

Einleitung

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika ist in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) der Kinder, trotz erheblicher Fortschritte in den letzten Jahrzehnten, eine der wichtigsten Ursachen für das Fehlschlagen der Chemotherapie.

Die meisten der in der Therapie der ALL eingesetzten Zytostatika sowie Glukokortikosteroide bewirken - oft durch unterschiedliche und noch nicht genau charakterisierte molekulare Wege - den Zelltod über Induktion von Apoptose (programmierter Zelltod). Die Erforschung der Apoptose hat in den letzten Jahren zu grundlegend neuen Einsichten in die Entstehung und Selektion von chemoresistenten Tumorzellen geführt. Tumorzellen verfügen zum einen über antiapoptotische Mechanismen, die ein verlängertes Überleben und somit Wachstumsvorteil ermöglichen, zum anderen sind in diesen Zellen intrazelluläre Apoptosesignalwege gestört, die eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutika-induzierten Zelltod bedingen. Kenntnisse über die Natur der Mechanismen, die der Signaltransduktion der Apoptose zugrunde liegen, stellen somit eine wichtige Voraussetzung für neue Therapieansätze dar.

Unter verschiedenen Subtypen der ALL zeigt die Gruppe der Vorläufer-T-Zell ALL eine besonders schlechte Prognose in der Chemotherapie. So zeigt diese Gruppe ein schlechteres Therapieansprechen als die Gruppe der Vorläufer-B-Zell ALL [1, 2] und auch *in vitro* kann eine generell höhere Resistenz gegen Chemotherapeutika beobachtet werden als in Vorläufer-B-Zell ALL [3, 4]. Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung von Vorläufer-T-Zell ALL verschiedener Reifungs-Subtypen bezüglich Apoptoseregulation und Ansprechen auf Zytostatika von besonderem Interesse.

Im Folgenden soll zunächst einleitend auf die Entstehung, die immunphänotypische Unterteilung und die Therapie von Vorläufer-T-Zell ALL eingegangen werden. Desweiteren werden die Apoptose und die heute bekannten bedeutendsten Mechanismen, die in der Regulation der Apoptose beteiligt sind und daher eine Bedeutung für die Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika spielen können, behandelt.

1. Vorläufer-T-Zell ALL – Biologie und Klinik

1.1 Akute Leukämien – Definition und Entstehung

Akute Leukämien sind maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Sie entstehen durch die klonale Expansion einer durch Mutation entarteten Vorläuferzelle [5]. Die Klonalität der Leukämien wurde bereits 1960 durch den Nachweis des sog. Philadelphia-Chromosoms bei der chronischen myeloischen Leukämie bewiesen. Der klonale Ursprung

akuter Leukämien konnte durch die Entdeckung spezifischer Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden [6].

In der normalen Hämatopoese werden die verschiedenen hämatopoetischen Zellen, d.h. Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten ausgehend von einer undifferenzierten pluripotenten Stammzelle [7] durch Proliferations- und Differenzierungsprozesse gebildet (Abb. 1). Dabei entstehen über weiter differenzierte linienspezifische Vorläuferzellen schließlich die ausdifferenzierten Effektorzellen des peripheren Blutes. Die frühe Differenzierung zu linienspezifischen Vorläuferzellen findet im Knochenmark unter dem Einfluß von Stromazellen statt, die eine Versorgung der frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen mit Wachstums- und Überlebensfaktoren, den sogenannten Zytokinen oder Interleukinen, gewährleisten.

Während der normalen Entwicklung erfahren die hämatopoetischen Zellen reifungs- und differenzierungsspezifische Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Oberflächen-Proteine, der sog. CD-Marker (CD = cluster of differentiation), die u.a. die Abhängigkeit der Zellen in ihrem jeweiligen Reifestadium gegenüber bestimmter Faktoren (z.B. Zytokine) repräsentieren [8-10].

Seit längerem ist bekannt, dass auch Leukämiezellen, z.B. von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie, verschiedene Oberflächen-Antigene exprimieren, die in normalen lymphatischen Vorläuferzellen in bestimmten Reifungsstadien vorkommen [11, 12]. Man kann daher annehmen, daß akute Leukämien aufgrund ihrer Abstammung von hämatopoetischen Stammzellen ähnliche Eigenschaften wie normale hämatopoetische Zellen aufweisen. Die Expression von Oberflächen-Antigenen dient u.a. als ein Kriterium zur Klassifikation der akuten Leukämien (siehe unten).

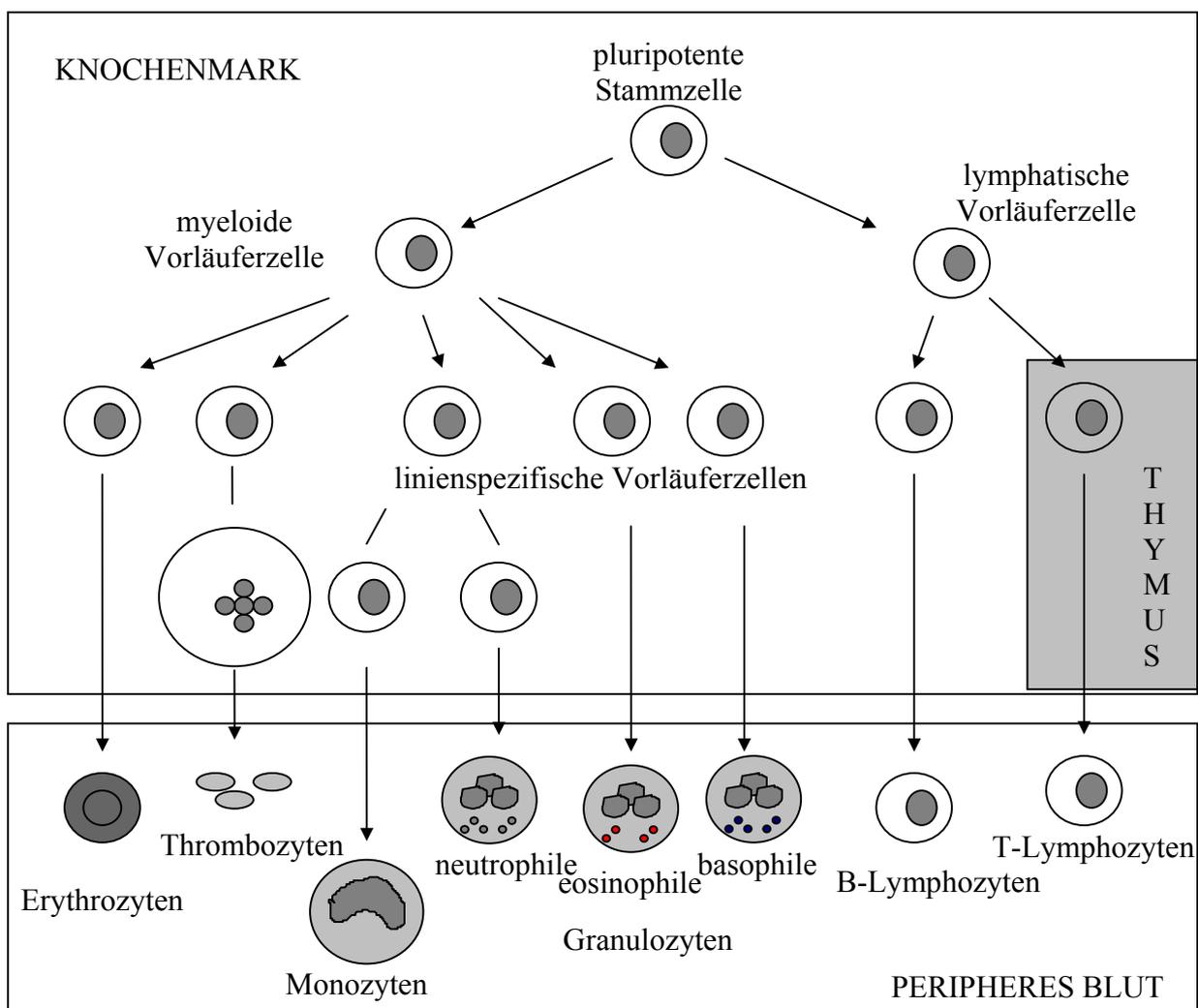


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (Modell nach A Fauser. Stammzellsystem. Hämatologie/Onkologie (Hrsg. Ostendorf, Seber; Verlag Urban+Schwarzenberg) 1997)[7]

1.2 Klassifikation akuter Leukämien – Der Subtyp der Vorläufer-T-Zell ALL

Die Klassifizierung der Leukämien basiert auf der Erkennung biologischer Subtypen, die sich hinsichtlich ihres klinischen Erscheinungsbildes und ihrer therapeutischen Beeinflussbarkeit unterscheiden. Leukämische Blasten werden nach differenzierungsabhängigen morphologischen, immunphänotypischen und zytogenetischen Kriterien klassifiziert [13]. Die 1976 von der French-American-British-Cooperative Group (FAB) vorgeschlagene morphologische Klassifizierung ermöglicht eine für die Therapie entscheidende Abgrenzung der ALL von der AML. Eine genauere Charakterisierung biologisch oder klinisch relevanter Untergruppen innerhalb der ALL wurde jedoch erst durch den immunphänotypischen Nachweis linienspezifischer und reifungsassoziierter Zellproteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper möglich, mit deren Hilfe z.B. Vorläufer-B-Zell ALL und die Vorläufer-T-Zell ALL voneinander unterschieden werden können, was nach morphologischen Kriterien nicht

möglich ist. Die Immunphänotypisierung in Kombination mit zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen haben die Identifizierung von biologisch und klinisch unterschiedlichen Untergruppen innerhalb der Hauptgruppen der Vorläufer-B-Zell ALL und der Vorläufer-T-Zell ALL ermöglicht und ist entscheidend für das Monitoring von Risikogruppen in therapeutischen Studien [14].

Die Bestimmung der Linienzugehörigkeit sowie des Reifestadiums in ALL basieren auf dem Muster der Antigen-Expression, die durch eine geeignete Auswahl von monoklonalen Antikörpern gegen CD-Antigene bestimmt wird [14]. So sind Vorläufer-T-Zell ALL durch die Expression von cytoplasmatischem bzw. membranständigem CD3 charakterisiert [15]. Vorläufer-B-Zell ALL exprimieren CD19 und/oder CD79a und/oder CD22 [15]. Akute myeloische Leukämien (AML) zeichnen sich durch die Expression eines oder zweier myelomonocytischen Marker aus, wie anti-MPO, CD13 CD33, CD65 und/oder CD117 [15]. Die reifungsabhängige Expression von CD-Markern in der T-Zell-Entwicklung ist in Abb. 2 dargestellt. Die wichtigsten Oberflächen-Moleküle zur Identifizierung von Thymocyten-Untergruppen sind CD4, CD8 und T-Zell-Rezeptorkomplex Moleküle (CD3 und T-cell Rezeptoren $\alpha:\beta$ und $\gamma:\delta$). Die im Verlauf der T-Zell-Differenzierung aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehenden Zellen sind zunächst negativ hinsichtlich der Expression von CD3, CD4 und CD8 (doppelt-negatives Stadium). Diese wandern in den Thymus ein und stellen die unreifste Zellpopulation im Thymus dar. Aus diesen Vorläufer-Zellen entstehen zwei Linien von T-Zellen, $\alpha:\beta$ und $\gamma:\delta$ T-Zellen, die unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren aufweisen. Die Hauptpopulation gehört der $\alpha:\beta$ T-Zell-Linie an, aus der sich im weiteren Verlauf Zellen mit positiver Expression von CD3, CD4 und CD8 (doppelt-positives Stadium) bilden. Die meisten Thymocyten im doppelt-positiven Stadium sterben während der negativen und positiven Selektion durch Apoptose. Die restlichen Zellen differenzieren weiter und exprimieren CD3+, CD4+, CD8- oder CD3+, CD4-, CD8+ (einfach-positives Stadium). Diese einfach-positiven Zellen stellen die reifen CD4 oder CD8 T-Zellen dar und finden sich im peripheren Blut wieder (Abb. 2).

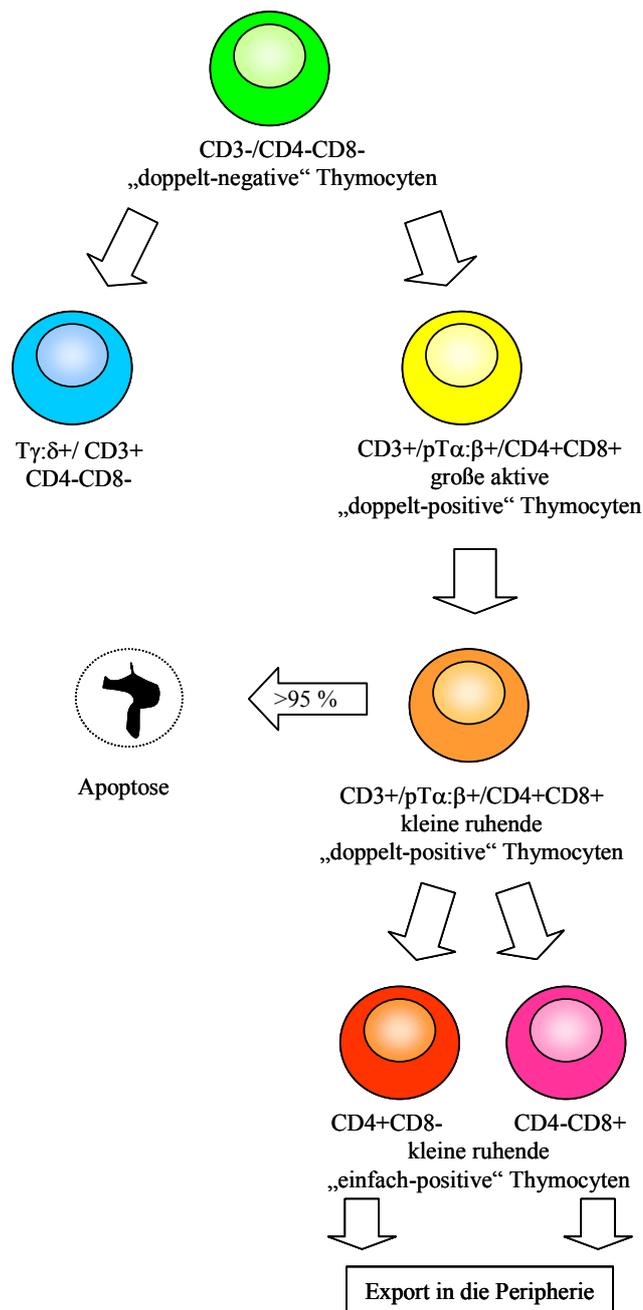


Abb. 2: Expression von CD-Oberflächenmarkern während der normalen T-Zell-Entwicklung im Thymus. Durch die Veränderungen der Expression von CD-Oberflächenmarkern lassen sich Thymocyten-Populationen aufgrund ihres Reifungsstadiums unterscheiden (Modell nach Janeway Immunobiology [16]).

Die Untergruppe der Vorläufer-T-Zell ALL wird nach der Expression verschiedener CD-Reifungsmarker wie in Tabelle 1 dargestellt weiter unterteilt.

Die vier Untergruppen von der pro-T-ALL (T-I) zur reifen T-ALL (T-IV) wurden auch nach dem Grad der Differenzierung der Zellen im Thymus definiert [15]. Diese Klassifizierung der Vorläufer-T-Zell ALL spiegelt damit die wichtigsten Stadien der normalen T-Zell-Entwicklung wider.

Tab. 1: Immunphänotypische Klassifikation der akuten lymphoblastischen Leukämien nach der CD-Marker Expression (nach MC Béné G Castoldi W Knapp et al. Leukemia 1995 9:1783-6)[15].

Vorläufer-T-Zell ALL (cytoplasmatisch/membranständig CD3+)	
pro-T-ALL (T-I)	CD7+
prä-T-ALL (T-II)	CD2+ und/oder CD5+ und/oder CD8+
kortikale T-ALL (T-III)	CD1a+
reife T-ALL (T-IV)	CD3+ (membranständig), CD1a-
α/β + T-ALL	anti-TCR α/β
γ/δ + T-ALL	anti-TCR γ/δ +

1.3 Akute lymphoblastische Leukämie: Therapie und Prognose

Patienten mit akuter Leukämie werden mit Chemotherapeutika therapiert. Als Chemotherapeutika werden verschiedene Substanzen eingesetzt, die unterschiedliche Wirkungsmechanismen aufweisen und den apoptotischen Zelltod induzieren.

Der Erfolg einer Therapie in akuten Leukämien hängt von verschiedenen Faktoren ab wie z.B. vom Immunphänotyp, der Zytogenetik oder dem Alter des Patienten. Bei den kindlichen ALL liegt das 5-year-EFS (ereignisfreie Überleben) nach der Chemotherapie heute bei 70-80% [17], wobei es deutliche Unterschiede zwischen den immunphänotypischen, zytogenetischen und klinisch charakterisierten Subtypen gibt, was dazu geführt hat, daß unterschiedliche Behandlungsprotokolle für Hochrisiko und Standardrisikopatienten eingesetzt werden. Die meisten in dieser Arbeit untersuchten erkrankten Kinder mit ALL wurden im Rahmen der deutschen multizentrischen ALL-BFM95-Studie nach dem in Abb. 3 beispielhaft dargestellten Behandlungsprotokoll behandelt.

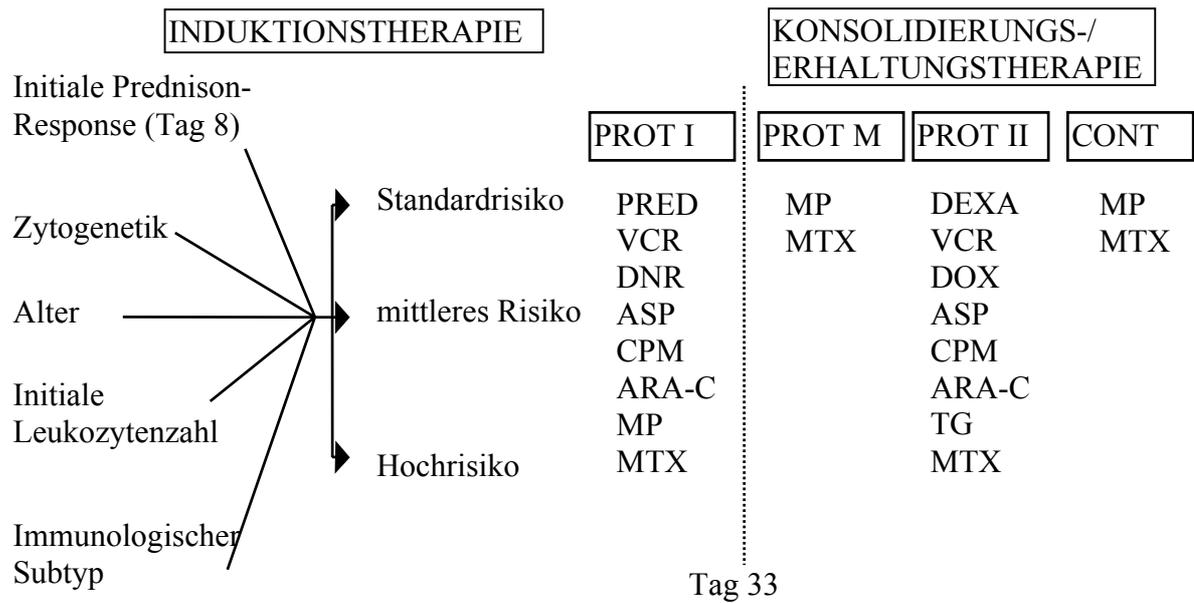


Abb. 3: Risikoadaptiertes Behandlungsschema der deutschen ALL-BFM-Studiengruppe (nach [18]). PRED=Prednison, ASP=Asparaginase, MP=Mercaptopurin, TG=Thioguanin, VCR=Vincristin, CPM=Cyclophosphamid, MTX=Methotrexat, DNR=Daunorubicin, ARA-C=Arabinosid-Cytosin, DOX=Doxorubicin. PROT=Protokoll, CONT=Erhaltungstherapie. Die unterschiedlichen Medikamente werden in den jeweiligen Risikogruppen unterschiedlich dosiert bzw. evtl. nicht appliziert.

2. Apoptose und deren Regulationsmechanismen

2.1 Apoptose — Definition und Prozeß

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der durch aktive Regulationsprozesse erfolgt und für die Elimination unerwünschter Zellen sowie die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase in multizellulären Organismen verantwortlich ist [19-21]. Die Apoptose stellt einen essentiellen Prozeß für die Organ- und Gewebeentwicklung während der Embryogenese dar und ist von entscheidender Bedeutung für die Reifung von B- und T-Lymphozyten im Zuge der Hämatopoese, der Regulation der Immunantwort, sowie der Elimination differenzierter Zellen mit kurzer Halbwertszeit, z.B. neutrophiler Granulozyten [20-23]. Der apoptotische, physiologisch regulierte Zelltod ist nicht zu verwechseln mit dem nekrotischen, pathologisch bedingten Absterben von Zellen infolge mechanischer oder anderer irreparabler Schädigungen. Apoptose und Nekrose sind morphologisch unterscheidbar. Apoptotische Zellen sind an der Bildung membranumgebener Blasen, sogenannter „apoptotic blebs“, zu erkennen (Abb. 4), die abgeschnürt und von

Immunzellen phagozytiert und eliminiert werden. Im Gegensatz dazu schwellen nekrotische Zellen durch den durch die Schädigung hervorgerufenen Verlust der Flüssigkeits- und Elektrolytkontrolle an und platzen. Dabei treten zellschädigende Substanzen aus der Zelle aus (z.B. Ionen, Proteasen) und beeinträchtigen das umgebende Gewebe. Als Folge davon kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Einströmen von Granulozyten in das Nekrosegebiet.

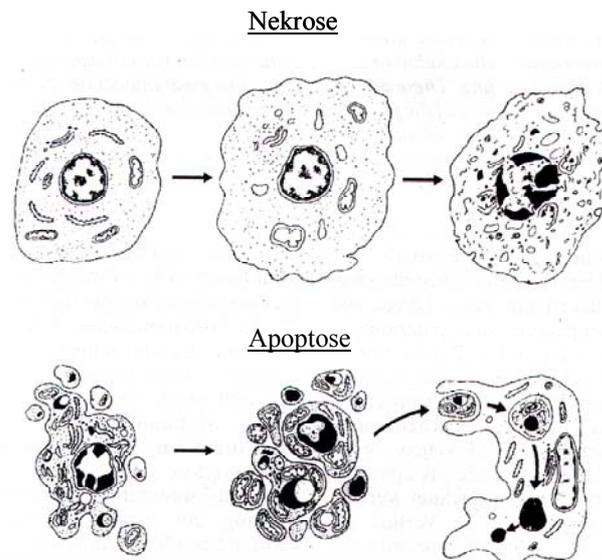


Abb. 4: Schematische Darstellung des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes. Der nekrotische Zelltod zeichnet sich durch einen Verlust der Flüssigkeits- und Elektrolytkontrolle aus, infolge derer die Zelle zerstört wird und proteolytische Bestandteile des Zytoplasmas unkontrolliert in das umgebende Gewebe gelangen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Apoptose um einen programmierten Zelltod bei der die Zelle zunächst schrumpft und zytoplasmahaltige Membranbläschen bildet, die von Immunzellen durch Phagozytose eliminiert werden. (nach [24]).

Der komplizierte Prozeß der Apoptose kann vereinfachend in drei Phasen unterteilt werden: *Induktion*, *Regulation* und *Ausführung* [25]. Die *Induktion* der Apoptose kann entweder durch das Einschalten des apoptotischen Mechanismus während einer bestimmten Entwicklungsphase, z.B. Organ- und Gewebeentwicklung, von der Zelle selbst ausgelöst werden oder als Antwort auf eine irreparable Störung (z.B. durch Chemotherapeutika, UV-, γ -Strahlung) wichtiger zellulärer Funktionen, wie Zellzyklus und Metabolismus, erfolgen. Die Apoptose kann auch durch die spezifische Bindung natürlicher Liganden an ihren Rezeptor, z.B. an Oberflächenrezeptoren der Tumornekrose (TNF)- bzw. Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptor Familie, CD95 (Fas/APO) und TNFR-1 [26, 27]. induziert werden (siehe unten).

Eine weitere Ursache für die Induktion von Apoptose ist der Entzug von Wachstumsfaktoren (Zytokinen), die in der natürlichen Umgebung der Zellen überlebenswichtige Signale

vermitteln. So führt z.B. der Zytokinentzug in aktivierten Lymphozyten bei der Kultivierung der Zellen *in vitro* zur Induktion von sogenannter spontaner Apoptose in aktivierten Lymphozyten [28, 29]. Eine Zugabe von Zytokinen, z.B. IL-2, kann diese Form der Apoptose effektiv verhindern [28]. Interessanterweise wird die spontane Apoptose oft auch in Leukämiezellen beobachtet, was wahrscheinlich auf die Abhängigkeit dieser Zellen von Wachstumsfaktoren oder anderen Aktivierungssignalen zurückzuführen ist [30, 31].

Die *Regulation* der Apoptose erfolgt durch eine Verkettung intrazellulärer molekularer Ereignisse, die besonders anfangs („upstream“) sehr unterschiedlich verlaufen können, aber fortschreitend („downstream“) gemeinsame regulatorische Komponenten aufweisen. Eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose spielen die Mitochondrien. So konnte gezeigt werden, daß es im Zuge der Apoptose zu einem irreversiblen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt [32]. Eng verbunden damit sind die Proteine der Bcl-2-Familie mit ihren pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern von großer Bedeutung für die Regulation der Apoptose auf der Ebene der Mitochondrien [33, 34].

Bei der letzten Phase des apoptotischen Prozesses, der *Ausführung*, kommt es zu morphologischen Veränderungen verschiedener Zellstrukturen. Eine Veränderung, die generell während sehr früher Stadien der Apoptose auftritt, ist die Externalisierung des Membran-Phospholipids Phosphatidylserin, das als Antwort auf die Induktion von Apoptose von der Membranınnenseite nach außen verlagert wird [35]. Durch diese Externalisierung dient es als Signal für die Phagozytose durch Makrophagen [36, 37]. Spätere Ereignisse des apoptotischen Prozesses werden vor allem morphologisch durch die Degradation verschiedener Zellstrukturen erkennbar. Die wichtigsten Merkmale, die unabhängig vom apoptoseauslösenden Signal universell ablaufen sind dabei die Kondensation des Chromatins, die Bildung von Membranblasen und die reguläre oligonucleosomale Fragmentierung der DNA [22, 38]. Diese Prozesse werden von einer Reihe strukturell verwandter proteolytischer Enzyme ausgeführt, den sogenannten Caspasen (cysteine-containing aspartate-specific proteases). Die Rolle der Caspasen in der Apoptose wurde mit CED-3 entdeckt, einem mit dem Zelltod-assoziierten Protein in der Nematode *Caenorhabditis elegans*, das mit dem in Säugerzellen vorkommenden interleukin-1 β converting enzyme (ICE oder Caspase-1) verwandt ist [39, 40]. Obwohl Caspase-1 selbst keine eindeutige Rolle in der Apoptose spielt, gehören dieser Protein-Familie eine Reihe von apoptose-relevanten Enzymen an. Inzwischen sind in Säugern 13 Caspasen (Caspase-1 bis Caspase-13) beschrieben [41]. Caspasen wurden bisher in allen untersuchten Zelltypen unterschiedlicher multizellulärer Organismen nachgewiesen [38].

Die Apoptose ist ein intrazellulär regulierter Prozeß, dessen Fehlregulation zunehmend als ein zentraler Mechanismus der Chemoresistenz erkannt wird. Fehlregulationen im Signaltransduktionsweg der Apoptose führen zu Störungen in der im gesunden Organismus

bestehenden Balance zwischen Zelltod und Zellteilung und damit zu Erkrankungen, die sich entweder durch einen verstärkten Verlust (z.B. beim AIDS oder bei der Alzheimerschen Krankheit) oder eine Akkumulation (Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen) bestimmter Zellpopulationen auszeichnen.

2.2 Apoptose-regulierende Proteine: die Bcl-2-Protein-Familie

Unter verschiedenen molekularen Faktoren, die eine Rolle in der Regulation der Apoptose spielen und damit für die Entwicklung einer Chemoresistenz verantwortlich sein können, nehmen die Produkte der bcl-2 Genfamilie (bcl-2, bax, etc.) eine Schlüsselposition ein. Die Mitglieder dieser Familie weisen eine entweder Apoptose-induzierende (bax) oder -inhibierende (bcl-2, bcl-x_L) Wirkung auf und können entsprechend zu niedriger Expression bzw. Überexpression eine Apoptoseresistenz verursachen.

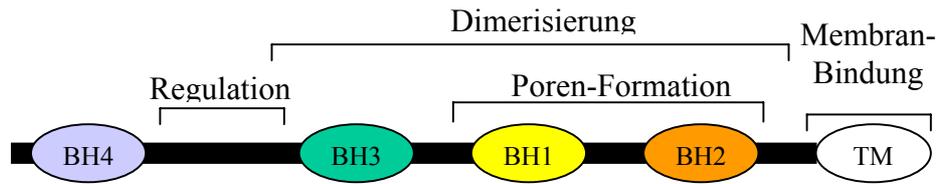
Das erste Mitglied dieser Multi-Genfamilie wurde mit bcl-2 in folliculären B-Zell-Lymphomen entdeckt, in denen es infolge der Translokation t(14;18) überexprimiert wurde. [42]. In verschiedenen Zellsystemen konnte mit Hilfe von Gentransfektions-Experimenten gezeigt werden, daß die Überexpression von Bcl-2 die durch verschiedene Stimuli (z.B. Wachstumsfaktorentzug, Chemotherapeutika oder γ -Strahlung) induzierte Apoptose verhindert bzw. verzögert [43, 44]. Inzwischen wurden weitere Homologe der Bcl-2-Familie gefunden, von denen einige anti-apoptotisch, z.B. Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-x_L, andere dagegen pro-apoptotisch wirksam sind, z.B. Bax, Bak und Bcl-x_S. Dabei handelt es sich bei Bcl-x_L und Bcl-x_S um die lange bzw. kurze mRNA-Splicing-Variante desselben Gens, bcl-x [43, 45].

Allen Bcl-2-verwandten Proteinen gemeinsam ist mindestens eine von vier evolutiv konservierten Bcl-2-homologen Sequenzen, BH1 - BH4 [46-48] (Abb. 5). Dabei besitzen die meisten anti-apoptotisch wirksamen Mitglieder der Bcl-2-Familie mindestens die Domänen BH1 und BH2, wobei die dem Bcl-2 ähnlichsten Proteine alle vier Domänen besitzen (Bcl-x_L). Die Domäne BH4 ist nur in anti-apoptotischen Proteinen zu finden. Eine Ausnahme bildet Bcl-x_S, das ebenfalls BH4 enthält [49]. Die Gruppe der pro-apoptotischen Moleküle wird unterteilt in die sogenannte Bax-Unterfamilie und die BH3-Unterfamilie. Die Bax-Unterfamilie, zu der Bax, Bak und Bok zählen, besitzt die Domänen BH1, BH2 und BH3. Die zweite pro-apoptotische Gruppe besitzt nur BH3 („BH3-only“, z.B. Bik, Bad), was darauf hindeutet, daß BH3 die essentielle Domäne für die pro-apoptotische Funktion darstellt [46]. Die BH3-Domäne der pro-apoptotischen Proteine zeigt sequenzielle Unterschiede zur BH3-Region in den anti-apoptotischen Bcl-2-Familie Proteinen [50].

1) Anti-apoptotisch

Bcl-2-Untergruppe

Bcl-2, Bcl-X_L,
Bcl-w, Mcl1



2) Pro-apoptotisch

Bax-Untergruppe

Bax, Bak, Bok



BH3-Untergruppe

Bik, Bad, Bmf, Hrk, Bim,
Noxa, Puma



Bid



Abb. 5: Mitglieder der Bcl-2-Familie. Dargestellt sind zwei Hauptgruppen: 1) die anti-apoptotische Gruppe mit der Bcl-2-Untergruppe, deren Proteine das Überleben der Zellen fördern und 2) die pro-apoptotische Gruppe, die weiter unterteilt wird in die Bax-Untergruppe, deren Proteine die Domänen BH1, BH2 und BH3 besitzen und die BH3-Untergruppe, deren Mitglieder nur die Domäne BH3 aufweisen. (nach KC Zimmermann et al Pharmacology and Therapeutics 92 2001 57-70 [51]).

In den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie bilden die Domänen BH1, BH2 und BH3 eine Art Tasche. Diese Formation bewirkt einerseits, dass die BH3-Domäne ihre proapoptotische Funktion nicht ausüben kann, andererseits fungiert sie als Bindungsstelle für die BH3-Domäne pro-apoptotischer Moleküle. Dabei kommt es zu einer Heterodimerisation, die zur Inhibition der anti-apoptotischen Moleküle führt [47]. Von Bad z.B. weiß man, dass es antiapoptotisch wirkt, indem es eine Bindung der anti-apoptotischen Moleküle mit Bax oder Bak verhindert. Es wird auch vermutet, dass Bad die Fähigkeit von Bcl-2 und Bcl-x_L Poren zu bilden, inhibiert [47].

Zusätzlich zu den beschriebenen homologen Domänen besitzen fast alle Bcl-2-Familie Proteine im Bereich des C-terminalen Endes eine Sequenz aus hydrophoben Aminosäuren, die eine Bindung an intrazelluläre Membranen ermöglicht. Eine Ausnahme bildet Bid, das zur Untergruppe der „BH3-only“ gehört und keine Membranbindungsdomäne besitzt. Bid gilt als endogener Inhibitor von Bcl-2-Familie Proteinen durch Bildung von Heterodimeren. Bid fördert den apoptotischen Zelltod vermutlich durch die Aktivierung von Bax und Bak oder durch die Inaktivierung von anti-apoptotischen Molekülen der Bcl-2-Familie [51].

Man nimmt an, daß bestimmte Proteine der Bcl-2-Familie in ihrer membrangebundenen Form Porenkomplexe bilden können und dadurch die Passierbarkeit von Molekülen durch die Membranen regulieren. Dabei scheinen die Domänen BH1 und BH2 für die Porenformation eine Rolle zu spielen [47]. *In vitro* tests haben gezeigt, daß Bcl-2, Bcl-x_L und Bax Porenkanäle in Lipid-Doppelschichtmembranen formen, wobei sich die durch Bcl-2 und Bax gebildeten Kanäle in ihrer Ionen-Selektivität unterscheiden [46, 52]. Bestimmte pro- und antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2, Bcl-x_L und Bak sind überwiegend mit Mitochondrien kolokalisiert, während andere wie Bax, Bid und Bad im Cytosol von gesunden Zellen zu finden sind. Mit Hilfe von Zellfraktionierungsexperimenten sowie durch konfokale Laserscan Mikroskopie und Elektronen-Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß Bcl-2 v.a. in der äußeren Membran von Mitochondrien, in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und in der Zellkernmembran lokalisiert ist [48, 49, 53-56]. Bcl-x_L ist nur zum Teil an Membranen lokalisiert und Bax liegt hauptsächlich cytosolisch vor [49, 53]. Biochemische sowie mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß verschiedene Proteine der Bcl-2 Familie im Zuge der Apoptose Lokalisationsänderungen erfahren. Daraus läßt sich schließen, daß die intrazelluläre Lokalisation von Bcl-2-verbundenen Proteine bedeutungsvoll für die Regulation der Apoptose ist [53, 55]. Kürzlich wurde postuliert, dass eine Translokation von Bax zur äußeren Mitochondrien-Membran hin eine Schlüsselrolle in der Induktion von Apoptose spielt [57, 58]. In B-CLL Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit der Chemotherapeutika-Kombination Fludarabin/Cyclophosphamid/Mitoxantron zu einer Lokalisationsänderung von intrazellulärem Bax führt, wobei Bax vom Cytosol zur Mitochondrienmembran hin verschoben wird, und dass dies ein frühes Ereignis der Apoptose-Induktion darstellt [59].

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose. Bereits in frühen Stadien des apoptotischen Prozesses kann ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) beobachtet werden [59]. Pharmakologische und funktionelle Studien zeigten, daß dieser Verlust von $\Delta\psi_m$ aufgrund einer Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-Poren (PT) erfolgt. Die PT Poren sind Multiproteinkomplexe an den Kontaktstellen zwischen der inneren und äußeren Mitochondrien-Membran die durch verschiedene Parameter, wie z.B. Inhibitoren der Atmungskette, reaktive Sauerstoff-Radikale (ROS), Caspasen oder Modifikationen von Bcl-2 beeinflusst werden können [58].

Bcl-2-verbundene Proteine können durch die Bindung an die PT Porenkomplexe der Mitochondrienmembran das Membranpotential dieser Organellen beeinflussen [58]. In zellfreien Systemen konnte gezeigt werden, daß Bcl-2 durch Stabilisierung der Mitochondrien-Membran PT und die daraus resultierende Freisetzung von mitochondrialen Proteinen inhibieren kann [58]. Bcl-2 und Bcl-x_L wirken wahrscheinlich regulierend auf den pH-Wert im mitochondrialen Intermembranraum durch Erhöhung des Protonenfluxes aus

der Matrix oder sie kommunizieren mit Komponenten des PT Porenkomplexes und beeinflussen so den Ionentransport [52, 60]. Die apoptotische Wirkung von Bax in Säugerzellen scheint von einer funktionellen F_0F_1 -ATPase Protonenpumpe abzuhängen [52, 61]. Als Konsequenz der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-Poren während der Apoptose kommt es zur Freisetzung mitochondrialer Proteine wie z.B. Cytochrom C ins Cytosol. Cytochrom C ist ein wesentlicher Bestandteil des apoptotischen Signalweges. Zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 bildet es einen Komplex, das sog. „Apoptosom“, durch den es zur Aktivierung der Caspase-9 kommt, die wiederum die Aktivierung weiterer downstream-Caspasen initiiert, wie z.B. Caspase-3, und schließlich zu den Apoptose-assoziierten metabolischen Veränderungen der Zelle (DNA-Degradation, PS-Externalisierung etc.) führt [32, 52, 58, 62] (Abb. 6).

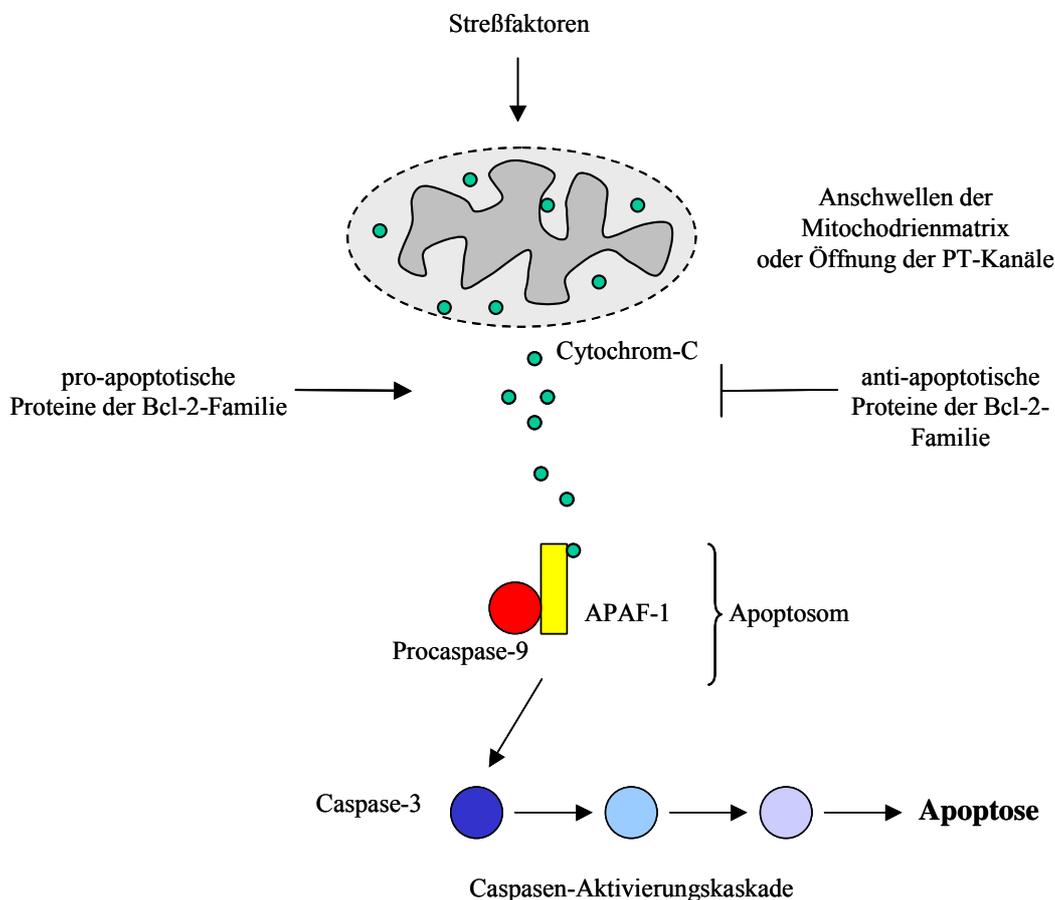


Abb. 6: Regulation der Apoptose über den Mitochondrien-Signalweg. (Modell nach [52, 63]). Stressfaktoren induzieren die Translokation von pro-apoptischen Bcl-2-Familie Proteinen zu den Mitochondrien, wo sie die Freisetzung von Cytochrom-C induzieren. Cytochrom-C bildet zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 das sog. Apoptosom. Dies induziert die Aktivierung von Caspase-9, die wiederum Caspase-3 aktiviert und schließlich zur Apoptose führt.

In HeLa Zellen konnte z.B. gezeigt werden, dass Caspase-3 ein Protein aktiviert, das direkt die DNA fragmentiert [64]. Die aktivierten Caspasen können, neben der Ausführung der Apoptose als Effektor-Caspasen, in einem verstärkenden Rückkopplungsprozess wiederum die Permeabilität der Mitochondrien-Membranen erhöhen und so die Apoptose beschleunigen [65].

2.3 Das CD95-Rezeptor/Ligand-System

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose wird durch sog. „death receptors“ ermöglicht. Diese Rezeptoren gehören zur TNF (Tumor Nekrose Faktor)-Familie, die sich durch eine Cysteinreiche extrazelluläre Domäne auszeichnen [66, 67]. Intrazellulär weisen diese Rezeptoren eine homologe Sequenz auf, die sog. „death domain“. Zur TNF-Familie zählen die Rezeptoren Fas (CD95), die TNF- α -Rezeptoren TNF-RI (CD120a bzw. p55) und TNF-RII (CD120b bzw. p75) sowie TRAIL-RI-IV.

Der am besten charakterisierte „death receptor“ ist CD95 (Fas/APO1). Die Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor führt zu dessen Trimerisierung und damit Aktivierung [68]. Dabei kommt es zur Bildung des sog. DISC-Komplexes („death-inducing-signaling-complex“), indem der intrazelluläre Teil des CD95-Rezeptors an das Adapter-Protein FADD („Fas-associated death domain“ auch MORT1, „mediator of receptor-induced toxicity 1“) gebunden wird, das wiederum eine Effektor-„death domain“ enthält [69-71]. An diese Domäne bindet nun die zymogene Form von Caspase-8 (auch FLICE, „FADD-like ICE“ oder MACH, „MORT1-associated CED-3“), die durch die Bindung oligomerisiert und aktiviert wird und in diesem Zustand weitere Caspasen aktiviert [71, 72]. Caspase-8 stellt damit die erste aktivierte Caspase im CD95-induzierten Signalweg dar [73]. Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-8 infolge ihrer Aktivierung Caspase-3, -6 und -7 aktiviert (Abb. 7). Der CD95-induzierte Apoptose-Signalweg kann auch über die Mitochondrien verlaufen. Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-8 das BH3-only Protein Bid aktiviert, welches die Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien induziert und so über die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 die Caspasen-Aktivierungskaskade in Gang setzt, die schließlich zur Apoptose führt [63].

CD95 und sein Ligand CD95-L spielen eine große Rolle in der physiologischen Apoptose-Induktion wie z.B. bei der peripheren Deletion von aktivierten reifen T-Zellen nach einer Immunantwort oder bei der Vernichtung von Virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen [71]. Die biologische Bedeutung des CD95-Rezeptor/Ligand-Systems konnte in Mauslinien und Patienten mit CD95 oder CD95-L Gen-Mutationen gezeigt werden [71]. Mutationen in diesen Genen führen zu einer Akkumulation

von peripheren lymphatischen Zellen und zu einem fatalen Autoimmunsyndrom charakterisiert durch eine Vergrößerung der Lymphknoten.

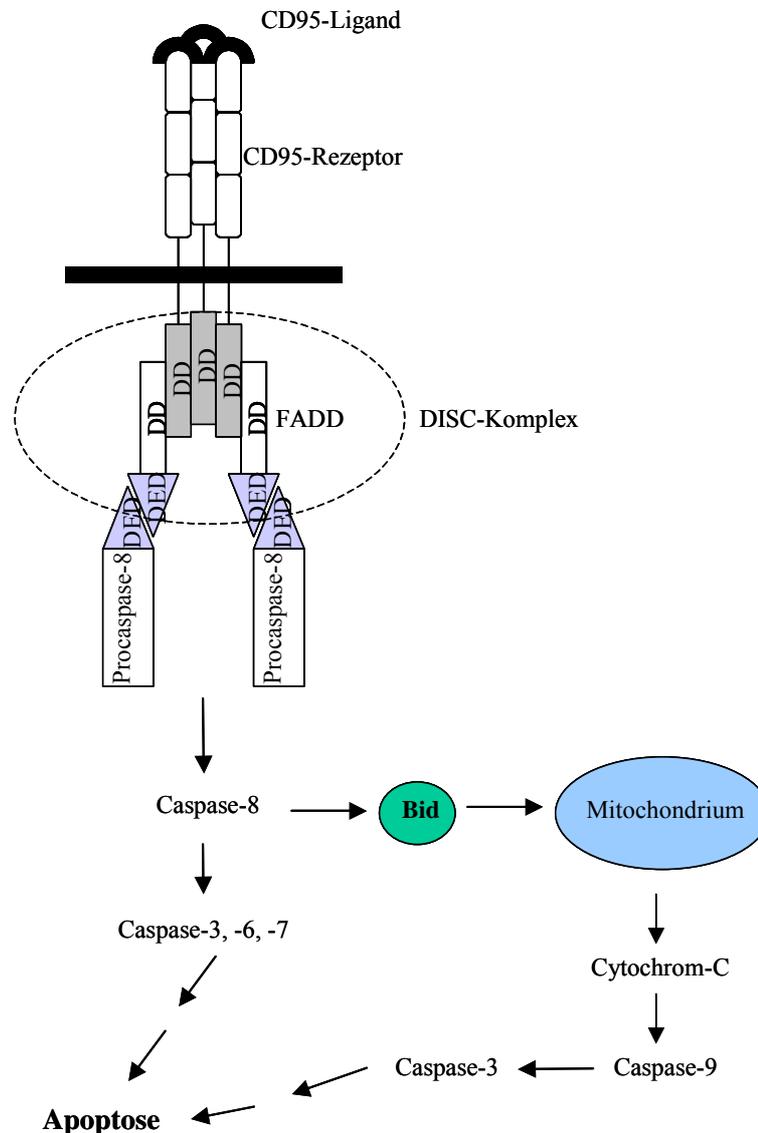


Abb. 7: Der CD95-vermittelte Apoptose-Signalweg. Die Bindung des CD95-Liganden führt zur CD95-Rezeptor-Trimerisierung und zur Bildung des sog. DISC-Komplexes, durch den in Folge die Aktivierung von Caspase-8 und schließlich Apoptose induziert wird (siehe Text). DD= „death domain“ DED= „death effector domain“ [71]. Der CD95-Signalweg kann über die Caspase-8-induzierte Spaltung von Bid auch den mitochondrialen Signalweg aktivieren und durch die von Bid gesteuerte Freisetzung von Cytochrom-C Apoptose auslösen[63].

2.4 Molekulare Mechanismen der Chemotherapeutika Doxorubicin und Dexamethason

Glukokortikosteroide und Anthrazykline wie z.B. Dexamethason und Doxorubicin stellen wichtige Substanzen dar, die in der Therapie akuter Leukämien eingesetzt werden. Die

Erforschung der intrazellulären Signalwege, die durch diese Agenzien in Leukämiezellen induziert werden sind daher von besonderem Interesse.

Doxorubicin gehört chemisch zur Gruppe der Anthrazykline, die eine Reihe unterschiedlicher biologischer Effekte auf die Zelle aufweisen [74]. Im Vordergrund steht dabei die Schädigung der DNA, die durch eine Wechselwirkung der Anthrazykline mit dem zellulären Genom durch DNA-Interkalation und die indirekte Inhibition des Enzyms Topoisomerase-II hervorgerufen wird [75]. Die Schädigung der DNA führt zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 und führt schließlich zur Induktion von Apoptose [76]. p53 stellt einen zentralen Faktor der zellulären Reaktion auf eine DNA-Schädigung dar. Das p53-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der normalerweise schwach exprimiert wird, aber einen rapiden Anstieg z.B. nach Bestrahlung oder Inkubation mit DNA-schädigenden Substanzen zeigt. Dieser Anstieg kann sowohl zur Zellzyklusarretierung als auch zur Apoptose führen [77, 78]. Ein p53-abhängiger sog. „Checkpoint“ bewirkt einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nach Inkubation mit DNA-schädigenden Substanzen [79-82]. Dabei werden endogene Reparaturmechanismen eingeschaltet, die verhindern sollen, daß geschädigte DNA repliziert (Checkpoints in der G1- und S-Phase) bzw. an die Tochterzellen weitergegeben wird (G2-Checkpoint) [83].

Regulationsmechanismen, die der Apoptoseinduktion durch p53 zugrundeliegen, sind komplex und können mehrere Targetgene einbeziehen. Proapoptotische p53 gesteuerte Zielgene sind z.B. bax, CD95, der TRAIL-Rezeptor DR5 [62] und die BH3-only Gene bbc3 [84], Noxa und PUMA [85].

Bax stellt ein direkt durch p53 gesteuertes Effektor-Molekül in der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose dar und kann z.B. durch Doxorubicin, Etoposid oder Cisplatin induziert werden [78, 86]. In verschiedenen leukämischen Zelllinien, u.a. in kindlichen ALL Linien, konnte eine p53-abhängige Hochregulation von Bax durch DNA-Schädigende Substanzen wie Doxorubicin oder ionisierende Strahlung nachgewiesen werden [87-89].

Anthrazykline wie Daunorubicin können über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auch die Expression von anti-apoptotischen Zielgenen induzieren. Zu den Targetgenen, die durch NF- κ B reguliert werden gehört unter anderem Bcl-x_L [62, 90].

Eine Beteiligung von Proteinen der Bcl-2-Familie in der Doxorubicin-induzierten Apoptose konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden. In T- und B-lymphoiden Tumor-Zelllinien sowie in Patientenproben wurde ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) nach einer Inkubation der Zellen mit Doxorubicin beobachtet, der durch Überexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L inhibiert werden konnte [91].

Weiterhin wird eine Beteiligung des CD95-Signalweges in der Regulation der Doxorubicin-induzierten Apoptose diskutiert [62]. Mehrere Studien berichten über eine Beteiligung des CD95-Rezeptor/Ligand-Systems in der Doxorubicin-induzierten Apoptose in leukämischen

Zelllinien [92-94]. Dabei wurden eine durch Doxorubicin-induzierte Hochregulation sowohl des CD95-Rezeptors als auch des CD95-Liganden mit daraus resultierender CD95-abhängiger Apoptose beobachtet und es bestand eine Kreuzsensitivität gegenüber einer Apoptoseinduktion durch CD95-Ligation und Doxorubicin [95, 96]. In einer Studie konnte eine Beteiligung des CD95-Rezeptor/Ligand Systems in der Doxorubicin-induzierten Apoptosis in zwei Patientenproben (1 Vorläufer-T-Zell ALL, 1 T-NHL) nachgewiesen werden, in denen ebenfalls eine Kreuzsensitivität zu den beiden Signalwegen und eine Hochregulation von CD95-Ligand durch Doxorubicin erfolgte [95]. Gegen eine Beteiligung des CD95-Systems in der Apoptose-Induktion durch Doxorubicin sprechen Studien an leukämischen Zelllinien, in denen das Chemotherapeutikum keine Expression von CD95-Ligand induzieren konnte [97, 98] und die Blockierung des CD95-Rezeptors oder -Ligands keinen Apoptose-inhibierenden Effekt zeigte [99, 100]. Desweiteren konnten keine Unterschiede zwischen CD95-resistenten und -sensitiven parentalen Zelllinien hinsichtlich der Doxorubicin-induzierten Apoptose beobachtet werden [99, 101]. Bisher wurden jedoch noch keine repräsentativen Studien an einer größeren Anzahl von frischen Leukämieproben durchgeführt, die eine Rolle des CD95-Signalweges in der Doxorubicin-induzierten Apoptose bestätigen.

Glukokortikosteroide, zu denen auch das synthetische Dexamethason gehört, sind körpereigene Botenstoffe, die zellphysiologisch eine bedeutende Rolle spielen. So stellen sie beispielsweise wichtige Faktoren in der Thymozyten-Differenzierung und in der Regulation der Antigen-spezifischen T-Zellentwicklung dar [102]. Glukokortikosteroide beeinflussen durch die spezifische Bindung an ihren intrazellulären Rezeptor die Expression zahlreicher Zielgene, die dadurch aktiviert oder supprimiert werden können [103, 104]. In Leukämien sind die hemmende Wirkung von Glukokortikosteroiden auf die Proliferation und die Induktion der Apoptose von besonderer Bedeutung. Eine Resistenz gegen Glukokortikosteroide ist häufig verantwortlich für ein schlechtes Therapieansprechen in ALL. Die wachstumshemmende Wirkung der Glukokortikosteroide auf Zellen ist seit langem bekannt und der durch Dexamethason induzierte G1-Arrest bereits 1979 in einer humanen lymphatischen Zelllinie beschrieben worden [105]. In weiteren Studien, z.B. an humanen T-Lymphozyten, konnte die anti-proliferative Wirkung von Glukokortikosteroiden bestätigt werden [106]. Die wahrscheinlich für die Zellzyklus-Progression verantwortlichen Zielgene, die durch Dexamethason inhibiert werden, sind z.B. Kontrollgene der G1/S-Phase des Zellzyklus wie das Oncogen c-myc, das Rb (Retinoblastom-Gen) und Cyclin D3 [104, 107, 108]. In verschiedenen Zellsystemen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Wirkung der Glukokortikosteroide auf Proliferation und Apoptose. So induziert Dexamethason in transformierten lymphoiden Zellen einen Zellzyklusarrest in G1-Phase und Apoptose [109]

und in murinen T-Lymphomzellen der Linie P1798 wurde beobachtet, daß Gene, die Resistenz zu Glucocorticoid-induziertem Zellzyklusarrest vermitteln auch Resistenz zu Apoptose bewirken [107]. In der Vorläufer-T-Zell ALL Zelllinie CCRF-CEM wurde gezeigt, dass das Gen p16^{INK4A} den Zellzyklus in G0/G1 arretiert und dadurch die Sensitivität der Zellen gegenüber Glucocorticoid-induzierter Apoptose erhöht ist [110]. In Mikroarray Analysen an Zellen der leukämischen B-Zelllinie 697 konnte gezeigt werden, dass im Zuge der Glucocorticoid-induzierten Apoptose verschiedene anti-proliferative (z.B. p19(INK4d)) und Apoptose-relevante Gene (BTG1, BTG2, Granzym-A) auf transkriptioneller Ebene durch Glukokortikosteroide hochreguliert werden [111].

Der Apoptose-induzierende Effekt von Dexamethason wurde bereits in mehreren Zellsystemen beschrieben, wobei kortikale Thymozyten das klassische Beispiel für die Dexamethason-induzierte Apoptose bilden [112]. Die intrazelluläre Regulation der Glucocorticoid-induzierten Apoptose und damit die für eine Resistenz verantwortlichen Gene und Genprodukte sind noch weitgehend unbekannt. Obwohl bisher noch keine Glucocorticoid-induzierbaren pro-apoptotischen Gene identifiziert wurden [113], ist bekannt, dass viele Proteine durch Glukokortikosteroide auf der transkriptionellen sowie der posttranskriptionellen Ebene im Zuge der Glucocorticoid-induzierten Apoptose moduliert werden können [114]. Die Apoptose-induzierende Wirkung der Glukokortikosteroide scheint dabei eher durch die Inaktivierung von Genen, die Überlebenssignale übermitteln, zu erfolgen. Der Glucocorticoid-Rezeptor inaktiviert verschiedene Moleküle wie z.B. AP-1 oder NF- κ B, die als Transkriptionsfaktoren Zytokingene aktivieren und dadurch das Wachstum und Überleben von Zellen regulieren [114].

Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung der Bcl-2-Familie Proteine in der Glucocorticoid-induzierten Apoptose. Die Expression von Bcl-2 scheint einer Apoptose-Induktion durch Glukokortikosteroide entgegenzuwirken. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass ein Verlust des bcl-2 Gens zu einer Beschleunigung der Glucocorticoid-induzierten Apoptose in Thymozyten führt [115], während eine Überexpression von bcl-2 eine Resistenz gegenüber Glukokortikosteroide verursacht [33, 116]. Auch in leukämischen Zelllinien und akuten Leukämien konnte bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen der Sensitivität gegenüber Glukokortikosteroiden und der Expression von Bcl-2-Familie Proteinen beobachtet werden [117-119].

Weitere Studien an verschiedenen leukämischen Zelllinien und ALL deuten darauf hin, daß eher das Verhältnis von anti- zu pro-apoptotischen Bcl-2 Proteinen als die Expression eines Proteins allein die Sensitivität zu Glukokortikosteroiden bestimmt [120, 121].

Unter der Behandlung von Glukokortikosteroiden konnten auch Apoptose-abhängige Expressionsveränderungen von Bcl-2-Familie Proteinen beobachtet werden. In Zellen der myeloischen leukämischen Linie M1 wurde eine differenzielle Regulation verschiedener

Proteine durch Dexamethason beobachtet, mit einer Herunterregulation von Bcl-2 und Bax bei gleichzeitiger Hochregulation von Bcl-x [122]. In Studien an CLL konnte eine durch Glukokortikosteroide induzierte Veränderung der Expression von Bcl-2-Familie Proteinen demonstriert werden, die zu Verschiebungen der Verhältnisse von pro- zu anti-apoptotischen Proteinen führte, die mit der Sensitivität der Zellen korrelierte [119, 123]. *In vivo* Studien an kindlichen ALL zeigten, dass eine Behandlung der Patienten mit Glukokortikosteroiden zu einer Expressionsveränderung von Bcl-2-verwandten Proteinen führt und vor allem Bcl-x_L eine Rolle bei der Protektion vor der Glucocorticoid-induzierten Apoptose zu sein scheint [124].

Eine direkte Regulation von Genen der bcl-2-Familie durch Glukokortikosteroide im Zuge der Glucocorticoid-induzierten Apoptose scheint nach den neuen Erkenntnissen, die mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie gewonnen wurden, jedoch unwahrscheinlich [125].

Neben der Bedeutung der Expression wird aber auch der intrazellulären Lokalisation von Bcl-2-verwandten Proteinen eine Rolle in der Glucocorticoid-induzierten Apoptose zugeschrieben. So wurde mit Hilfe biochemischer Zellfraktionierungsexperimente an murinen Thymozyten demonstriert, daß infolge einer Behandlung mit Dexamethason die Proteine Bax und Bcl-x_L ihre intrazelluläre Lokalisation ändern und aus einer im Zytoplasma gelösten in eine membrangebundene Form übergehen [53].

Die Glucocorticoid-induzierte Apoptose zeigte in mehreren Zellsystemen eine Abhängigkeit von Komponenten, die im Mitochondrien-assoziierten Signalweg eine Rolle spielen. Ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials durch Glukokortikosteroide und eine darauf folgende Freisetzung von Cytochrom-C wurde bereits beschrieben u.a. auch in B-CLL [59]. Ebenso zeigte sich, daß durch die Inhibition der mitochondrialen PT-Poren Glucocorticoid-induzierte Apoptose-assoziierte Zellveränderungen (Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation, PS-Externalisierung) unterdrückt werden können [126]. Neben dem mitochondrialen Signalweg wurde auch eine Beteiligung des CD95/CD95-Ligand-Systems in der Glucocorticoid-induzierten Apoptose postuliert [125]. Tatsächlich konnte in Monozyten gezeigt werden, dass im Zuge der Glucocorticoid-induzierten Apoptose CD95 sowie der CD95-Ligand hochreguliert werden [127]. Die Glucocorticoid-induzierte Apoptose war dabei abhängig von einem funktionellen Liganden.

2.5 Zytokine als Regulationsfaktoren in der Apoptose und Hämatopoese der T-Zell-Entwicklung: Zentrale Rolle von Interleukin-7

Zytokine sind interzelluläre Mediatoren, die von Zellen des Immunsystems bzw. mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Stromazellen) synthetisiert werden und

Immunantwort, zelluläre Proliferation und Differenzierung modulieren können. Die verschiedenen Zytokine weisen spezifische Wirkungen auf unterschiedliche Zelltypen auf. Die Sensitivität hämatopoetischer Zellen gegenüber Zytokinen hängt dabei vom Differenzierungsstadium und der Linienzugehörigkeit der Zellen ab [28, 128, 129].

Neben ihrer Funktion als Differenzierungs- und Proliferationsfaktoren, gewinnen Zytokine als antiapoptotische Überlebensfaktoren zunehmend an Bedeutung. Es hat sich gezeigt, daß viele Zytokine modulierend auf den Prozeß der Apoptose wirken können, z.B. durch die Übermittlung von Überlebenssignalen [130]. Die Wirkung von Zytokinen als Überlebensfaktoren wurde in Experimenten an humanen B-Lymphoblasten gezeigt, in denen eine Kokultivierung mit Stromazellen aus dem Knochenmark, die als Syntheseort verschiedener Faktoren gelten, zu einer Inhibition der *in vitro* Apoptose führte [131] und in verschiedenen Zytokin-abhängigen Zelllinien, in denen der Entzug von Zytokinen zur Induktion von Apoptose führt, konnte gezeigt werden, daß eine Zugabe von Zytokinen das Überleben der Zellen bewirkt [132, 133].

In der normalen T-Zell-Entwicklung spielt vor allem die γ -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2R γ) eine bedeutende Rolle, die eine gemeinsame Untereinheit der Rezeptoren für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 darstellt [134]. Experimente an „knock-out“-Mäusen zeigten, daß das Fehlen dieser IL-2R γ -Kette zu drastischen Störungen in der frühen T-Zellentwicklung führt [134-137].

Mäuse mit Defizienz zu einzelnen der oben genannten Zytokine zeigen in den meisten Fällen keine Beeinträchtigung der Lymphopoese, was auf eine funktionell redundante Wirkung der Zytokine hinweist. [138, 139]. Eine Ausnahme bildet jedoch IL-7. IL-7 wurde ursprünglich durch seine Proliferations-induzierende Wirkung in murinen pro-B-Zellen entdeckt [140]. IL-7 spielt eine kritische Rolle in der Entwicklung von T-Zellen im Menschen und wird zum größten Teil im Thymus von Zellen gebildet, die MHC II exprimieren und wahrscheinlich zum kortikalen epithelialen Zell-Populationen gehören [141, 142]. Diese Zellen bilden auch SCF (Stem cell factor), das synergistisch mit IL-7 die Proliferation von Thymozyten induziert. Weiterhin wird IL-7 im Knochenmark von Stromazellen gebildet, die ebenfalls auch SCF exprimieren [143].

In knock-out Mäusen resultierte das Fehlen von IL-7 in einer Unterdrückung der Lymphopoese mit einer drastischen Reduktion der Anzahl von T-Zellen in den lymphoiden Organen und im peripheren Blut und einem teilweisen Block in der Reifung von pro-T-Zellen zu prä-T-Zellen [140, 144, 145]. Die kritische Rolle von IL-7 für die frühe T-Zell-Entwicklung konnte auch durch den Einsatz blockierender Antikörper gegen IL-7 und IL-7-Rezeptor in chimären Mensch-Maus Thymus-Organokulturen demonstriert werden. [28, 146].

Mäuse, denen die Gene für IL-7 oder IL-7R α fehlen, zeigen, im Gegensatz zu IL-2 oder IL-4 defizienten Mäusen, starke Störungen in der Thymozyten-Entwicklung [144, 145]. Eine

Analyse von Thymozyten von IL-7-defizienten Mäusen zeigte, dass die Zellen in ihrer Entwicklung im dreifach negativen Stadium arretiert sind (CD3-, CD4-, CD8-) [145]. Diese Zellen zeichnen sich aus durch eine erhöhte Rate spontaner Apoptose, die mit einem verringerten Expressionsniveau des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und einer erhöhten Expression des pro-apoptotischen Bax einhergeht [147]. Eine Behandlung dieser dreifach-negativen Thymozyten mit IL-7 führte zu einer Hochregulation der Bcl-2 Expression und einer Inhibition der Apoptose [148]. Darüberhinaus konnte eine Überexpression von Bcl-2 in IL-7-defizienten Mäusen die normale T-Zell-Entwicklung zum großen Teil wiederherstellen, was darauf hindeutet, dass IL-7 seine anti-apoptotische Wirkung über die Hochregulation von Bcl-2 ausübt [149]. Interessanterweise wird die durch IL-7 induzierte Inhibition der Apoptose in isolierten pro-T-Zellen nicht von Änderungen der Zellzyklusverteilung begleitet. Es wird daher angenommen, dass IL-7 für die T-Zell-Entwicklung eher als „trophischer“ oder Überlebensfaktor und weniger als Wachstumsfaktor eine Rolle spielt [148].

Die Abhängigkeit von IL-7 während der Lymphopoese spiegelt sich auch in der Expression des IL-7-Rezeptors in der normalen T-Zell-Entwicklung wider. Der IL-7-Rezeptor wird bereits in sehr frühen T-Zell-Vorläuferzellen exprimiert. Im Thymus zeigt sich eine positive Expression von IL-7R α in CD4-/CD8- Vorläuferzellen [150]. In der weiteren Entwicklung (im doppelt positiven Stadium, CD4+/CD8+) wird der Rezeptor nicht exprimiert. Spätere T-Zell-Stadien zeigen dann wieder Expression des Rezeptors, der in diesen Zellen das Überleben fördert [147]. Man nimmt an, daß der vorübergehende Verlust des Rezeptors wichtig für die negative/positive Selektion ist, der die doppelt positiven Zellen unterzogen werden, da IL-7 diesen für die Eliminierung autoimmunreaktiver Zellen wichtigen Prozeß wahrscheinlich durch die Übermittlung von Überlebenssignalen unterbinden würde [140].

Dem Zytokin IL-7 kann demnach eine einzigartige Bedeutung für die normale T-Zell-Entwicklung zugeschrieben werden.

3. Fragestellung

Akute lymphatische Leukämien können anhand ihres Immunphänotyps in unterschiedliche Subtypen der Vorläufer B- bzw. Vorläufer-T-Zell ALL unterteilt werden. Die Vorläufer-T-Zell ALL stellen eine Untergruppe akuter Leukämien dar, die *in vivo* und *in vitro* eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zeigen. Verschiedene immunphänotypische Eigenschaften, wie z.B. ein unreifer pro/prä-T-ALL Phänotyp, scheinen in Vorläufer-T-Zell ALL mit einem erhöhten Risiko eines Therapie-Versagens assoziiert zu sein [14]. Es hat sich allerdings gezeigt, dass der prognostische Wert dieser Faktoren, z.B. je nach Therapieprotokoll, unterschiedlich sein kann. Die Immunphänotypisierung stellt daher noch einen unsicheren prognostischen Faktor dar und wird bisher nicht routinemäßig für eine Bewertung des Risikos oder den Einsatz neuer Behandlungsstrategien in Vorläufer-T-Zell ALL eingesetzt [14]. Kenntnisse über die zellbiologischen Eigenschaften von Vorläufer-T-Zell ALL hinsichtlich Apoptose-Induktion im Zusammenhang mit dem vorliegenden Immunphänotyp könnten zu einer Verbesserung der Therapiestrategien beitragen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Mechanismen, die der Induktion und Regulation der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL zugrunde liegen, identifiziert und in Zusammenhang mit immunphänotypischen, labordiagnostischen und klinischen Eigenschaften gebracht werden. Folgende Untersuchungen an Vorläufer-T-Zell ALL sollten durchgeführt werden:

1. *In vitro* Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion (spontane Apoptose sowie induzierte Apoptose durch Dexamethason, Doxorubicin, CD95).
2. Anti- bzw. pro-apoptotische Signalwirkung der T-Zell relevanten Zytokine *in vitro* (Einfluß von Zytokinen auf spontane und induzierte Apoptose sowie Zellzyklus).
3. Konstitutive Expression von apoptoserelevanten Molekülen und deren Änderung in Korrelation zum Apoptoseverhalten und Zytokinansprechen.
4. Bedeutung des immunologischen Phänotyps der Vorläufer-T-Zell ALL für das Apoptoseverhalten und Zytokinansprechen.
5. Vergleich zwischen dem *in vitro* Apoptoseverhalten und Zytokinansprechen mit dem klinischen Therapieverlauf *in vivo*.