

HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
ZENTRUM FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
KLINIK FÜR KINDER - ONKOLOGIE, - HÄMATOLOGIE UND - IMMUNOLOGIE
DIREKTOR: UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. U. GÖBEL

IMMUNOLOGISCHE UND GENOTOXISCHE
PATHOMECHANISMEN DER ERWORBENEN
APLASTISCHEN ANÄMIE DES KINDESALTERS

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER
MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

VORGELEGT VON

KAVEH ASADI MOGHADDAM

2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. W. H. M. Raab

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Seißler

Meiner Mutter
Masoomeh F. Shalchian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
1.1 Immunvermitteltes Knochenmarksversagen	3
1.2 Biotransformation von Fremdstoffen	7
1.2.1 Polymorphismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase	9
1.2.2 Polymorphismus der Glutathion S-Transferase	10
2. Fragestellungen	13
3. Patienten, Material und Methoden	15
3.1 Patienten und Kontrollen	15
3.2 Material	15
3.2.1 Chemikalien	15
3.2.2 Antikörper und Zytokine	16
3.2.3 ELISA	16
3.2.4 Molekularbiologische Kits	16
3.2.5 Puffer und Lösungen für die PCR-Analysen	16
3.2.6 Enzyme	17
3.2.7 Primer	17
3.3 Methoden	18
3.3.1 Zellbiologische Methoden	18
3.3.1.1. Isolation mononukleärer Zellen	18
3.3.1.2. Stimulation mononukleärer Zellen	18
3.3.1.3. Zytokinnachweis aus MNC-Kulturüberständen mittels ELISA	19
3.3.1.4. Oberflächenmarkeranalyse mit dem FACScan	20
3.3.2 Molekularbiologische Methoden	22
3.3.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
3.3.2.2. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	23
3.3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	24
3.4 Statistik	24

4. Ergebnisse	25
4.1 Zytokin- und FACS-Analysen	25
4.1.1 Zählung hämatologischer Progenitorzellen in KM und PB	25
4.1.2 Inzidenz immunkompetenter Zellen im KM und PB	26
4.1.3 Immunhämatologische Klassifikation der EAA	29
4.1.4 Zytokinfreisetzung im Plasma und nach MNC-Stimulation	30
4.1.4.1. IFN- γ Messungen	30
4.1.4.2. IL10 Messungen	31
4.1.4.3. IL15 Messungen	33
4.2 Enzympolymorphismen	35
4.2.1 Polymorphismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase	35
4.2.2 Polymorphismus der Glutathion S-Transferase	38
4.3 Koinzidenz zwischen den erhobenen Daten	39
5. Diskussion	41
5.1 Hämatopoetisches-Versagen	41
5.2 Mechanismen hämatopoetischer Zellschädigung	43
5.2.1 Immunvermitteltes Knochenmarksversagen	43
5.2.1.1. T-Zellaktivierung und IFN- γ Freisetzung	43
5.2.1.2. Erhöhte IL15 Plasmawerte	45
5.2.1.3. IL10 Freisetzung	46
5.2.2 Direkte Knochenmarkstoxizität, Enzympolymorphismus und Biotransformation von Xenobiotika	48
5.2.2.1. Polymorphismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase	49
5.2.2.2. Polymorphismus der Glutathion S-Transferase	49
6. Zusammenfassung	55
7. Literatur	57
Danksagung	75
Lebenslauf	77

Abkürzungen

Arg	Arginin
BFU-E	primitivster Erythroid-Vorläufer (<i>burst forming unit, erythroid</i>)
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CFU-E	Erythrozyten-Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit erythroid</i>)
CFU-GEMM	Granulozyten-Erythrozyten-Makrophagen-Megakaryozyten-Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte</i>)
CsA	Cyclosporin α
CFU-GM	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit granulocyte, macrophage</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleinacid</i>)
EAA	erworbene aplastische Anämie
FcR	immunglobulinbindender Rezeptor
GST	Glutathion S-Transferase
GSH	Glutathion
His	Histidin
IFN- γ	Gamma-Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
LAK-Zelle	lymphokin-aktivierte Killerzelle
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
mEPHX	Gen der mikrosomalen Epoxidhydrolase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MNC	mononukleäre Zelle
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NK-Zelle	natürliche Killerzelle (<i>natural killer cell</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PB	peripheres Blut
Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Die erworbene aplastische Anämie (EAA) ist durch eine Panzytopenie im peripheren Blut (PB) und eine Knochenmarksaplasie gekennzeichnet.²⁸⁴ 1888 wurde die Aplastische Anämie zum ersten Mal von Paul Ehrlich in einer Kasuistik über eine jungen Frau, welche an einer „kurzen fatalen Krankheit“ verstarb, beschrieben.⁶⁵ Die charakteristischen Symptome der Erkrankung waren eine Anämie, Blutungen sowie eine Infektion. Bei der Untersuchung fiel das Fehlen von kernhaltigen Erythrozyten im Blut und gelbes, fettiges Femurmark auf, woraus Ehrlich auf „ein mangelhaftes Funktionieren des Knochenmarkes“ schloß. Vaquez und Aubertin berichteten 1904 von einem ähnlich fatalen Fall in Frankreich.²⁶² Sie nannten die Erkrankung „la forme aplastique“ um den Aspekt der „anhématopoièse“ zu betonen und gaben der Krankheit ihren heute gebräuchlichen Namen. Durch die Häufung von Kasuistiken und Autopsieberichten Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die EAA als ein Modell des Knochenmarksversagens bekannt und es wurden zahlreiche verschiedenartige Ursachen beschrieben, die zu der Symptomatik einer EAA führen können (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1. Ätiologische Klassifikation der erworbenen Aplastischen Anämie

Direkte Toxizität	Immunologische Ursachen
ionisierende Strahlung ^{43,233}	Viren ³⁵
Medikamente ¹⁵³	Medikamente ¹⁵³
Benzolderivate ^{226,237}	Schwangerschaft ²⁶¹
	idiopatisch ¹⁸⁹

1.1. Immunvermitteltes Knochenmarksversagen

Trotz der Einfachheit des pathologisch-morphologischen Korrelates -Panzytopenie und Knochenmarksaplasie- ist die Pathophysiologie der EAA komplex und in ihrer Gesamtheit noch nicht erfasst. Teilweise lassen sich Rückschlüsse aus anderen Erkrankungen ziehen (*Agranulozytose*,²⁵ „*pure red-cell aplasia*“,⁶² *Myelodysplastische Syndrom*,²⁵⁹ *Fanconi-Anämie*⁶³), welche nur mit einer partiellen Knochenmarksdestruktion einhergehen und deren Pathomechanismen zum Teil

besser verstanden sind als bei der EAA. Aus Untersuchungen weiß man, dass zwei Zellkompartimente des Knochenmarkes (KM) hierfür in Frage kommen: hämatopoetische Vorläuferzellen und das KM-Stroma. Überleben und Proliferation hämatopoetischer Zellen hängen maßgeblich von den Stromazellen des KM ab, weil diese für die Lebensfähigkeit und Differenzierung der Stamm- und Progenitorzellen essentielle hämatopoetische Wachstumsfaktoren produzieren.¹³⁴ In Anlehnung an diese Erkenntnisse erfolgten Untersuchungen bei der EAA. Hier zeigte sich die Stromazellfunktion weitgehend erhalten. Dies zeigten sowohl klinische als auch experimentelle Beobachtungen. So setzt eine erfolgreiche Knochenmarkstransplantation (KMT) bei EAA-Patienten eine adäquate Stromazellfunktion voraus,^{11,106} da die Stromazellen von der Konditionierung wenig beeinträchtigt werden. Laboruntersuchungen bestätigen diese klinische Beobachtung. Demgemäß unterstützt das KM-Stroma von EAA-Patienten die hämatopoetische Koloniebildung mit CD34-Zellen von gesunden Personen. Dagegen entwickeln sich keine hämatopoetischen Kolonien, wenn CD34-Zellen von EAA-Patienten auf normalen Stromazellen kultiviert werden.^{166,198} Die Funktion hämatopoetischer Vorläuferzellen ist bei der EAA stark beeinträchtigt.^{10,165,209}

Bereits im Jahre 1970 diskutierte Mathé eine immunvermittelte Pathogenese der EAA.¹⁶⁹ Diese These stützte sich auf die Beobachtung einer unerwarteten Verbesserung der Panzytopenie bei graft-failure nach einer KMT. Es wurde spekuliert, dass das immunsuppressive Regime, welches durchgeführt wurde um das Engraftment vom Spendermark zu ermöglichen, zu einer Verbesserung der Empfängermarkfunktion geführt hat. Seitdem sind diverse vielversprechende immunologisch-klinische Studien durchgeführt worden. Die erste mit Antilymphozyten Globulin,²⁴⁴ dann mit Antithymozyten Globulin,⁴⁴ mit hochdosiertem Methylprednisolon,¹⁶⁴ Cyclosporin A¹⁵² und mit Cyclophosphamid.³⁴ Darüber hinaus gibt es große Studien über erfolgreiche immunsuppressive Kombinations-therapien.^{9,75,221} Da diese Therapieansätze entweder zu einer Reduktion der Lymphozytenzahl führen oder T-Zellfunktionen blockieren, liegt die Vermutung nahe, dass ihre Effektivität durch die Immunsuppression bedingt ist.

Zeitgleich wurden experimentelle Modelle für die Immun-Pathogenese entwickelt. Wachstum und Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen werden durch ein Netzwerk stimulatorischer und inhibitorischer Zytokine reguliert.

Eine KM-Insuffizienz kann demnach durch einen Mangel an Stimulatoren, einen Überschuss an Inhibitoren oder durch die Kombination beider bedingt sein. T-Lymphozyten können sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Zytokine freisetzen. 1976 wurde durch Co-Kultur-Experimente zum ersten Mal gezeigt, dass T-Zellen eine wichtige Rolle bei der EAA spielen. Hierbei unterdrückten Lymphozyten von EAA Patienten *in vitro* die Koloniebildung gesunder hämatopoetischer Progenitorzellen.¹¹³ Nach der Entfernung von T-Zellen aus den Patientenproben verbesserte sich in einigen Fällen die *in vitro* Koloniebildung.¹¹³ Andere Arbeitsgruppen fanden bei EAA-Patienten Subpopulationen, welche eine erhöhte Anzahl aktivierter T-Zellen aufwiesen.^{156,173,263} Das IL2 ist eines der potentesten Aktivatoren von T-Zellen und es entfaltet seine Wirkung unter anderem über die Hochregulation der α -Kette des IL2 Rezeptors (IL2R α). Diese aktivierten T-Zellen produzieren das Zytokin Gamma-Interferon (IFN- γ), welches eine Inhibition der Hämatopoese induziert und als immunologischer Mediator der EAA gewertet wird.^{235,292} Bei der EAA wird angenommen, dass IFN- γ die Hämatopoese supprimiert, indem es an den Fas-Rezeptor von CD34+-Zellen bindet und einen programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet.^{157,187,209} Im Gegensatz zu den anderen hauptsächlich antiviralen Interferonen, wirkt IFN- γ überwiegend immunmodulatorisch (siehe Tabelle 1.2).^{24,61}

Tabelle 1.2. Wirkungen von IFN- γ auf hämatologische Zellen^{24,57,61,70}

Zelltyp	Effekt
T-Zellen	Wachstum \uparrow , Maturationsfaktor für zytotoxische T-Zellen, Sensibilität für andere Zytokine \uparrow
B-Zellen	Wachstum \uparrow , Maturation, IgM \uparrow
NK-Zellen	Aktivierung und Verstärkung der zytotoxischen Aktivität
Granulozyten	Aktivierung, FcR \uparrow
Makrophagen	Aktivierung, Zytokinfreisetzung \uparrow
hämatopoetische Progenitoren	Wachstumshemmung

Ein weiterer Inhibitor der Hämatopoese ist das Interleukin 15 (IL15). IL15 ist ein T-Zellwachstumsfaktor und aktiviert NK (natürliche Killer) -Zellen und verstärkt ihre zytolytische Wirkung.⁴¹ Es induziert auch die Proliferation und Aktivierung naiver memory und zytotoxischer T-Zellen.^{115,215} Darüber hinaus ist IL15 in der Lage LAK (lymphokin-aktivierte Killer) -Zellen zu aktivieren.²¹⁵ IL15 hat ähnliche Wirkungen wie IL2, beide interagieren mit denselben β - und γ -Rezeptorketten,⁸¹ welche essentiell für die Signalübertragung sind.^{136,249} Um seine volle biologische Aktivität zu entfalten, benötigt IL15 jedoch eine eigene spezifische α -Kette, die sich von der α -Kette des IL2 Rezeptors (IL2R α) unterscheidet.^{3,123} Interessanterweise reguliert IL15 genauso wie IL2 den IL2R α auf T- und B-Zellen hoch und gleichzeitig wird die α -Kette vom IL15 Rezeptor herunter reguliert. Dies führt zu einer verminderten IL15 Antwort und dient wahrscheinlich der Verstärkung der IL2 Antwort auf expandierende T-Zellen.¹⁴¹

Im Gegensatz zu IFN- γ und IL15 hat das Interleukin 10 (IL10) eine hemmende Wirkung auf Entzündungsreaktionen und auf die zellvermittelte Immunantwort.^{59,107,144,214} Das Zusammenspiel der Zytokine IFN- γ , IL10 und IL15 wird von zwei Zellpopulationen reguliert, den T-Helferzellen vom Typ1 und Typ2 (TH1, TH2).^{149,185,219} Beide Zelltypen sind durch den Oberflächenmarker CD4 charakterisiert und werden aufgrund ihrer wesentlichen Funktion Zytokine zu produzieren, als Helferzellen bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf unterschiedliche Pathogene und sind funktionell sehr verschiedenartig.⁶⁰ Eine ihrer Aufgaben ist die Inhibition der jeweils anderen T-Helferpopulation, wobei IL10 ein wichtiger Mediator bei der Kreuzregulation ist.^{181,183,184} Die IL10-Wirkung ist vornehmlich durch die Syntheseinhibition vieler TH1-Zytokine (z.B. IFN- γ , IL15) bedingt.^{7,137,182} TH1-Zellen, welche hauptsächlich IFN- γ , IL2 und IL15 (aber nicht IL4,-5,-6,-10) sekretieren, hemmen TH2-Zellen und sind vor allem an der zellvermittelten Immunität beteiligt (z.B. Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen).^{218,220} Im Gegensatz dazu inhibieren TH2-Zellen, welche IL4,-5,-6 und IL10 (aber nicht IFN- γ und IL15) sekretieren, TH1-Zellen und sind vor allem an der humoralen Immunantwort beteiligt (z.B. Stimulation der Antikörper-produktion).^{218,220} Alle drei Zytokine und ihre Regulation spielen bei der KM-Schädigung eine wichtige Rolle.²⁷⁸

1.2. Biotransformation von Fremdstoffen (Xenobiotika)

Epidemiologische Untersuchungen haben zahlreiche Fremdstoffe beschrieben, welche mit der Pathogenese der EAA assoziiert sind. Es handelt sich hierbei um Medikamente, Pestizide, zyklische Kohlenwasserstoffe, ionisierende Strahlen und andere Umweltnoxen.²⁸⁴ Diese Noxen können direkt zelltoxisch wirken und/oder eine immunvermittelte Zellschädigung induzieren.^{167,170,256,281}

Direkte KM-Zellschädigung bei hohen Konzentrationen ist nachgewiesen, jedoch findet sich in der Anamnese nur weniger EAA-Patienten ein Hinweis auf eine Exposition für eine bestimmte Noxe. Vielmehr scheinen bei diesem multifaktoriellen Prozess individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Noxen eine Rolle zu spielen.^{47,138,258} Die häufigste Form des direkten Knochenmarkversagens ist iatrogen, ausgelöst durch eine vorübergehende KM-Aplasie bei zytostatischer Chemo- oder Radiotherapie.²⁸³ Eine Reihe anderer chemischer Substanzen können über eine DNA-Schädigung zu einem hämatopoetischen Zellschaden führen.^{76,165,166,254} Nach einer Schätzung des schwedischen Umweltamtes ist man in Schweden ca. 70.000 verschiedenen Fremdstoffen (Lebensmittel und Medikamente eingeschlossen) ausgesetzt,¹⁵⁴ wobei diese Schätzung nur bislang bekannte Stoffe einbezieht und der tatsächliche Wert um ein vielfaches höher liegen dürfte. Der menschliche Organismus begegnet vielen dieser Stoffe zum ersten Mal und trotzdem ist er in der Lage, mit diesen Umwelteinflüssen durch Entgiftungsreaktionen (=Biotransformation) adäquat umzugehen. Im Laufe der Evolution hat sich zur Elimination von Fremdstoffen ein komplexes System aus Entgiftungsenzymen mit großer individueller Variabilität entwickelt.⁸⁷ Die Biotransformation von Xenobiotika ist ein in der Evolution bereits früh entwickelter Mechanismus, um den Organismus gegen lipophile Stoffe aus der Umwelt zu schützen.^{27,105,171,267}

Bei der Entgiftung durch enzymatische Transformation kann aber auch eine Aktivierung von Fremdstoffen zustande kommen.¹⁸⁶ Seither gibt es zahlreiche Untersuchungen, welche eine Assoziation zwischen bestimmten Entgiftungsreaktionen und Krankheiten wie z.B. Harnblasen-Ca, Parkinson-Syndrom, immunologische Dysfunktionen u.v.a. zeigten.^{99,101,193,216,276} Infolgedessen ist es naheliegend, dass die individuelle Fähigkeit Noxen aus dem Körper zu entfernen eine Rolle in der Ätiologie und Exazerbation von Krankheiten spielen kann.

Populationsgestützte Studien identifizierten Medikamente und Chemikalien in über 25% der Fälle als mögliche kausale Assoziationen mit der EAA.^{2,16,117,168} Am häufigsten findet sich bei der EAA eine Assoziation mit Benzol,^{114,162,237,241,243} Pestiziden⁷³ und anderen zyklischen Kohlenwasserstoffen.¹¹⁴ Die häufigsten Medikamentenassoziationen finden sich bei Gold-Präparaten,^{80,172,277} Chloramphenicol,^{1,142,143,268} Antikonvulsiva,^{33,79,112,205} Psychopharmaka und Neuroleptika.^{188,200,275} Bei der idiosynkratischen Medikamenten- und Chemikalien-Reaktion des Knochenmarkes konnte weder eine Antikörper- noch eine T-Zellantwort beobachtet werden,^{159,202,283} so dass eine direkte Alteration des Knochenmarks am wahrscheinlichsten erscheint.^{288,290} Der Metabolismus von Medikamenten und Umwelttoxinen kann zu toxischen Intermediärprodukten führen.^{52,109,203} Diese können an Proteine, DNA oder RNA binden und hierdurch die Zelle schädigen.^{102,154} Versuche an Tiermodellen wiesen darauf hin, dass der Polymorphismus von Biotransformationsenzymen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten (Karzinomen, KM-Alteration) spielt.^{23,50,83,85,192,193} Das Cytochrom P-450 wurde als erste Enzymgruppe mittels neuer *in vitro* Methoden untersucht.^{86,238} Die selben Methoden wurden auch bei anderen Enzymen wie z.B. der Glutathion S-Transferase verwendet.^{95,111} In den letzten Jahren wurden zahlreichen Studien durchgeführt (von einigen Autoren als „molekulare Epidemiologie“ bezeichnet), welche die Assoziation zwischen verschiedenen Erkrankungen und dem genetischen Polymorphismus der Biotransformationsenzymen untersuchten.

Die lipophile physikalische Eigenschaft, welche vielen Fremdstoffen (incl. Medikamenten) die Absorption über die Lunge, den Magen-Darm-Trakt oder die Haut ermöglicht, verhindert ihre direkte Elimination aus dem Körper. Die Eliminierung erfolgt erst über die Umwandlung in wasserlösliche Stoffe (=Biotransformation). Diese Xenobiotika-Biotransformation besteht aus zwei Phasen, welche sowohl im glatten endoplasmatischen Retikulum als auch im Zytosol ablaufen.^{71,139} Bei Phase I-Reaktionen (Unwandlungsreaktion) werden reaktive polare Gruppen (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) in unpolare Moleküle eingefügt oder vorhandene funktionelle Gruppen werden umgewandelt. In der Regel hat dieses eine Erhöhung der Polarität und eine Verringerung der biologischen Aktivität oder Toxizität zur Folge. Phase I-Produkte werden in einer Phase II-Reaktion (Konjugatbildung) mit einer

endogenen Substanz (Zucker, Aminosäuren, organische Säuren, anorganische Ionen) konjugiert. Die Konjugate werden entweder biliär (bei Molmassen > 300) oder renal (bei Molmassen < 300) eliminiert.^{133,217,266} In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils ein Phase I-Enzym, die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) und ein Phase II-Enzym, die Glutathion S-Transferase (GST) untersucht. Beide Enzyme sind insbesondere am Abbau KM-schädigender Substanzen wie z.B. Benzolderivate beteiligt.^{129-131,150,176,177,242}

1.2.1. Polymorphismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase

Epoxidhydrolasen (EH; EC 3.3.2.3) sind Enzyme der Phase I Biotransformation, welche die *trans*-Addition von Wasser an Alken-Epoxide und Aren-Oxide, die durch Cytochrom-P450-abhängige Oxidation entstehen, katalysieren.^{69,201,234,236}

Tabelle 1.3. Begriffsdefinition

Alkene	Ungesättigte azyklische, sehr reaktionsfähige Kohlenwasserstoffe, die eine Kohlenstoff-doppelbindung haben.
Arene	Gruppen-Bezeichnung für aromatische Kohlenwasserstoffe mit mindestens einem Benzolring.
Epoxide	Durch Anlagerung von Sauerstoff an Alkene gewonnene chemische Verbindung

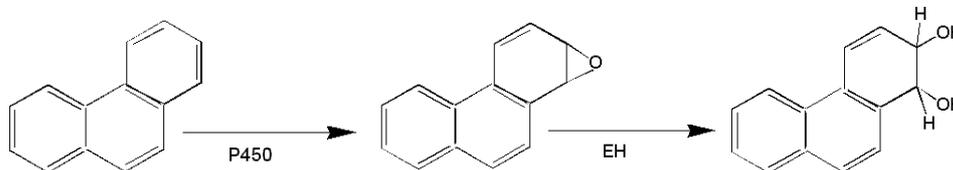


Abb. 1.1. Beispiel einer durch Epoxidhydrolasen (EH) katalysierten Reaktion nach einer Cytochrom P450 (P450) katalysierten Epoxidation.

Epoxidhydrolasen spielen eine wichtige Rolle in der Entgiftung reaktiver Noxen, welche durch Bindung an Proteine oder Nukleinsäuren einen Zellschaden oder genetische Mutationen verursachen können. Bislang sind fünf immunologisch und strukturell unterscheidbare Epoxidhydrolasen charakterisiert worden.¹⁷ Nur eine Klasse, die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH), wird nahezu ubiquitär exprimiert.^{84,199} Von der mEH konnten zwei aberrante Allele in der codierenden Region des mikrosomalen-Epoxidhydrolase-Gens (mEPHX) identifiziert werden. Das polymorphe Allel in Exon 3 kodiert entweder für Histidin (His) oder Tyrosin (Tyr) an der Aminosäuren Position 113. Der andere Polymorphismus im Exon 4 kodiert entweder für His- oder Arginin (Arg) an Position 139.^{78,93,94} Tyr ist bei der

kaukasischen Population die prädominante Aminosäure an Position 113 und *His* an Position 139.^{93,94} Die Allelverteilung entspricht dem Hardy-Weinberg Gesetz. Das Besondere an den Polymorphismen ist, dass sich hieraus ein Unterschied für die Enzymaktivität ergibt. *His*113 bedingt ein funktionell langsames Enzym (ca. 50% reduzierte Enzymaktivität als *Tyr*113). *Arg*139 bewirkt eine ca. 25% schnellere Enzymaktivität als *His*139. Die Kombination *Tyr*113/*Arg*139 hat die höchste Enzymaktivität und die Kombination *His*113/*His*139 die langsamste.^{93,94} Viele CKWs haben die Potenz reaktive Epoxide bilden, welche zu einer KM-Schädigung führen und ihre Entgiftung hängt maßgeblich von der mEH ab.

1.2.2. Polymorphismus der Glutathion S-Transferase

Die Glutathion S-Transferasen (GST; EC 2.5.1.18)¹⁶⁰ bilden eine Superfamilie dimerer Enzyme, welche die Konjugation eines großen Spektrums elektrophiler Substanzen mit dem Tripeptid Glutathion (GSH) katalysiert (Abb. 1.2.).^{6,210,222}

Die GST-Familie nimmt in der Phase II Biotransformation eine zentrale Rolle ein.⁸ Dieses verweist auf ihre wichtige präventive Rolle gegenüber toxischen Substanzen.^{29,125,274} Die GST-Genexpression^{21,163,180} ist ubiquitär und unterliegt komplexen regulatorischen Mechanismen (zellspezifische Umgebung, Hormonen, Xenobiotika).^{55,121,171,179} Die Isoenzyme der GST werden in sieben Klassen unterteilt, fünf zytosolische (α , μ , π , θ , κ ; A, M, P, T, K; Alpha, My, Pi, Theta, Kappa) und zwei membrangebundene.^{22,161,207} Bislang sind bei drei humanen GST-Genen genetische Polymorphismen beschrieben worden, nämlich bei der *GSTP1-1*, *GSTM1-1* und *GSTT1-1* (im folgenden als *GSTM1* und *GSTT1* bezeichnet).²²⁵ Der Genotyp für *GSTM1* und *GSTT1* ist entweder ein homozygot vorhandenes Gen (GST +/+), eine Heterozygotie (GST+/-) oder eine homozygote Deletion (=Nullgenotyp). Bei Individuen mit einem Nullgenotyp ist auch phänotypisch keine GST-Aktivität nachweisbar.^{31,36} Die Bestimmung des Genotyps ist daher ein geeigneter Untersuchungsparameter für *GSTM1* und *GSTT1*.

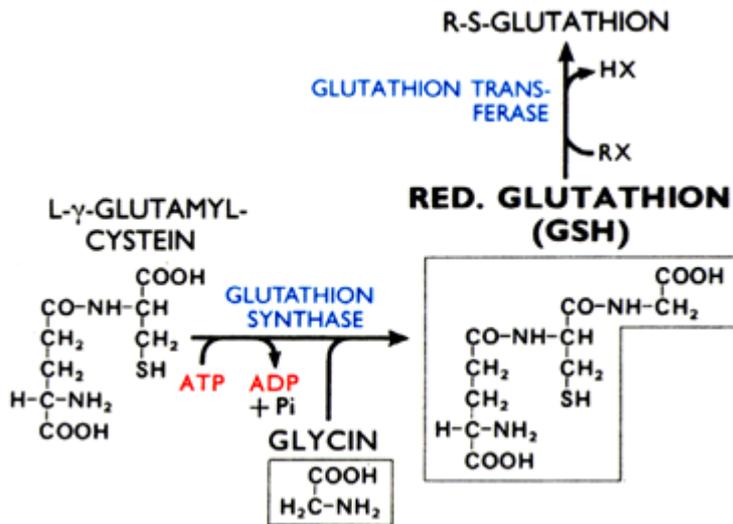


Abb. 1.2. Schematische Darstellung des GST / GSH Metabolismus.

Glutathion S-Transferasen sind entscheidend an der Inaktivierung, selten bei der Aktivierung, vieler Xenobiotika (z.B. zyklische Kohlenwasserstoffe, Medikamente) und körpereigener Substanzen (z.B. Bilirubin, Steroide, Thyroxin) beteiligt.^{4,124,127} Dabei erleichtert die Konjugation mit GSH die Elimination von Fremdstoffen.

GSTM1-Nullgenotyp-Träger (=Nullphenotyp) haben, besonders bei gleichzeitigem Zigarettenkonsum, unter anderem ein erhöhtes Risiko Karzinome der Lunge,^{103,104} Harnblase,^{18,146} und Haut⁰⁶ zu entwickeln. Bei GSTT1-Nullgenotyp-Träger wurde unter anderem eine Assoziation mit Neoplasmen des Hirns^{66,92} und mit MDS^{46,228} festgestellt. Vor dem Hintergrund, dass die GST eine besondere Rolle in der Entgiftung von genotoxischen und hämatotoxischen Substanzen spielt, ist der Zusammenhang mit der EAA vom Besonderen Interesse.^{49,126,240,247}

2. Fragestellungen

Basierend auf den bislang erzielten Erkenntnissen in der Pathogenese der erworbenen aplastischen Anämie und ihrer verschiedenartigen Ursachen (Medikamente,¹⁵³ Chemikalien,^{226,237} Viren,³⁵ ionisierende Strahlung^{43,233} und Schwangerschaft²⁶¹) sollten die in der Literatur beschriebenen immunologischen und genotoxischen Pathomechanismen bei Kindern untersucht werden. Hierzu standen KM-Proben von Kindern mit EAA zur Verfügung. Von einigen Patienten standen zusätzlich PB zur Verfügung. Diese Proben wurden im Rahmen der Therapieoptimierungsstudie SAA94 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie erfasst.

Hierzu wurden folgende Untersuchungen geplant:

- 1) Quantifizierung hämatologischer Progenitorzellen im KM und PB mittels FACS
- 2) Immunphänotypisierung zur Erfassung differentieller T-Zellaktivierung
- 3) Messung der Zytokinlevel IFN- γ , IL10 und IL15 im KM und PB
- 4) Analyse von Polymorphismen der Biotransformationsenzyme mEH und GST

Durch Korrelation der verschiedenen Untersuchungsergebnisse sollte geprüft werden, welche prozentualen Anteile den verschiedenen pathogenetischen Reaktionsweisen bei der Genese der EAA im Kindesalter zukommen.

Weiterhin sollten folgende Hypothesen geprüft werden:

- 1) Patienten mit aktivierten T-Zellen produzieren vermehrt IFN- γ , IL10, IL15
- 2) Bei Patienten ohne T-Zellaktivierung finden sich normale Zytokinlevel
- 3) Bei Patienten ohne T-Zellaktivierung findet sich normale Stimulierbarkeit
- 4) Patienten ohne T-Zellaktivierung zeigen andere Enzym polymorphismen

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Patienten und Kontrollen

Als Untersuchungsmaterial wurden Knochenmark (KM) sowie peripheres Blut (PB) von Kindern mit erworbener aplastischer Anämie verwendet. Die Patienten-Proben wurden im Rahmen der „SAA-94“-Studie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie GPOH akquiriert. Als Kontrollen standen nach dem Ethik-Votum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf PB und KM von gesunden Knochenmarksspendern, Buffy-Coats aus der Blutbank des Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) und Nabelschnurblut (CB) gesunder Neugeborener zur Verfügung.

3.2. Material

3.2.1. Chemikalien

Agarose	Biozym (Oldendorf)
Ammoniumchlorid (0,83%)	Apotheke der UKD
Aqua pro injektione	Delta Pharma (Pfullingen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
DNA Größenmarker = 100 bp Leiter	MWG-Biotech (Ebersberg)
DNTPs	Qiagen (Ratingen)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Ficoll	Pharmacia (Freiburg)
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO (Karlsruhe)
HPLC Wasser	Apotheke der UKD
PBS	Serag Wiessner (Naila)
RPMI-1640 Medium	GibcoBRL (Karlsruhe)

3.2.2. Antikörper und Zytokine

Anti-CD3	Coulter (Hamburg)
Anti-CD3-PE	Coulter (Hamburg)
Anti-CD4	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Anti-CD8	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Anti-CD25-PE	Coulter (Hamburg)
Anti-CD33-PE	Coulter (Hamburg)
Anti-CD34-PE	Coulter (Hamburg)
IL-2	Euro-Cetus (Ratingen)

3.2.3. ELISA

IFN- γ	Laboserv (Staufenberg)
IL-10	Laboserv (Staufenberg)
IL-15	Laboserv (Staufenberg)

3.2.4. Molekularbiologische Kits

QIAamp Blood Kit	Qiagen (Ratingen)
------------------	-------------------

3.2.5. Puffer und Lösungen für die PCR-Analysen

dNTP-Mix	20 mM dATP 20 mM dCTP 20 mM dGTP 20 mM dTTP	Qiagen (Ratingen)
10x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCL, pH 8,3 15 mM MgCl ₂	Qiagen (Ratingen)
10x Rsa I-Puffer	10 mM Tris-HCL, pH 7,4 10 mM MgCl ₂	GibcoBRL (Karlsruhe)
10x Asp I-Puffer	10 mM Tris-HCL, pH 8,0 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM 2-Mercaptonethanol	Roche (Mannheim)
Probenauftragungspuffer	10 mM EDTA 445 mM Tris-Borat, pH 8,3 0,25 % Brobphenolblau 0,25 % Xylencyanol 50 % Glycerin	
10x TBE	0,89 M Tris/HCL, pH 8 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA	

3.2.6. Enzyme

Asp I	Roche (Mannheim)
Expand High Fidelity PCR System	Roche (Mannheim)
Rsa I	GibcoBRL (Karlsruhe)
Taq DNA-Polymerase	Qiagen (Ratingen)

3.2.7. Primer

3'β-Globin	CAACTTCATCCACGTTACACC
5'β-Globin	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
3'GSTT1	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC
5'GSTT1	TCACCGGATCATGGCCAGCA
3'GSTM1	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC
5'GSTM1	GTTGGGCTCAAATATACGGTGG
3'mEH Exon3	AATCTTAGTCTTGAAGTGACGGT
5'mEH Exon3	CTTGTGCTCTGTCCTTCCCATCCC
3'mEH Exon4	AACACCGGGCCCACCCTTGGC
5'mEH Exon4	GGGGTGCCAGAGCCTGACCGT

Die Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Vor der Verwendung wurden alle Primer zu einer Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt und aliquotiert.

3.3. Methoden

3.3.1. Zellbiologische Methoden

3.3.1.1. Isolation mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen (MNC) sind Zellen myeloischen und lymphatischen Ursprungs. Diese wurden aus peripherem Blut, KM und Nabelschnurblut (CB) mittels Ficoll-Dichtezentrifugation steril isoliert. Dazu wurde das KM, PB und CB auf das doppelte Volumen mit RPMI 1640 verdünnt und in 30 ml-Portionen über 15 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Nach der anschließenden Zentrifugation von 15 min bei 1100 x g und Raumtemperatur (RT) ohne Bremse befanden sich Erythrozyten und Granulozyten im Sediment unterhalb des Ficolls und die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Ficoll (mittlere Schicht) und Blutplasma (oberste Schicht). Die in der milchig weißen Interphase befindlichen mononukleären Zellen wurden in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) transferiert und nach Suspension in 20 ml PBS gewaschen (666 x g, 6 min, RT). Kontaminierende Erythrozyten wurden durch Inkubation mit 1 ml Ammoniumchlorid (5 min, auf Eis) lysiert und durch dreimaliges Waschen mit 20 ml PBS entfernt.²⁶

3.3.1.2. Stimulation mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen wurden in Zellkulturmedium (RPMI 1640, 100U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin, 10% hitzeinaktiviertes foetales Kälberserum) in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml aufgenommen. Zur Induktion der Zytokinproduktion wurden die Zellen mit anti-CD3 und IL-2 stimuliert. Dadurch wird der klassische T-Zellaktivierungsweg aktiviert, wobei eine Kostimulation durch von T-Zellen ausgehende Signale an andere MNCs -Monozyten und B- und NK-Zellen nicht auszuschließen ist. Die Zellen wurden anschließend in CO₂-gesättigter Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Proben für 10 min bei 1100 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.3.1.3. Zytokinnachweis aus MNC-Kulturüberständen mittels ELISA

Die Konzentrationen der produzierten Zytokine IL-10, IL-15, IFN- γ wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen *sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) nach Herstellerangaben bestimmt. Hierbei wurden 100 μ l der zu testenden Seren bzw. Kontroll-Standards in die Vertiefungen der mit einem monoklonalen zytokinspezifischen Antikörper vorbeschichteten Microtiterplatten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1h bis 2 $\frac{1}{2}$ h (je nach Zytokinbestimmung) bei RT wurde biotinyliertes polyklonales Zytokin-Antiserum zugegeben, das gegen ein anderes Zytokin-Epitop gerichtet ist. Dieses bindet an das bereits immobilisierte Zytokin. Nach Entfernen von überschüssigem Zweitantikörper durch fünfmaliges Waschen mit 100 μ l Waschpuffer wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben. Nachdem nicht gebundenes enzymgekoppeltes (Meerrettich-Peroxidase) Streptavidin durch fünfmaliges Waschen entfernt worden war, wurde der Substratlösung Tetramethylbenzidin und H₂O₂ zugesetzt. Diese bilden mit dem Enzym einen Farbkomplex. Es kommt zu einer blauen Farbreaktion, deren Intensität proportional zu der zu messenden Zytokinkonzentration ist. Gestoppt wurde die Reaktion mit 2N H₂SO₄, die einen Farbumschlag nach Gelb bewirkt, so dass die Farbintensität im Photometer bei OD450nm gemessen werden konnte. Mit Hilfe einer Standardkurve konnte anschließend die Zytokinkonzentration ermittelt werden. Einige IL-15 Messungen mussten nach Austestung der Konzentration nach einer Verdünnung wiederholt werden, da die gemessenen Konzentrationen oberhalb der Sensitivität lagen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte im ELISA-Reader (Bio-Rad, München).

3.3.1.4. Oberflächenmarkeranalyse mit dem FACScan

3.3.1.4.1. Markierung

Ca. 200 000 Zellen wurden in FACS (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) sedimentiert und der Überstand dekantiert. Danach wurden die Zellen mit 1 μg direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächen-Antigene für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (666 x g, 6 min, RT) wurden die Zellen in 200 μl PBS aufgenommen.

Bei Verwendung nicht direkt fluoreszenzmarkierter Antikörper erfolgt die Markierung in zwei Schritten. Dabei wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und im ersten Färbeschritt mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe eines Maus-Immunglobulin-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörpers für ebenfalls 10 min im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 200 μl PBS aufgenommen.

3.3.1.4.2. FACS-Analysen

Mit Hilfe eines FACScan (Becton Dickinson) wurden durchflußzytometrisch simultan bis zu 5 verschiedene Parameter einer Zelle analysiert:

Zelleigenschaft	FACScan Parameter
Größe	Vorwärtsstreulicht (FSC)
Granularität	Seitwärtsstreulicht (SSC)
Markierung durch Fluorescein.Isothiocyanat (FITC)-gekoppelte Antikörper*	Fluoreszenz 1
Markierung durch Phycoerythrin (PE)-gekoppelte Antikörper*	Fluoreszenz 2
Markierung durch Peridinchlorophyll (PerCP)-gekoppelte Antikörper*	Fluoreszenz 3

* FITC emittiert grünes Licht (525 nm), PE rotes Licht (578 nm), PerCP dunkelrotes Licht (680 nm).

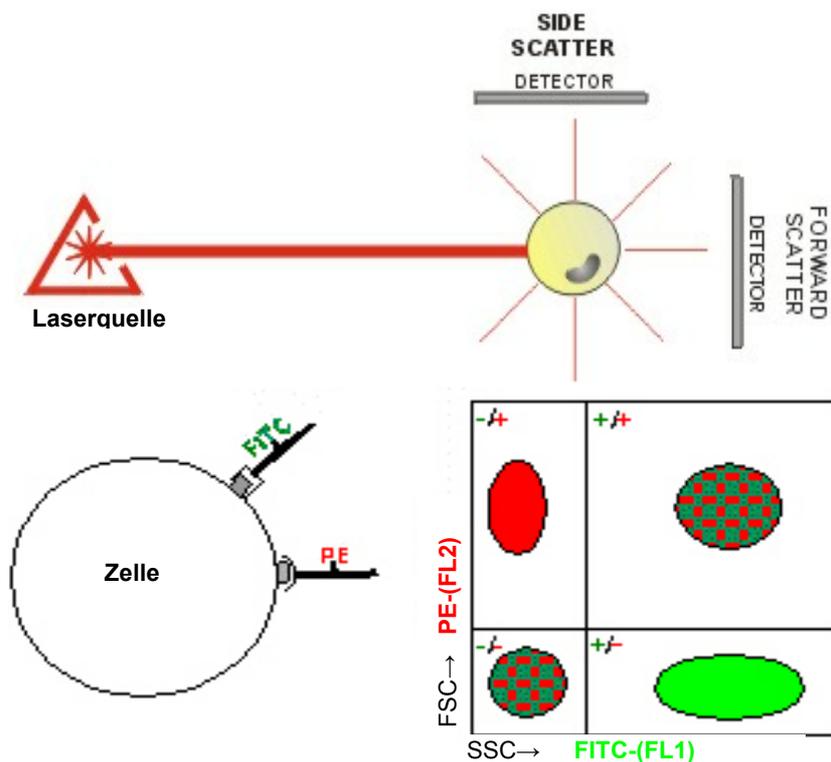


Abb 3.1. Zellen werden einzeln durch den Laser gelenkt, je nach Granularität, Nukleus und Größe wird der Laserstrahl abgelenkt. Zusätzlich kann die Emission bei Fluoreszenz-Ak markierten Zellen gemessen werden.

Zur Auswertung der Ergebnisse standen die FACScan- und LYSIS II- Software zur Verfügung. Die Analyse der Lymphozytenpopulationen erfolgte im Lymphozytenfenster, das durch die Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert wurde. Es wurden 10.000 Zellen je Probe analysiert. Als Negativkontrolle dienten mit Isotypkontrollantikörpern gefärbte Zellen.

3.3.2. Molekularbiologische Methoden

3.3.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der gezielt Desoxyribonukleinsäure-(DNA-) Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt werden können. Hierzu wird eine hitzestabile DNA-Polymerase verwendet, welche die Einzelstrang-DNA als Matrize zur Synthese eines neuen komplementären Stranges nutzt. Die PCR ist in drei Schritte unterteilt, die sich in genau definierten Zyklen wiederholen:

1. Denaturierung: Um eine Einzelstrang-DNA zu erzeugen, wird die DNA zunächst denaturiert, indem die doppelsträngige DNA nahe dem Siedepunkt (94°C) erhitzt wird.
2. Primer-Annealing: Im zweiten Schritt hybridisieren die Primer, die die jeweils interessierenden DNA-Abschnitte von beiden Seiten begrenzen, mit jeweils komplementären Basensequenzen.
3. Extension: Schließlich wird die einsträngige DNA verlängert (Extension). Hierbei werden die Primer durch die DNA-Polymerase in 3'-Richtung verlängert. Im Ergebnis sind 2 identische DNA-Doppelstränge entstanden, die im 2. Zyklus wieder durch Hitze gespalten werden. Der Prozess beginnt von Neuem über ca. 30 Zyklen.²²³

Für die Amplifikation der GST- bzw. mEH- Gene wurden die unter 1.2.7. beschriebenen Primer verwendet. Die Reaktionsansätze waren wie folgt:

	GST-PCR	mEH-PCR
10x PCR Puffer	3 µl	5 µl
Q-Puffer	-	10 µl
dNTP-Mix	2,4 µl (0,2 mM)	0,75 µl (0,15 mM)
Primer	1 µl (0,7 µM)	2,5 µl (1 µM)
Taq-Polymerase	0,29 µl (1U)	0,3 µl (1,5 U)
ddH ₂ O	13,3 µl	23,95 µl
genomische DNA	5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	30 µl	50 µl

Die Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenzen wurde in einem *Trio Thermo Cycler* (Biometra, Göttingen) mit den folgenden Zyklen durchgeführt:

	GST-PCR	mEH-PCR Exon3	mEH-PCR Exon4
Vorlauf	94°C 4'	94°C 4'	95°C 5'
Denaturierung	94°C 1'	94°C 10"	93°C 1'
Annealing	60°C 1'	56°C 30"	58°C 1'
Extension	72°C 1'	72°C 45"	72°C 1'
Zyklen	34	35	30
Nachlauf	72°C 7'	72°C 7'	72°C 7'
Lagerung	4°C	4°C	4°C

3.3.2.2. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Bei diesem Verfahren wird die amplifizierte DNA mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen in definierte Fragmente gespalten. Jedes Restriktionsenzym schneidet die DNA exakt an der Stelle, die seiner spezifischen Erkennungssequenz entspricht. Mittels Gelelektrophorese kann anschließend die Länge der Fragmente, im Abgleich zu einem geeigneten Größenmarker, bestimmt werden.¹⁹⁵

Restriktionsanalysen können dem Nachweis von Punktmutationen dienen, wenn die Erkennungssequenz des Enzyms durch den Austausch oder den Verlust einer Base verändert wurde. Ein Beispiel für den Basenaustausch mit Verlust der spezifischen Schnittstelle ist der mEH-Polymorphismus für das Exon 3 und Exon 4. Hierbei wird die Erkennungssequenz GACACCGTC des Enzyms *Asp I* in GATACCGTC verändert (Exon 3) und die Erkennungssequenz GTAC des Enzyms *Rsa I* in ATAC verändert (Exon 4). Die Folge dieser Punktmutationen ist der Verlust des charakteristischen Restriktionsmusters, weil das Enzym die Sequenz der Schnittstelle nicht mehr erkennen kann.

Für Restriktionsanalysen wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit 1 µl (10 U) Enzym, 2 µl 10x-Puffer und 7 µl nuklease-freiem Wasser in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und 60 min bei 37°C inkubiert.

3.3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es DNA auf Grund ihrer unterschiedlichen Länge und ihrer dadurch bedingten Wanderungsgeschwindigkeit aufzutrennen. Die als Anionen vorliegenden DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der sich zwischen den Basen der DNA einlagert, können die aufgetrennten DNA-Moleküle sichtbar gemacht werden. Die Anregung erfolgt mit UV-Licht von 500-590nm Wellenlänge. Dazu wurde die DNA im Verhältnis 1:6 mit Proben-Puffer vermischt und auf ein 2,0%iges Agarosegel aufgetragen, das Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) enthielt. Der Elektrophoresepuffer, in dem auch der Agar gelöst wurde, bestand aus 1x TAE-Puffer. Anschließend wurde eine Spannung von 60-100V angelegt. Neben den Proben wurden DNA-Längenstandard (MWG-Biotech, Ebersberg) aufgetragen, so dass eine Größenbestimmung der Produkte erfolgen konnte.

3.4. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms SPSS 9.0 sowie der Unterstützung von Herrn Dr. sc. math. Willers, Universitätsrechenzentrum Düsseldorf. Als Tests kamen der Student's T-Test (zweiseitig), der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-Exakt-Test sowie Multivarianzanalysen zur Anwendung. Unterschiede zwischen den Gruppen, für die $p < 0,05$ gilt, wurden als signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Zytokin- und FACS-Analysen

4.1.1. Zählung hämatologischer Progenitorzellen in KM und PB

Zur Analyse des hämatologischen Status wurde die Zellpopulation der Patienten in KM und PB bei Diagnosestellung vor Therapiebeginn analysiert. Hierzu wurde durchflusszytometrisch das KM von 152 und zusätzlich das PB von 63 pädiatrischen Patienten mit EAA auf den Anteil von pluripotenten Progenitorzellen untersucht. Der Normbereich für pluripotente Progenitorzellen liegt bei Kindern in einem Bereich von 1-3% und absolut 400-1000 Zellen/ μl KM bzw. 40-300 Zellen/ μl PB.^{15,191} Die pluripotenten Progenitorzellen wurden als CD34 positive (+) und CD33 negative (-) gatede Zellen im Lymphozytenfenster definiert. Von den KM-Analysen waren 126 und von den PB-Analysen 27 Proben auswertbar. Die nicht verwertbaren Proben beinhalteten entweder nicht genügend Material oder waren geronnen. Bei 22 KM-Proben und 18 PB-Proben konnten wir sowohl die relative Zellzahl ermitteln und gleichzeitig lag uns hier die absolute Leukozytenzahl vor, welche für die Errechnung der Anzahl der absoluten Progenitorzellen notwendig ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

Im Durchschnitt hatten die pädiatrischen EAA Patienten 1% CD34+-Zellen in KM und PB. Im Einzelnen fanden sich im KM bei 12% (15/126) und im PB bei 22% (6/27) der Patienten 1-3% CD34+-Zellen, welche somit im Normbereich liegen. 17% (22/126) der Patienten hatten mit 4-8% CD34+ im Knochenmark eine relativ erhöhte Anzahl von pluripotenten Progenitorzellen. Mit <1% CD34+ hatten 71% (89/126) der Patienten im KM bzw. 78% (21/27) im PB eine prozentual erniedrigte Anzahl von pluripotenter Progenitorzellen.

Beachtet man die absolute Anzahl der CD34+-Progenitorzellen, zeigte sich bei den Patienten eine signifikante Reduktion der Progenitorzellen im Vergleich zum Normkollektiv. 91% (20/22) hatten mit ≤ 167 CD34+-Zellen/ μl KM, 94% (17/18) mit ≤ 22 CD34+-Zellen/ μl PB weniger pluripotente Progenitoren. Dagegen wiesen nur 9% (2/22) der Patienten mit 560-600 CD34+-Zellen/ μl KM bzw. 6% (1/18) mit 46 CD34+-Zellen/ μl PB eine normale Progenitorzellzahl auf. Die Daten unserer

Kontrollgruppe sind vergleichbar mit den Literaturdaten, welche ein größeres Kollektiv an Kindern untersucht haben.^{15,191}

Tabelle 4.1. Relative Progenitorinzidenz in KM (n=126) und PB (n=27) bei der EAA

	CD34 <1%	CD34 1-3%	CD34 >3%
KM	0 ± 0	2 ± 1	6 ± 2
n	89 (71%)	15 (12%)	22 (17%)
PB	0 ± 0	2 ± 0	-
n	21 (78%)	6 (22%)	0

Für *Knochenmark* (KM) und *peripheres Blut* (PB) sind jeweils Mittelwert ± Standardabweichung angegeben; n = Fallzahl, in () prozentualer Anteil; relativ = relativer Anteil der CD34+-Zellen in.

Tabelle 4.2. Absolute Progenitorinzidenz in KM (n=22) und PB (n=18) bei der EAA

(μl^{-1})	CD34↓	CD34n	CD34↑
KM	55 ± 112	580 ± 20	0
n	20 (91%)	2 (9%)	0
PB	11 ± 11	46	0
n	17 (94%)	1 (6%)	0

Für *Knochenmark* (KM) und *peripheres Blut* (PB) sind jeweils Mittelwert ± Standardabweichung angegeben; n = Fallzahl, in () prozentualer Anteil; absolut = rechnerische absolute Anzahl CD34+-Zellen pro μl Blut; CD34n = normal; ↑ = erhöht; ↓ = erniedrigt.

4.1.2. Inzidenz immunkompetenter Zellen in KM und PB

Mittels Dreifarbandurchflusszytometrie (FACS) wurde das KM (n=130) und zusätzlich PB (n=45) von pädiatrischen EAA-Patienten untersucht. Nicht verwertbare Proben beinhalteten entweder eine nicht ausreichende Zellzahl oder waren geronnen. Aufgrund der Altersvariabilität wurden als Normwerte für Leukozyten der Altersverteilung entsprechende Zahlen aus der Literatur zugrundegelegt.^{15,53,191} Als Referenzwerte für aktivierte T-Zellen wurden im KM $\leq 13\%$ und ≤ 1580 Zellen/ μl verwendet.^{15,191} Referenzwerte für PB siehe Tabelle 4.3.

Die T-Zellen tragen das CD3-Antigen auf ihrer Oberfläche, welches nach Binden an einen fluoreszenzmarkierten Antikörper im FACS quantifiziert werden kann. In aktivierten T-Zellen ist zusätzlich die Expression der α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors (IL2R α) hochreguliert. IL2R α wird mit dem Antikörper CD25 markiert.

Somit können CD3 und CD25 doppelt positive Zellen als aktivierte T-Zellen definiert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt.

Tabelle 4.3. Streubereich (CI 95%) für Leukozyten und Subpopulationen im PB in Abhängigkeit vom Alter.^{15,53,191}

	Leukozyten x10 ³ /µl	Lymphozyten x10 ³ /µl	T-Zellen x10 ³ /µl	akt. T-Zellen x10 ³ /µl
9 Tage-1 Jahr	7,3-16,6	3,4-9,4	1-2,8	≤0,4
1-2 Jahre	5,6-17	2,5-8,6	0,8-2,6	≤0,3
3-5 Jahre	4,9-12,9	1,7-5,5	0,5-1,7	≤0,2
6-7 Jahre	4,4-10,6	1,6-4,3	0,5-1,3	≤0,2
8-16 Jahre	3,9-9,9	1,4-3,8	0,4-1,1	≤0,1

Tabelle 4.4. Leukozyten- und T-Zellinzidenz im KM und PB bei der EAA

	CD3	CD25/CD3	CD25/CD3n	CD25/CD3↑
KM	42% ± 21	11% ± 9	7% ± 2	23% ± 12
n	130	130	99 (76%)	31 (24%)
PB	62% ± 14	8% ± 13	7% ± 3	14% ± 1
n	41	41	38 (93%)	3 (7%)

Angegeben sind jeweils Mittelwert ± Standardabweichung; n = Fallzahl in () prozentualer Anteil; CD3 = T-Zellen; CD25/CD3 = aktivierte T-Zellen; n=notwertig; ↑=erhöht.

Tabelle 4.5. Errechnete Leukozyten- und T-Zellzahl für KM und PB bei der EAA

x10 ³ /µl	Leukozyten	CD3	CD25/CD3 n	CD25/CD3↑
KM	11 ± 2,6	3,7 ± 2,0	0,6 ± 0,5	0
n	18	18	18 (100%)	0
PB	2,3 ± 1,9	1,6 ± 1,7	0,1 ± 0,05	0
n	63	25	13 (100%)	0

Angegeben sind jeweils Mittelwert ± Standardabweichung; n = Fallzahl in () prozentualer Anteil; CD3 = T-Zellen; CD25/CD3 = aktivierte T-Zellen; n=notwertig; ↑=erhöht.

Es fanden sich bei pädiatrischen EAA Patienten im KM 42 ± 21% (n=130) und im PB 62 ± 14% (n=41) CD3+ Zellen. Diese waren, im Vergleich zu der Kontrollgruppe welche im KM und PB 20-30% CD3+-Zellen aufwiesen, signifikant erhöht (p<0,05). Von den CD3+ Zellen sind im KM 11 ± 9% CD25+ und somit aktiviert. Im PB fanden sich bis zu 8 ± 13% aktivierte T-Zellen. Wenn die CD25/CD3 doppelt positiven Zellen in einzelne Untergruppen unterteilt werden, lagen 76% (99/130) im KM und 93% (38/41) im PB mit 7 ± 3% aktivierten T-Zellen im Normbereich. 24% (31/130) der

Patienten haben mit $23 \pm 12\%$ im KM und 7% (3/41) mit $14 \pm 1\%$ im PB relativ erhöhte CD25/CD3-positive Zellen.

Bei den absoluten Werten wiesen die EAA Patienten 11.000 ± 2.600 Leukozyten/ μl KM (n=18) und 2.300 ± 1.900 Leukozyten/ μl PB (n=63) auf. Diese Werte lagen im unteren Normbereich (siehe Tab.4.3) bzw. waren im Rahmen der Panzytopenie erniedrigt. Die Anzahl der CD3+-Zellen war $3.700 \pm 2.000/\mu\text{l}$ KM (n=18) und $1.600 \pm 1.700/\mu\text{l}$ PB (n=25). Die absolute Anzahl der CD25/CD3+-Zellen war $600 \pm 500/\mu\text{l}$ KM (n=18) und $100 \pm 50/\mu\text{l}$ PB (n=13). Sowohl im KM als auch im PB wurde in keinem der untersuchten Fälle in absoluten Zahlen eine Vermehrung von aktivierten T-Zellen festgestellt.

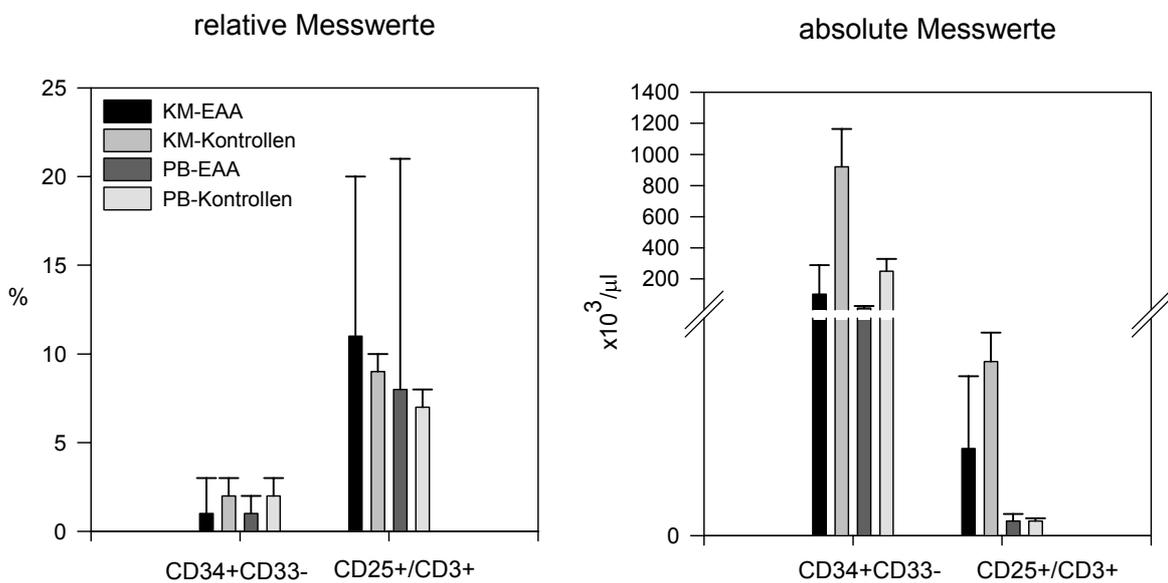


Abb. 4.1. Darstellung von relativen bzw. absoluten Werten im KM sowie PB für pluripotente Progenitorzellen (CD34+CD33-) und akt. T-Zellen (CD25+/CD3+).
Vergleiche Tab. 4.1. bis 4.5.

4.1.3. Immunhämatologische Klassifikation der EAA

Anhand der in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen relativen Progenitorinzidenz und T-Zellaktivierung im KM wurden die in Tabelle 4.6 dargestellten immunologischen Konstellationen definiert. Die Verteilung innerhalb der Einzelgruppen ist ebenfalls in Tabelle 4.6 dargestellt.

Typ	Anzahl	Konstellation
Typ Ia	60/105	erniedrigte Progenitorinzidenz, normale T-Zellaktivierung
Typ Ib	13/105	erniedrigte Progenitorinzidenz, erhöhte T-Zellaktivierung
Typ IIa	11/105	erhöhte Progenitorinzidenz, erhöhte T-Zellaktivierung
Typ IIb	6/105	erhöhte Progenitorinzidenz, normale T-Zellaktivierung
Typ III	6/105	normale Progenitorinzidenz, erhöhte T-Zellaktivierung
Typ IV	9/105	normale Progenitorinzidenz, normale T-Zellaktivierung

Von den 105 klassifizierten EAA Patienten hatten insgesamt 70% (73/105) eine relativ erniedrigte Progenitorinzidenz im KM; sie wurden zum Typ I zusammengefasst. Hierbei ließen sich wiederum zwei Subtypen unterscheiden. Zum einen Typ Ia, welcher mit 57% (60/105) eine relativ erniedrigte Progenitorzellinzidenz bei gleichzeitiger T-Zellaktivierung im Normbereich zeigte. Und zum anderen Typ Ib, welcher mit 12% (13/105) ebenfalls eine erniedrigte Progenitorinzidenz bei jedoch erhöhter T-Zellaktivierung aufwies. Zum Typ II wurden Patienten mit erhöhter Progenitorinzidenz zusammengefasst. Beim Typ IIa hatten 10% (11/105) sowohl eine erhöhte Progenitorzellinzidenz als auch eine erhöhte T-Zellaktivierung. Zum Typ IIb zählten 6% (6/105), welche bei erhöhter Progenitorinzidenz über eine normale T-Zellaktivierung verfügten. Zum Typ III wurden alle EAA Patienten mit normaler Progenitorinzidenz und erhöhter T-Zellaktivierung summiert. Hierzu zählten 6% (6/105) der Patienten. 9% (9/105) der Patienten hatten sowohl eine normale Progenitorinzidenz als auch eine normale T-Zellaktivierung und wurden zum Typ IV zusammengefasst.

4.1.4. Zytokinfreisetzung im Plasma und nach MNC-Stimulation

IFN- γ , IL10 und IL15 sind Zytokine, die direkt oder über Modulation der T-Zellantwort, Wachstum und Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflussen.^{72,250,251}

Um die Nullhypothese zu verifizieren, ob EAA-Patienten ohne T-Zellaktivierung normale Zytokinlevel aufweisen, wurden im Plasma von EAA-Patienten die Konzentrationen von IFN- γ , IL10 und IL15 gemessen. Darüber hinaus wurden gereinigte mononukleäre Zellen (MNC) von EAA-Patienten mit anti-CD3 bzw. anti-CD3 in Kombination mit IL2 stimuliert und für 72 Stunden inkubiert. Die Stimulation mit Medium diente als Kontrolle. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 4.7 bis 4.9 dargestellt.

4.1.4.1. IFN- γ Messungen

Es wurden die KM-Proben von 35 EAA-Patienten und 14 Kontrollen untersucht und zusätzlich die PB-Proben von 18 EAA-Patienten und 31 Kontrollen. Aufgrund einer z.T. nicht ausreichenden Zellzahl konnten nicht alle Stimulationsvarianten durchgeführt werden. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7. IFN- γ -Freisetzung bei Patienten mit EAA.

pg/ml	KM				
	Plasma	Medium	+IL2	+aCD3	+IL2 +aCD3
EAA	1 \pm 1	26 \pm 32	121 \pm 206	-	-
n	35	32	32	-	-
Kon	0,5 \pm 0,3	14 \pm 8	108 \pm 167	-	-
n	14	15	15	-	-
PB					
EAA	0 \pm 1	4 \pm 12	223 \pm 162	291 \pm 61	636 \pm 147
n	18	13	8	8	12
Kon	0 \pm 0	0 \pm 0	204 \pm 366	397 \pm 345	848 \pm 285
n	31	8	8	8	7

Gehalt an IFN- γ im Plasma und nach Stimulation mit anti-CD3 (aCD3) und IL2. Es sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut; Kon = Kontrollgruppe.

Der IFN- γ -Plasmaspiegel von EAA-Patienten lag im KM bei 1 ± 1 pg/ml (n=35), bei der KM-Kontrolle bei $0,5 \pm 0,3$ pg/ml (n=14). Im PB war der Wert bei EAA-Patienten 0 ± 1 pg/ml (n=18) IFN- γ im Plasma und in der Kontrollgruppe 0 ± 0 pg/ml (n=31). Somit lagen KM- und PB-Plasmawerte für IFN- γ im Normbereich.

Nach Inkubation mit Medium setzten die MNCs im EAA-KM 26 ± 32 pg/ml (n=32), im Kontrollgruppen (Kon)-KM 14 ± 8 pg/ml (n=15) IFN- γ frei bzw im EAA-PB 4 ± 12 pg/ml (n=13) und Kon-PB 0 ± 0 pg/ml (n=8) IFN- γ . Nach Stimulation mit IL2 betrug die IFN- γ -Freisetzung im EAA-KM 121 ± 206 pg/ml (n=32), im Kon-KM 108 ± 167 pg/ml (n=15); im EAA-PB 223 ± 162 pg/ml (n=8) und Kon-PB 204 ± 366 pg/ml (n=8). Im PB wurde darüber hinaus eine Stimulation mit anti-CD3 alleine und anti-CD3 in Kombination mit IL2 durchgeführt. Bei der alleinigen anti-CD3-Stimulation war die IFN- γ -Freisetzung im EAA-PB 291 ± 61 pg/ml (n=8) und im Kon-PB 397 ± 345 pg/ml (n=8). Bei der Doppelstimulation mit anti-CD3 und IL2 wurden im EAA-PB 636 ± 147 pg/ml (n=12) und bei der Kontrollgruppe 848 ± 285 pg/ml (n=7) gemessen. Alle für IFN- γ gemessenen Werte bei EAA-Patienten sowohl im KM als auch PB unterschieden sich nicht signifikant von den Werten der Kontrollgruppen.

4.1.4.2. IL10 Messungen

Es wurden die KM-Proben von 59 EAA-Patienten und 15 Kontrollen und zusätzlich die PB-Proben von 15 EAA-Patienten und 31 Kontrollen untersucht. Aufgrund einer nicht ausreichenden Zellzahl konnten nicht alle Stimulationsvarianten durchgeführt werden. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

Der IL10-Plasmaspiegel von EAA-Patienten lag im KM bei 39 ± 158 pg/ml (n=59) und bei den KM-Kontrollen bei 12 ± 3 pg/ml (n=15). Im PB hatte EAA-Patienten 6 ± 14 pg/ml (n=15) IL10 im Plasma und in der Kontrollgruppe 2 ± 2 pg/ml (n=31).

IL10-Freisetzung aus MNCs nach Inkubation in Kulturmedium alleine war bei EAA-KM 10 ± 10 pg/ml (n=57), Kon-KM 8 ± 12 pg/ml (n=12) und im EAA-PB 11 ± 13 pg/ml (n=11), Kon-PB 7 ± 14 pg/ml (n=8) IL10.

Tabelle 4.8. IL10 Freisetzung bei Patienten mit EAA.

pg/ml	KM				
	Plasma	Medium	+IL2	+aCD3	+IL2 +aCD3
EAA	39 ± 158	10 ± 10	21 ± 25	80 ± 135	251 ± 315
n	59	57	36	27	41
Kon	12 ± 3	8 ± 12	18 ± 8	63 ± 98	315 ± 204
n	15	12	11	11	11
PB					
EAA	6 ± 14	11 ± 13	20 ± 19	134 ± 102	489 ± 236
n	15	11	8	9	10
Kon	2 ± 2	7 ± 14	5 ± 4	73 ± 110	675 ± 94
n	31	8	8	8	8

Der Gehalt an IL10 im Plasma und nach Stimulation mit anti-CD3 (aCD3) und/oder IL2. Es sind jeweils Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut; Kon = Kontrollgruppe.

Nach Stimulation mit IL2 betrug die IL10-Freisetzung im EAA-KM 21 ± 25 pg/ml (n=36), Kon-KM 18 ± 8 pg/ml (n=11) und im EAA-PB 20 ± 19 pg/ml (n=8), Kon-PB 5 ± 4 pg/ml (n=8). Bei der alleinigen Stimulation der MNCs mit anti-CD3 setzten diese beim EAA-KM 80 ± 135 pg/ml (n=27), Kon-KM 63 ± 98 pg/ml (n=11) und bei EAA-PB 134 ± 102 pg/ml (n=9), Kon-PB 73 ± 110 pg/ml (n=8) IL10 frei. Bei der Ko-Stimulation der MNCs mit IL2 und anti-CD3 resultierte beim EAA-KM 251 ± 315 pg/ml (n=41), Kon-KM 315 ± 204 pg/ml (n=11) und bei EAA-PB 489 ± 236 pg/ml (n=10), Kon-PB 675 ± 94 pg/ml (n=8) IL10. Diese für IL10 in KM und PB gemessenen Werte bei EAA-Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen.

Bei genauerer Aufgliederung der Daten zeigte sich jedoch eine Untergruppe von 8/59 Patienten, welche mit einem IL10-Plasmaspiegel von 280 ± 342 pg/ml im KM signifikant erhöhte Werte aufwiesen ($p < 0,05$). Wir untersuchten, ob in dieser Untergruppe Korrelationen mit anderen von uns untersuchten Parametern bestehen. 6 von 8 Patienten mit erhöhtem IL10 Plasmawerten hatten mit $38 \pm 6\%$ relativ erhöhte T-Zellen im KM ($p < 0,05$). Bei den absoluten Werten zeigte sich eine erniedrigte T-Zellzahl 591 ± 376 / μ l KM. Aufgrund der niedrigen Fallzahl war es nicht möglich, hieraus eine Aussage bezüglich der Pathogenese der EAA abzuleiten.

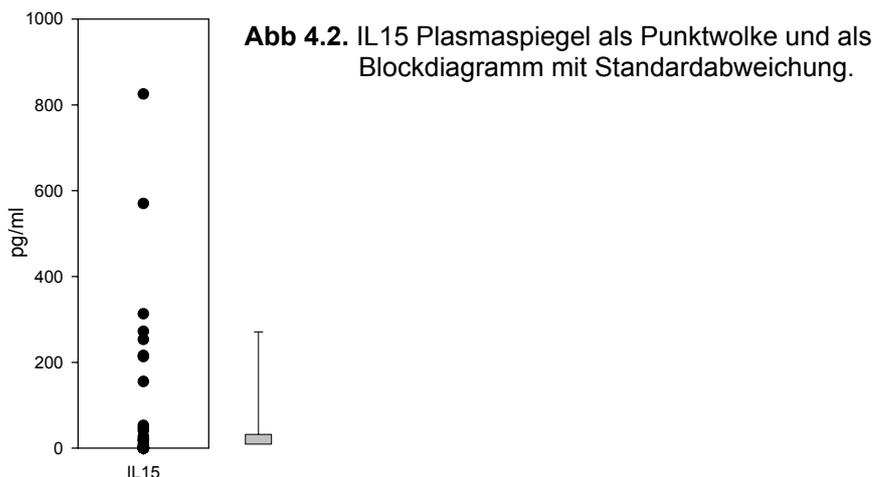
4.1.4.3. IL15

KM-Proben von 53 EAA-Patienten und 15 Kontrollen und zusätzlich die PB-Proben von 19 EAA-Patienten und 31 Kontrollen untersucht. Aufgrund einer nicht ausreichenden Zellzahl konnten nicht alle Stimulationsvarianten durchgeführt werden. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9. IL15 Freisetzung bei Patienten mit EAA.

pg/ml	KM				
	Plasma	Medium	+IL2	+aCD3	+IL2+aCD3
EAA	57 ± 150	116 ± 150	174 ± 181	131 ± 115	116 ± 114
n	53	35	40	27	30
Kon	0 ± 0	96 ± 35	110 ± 84	116 ± 91	88 ± 66
n	15	12	12	12	10
PB					
EAA	32 ± 46	59 ± 25	101 ± 103	105 ± 146	90 ± 129
n	19	13	8	9	11
Kon	33 ± 33	55 ± 26	69 ± 22	38 ± 40	48 ± 22
n	31	8	8	8	8

Der Gehalt an IL15 im Plasma und nach Stimulation mit anti-CD3 (aCD3) und IL2. Es sind jeweils Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut; Kon = Kontrollgruppe.



Der IL15-Plasmaspiegel lag im KM der EAA-Patienten bei 57± 150 pg/ml (n=53) und bei den KM-Kontrollen bei 0± 0 pg/ml (n=15). Im PB zeigten EAA-Patienten 32± 46 pg/ml (n=19) IL15 im Plasma und in der Kontrollgruppe 33± 33 pg/ml (n=31).

Die IL15-Plasmawerte des Patientenkollektives unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe. Bei genauer Betrachtung der Daten fiel auf, dass ein kleiner Teil der Patienten (14/53) stark erhöhte IL15-Spiegel aufwies, während bei allen anderen Patienten die IL15-Werte im Normbereich lagen (s.Abb.4.2). Multivarianzanalysen zeigten, dass die hohen IL15-Werte mit absolut und prozentual erniedrigte Progenitoranzahlen korrelierten ($p < 0,05$). 9/14 Patienten hatten $0 \pm 0\%$ und 74 ± 124 Zellen/ μl CD34+-Zellen im KM.

Als nächstes wurde untersucht, ob die MNCs von EAA-Patienten eine erhöhte IL15-Freisetzung aufweisen. Nach Inkubation mit Medium setzten die MNCs im Medium beim EAA-KM 116 ± 150 pg/ml ($n=35$), bei Kon-KM 96 ± 35 pg/ml ($n=12$) und im EAA-PB 59 ± 25 pg/ml ($n=13$), Kon-PB 55 ± 26 pg/ml ($n=8$) IL15 frei. Unter Stimulation mit IL2 war die IL15-Freisetzung im EAA-KM 174 ± 181 pg/ml ($n=40$), Kon-KM 110 ± 84 pg/ml ($n=12$) und im EAA-PB 101 ± 103 pg/ml ($n=8$), Kon-PB 69 ± 22 pg/ml ($n=8$). Bei der alleinigen Stimulation der MNCs mit anti-CD3 setzten diese beim EAA-KM 131 ± 115 pg/ml ($n=27$), Kon-KM 116 ± 91 pg/ml ($n=12$) und bei EAA-PB 105 ± 146 pg/ml ($n=9$), Kon-PB 38 ± 40 pg/ml ($n=8$) IL15 frei. Bei der Co-Stimulation der MNCs mit IL2 und anti-CD3 resultierte beim EAA-KM 116 ± 114 pg/ml ($n=30$), Kon-KM 88 ± 66 pg/ml ($n=10$) und bei EAA-PB 90 ± 129 pg/ml ($n=11$), Kon-PB 48 ± 22 pg/ml ($n=8$) IL15. Die nach Stimulation der KM- und PB-Proben von EAA-Patienten gemessene Werte für IL15 unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe.

4.2. Enzypolymorphismen

4.2.1. Polymorphismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase

Um die verschiedenen mEH-Mutationen zu untersuchen, wurde eine kombinierte PCR-RFLP entwickelt (Einzelheiten siehe Abb.4.3 und Abschnitt 3.3.2.2.). Die Häufigkeitsverteilung ist in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

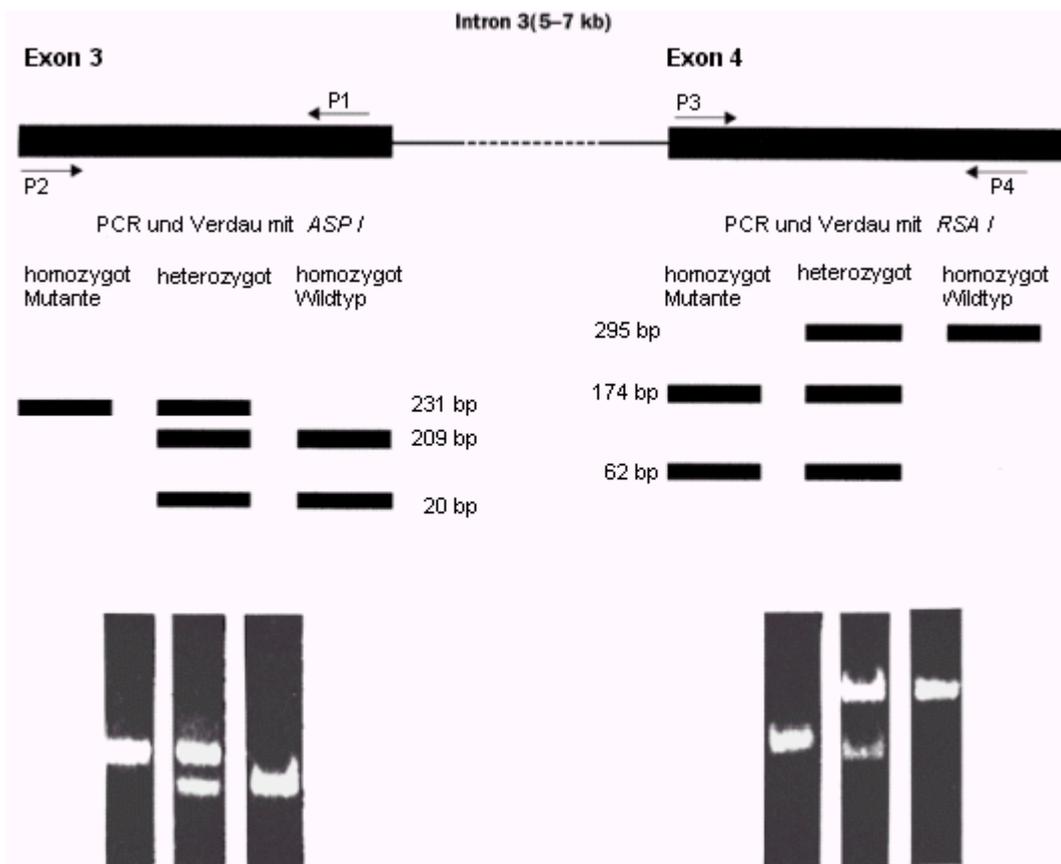


Abb. 4.3. PCR-RFLP Analysen des mEPHX-Polymorphismus

Obere Reihe zeigt die Anordnung von Exon 3 und 4.

Mittlere Reihe zeigt die erwartete Bandenanordnung bei Homo- oder Heterozygotie.

Untere Reihe zeigt ein typisches Elektrophoresegele.

Tabelle 4.10. mEH-Genotypenverteilung in der Kontroll- und Patientengruppe.

	homozygot Wildtyp	heterozygot	homozygot Mutante	OR(95%CI) für homoz. Mutante	Allelfrequenz Mutante	OR(95%CI) für Mutationsträger§
Exon 3 Polymorphismus (langsam)						
Kontrollen (n=100)	40 (40%)	52 (52%)	8 (8%)	1,0*	0,34	1,0
EAA (n=59)	29 (49%)	19 (32%)	11 (19%)	2,6 (1,0-7,0)	0,35	0,7 (0,4-1,3)
Exon 4 Polymorphismus (schnell)						
Kontrollen (n=100)	65 (65%)	31 (31%)	4 (4%)	1,0*	0,20	1,0*
EAA (n=59)	39 (66%)	19 (32%)	1 (2%)	0,4 (0-3,8)	0,18	1,0 (0,5-1,9)

*Referenzgruppe; § mind. ein mutantes Allel. OR=Odds Ratio.

Das mEH-Gen wurde bei 59 Kindern mit EAA und 100 Kontrollen untersucht. Bei 29/59 (49%) Kindern mit EAA wurde der Wildtyp (WT) Tyr/Tyr113 nachgewiesen. Bei den Kontrollen hatten 40/100 (40%) den WT Genotyp für Exon 3. Heterozygot Tyr/His113 waren 19/59 (32%) der EAA-Patienten und 52/100 (52%) der Kontrollpersonen. Homozygot für die Mutation His/His113 waren 11/59 (19%) der EAA-Patienten und 8/100 (8%) der Kontrollpersonen. Dieses machte eine Allelfrequenz für homozygote Mutationsträger von 0,35 in der Patientengruppe und 0,34 bei der Kontrollgruppe für Exon 3 aus. Weder die Häufigkeit für homozygote noch die gesamte Häufigkeit der Mutationsträger unterschied sich signifikant zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

Bei Exon 4 waren 39/59 (66%) der Patienten homozygot für den WT His/His139 und 65/100 (65%) der Kontrollpersonen. Heterozygot His/Arg139 waren 19/59 (32%) der Patienten und 31/100 (31%) der Kontrollpersonen. Homozygoter Mutationsträger Arg/Arg139 war ein Patient (1/59; 2%), bei der Kontrollgruppe waren es 4/100 (4%). Bei Exon 4 betrug die Allelfrequenz somit bei den EAA-Patienten 0,18 und bei der Kontrollgruppe 0,2. Bei Exon 4 fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Als nächstes wurde eine funktionelle Auswertung der Daten durchgeführt (siehe Tab.3.9). Hierbei waren Phänotypen mit *normaler* Aktivität entweder homozygote WT für Exon 3 und Exon 4 oder heterozygote für Exon 3 und 4. Als *schnell* wurden diejenigen eingestuft, welche homozygote WT für Exon 3 waren und entweder

homozygote Mutationsträger für Exon 4 oder heterozygote für Exon 4. *Langsame* Aktivität besaßen heterozygote für Exon 3 und homozygote WT für Exon 4. *Sehr langsame* Phänotypen waren homozygote Mutationsträger für Exon 3.²³⁹

Tabelle 4.11. Verteilung von möglichen mEH Phänotypen*.

	Normal	Schnell	Langsam	Sehr langsam	OR (95%CI) für <i>sehr langsam</i> vs. alle anderen Phänotypen
Kontrollen (n=100)	35 (35%)	19 (19%)	38 (38%)	8 (8%)	1,0§
EAA (n=59)	26 (44%)	9 (15%)	13 (22%)	11 (19%)	2,6 (1,0-7,0)

*Normal=keine Mutationen in den Genen oder heterozygot für Exon 3 und 4; schnell=mind. eine schnelle Mutation und homozygot (Exon 4) und keine Exon 3 Mutation; langsam=ein langsames (Exon 3) Allel; sehr langsam=zwei langsame Allele; §Referenzgruppe.

Bei den EAA-Patienten wiesen 26/59 (44%) den *normalen* Phänotyp auf und in der Kontrollgruppe 35/100 (35%). Den *schnellen* Phänotyp hatten 9/59 (15%) der EAA-Patienten und 19/100 (19%) der Kontrollgruppe. Als *langsam* waren 13/59 (22%) der Patienten einzustufen und 38/100 (38%) der Kontrollpersonen. *Sehr langsame* Phänotypen waren 11/59 (19%) der EAA-Patienten und 8/100 (8%) der Kontrollen. Hierbei waren die Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe im Rahmen der Normalverteilung.

4.2.2. Polymorphismus der Glutathion S-Transferase

Von den bislang bekannten GST-Isoenzymen ist für drei -GSTP1-1, GSTM1-1 und GSTT1-1- ein genetischer Polymorphismus beschrieben worden. In dieser Studie wurde der Polymorphismus der GSTM1-1 und GSTT1-1 untersucht. In Abbildung 4.3. ist die im Abschnitt 3.3.2. geschilderte Methode bildlich dargestellt. Die Ergebnisse der GST-Polymorphismus-Analysen sind in Tabelle 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.12. GST-Genotypenverteilung bei Kontroll- und Patientengruppe.

	GSTM1 vor.*	GSTM1 null	GSTT1 vor.*	GSTT1 null	GSTM1+T1 null
Kontrollen (n=160)	82 (51%)	78 (49%)	135 (84%)	25 (16%)	16 (10%)
EAA (n=91)	53 (58%)	38 (42%)	60 (66%)	31 (34%)	14 (15%)
Odds Ratio (95% CI)	1,0¶	0,8 (0,4-1,3)	1,0¶	2,8 (1,5-5,1)§	1,6 (0,8-3,5)‡

*vor.=mind. ein Allel vorhanden; ¶Referenzgruppe; §p=0,001; ‡OR für *Doppelnull* vs. alle anderen Genotypen.

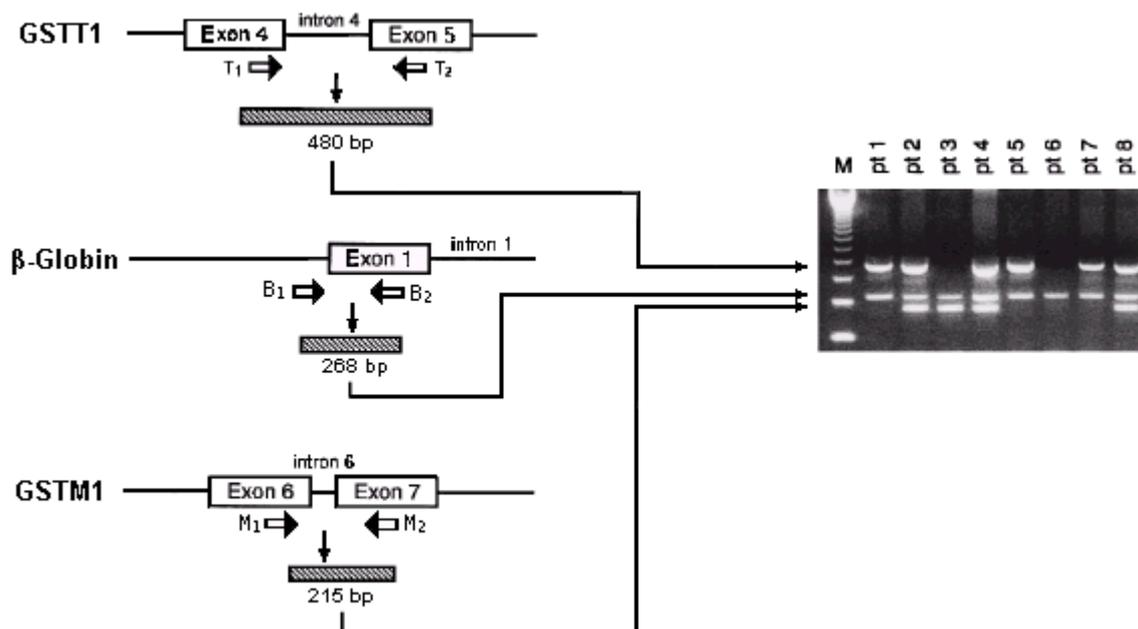


Abb. 4.4. Schematische Darstellung der Amplifikation der GSTT1, β -Globin und GSTM1 Gene (links) mit resultierendem Ethidiumbromid-Gel (rechts). Es sind jeweils repräsentative Patienten-Proben (pt1-pt8) mit positiven GSTT1, β -Globin und GSTM1 Allel-Fragmenten dargestellt; z.B. Patienten 1 und 5 sind *null* für GSTM1, Patienten 2 und 8 sind weder *null* für GSTM1 noch GSTT1, Patient 3 ist *null* für GSTT1 und Patient 6 ist *null* für GSTM1 und GSTT1. Die Abwesenheit eines PCR-Produktes zeigt einen Null-Genotyp an. M=DNA-Größenmarker; T₁, T₂, B₁, B₂, M₁, M₂=jeweilige Primer.

Wir untersuchten die Gene für GSTT1 und GSTM1 bei 91 Kindern mit EAA und bei 160 Kontrollpersonen. Bei 53/91 (58%) Kindern mit EAA war mindestens ein GSTM1 Allel vorhanden. Bei den Kontrollpersonen waren bei 82/160 (51%) das Gen für GSTM1 nachweisbar. Einen Null-Genotyp für GSTM1 hatten 38/91 (42%) der Patienten und 78/160 (49%) der Kontrollpersonen. Bei den GSTT1-Genotypen fand sich ein signifikanter Unterschied beim Null-Genotyp zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe. Im Einzelnen hatten 60/91 (66%) der EAA Patienten und 135/160 (84%) der Kontrollpersonen mindestens ein GSTT1-Allel. 31/91 (34%) der EAA-Patienten und 25/160 (16%) der Kontrollpersonen hatten einen Null-Genotyp für GSTT1. Die Häufigkeit für den Doppelnul-Genotyp für GSTM1 und GSTT1 unterschied sich bei den Patienten mit 14/91 (15%) und bei den Kontrollen mit 16/160 (10%) nicht signifikant voneinander.

Zusammenfassend war das Verhältnis von Individuen mit einem GSTT1-Null-Genotyp bei Kindern mit EAA im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Signifikanzniveau von $p=0,001$ signifikant höher. Somit stellte der GSTT1 Null-Genotyp einen signifikanten Risikofaktor für die EAA im Kindesalter dar ($OR=2,8$). Keines der anderen untersuchten Allele war ein signifikanter Indikator für das Risiko der EAA.

4.3. Koinzidenz zwischen den erhobenen Daten

Zahlreiche Multivarianzanalysen zeigten keine signifikanten Korrelation zwischen den erhobenen immunologischen und/oder genetischen Analysen. Im Einzelnen wurde keine signifikante Korrelation gefunden zwischen der EAA des Kindesalters und der Multivarianzanalysen aus Progenitorinzidenz, aktivierten T-Zellzahlen, $IFN-\gamma$ -, $IL10$ -, $IL15$ -Plasmaspiegel, mEH-Wildtyp, -Heterozygotie, -Mutante, funktionellen mEH-Analysen, GSTT1/GSTM1-Doppelnulgenotyp (wie bei der akuten lymphatischen Leukämie(ALL) des Kindesalters),⁴⁵ Phänotyp der aplastischen Anämie (NSAA, SAA, VSAA), Therapieansprechen, Alter und/oder Geschlecht der Patienten. Erwähnenswert ist auch, dass die immunhämatologische Klassifikation (s.Tab.4.6) keine Korrelation mit den Zytokinpiegel und Enzym polymorphismen zeigte. Somit konnten außer der Korrelation GSTT1-Nullgenotyp/EAA keine weiteren, statistisch signifikanten Risikofaktoren für die EAA bestimmt werden.

5. Diskussion

Die EAA ist durch eine Knochenmarksaplasie und eine Panzytopenie im peripheren Blut charakterisiert.²⁸⁴ Die bekannten Ursachen für die EAA sind verschiedenartig und umfassen z.B. Medikamente,¹⁵³ Chemikalien,^{226,237} Viren,³⁵ ionisierende Strahlung^{43,233} und Schwangerschaft.²⁶¹ Möglicherweise können durch äußere Noxen bedingte DNA-Schäden immunologische Mechanismen induzieren, so dass für die unterschiedlichen Auslöser eine gemeinsame Endstrecke auf dem Weg zur EAA resultiert.²⁸² Genetisch prädisponierende Faktoren, die mit einer verzögerten Ausscheidung von Zellgiften einhergehen, werden diskutiert sind aber kaum untersucht. Im Rahmen der Therapieoptimierungsstudie SAA94 für Kinder mit EAA hat sich die einmalige Gelegenheit geboten, prätherapeutisch wissenschaftliche Begleituntersuchungen zu initiieren. Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, anhand der bislang größten pädiatrischen Patientengruppe die Kenntnisse der Pathogenese der erworbenen aplastischen Anämie des Kindesalters zu erweitern.

5.1. Hämatopoetisches Versagen

Die hämatopoetischen Stammzellen sind normalerweise durch ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential gekennzeichnet. Dass die pluripotenten Progenitoren bei der EAA eine gestörte Funktion aufweisen, wurde bereits in den 70er Jahren durch Zellkulturexperimente gezeigt.¹⁷⁵ Bei funktionellen Untersuchungen zeigt das KM von erwachsenen und pädiatrischen EAA-Patienten eine stark verminderte Potenz zur Koloniebildung von CFU-GM¹² (*colony forming unit granulocyte, macrophage*), BFU-E und CFU-E^{5,252} (*burst forming unit, erythroid*, frühe Erythroid-Vorläufer) und CFU-GEMM¹⁴ (pluripotente Vorläufer). Auffällig war auch die persistierend niedrige Anzahl von Progenitoren im KM.^{155,174,175,232} Selbst lange Zeit nach erfolgreicher immunsuppressiver Therapie bleibt die Anzahl von hämatopoetischen Vorläuferzellen häufig niedrig.^{213,279} Besonders in Kolonieassays konnte sowohl bei Erwachsenen¹⁵⁸ als auch bei Kindern⁶⁴ eine deutlich eingeschränkte Koloniebildung bei EAA-Patienten gezeigt werden. Insgesamt wurden in der Literatur fünf verschiedene Methoden zur Messung der Anzahl von

hämatopoetischen Vorläuferzellen verwendet (unter anderem auch mittels CD34+ Zellen im FACS). Alle Methoden zeigten eine früh reduzierte Hämatopoese. Die FACS-Analyse stellt hier eine effektive und verlässliche Methode zur Messung hämatopoetischer Zellpopulationen dar.

Die vorliegende Arbeit bestätigte diese zumeist bei Erwachsenen durchgeführten Untersuchungen auch für die EAA des Kindesalters. So dass analog zu den Erwachsenen eine bereits frühe Reduktion der Hämatopoese die Panzytopenie bei der EAA im Kindesalter bedingt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass auch bei der EAA im Kindesalter pluripotente Progenitoren, welche das CD34-Antigen exprimieren (durchflußzytometrisch gemessen), meist weder im KM noch im PB, wo sie ohnehin nur in geringem Maße nachweisbar sind, vorhanden sind. So wies das KM von 71% (89/126) pädiatrischen EAA-Patienten signifikant erniedrigte relative pluripotente Progenitorzellzahlen (CD34+CD33-) im Vergleich zu Normalpersonen auf. Bei der absoluten Zellzahl im KM hatten 91% (20/22) der Patienten eine signifikant erniedrigte Progenitorinzidenz. Der Grund für die übrigen 9% mit normaler Progenitorinzidenz konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden (z.B. Schädigung an reiferen Zellen, spontane Regeneration, peripherer Zellverbrauch etc.). Zur weiteren Klärung der beeinträchtigten Hämatopoese wurde als nächstes die Aktivierung der T-Zellen als mögliche Ursache der reduzierten Progenitorinzidenz untersucht.

5.2. Mechanismen hämatopoetischer Zellschädigung

5.2.1. Immunvermitteltes Knochenmarksversagen

Bereits im Jahre 1970 diskutierte Mathé eine immunvermittelte Pathogenese der EAA.¹⁶⁹ Seither hat es eine Vielzahl von Studien zur Immunpathogenese der EAA gegeben.²⁸² Bei dieser Studie wurden T-Zellpopulationen, Hämatopoese-inhibierende (IFN- γ , IL15) und stimulierende (IL10) Zytokine bei Kindern mit EAA untersucht.

5.2.1.1. T-Zellaktivierung und IFN- γ Freisetzung

Die immunologischen Untersuchungen ergaben eine große Heterogenität bei Kindern mit einer EAA. Neben der in Abschnitt 4.1 beschriebenen pluripotenten Progenitorinzidenz wurde auch die T-Zellaktivierung (IL2R α auf CD3+-Zellen) im Durchflußzytometer untersucht. Bislang publizierte Untersuchungen bezüglich KM- und PB-Lymphozyten bei Patienten mit einer EAA lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe postuliert, dass aktivierte T-Zellen eine zentrale pathogenetische Rolle bei der EAA spielen. Zum einen beruht diese Schlussfolgerung auf einem vermehrten Nachweis von aktivierten T-Zellen und zum anderen auf deren Zytokin-Produktion in KM und PB. So stellten bei der Differenzierung der Lymphozyten von erwachsenen EAA-Patienten mittels verschiedener monoklonaler Antikörper Viale et al. (Patientenzahl n=4; AK CD8),²⁶³ Maciejewski et al. (n=33; HLA-DR, CD8, CD56),¹⁵⁶ Miura et al. (n=34; HLA-DR, CD4, CD8),¹⁷³ Suarez et al. (n=17; CD4, CD8, CD25)²⁴⁸ und Fan et al. (n=12; CD4, CD8, CD25)⁶⁸ eine vermehrte Anzahl von aktivierten T-Zellen bei EAA Patienten im Vergleich zu Normalpersonen fest. Zum anderen konnte kein Zusammenhang zwischen aktivierten T-Zellen und der EAA festgestellt werden (n=13; HLA-DR, CD4, CD8).¹³⁵

Bei der kombinierten Analyse unserer Daten konnten Subgruppen identifiziert werden. 30 von 105 Patienten hatten im KM eine erhöhte T-Zellaktivierung, wobei 13 der 30 Patienten eine relativ erniedrigte Progenitorinzidenz aufwiesen. Demnach könnten nach unseren Daten aktivierte T-Zellen in der Pathogenese bei einer Subgruppe von pädiatrischen EAA Patienten eine Rolle spielen.

Wenn aktivierte T-Zellen Ursache für die EAA bei einer Subgruppe der Patienten ist, ist es wahrscheinlich, dass als Mediatoren der Suppression der Hämatopoese spezifische T-Zellzytokine nachweisbar sind. Eines der potentesten Inhibitoren der Hämatopoese ist das IFN- γ , welches von aktivierten T-Zellen produziert wird.^{13,173,235,291} T-Zellen von pädiatrischen und erwachsenen EAA-Patienten, produzierten in Zellkultur²⁹² oder als Zellklon²⁵⁵ große Mengen an Tumor-Nekrose-Faktor (TNF, hier nicht untersucht) und IFN- γ . Bei KM-Proben von erwachsenen EAA-Patienten konnte darüber hinaus eine Überexpression von IFN- γ -messenger-RNA (mRNA) nachgewiesen werden.^{190,196} Wie schon bei der T-Zellaktivierung sind die bislang publizierten Daten bezüglich der IFN- γ -Produktion teilweise gegensätzlich. Die Arbeitsgruppe von Neil Young fand eine signifikant erhöhte IFN- γ -Produktion bei MNC's von erwachsenen EAA-Patienten (n=24) und postulierte, dass dieses einen grundlegenden Pathomechanismus der EAA darstellt.^{285,292} Andere Arbeitsgruppen konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen IFN- γ und der EAA feststellen (n=2⁹¹; n=50²⁵⁷). Unsere Untersuchung für das Gesamtkollektiv zeigte keine signifikant erhöhten IFN- γ -Plasmawerte in KM oder PB im Vergleich zu Normalpersonen. Auch nach Stimulation von Patienten-MNCs, zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der IFN- γ -Freisetzung zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe. Darüber hinaus korrelierten die IFN- γ -Spiegel weder mit der Anzahl der aktivierten T-Zellen noch mit der Progenitorinzidenz. Die gegensätzlichen Ergebnisse bei verschiedenen Untersuchungen (unsere mit eingeschlossen) könnten mit der geringen Patientenzahl mancher Untersuchungen oder mit den verschiedenen Methoden und den Variationen zwischen verschiedenen T-Zellmarkern und Zytokin-Bestimmungsmethoden zusammenhängen;³⁷ zumal einige Arbeitsgruppen als abschließendes Resümee ihrer Daten, besonders in Bezug auf die Immunpathogenese der EAA, eine Evaluation mit größeren Fallzahlen empfehlen.¹⁷³ Da die meisten anderen Studien ein gemischtes Patientenkollektiv aus Erwachsenen und Kinder untersuchten, könnten unsere Daten auf einen pathogenetischen Unterschied zwischen der EAA im Erwachsenenalter und Kindesalter hinweisen.

5.2.1.2. Erhöhte IL15-Plasmawerte

Ein weiterer Inhibitor der Hämatopoese ist das IL15. Im Gegensatz zu IFN- γ ist die Rolle von IL15 bei Krankheiten mit KM-Versagen bislang nicht untersucht. IL15 aktiviert NK-Zellen und verstärkt ihre zytolytische Wirkung.⁴¹ Des Weiteren induziert IL15 die Proliferation und Aktivierung von LAK-Zellen, naiven, memory und zytotoxischen T-Zellen und intensiviert die zytotoxische T-Zellaktivität.^{115,215} Bei der EAA konnten andere Arbeitsgruppen eine Assoziation zu erhöhten NK-Zellen zeigen.^{58,156,178} Um seine biologische Aktivität zu entfalten, reguliert IL15 den IL2R α auf T- und B-Zellen hoch. Wenn T-Zellen eine Rolle bei einer Subgruppe der EAA spielen sollten, könnten Modulatoren von T-Zellen wie IL15 ebenfalls eine Funktion in der Pathogenese dieser Erkrankung besitzen. Bei unseren Untersuchungen korrelierten die IL15-Spiegel jedoch nicht mit der IL2R α -Expression, folglich kann nicht von einer relevanten pathogenetischen Rolle von IL15 in Bezug auf aktivierte T-Zellen bei der EAA ausgegangen werden.

Daneben werden viele der von IL15 stimulierten Zellpopulationen zur IFN- γ Produktion angeregt.^{41,137,215} IFN- γ seinerseits induziert über einen positiven Rückkopplungsmechanismus eine vermehrte IL15-Expression.¹⁴⁰ Wahrscheinlich beruht die Suppression der Hämatopoese sowohl auf der direkten IL15-Wirkung als auch auf der indirekten IFN- γ -Induktion sowie der zusätzlichen Immunstimulation. Bei dieser Studie zeigte eine Subgruppe von EAA-Patienten stark erhöhte IL15-Spiegel. Multivariatanalysen zeigten, dass die hohen IL15-Werte mit absolut und prozentual erniedrigten Progenitoren korrelierten ($p < 0,05$). Die IL15-Werte korrelierten nicht mit den IFN- γ Werten. Da kein signifikanter Zusammenhang zwischen IL15 und T-Zellen oder IFN- γ gefunden wurde, könnte hier eine direkte IL15-Wirkung auf die pluripotenten Progenitoren zu deren Erniedrigung führen.

5.2.1.3. IL10-Freisetzung

Wie bei IL15 ist die Rolle von IL10 bei der EAA noch nicht hinreichend untersucht. Es gibt nur eine Untersuchung, welche bei einem EAA-Patienten mit erhöhtem IFN- γ -Spiegel eine Inhibition der IFN- γ -Produktion durch *in vitro* hinzugefügtes IL10 feststellte.⁷ Bei der vorliegenden Studie wurden neben den bislang beschriebenen immunologischen Parametern auch die IL10-Plasmaspiegel bei EAA-Patienten bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Subgruppe von 8/59 EAA-Patienten mit erhöhtem IL10-Plasmaspiegel.

Im Gegensatz zu IFN- γ und IL15 hat das IL10 eine hemmende Wirkung auf Entzündungsreaktionen und auf die zellvermittelte Immunantwort.^{59,107,144,214} Die IL10-Wirkung ist durch die Inhibition der Synthese einer Vielzahl von Zytokinen wie IFN- γ und IL15 bei TH1-Zellen bedingt.^{7,137,182} Unsere Daten zeigten keine Korrelation zwischen IL10- und IFN- γ -Plasmaspiegel bei Kindern mit EAA. Des Weiteren zeigten unsere Daten, keine Korrelation zwischen IL10-Plasmaswerten mit dem Grad der T-Zellaktivierung. Dieses stimmt mit einer großen Untersuchung überein, bei der die T-Zellproliferation (anhand des ebenfalls von uns verwendeten Markers CD25 gemessen) nicht von IL10 beeinflusst wird.¹³⁷ Selbst *in vitro* zeigt sich physiologischerweise kaum eine lineare Verbindung zwischen Zytokinproduktion und T-Zellaktivierung oder Progenitorinzidenz.^{59,107,144,214}

Die Heterogenität der gemessenen immunologischen Parametern könnte zum einen durch die unterschiedlichen Ätiologien der EAA, die nicht mit der gleichen Immunantwort einhergehen, bedingt sein. Weitere mögliche Ursachen für die teilweise gegensätzlichen Ergebnisse könnten unterschiedliche Krankheitsstadien sein. Bei der vorliegenden Studie wurden Kinder zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor Therapiebeginn untersucht. Retrospektiv kann kaum nachvollzogen werden, wie lange der Prozess bis zu einer symptomatischen EAA dauerte. Auch bei T-zellvermittelten Autoimmunkrankheiten, wie der Multiplen Sklerose, konnte gezeigt werden, dass gleichzeitig erhöhte IFN- γ - und IL10-Plasmaspiegel vorliegen können,³² obgleich diese Zytokine gegensätzliche Immunwirkungen haben. Bei der MS werden erhöhte IL10-Spiegel als reaktiv auf eine erhöhte IFN- γ -Produktion interpretiert. Diese These wird dadurch unterstützt, dass dem IL10 besonders bei der späten fortgeschrittenen Immunantwort eine besondere regulatorische Rolle

zugeschrieben wird.²⁸⁷ Die Tatsache, dass sowohl IL10 und IL15 als auch IFN- γ mit der EAA assoziiert sein können, zeigt, dass wahrscheinlich sowohl TH1- als auch TH2-Zellpopulationen an der Pathogenese der EAA beteiligt sind. Dies bedeutet wiederum, dass in einigen Fällen die humorale und in anderen die zelluläre Immunantwort eine dominierende Rolle spielen muss. Nicht zuletzt erscheint dies trotz der gemeinsamen Endstrecke auf Grund der verschiedenen zugrundeliegenden Ätiologien wahrscheinlich.²⁸³ Um diese Hypothesen zu verifizieren, wären weitere Untersuchungen mit besonderem Augenmerk auf die verschiedenen T-Helferzellpopulationen und den komplexen Zytokin-Interaktionen und -Auswirkungen notwendig.

5.2.2. Direkte Knochenmarkstoxizität, Enzym polymorphismus und Biotransformation von Xenobiotika

Populationsgestützte Studien hauptsächlich an Erwachsenen identifizierten in über 25% der Fälle eine Assoziationen zwischen exogenen Noxen und der EAA.^{2,16,117,168} Am häufigsten findet sich bei der EAA eine Assoziation mit Benzol,^{114,162,237,241,243} Pestiziden⁷³ und anderen zyklischen Kohlenwasserstoffen.¹¹⁴ Eine weitere häufige Assoziation mit der EAA findet sich bei dem Antibiotikum Chloramphenicol. Hierbei gibt es zwei verschiedene Formen der KM-Schädigung. Bei der einen kommt es dosisabhängig zu einer reversiblen KM-Repression als Folge mitochondrialer Schädigungen.²⁸⁸ Bei der anderen reicht bereits dosisunabhängig die einmalige topische Applikation am Auge aus um eine EAA auszulösen.^{20,148} Hierbei spielt die Entgiftung von Chloramphenicol und ihrer toxischen Metabolite eine entscheidende Rolle.^{145,288,289} Wie für Chloramphenicol wird bei anderen Substanzen die genetische Determination im Entgiftungsstoffwechsel von Xenobiotika für die KM-Schädigung angesehen.²⁸¹ So hängt der Schutz des Knochenmarks vor Xenobiotika maßgeblich von einer effizienten Biotransformation ab. Individuelle Unterschiede bei der Expression biotransformierender Enzyme könnten zu einer Empfänglichkeit gegenüber toxischer Substanzen führen. Bei dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der EAA im Kindesalter und Enzym polymorphismen besteht. Es wurde jeweils ein Phase I-Enzym (mEH) und ein Phase II-Enzym (GST) untersucht. Beides sind Enzyme, welche an der Entgiftung besonders zyklischer Kohlenwasserstoffe beteiligt sind.^{129-131,150,176,177,242}

5.2.2.1. Polymorphismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase

Viele der zyklischen Kohlenwasserstoffe haben die Potenz reaktive Epoxide zu bilden und ihre Verstoffwechslung durch mEHs ist maßgeblich für ihre Entgiftung.^{176,242} Bei unseren Untersuchungen zu der Häufigkeitsverteilung der verschiedenen mEH-Allele zeigte sich keine signifikante Korrelation mit der EAA. Erwähnenswert ist lediglich, dass bei der funktionellen Auswertung der sehr langsame mEH-Phenotyp bei EAA-Kindern mehr als doppelt so häufig vorkam als in der Kontrollgruppe. Bei einer multifaktoriellen Erkrankung wie der EAA ist es wahrscheinlich, dass multiple Gene eine Rolle spielen und die individuelle Empfänglichkeit von der Koinzidenz mehrerer Genpolymorphismen in ihrer Gesamtheit abhängt. Ein Polymorphismus von einigen Genen könnte somit einen Risikofaktor für die Entwicklung einer EAA darstellen. Nach unseren Daten ist der mEH-Polymorphismus jedoch kein Risikofaktor für die EAA. Auch nicht für die Untergruppe ohne Immunphänomen.

5.2.2.2. Polymorphismus der Glutathion S-Transferase

Die Enzymfamilie der Glutathion S-Transferasen spielt eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung, selten auch Aktivierung, einer Vielzahl von Xenobiotika (zyklische Kohlenwasserstoffe, Medikamente etc.).^{4,124,127} Kinder mit einem GSTT1-Nullgenotyp haben ein 2,8-fach erhöhtes Risiko eine EAA zu entwickeln. Somit ist der GSTT1-Nullgenotyp ein Risikofaktor für die EAA des Kindesalters. Keines der anderen untersuchten GST-Allele zeigte eine signifikante Assoziation mit der EAA im Kindesalter.

Das Gen für die GSTT1 ist auf Chromosom 22 lokalisiert.²⁷² Genetische Analysen haben einen GSTT1-Polymorphismus, resultierend aus einer Gendeletion, gezeigt.²⁰⁶ Es gibt eine große interethnische Variabilität für den genetischen Polymorphismus, mit einer Expressionsbreite der GSTT1-Nullgenfrequenz von 10% (Skandinavien) bis hin zu 60% (ostasiatische Populationen). Die GSTT1-Genfrequenz unserer Kontrollgruppe ist vergleichbar mit der anderer Studien bei Kaukasiern.^{31,104,245}

Tabelle 5.1. Epidemiologie des GSTT1-Nullgenotyps und der EAA

Population	GSTT1-Nullgenotyp (%)	EAA-Inzidenz (/10 ⁶)
Deutschland	19,3 ³⁶	3 ⁹⁷
Großbritannien	16 ²⁷¹	2,3 ⁴²
Skandinavien	10 ²⁷⁰	1,95 ⁴⁸
Japan	44,4 ¹¹⁶	11 ²⁴⁶
Korea	60,2 ¹⁹⁴	11 ²⁴⁶
China	61,2 ¹⁵¹	7,4 ²⁷⁸

Die GSTT1-Nullgenotypfrequenz verschiedener Populationen korreliert bemerkenswerterweise mit der EAA-Inzidenz bei der selben Population (siehe Tab.5.1). So ist die Nullgenotypfrequenz für GSTT1 in China mehr als dreimal so hoch wie in Europa²⁷⁶ und zugleich ist die Inzidenz für die EAA in China mit 7,4/10⁶ Einwohner²⁷⁸ im Vergleich zu Europa mit 2,2/10⁶ Einwohner¹¹⁸ mehr als dreimal so hoch. Ähnlich verhält es sich auch in anderen geographischen Regionen. Diese Koinzidenz unterstützt indirekt die von uns beschriebene Assoziation zwischen der EAA und dem GSTT1-Nullgenotyp. Der erhöhte GSTT1-Nullgenotyp in der Normalpopulation kann eine Erklärung für die erhöhte Inzidenz der EAA in diesen Regionen sein.

Pathophysiologisch gibt es verschiedene denkbare Modelle für den Zusammenhang zwischen der EAA und einem GSTT1-Nullgenotyp. Die GSTT1-Isoform unterliegt einer organspezifischen Expression. So findet sich eine hohe GSTT1- (aber nicht GSTM1-) Enzymaktivität besonders in Erythrozyten, Leukozyten und wahrscheinlich auch in hämatopoetischen Stammzellen.^{19,46,206,273} Des Weiteren haben zahlreiche funktionelle Untersuchungen gezeigt, dass der GSTT1-Phänotyp maßgeblich für die interindividuelle Variabilität bei der Glutathion-Konjugation mit Xenobiotika verantwortlich ist. Besonders bei humanen Blutzellen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem GSTT1-Polymorphismus und der Entgiftung von Mutagenen (O₂-Radikale, CKWs).^{74,122,230} Die interindividuellen Unterschiede sind so groß, dass Populationen in sogenannte Glutathion Konjugierer und Nichtkonjugierer unterteilt werden können.^{89,90,208,212,269}

Im Detail zeigten sich folgende funktionelle Besonderheiten: Der Metabolismus von Methylchlorid in humanen Erythrozyten zeigte eine trimodale Verteilung, welche das Resultat der drei verschiedenen GSTT1-Genpolymorphismen ist (homozygote

Deletion, heterozygote bzw. homozygote Genträger).^{88,208,270} Im peripheren Blut kommt es nach Inkubation mit genotoxischen Substanzen und bei Fehlen der GSTT1 vermehrt zu DNA-Strangbrüchen,^{99,100} wohingegen bei GSTM1-Polymorphismen keine Assoziation mit DNA-Veränderungen festzustellen ist.¹⁹⁷ Die Rate des Schwesterchromatin-Austausches bei Lymphozyten, welche ebenfalls eine interindividuelle Variabilität aufweist,¹¹⁹ war bei Personen mit einem GSTT1-Nullgenotyp im Vergleich zu Personen mit einem GSTT1-positiven Genotyp 16-fach erhöht.^{120,231} Dieser DNA-Austausch kann unter anderem durch Ethene und Ethylenoxide hervorgerufen werden. Die GSTT1 ist entscheidend an der Entgiftung solcher Stoffklassen beteiligt, die oxidativen Stress für die Zelle bedeuten.^{204,227,229,273} Der oxidative Stress führt nicht nur zum DNA-Austausch sondern begünstigt auch DNA-Punktmutationen. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass es in Abhängigkeit von der Aktivität von Biotransformationsenzymen wie auch GSTT1 vermehrt zu einer Mutation in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen (TP) kommen kann.^{28,30,82} Eines der potentesten Tumorsuppressorgene ist das Protein p53. Dabei können Mutationen im TP53-Gen zu einer Überexpression führen, wodurch die Zellteilung gehemmt oder sogar die Apoptose ausgelöst wird.³⁸ Es gibt Untersuchungen bei Tumoren (z.B. Ovarial-Ca, Zervix-Ca) bei denen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem GSTT1-Polymorphismus und TP53-Gen Mutationen gezeigt wurde.^{108,128,227} Zwar zeigten Untersuchungen bei EAA-Patienten vermehrt apoptotische Zellen in Knochenmarksbiopsien³⁹ und bei Progenitorzellen,²⁰⁹ jedoch zeigten Untersuchungen keine Assoziation zwischen dem TP53-Gen und der EAA bei Erwachsenen.^{40,67,132} Es wird aber durchaus diskutiert, dass bei der EAA Gegenspieler des p53 durch oxidativen Stress mutieren können. Dieses könnte zu einer funktionellen Überexpression vom Wildtyp p53 führen.²²⁷

Erste *in vitro* Versuche zeigten, dass es in Zellen unter oxidativem Stress zu einer transkriptionellen Aktivierung von Biotransformations- und Reparationsgenen kommt und zeitgleich über komplexe Redoxsignalkaskaden zu einer p53-Aktivierung und einer Dysregulation des Zellwachstums.⁵⁴

Die Mechanismen, welche zu einer manifesten EAA nach Chemikalien-/Medikamenten-Exposition führen, können neben den bereits beschriebenen Mechanismen auch eine Xenobiotika-immunvermittelte KM-Schädigung nach sich ziehen. Hierbei können z.B. Xenobiotika ebenfalls als Antigene wirken.^{56,77,202,211,260}

Es wäre durchaus denkbar, dass Xenobiotika durch das Nichtvorhandensein der GSTT1 langsamer abgebaut werden und nicht nur mehr Zeit haben direkt toxisch zu wirken, sondern auch vermehrt an Zellproteine binden könnten, wodurch der schädigende Effekt potenziert wäre. Xenobiotika fungieren hierbei wahrscheinlich nicht einfach als Haptene, sondern führen zu einem Toleranzverlust, indem sie an zelleigene Proteine binden. Diese Proteine werden dem Immunsystem präsentiert und fälschlicherweise als Fremdanigene eingestuft.^{281,286}

Unterstützt wird diese Theorie von einigen EAA-Fällen bei denen Antikörper gegen Medikamente nachweisbar waren.^{281,286} Ähnliche pathophysiologische Kreisläufe sind bereits für die Agranulozytose detailliert beschrieben.^{98,265} Diese Erkrankung geht mit einer partiellen Knochenmarksdestruktion einher und ist häufiger mit Medikamenten assoziiert als die EAA,^{51,253} Für die EAA sind die pathophysiologischen Vorgänge noch nicht so detailliert verstanden, da für die EAA noch kein Tiermodell vorhanden ist.

Alles in allem wird die bei dieser Studie festgestellte Assoziation *GSTT1-Nullgenotyp/EAA im Kindesalter* durch zahlreiche funktionelle und populationsgestützte Analysen untermauert. Obwohl bewiesen ist, dass Umweltnoxen eine EAA auslösen können,²⁸⁰ ist bei der Mehrzahl der Patienten ein solcher Auslöser nicht eruierbar.²⁸³ Der kausale Zusammenhang ist umso schwerer nachzuweisen, da der Beginn des Knochenmarksversagens nicht genau datierbar ist und die Latenzphase bis zur klinischen Manifestation der EAA nach der Xenobiotika-Exposition sehr variabel sein kann. Hierzu liefert der GSTT1-Polymorphismus einen möglichen Erklärungsansatz, weil Personen mit einem Enzymdefizit eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber KM-toxischen Substanzen haben können und bei diesen Individuen womöglich geringere Xenobiotika-Mengen ausreichen, um das KM zu schädigen und es somit je nach Enzymkonstellation früher oder später zu einer toxischen Akkumulation von Xenobiotika kommt.^{110,147,224,264}

6. Zusammenfassung

Die Ursachen für die erworbene aplastische Anämie (EAA) sind verschiedenartig (Medikamente, Chemikalien, Viren, ionisierende Strahlung, Schwangerschaft). Dabei ist die EAA durch eine Knochenmarks(KM)-Aplasie und eine Panzytopenie charakterisiert. Als wesentliche pathogenetische Faktoren für die KM-Aplasie werden immunologische und DNA-toxische Mechanismen diskutiert. Individuelle Unterschiede bei der Elimination KM-toxischer Substanzen (z.B.zyklischen Kohlenwasserstoffen) durch verminderte Expression von Biotransformations-Enzymen könnten zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber diesen Substanzen führen. Bei dieser Arbeit wurden immunologische Faktoren der KM-Schädigung im Kindesalter und die Rolle von Polymorphismen bei Biotransformationsenzymen untersucht.

In der Immunphänotypisierung zeigten sich mit 0% CD34+ bei 71% (n=126) der Patienten im KM bzw. 78% (n=27) im PB eine erniedrigte Anzahl pluripotenter Progenitorzellen. Anhand der CD34+-Zellen und der Anzahl aktivierte T-Zellen (CD25 auf CD3+) konnten vier immunologische Typen definiert werden (n=105). (Typ Ia) 57% - erniedrigte Progenitorinzidenz bei normaler Anzahl aktivierter T-Zellen. (Typ Ib) 12% - erniedrigte Progenitorinzidenz bei erhöhter T-Zellaktivierung. (Typ IIa) 10% - erhöhte Progenitorzellinzidenz und erhöhte T-Zellaktivierung. (Typ IIb) 6% - erhöhte Progenitorinzidenz bei normaler T-Zellaktivierung. (Typ III) 6% - normale Progenitorinzidenz bei erhöhter T-Zellaktivierung. (Typ IV) 9% - normale Progenitorinzidenz und normale T-Zellaktivierung. Weitere Untersuchungen ergaben keine erhöhten IFN- γ -Plasmawerte in KM oder PB von EAA-Patienten im Vergleich zu Normalpersonen. Die IL15-Plasmawerte waren bei 26% der EAA-Patienten stark erhöht. Dies korrelierte jeweils mit absolut und prozentual erniedrigten Progenitoren ($p<0,05$). Bei den IL10-Plasmawerte zeigten 10% der EAA-Patienten mit erhöhtem Spiegel eine Korrelation mit relativ erhöhten T-Zellen im KM ($p<0,05$). Bei der Einzel- oder Doppelstimulation mit anti-CD3 und IL2 unterschieden sich die Werte bei keinem der Zytokine signifikant von den Kontrollgruppenwerten. Bei den Analysen der Enzym polymorphismen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der EAA und einem mEH-Polymorphismus. Bei den GST-Analysen zeigte sich bei Kindern mit EAA ein signifikant erhöhter GSTT1-Nullgenotyp im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p<0,05$; OR=2,8).

Das heterogene immunologische Profil der pädiatrischen EAA-Patienten deutet daraufhin, dass möglicherweise sowohl TH1- als auch TH2-Zellpopulationen eine pathogenetische Rolle bei der EAA spielen. Dies würde bedeuten, dass in einigen Fällen die humorale und in anderen die zelluläre Immunantwort eine dominierende Rolle spielt. Bei den genetischen Analysen zeigte sich, dass der GSTT1-Nullgenotyp einen signifikanten Risikofaktor für die EAA des Kindesalters darstellt. Kinder mit einem GSTT1-Nullgenotyp haben somit ein 2,8-fach erhöhtes Risiko eine EAA zu entwickeln. Die Pathogenese der EAA ist komplex und kann weder durch einzelne Zytokin-/ Zellanalysen noch durch die Variabilität einzelner Allele erklärt werden, nicht zuletzt weil sowohl die Immunregulation als auch die Biotransformation von Xenobiotika jeweils komplexen Regelkreisläufen unterliegen. In ihrer Gesamtheit soll diese Studie einen weiteren Beitrag zum „Pathogenese-Puzzle“ der erworbenen aplastischen Anämie leisten.

1. Abbas, Z, I Malik ,A Khan: Sequential induction of aplastic anemia and acute leukemia by chloramphenicol. *JPMA* 1993; 43:58-59.
2. Aksoy, M, S Erdem, G Dincol, I Bakioglu ,A Kutlar: Aplastic anemia due to chemicals and drugs: a study of 108 patients. *Sex Transm Dis* 1984; 11:347-350.
3. Anderson, DM, S Kumaki, M Ahdieh, et al.: Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995; 270:29862-29869.
4. Andersson, C, E Mosialou, R Weinander ,R Morgenstern: Enzymology of microsomal glutathione S-transferase. *Adv Pharmacol* 1994; 27:19-35.
5. Aoki, I, K Higashi, M Homori, H Chikazawa ,K Ishikawa: Responsiveness of bone marrow erythropoietic stem cells (CFU-E and BFU-E) to recombinant human erythropoietin (rh-Ep) in vitro in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol* 1990; 35:6-12.
6. Armstrong, RN: Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 1997; 10:2-18.
7. Asano, Y, S Shibata, S Kobayashi, S Okamura ,Y Niho: Effect of interleukin 10 on the hematopoietic progenitor cells from patients with aplastic anemia. *Stem Cells* 1999; 17:147-151.
8. Awasthi, YC, R Sharma ,SS Singhal: Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem* 1994; 26:295-308.
9. Bacigalupo, A, G Broccia, G Corda, et al.: Antilymphocyte globulin, cyclosporin, and granulocyte colony-stimulating factor in patients with acquired severe aplastic anemia (SAA): a pilot study of the EBMT SAA Working Party. *Blood* 1995; 85:1348-1353.
10. Bacigalupo, A, O Figari, J Tong, et al.: Long-term marrow culture in patients with aplastic anemia compared with marrow transplant recipients and normal controls. *Exp Hematol* 1992; 20:425-430.
11. Bacigalupo, A, R Oneto, B Bruno, et al.: Current results of bone marrow transplantation in patients with acquired severe aplastic anemia. Report of the European Group for Blood and Marrow transplantation. On behalf of the Working Party on Severe Aplastic Anemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Acta Haematol* 2000; 103:19-25.
12. Bacigalupo, A, G Piaggio, O Figari, et al.: Response of CFU-GM to increasing doses of rhGM-CSF in patients with aplastic anemia. *Exp Hematol* 1991; 19:829-832.
13. Bacigalupo, A, M Podesta, F Frassoni, et al.: Generation of CFU-C suppressor T cells in vitro. V. A multistep process. *Br J Haematol* 1982; 52:421-427.
14. Bagnara, GP, P Strippoli, L Bonsi, et al.: Effect of stem cell factor on colony growth from acquired and constitutional (Fanconi) aplastic anemia. *Blood* 1992; 80:382-387.
15. Bain BJ, HD: Roche Grundkurs Hämatologische Morphologie. Berlin: Blackwell Science, 1997:328.
16. Baumelou, E, M Guiguet ,JY Mary: Epidemiology of aplastic anemia in France: a case-control study. I. Medical history and medication use. The French Cooperative Group for Epidemiological Study of Aplastic Anemia. *Blood* 1993; 81:1471-1478.
17. Beetham, JK, D Grant, M Arand, et al.: Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 1995; 14:61-71.

18. Bell, DA, JA Taylor, DF Paulson, CN Robertson, JL Mohler ,GW Lucier: Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1159-1164.
19. Bernardini, S, K Pelin, K Peltonen, et al.: Induction of sister chromatid exchange by 3,4-epoxybutane-1,2-diol in cultured human lymphocytes of different GSTT1 and GSTM1 genotypes [published erratum appears in *Mutat Res* 1997 Apr 24;390(1-2):199]. *Mutat Res* 1996; 361:121-127.
20. Besamusca, FW ,LA Bastiaensen: Blood dyscrasias and topically applied chloramphenicol in ophthalmology. *Doc Ophthalmol* 1986; 64:87-95.
21. Bhagwat, SV, J Mullick, NG Avadhani ,H Raza: Differential response of cytosolic, microsomal, and mitochondrial glutathione S-transferases to xenobiotic inducers. *Int J Oncol* 1998; 13:281-288.
22. Board, P, M Coggan, P Johnston, V Ross, T Suzuki ,G Webb: Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; 48:357-369.
23. Bolton, MG, A Munoz, LP Jacobson, et al.: Transient intervention with oltipraz protects against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Res* 1993; 53:3499-3504.
24. Borden, E: Interferons: Pleiotropic cellular modulators. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992; 62:S18-S24.
25. Bottiger, LE ,B Bottiger: Incidence and cause of aplastic anemia, hemolytic anemia, agranulocytosis and thrombocytopenia. *Acta Med Scand* 1981; 210:475-479.
26. Boyum, A: Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97:9-29.
27. Bridges, JW: The role of the drug-metabolizing enzymes. *Ciba Found Symp* 1980; 76:5-24.
28. Bringuier, PP, M McCredie, G Sauter, et al.: Carcinomas of the renal pelvis associated with smoking and phenacetin abuse: p53 mutations and polymorphism of carcinogen-metabolising enzymes. *Int J Cancer* 1998; 79:531-536.
29. Brockmoller, J, I Cascorbi, R Kerb, C Sachse ,I Roots: Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol Lett* 1998; 102-103:173-183.
30. Brockmoller, J, R Kaiser, R Kerb, I Cascorbi, V Jaeger ,I Roots: Polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism as modulators of acquired P53 mutations in bladder cancer. *Pharmacogenetics* 1996; 6:535-545.
31. Brockmoller, J, R Kerb, N Drakoulis, M Nitz ,I Roots: Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. *Cancer Res* 1993; 53:1004-1011.
32. Brod, SA, LD Nelson, M Khan ,JS Wolinsky: Increased in vitro induced CD4+ and CD8+ T cell IFN-gamma and CD4+ T cell IL-10 production in stable relapsing multiple sclerosis. *Int J Neurosci* 1997; 90:187-202.
33. Brodie, MJ ,JM Pellock: Taming the brain storms: felbamate updated. *Lancet* 1995; 346:918-919.

34. Brodsky, RA, LL Sensenbrenner ,RJ Jones: Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87:491-494.
35. Brown, KE, J Tisdale, AJ Barrett, CE Dunbar ,NS Young: Hepatitis-associated aplastic anemia [see comments]. *N Engl J Med* 1997; 336:1059-1064.
36. Bruhn, C, J Brockmoller, R Kerb, I Roots ,HH Borchert: Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). *Biochem Pharmacol* 1998; 56:1189-1193.
37. Burdach, S, R Vohringer, D Dilloo, K Krauth, H Hanenberg ,U Gobel: [Experimental principles of therapy-oriented pathogenetic classification of aplastic anemia in childhood]. *Klin Padiatr* 1994; 206:201-207.
38. Caelles, C, A Helmberg ,M Karin: p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994; 370:220-223.
39. Callera, F ,RP Falcao: Increased apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1997; 98:18-20.
40. Callera, F, AB Garcia ,RP Falcao: Fas-mediated apoptosis with normal expression of bcl-2 and p53 in lymphocytes from aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1998; 100:698-703.
41. Carson, WE, JG Giri, MJ Lindemann, et al.: Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; 180:1395-1403.
42. Cartwright, RA, PA McKinney, L Williams, et al.: Aplastic anaemia incidence in parts of the United Kingdom in 1985. *Leuk Res* 1988; 12:459-463.
43. Champlin, R: Bone marrow aplasia due to radiation accidents: pathophysiology, assessment and treatment. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2:69-82.
44. Champlin, R, W Ho ,RP Gale: Antithymocyte globulin treatment in patients with aplastic anemia: a prospective randomized trial. *N Engl J Med* 1983; 308:113-118.
45. Chen, CL, Q Liu, CH Pui, et al.: Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 89:1701-1707.
46. Chen, H, DP Sandler, JA Taylor, et al.: Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect [see comments]. *Lancet* 1996; 347:295-297.
47. Chitambar, CR, WA Robinson ,LM Glode: Familial leukemia and aplastic anemia associated with monosomy 7. *Am J Med* 1983; 75:756-762.
48. Clausen, N, A Kreuger, T Salmi, I Storm-Mathisen ,G Johannesson: Severe aplastic anaemia in the Nordic countries: a population based study of incidence, presentation, course, and outcome. *Arch Dis Child* 1996; 74:319-322.
49. Coles, B ,B Ketterer: The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990; 25:47-70.
50. Conney, AH, EC Miller ,JA Miller: The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res* 1956; 16:450-459.
51. Corzo, D, JJ Yunis, M Salazar, et al.: The major histocompatibility complex region marked by HSP70-1 and HSP70-2 variants is associated with clozapine-induced agranulocytosis in two different ethnic groups. *Blood* 1995; 86:3835-3840.

52. Cova, D, A Arnoldi ,L Rossini: Pyrethroid metabolism: studies on cis- and trans-phenothrins, and related epoxide intermediates. *Arch Toxicol Suppl* 1986; 9:329-332.
53. Cranendonk, E, AH van Gennip, NG Abeling, H Behrendt ,AA Hart: Reference values for automated cytochemical differential count of leukocytes in children 0-16 years old: comparison with manually obtained counts from Wright-stained smears. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:663-667.
54. Crosby, LM, KS Hyder, AB DeAngelo, et al.: Morphologic analysis correlates with gene expression changes in cultured F344 rat mesothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 169:205-221.
55. Daniel, V: Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; 28:173-207.
56. Das, UN: Agranulocytosis, aplastic anemia, and leukemia: relevance to arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990; 39:217-220.
57. De Maeyer, E ,J De Maeyer-Guignard: Interferon-gamma. *Curr Opin Immunol* 1992; 4:321-326.
58. De Souza, MH, AR Pires ,HR Diamond: Study of lymphocyte populations and natural killer activity in severe aplastic anaemia. *J Clin Lab Immunol* 1989; 30:111-116.
59. de Waal Malefyt, R, H Yssel, MG Roncarolo, H Spits ,JE de Vries: Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 1992; 4:314-320.
60. Delves, PJ ,IM Roitt: The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:108-117.
61. DeMaeyer, E ,J DeMaeyer-Guignard: Interferons and other regulatory cytokines. New York: J. Wiley, 1988.
62. Dessypris, EN: Aplastic anemia and pure red cell aplasia. *Curr Opin Hematol* 1994; 1:157-161.
63. Digweed, M: [Molecular basis of Fanconi's anemia]. *Klin Padiatr* 1999; 211:192-197.
64. Dirksen, U, K Asadi-Moghaddam, M Fuhrer ,S Burdach: Defunct hematopoietic progenitor growth and heterogeneous immunological phenotypes in acquired aplastic anemia of childhood: identification of subsets with decreased hematopoietic progenitors and increased IL15 or IL10 production. *Klin Padiatr* 1998; 210:167-172.
65. Ehrlich, P: Über einen Fall von Anämie mit Bemerkungen über regenerative Veränderungen des Knochenmarks. *Charité-Annalen* 1888; 13:300-309.
66. Elexpuru-Camiruaga, J, N Buxton, V Kandula, et al.: Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 1995; 55:4237-4239.
67. Elghetany, MT, S Vyas ,G Yuoh: Significance of p53 overexpression in bone marrow biopsies from patients with bone marrow failure: aplastic anemia, hypocellular refractory anemia, and hypercellular refractory anemia. *Ann Hematol* 1998; 77:261-264.
68. Fan, LH, YJ Zhou ,LF Wang: [Study on T-lymphocyte culture and function of T-lymphocyte subsets in patients with aplastic anemia]. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* 1991; 30:273-275, 316-277.

69. Fandrich, F, B Degiuli, U Vogel-Bindel, M Arand ,F Oesch: Induction of rat liver microsomal epoxide hydrolase by its endogenous substrate 16 alpha, 17 alpha-epoxyestra-1,3,5-trien-3-ol. *Xenobiotica* 1995; 25:239-244.
70. Farrar, MA ,RD Schreiber: The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:571-611.
71. Farrell, GC: Drug metabolism in extrahepatic diseases. *Pharmacol Ther* 1987; 35:375-404.
72. Fiorentino, DF, A Zlotnik, P Vieira, et al.: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146:3444-3451.
73. Fleming, LE ,W Timmeny: Aplastic anemia and pesticides. An etiologic association? [see comments]. *J Occup Med* 1993; 35:1106-1116.
74. Fost, U, M Tornqvist, M Leutbecher, F Granath, E Hallier ,L Ehrenberg: Effects of variation in detoxification rate on dose monitoring through adducts. *Hum Exp Toxicol* 1995; 14:201-203.
75. Frickhofen, N, JP Kaltwasser, H Schrezenmeier, et al.: Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. The German Aplastic Anemia Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 1991; 324:1297-1304.
76. Frickhofen, N, JM Liu ,NS Young: Etiologic mechanisms of hematopoietic failure. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:385-395.
77. Furst, SM ,JP Utrecht: The effect of carbamazepine and its reactive metabolite, 9-acridine carboxaldehyde, on immune cell function in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17:445-452.
78. Gaedigk, A, SP Spielberg ,DM Grant: Characterization of the microsomal epoxide hydrolase gene in patients with anticonvulsant adverse drug reactions. *Pharmacogenetics* 1994; 4:142-153.
79. Gerson, WT, DG Fine, SP Spielberg ,LL Sensenbrenner: Anticonvulsant-induced aplastic anemia: increased susceptibility to toxic drug metabolites in vitro. *Blood* 1983; 61:889-893.
80. Gibson, J, EE McGirr, J York ,H Kronenberg: Aplastic anemia in association with gold therapy for rheumatoid arthritis. *Aust N Z J Med* 1983; 13:130-134.
81. Giri, JG, M Ahdieh, J Eisenman, et al.: Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 1994; 13:2822-2830.
82. Gudmundsdottir, K, L Tryggvadottir ,JE Eyfjord: GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1169-1173.
83. Guengerich, FP: Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1988; 48:2946-2954.
84. Guengerich, FP ,NK Davidson: Interaction of epoxide hydrolase with itself and other microsomal proteins. *Arch Biochem Biophys* 1982; 215:462-477.
85. Guengerich, FP, WW Johnson, YF Ueng, H Yamazaki ,T Shimada: Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 3:557-562.
86. Guengerich, FP ,T Shimada: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991; 4:391-407.
87. Guengerich, FP, T Shimada, KD Raney, et al.: Elucidation of catalytic specificities of human cytochrome P450 and glutathione S-transferase enzymes

- and relevance to molecular epidemiology. *Environ Health Perspect* 1992; 98:75-80.
88. Hallier, E, R Jager, S Deutschmann, HM Bolt ,H Peter: Glutathione conjugation and cytochrome P-450 metabolism of methyl chloride in vitro. *Toxicol. in Vitro* 1990; 4:513-517.
 89. Hallier, E, T Langhof, D Dannappel, et al.: Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Arch Toxicol* 1993; 67:173-178.
 90. Hallier, E, KR Schroder, K Asmuth, A Dommermuth, B Aust ,HW Goergens: Metabolism of dichloromethane (methylene chloride) to formaldehyde in human erythrocytes: influence of polymorphism of glutathione transferase theta (GST T1-1). *Arch Toxicol* 1994; 68:423-427.
 91. Hanada, T, H Yamamura, T Ehara, et al.: No evidence for gamma-interferon mediated haematopoietic inhibition by T cells in aplastic anaemia: an observation in the course of immunosuppressive therapy. *Br J Haematol* 1987; 67:123-127.
 92. Hand, PA, A Inskip, J Gilford, et al.: Allelism at the glutathione S-transferase GSTM3 locus: interactions with GSTM1 and GSTT1 as risk factors for astrocytoma. *Carcinogenesis* 1996; 17:1919-1922.
 93. Hassett, C, L Aicher, JS Sidhu ,CJ Omiecinski: Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1994 Jul;3(7):1214]. *Hum Mol Genet* 1994; 3:421-428.
 94. Hassett, C, KB Robinson, NB Beck ,CJ Omiecinski: The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics* 1994; 23:433-442.
 95. Hayes, JD ,DJ Pulford: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30:445-600.
 96. Heagerty, AH, D Fitzgerald, A Smith, et al.: Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumours. *Lancet* 1994; 343:266-268.
 97. Heimpel, H: Aplastische Anämie. In: Gerok, W, C Huber, T Meinertz ,H Zeidler, eds. *Die Innere Medizin*. Stuttgart; New York: Schattauer, 2000:170-172.
 98. Heit, WF: Hematologic effects of antipyretic analgesics. Drug-induced agranulocytosis. *Am J Med* 1983; 75:65-69.
 99. Hengstler, JG, M Arand, ME Herrero ,F Oesch: Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154:47-85.
 100. Hengstler, JG, J Fuchs ,F Oesch: DNA strand breaks and DNA cross-links in peripheral mononuclear blood cells of ovarian cancer patients during chemotherapy with cyclophosphamide/carboplatin. *Cancer Res* 1992; 52:5622-5626.

101. Hietanen, E, K Husgafvel-Pursiainen ,H Vainio: Interaction between dose and susceptibility to environmental cancer: a short review. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 4:749-754.
102. Hinson, JA ,PG Forkert: Phase II enzymes and bioactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73:1407-1413.
103. Hirvonen, A: Combinations of susceptible genotypes and individual responses to toxicants. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 4:755-758.
104. Hirvonen, A, K Husgafvel-Pursiainen, S Anttila ,H Vainio: The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 1993; 14:1479-1481.
105. Hodgson, E, AP Kulkarni, DL Fabacher ,KM Robacker: Induction of hepatic drug metabolizing enzymes in mammals by pesticides: A review. *J Environ Sci Health [B]* 1980; 15:723-754.
106. Horowitz, MM: Current status of allogeneic bone marrow transplantation in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000; 37:30-42.
107. Howard, M, A O'Garra, H Ishida, R de Waal Malefyt ,J de Vries: Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992; 12:239-247.
108. Howells, RE, CW Redman, KK Dhar, et al.: Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes with clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2439-2445.
109. Hsieh, DP: Biological reactive intermediates of mycotoxins. *Adv Exp Med Biol* 1986; 197:597-610.
110. Hurst, R, Y Bao, P Jemth, B Mannervik ,G Williamson: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem J* 1998; 332:97-100.
111. Ito, N, H Tsuda, M Tatematsu, et al.: Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats--an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* 1988; 9:387-394.
112. Joffe, RT, RM Post, PP Roy-Byrne ,TW Uhde: Hematological effects of carbamazepine in patients with affective illness. *Am J Psychiatry* 1985; 142:1196-1199.
113. Kagan, WA, JA Ascensao, RN Pahwa, et al.: Aplastic anemia: presence in human bone marrow of cells that suppress myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:2890-2894.
114. Kalf, GF ,A O'Connor: The effects of benzene and hydroquinone on myeloid differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1993; 11:331-338.
115. Kanegane, H ,G Tosato: Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* 1996; 88:230-235.
116. Katoh, T, N Nagata, Y Kuroda, et al.: Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1996; 17:1855-1859.
117. Kaufman, DW, JP Kelly, JM Jurgelon, et al.: Drugs in the aetiology of agranulocytosis and aplastic anaemia. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 60:23-30.
118. Kelly, JP, DW Kaufman ,S Shapiro: Risks of agranulocytosis and aplastic anemia in relation to the use of cardiovascular drugs: The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49:330-341.

119. Kelsey, KT, DC Christiani ,JK Wiencke: Bimodal distribution of sensitivity to SCE induction by diepoxybutane in human lymphocytes. II. Relationship to baseline SCE frequency. *Mutat. Res.* 1991; 248:27.
120. Kelsey, KT, JK Wiencke, J Ward, W Bechtold ,J Fajen: Sister-chromatid exchanges, glutathione S-transferase theta deletion and cytogenetic sensitivity to diepoxybutane in lymphocytes from butadiene monomer production workers. *Mutat Res* 1995; 335:267-273.
121. Kempkes, M, K Golka, S Reich, T Reckwitz ,HM Bolt: Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder. *Arch Toxicol* 1996; 71:123-126.
122. Kempkes, M, FA Wiebel, K Golka, P Heitmann ,HM Bolt: Comparative genotyping and phenotyping of glutathione S-transferase GSTT1. *Arch Toxicol* 1996; 70:306-309.
123. Kennedy, MK ,LS Park: Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *J Clin Immunol* 1996; 16:134-143.
124. Ketterer, B: Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 1986; 16:957-973.
125. Ketterer, B: Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radic Res* 1998; 28:647-658.
126. Ketterer, B: Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; 202:343-361.
127. Ketterer, B ,LG Christodoulides: Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Adv Pharmacol* 1994; 27:37-69.
128. Kim, JW, CG Lee, YG Park, et al.: Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. *Cancer* 2000; 88:2082-2091.
129. Kim, SG ,MK Cho: Expression of glutathione S-transferases Ya, Yb1, Yb2, Yc1 and Yc2 and microsomal epoxide hydrolase genes by thiazole, benzothiazole and benzothiadiazole. *Biochem Pharmacol* 1996; 52:1831-1841.
130. Kim, SG, MK Cho, SH Choi, HJ Kim, MK Kwak ,ND Kim: Molecular basis for hepatic detoxifying enzyme induction by 2-(allylthio)pyrazine in rats in comparison with oltipraz: effects on prooxidant production and DNA degradation. *Drug Metab Dispos* 1999; 27:667-673.
131. Kim, SG, HJ Kim ,CH Yang: Thioureas differentially induce rat hepatic microsomal epoxide hydrolase and rGSTA2 irrespective of their oxygen radical scavenging effect: effects on toxicant-induced liver injury. *Chem Biol Interact* 1999; 117:117-134.
132. Kitagawa, M, S Yoshida, T Kuwata, T Tanizawa ,R Kamiyama: p53 expression in myeloid cells of myelodysplastic syndromes. Association with evolution of overt leukemia. *Am J Pathol* 1994; 145:338-344.
133. Klaassen, CD: Biliary excretion of xenobiotics. *CRC Crit Rev Toxicol* 1975; 4:1-30.
134. Koijima, S: Hematopoietic growth factors and marrow stroma in aplastic anemia. *Int J Hematol* 1998; 68:19-28.
135. Koller, U, W Hinterberger, L Gschwandtler, R Grumayer, O Majdic ,W Knapp: Identification of activated T cells and the suppressor/inducer subset in patients suffering from severe aplastic anemia. *Blut* 1989; 58:21-26.
136. Kono, T, Y Minami ,T Taniguchi: The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the beta-chain. *Semin Immunol* 1993; 5:299-307.

137. Korholz, D, U Banning, H Bonig, et al.: The role of interleukin-10 (IL-10) in IL-15-mediated T-cell responses. *Blood* 1997; 90:4513-4521.
138. Kovacs, E, C Nissen, B Speck, E Signer: Repair of UV-induced DNA damage in aplastic anaemia: changes after treatment with antilymphocyte globulin (ALG). *Eur J Haematol* 1988; 40:430-436.
139. Krishna, DR, U Klotz: Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 1994; 26:144-160.
140. Kumaki, N, DM Anderson, D Cosman, S Kumaki: Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 1996; 15:876-882.
141. Kumaki, S, R Armitage, M Ahdieh, L Park, D Cosman: Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells. *Eur J Immunol* 1996; 26:1235-1239.
142. Kumana, CR, KY Li, PY Chau: Worldwide variation in chloramphenicol utilization: should it cause concern? *J Clin Pharmacol* 1988; 28:1071-1075.
143. Kumana, CR, KY Li, M Kou: Do chloramphenicol blood dyscrasias occur in Hong Kong? *Adverse Drug React Toxicol Rev* 1993; 12:97-106.
144. Kumar, A, WD Creery: The therapeutic potential of interleukin 10 in infection and inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; 48:529-538.
145. Lafarge-Frayssinet, C, S Robbana-Barnat, C Frayssinet, L Toucas, F Decloitre: Cytotoxicity and DNA damaging potency of chloramphenicol and six metabolites: a new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. *Mutat Res* 1994; 320:207-215.
146. Lafuente, A, F Pujol, P Carretero, JP Villa, A Cuchi: Human glutathione S-transferase mu (GST mu) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett* 1993; 68:49-54.
147. Lakehal, F, D Wendum, V Barbu, et al.: Phase I and phase II drug-metabolizing enzymes are expressed and heterogeneously distributed in the biliary epithelium. *Hepatology* 1999; 30:1498-1506.
148. Laporte, JR, X Vidal, E Ballarin, L Ibanez: Possible association between ocular chloramphenicol and aplastic anaemia--the absolute risk is very low. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46:181-184.
149. Lappin, MB, JD Campbell: The Th1-Th2 classification of cellular immune responses: concepts, current thinking and applications in haematological malignancy. *Blood Rev* 2000; 14:228-239.
150. Lauren, DJ, PP Halarnkar, BD Hammcock, DE Hinton: Microsomal and cytosolic epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities in the gill, liver, and kidney of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Baseline levels and optimization of assay conditions. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:881-887.
151. Lee, EJ, JY Wong, PN Yeoh, NH Gong: Glutathione S transferase-theta (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics* 1995; 5:332-334.
152. Leonard, EM, E Raefsky, P Griffith, J Kimball, AW Nienhuis, NS Young: Cyclosporine therapy of aplastic anaemia, congenital and acquired red cell aplasia [see comments]. *Br J Haematol* 1989; 72:278-284.
153. Lewis, CN, LE Putnam, FD Hendricks, I Kelan, H Welch: Chloramphenicol (choromycetin) in relation to blood dyscrasias with observations on other drugs: a special study. *Antibiotic Chemother.* 1952; 2:601-609.

154. Lundgren, B ,JW DePierre: The metabolism of xenobiotics and its relationship to toxicity/genotoxicity: studies with human lymphocytes. *Acta Physiol Scand Suppl* 1990; 592:49-59.
155. Maciejewski, JP, S Anderson, P Katevas ,NS Young: Phenotypic and functional analysis of bone marrow progenitor cell compartment in bone marrow failure. *Br J Haematol* 1994; 87:227-234.
156. Maciejewski, JP, JR Hibbs, S Anderson, P Katevas ,NS Young: Bone marrow and peripheral blood lymphocyte phenotype in patients with bone marrow failure. *Exp Hematol* 1994; 22:1102-1110.
157. Maciejewski, JP, C Selleri, T Sato, S Anderson ,NS Young: Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1995; 91:245-252.
158. Maciejewski, JP, C Selleri, T Sato, S Anderson ,NS Young: A severe and consistent deficit in marrow and circulating primitive hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in acquired aplastic anemia. *Blood* 1996; 88:1983-1991.
159. Malkin, D, G Koren ,EF Saunders: Drug-induced aplastic anemia: pathogenesis and clinical aspects. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:402-410.
160. Mannervik, B, YC Awasthi, PG Board, et al.: Nomenclature for human glutathione transferases [letter]. *Biochem J* 1992; 282:305-306.
161. Mannervik, B ,UH Danielson: Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 1988; 23:283-337.
162. Marcus, WL: Chemical of current interest--benzene. *Toxicol Ind Health* 1987; 3:205-266.
163. Marie, JP, G Simonin, O Legrand, et al.: Glutathione-S-transferases pi, alpha, mu and mdr1 mRNA expression in normal lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1995; 9:1742-1747.
164. Marmont, AM, A Bacigalupo, MT Van Lint, et al.: Treatment of severe aplastic anemia with high-dose methylprednisolone and antilymphocyte globulin. *Prog Clin Biol Res* 1984; 148:271-287.
165. Marsh, JC, J Chang, NG Testa, JM Hows ,TM Dexter: The hematopoietic defect in aplastic anemia assessed by long-term marrow culture. *Blood* 1990; 76:1748-1757.
166. Marsh, JC, J Chang, NG Testa, JM Hows ,TM Dexter: In vitro assessment of marrow 'stem cell' and stromal cell function in aplastic anaemia [see comments]. *Br J Haematol* 1991; 78:258-267.
167. Marsh, JC, J Chang, NG Testa, JM Hows ,TM Dexter: Purification of aplastic anaemia (AA) marrow haemopoietic progenitors combined with long-term marrow cultures (LTMC) to assess haemopoiesis in AA. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7:98.
168. Mary, JY, M Guiguet ,E Baumelou: Drug use and aplastic anaemia: the French experience. French Cooperative Group for the Epidemiological Study of Aplastic Anaemia. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 60:35-41.
169. Mathe, G, JL Amiel, L Schwarzenberg, et al.: Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum. *Br Med J* 1970; 2:131-136.
170. Mentzel, U, H Vogt, R Rossol, et al.: Analysis of lymphocyte subsets in patients with aplastic anemia before and during immunosuppressive therapy. *Ann Hematol* 1993; 66:127-129.

171. Meyer, UA ,UM Zanger: Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-296.
172. Meyer, W: [Side effects of gold therapy]. *Acta Med Austriaca* 1975; 2:122-125.
173. Miura, A, K Endo, T Sugawara, et al.: T cell-mediated inhibition of erythropoiesis in aplastic anaemia: the possible role of IFN-gamma and TNF-alpha. *Br J Haematol* 1991; 78:442-449.
174. Miura, K, K Morimoto ,A Koizumi: Proliferative kinetics and mitomycin C-induced chromosome damage in Fanconi's anemia lymphocytes. *Hum Genet* 1983; 63:19-23.
175. Mizoguchi, H, Y Miura, S Chiyoda ,F Takaku: Myeloid stem cells in various hemopoietic disorders. pp. 199-207. In: Nakao K, et al., ed. *Erythropoiesis*. Baltimore, Univ Park Press, 1975.
176. Moody, DE, KA Montgomery, MB Ashour ,BD Hammock: Effects of environmentally encountered epoxides on mouse liver epoxide-metabolizing enzymes. *Biochem Pharmacol* 1991; 41:1625-1637.
177. Moorthy, B ,K Randerath: Pentachlorophenol enhances 9-hydroxybenzo [a] pyrene-induced hepatic DNA adduct formation in vivo and inhibits microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities in vitro: likely inhibition of epoxide detoxication by pentachlorophenol. *Arch Toxicol* 1996; 70:696-703.
178. Morikawa, K, A Nakano, F Oseko ,S Morikawa: High cytotoxic cell activity in the marrow from patients with aplastic anemia. *Jpn J Med* 1989; 28:585-592.
179. Morrow, CS, ME Goldsmith ,KH Cowan: Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription: influence of 5'-flanking sequences and transactivating factors which recognize AP-1-binding sites. *Gene* 1990; 88:215-225.
180. Moscow, JA, CR Fairchild, MJ Madden, et al.: Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res* 1989; 49:1422-1428.
181. Mosmann, TR: Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol Res* 1991; 10:183-188.
182. Mosmann, TR: Regulation of immune responses by T cells with different cytokine secretion phenotypes: role of a new cytokine, cytokine synthesis inhibitory factor (IL10). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94:110-115.
183. Mosmann, TR: Role of a new cytokine, interleukin-10, in the cross-regulation of T helper cells. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 628:337-344.
184. Mosmann, TR ,KW Moore: The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991; 12:A49-53.
185. Mosmann, TR ,S Sad: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17:138-146.
186. Mueller, GC ,JA Miller: The metabolism of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver homogenates. *J Biol Chem* 1948; 176:535-544.
187. Nagafuji, K, T Shibuya, M Harada, et al.: Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86:883-889.
188. Nagao, T ,AM Mauer: Concordance for drug-induced aplastic anemia in identical twins. *N Engl J Med* 1969; 281:7-11.
189. Nakao, S: Immune mechanism of aplastic anemia. *Int J Hematol* 1997; 66:127-134.

190. Nakao, S, M Yamaguchi, S Shiobara, et al.: Interferon-gamma gene expression in unstimulated bone marrow mononuclear cells predicts a good response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. *Blood* 1992; 79:2532-2535.
191. Nathan DG, OS, Lampert R: Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia: Saunders WB, 1997:2096.
192. Nebert, DW: Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? [editorial; comment]. *Am J Hum Genet* 1997; 60:265-271.
193. Nebert, DW, RA McKinnon ,A Puga: Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15:273-280.
194. Nelson, HH, JK Wiencke, DC Christiani, et al.: Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 16:1243-1245.
195. Nicholl, D, O Windl, R de Silva, et al.: Inherited Creutzfeldt-Jakob disease in a British family associated with a novel 144 base pair insertion of the prion protein gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 58:65-69.
196. Nistico, A ,NS Young: gamma-Interferon gene expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. *Ann Intern Med* 1994; 120:463-469.
197. Norppa, H, A Hirvonen, H Jarventaus, et al.: Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1995; 16:1261-1264.
198. Novitzky, N ,P Jacobs: Immunosuppressive therapy in bone marrow aplasia: the stroma functions normally to support hematopoiesis. *Exp Hematol* 1995; 23:1472-1477.
199. Omiecinski, CJ, L Aicher, R Holubkov ,H Checkoway: Human peripheral lymphocytes as indicators of microsomal epoxide hydrolase activity in liver and lung. *Pharmacogenetics* 1993; 3:150-158.
200. Oyewumi, LK: Acquired aplastic anemia secondary to perphenazine. *Can J Clin Pharmacol* 1999; 6:169-171.
201. Papadopoulos, D, J Seidegard, A Georgellis ,J Rydstrom: Subcellular distribution, catalytic properties and partial purification of epoxide hydrolase in the human adrenal gland. *Chem Biol Interact* 1985; 55:249-260.
202. Patton, WN ,SB Duffull: Idiosyncratic drug-induced haematological abnormalities. Incidence, pathogenesis, management and avoidance. *Drug Saf* 1994; 11:445-462.
203. Pearson, PG, EJ Soderlund, E Dybing ,SD Nelson: Metabolic activation of 1,2-dibromo-3-chloropropane: evidence for the formation of reactive episulfonium ion intermediates. *Biochemistry* 1990; 29:4971-4981.
204. Pelin, K, A Hirvonen ,H Norppa: Influence of erythrocyte glutathione S-transferase T1 on sister chromatid exchanges induced by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1996; 11:213-215.
205. Pellock, JM: Carbamazepine side effects in children and adults. *Epilepsia* 1987; 28:S64-70.
206. Pemble, S, KR Schroeder, SR Spencer, et al.: Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300:271-276.

207. Pemble, SE, AF Wardle, JB Taylor: Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J* 1996; 319:749-754.
208. Peter, H, S Deutschmann, A Muelle, B Gansewendt, M Bolt, E Hallier: Different affinity of erythrocyte glutathione-S-transferase to methyl chloride in humans. *Arch Toxicol Suppl* 1989; 13:128-132.
209. Philpott, NJ, J Scopes, JC Marsh, EC Gordon-Smith, FM Gibson: Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp Hematol* 1995; 23:1642-1648.
210. Pickett, CB, Lu, A. Y. H.: The structure, genetics and regulation of soluble glutathione-S-transferases. *Glutathione Conjugation*. San Diego: Academic Press, 1988:137-156.
211. Pisciotta, AV: Drug-induced agranulocytosis. Peripheral destruction of polymorphonuclear leukocytes and their marrow precursors. *Blood Rev* 1990; 4:226-237.
212. Ploemen, JH, LW Wormhoudt, B van Ommen, JN Commandeur, NP Vermeulen, PJ van Bladeren: Polymorphism in the glutathione conjugation activity of human erythrocytes towards ethylene dibromide and 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243:469-476.
213. Podesta, M, G Piaggio, F Frassoni, et al.: The assessment of the hematopoietic reservoir after immunosuppressive therapy or bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* 1998; 91:1959-1965.
214. Powrie, F, RL Coffman: Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Res Immunol* 1993; 144:639-643.
215. Qian, JX, SM Lee, Y Suen, E Knoppel, C van de Ven, MS Cairo: Decreased interleukin-15 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and the effect of interleukin-15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood* 1997; 90:3106-3117.
216. Raunio, H, K Husgafvel-Pursiainen, S Anttila, E Hietanen, A Hirvonen, O Pelkonen: Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility--a review. *Gene* 1995; 159:113-121.
217. Rollins, DE, CD Klaassen: Biliary excretion of drugs in man. *Clin Pharmacokinet* 1979; 4:368-379.
218. Romagnani, S: Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995; 15:121-129.
219. Romagnani, S: T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85:9-18; quiz 18, 21.
220. Romagnani, S: Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5:285-294.
221. Rosenfeld, SJ, J Kimball, D Vining, NS Young: Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood* 1995; 85:3058-3065.
222. Rushmore, TH, CB Pickett: Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem* 1993; 268:11475-11478.
223. Saiki, RK, S Scharf, F Faloona, et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.

224. Salama, SA, SZ Abdel-Rahman, CH Sierra-Torres, FA Hamada ,WW Au: Role of polymorphic GSTM1 and GSTT1 genotypes on NNK-induced genotoxicity. *Pharmacogenetics* 1999; 9:735-743.
225. Salinas, AE ,MG Wong: Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* 1999; 6:279-309.
226. Santesson, CG: Über chronische Vergiftung mit Steinkohlentheerbenzin: vir Todesfälle. *Arch Hyg Berl.* 1897; 31:336-376.
227. Sarhanis, P, C Redman, C Perrett, et al.: Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. *Br J Cancer* 1996; 74:1757-1761.
228. Sasai, Y, S Horiike, S Misawa, et al.: Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. *Leuk Res* 1999; 23:975-981.
229. Sasiadek, M, A Hirvonen, L Noga, M Paprocka-Borowicz ,H Norppa: Glutathione S-transferase M1 genotype influences sister chromatid exchange induction but not adaptive response in human lymphocytes treated with 1,2-epoxy-3-butene. *Mutat Res* 1999; 439:207-212.
230. Schroder, KR, E Hallier, DJ Meyer, FA Wiebel, AM Muller ,HM Bolt: Purification and characterization of a new glutathione S-transferase, class theta, from human erythrocytes. *Arch Toxicol* 1996; 70:559-566.
231. Schroder, KR, FA Wiebel, S Reich, D Dannappel, HM Bolt ,E Hallier: Glutathione-S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate. *Arch Toxicol* 1995; 69:505-507.
232. Scopes, J, M Bagnara, EC Gordon-Smith, SE Ball ,FM Gibson: Haemopoietic progenitor cells are reduced in aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1994; 86:427-430.
233. Seed, T, B Carnes, D Tolle ,T Fritz: Blood responses under chronic low daily dose gamma irradiation: II. Differential preclinical responses of irradiated female dogs in progression to either aplastic anemia or myeloproliferative disease. *Leuk Res* 1993; 17:411-420.
234. Seidegard, J, JW DePierre, TM Guenther ,F Oesch: The effects of metyrapone, chalcone epoxide, benzil, clotrimazole and related compounds on the activity of microsomal epoxide hydrolase in situ, in purified form and in reconstituted systems towards different substrates. *Eur J Biochem* 1986; 159:415-423.
235. Selleri, C, JP Maciejewski, T Sato ,NS Young: Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood* 1996; 87:4149-4157.
236. Sevanian, A ,LL McLeod: Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J Biol Chem* 1986; 261:54-59.
237. Sharpe, WD: Benzene, artificial leather and aplastic anemia: Newark, 1916-1928. *Bull N Y Acad Med* 1993; 69:47-60.
238. Shimada, T, M Iwasaki, MV Martin ,FP Guengerich: Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. *Cancer Res* 1989; 49:3218-3228.
239. Smith, CA ,DJ Harrison: Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema [see comments]. *Lancet* 1997; 350:630-633.
240. Smith, CA, G Smith ,CR Wolf: Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. *Eur J Cancer* 1994; 13:1921-1935.

241. Smith, MT: Overview of benzene-induced aplastic anaemia. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 60:107-110.
242. Snyder, R, T Chepiga, CS Yang, H Thomas, K Platt ,F Oesch: Benzene metabolism by reconstituted cytochromes P450 2B1 and 2E1 and its modulation by cytochrome b5, microsomal epoxide hydrolase, and glutathione transferases: evidence for an important role of microsomal epoxide hydrolase in the formation of hydroquinone. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 122:172-181.
243. Snyder, R, G Witz ,BD Goldstein: The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect* 1993; 100:293-306.
244. Speck, B, E Gluckman, HL Haak ,JJ van Rood: Treatment of aplastic anaemia by antilymphocyte globulin with and without allogeneic bone-marrow infusions. *Lancet* 1977; 2:1145-1148.
245. Stanulla, M, M Schrappe, AM Brechlin, M Zimmermann ,K Welte: Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 2000; 95:1222-1228.
246. Storb, R: Aplastic anemia. *J Intraven Nurs* 1997; 20:317-322.
247. Strange, RC ,AA Fryer: Chapter 19. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 1999; 148:231-249.
248. Suarez, M, L Bezrodnik, AM Di Lonardo, ME Rivas, L Hernandez ,M Zelazko: [Changes in distribution of T subpopulations in the peripheral blood of patients with severe idiopathic anemia]. *Medicina* 1990; 50:527-531.
249. Sugamura, K, T Takeshita, H Asao, et al.: IL-2-induced signal transduction: involvement of tyrosine kinase and IL-2 receptor gamma chain. *Lymphokine Res* 1990; 9:539-542.
250. Taga, K, H Mostowski ,G Tosato: Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993; 81:2964-2971.
251. Taga, K ,G Tosato: IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992; 148:1143-1148.
252. Takaku, F, H Mizoguchi, T Suda, K Kubota ,Y Miura: Erythroid precursor cells in primary acquired and secondary sideroblastic anemia. *Exp Hematol* 1980; 8:225-234.
253. Tamai, H, T Sudo, A Kimura, et al.: Association between the DRB1*08032 histocompatibility antigen and methimazole-induced agranulocytosis in Japanese patients with Graves disease. *Ann Intern Med* 1996; 124:490-494.
254. Teramura, M ,H Mizoguchi: Special Education: Aplastic Anemia. *Oncologist* 1996; 1:187-189.
255. Tong, J, A Bacigalupo, G Piaggio, O Figari, G Sogno ,A Marmont: In vitro response of T cells from aplastic anemia patients to antilymphocyte globulin and phytohemagglutinin: colony-stimulating activity and lymphokine production. *Exp Hematol* 1991; 19:312-316.
256. Torok-Storb, B: Etiological mechanisms in immune-mediated aplastic anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:396-401.
257. Torok-Storb, B, GG Johnson, R Bowden ,R Storb: Gamma-interferon in aplastic anemia: inability to detect significant levels in sera or demonstrate hematopoietic suppressing activity. *Blood* 1987; 69:629-633.
258. Turner, DR, AA Morley ,RS Seshadri: Lymphocyte DNA in aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1981; 48:207-215.

259. Tuzuner, N, C Cox, JM Rowe, D Watrous ,JM Bennett: Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals [see comments]. *Br J Haematol* 1995; 91:612-617.
260. Uetrecht, JP: The role of leukocyte-generated reactive metabolites in the pathogenesis of idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab Rev* 1992; 24:299-366.
261. van Besien, K, G Tricot, A Golichowski, L Padilla ,R Hoffman: Pregnancy-associated aplastic anemia--report of 3 cases. *Eur J Haematol* 1991; 47:253-256.
262. Vaquez, MH ,C Aubertin: L'anémie pernicieuse d'après les conceptions actuelles. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1904; 21:288-297.
263. Viale, M, A Merli ,A Bacigalupo: Analysis at the clonal level of T-cell phenotype and functions in severe aplastic anemia patients. *Blood* 1991; 78:1268-1274.
264. Viezzer, C, H Norppa, E Clonfero, et al.: Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphisms on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers [see comments]. *Mutat Res* 1999; 431:259-269.
265. Vincent, PC: Drug-induced aplastic anaemia and agranulocytosis. Incidence and mechanisms. *Drugs* 1986; 31:52-63.
266. Vore, M: Phase III elimination: another two-edge sword. *Environ Health Perspect* 1994; 102:422-423.
267. Vos, RM ,PJ Van Bladeren: Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 1990; 75:241-265.
268. Wallerstein, RO, PK Condit, CK Kasper, JW Brown ,FR Morrison: Statewide study of chloramphenicol therapy and fatal aplastic anemia. *Jama* 1969; 208:2045-2050.
269. Warholm, M, AK Alexandrie, J Hogberg, K Sigvardsson ,A Rannug: Polymorphic distribution of glutathione transferase activity with methyl chloride in human blood. *Pharmacogenetics* 1994; 4:307-311.
270. Warholm, M, A Rane, AK Alexandrie, G Monaghan ,A Rannug: Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics* 1995; 5:252-254.
271. Warwick, A, P Sarhanis, C Redman, et al.: Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. *Carcinogenesis* 1994; 15:2841-2845.
272. Webb, G, V Vaska, M Coggan ,P Board: Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 1996; 33:121-123.
273. Wiencke, JK, S Pemble, B Ketterer ,KT Kelsey: Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:253-259.
274. Wilkinson, Jt ,ML Clapper: Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216:192-200.
275. Williams, DM, RE Lynch ,GE Cartwright: Drug-induced aplastic anemia. *Semin Hematol* 1973; 10:195-223.
276. Wormhoudt, LW, JN Commandeur ,NP Vermeulen: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and

- epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29:59-124.
277. Yan, A ,P Davis: Gold induced marrow suppression: a review of 10 cases. *J Rheumatol* 1990; 17:47-51.
278. Yang, C ,X Zhang: Incidence survey of aplastic anemia in China. *Chin Med Sci J* 1991; 6:203-207.
279. Yoshida, K, I Miura, T Takahashi, et al.: Quantitative and qualitative analysis of stem cells of patients with aplastic anaemia. *Scand J Haematol* 1983; 30:317-323.
280. Young, NS: Drug-related blood dyscrasias. Introduction. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 60:6-8.
281. Young, NS: Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000; 37:3-14.
282. Young, NS: Immune pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 60:55-59.
283. Young, NS: Introduction: acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000; 37:2.
284. Young, NS ,BP Alter: *Aplastic anemia: acquired and inherited*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.
285. Young, NS, E Leonard ,L Platanias: Lymphocytes and lymphokines in aplastic anemia: pathogenic role and implications for pathogenesis. *Blood Cells* 1987; 13:87-100.
286. Young, NS ,J Maciejewski: The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997; 336:1365-1372.
287. Yssel, H, R De Waal Malefyt, MG Roncarolo, et al.: IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 1992; 149:2378-2384.
288. Yunis, AA: Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *Am J Med* 1989; 87:44N-48N.
289. Yunis, AA, GK Arimura ,M Isildar: DNA damage induced by chloramphenicol and its nitroso derivative: damage in intact cells. *Am J Hematol* 1987; 24:77-84.
290. Zhu, H, Y Li ,MA Trush: Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA/2 mice: potential role of mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 130:108-120.
291. Zoumbos, NC, JY Djeu ,NS Young: Interferon is the suppressor of hematopoiesis generated by stimulated lymphocytes in vitro. *J Immunol* 1984; 133:769-774.
292. Zoumbos, NC, P Gascon, JY Djeu ,NS Young: Interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:188-192.

Danksagung

An der Entstehung dieser Dissertation sind viele Menschen beteiligt gewesen, die aktiv oder unterstützend, genannt und ungenannt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Fertigstellung gibt mir die Gelegenheit mich bei Ihnen zu bedanken.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Göbel danke ich für die Überlassung des Themas, die Freiheit zur Ausgestaltung, das in mich gesetzte Vertrauen bei der Durchführung des Projektes und die fordernde wissenschaftliche Diskussion während der schriftlichen Ausfertigung.

Ganz herzlich möchte ich Frau Dr. med. Uta Dirksen für Ihre Betreuung, Umsetzung und Weiterentwicklung der gestellten Aufgaben danken, sowie dafür, dass sie stets mit offenem Ohr all meine Fragen auch während des Nachtdienstes zu beantworten wusste.

Den Dres. rer. nat. Carsten Burry und Werner Frings danke ich für die vielen Anregungen und Hilfestellungen bei der Durchführung molekularbiologischer Methoden des Projekts.

Herrn Dr. sc. math. R. Willers vom Universitätsrechenzentrum Düsseldorf danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Stefanie Borkens möchte ich für Ihre Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie mir mit Rat und Tat bei der Laborarbeit beigestanden hat, danken.

Ulla Wicorek und Petra Genut bin ich sehr für die vielen Hilfestellungen und Analysen bei der Durchführung hämatologischer Methoden dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Burdach danke für die gewährte Unterstützung während der Anfangszeit der Arbeit und Herrn PD Dr. med. Helmut Hannenberg danke ich für die immer vorhandene musikalische Untermalung während der Laborarbeit.

Für die finanzielle Ausstattung, die die Untersuchungen zu dieser Arbeit erst ermöglichten danke ich dem SFB 503 der DFG.

Zu guter letzt möchte ich meiner Mutter, Masoomeh Shalchian, meinen Geschwistern Anousheh und Arash, meinen Freunden Dres. med. Özgür Yaldizli, Stefanie Boms und Thuy-Duong Do-Quang (DDS) für ihr Verständnis dafür, dass ich viel Zeit im KMT-Labor verbracht habe sowie ihre vielfältige Unterstützung im Studium und während der Promotion danken.

Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Kaveh Asadi Moghaddam

12.11.1974 in Teheran/ Iran geboren, ledig

Studium und Schulbildung

- | | |
|-----------|---|
| 1981-1983 | Grundschule - <i>Teheran, Iran</i> |
| 1983-1994 | Grundschule und Gymnasium - <i>Wuppertal</i> |
| 1994 | Studium der Chemie - <i>Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf</i> |
| 1995-2002 | Wechsel zum Medizinstudium - <i>Heinrich-Heine-Univers. Düsseldorf, Julius-Maximilians-Univ. Würzburg, McGill University Montreal, Kanada Harvard Medical School, Boston, USA</i> |

Publikationen und Präsentationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

- | | |
|------|---|
| 1998 | U.Dirksen, K.Asadi Moghaddam , M.Führer, S.Burdach: DEFUNCT HEMATOPOIETIC PROGENITOR GROWTH AND HETEROGENEOUS IMMUNOLOGICAL PHENOTYPES IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA OF CHILDHOOD: IDENTIFICATION OF SUBSETS WITH DECREASED HEMATOPOIETIC PROGENITORS AND INCREASED IL15 OR IL10 PRODUCTION. <i>Klin Pädiatr.</i> 210(98)167-172 |
| 1999 | K.Asadi Moghaddam , M.Führer, S.Burdach, U.Dirksen: GLUTATHION TRANSFERASE THETA 1 NULL GENOTYPE IN CHILDREN WITH ACQUIRED APLASTIC ANEMIA. Vortrag & Abstract. <i>XIII Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Hamburg</i> |
| 2000 | K.Asadi Moghaddam , C.Mambetova, S.Burdach, U.Göbel, U.Dirksen: INCREASED INCIDENCE OF THE GLUTATHION S-TRANSFERASE THETA 1 (GSTT1) NULL GENOTYPE IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACQUIRED APLASTIC ANEMIA. Poster & Abstract, <i>42nd Ann. Meeting of the Amer. Society of Hematology, USA</i> |
| 2004 | U.Dirksen, K.Asadi Moghaddam , C.Mambetova, C.Esser, M.Führer, S.Burdach: INCREASED FREQUENCY OF GLUTATHION S-TRANSFERASE THETA 1 (GST1) NULL GENOTYPE IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED RISK FOR ACQUIRED APLASTIC ANEMIA IN CHILDREN. <i>Pediatr Res.</i> 2004 Mar;55(3):466-71 |

Stipendien

- | | |
|-----------|---|
| 1998-2002 | Studienförderung der <i>Friedrich-Ebert-Stiftung</i> |
| 2001-2002 | Auslandsförderung der <i>Friedrich-Ebert-Stiftung</i> |

Persönliche Interessen

klassische Musik, Rad- und Wassersport