

Material und Methoden

1. Patientenproben und klinische Daten

Untersucht wurden Proben aus dem Knochenmark bzw. aus peripherem Blut von insgesamt 161 Kindern mit neu diagnostizierter akuter T-lymphoblastischer Leukämie (Vorläufer-T-Zell ALL). Die morphologisch nach den FAB-Kriterien diagnostizierten [151, 152] Proben wurden in unserem Labor im Rahmen der multizentrischen BFM-Studien zur Behandlung von kindlichen akuten lymphatischen Leukämien immunphänotypisch charakterisiert. Die leukämischen Blasten wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Biotech, Freiburg) isoliert und zeigten eine durchschnittliche Vitalitätsrate von 80-90%, die durch Tests unter Verwendung von Trypanblau und Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt wurde. Die Immunphänotypisierung erfolgte durchflußzytometrisch durch direkten oder indirekten Nachweis von membranständigen und intrazytoplasmatischen Antigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper [152, 153]. Die Positivität für bestimmte CD-Marker sowie die Subklassifikation der Proben (pro-/prä-, kortikale, reife Vorläufer-T-Zell ALL) erfolgte nach den Richtlinien der „European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)“ [15]. Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben enthielten mehr als 90% leukämischer Blasten.

Für die Korrelationen der *in vitro* erhaltenen Ergebnisse zum Apoptoseverhalten der leukämischen Blasten mit klinischen Daten wurde das frühe *in vivo* Ansprechen der Patienten auf die Induktionstherapie mit Prednison herangezogen, da sich gezeigt hat, dass die frühe *in vivo* Blastenreduktion einen unabhängigen prognostischen Faktor in Kindern mit ALL darstellt [154-156]. Das frühe *in vivo* Ansprechen wird durch den Blastenanteil im peripheren Blut am Tag 8 und dem Anteil der Blasten im Knochenmark am Tag 15 der Therapie bewertet. Während der ersten 14 Tage der Therapie wurden Methotrexat intrathekal (am Tag 1), Prednison (täglich, in rasch ansteigender Dosis ab Tag 1), Vincristin und Daunorubicin (am Tag 8) und Asparaginase (am Tag 12) verabreicht [157]. Das Vorhandensein von mehr als 1000 Blasten/ μ l Blut am Tag 8 der Therapie wird als schlechtes Ansprechen auf Prednison definiert („prednison poor response“).

Die meisten der untersuchten Patienten waren in der multizentrischen ALL-BFM Studie behandelt [2, 157, 158]. Für die Korrelation zwischen dem *in vitro* Ansprechen auf IL-7 und dem *in vivo* Ansprechen am Tag 8 und am Tag 15 der Therapie konnten klinische Daten von 82 bzw. 59 Patienten herangezogen werden. Für die Korrelation zwischen dem *in vitro*

Ansprechen auf Dexamethason oder Doxorubicin und dem *in vivo* Ansprechen am Tag 8 und am Tag 15 der Therapie lagen klinische Daten von 63 bzw. 51 Patienten vor.

2. Zelllinien

Untersucht wurden die leukämischen T-Zelllinien P12/Ichikawa, Molt-3, KE-37, Jurkat, PF-382, Peer, BE-13 und CCRF-CEM. Die leukämischen Linien wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen. Alle Kulturen waren frei von Kontaminationen durch Mycoplasmen und wurden regelmäßig durch einen PCR-Primer-Set Kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) überprüft.

3. Zellkultivierung

Zelllinien wurden in 50-ml-Kulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) in einer Konzentration von $0,1 - 0,3 \times 10^6$ Zellen/ml Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Weiterführung der Zellkulturen erfolgte durch regelmäßige Verdünnung der Zellsuspension mit frischem Medium in Zeitabständen von 2 - 3 Tagen. Aliquots von jeder Zelllinie wurden kryokonserviert und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Patientenproben wurden in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) Standardmedium unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% inaktiviertem (56°C, 30 Min.) fötalem Kälberserum (FCS; Gibco BRL, Paisley, UK) kultiviert.

4. Durchflußzytometrie: Das Prinzip und Anwendung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Proteinexpression, Apoptose und Proliferation wurden mit Hilfe der Technik der Durchflußzytometrie durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson).

Die Methode der Durchflußzytometrie ermöglicht die Analyse und Charakterisierung einzelner Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden und lichtstreuenden Eigenschaften. Dazu werden Zellen in Suspension durch spezielle Vorrichtungen des Durchflußzytometers in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl wie Perlen einer Perlenkette aneinandergereiht („hydrodynamische Fokussierung“) und passieren so einzeln einen Laserstrahl. Physikalische

Zelleigenschaften wie Größe und Granularität bestimmen die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung gibt Auskunft über die Größe der Zelle, d. h. je größer die Zelle, desto größer ist die Streuung in Vorwärtsrichtung. Der Parameter für die Vorwärtsstreuung wird als FSC (engl. „forward scatter“) bezeichnet. Desweiteren erfolgt eine von der Granularität abhängige Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Diese Seitwärtsstreuung wird auch SSC (engl. „sideward scatter“) genannt und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist.

Die Zellen können auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden vom Laserlicht angeregt, d.h. ihre Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau emittieren sie Lichtenergie, die als Fluoreszenz sichtbar wird. Durch den Energieverlust während des Strahlungsüberganges besitzt das energieärmere emittierte Licht stets eine größere Wellenlänge als das energiereichere absorbierte Licht. Die Absorption des Lichts ist abhängig vom Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, und vom Fluorochrom, dessen Absorptionsspektrum im selben Wellenlängenbereich liegen muß. Bei Markierung von Zellen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen muß beachtet werden, daß sich die Absorptions- und Emissionsspektren voneinander unterscheiden.

Die gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften werden von speziellen Detektoren erfaßt und verstärkt (sog. „Photomultiplier“, PMT). Über spezielle Computer-Software werden die verschiedenen Parameter der Zelle gespeichert und analysiert.

Die Vorteile der Durchflußzytometrie liegen in der Möglichkeit mehrere verschiedene Parameter einer Zelle simultan zu erfassen. Zusätzlich können innerhalb von Sekunden mehrere Tausend Zellen erfaßt werden, wodurch eine aussagekräftige Statistik ermöglicht wird.

Die durchflußzytometrischen Messungen in dieser Arbeit wurden an einem FACScan Durchflußzytometer mit Argon-Laser (Becton Dickinson, Heidelberg) vorgenommen. Die Aufnahme und Auswertung der Zellparameter erfolgte mit Hilfe der Software „CellQuest“ Version 3.0 (Becton Dickinson, Heidelberg) an einem Power Macintosh 7600/120.

5. Untersuchungen zur Apoptose

Zur Induktion von spontaner Apoptose in Patientenproben wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 200- μ l-Schale auf 96-Schalen-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) in Kulturmedium ausgesät und für 24 h bei 37°C und unter 5 % CO₂ in der Atmosphäre inkubiert. Zur *in vitro* Untersuchung von Zelllinien wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen pro 1-ml-Schale auf 24-Schalen-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) in Kulturmedium ausgesät. Alle *in vitro* Ansätze wurden doppelt

ausgeführt. Die Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die *in vitro* Induktion von Apoptose erfolgte durch Zugabe von rekombinanten humanen Zytokinen ins Kulturmedium. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die für verschiedene T-Zellsysteme [159, 160] und auch in eigenen Titrationsexperimenten (nicht gezeigt) für optimal befunden wurden: 25 ng/ml IL-7, 50 ng/ml IL-4, 25 ng/ml IL-2 (Pharma Biotechnologie Hannover). Zum Testen der zytokinspezifischen Wirkung wurden in einigen Experimenten blockierende anti-IL-7 polyklonale Kaninchen Antikörper zugegeben (10 µg/ml; Pharma Biotechnologie Hannover). Zur Induktion von Apoptose durch Dexamethason und Doxorubicin in Vorläufer-T-Zell ALL wurde zunächst eine Titration zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen der beiden Chemotherapeutika an leukämischen Zelllinien durchgeführt. Doxorubicin (Adriblastin, Pharmacia & Upjohn, Milano, Italy) wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,008-5 µM dem Kulturmedium zugesetzt, wobei die eingesetzten Konzentrationen ausgehend von einer $3,4 \times 10^{-3}$ M Infusionslösung, die aliquotiert bei -20°C aufbewahrt wurde, hergestellt wurden. Dexamethason wurde, ausgehend von einer 1×10^{-2} M Infusionslösung (Fortecortin Mono 4, Merck), in fünf verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0.08-50 µM an Zelllinien getestet.

5.1 Färbung und Messung apoptotischer Zellen

Der Nachweis der Apoptose erfolgte mit Hilfe von Annexin-V-FITC/Propidiumjodid (PI) an unbehandelten und *in vitro* inkubierten Zellen. Die Färbung der Zellen erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers (PharMingen, Hamburg).

Die Messung der Apoptose erfolgte an einem FACScan Durchflußzytometer (BectonDickinson). Während der durchflußzytometrischen Messung wurden 10 000 Zellen aufgenommen und die Fluoreszenz von FITC (FL-1) und PI (FL-3) gemessen.

Zur Auswertung wurden die Zellen in einem Punkt-Diagramm, in dem FL-3 gegen FL-1 aufgetragen wurde, dargestellt (Abb. 8).

In einem solchen Diagramm repräsentiert jeder abgebildete Punkt eine Zelle der Probe. Zellen mit Annexin-V⁻/PI⁻ stellen die lebende Fraktion innerhalb der Probe dar. Die Zellen mit Annexin-V⁺/PI⁻ sind früh apoptotisch, da sie Phosphatidylserin externalisiert haben, an das Annexin-V bindet, und noch eine intakte Plasmamembran besitzen, wodurch eine Färbung mit PI verhindert wird. Spät-apoptotische Zellen, die zusätzlich zur Annexin-Positivität aufgrund einer Desintegration der Plasmamembran mit PI anfärbbar sind, zeigen Positivität für beide Fluoreszenzen, Annexin-V⁺/PI⁺.

Das Ausmaß der spontanen Apoptose wurde als Differenz aus dem Anteil apoptotischer Zellen in der Medium-inkubierten Probe minus dem Anteil apoptotischer Zellen zum Zeitpunkt Null („T0“) der Inkubation berechnet:

$$\Delta N^{\text{spont}} [\%] := N^{\text{Medium}} [\%] - N^{\text{T0}} [\%]$$

N^{T0} ist dabei der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in der unbehandelten Probe und N^{Medium} der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in der Medium-inkubierten Probe. Proben mit einer spontanen Apoptoserate von $< 5 \%$ wurden als nicht apoptotisch betrachtet. Die Grenze von 5% ergibt sich aus der 2,5-fachen mittleren Standardabweichung resultierend aus zwei unabhängigen Messungen.

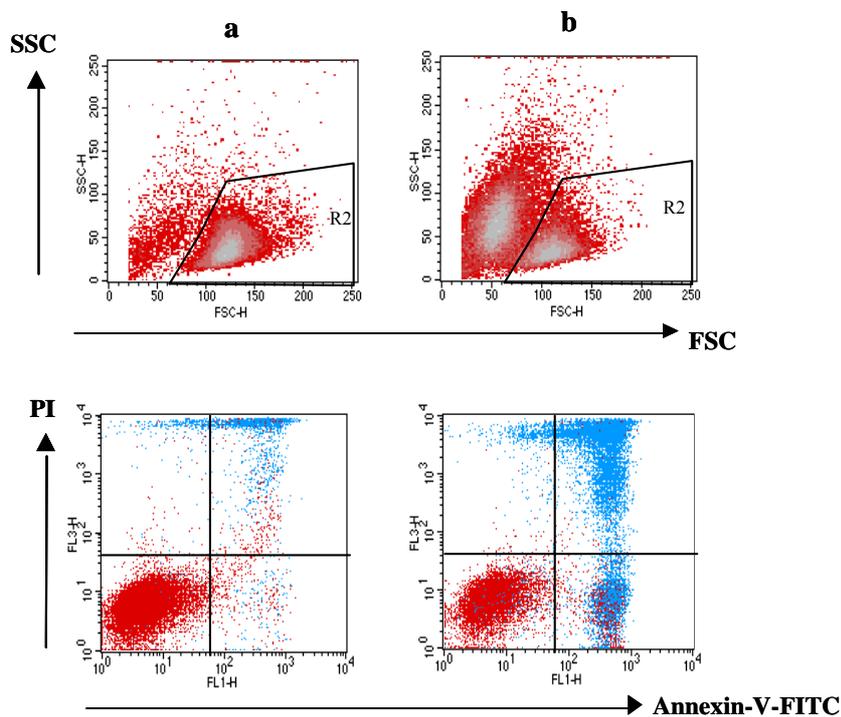


Abb. 8: Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe von Annexin-V-FITC und Propidiumjodid (PI) in Vorläufer-T-Zell ALL. a) unbehandelte Zellen, b) Zellen nach Induktion von Apoptose. Die Region R2 enthält Zellen, die nach ihren Lichtstreuungseigenschaften als lebend beurteilt werden. Diese Zellen sind in den unteren Punktdiagrammen rot dargestellt. Apoptotische Zellen sind Annexin-V-FITC positiv gefärbt. Es wird deutlich, daß sich innerhalb der Population aus R2 auch apoptotische Zellen befinden, die erst durch die Färbung der Zellen mit Annexin-V erfaßt werden können.

Das Ausmaß der Zytokinwirkung auf die spontane Apoptose wurde durch den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in der Medium-behandelten Probe minus dem prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in der Zytokin-behandelten Probe berechnet:

$$\Delta N^{\text{zytokin}} [\%] = N^{\text{Medium}} [\%] - N^{\text{zytokin}} [\%]$$

Eine Differenz von $\geq 5 \%$, die der 2,5-fachen mittleren Standardabweichung entsprach, wurde als Schwellenwert für die Zytokin-induzierte Modulation der Apoptose angesehen. In einigen

Experimenten (n=38) wurde die Apoptose parallel auch durch die Bestimmung des Subdiploiden DNA-Gehaltes nach Färbung der Zellen mit Propidiumjodid untersucht [161, 162]. Die Berechnung der spezifischen Chemotherapeutika-induzierten Apoptose erfolgte nach der von Debatin et al. [163] beschriebenen Gleichung unter Berücksichtigung der in Patientenproben parallel auftretenden spontanen Apoptose:

$$\text{spez.}N^{\text{Chem.}} [\%] = (N^{\text{Chem}} [\%] - N^{\text{medium}} [\%]) \times 100 / (100 - N^{\text{medium}} [\%])$$

Dabei handelt es sich bei N^{Chem} und N^{medium} um den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von Chemotherapeutika im Kulturmedium.

Das Ausmaß der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose im Beisein von IL-7 wurde entsprechend wie folgt berechnet:

$$\text{spez.}N^{\text{Chem+IL-7}} [\%] = (N^{\text{Chem+IL-7}} [\%] - N^{\text{medium}} [\%]) \times 100 / (100 - N^{\text{medium}} [\%])$$

5.2 Untersuchung der Zellzyklusverteilung

Die Auswirkungen der *in vitro* Behandlungen auf den Zellzyklus erfolgte durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Zellen. Um zusätzlich die Zytostatika-induzierte zellzyklusspezifische Apoptose zu untersuchen, wurde in unserem Labor eine Methode zur kombinierten Färbung von apoptotischen Zellen durch Annexin-V-FITC und der DNA mit Propidiumjodid entwickelt, wobei sich die Färbung der DNA auf bekannte Methoden stützte [161, 162].

Färbeprozedur:

1. Waschen der geernteten Zellen mit PBS durch Zentrifugation bei 1000 UpM und 4°C für 5 Minuten.
2. Annexinfärbung. (siehe unter 2.5.2. Schritt 2).
3. Fixierung der Zellen durch Zugabe von eiskaltem (-20°C) unvergälltem Ethanol unter Schütteln. Inkubation 30 Minuten bei 4°C.
4. Waschen der Zellen durch Zugabe von PBS und Zentrifugation bei 1000 UpM und 4°C für 5 Minuten.
5. Resuspendieren des Pellets in 200 µl DNA-Färbelösung bestehend aus 160 µl PBS, 10 µl RNase (Typ I-A, Boehringer, Mannheim) aus einer 10 mg/ml Stammlösung in PBS, 30 µl PI aus einer 750 µg/ml Stammlösung in PBS. Inkubation 30 Minuten im Dunkeln bei RT.
6. Messung am FACScan.

Bei der durchflußzytometrischen Messung wurden 10.000 Zellen/Probe hinsichtlich der Fluoreszenzen FL-1 für Annexin-V-FITC und FL-2-A (engl. „area“) und FL-2-W (engl. „width“) mit DDM (engl. „doublet-discriminating-modus“) für PI aufgenommen. Der DDM ermöglicht eine zeitliche Auflösung des Durchganges der Zellen durch den Laserstrahl und damit die Diskriminierung von Zelldupletts, die ein höheres Fluoreszenzsignal und eine längere Durchgangsdauer aufweisen als Einzelzellen, was einen höheren DNA-Gehalt vortäuscht. Bei der Auswertung wurden zunächst Zelldupletts durch entsprechendes Gaten im Dot Plot, indem FL-2-A gegen FL-2-W dargestellt wurde, ausgeschlossen (Abb. 9a). Nach Ausgaten der Zelldupletts können die Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen durch Darstellung in einem FL-2-A-Histogramm-Plot oder in einem Dot Plot mit FL-2-A gegen FSC, in dem neben dem DNA-Gehalt auch die Zellgröße berücksichtigt wird, bewertet werden (Abb. 9b, c).

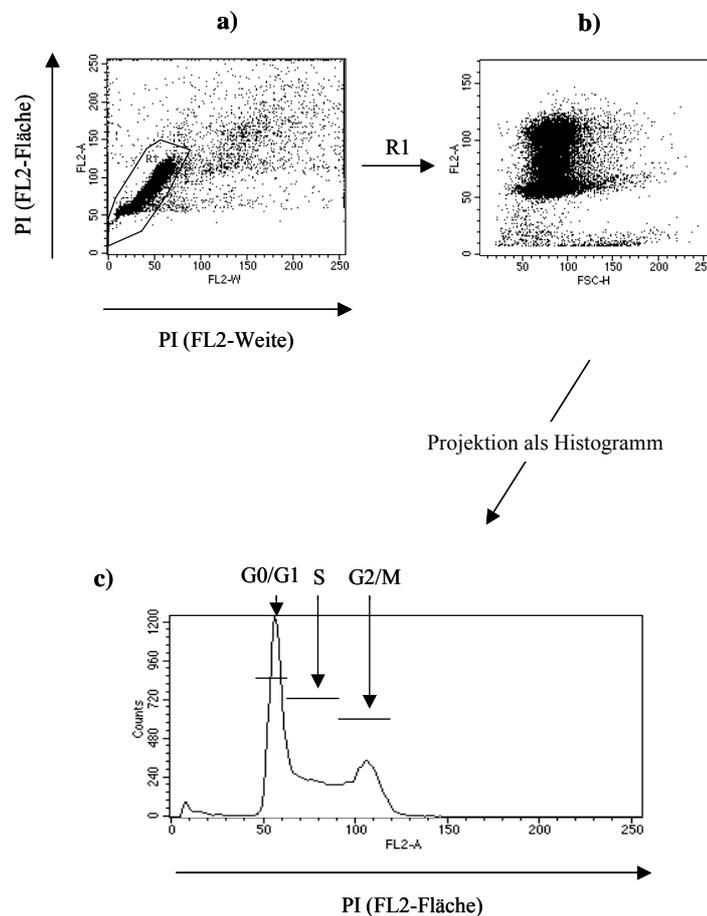


Abb. 9: Durchflußzytometrische Messung der DNA in Vorläufer-T-Zell ALL (Zelllinie P12/Ichikawa). Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert, mit RNase behandelt und mit Propidiumjodid gefärbt. Die Messung der Zellen erfolgte mit dem DDM-Modus am FACS-Scan. Die Auswertung der Zellzyklusverteilung in den Zellen erfolgte durch Ausschluß von Zell-Dupletts (a) und Darstellung der Zellen aus R1 (b). Durch Projektion der Zellen im Histogramm erhält man die charakteristische DNA-Kurve mit den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M.

Unbehandelte Zellen weisen die typische DNA-Verteilung mit Zellen in den Phasen G0/G1, S und G2/M auf. Der DNA-Gehalt steigt aufgrund der Proliferation in S-Phase und ist in G2/M doppelt so groß wie in G0/G1. Apoptotische Zellen besitzen aufgrund der im Zuge der Apoptose erfolgenden DNA-Fragmentation geringere DNA-Mengen und erscheinen als sub-G0/G1-Fraktion (Abb. 10). Apoptotische Zellen aus höheren Zellzyklusphasen, können jedoch mit nicht-apoptotischen Zellen aus unteren Zellzyklusphasen überlagern, wodurch es zu einer Verfälschung der DNA-Verteilung kommt. Mit Hilfe der Doppelfärbung können die apoptotischen Zellen im Plot mit FL-2-A gegen FL-1 hinsichtlich FL-1 von den lebenden Zellen unterschieden werden. Durch Gaten und Darstellung im Zweifarben-Plot mit FL-2-A gegen FSC wird die Überlagerung von apoptotischen und lebenden Zellen in den Phasen \geq G0/G1 erkennbar (Abb. 10). Die Auswirkungen der *in vitro* Behandlungen auf den Zellzyklus wurden daher durch Bestimmung der DNA innerhalb der lebenden, Annexin-V-negativen Population vorgenommen.

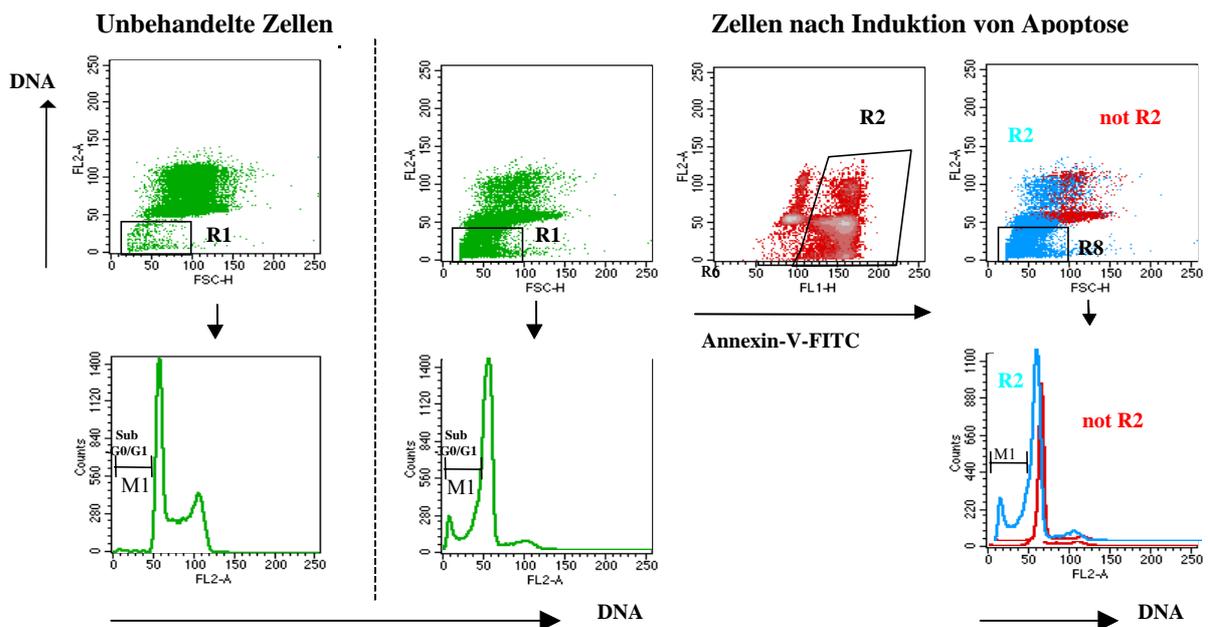


Abb. 10: Bestimmung der DNA-Verteilung in Vorläufer-T-Zell ALL (Zelllinie P12/Ichikawa). Die Zellen wurden mit Annexin-V-FITC gefärbt, mit Ethanol fixiert und die DNA mit Propidiumjodid gefärbt. Durch diese kombinierte Färbung können apoptotische Zellen diskriminiert werden, die aufgrund von DNA-Degradierung im Zuge der Apoptose die Bestimmung der DNA-Verteilung der lebenden Annexin-V-negativen Zellpopulation störend beeinflussen. Bei Induktion von Apoptose wird in der kombinierten Färbung deutlich, daß apoptotische Zellen (R2, blau) lebende Zellen (not R2, rot) überlagern, während in der einfachen Färbung ohne Annexin-V apoptotische Zellen nur als sub-G0/G1 (R1 und M1) Population sichtbar werden.

6. Untersuchungen der Antigenexpression an der Zelloberfläche

Die Zytokin-Rezeptoren IL-2R α (CD25), IL-7R α (CDw127) und IL-2R γ (CD132) wurden durch direkte Immunfluoreszenz mit Hilfe monoklonaler Maus-Antikörper nachgewiesen, die entweder mit Fluoreszein-Isothiocyanat FITC, (CD25, Klon 3G-10, Medac, Hamburg) oder Phycoerythrin, PE, (CDw127, Klon R34.34, Immunotech; CD132, Klon AG184, Pharmingen, Hamburg) gekoppelt waren. IL-4R α wurde indirekt durch einen monoklonalen Antikörper (CDw124, clone S4-56C9, Immunotech) und in einem zweiten Inkubationsschritt mit FITC-konjugiertem polyklonalem Ziege-anti-Maus-Antikörper (Medac, Hamburg) nachgewiesen. Die Oberflächenexpression von CD95 wurde durch einen PE-konjugierten monoklonalen Antikörper (Klon DX2, PharMingen, San Diego, USA) bestimmt.

Als Negativkontrolle wurden irrelevante Maus-Antikörper gleichen Isotyps verwendet (Immunotech, Marseille). Die Expression der Antigene wurde durchflußzytometrisch unter Verwendung von Kalibrierungs-Beads als Fluoreszenzstandards (DAKO FluoroSpheres, Dako, Glostrup, Denmark) quantifiziert und als MESF (engl. "molecules of equivalent soluble fluorochrome") angegeben.

7. Nachweis der intrazytoplasmatischen Expression der Proteine Bcl-2 und Bax

Zur Untersuchung der Expression der intrazellulären Proteine Bcl-2 und Bax wurden die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert, wobei ein Fixierungs/Permeabilisierungs-Kit verwendet wurde (Fix & Perm; An-der Grub, Kaumberg, Austria). Bcl-2 wurde direkt durch einen monoklonalen FITC-konjugierten Maus-Antikörper (Klon 124, Dako) nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente ein FITC-konjugierter irrelevanter Maus-Antikörper gleichen Isotyps (Immunotech). Bax wurde mit Hilfe eines Bax-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen synthetische Peptidsequenzen des Proteins gerichtet ist (I-19, Santa Cruz Biotech., CA), sowie mit monoklonalem Maus-Antikörper (Klon YTH-2D2, Trevigen) nachgewiesen. Die Antikörperbindung wurde indirekt mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG Serum bzw. Ziege-anti-Maus-IgG (beide von Medac) als Sekundärreagenz sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurden die Zellen im Beisein von sättigenden Mengen von blockierendem synthetischem Peptid (Santa Cruz) mit den Antikörpern inkubiert. Aus Titrationsexperimenten wurde eine effektive Blockierung mit 10 μ g Peptid gegen 1 μ g Antikörper ermittelt.

Die Immunfluoreszenz-Analysen wurden am FACScan durchgeführt. Aufgenommen wurden 10.000 Zellen/Probe. Da es im Zuge der Apoptose zu Degradationsprozessen und Verlust von Zellproteinen kommen kann, wurde die Protein-Expression nur innerhalb der lebenden Population bestimmt. Die lebenden Zellen wurden aufgrund ihres höheren FSC und

geringeren SSC identifiziert und anschließend die mittlere Fluoreszenzintensität in einem Fluoreszenz-Histogramm bestimmt. Die tatsächliche Fluoreszenzintensität der Probe wurde durch Subtraktion der mittleren Fluoreszenz der Negativkontrolle erhalten. Die Quantifizierung der Protein-Expression erfolgte in MESF-Einheiten („molecules of equivalent soluble fluorochrome“) mit Hilfe von Fluoreszenzstandards (Dako, Glostrup, Dänemark), die regelmäßig zur Kalibrierung der Fluoreszenzeinstellung des Gerätes gemessen wurden.

Zur Berechnung der relativen Expressions-Änderungen (Englisch: relative changes of expression, RCE) von Proteinen durch *in vitro* Behandlung wurden die MESF der behandelten Probe mit den MESF der unbehandelten Probe ins Verhältnis gesetzt. Die Expressionsveränderung eines Proteins im Zuge der spontanen Apoptose errechnet sich dabei durch $RCE^{Spont.} = MESF^{Medium}/MESF^{T0}$. Die Expressionsveränderungen durch IL-7 oder Chemotherapeutika errechnen sich aus $RCE^{IL-7 \text{ bzw. Chemoth.}} = MESF^{IL-7 \text{ bzw. Chemoth.}}/MESF^{Medium}$. RCE-Werte <1 bedeuten dabei eine Abnahme der Proteinexpression durch die Behandlung der Zellen, RCE-Werte >1 bedeuten Zunahme.

8. Intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Bedeutung der intrazellulären Lokalisation von Bcl-2-verwandten Proteinen für die Induktion der Apoptose wurden die Zellen einer Dreifarben-Analyse unterzogen, bei der gleichzeitig die Expression eines bestimmten Proteins in Kombination mit einer Färbung der Mitochondrien zur Lokalisierung des Proteins und einer Färbung mit Annexin-V zur Bestimmung von Apoptose in der selben Zelle gemessen werden konnte.

Bei der Dreifarben-Analyse wurde Apoptose durch eine Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC nachgewiesen.

8.1 Färbung der Zellen

Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker[®] Red CM-H₂XRos (Molecular Probes, Leiden, Holland) gefärbt. Dabei handelt es sich um ein rot-fluoreszierendes membranpermeables Agens, das in aktiven Mitochondrien akkumuliert wird und auch nach der Zellfixierung und -permeabilisierung erhalten bleibt. MitoTracker[®] Red lag lyophilisiert vor und wurde in DMSO gelöst als 33 µM Stammlösung aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. Für die Färbung wurden 0,33 µM durch Verdünnung mit RPMI eingesetzt.

Die intrazellulären Proteine wurden indirekt mit Cy5-konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht. Dabei wurde für Bax derselbe spezifische erste Antikörper eingesetzt wie für die Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression (s.o.). Für Bcl-2 wurde die unkonjugierte Form des monoklonalen (Klon 124) Antikörpers (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Als zweiter Antikörper wurde Cy5-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Medac, Hamburg) für Bax bzw. Ziege-anti-Maus-IgG1 (Medac, Hamburg) für Bcl-2 eingesetzt.

Färbeprozedur:

1. Waschen der Zellen mit PBS (Sigma, Deisenhofen) durch Zentrifugation bei 1000 UpM und 4°C für 5 Minuten.
2. Färbung der Mitochondrien: Zellpellet in 500 µl RPMI resuspendieren und 5 µl der MitoTracker® Red Stammlösung zugeben (s.o.). Inkubieren bei 37°C im Dunkeln für 30 Minuten. Zellen 2 × waschen mit PBS (siehe Schritt 1).
3. Färbung apoptotischer Zellen: Zellpellet resuspendieren in 200 µl Annexin-Bindungspuffer (s.o.) und Zugabe von 5 µl Annexin-V-FITC. Inkubation im Dunkeln bei RT für 5 Minuten.
4. Fixierung der Zellen durch Zugabe von 70 % eiskaltem (-20°C) Ethanol. Inkubation 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln.
5. Waschen der Zellen mit PBS.
6. Proteinfärbung: Zugabe von 10 µl RPMI mit 20 % FKS zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen. Bei den Negativ-Kontrollen zu Bax erfolgte zusätzlich die Zugabe des entsprechenden synthetischen Peptids.
7. Erste Antikörper-Inkubation (1 µg/10⁶ Zellen), 30 Minuten im Dunkeln bei RT.
8. Waschen mit PBS.
9. Zugabe von 50 µl RPMI mit 20 % FKS zum Pellet und zweite Antikörper-Inkubation (1 µg/10⁶ Zellen), 30 Minuten im Dunkeln bei RT.
10. Waschen mit PBS.
11. Fixierung durch Zugabe von 1 % Formaldehyd zum Pellet. Inkubation 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln.

8.2 Einbetten gefärbter Zellen zur Vorbereitung für die Mikroskopie

Die gefärbten und fixierten Zellen wurden gewaschen mit PBS und die Zellen aus dem Zellpellet auf 10-Felder-Objektträger (ICN, Ohio, USA) pipettiert. Nach dem vollständigen

Antrocknen wurde Glycergel (Dako, Glostrup, Dänemark), das zuvor im Wasserbad bei 60°C verflüssigt wurde, auf die angetrockneten Zellen getropft und sofort ein Deckglas unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Die eingebetteten Proben wurden nach dem Trocknen bei 4°C aufbewahrt.

8.3 Messung und Auswertung mit Hilfe konfokaler Laserscan-Mikroskopie

Der Erfolg der Färbung sowie die Einstellung eines geeigneten Bildausschnittes wurde zunächst durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Dazu wurde ein Inversmikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan) verwendet. Zur Beleuchtung diente eine Hochdruck-Quecksilberlampe (HB-10101 AF, Nikon, Japan).

Die Messung und Auswertung der Lokalisation der intrazellulären Proteine erfolgte an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop. Als Mikroskop wurde ein Inversmikroskop (Diaphot 300, Nikon, Japan) verwendet, an das ein MultiProbe 2010 Laserscan-System (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California) mit Argon-Krypton-Laserquelle angeschlossen war. Zur Beobachtung wurde ein 60× Ölimmersionsobjektiv eingesetzt (Nikon, Japan). Die Bildaufnahme erfolgte über eine INDY-Workstation (Silikon Graphics, Mountain View, CA, USA) mit Hilfe der Software ImageSpace Version 3.10 (Molecular Dynamics). Gemessen wurden drei Farben (s.o.) in zwei Meßschritten, wobei im ersten Schritt die Fluoreszenz von FITC und Cy5 zusammen aufgenommen wurden. Die Detektion des FITC erfolgte mit PMT 2, die des Cy5 mit PMT1. Filterkombinationen: Excitation: 488 nm (FITC) und 647 (Cy5), B/S („beamsplitter“) 650 nm, Emissionsfilter: 530DF30 (FITC) und 660 EFLP (Cy5). In einem zweiten Meßschritt wurde dann die rote Fluoreszenz der gefärbten Mitochondrien über PMT 1 gemessen. Filterkombination: Excitation: 565 nm (CM-H₂XRos), B/S 565 nm, Emissionsfilter: 570 EFLP.

Nach der Bearbeitung mit Hilfe von ImageSpace wurden die Bilder über einen Drucker (Codonics NP-1600) ausgedruckt.

9. Statistische Analysen

Mittelwerte sind angegeben als Mittelwert±SEM. Unterschiede zwischen den Mittelwerten (p-Werte) wurden mit dem zweiseitigen, nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test für kontinuierliche Variablen bzw. mit dem Fisher's-exact-Test für kategorische Variablen berechnet. Zusammenhänge (Korrelationskoeffizienten r_s und p-Werte) zwischen der

spontanen Apoptoserate sowie der durch IL-7 induzierten Apoptosemodulation oder der Rate der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose mit dem Expressionsniveau verschiedener Proteine in leukämischen Zellen oder der Anzahl der Blasten in Vorläufer-T-Zell ALL Patienten wurden mit Hilfe der Spearman-Korrelations-Statistik analysiert. Trendlinien wurden durch die lineare Regressions-Statistik bestimmt.

Unterschiede bzw. Zusammenhänge wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn p-Werte $<0,05$ erreicht wurden. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung der SPSS Software durchgeführt.