen Fludarabin sollte in Kombinationsversuchen stattfinden. Demgemäß konnte für ATG- Fresenius® und Thymoglobulin® durch Ayuk et al. 2008 ein solcher Synergismus bereits beschrieben werden [143].

Die Entscheidung über die Wahl des polyklonalen ATG würde sich dann nach der in- vivo benötigten Konzentration richten. Ferner sollte eine vergleichende weitere Aufschlüsselung der Epitope und somit Bindungsstellen für die diversen ATG stattfinden, um nähere Informationen über Spezifität und mögliche Nebenwirkungen in- vivo zu erhalten.

6.7 **ATG- ein klinischer Ausblick**

Das zytotoxische Potential der vier untersuchten ATG- Präparationen macht die anzunehmende zukünftige Bedeutung von polyklonalen ATG in der Bekämpfung hämatologischer Malignitäten verständlich.

Jedoch gilt es, Umstände zu berücksichtigen, die die Anwendung von polyklonalen Antithymozytenglobulinen limitieren könnte.

Zunächst müsste genau evaluiert werden, welche Konzentrationen in- vivo benötigt werden, um oben genannte Effekte zu erhalten und es wäre zu prüfen, ob diese überhaupt klinisch erreicht werden können. In den vorliegenden Experimenten konnte beispielsweise Thymoglobulin® in einer in der allogenen SZT- Medizin üblichen Dosis, einen zytotoxischen Effekt auf CLL- Zellen auslösen, während dieselbe Konzentration für Myelom- oder myeloische Zellen nicht ausreichte, sondern die benötigte Dosis um ein Vielfaches höher lag.

Auch muss hier, wie bereits angesprochen, Berücksichtigung finden, dass die in- vivo erreichbare Konzentration der diversen ATG stark, von etwa 75 µg/ml für Thymoglobulin® bis etwa 1000 µg/ml für ATG- Fresenius® voneinander abweichen kann.

Mit der Anwendung von ATG geht eine starke Immunsuppression einher, was wiederum nachteilig das erhöhte Risiko für Infektionen und daraus entstehende, teils fatale, Komplikationen mit sich bringen kann.

Diese Umstände limitieren einen Einsatz in beliebiger Dosierung und schränken die Zahl der für die Therapie mit ATG geeigneten Patienten vermutlich ein. Nennenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass polyklonale ATG auch Antigene binden, die sich auf gesunden wichtigen hämatologischen Zellen befinden, wie auf Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophilen oder Endothelzellen [167], schwere Nebenwirkungen mit großer Vielfalt sind somit denkbar.

Des Weiteren vorstellbar bei der häufigen Verwendung von ATG im Organismus wäre die Entwicklung von Antikörpern gegen Antithymozytenglobuline. Dies könnte eine wiederholte Verabreichung bei zunehmend resistentem Zielorganismus erheblich einschränken.

Eine detaillierte Prüfung auf Caspase- oder Cathepsin- bzw. Genistein- sensitive- Tyrosinkinase- Abhängigkeit, sowie auf eine mögliche Interaktion mit NK- Zellen bei der ADCC hat in dieser Arbeit nicht stattgefunden, sollte aber in Zukunft in den untersuchten diversen Krankheitsbildern und ATG- Präparationen zur weiteren Aufschlüsselung der Wirkungspotentiale erfolgen.

7 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom, die akute und chronische myeloische, sowie die chronische lymphatische Leukämie sind allesamt maligne hämatologische, potentiell lebensbedrohliche Erkrankungen.

Im Hinblick auf einen kurativen Behandlungsansatz haben autologe bzw. allogene Stammzelltransplantation heutzutage bereits eine entscheidende Rolle inne. Erhöhte Mortalitätsraten sind mit diesen Therapieoptionen weiterhin assoziierte Probleme.

Neuere Konditionierungsregimes, wie das RIC, bergen wiederum potentiell Probleme wie Transplantatabstoßungsreaktionen oder das erhöhte Rezidivrisiko in sich. Hier wurden polyklonale Antithymozytenglobuline aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeit mit in das Behandlungskonzept aufgenommen und konnten erfolgreich das Auftreten einer akuten, sowie chronischen GvHD mindern.

Nachdem durch mehrere Studien zudem bei ATG- Medikation eine niedrigere Rezidivrate für das Wiederauftreten von Malignomen beschrieben wurde, unterzog man die Antikörper weiteren Untersuchungen hinsichtlich ihrer direkten Anti- Tumor- Wirkung. Effekte gegen das multiple Myelom und die chronisch lymphatische Leukämie konnten mehrfach in- vitro und -vivo aufgezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden polyklonale ATG auf ihre zytotoxische Wirkung gegenüber gesunden T- Zellen und gegenüber dem Multiplen Myelom, der akuten und chronischen myeloischen, sowie der chronischen lymphatischen Leukämie überprüft. Dabei handelte es sich um vier verschiedene zum Zeitpunkt der Untersuchung kommerziell erhältliche ATG, die in klinisch relevanten Dosen entsprechend in- vitro eingesetzt wurden.

Jede der Präparationen zeigte miteinander vergleichbare potente zytotoxische Effekte in gesunden T- Zellen und den malignen Zelllinien und Patientenproben. Die Auswirkungen waren eindeutig und sowohl komplement- abhängig, als auch -unabhängig in den T- Zellen sowie im Multiplen Myelom, den Lymphom- Zelllinien und den CLL- Patientenproben zu beobachten. Bei den NHL- Proben setzte ein deutlich zelltoxischer Effekt bereits in solchen Konzentrationen ein, die

sich beispielsweise für Thymoglobulin® in der allogenen Stammzelltransplantation schon bewährt haben.

Im Multiplen Myelom und auch in den myeloisch leukämischen Zelllinien waren zum Abtöten der Zellen deutlich höhere Konzentrationen notwendig. Die myeloischen Zelllinien waren insgesamt viel unempfindlicher bei Inkubation mit den verschiedenen ATG.

Abschließend lässt sich sagen, dass die polyklonalen ATG das Behandlungsspektrum für hämatologische Malignitäten, vor allem bei Lymphomen und beim Multiplen Myelom erfolgreich erweitern könnten. Im Rahmen der autologen und allogenen Stammzelltransplantation sollten sie nicht nur aufgrund ihrer immunmodifizierenden Eigenschaft sondern auch zur möglichen Ergänzung und Verstärkung chemotherapeutischer Effekte Einzug in das Therapieregime erhalten.

Die Umsetzbarkeit und Auswahl der ATG- Anwendung im klinischen Alltag hinge dann von der jeweils im Organismus erreichbaren tolerierbaren Konzentration ab.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Keren, D. F. Heavy/Light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009. 55, 9, 1606-1608.
- [2] Yan, T. Q., Guo, W., Tang, X. D. et al. [Clinical study of solitary bone plasmacytoma]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2003. 41, 10, 749-752.
- [3] Harousseau, J. L. and Dreyling, M. Multiple myeloma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008. 19 Suppl 2, ii55-7.
- [4] Ichimaru, M., Ishimaru, T., Mikami, M. et al. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 1982. 69, 2, 323-328.
- [5] Riedel, D. A. and Pottern, L. M. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992. 6, 2, 225-247.
- [6] Bergsagel, D. E., Wong, O., Bergsagel, P. L. et al. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood* 1999. 94, 4, 1174-1182.
- [7] Salmon, S. E. and Kyle, R. A. Silicone gels, induction of plasma cell tumors, and genetic susceptibility in mice: a call for epidemiologic investigation of women with silicone breast implants. *J Natl Cancer Inst* 1994. 86, 14, 1040-1041.
- [8] Grosbois, B., Jego, P., Attal, M. et al. Familial multiple myeloma: report of fifteen families. *Br J Haematol* 1999. 105, 3, 768-770.
- [9] Rettig, M. B., Ma, H. J., Vescio, R. A. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 1997. 276, 5320, 1851-1854.
- [10] Sjak-Shie, N. N., Vescio, R. A., and Berenson, J. R. The role of human herpesvirus-8 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999. 13, 6, 1159-1167.
- [11] Roodman, G. D. Pathogenesis of myeloma bone disease. *J Cell Biochem* 2010. 109, 2, 283-291.
- [12] Sezer, O. Myeloma bone disease: recent advances in biology, diagnosis, and treatment. *Oncologist* 2009. 14, 3, 276-283.
- [13] Yaccoby, S. Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumour growth. *Br J Haematol* 2010. 149, 3, 311-321.
- [14] Nau, K. C. and Lewis, W. D. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2008. 78, 7, 853-859.
- [15] Adam, Z., Pour, L., Krejci, M. et al. [Kidney damage in multiple myeloma and other monoclonal gammopathies]. *Vnitr Lek* 2008. 54, 9, 847-861.
- [16] Lewis, M. A., Hendrickson, A. W., and Moynihan, T. J. Oncologic emergencies: Pathophysiology, presentation, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin* 2011.
- [17] Vivaldi, P., Comotti, C., and Pedrazzoli, M. [The kidney in multiple myeloma. The physiopathological and clinical aspects]. *Recenti Prog Med* 1994. 85, 2, 123-133.

- [18] Madan, S., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q. et al. Clinical features and treatment response of light chain (AL) amyloidosis diagnosed in patients with previous diagnosis of multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2010. 85, 3, 232-238.
- [19] Jhang, Y., Lee, J. J., Park, J. M. et al. Polyneuropathy associated with IgA paraproteinemia and amyloidosis: a case report and literature review. *J Clin Neurol* 2007. 3, 2, 116-119.
- [20] Liang, C., Gonzalez, M., Patel, R. et al. POEMS syndrome (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, and skin changes). *Dermatol Online J* 2009. 15, 8, 9.
- [21] Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003. 121, 5, 749-757.
- [22] Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009. 113, 22, 5412-5417.
- [23] Durie, B. G. and Salmon, S. E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975. 36, 3, 842-854.
- [24] Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G. et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005. 23, 15, 3412-3420.
- [25] Blade, J., Cibeira, M. T., Fernandez de Larrea, C. et al. Multiple myeloma. *Ann Oncol* 2010. 21 Suppl 7, vii313-9.
- [26] Blade, J., Rosinol, L., and Cibeira, M. T. Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel agents. *Ann Oncol* 2008. 19 Suppl 7, vii117-20.
- [27] Alexanian, R., Haut, A., Khan, A. U. et al. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 1969. 208, 9, 1680-1685.
- [28] Attal, M., Harousseau, J. L., Stoppa, A. M. et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 1996. 335, 2, 91-97.
- [29] Child, J. A., Morgan, G. J., Davies, F. E. et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003. 348, 19, 1875-1883.
- [30] Stewart, A. K., Vescio, R., Schiller, G. et al. Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001. 19, 17, 3771-3779.
- [31] Gahrton, G., Svensson, H., Cavo, M. et al. Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983--93 and 1994--8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br J Haematol* 2001. 113, 1, 209-216.
- [32] Kroger, N., Sayer, H. G., Schwerdtfeger, R. et al. Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 2002. 100, 12, 3919-3924.
- [33] Lokhorst, H., Einsele, H., Vesole, D. et al. International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010. 28, 29, 4521-4530.

- [34] Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R. et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999. 341, 21, 1565-1571.
- [35] Lokhorst, H., Huijgens, P. C., Raymakers, R. et al. [Modern treatment methods for multiple myeloma: guidelines from the Dutch Haemato-Oncology Association (HOVON)]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005. 149, 15, 808-813.
- [36] Ehninger, G., Link, H., and Berdel, W. E. Akute myeloische Leukämie-Pathophysiologie, Diagnostik. Therapie, Prognose. Deutscher Ärzte-Verlag 2008.
- [37] Checkoway, H., Wilcosky, T., Wolf, P. et al. An evaluation of the associations of leukemia and rubber industry solvent exposures. *Am J Ind Med* 1984. 5, 3, 239-249.
- [38] Greaves, M. F. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997. 349, 9048, 344-349.
- [39] Ichimaru, M., Ishimaru, T., and Belsky, J. L. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *J Radiat Res* 1978. 19, 3, 262-282.
- [40] Irons, R. D. and Stillman, W. S. The process of leukemogenesis. *Environ Health Perspect* 1996. 104 Suppl 6, 1239-1246.
- [41] Jablon, S. and Kato, H. Childhood cancer in relation to prenatal exposure to atomic-bomb radiation. *Lancet* 1970. 2, 7681, 1000-1003.
- [42] KRIVIT, W. and GOOD, R. A. Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia; report of a nationwide survey. *AMA J Dis Child* 1957. 94, 3, 289-293.
- [43] MILLER, O. J., BREG, W. R., SCHMICKEL, R. D. et al. A family with an XXXXY male, a leukaemic male, and two 21-trisomic mongoloid females. *Lancet* 1961. 2, 7193, 78-79.
- [44] Joventino, L. P., Stock, W., Lane, N. J. et al. Certain HLA antigens are associated with specific morphologic and cytogenetic subsets of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995. 9, 3, 433-439.
- [45] Martens, J. H. and Stunnenberg, H. G. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett* 2010. 584, 12, 2662-2669.
- [46] Mrozek, K., Dohner, H., and Bloomfield, C. D. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2007. 14, 2, 106-114.
- [47] Bird, A. R., Karabus, C. D., Pearl, R. et al. The classification of acute leukaemia in childhood. *S Afr Med J* 1981. 60, 20, 769-773.
- [48] Head, D. R., Savage, R. A., Cerezo, L. et al. Reproducibility of the French-American-British classification of acute leukemia: the Southwest Oncology Group Experience. *Am J Hematol* 1985. 18, 1, 47-57.
- [49] Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. et al. World Health Organization classification of tumours. tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. pathology and genetics. 2001.
- [50] Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009. 114, 5, 937-951.
- [51] Youn, B. S., Mantel, C., and Broxmeyer, H. E. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev* 2000. 177, 150-174.
- [52] Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J. et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis,

- Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003. 21, 24, 4642-4649.
- [53] Erba, H. P. Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol* 2010. 23, 4, 495-501.
- [54] Estey, E. and Dohner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006. 368, 9550, 1894-1907.
- [55] Appelbaum, F. R., Fisher, L. D., and Thomas, E. D. Chemotherapy v marrow transplantation for adults with acute nonlymphocytic leukemia: a five-year follow-up. *Blood* 1988. 72, 1, 179-184.
- [56] Champlin, R. E., Ho, W. G., Gale, R. P. et al. Treatment of acute myelogenous leukemia. A prospective controlled trial of bone marrow transplantation versus consolidation chemotherapy. *Ann Intern Med* 1985. 102, 3, 285-291.
- [57] Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990. 75, 3, 555-562.
- [58] Yanada, M., Matsuo, K., Emi, N. et al. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 2005. 103, 8, 1652-1658.
- [59] Goldstone, A. H., Burnett, A. K., and Avivi, I. Secondary AML has a worse outcome than de novo AML even taking into account cytogenetics and age. *Blood* 2002. 100, 88.
- [60] Grignani, F., Fagioli, M., Alcalay, M. et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994. 83, 1, 10-25.
- [61] Fenaux, P., Chastang, C., Chomienne, C. et al. Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) by all transretinoic acid (ATRA) combined with chemotherapy: The European experience. European APL Group. *Leuk Lymphoma* 1995. 16, 5-6, 431-437.
- [62] Orozco, J. J. and Appelbaum, F. R. Unfavorable, complex, and monosomal karyotypes: the most challenging forms of acute myeloid leukemia. *Oncology (Williston Park)* 2012. 26, 8, 706-712.
- [63] Schlenk, R. F., Dohner, K., Krauter, J. et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008. 358, 18, 1909-1918.
- [64] Patel, J. P., Gonen, M., Figueroa, M. E. et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012. 366, 12, 1079-1089.
- [65] Joske, D. J. Chronic myeloid leukaemia: the evolution of gene-targeted therapy. *Med J Aust* 2008. 189, 5, 277-282.
- [66] Sessions, J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *Am J Health Syst Pharm* 2007. 64, 24 Suppl 15, S4-9.
- [67] Ahmed, M., Dusanter-Fourt, I., Bernard, M. et al. BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (cEpoR) activate distinct mechanisms for growth factor-independence and inhibition of apoptosis in Ba/F3 cell line. *Oncogene* 1998. 16, 4, 489-496.
- [68] Amarante-Mendes, G. P., McGahon, A. J., Nishioka, W. K. et al. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* 1998. 16, 11, 1383-1390.
- [69] Evans, C. A., Owen-Lynch, P. J., Whetton, A. D. et al. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Res* 1993. 53, 8, 1735-1738.

- [70] Cortes, J. E., Talpaz, M., O'Brien, S. et al. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* 2006. 106, 6, 1306-1315.
- [71] Kantarjian, H., O'Brien, S., Cortes, J. et al. Survival advantage with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myelogenous leukemia (CML-CP) after IFN-alpha failure and in late CML-CP, comparison with historical controls. *Clin Cancer Res* 2004. 10, 1 Pt 1, 68-75.
- [72] Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Cortes, J. et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer* 2003. 98, 12, 2636-2642.
- [73] Kantarjian, H. M., Cortes, J. E., O'Brien, S. et al. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood* 2004. 104, 7, 1979-1988.
- [74] Radich, J. P. Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010. 2010, 122-128.
- [75] O'Brien, S., Kantarjian, H., and Talpaz, M. Practical guidelines for the management of chronic myelogenous leukemia with interferon alpha. *Leuk Lymphoma* 1996. 23, 3-4, 247-252.
- [76] Saussele, S., Lauseker, M., Gratwohl, A. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood* 2010. 115, 10, 1880-1885.
- [77] Hehlmann, R. and Saussele, S. Treatment of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Haematologica* 2008. 93, 12, 1765-1769.
- [78] Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994. 8, 10, 1640-1645.
- [79] Bannerji, R. and Byrd, J. C. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2000. 12, 1, 22-29.
- [80] Schimmer, A. D., Munk-Pedersen, I., Minden, M. D. et al. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2003. 4, 3, 211-218.
- [81] Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000. 343, 26, 1910-1916.
- [82] Gahrton, G., Robert, K. H., Friberg, K. et al. Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1980. 1(8160), 8160, 146-147.
- [83] Juliusson, G., Oscier, D. G., Fitchett, M. et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990. 323, 11, 720-724.
- [84] Giles, F. J., O'Brien, S. M., and Keating, M. J. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol* 1998. 25, 1, 117-125.
- [85] Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975. 46, 2, 219-234.
- [86] Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981. 48, 1, 198-206.
- [87] Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2013. 88, 9, 803-816.

- [88] 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, 7, 2850-2858.
- [89] Esteve, J., Villamor, N., Colomer, D. et al. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status. *Leukemia* 2001. 15, 3, 445-451.
- [90] Paneesha, S. and Milligan, D. W. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005. 128, 2, 145-152.
- [91] Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008. 111, 12, 5446-5456.
- [92] Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M. et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996. 22, 5-6, 439-447.
- [93] Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C. et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999. 93, 5, 1732-1737.
- [94] Knauf, W. U., Langenmayer, I., Ehlers, B. et al. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997. 27, 5-6, 523-532.
- [95] Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A. et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999. 94, 6, 1848-1854.
- [96] Turgut, B., Vural, O., Pala, F. S. et al. 17p Deletion is associated with resistance of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to in vitro fludarabine-induced apoptosis. *Leuk Lymphoma* 2007. 48, 2, 311-320.
- [97] Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A. et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005. 353, 17, 1793-1801.
- [98] Rossi, S., Shimizu, M., Barbarotto, E. et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* 2010. 116, 6, 945-952.
- [99] Kolb, H. J. Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties. *Vox Sang* 1998. 74 Suppl 2, 321-329.
- [100] Slavin, S., Nagler, A., Naparstek, E. et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998. 91, 3, 756-763.
- [101] Gale, R. P. and Champlin, R. E. How does bone-marrow transplantation cure leukaemia? *Lancet* 1984. 2, 8393, 28-30.
- [102] Lee, J. H., Choi, S. J., Lee, J. H. et al. Anti-leukemic effect of graft-versus-host disease on bone marrow and extramedullary relapses in acute leukemia. *Haematologica* 2005. 90, 10, 1380-1388.
- [103] Sullivan, K. M., Weiden, P. L., Storb, R. et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow

- transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 1989. 73, 6, 1720-1728.
- [104] Bjorkstrand, B. B., Ljungman, P., Svensson, H. et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 1996. 88, 12, 4711-4718.
- [105] Bensinger, W. I., Buckner, C. D., Anasetti, C. et al. Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome. *Blood* 1996. 88, 7, 2787-2793.
- [106] Crawley, C., Iacobelli, S., Bjorkstrand, B. et al. Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood* 2007. 109, 8, 3588-3594.
- [107] Bruno, B., Rotta, M., Patriarca, F. et al. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 2007. 356, 11, 1110-1120.
- [108] Garban, F., Attal, M., Michallet, M. et al. Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma. *Blood* 2006. 107, 9, 3474-3480.
- [109] Maloney, D. G., Molina, A. J., Sahebi, F. et al. Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. *Blood* 2003. 102, 9, 3447-3454.
- [110] Rotta, M., Storer, B. E., Sahebi, F. et al. Long-term outcome of patients with multiple myeloma after autologous hematopoietic cell transplantation and nonmyeloablative allografting. *Blood* 2009. 113, 14, 3383-3391.
- [111] Gupta, V., Tallman, M. S., He, W. et al. Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood* 2010. 116, 11, 1839-1848.
- [112] Koreth, J., Schlenk, R., Kopecky, K. J. et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* 2009. 301, 22, 2349-2361.
- [113] Cahn, J. Y., Labopin, M., Sierra, J. et al. No impact of high-dose cytarabine on the outcome of patients transplanted for acute myeloblastic leukaemia in first remission. Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 2000. 110, 2, 308-314.
- [114] Tallman, M. S., Rowlings, P. A., Milone, G. et al. Effect of postremission chemotherapy before human leukocyte antigen-identical sibling transplantation for acute myelogenous leukemia in first complete remission. *Blood* 2000. 96, 4, 1254-1258.
- [115] Duval, M., Klein, J. P., He, W. et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *J Clin Oncol* 2010. 28, 23, 3730-3738.
- [116] Gratwohl, A., Baldomero, H., Passweg, J. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. *Leukemia* 2003. 17, 5, 941-959.

- [117] Bacher, U., Klyuchnikov, E., Zabelina, T. et al. The changing scene of allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia--a report from the German Registry covering the period from 1998 to 2004. *Ann Hematol* 2009. 88, 12, 1237-1247.
- [118] Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009. 27, 35, 6041-6051.
- [119] Hansen, J. A., Gooley, T. A., Martin, P. J. et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1998. 338, 14, 962-968.
- [120] McGlave, P. B., Shu, X. O., Wen, W. et al. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years' experience of the national marrow donor program. *Blood* 2000. 95, 7, 2219-2225.
- [121] Carpenter, P. A., Snyder, D. S., Flowers, M. E. et al. Prophylactic administration of imatinib after hematopoietic cell transplantation for high-risk Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Blood* 2007. 109, 7, 2791-2793.
- [122] DeAngelo, D. J., Hochberg, E. P., Alyea, E. P. et al. Extended follow-up of patients treated with imatinib mesylate (gleevec) for chronic myelogenous leukemia relapse after allogeneic transplantation: durable cytogenetic remission and conversion to complete donor chimerism without graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 2004. 10, 15, 5065-5071.
- [123] Kerbauy, F. R., Storb, R., Hegenbart, U. et al. Hematopoietic cell transplantation from HLA-identical sibling donors after low-dose radiation-based conditioning for treatment of CML. *Leukemia* 2005. 19, 6, 990-997.
- [124] Crawley, C., Szydlo, R., Lalancette, M. et al. Outcomes of reduced-intensity transplantation for chronic myeloid leukemia: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Blood* 2005. 106, 9, 2969-2976.
- [125] Faber, E., Koza, V., Vitek, A. et al. Reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia is associated with better overall survival but inferior disease-free survival when compared with myeloablative conditioning - a retrospective study of the Czech National Hematopoietic Stem Cell Transplantation Registry. *Neoplasma* 2007. 54, 5, 443-446.
- [126] Dreger, P., Brand, R., Hansz, J. et al. Treatment-related mortality and graft-versus-leukemia activity after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia using intensity-reduced conditioning. *Leukemia* 2003. 17, 5, 841-848.
- [127] Michallet, M., Corront, B., Hollard, D. et al. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia: 17 cases. Report from the EBMTG. *Bone Marrow Transplant* 1991. 7, 4, 275-279.
- [128] Caballero, D., Garcia-Marco, J. A., Martino, R. et al. Allogeneic transplant with reduced intensity conditioning regimens may overcome the poor prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene and chromosomal abnormalities (11q- and 17p-). *Clin Cancer Res* 2005. 11, 21, 7757-7763.
- [129] Sorrow, M. L., Storer, B. E., Sandmaier, B. M. et al. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2008. 26, 30, 4912-4920.

- [130] Dreger, P., Corradini, P., Kimby, E. et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007. 21, 1, 12-17.
- [131] Delgado, J., Thomson, K., Russell, N. et al. Results of alemtuzumab-based reduced-intensity allogeneic transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a British Society of Blood and Marrow Transplantation Study. *Blood* 2006. 107, 4, 1724-1730.
- [132] Khouri, I. F., Saliba, R. M., Giralt, S. A. et al. Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. *Blood* 2001. 98, 13, 3595-3599.
- [133] Eiermann, T. H., Lambrecht, P., and Zander, A. R. Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999. 23, 8, 779-781.
- [134] Kroger, N., Perez-Simon, J. A., Myint, H. et al. Relapse to prior autograft and chronic graft-versus-host disease are the strongest prognostic factors for outcome of melphalan/fludarabine-based dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004. 10, 10, 698-708.
- [135] Perez-Simon, J. A., Martino, R., Alegre, A. et al. Chronic but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2003. 121, 1, 104-108.
- [136] Finke, J., Bethge, W. A., Schmoor, C. et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2009. 10, 9, 855-864.
- [137] Finke, J., Bertz, H., Schmoor, C. et al. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors using in vivo anti-T-cell globulin. *Br J Haematol* 2000. 111, 1, 303-313.
- [138] Remberger, M., Svahn, B. M., Hentschke, P. et al. Effect on cytokine release and graft-versus-host disease of different anti-T cell antibodies during conditioning for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999. 24, 8, 823-830.
- [139] Mueller, T. F. Thymoglobulin: an immunologic overview. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2003. 8, 4, 305-312.
- [140] Yoshimi, A., Ito, M., and Kojima, S. Leukemic cell death induced by antithymocyte globulin. *Leuk Res* 2005. 29, 7, 821-827.
- [141] 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.
- [142] Zand, M. S., Vo, T., Huggins, J. et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* 2005. 79, 11, 1507-1515.
- [143] Ayuk, F. A., Atassi, N., Schuch, G. et al. Complement-dependent and complement-independent cytotoxicity of polyclonal antithymocyte globulins in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2008. 32, 8, 1200-1206.
- [144] Radosevich, C. A., Gordon, L. I., Weil, S. C. et al. Complete resolution of pure red cell aplasia in a patient with chronic lymphocytic leukemia following antithymocyte globulin therapy. *JAMA* 1988. 259, 5, 723-725.
- [145] Singal, R., Winfield, D. A., and Greaves, M. Bone marrow aplasia in B cell chronic lymphocytic leukaemia: successful treatment with antithymocyte globulin. *J Clin Pathol* 1991. 44, 11, 954-956.

- [146] Lowsky, R., Takahashi, T., Liu, Y. P. et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2005. 353, 13, 1321-1331.
- [147] Ayuk, F. A., Fang, L., Fehse, B. et al. Antithymocyte globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells. *Exp Hematol* 2005. 33, 12, 1531-1536.
- [148] Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L. et al. Thymoglobulin targets multiple plasma cell antigens and has in vitro and in vivo activity in multiple myeloma. *Leukemia* 2006. 20, 10, 1863-1869.
- [149] Zand, M. S., 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.
- [150] Bacigalupo, A., Lamparelli, T., Bruzzi, P. et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2001. 98, 10, 2942-2947.
- [151] Zander, A. R., Zabelina, T., Kroger, N. et al. Use of a five-agent GVHD prevention regimen in recipients of unrelated donor marrow. *Bone Marrow Transplant* 1999. 23, 9, 889-893.
- [152] Fehse, N., Fehse, B., Kroger, N. et al. Influence of anti-thymocyte globulin as part of the conditioning regimen on immune reconstitution following matched related bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003. 12, 2, 237-242.
- [153] Meijer, E., Cornelissen, J. J., Lowenberg, B. et al. Antithymocyte globulin as prophylaxis of graft failure and graft-versus-host disease in recipients of partially T-cell-depleted grafts from matched unrelated donors: a dose-finding study. *Exp Hematol* 2003. 31, 11, 1026-1030.
- [154] Meijer, E., Bloem, A. C., Dekker, A. W. et al. Effect of antithymocyte globulin on quantitative immune recovery and graft-versus-host disease after partially T-cell-depleted bone marrow transplantation: a comparison between recipients of matched related and matched unrelated donor grafts. *Transplantation* 2003. 75, 11, 1910-1913.
- [155] Genestier, L., Fournel, S., Flacher, M. et al. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998. 91, 7, 2360-2368.
- [156] Remberger, M. and Sundberg, B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica* 2005. 90, 7, 931-938.
- [157] Michallet, M. C., Preville, X., Flacher, M. et al. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 2003. 75, 5, 657-662.
- [158] Mohty, M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007. 21, 7, 1387-1394.
- [159] Kim, K. M., Lee, K., Hong, Y. S. et al. Fas-mediated apoptosis and expression of related genes in human malignant hematopoietic cells. *Exp Mol Med* 2000. 32, 4, 246-254.
- [160] McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M. et al. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 1994. 83, 5, 1179-1187.
- [161] McGahon, A. J., Cotter, T. G., and Green, D. R. The abl oncogene family and apoptosis. *Cell Death Differ* 1994. 1, 2, 77-83.
- [162] McGahon, A. J., Nishioka, W. K., Martin, S. J. et al. Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. *J Biol Chem* 1995. 270, 38, 22625-22631.

- [163] Selleri, C., Maciejewski, J. P., Pane, F. et al. Fas-mediated modulation of Bcr/Abl in chronic myelogenous leukemia results in differential effects on apoptosis. *Blood* 1998. 92, 3, 981-989.
- [164] Selleri, C. and Maciejewski, J. P. The role of FAS-mediated apoptosis in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000. 37, 3-4, 283-297.
- [165] Zhao, W. L., Chai, Y. H., He, H. L. et al. Influence of interferon alpha on expression of Fas and Fas ligand in dendritic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008. 16, 3, 501-505.
- [166] Ayuk, F., Perez-Simon, J. A., Shimoni, A. et al. Clinical impact of human Jurkat T-cell-line-derived antithymocyte globulin in multiple myeloma patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2008. 93, 9, 1343-1350.
- [167] Bonnefoy-Berard, N., Fournel, S., Genestier, L. et al. In vitro functional properties of antithymocyte globulins: clues for new therapeutic applications? *Transplant Proc* 1998. 30, 8, 4015-4017.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Francis Ayuketang Ayuk für die stete Unterstützung. Er begleitete alle Phasen der Entstehung dieser Arbeit kompetent und zuverlässig.

Ein großer Dank gilt überdies dem ehemaligen Klinikdirektor Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel R. Zander, der es initial ermöglichte in seiner Abteilung zu promovieren.

Mein persönlicher Dank gilt zudem den medizinisch technischen Assistentinnen Sandra Hannemann und Ulrike Larsen, die eine Einführung in die praktische Laborarbeit bewerkstelligten und mich auch im Weiteren stets hilfsbereit mit Rat und Tat unterstützten.

Ich danke auch den übrigen, immer aufmerksamen und hilfsbereiten Mitarbeitern des KMT- Labors, die für ein gutes Arbeitsklima sowie beste Arbeitsbedingungen sorgten.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei den Studienteilnehmern und Patienten, die das Einverständnis zur Verwendung ihrer Blutproben gaben. Ohne diese wären wichtige Laborexperimente nicht möglich gewesen.

Ich möchte meiner Mutter und Schwester von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Liebe und ihr immerwährendes Verständnis danken.

Meinem Mann Lars und meiner Tochter Alva danke ich dafür, dass sie mein Leben auf jede erdenklich mögliche Art und Weise bereichern.

Ihr habt entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Curriculum vitae

-entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen-

Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder 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: