

Ergebnisse

1. Sensitivität von primären Vorläufer-T-Zell ALL gegenüber Apoptose-Induktion *in vitro*

Spontane Apoptose erfolgt durch die Kultivierung abhängiger Zellen unter Entzug von Wachstumsfaktoren. Die *in vitro* Induzierbarkeit spontaner Apoptose sollte in Vorläufer-T-Zell ALL untersucht werden. Die *in vitro* Kultivierung von Patientenzellen für 24 h in FKS-haltigem Standardmedium führte zu einer spontanen Induktion von Apoptose, wie sie bereits mehrfach für Patientenproben mit ALL beschrieben wurde [30, 164-167]. Die Induktion spontaner Apoptose konnte in Zellmaterial von 161 Kindern ausgewertet werden. Die spontane Apoptose ($\Delta N^{\text{spont.}}$), berechnet aus der Differenz des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen nach Inkubation in Medium und dem Anteil zu Beginn der Inkubation (0 h) wies eine hohe Variabilität zwischen den Proben mit Mittelwerten von $34 \pm 2 \%$ (Bereich 0 - 88 %) auf.

Die Sensitivität gegenüber der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose wurde nach der im Methodenteil beschriebenen Formel berechnet und als spezifische Apoptose angegeben. Die Induktion von Apoptose durch Dexamethason und Doxorubicin wurde an leukämischen T-Zelllinien getestet. Die Ergebnisse der Titrationsexperimente sind in Abb. 11 dargestellt.

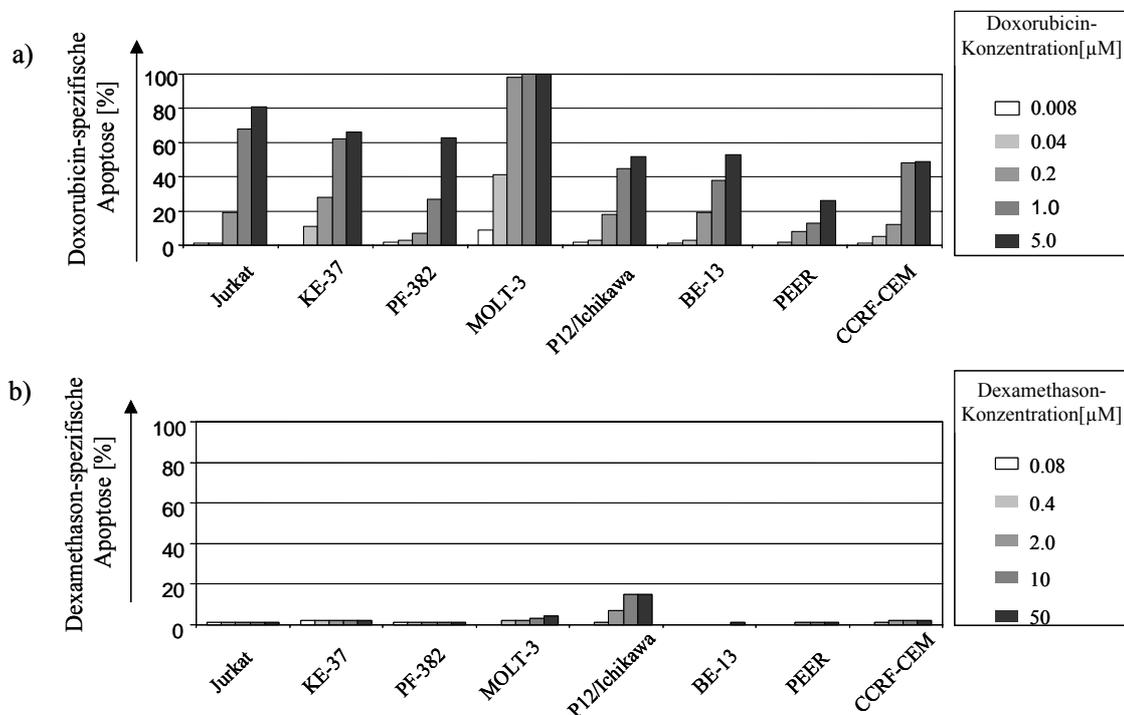


Abb. 11: Sensitivität zu Doxorubicin- und Dexamethason-induzierter Apoptose in leukämischen Zelllinien. Vorläufer-T-Zell ALL Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin (a) und Dexamethason (b) für 24 h kultiviert und die Apoptose durchflußzytometrisch durch Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC/Propidiumjodid gemessen. Das Ausmaß der spezifischen Apoptose wurde nach der im Methodenteil beschriebenen Formel berechnet.

Alle Zelllinien zeigten Resistenz gegenüber Doxorubicin in Konzentrationen < 8 nM. Die Behandlung mit Doxorubicin in den Konzentrationen zwischen 40 nM und 5 μ M führte zu Dosis-abhängiger Induktion von Apoptose. Die konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion wurde daraufhin in 47 Vorläufer-T-Zell ALL Proben durch 0,2 μ M, 1 μ M und 5 μ M Doxorubicin untersucht. In 45 Proben wurde eine konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion beobachtet (Mittelwerte \pm SEM in %: 11,5 \pm 1,6; 46,7 \pm 4,5; 68,7 \pm 4,1 für 0,1 μ M, 1 μ M und 5 μ M). Bei einer Konzentration von 1 μ M wurde die größte Heterogenität der Sensitivität der Proben beobachtet, daher wurde diese Konzentration für die weiteren Untersuchungen an 81 Vorläufer-T-Zell ALL eingesetzt.

Im Gegensatz zu Doxorubicin zeigten sich fast alle der getesteten Zelllinien resistent gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Dexamethason (Abb. 11). Die Zelllinie P12/Ichikawa war die einzige Zelllinie, bei der eine geringe Induktion von Apoptose durch die Inkubation mit 10 μ M Dexamethason erreicht werden konnte. Höhere Konzentrationen von Dexamethason brachten keine Verstärkung der Apoptose (Abb. 11). Bei einer längeren Inkubationsdauer von 48 h konnte auch in der Linie KE-37 Apoptose durch Dexamethason induziert werden. Die konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion durch Dexamethason wurde in 12 Vorläufer-T-Zell ALL Proben untersucht. Drei Proben waren resistent gegenüber Dexamethason, 9 Proben zeigten eine konzentrationsabhängige Sensitivität, wobei die maximale Apoptoserate bei einer Konzentration von 2 μ M erreicht wurde. Diese Konzentration wurde für die weiteren Untersuchungen an 81 Vorläufer-T-Zell ALL verwendet.

Vorläufer-T-Zell ALL Proben zeigten eine sehr heterogene Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Doxorubicin und Dexamethason. Die Mittelwerte \pm SEM der spezifischen Apoptose in n=81 Vorläufer-T-Zell ALL Proben betragen 39,2% \pm 3,6% für Doxorubicin und 37,8% \pm 3,1% für Dexamethason. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Dexamethason- und der Doxorubicin-induzierten Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL beobachtet werden ($r_s=0,22$, $p=0,053$, $n=81$) (Abb. 12).

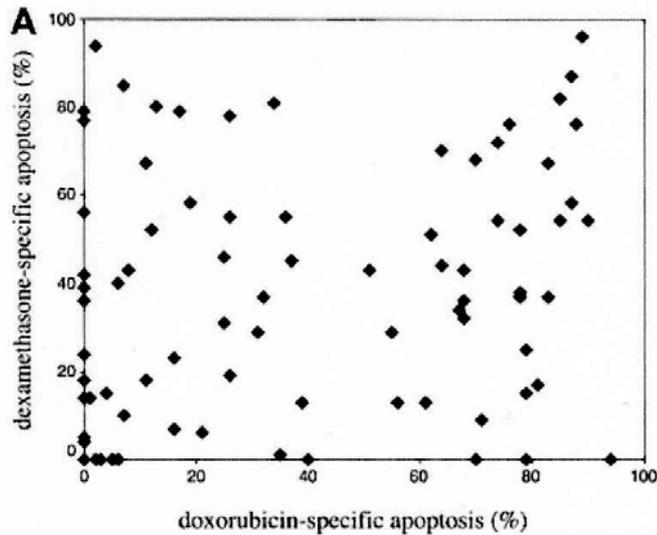


Abb. 12: In vitro Apoptose-Induktion durch Dexamethason und Doxorubicin in primären kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL. Die durch Dexamethason und Doxorubicin induzierte spezifische Apoptose war sehr heterogen. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Sensitivität zu Dexamethason und Doxorubicin ($r_s=0,22$, $p=0,053$, $n=81$).

Die *in vitro* Behandlung mit anti-CD95 IgM führte zur Induktion von CD95-vermittelter Apoptose in leukämischen T-Zelllinien. Die Zelllinien unterschieden sich in der Sensitivität zu CD95-induzierter Apoptose (Tab. 2). Es bestand keine Korrelation zwischen der CD95-Expression und der CD95-Sensitivität in den Zelllinien.

Tab. 2: CD95-Sensitivität in leukämischen T-Zelllinien. Die Apoptose wurde durchflußzytometrisch nach Färbung der Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid bestimmt. Angegeben ist die Anzahl der Annexin-V-positiven Zellen in Prozent.

	Jurkat	KE-37	PF-382	MOLT-3	P12/ Ichikawa	BE13	PEER	CCRF- CEM
CD95-Sensitivität	91	35	3	73	82	5	17	48

Die Induktion der CD95-vermittelten Apoptose wurde in 84 kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL untersucht. Die Behandlung der Zellen mit anti-CD95 IgM resultierte in einer mittleren spezifischen Apoptose von $9,9 \pm 1,4$ % mit Werten zwischen 0 und 96 %. Das Ausmaß der spezifischen CD95-induzierten Apoptose korrelierte signifikant mit der konstitutiven Expression von Oberflächen-CD95 (Spearman Regression: $r_s=0,52$, $n=62$, $p<0,001$) (Abb. 13).

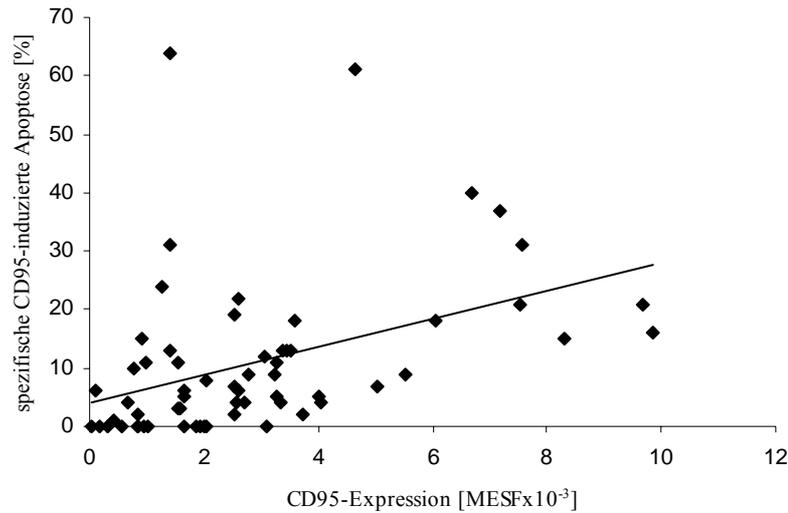


Abb. 13: Korrelation zwischen der CD95-Expression und der Sensitivität gegenüber CD95-spezifischer Apoptoseinduktion in Vorläufer-T-Zell ALL (Spearman Regression: $r_s=0,52$, $n=62$, $p<0,001$).

Nachdem die *in vitro* Sensitivität gegenüber der Apoptose-Induktion durch die Chemotherapeutika Dexamethason und Doxorubicin sowie der Sensitivität gegenüber spontaner Apoptose und CD95-vermittelter Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL untersucht wurden, sollten nun mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Signalwegen aufgedeckt werden. Mit Hilfe statistischer Berechnungen wurde ermittelt, dass Vorläufer-T-Zell ALL Proben mit erhöhter Sensitivität gegen Apoptose-Induktion durch die Chemotherapeutika auch verstärkt spontane Apoptose *in vitro* aufweisen. Dagegen bestand zwischen der Chemotherapeutika- und der CD95-induzierten Apoptose kein signifikanter Zusammenhang (Tab. 3).

Tab. 3: In vitro-Sensitivität zu Dexamethason- und Doxorubicin-induzierter Apoptose in Abhängigkeit zur *in vitro* Sensitivität gegenüber spontaner und CD95-induzierter Apoptose in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL (Bivariat Analyse, Spearman Regression). ^aSpearman Korrelationskoeffizient. Signifikante Werte ($p<0,05$) erscheinen fett.

Funktionelle <i>in vitro</i> Apoptose Untersuchungen	Dexamethason-induzierte Apoptose			Doxorubicin-induzierte Apoptose		
	r_s^a	p-Wert	n	r_s^a	p-Wert	n
Spontane Apoptose	0,25	0,026	81	0,34	0,002	81
CD95 Sensitivität	0,03	0,829	51	0,11	0,443	51

2. Charakterisierung primärer Vorläufer-T-Zell ALL hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Zytokinen *in vitro*

Die Wirkung von Zytokinen auf die spontane Apoptose (ΔN^{II}) wurde an 38 Proben von Kindern mit Vorläufer-T-Zell ALL durch die Zugabe der T-Zell-relevanten Zytokine IL-2, IL-4 und IL-7 ins Kulturmedium untersucht. Die durchflußzytometrische Analyse der spontanen Apoptose sowie des Apoptose-modulierenden Effektes von IL-7 ist beispielhaft in Abb. 14 dargestellt.

IL-2 konnte in keiner der untersuchten Proben spontane Apoptose inhibieren (Tab. 4). Eine Inhibition der spontanen Apoptose von mindestens 5 % konnte in wenigen Proben durch IL-4 (7/37) und in den meisten Proben durch IL-7 (24/38, 63%) erzielt werden.

Eine Erhöhung der Apoptose von $\geq 5\%$ wurde in einer Probe durch IL-2 und in zwei Proben durch IL-4 hervorgerufen (nicht gezeigt).

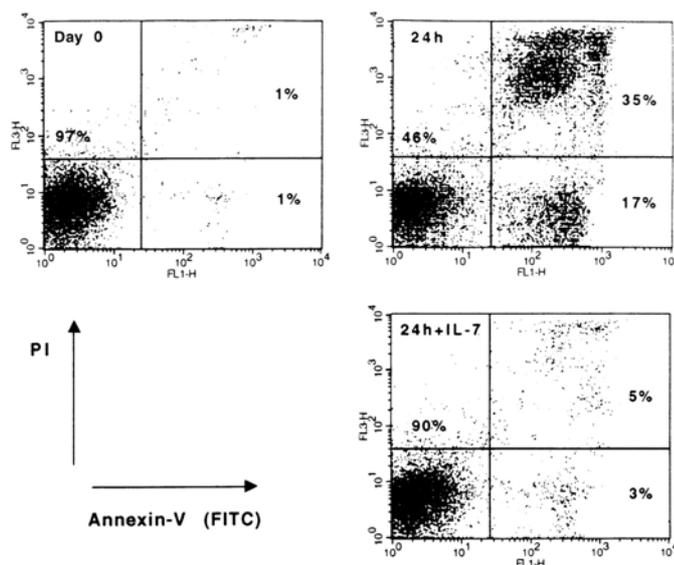


Abb. 14: Durchflußzytometrische Analyse spontaner Apoptose und Inhibition der Apoptose durch IL7 in Vorläufer-T-Zell ALL. Die Zellen wurden 24 h ohne (Kontrolle) oder mit IL-7 kultiviert und anschließend die Apoptose durchflußzytometrisch durch Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC/Propidiumjodid in der Probe bestimmt (siehe Methodenteil). Lebende Zellen erscheinen doppelt negativ (Quadrant links unten), apoptotische Zellen einfach und doppelt positiv gefärbt (Quadranten unten rechts und oben rechts). Dargestellt ist eine exemplarische Probe mit anti-apoptotischem Effekt von IL-7.

Die Auswirkung der Zytokine auf die spontane Apoptose in den einzelnen Proben ist in Abb. 15 dargestellt.

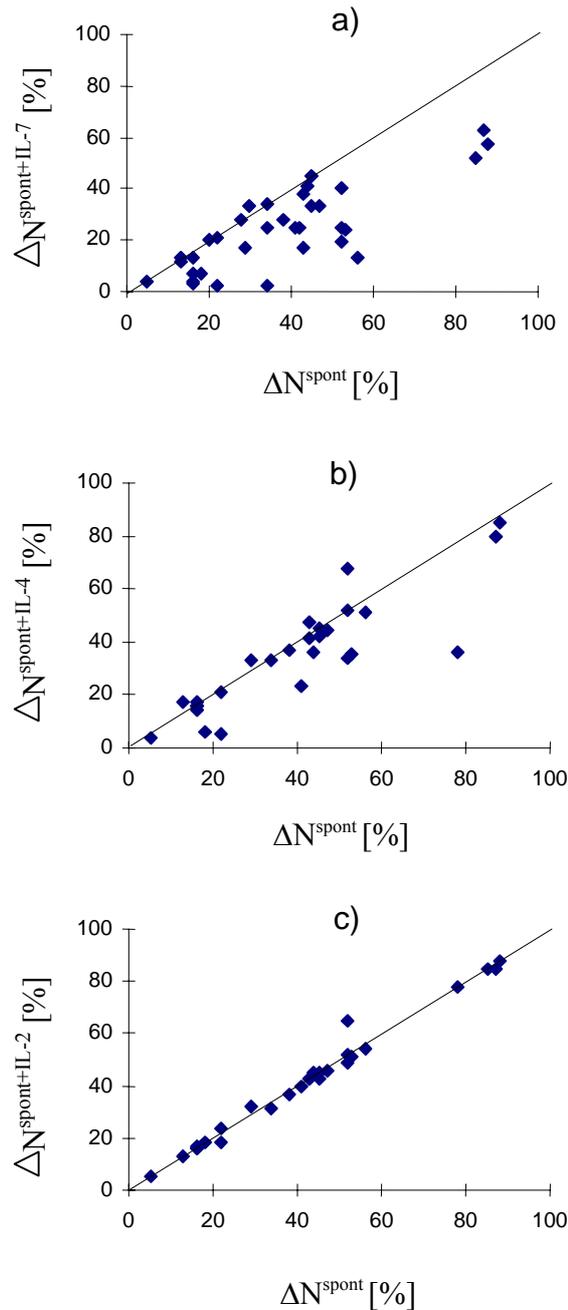


Abb. 15: Auswirkungen der Zytokine a) IL-7, b) IL-4 und c) IL-2 auf die in vitro induzierte spontane Apoptose in $n=38$ Vorläufer-T-Zell ALL. Dargestellt ist die Apoptose, die in Anwesenheit des jeweiligen Zytokins induziert wurde, gegen die spontane Apoptose (Berechnungen siehe Methodenteil). Proben, die auf der Diagonalen liegen, zeigen keine Sensitivität zu dem jeweiligen Zytokin, während Proben die unterhalb oder oberhalb davon liegen eine Apoptose-Inhibition bzw. -Induktion durch das Zytokin aufweisen.

Bei der Betrachtung einzelner Proben zeigte sich, daß die meisten IL-4-sensitiven Proben im Hinblick auf Apoptose-Inhibition in gleicher Weise sensitiv gegenüber IL-7 reagierten (6/7 Vorläufer-T-Zell ALL), wohingegen die meisten Proben, die durch IL-7 vor spontaner

Apoptose gerettet wurden, keine Rettung durch IL-4 zeigten. In einer Probe hatten IL-4 und IL-7 gegenteilige Effekte: IL-4 wirkte pro-, IL-7 antiapoptotisch.

Tab. 4: Wirkung der Zytokine IL-2, IL-4 und IL-7 auf die spontane Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL. Angegeben sind die Anzahl der Proben mit bzw. ohne Reaktion zur Gesamtanzahl der untersuchten Proben und die daraus berechneten prozentualen Anteile. Die Reaktion wurde, wie im Methodenteil beschrieben, als ΔN^{IL} berechnet und Werte von $\Delta N^{IL} \geq 5\%$ (Inhibition oder Induktion) als Reaktion anerkannt.

Apoptose-Modulation	IL-2	IL-4	IL-7
Inhibition	0/37 (0%)	7/37 (19%)	24/38 (63%)
keine Wirkung	36/37 (97%)	28/37 (76%)	14/38 (37%)
Induktion	1/37 (3%)	2/37 (5%)	0/38 (0%)

IL-7 zeigte im Vergleich zu IL-2 und IL-4 die einzigartige Wirkung der Inhibition spontaner Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL *in vitro*. Es wurden daher im weiteren Verlauf der Arbeit eine größere Anzahl von kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL Proben hinsichtlich ihres Ansprechens auf IL-7 untersucht und mit verschiedenen Parametern korreliert. Von 130 untersuchten Vorläufer-T-Zell ALL wiesen 10 Proben keine spontane Apoptose auf ($\Delta N^{\text{spont}} < 5\%$) und konnten daher nicht auf ihre Sensitivität gegenüber IL-7 beurteilt werden. Von den verbleibenden 120 Proben, die eine spontane Apoptoserate von 7%-75% aufwiesen, zeigten 64 (53%) Sensitivität zu IL-7 mit $\Delta N^{IL-7} > 5\%$, während 56 Proben (47%) nicht auf IL-7 reagierten ($\Delta N^{IL-7} \leq 5\%$). IL-7 sensitive Vorläufer-T-Zell ALL zeigten eine signifikant höhere Rate spontaner Apoptose als IL-7 insensitive Proben (Mann-Whitney-U-Test: $39 \pm 2,1\%$ vs $28 \pm 2,4\%$, $p=0.002$) (Abb. 16).

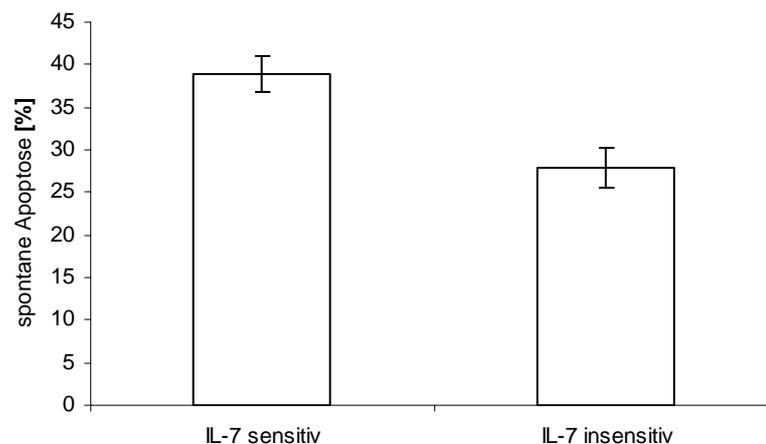


Abb. 16: IL-7 sensitive Vorläufer-T-Zell ALL zeigen eine signifikant höhere Rate spontaner Apoptose *in vitro* als IL-7 insensitive Vorläufer-T-Zell ALL (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,002$). Die spontane Apoptose sowie die Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Inhibition durch IL-7 wurden wie im Methodenteil beschrieben bewertet.

2.1 Expression der Zytokin-Rezeptoren IL-7- α , IL-4- α , IL-2- α und IL-2- γ in Vorläufer-T-Zell ALL

Die Expressionen der α -Ketten der Zytokin-Rezeptoren für IL-7, IL-4 und IL-2 sowie der γ -Kette des IL-2-Rezeptors wurden auf der Oberfläche der Plasmamembran einiger Proben (n=33, 20, 19 bzw. 12) durchflußzytometrisch untersucht. Die Expressionsstärke des IL-7-Rezeptors zeigte eine hohe Variabilität (Mittelwert \pm SEM in MESF $\times 10^{-3}$: $1,5\pm 0,2$; Bereich: 0 - 5,2) und korrelierte mit der Inhibition der spontanen Apoptose durch IL-7 (Spearman Regressionsanalyse: $r_s=0,63$, $p<0,0001$, n=33) (Abb. 17). Fast alle Proben (14/20) zeigten Negativität für die Expression des IL-4-Rezeptors. Dabei wies die Gruppe der Vorläufer-T-Zell ALL, die auf IL-4 sensitiv reagierten (im Sinne einer Inhibition der spontanen Apoptose) im Mittel eine signifikant höhere Expression des IL-4-Rezeptors auf im Vergleich zur Gruppe, die sich insensitiv zu IL-4 zeigte (Mittelwerte \pm SEM in MESF $\times 10^{-3}$: $0,69\pm 0,25$ vs $0,07\pm 0,07$; $p=0,02$). Im Gegensatz zu IL4 und IL-7, zeigten fast alle Proben (15/19) trotz der Insensitivität gegenüber IL-2 eine gewisse, wenn auch relativ schwache, Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (Mittelwert \pm SEM in MESF $\times 10^{-3}$: $0,4\pm 0,1$; Bereich: 0 - 1,3). Alle getesteten Proben waren positiv für die Expression der γ -Kette des IL-2-Rezeptors (Mittelwert \pm SEM in MESF $\times 10^{-3}$: $1,8\pm 0,2$; Bereich: 0,3 - 3,0). Interessanterweise zeigten sich ähnliche Expressionsstärken in den verschiedenen Proben (MESF $\times 10^{-3}$ Bereich: 1.5-3.0) und es bestand keine Korrelation zwischen der Expression des IL-2- γ -Rezeptors und der Sensitivität zu IL-7. Darüberhinaus konnte in einer Vorläufer-T-Zell ALL mit relativ geringer Expression von IL-2- γ (MESF $\times 10^{-3}$ 0,3) weder Sensitivität zu IL-7 noch Expression von IL-7- α beobachtet werden.

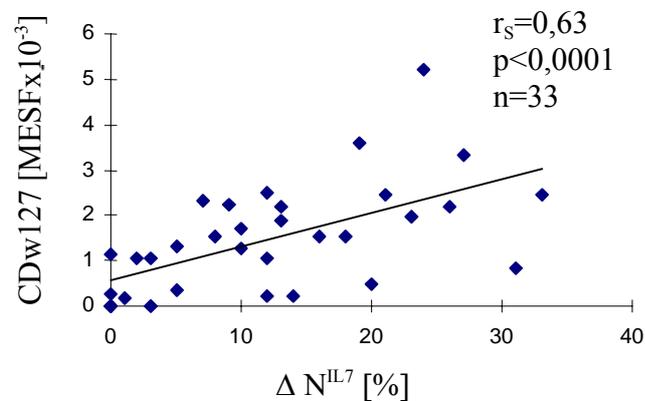


Abb. 17: Die Sensitivität zu IL-7 (ΔN^{IL7}) korreliert signifikant mit der Expression des IL-7-Rezeptors (CDw127) in T-ALL (Spearman Regression: $r_s=0,63$, $p<0,0001$, $n=33$). Die Expression des Rezeptors wurde mit Hilfe von Fluoreszenzstandards quantifiziert (siehe Methoden).

2.2 Wirkung der Zytokine IL-2, IL-4 und IL-7 auf die Zellzyklusverteilung in Vorläufer-T-Zell ALL

Neben der Zytokin-induzierten Effekte auf das *in vitro* Apoptoseverhalten der Vorläufer-T-Zell ALL wurde die Wirkung der Zytokine auf den Zellzyklus untersucht. Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung erfolgte nach Färbung der Zellen mit Propidiumjodid durch die Ermittlung des Anteils an Zellen, die sich in den Zellzyklusphasen S und G2/M und damit in Proliferation befinden. Es zeigte sich ein relativ geringer prozentualer Anteil an proliferierenden Zellen zu Beginn der *in vitro* Kultivierung (Mittelwert: $10,3 \pm 1,2$, Bereich: 2-26, n=36), der sich durch die Inkubation in Medium für 24 h nicht signifikant änderte (Mittelwert: $9,3 \pm 1,2$, Bereich: 0-29, n=38) (Tab. 5). Es konnte in nur einer der untersuchten Proben eine spontane Proliferation *in vitro* durch die Kultivierung induziert werden, wobei ein Anstieg des Anteils an Zellen in den Zellzyklusphasen S+G2/M von 12% auf 22% beobachtet werden konnte.

Tab. 5: Anteil der Zellen in S- und G2/M-Phase des Zellzyklus in unbehandelten (0 h) und behandelten (24 h Medium \pm Zytokine) Vorläufer-T-Zell ALL Proben. a) Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM aus n Proben.

Behandlung	Zellen in S- und G2/M-Phase [%] ^a	Bereich [%]	n
0 h	$10,3 \pm 1,2$	2 - 26	36
Medium	$9,3 \pm 1,2$	0 - 29	38
+ IL-2	$8,7 \pm 1,2$	2 - 27	34
+ IL-4	$10,0 \pm 1,2$	1 - 32	38
+ IL-7	$9,9 \pm 1,4$	1 - 38	38

Die Zugabe der Zytokine IL-2, IL-4 und IL-7 ins Kulturmedium bewirkte in den meisten Proben keine signifikanten Veränderungen des Zellzyklus (Tab. 5). Eine Erhöhung von > 5 % in den Phasen S und G2/M erfolgte lediglich in 3 von 38 Proben durch IL-7 und in 2 von 37 Proben durch IL-4 nach 24 h Inkubation (Abb. 18).

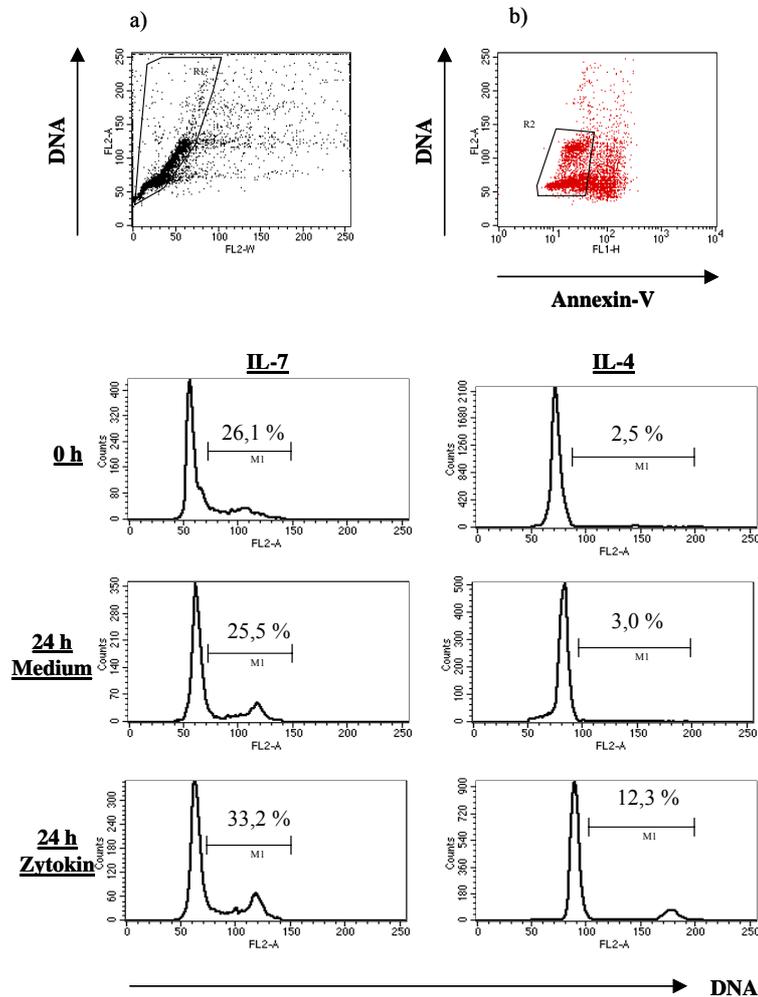


Abb. 18: Einfluß von Zytokinen auf die Zellzyklusverteilung in Vorläufer-T-Zell ALL. Eine Erhöhung der Proliferation, die durch den prozentualen Anteil der Zellen in den Zellzyklusphasen S und G2/M bestimmt wurde, von >5% im Vergleich zur Mediumkontrolle konnte in 3/38 Vorläufer-T-Zell ALL durch IL-7 und in 2/37 Vorläufer-T-Zell ALL durch IL-4 induziert werden. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C kultiviert und die DNA mit Propidiumjodid gefärbt. Dargestellt sind die Fluoreszenzhistogramme der durchflußzytometrischen Messung von exemplarischen Vorläufer-T-Zell ALL Proben nach Ausgaten der Zell-Dupletts (a) und der apoptotischen Zellen (b) (siehe Methodenteil).

2.3 Bedeutung der Sensitivität zu IL-7 auf die *in vitro*-Chemosensitivität in Vorläufer-T-Zell ALL

Da bereits gezeigt werden konnte, daß IL-7 die spontane Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL

inhibieren kann, sollte geklärt werden, ob IL-7 auch regulativ in die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose eingreift. Die Wirkung von IL-7 auf die Dexamethason- und Doxorubicin- induzierte Apoptose wurde zunächst in leukämischen T-Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, daß IL-7 in den meisten Zelllinien keine modulierende Wirkung auf die durch Doxorubicin-induzierte Apoptose hat. In einer Zelllinie, KE-37, wurde eine teilweise Inhibition der Doxorubicin-induzierten Apoptose beobachtet (Abb. 19). In der Zelllinie Molt-3 hatte IL-7 sogar einen Apoptose-verstärkenden Effekt (Abb. 19).

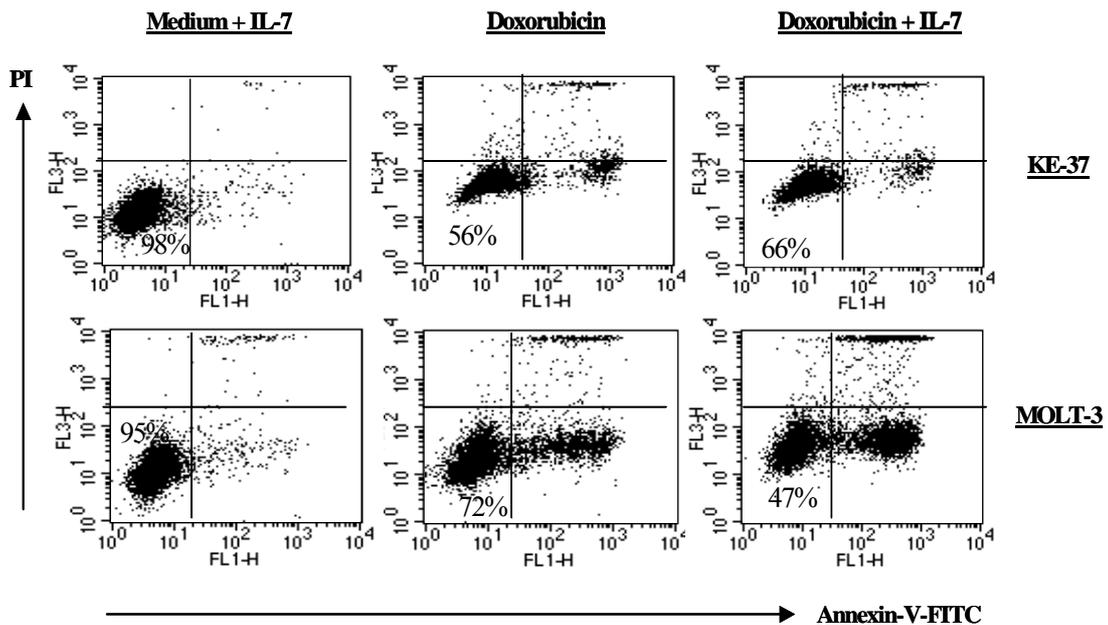


Abb. 19: Modulation der Doxorubicin-induzierten Apoptose durch IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL Zelllinien. Leukämische Zellen wurden mit IL-7 und/oder Doxorubicin (1 μ M in KE-37, 0,04 μ M in MOLT-3) für 24 h kultiviert. Gezeigt sind die Punktdiagramme der durchflußzytometrischen Apoptose-Messungen nach Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC/Propidiumjodid. Angegeben sind prozentuale Anteile lebender (doppelt-negativer) Zellen. Die Kultivierung in Medium ohne IL-7 zeigte keinen Unterschied zur Kultivierung in Medium mit IL-7 (nicht gezeigt).

Die Wirkung von IL-7 auf die Dexamethason-induzierte Apoptose und den Zellzyklus konnte in der Zelllinie KE-37 gezeigt werden. In dieser Zelllinie führte die Inkubation für 48 h mit dem Glucocorticoid zur Induktion von Apoptose. Die Behandlung mit Dexamethason induzierte außerdem einen Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 20). Eine Inkubation der Zellen mit Dexamethason im Beisein von IL-7 führte zu einer fast vollständigen Inhibition der Dexamethason-induzierten Apoptose. Dagegen konnte das Zytokin die durch Dexamethason induzierte Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus nicht inhibieren (Abb. 20).

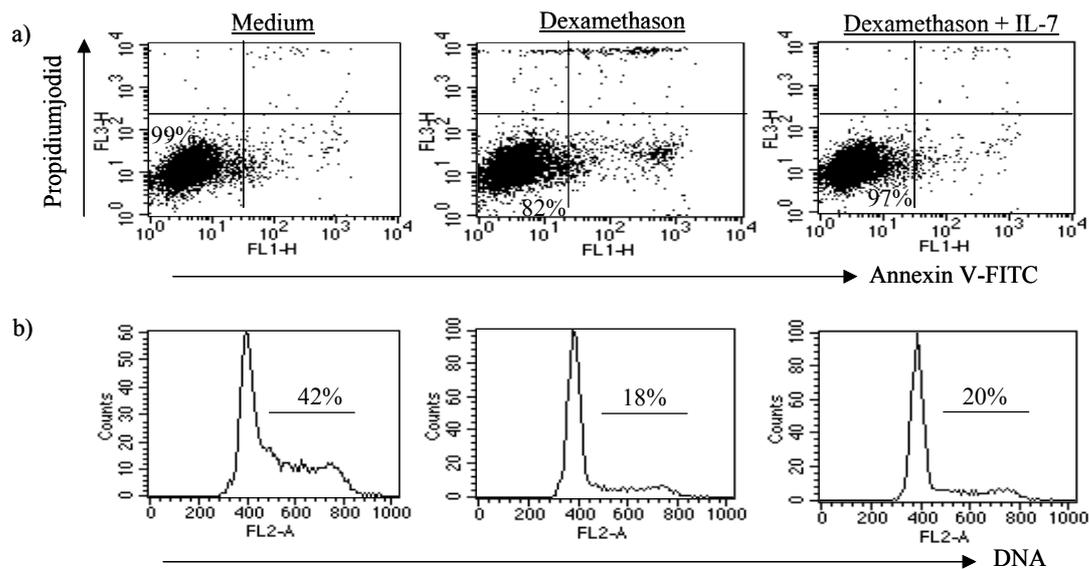


Abb. 20: Modulation der Dexamethason-induzierten Apoptose durch IL-7 in der Zelllinie KE-37. Leukämische Zellen wurden mit Dexamethason (2 μ M) und/oder IL-7 (25 ng/ml) für 24 h kultiviert. (a) Punktdiagramme der durchflußzytometrischen Apoptose-Messungen nach Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC/Propidiumjodid. Angegeben sind prozentuale Anteile lebender (doppelt-negativer) Zellen. (b) Zellzyklusverteilung der leukämischen Zellen. Annexin-V-FITC-gefärbte Zellen wurden mit Ethanol fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt. Gezeigt sind die DNA-Histogramme von lebenden, Annexin-V-negativen Zellen. Die prozentualen Anteile der Zellen in S- und G2/M-Phase sind angezeigt.

Der Effekt von IL-7 auf die Doxorubicin- und die Dexamethason-induzierte Apoptose wurde in 16 bzw. 46 Vorläufer-T-Zell ALL Proben untersucht. Die durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptose nach Induktion durch die beiden Chemotherapeutika sowie der Einfluß von IL-7 ist exemplarisch für eine Vorläufer-T-Zell ALL in Abb. 21 dargestellt.

Die *in vitro* Inkubation der Zellen mit Dexamethason oder Doxorubicin im Beisein von IL-7 führte in den Vorläufer-T-Zell ALL Proben zu unterschiedlich starken Apoptose-inhibierenden Effekten (Abb. 22). Es wurden keine pro-apoptotischen Effekte von IL-7 auf die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL beobachtet.

Die Zusammenhänge zwischen der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose und der Sensitivität der Vorläufer-T-Zell ALL Zellen gegenüber IL-7 wurden zusätzlich durch statistische Berechnungen ermittelt. Dabei stellte sich heraus, daß die Dexamethason-induzierte Apoptose mit dem Ausmaß der Inhibition der spontanen Apoptose durch IL-7 positiv korreliert (Bivariat Analyse, Spearman Regression: $r_s=0,4$; $p=0,0001$, $n=77$)(Abb. 23). Im Gegensatz dazu bestand zwischen der Sensivität zu Doxorubicin und IL-7 kein signifikanter Zusammenhang ($r_s=0,2$; $p=0,08$, $n=77$).

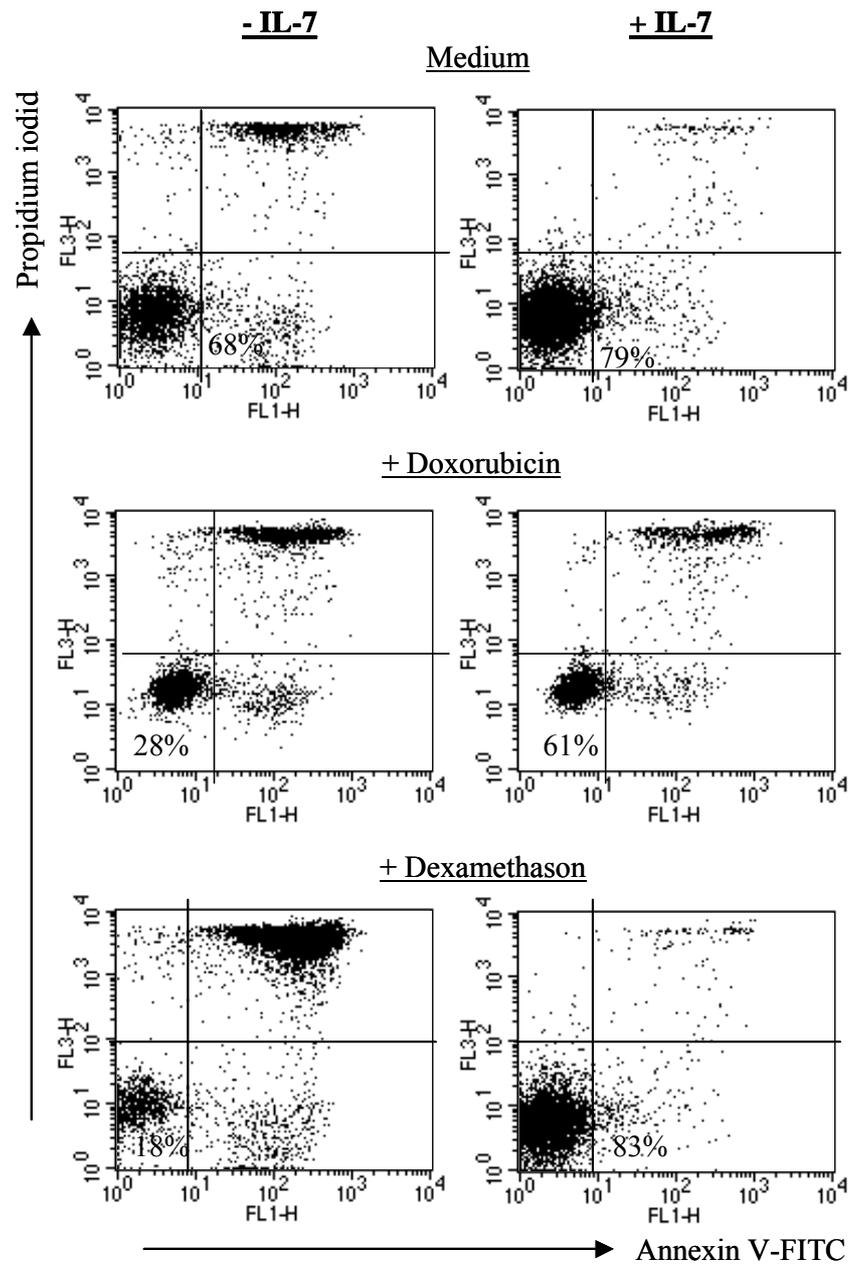


Abb. 21: Durchflußzytometrische Analyse des IL-7 Effektes auf die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose in primären Vorläufer-T-Zell ALL Zellen. Leukämische Zellen wurden mit Doxorubicin ($0,2 \mu\text{M}$) oder Dexamethason ($2 \mu\text{M}$) mit oder ohne IL-7 (25 ng/ml) für 24 h kultiviert. Gezeigt sind die Punktdiagramme der Annexin-V-FITC gefärbten Zellen unter Angabe der prozentualen Anteile lebender (doppelt negativer) Zellen. Am Tag 0 betrug der Anteil an lebenden Zellen 95 % (nicht gezeigt).

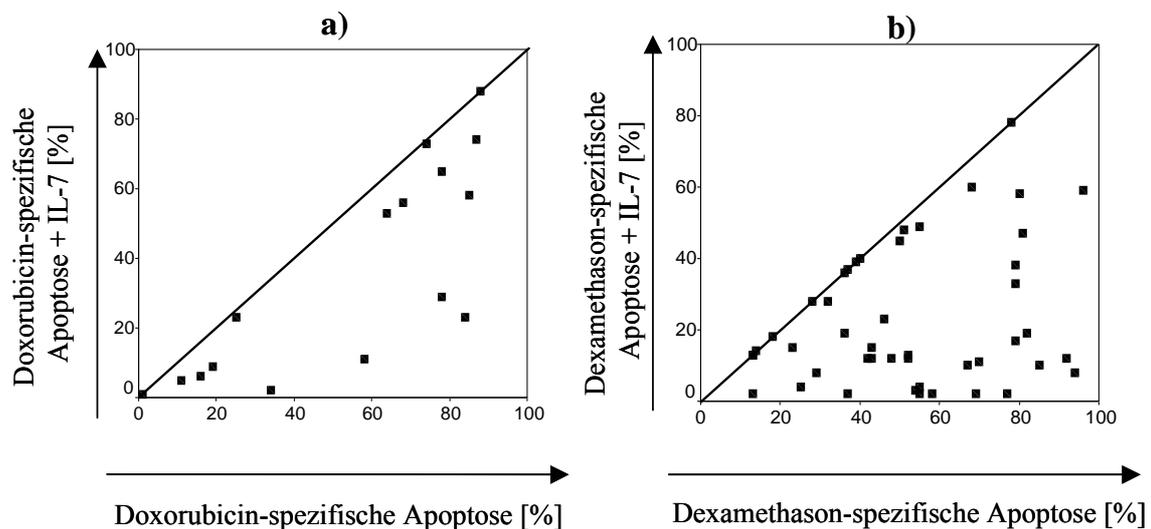


Abb. 22: Effekt von IL-7 auf die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL. Vorläufer-T-Zell ALL Proben wurden mit Doxorubicin \pm IL-7 oder Dexamethason \pm IL-7 für 24 h kultiviert und die Apoptose durch Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC/Propidiumjodid bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Apoptose erfolgte nach der im Methodenteil beschriebenen Formel. Jeder Punkt in der Abbildung repräsentiert eine individuelle Vorläufer-T-Zell ALL Probe. Die Diagonale bezeichnet gleiche Werte der spezifischen Apoptose durch das Chemotherapeutikum allein und im Beisein von IL-7 und somit keinen Effekt auf die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose durch das Zytokin.

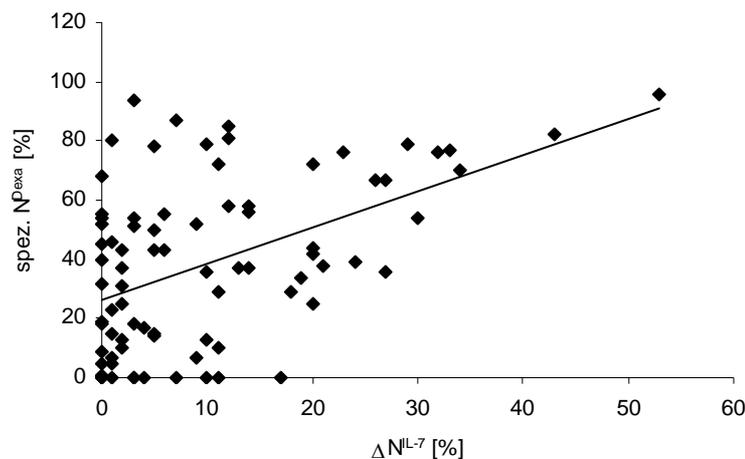


Abb. 23: Die spezifische Dexamethason-induzierte Apoptose (spez. N^{dexta} [%]) korreliert signifikant mit der Sensitivität gegenüber IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL (Bivariat Analyse, Spearman Regression: $r_s=0,4$; $p=0,0001$, $n=77$).

3. Rolle Apoptose-relevanter Proteinen für das *in vitro* Ansprechen in Vorläufer-T-Zell ALL

Um die Bedeutung von Apoptose-relevanten Proteinen für die *in vitro* Sensitivität auf Apoptose und Zytokinansprechen beurteilen zu können, wurden zunächst die konstitutiven

Expressionen der Proteine Bcl-2, Bax und CD95 in Vorläufer-T-Zell ALL und Zelllinien bestimmt und diese dann mit der *in vitro* Sensitivität in Zusammenhang gebracht.

Die konstitutive Expression der Apoptose-relevanten Proteine Bcl-2, Bax und CD95 wurde in 58 Vorläufer-T-Zell ALL gemessen. Es zeigte sich eine konstitutive Expression der Proteine in allen Proben. Die Vorläufer-T-Zell ALL Proben zeigten eine hohe Variabilität in der Expressionsstärke dieser Moleküle. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Expression der einzelnen Proteine sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Leukämische T-Zelllinien wiesen unterschiedliche Expressionen der Proteine Bcl-2, Bax und CD95 auf (Tab. 7).

Tab. 6: Konstitutive Expression Apoptose-relevanter Proteine in Vorläufer-T-Zell ALL (n=58). Angegeben sind die durchflußzytometrisch gemessenen Fluoreszenzintensitäten in MESF ($\times 10^{-3}$).

	Bcl-2	Bax	CD95
Mittelwert \pm SEM	4,9 \pm 0,8	186 \pm 18	2,76 \pm 0,3
Bereich	0,5-25	40-553	0,05-9,86

Tab. 7: Konstitutive Expression Apoptose-relevanter Proteine in leukämischen T-Zelllinien. Angegeben sind die durchflußzytometrisch gemessenen Fluoreszenzintensitäten in MESF ($\times 10^{-3}$).

	Jurkat	KE-37	PF-382	MOLT-3	P12/ Ichikawa	BE13	PEER	CCRF- CEM
Bcl-2	3,6	9,9	8,6	12,5	13,5	43,4	20,1	19,9
Bax	52,1	37,6	26,1	42,2	63,0	48,6	51,5	66,5
CD95	13,4	20,5	5,2	11,6	19,2	16,3	11,6	50,6

3.1 Beteiligung von Bcl-2, Bax und CD95 in der Regulation der spontanen Apoptose

Es sollte untersucht werden, ob die Sensitivität gegenüber der Induktion spontaner Apoptose von der konstitutiven Expression der Apoptose-relevanten Proteine Bcl-2 und Bax abhängig ist und ob die Expression dieser Proteine während der Apoptoseinduktion reguliert wird.

Das Ausmaß der spontanen Apoptose korrelierte nicht mit den konstitutiven Expressionsstärken der Proteine Bcl-2 ($r_s = -0,02$, $p = 0,9$, $n = 45$) oder Bax ($r_s = -0,13$, $p = 0,4$, $n = 45$). Eine Abhängigkeit der spontanen Apoptose von den Verhältnissen zwischen anti- und pro-apoptotisch wirkenden Proteinen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Bcl-2/Bax: $r_s = 0,07$, $p = 0,7$, $n = 45$).

Im Gegensatz zu den konstitutiven Expressionsstärken, die keine Korrelation mit der Sensitivität gegenüber spontaner Apoptoseinduktion aufwiesen, konnte die Rate spontaner Apoptose mit Expressionsveränderungen von Bax im Zuge der Apoptoseinduktion beobachtet werden. Die Expressionsveränderungen von Bax durch die Induktion spontaner Apoptose ($RCE^{spont.}$) zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Ausmaß der spontanen Apoptose ($r_s=0.51$, $p=0.02$, $n=20$) (Abb. 24). Dagegen konnten keine signifikanten Zusammenhänge für Bcl-2 ($r_s=0.003$, $p=0.99$, $n=20$) oder das Verhältnis Bcl-2/Bax ($r_s=-0.32$, $p=0.17$, $n=20$) beobachtet werden.

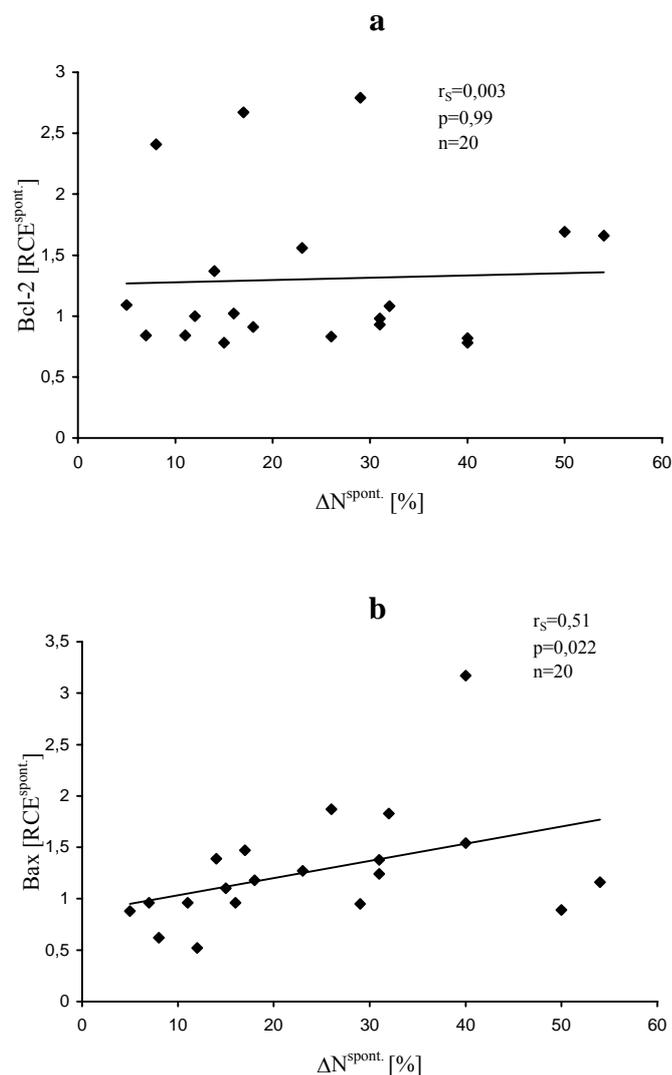


Abb. 24: Korrelation zwischen der Sensitivität gegenüber spontaner Apoptose ($\Delta N^{spont.}$ [%]) und relative Expressionsveränderungen (RCE) von Bcl-2 (a) und Bax (b) im Zuge der spontanen Apoptose-Induktion in Vorläufer-T-Zell ALL.

3.2 Beteiligung von Bcl-2, Bax und CD95 in der Regulation der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose

Zur Identifizierung der Faktoren, die für die unterschiedliche *in vitro* Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Dexamethason in Vorläufer-T-Zell ALL verantwortlich sein könnten, wurde der Zusammenhang der spezifischen Apoptose-Induktion durch Dexamethason und Doxorubicin mit der konstitutiven Expression der Apoptose-relevanten Proteine Bcl-2, Bax und CD95 untersucht. Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose und den genannten Parametern in Zelllinien gefunden werden.

Auch in Vorläufer-T-Zell ALL Proben zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der *in vitro* Sensitivität und der konstitutiven Expression von Bcl-2, Bax oder CD95 (Tab. 8).

Tab. 8: In vitro-Sensitivität zu Dexamethason- und Doxorubicin-induzierter Apoptose in Abhängigkeit zur Expression von Apoptose-relevanten Proteinen in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL (Bivariat Analyse, Spearman Regression). ^aSpearman Korrelationskoeffizient; ^bin MESF ($\times 10^{-3}$).

Konstitutive Expression von Apoptose-relevanten Proteinen ^b	Dexamethason-induzierte Apoptose			Doxorubicin-induzierte Apoptose		
	r_s^a	p-Wert	n	r_s^a	p-Wert	n
Bcl-2	-0,19	0,17	58	-0,04	0,776	58
Bax	0,14	0,288	58	-0,16	0,245	58
Bcl-2/Bax	-0,25	0,063	58	0,03	0,847	58
CD95	-0,21	0,139	51	0,04	0,758	51

Expressionsveränderungen von Bcl-2 durch Dexamethason (RCE^{Dexa}) zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit der spezifischen Dexamethason-induzierten Apoptose ($r_s=0,12$, $p=0,5$, $n=33$). Dagegen konnte eine signifikante negative Korrelation für Bax beobachtet werden ($r_s=-0,4$, $p=0,02$, $n=36$) (Abb. 26). Die Veränderungen des Verhältnisses Bcl-2/Bax zeigten keine Relevanz für die Sensitivität zu Dexamethason ($r_s=0,27$, $p=0,1$, $n=32$).

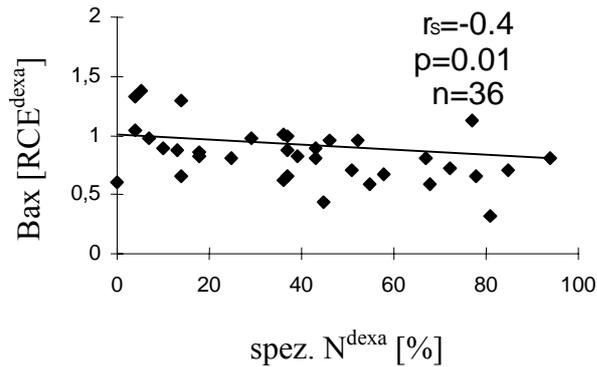


Abb. 26: Korrelation zwischen der Sensitivität zu Dexamethason (spez. N^{dexa} [%]) und der durch Dexamethason induzierten Expressionsveränderung von Bax (Bax [RCE^{dexa}]) in Vorläufer-T-Zell ALL (Spearman-Regression).

3.3 Beteiligung von Bcl-2 und Bax in der Regulation der Apoptoseinhibition durch IL-7 in primären Vorläufer-T-Zell ALL

Ebenso wie für die spontane Apoptose konnte auch für das Ausmaß der Inhibition spontaner Apoptose durch IL-7 keine Korrelationen mit den konstitutiven Expressionsstärken der apoptose-relevanten Proteine Bcl-2 und Bax bzw. deren Verhältnis zueinander gefunden werden (Bcl-2: $r_s = -0,06$, $p = 0,6$, $n = 90$, Bax: $r_s = -0,05$, $p = 0,7$, $n = 76$, Bcl-2/Bax: $r_s = 0,02$, $p = 0,9$, $n = 74$).

Zur Untersuchung der Beteiligung von Bcl-2 und Bax in der IL-7-induzierten Inhibition spontaner Apoptose wurden die Expressionsstärken in IL-7-behandelten Zellen mit denen in unbehandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Die daraus resultierenden Expressionsveränderungen von Bcl-2 durch IL-7 (RCE^{IL-7}) zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Ausmaß der IL-7-induzierten Inhibition spontaner Apoptose ($r_s = 0,75$, $p < 0,0001$) (Abb. 25). Dagegen konnten keine signifikanten Zusammenhänge für Bax ($r_s = 0,15$, $p = 0,36$, $n = 42$) beobachtet werden. Die Veränderungen des Verhältnisses Bcl-2/Bax durch IL-7 zeigten keine Verbesserung der Korrelation mit der Sensitivität zu IL-7 im Vergleich zu Bcl-2 allein ($r_s = 0,55$, $p = 0,0002$, $n = 42$).

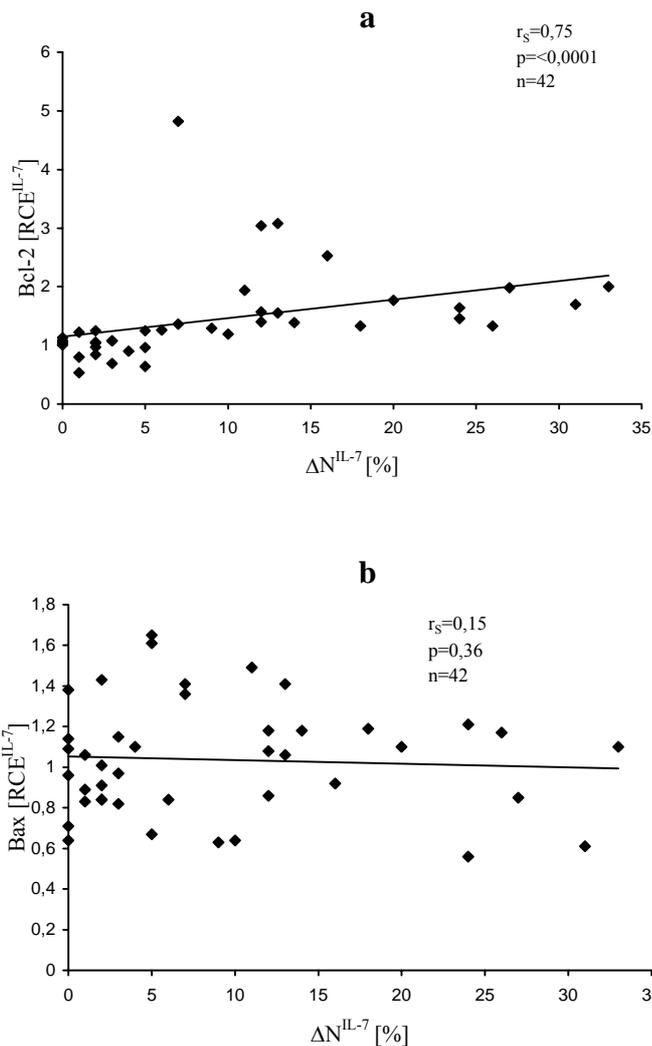


Abb. 25: Korrelation der relativen Änderungen der Protein-Expression von Bcl-2 (a) und Bax (b) im Zuge der Apoptose-Inhibition durch IL-7 (RCE^{IL-7}) mit dem Ausmaß der IL-7-induzierten Apoptose-Inhibition (ΔN^{IL-7}) durch Inkubation der Vorläufer-T-Zell ALL Zellen für 24 h in Standardmedium unter Zusatz von IL-7 in vitro.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-7 nicht nur die spontane Apoptose, sondern auch die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose effektiv inhibieren kann. Daher sollte untersucht werden, ob die inhibitorische Wirkung von IL-7 auf die Dexamethason-induzierte Apoptose in ähnlicher Weise wie die spontane Apoptose über die Regulation von Bcl-2-verwandten Proteinen erfolgt. Dazu wurden die Zellen mit Dexamethason mit und ohne Zusatz von IL-7 inkubiert und die Expression der Proteine Bcl-2 und Bax nach den verschiedenen Behandlungen bestimmt.

Die relativen Expressionsänderungen von Bcl-2 und Bax nach der Inkubation der Zellen mit Dexamethason in Anwesenheit von IL-7 ($RCE^{Dexa+IL-7}$) wurden in 25 Vorläufer-T-Zell ALL bestimmt. Diese Proben waren sensitiv gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose. In

14/25 Proben bewirkte die Anwesenheit von IL-7 in der Kultur eine vollständige oder partielle Inhibition der Dexamethason-induzierten Apoptose, in 11 Proben dagegen konnte IL-7 die Apoptose nicht hemmen. Es zeigte sich, daß Proben, in denen IL-7 eine Resistenz gegen die Dexamethason-induzierte Apoptose bewirkte, eine stärkere Erhöhung der Bcl-2-Expression durch die Behandlung mit Dexamethason in Anwesenheit von IL-7 aufwiesen als Proben, bei denen IL-7 keine Resistenz induzieren konnte (RCE Mittelwerte \pm SEM: 2,19 \pm 0,20 vs 1,14 \pm 0,11, p=0,001) (Abb. 27). Dagegen gab es keine Unterschiede bezüglich der relativen Expressionsänderungen von Bax (RCE Mittelwerte \pm SEM: 0,90 \pm 0,06 vs 0,75 \pm 0,07, p=0,21). Das Verhältnis Bcl-2/Bax zeigte keinen größeren Unterschied zwischen den beiden Gruppen als Bcl-2 allein (RCE Mittelwerte \pm SEM: 2,56 \pm 0,26 vs 1,71 \pm 0,25, p=0,04).

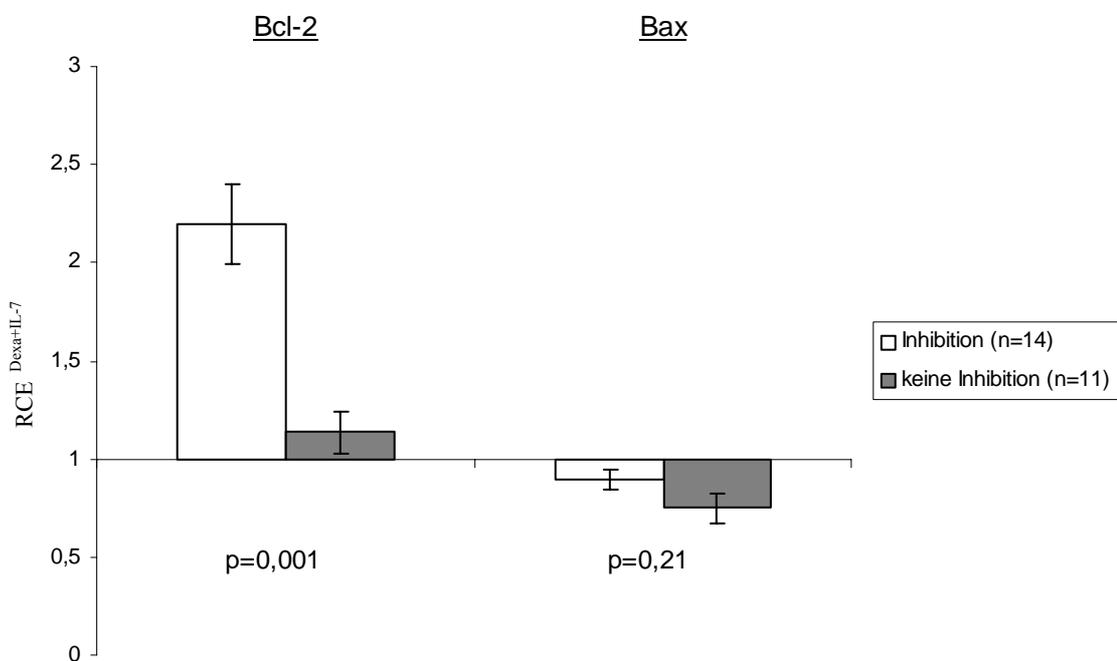


Abb. 27: Relative Expressionsänderungen von Bcl-2 und Bax durch die Kultivierung der Zellen mit Dexamethason in Anwesenheit von IL-7 ($RCE^{Dexa+IL-7}$) in Vorläufer-T-Zell ALL in Abhängigkeit von der Inhibierbarkeit der Dexamethason-induzierten Apoptose durch IL-7. Angegeben sind RCE Mittelwerte \pm SEM aus 14 bzw. 11 Proben.

3.4 Intrazelluläre Lokalisation von Bcl-2 und Bax in Vorläufer-T-Zell ALL und deren Bedeutung für die Induzierbarkeit von Apoptose

Die intrazelluläre Lokalisation von Bcl-2 und Bax in Vorläufer-T-Zell ALL Zellen wurde durch Immunofluoreszenzfärbungen am konfokalen Laserscan-Mikroskop untersucht. Die Doppelfärbung, bei der eines der beiden Proteine und die Mitochondrien gleichzeitig sichtbar gemacht wurden, zeigte in lebenden Vorläufer-T-Zell ALL Zellen eine starke Kolokalisation

von Bcl-2 mit Mitochondrien. Außerhalb der Mitochondrien wurde kaum Bcl-2 detektiert (Abb. 28).

Bax dagegen war sowohl kolokalisiert mit den Mitochondrien, als auch außerhalb der Mitochondrien im Cytoplasma zu finden, wobei es eine punktierte Struktur aufwies (Abb. 29).

Eine Untersuchung der intrazellulären Protein-Lokalisation bei Induktion von Apoptose zeigte, dass Bcl-2 und Bax unterschiedlich reguliert werden. Die Bewertung von Lokalisationsänderungen im Zuge der Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL erfolgte durch den Vergleich von lebenden (Annexin-V-negativen) und apoptotischen (Annexin-V-positiven) Zellen innerhalb einer Probe.

Von drei untersuchten Vorläufer-T-Zell ALL zeigten zwei Proben im Zuge der Apoptose-Induktion eine Verschiebung von Bax zu den Mitochondrien hin (Abb. 29). Während lebende, Annexin-V-negative Zellen die typische intrazelluläre Verteilung von Bax zeigten, wobei Bax sowohl auf den Mitochondrien sowie zu einem großen Teil im Cytoplasma vorlag, konnte in apoptotischen Zellen eine strenge Kolokalisation des Proteins mit den Mitochondrien beobachtet werden.

Bcl-2 zeigte dagegen keine Lokalisations-Änderungen im Zuge der Apoptose-Induktion. Die Kolokalisation von Bcl-2 mit den Mitochondrien, die in lebenden Zellen beobachtet wird, bleibt in Annexin-V-positiven apoptotischen Zellen erhalten (Abb. 28).

Die Lokalisations-Änderungen von Bcl-2 und Bax während der Apoptose-Induktion zeigten sich unabhängig vom Apoptose-induzierenden Signal und konnten in ähnlicher Weise sowohl bei der spontanen Apoptose-Induktion sowie bei der Induktion der Apoptose durch Dexamethason oder Doxorubicin beobachtet werden (nicht gezeigt).

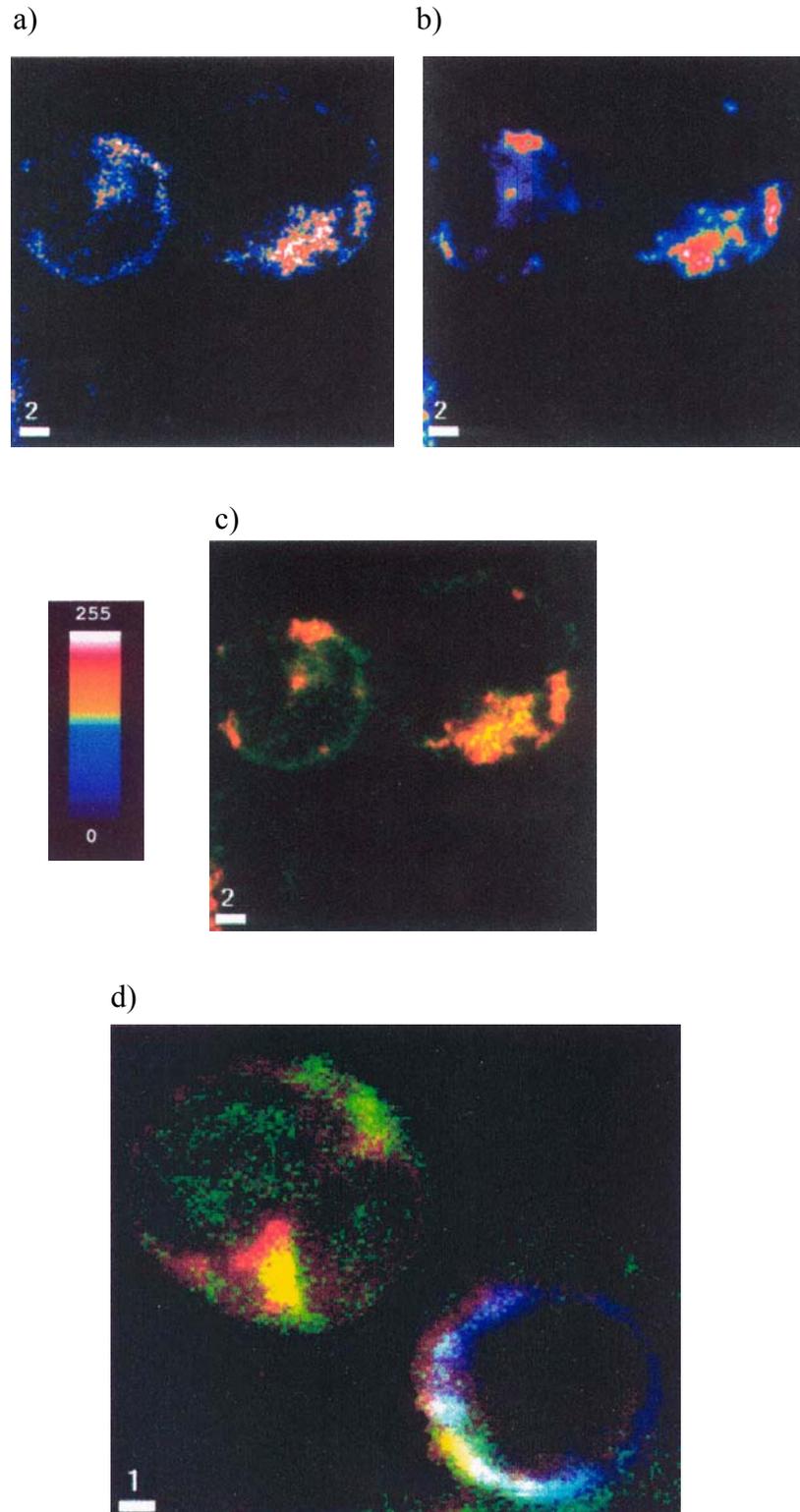
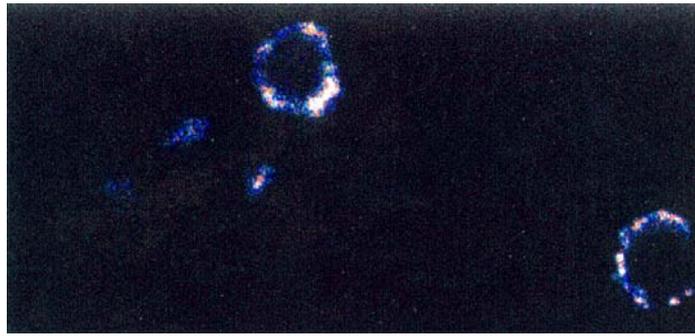
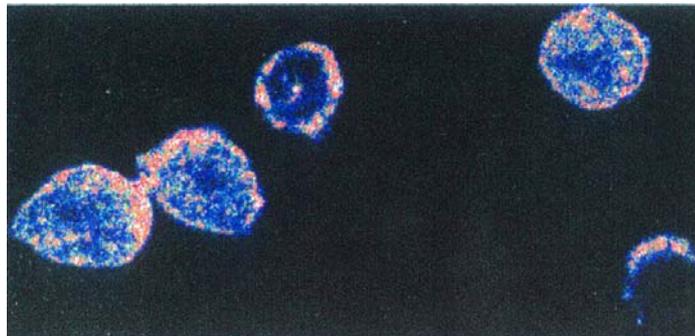
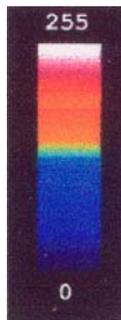


Abb. 28: Intrazelluläre Verteilung von Bcl-2 in Vorläufer-T-Zell ALL Zellen. Bcl-2 zeigte eine strenge Kolokalisation mit Mitochondrien. Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben einer Dreifach-Färbung unterzogen und am konfokalen Laserscan Mikroskop gemessen. Die Einzelfärbungen für a) Bcl-2 und b) Mitochondrien sind in Falschfarben angegeben, die die Intensität der Färbung anzeigen, wobei blau die geringste, weiß die höchste Intensität angibt (siehe Farbbalken). c) Überlagerung von a) und b) mit rot=Mitochondrien, grün=Bcl-2, gelb=Kolokalisation. d) Die intrazelluläre Verteilung von Bcl-2 ändert sich nicht bei Induktion von Apoptose. Bcl-2 (grün) und Mitochondrien (rot) zeigen eine Kolokalisation (gelb) in lebenden (linke Zelle im Bild) sowie in apoptotischen Zellen (blau, Annexin-V-Färbung) (rechts im Bild).

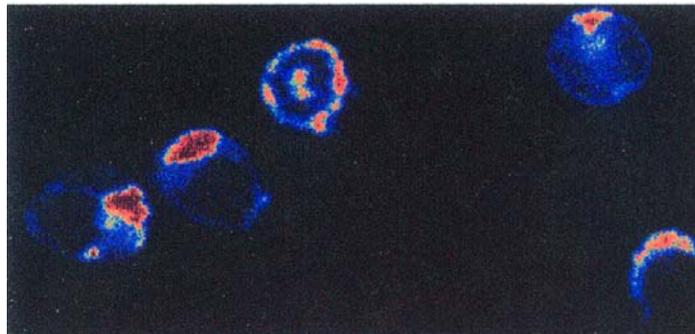
a) Annexin-V



b) Bax



c) Mitochondrien



d) Bax + Mitochondrien

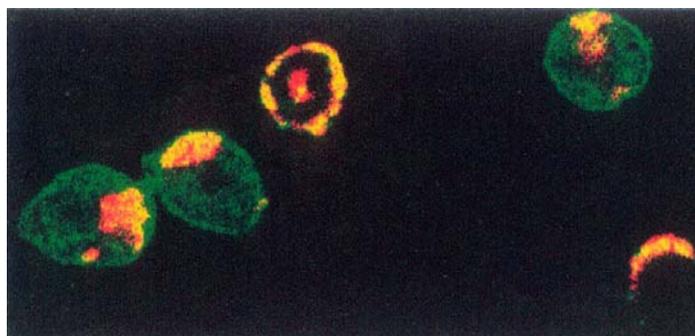


Abb. 29: Intrazelluläre Lokalisation von Bax in Vorläufer-T-Zell ALL Zellen. Die Zellen wurden einer Dreifach-Färbung unterzogen (siehe Methoden). Die Färbung von Bax weist eine punktierte Struktur auf und ist in lebenden Zellen über das gesamte Zytoplasma verteilt. Annexin-V-positive apoptotische Zellen zeigen eine strenge Kolokalisation von Bax mit den Mitochondrien. a)-c) sind in Falschfarben gezeigt, die die Intensität der Färbung anzeigen (siehe Farbbalken). d) Überlagerung von b) und c) mit rot=Mitochondrien, grün=Bax, gelb=Kolokalisation. Konfokale Laserscan Mikroskopie.

4. Korrelation des *in vitro* Ansprechens auf Apoptoseinduktion und Zytokine mit dem Immunphänotyp der Vorläufer-T-Zell ALL

Die Expression von CD-Markern ist von prognostischer Relevanz für das Therapieansprechen in Vorläufer-T-Zell ALL. Verschiedene Studien zeigen, dass vor allem der CD1a-positive kortikale Phänotyp im Vergleich zu anderen immunologischen Subgruppen *in vivo* ein signifikant besseres Ansprechen aufweist [154, 168, 169]. Es sollte daher untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der *in vitro* Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Chemotherapeutika und Zytokinen und dem Immunphänotyp der Vorläufer-T-Zell ALL besteht. Die Vorläufer-T-Zell ALL Proben wurden nach der Expression einzelner reifungsabhängiger CD-Marker unterteilt und die Untergruppen hinsichtlich ihrer *in vitro* Sensitivität verglichen. Die wichtigsten Marker für die Immunphänotypisierung kortikaler und reifer Vorläufer-T-Zell ALL nach der EGIL-Klassifikation sind CD1a und CD3 [15]. Unreife Vorläufer-T-Zell ALL können anhand von CD34 und der aberranten Expression der myeloiden Marker CD13 und CD33 charakterisiert werden.

Von acht untersuchten T-Zelllinien wiesen sechs einen kortikalen CD1a positiven Phänotyp auf. Zwei Zelllinien zeigten einen reifen Phänotyp mit positiver Expression von CD3 und Negativität für CD1a (Tab. 9). Es konnten keine Korrelationen zwischen der Sensitivität gegenüber Dexamethason- oder Doxorubicin-induzierter Apoptose und dem Immunphänotyp in leukämischen T-Zelllinien gefunden werden.

Tab. 9: Expression von Reifungs-abhängigen CD-Markern in Vorläufer-T-Zell ALL Zelllinien. Angegeben sind die Anteile positiver Zellen pro Probe in Prozent.

	Jurkat	KE-37	PF-382	MOLT-3	P12/ Ichikawa	BE13	PEER	CCRF- CEM
CD1a	96	62	99	93	53	0	0	40
CD2	26	99	67	99	7	0	0	0
sCD3	70	3	0	12	1	84	81	49
CD13	5	13	19	8	17	19	21	7
CD33	1	3	0	10	3	15	33	2
CD34	28	0	13	0	0	0	0	0

Im Gegensatz dazu zeigte sich in Vorläufer-T-Zell ALL Proben ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Doxorubicin- und der Dexamethason-induzierten Apoptose mit der Expressionsstärke von CD1a (Tab. 10). Zusätzlich korrelierte die Sensitivität zu Dexamethason im Unterschied zu Doxorubicin positiv mit der Expression von Oberflächen-CD3 und negativ mit der Expression der frühen Marker CD34 und CD13 (Tab. 10). Die Sensitivität zu Doxorubicin aber nicht Dexamethason korrelierte mit der Expression von CD2.

Tab. 10: In vitro-Sensitivität zu Dexamethason- und Doxorubicin-induzierter Apoptose in Abhängigkeit zur Expression von CD-Reifungsmarkern in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL (Bivariat Analyse, Spearman Regression). ^aSpearman Korrelationskoeffizient; ^bProzent positiver Zellen pro Probe; ^cin MESF ($\times 10^{-3}$). Signifikante Werte ($p < 0,05$) erscheinen fett.

Bivariat Korrelation CD-Marker Expression ^b	Dexamethason-induzierte Apoptose			Doxorubicin-induzierte Apoptose		
	r_s^a	p-Wert	n	r_s^a	p-Wert	n
CD1a	0,3	0,006	81	0,4	0,000	81
CD2	0,19	0,089	81	0,26	0,02	81
surfaceCD3	0,26	0,018	81	0,08	0,455	81
CD13	-0,27	0,014	81	-0,08	0,471	81
CD33	-0,16	0,149	81	-0,08	0,479	81
CD34	-0,23	0,04	81	-0,25	0,025	81

Zusätzlich zur Einteilung der Vorläufer-T-Zell ALL nach der Expression einzelner CD-Reifungsmarker wurde eine Gruppierung der Proben nach der EGIL-Klassifikation vorgenommen (siehe Methodenteil). Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Untergruppen hinsichtlich der *in vitro* Sensitivität zu Doxorubicin und Dexamethason (Abb. 30).

So wiesen kortikale Vorläufer-T-Zell ALL eine höhere Sensitivität gegenüber Doxorubicin-induzierter Apoptose auf als unreife pro-/prä-T-ALL ($p=0,02$) und reife T-ALL ($p=0,02$) (Mittelwerte der spezifischen Apoptose \pm SEM [%]: $48 \pm 5\%$ vs $27 \pm 7\%$ vs $26 \pm 7\%$).

Pro-/prä-T-ALL und reife T-ALL unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Sensitivität zu Doxorubicin-induzierter Apoptose ($p=0,92$).

Hinsichtlich der Dexamethason-induzierten Apoptose zeigten kortikale T-ALL ähnlich wie für die Doxorubicin-induzierte Apoptose, eine höhere Sensitivität verglichen mit unreifen pro-/prä-T-ALL (Mittelwerte der spezifischen Apoptose \pm SEM [%]: $45 \pm 5\%$ vs $22 \pm 6\%$; $p=0,002$). Reife T-ALL zeigten eine mittlere spezifische Apoptoserate von $34 \pm 8\%$ durch Dexamethason und unterschieden sich nicht signifikant von unreifen pro-/prä- ($p=0,23$) oder kortikalen T-ALL ($p=0,25$).

Zwischen der Sensitivität gegenüber IL-7 und dem Immunphänotyp konnten ebenfalls Zusammenhänge gefunden werden. Die Sensitivität zu IL-7 korrelierte positiv mit der Expression von CD1a ($p < 0,05$, $n=120$; Abb. 31a), Oberflächen (s)CD3 ($p < 0,05$), CD8 ($p < 0,01$) und CD4/CD8 Koexpression ($p < 0,05$) in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL.

Eine starke negative Korrelation bestand zwischen der IL-7 Sensitivität und der Expression von CD34 ($p < 0,0001$; Abb. 31b). Blasten mit aberranter Expression des myeloiden Markers CD33 zeigten sich meistens insensitiv zu IL-7 ($p < 0,01$; Abb. 31c).

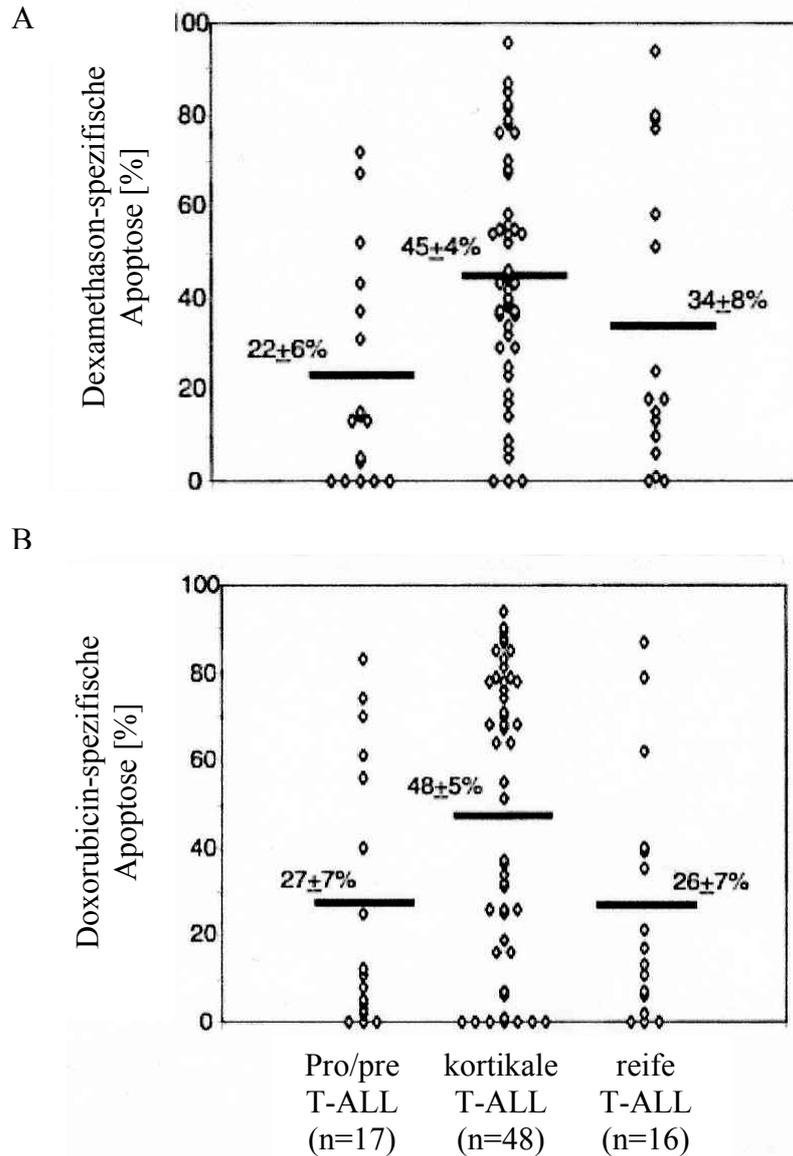


Abb. 30: In vitro-Sensitivität zu Doxorubicin- und Dexamethason-induzierter Apoptose in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL Subtypen. Leukämische Proben wurden mit Doxorubicin oder Dexamethason behandelt und die Apoptose durchflußzytometrisch unter Verwendung von Annexin-V-FITC/Propidiumjodid bestimmt. Vorläufer-T-Zell ALL Subtypen wurden nach den EGIL Kriterien als pro/pre-T-ALL (CD1a und sCD3 negativ), kortikale T-ALL (CD1a positiv) und reife T-ALL (CD1a negativ, sCD3 positiv) definiert. Signifikante Unterschiede wurden gefunden für pro/pre versus kortikale T-ALL ($p=0,002$ für Doxorubicin; $p=0,02$ für Dexamethason) und kortikale versus reife T-ALL ($p=0,02$ für Doxorubicin).

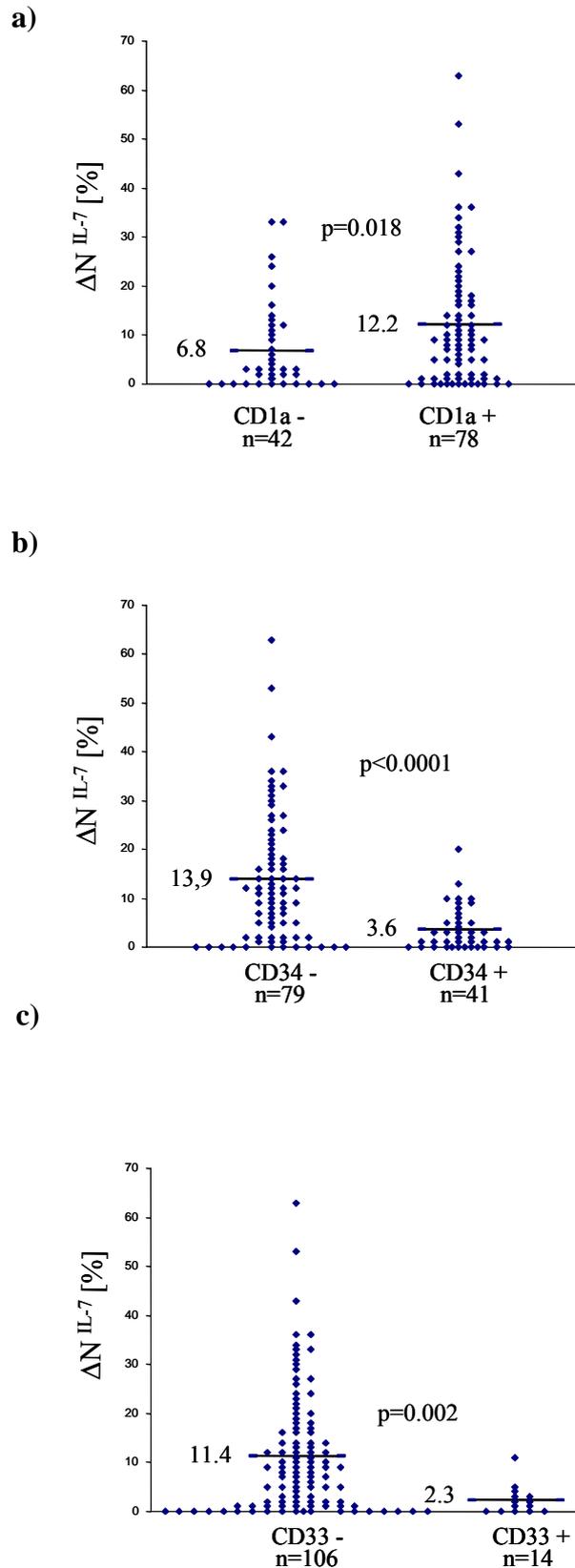


Abb. 31: Korrelation zwischen der Sensitivität zu IL-7 hinsichtlich Inhibition spontaner Apoptose und der Expression von Oberflächenmarkern in Vorläufer-T-Zell ALL. Die CD-Marker-Positivität wurde nach dem 20% "cut-off"-Kriterium beurteilt, nach dem die Probe als positiv bewertet wird, wenn >20% der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle ein positives Fluoreszenzsignal für das Antigen zeigen.

Es wurde darüber hinaus auch die Abhängigkeit der Expression des IL-7- α -Rezeptors vom Immunphänotyp der Vorläufer-T-Zell ALL Zellen in 33 Proben untersucht. Dabei zeigte sich eine höhere Expression des Rezeptors in Vorläufer-T-Zell ALL Proben mit positiver Expression der Marker CD1a, CD4, CD8 und CD3, sowie in Proben, die negativ für die Marker CD34 und CD33 waren, wobei Vorläufer-T-Zell ALL mit einem kortikalen Phänotyp die höchste und pro/pre-T-ALL die geringste Expression des Rezeptors zeigten (Mittelwerte in MESFx10⁻³: 1.1 \pm 0.3 vs 1.7 \pm 0.2 vs 1.4 \pm 0.6 für 8, 17 und 8 pro-/prä-, kortikale und reife T-ALL). Die beobachteten Unterschieden waren allerdings nicht von statistischer Signifikanz ($p > 0.05$). Vorläufer-T-Zell ALL Proben mit geringer spontaner Apoptoserate ($\Delta N^{\text{spont}} < 5\%$) ließen sich nicht einem bestimmten Phänotyp zuordnen (n=4 pro-/prä-T-ALL, 3 kortikale T-ALL, 2 reife T-ALL).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Inhibition der spontanen Apoptose durch IL-7 mit der Expression von CD1a und sCD3 und mit der *in vitro* Sensitivität gegenüber Dexamethason korreliert. Ebenso korrelierte die Sensitivität gegenüber Dexamethason mit der Expression von CD1a und sCD3.

Es sollte daraufhin geklärt werden, ob die beobachtete Korrelation zwischen der *in vitro* Sensitivität zu IL-7 und Dexamethason in Vorläufer-T-Zell ALL unabhängig vom immunologischen Phänotyp besteht. Dazu wurde die Abhängigkeit zwischen der Sensitivität zu IL-7 und Dexamethason innerhalb von CD1a⁺/sCD3⁺ und CD1a⁻/sCD3⁻ Vorläufer-T-Zell ALL untersucht. Innerhalb dieser beiden Untergruppen blieb der Zusammenhang zwischen IL-7 und Dexamethason bestehen (r_S -Werte zwischen 0,31 und 0,44; $p < 0,05$).

5. Korrelation des *in vitro* Ansprechens auf Apoptoseinduktion und Zytokine mit dem Therapieansprechen *in vivo*

Ein schlechtes *in vivo* Ansprechen auf die Initialtherapie, das definiert wird durch >1000 Blasten/ μ l im peripheren Blut am Tag 8, hat sich in den ALL-BFM Studien als ein starker prognostischer Parameter herausgestellt [2, 157, 158]. Ein weiteres Kriterium für das Therapieansprechen stellt die Ermittlung der Blastenzahl im Knochenmark am Tag 15 der Therapie dar. Der prognostische Wert der *in vitro* beobachteten Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Dexamethason und Doxorubicin sowie einer Apoptose-Inhibition durch IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL sollte durch mögliche Korrelationen mit dem *in vivo* Ansprechen auf die Chemotherapie ermittelt werden.

Die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse zur Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Dexamethason und Doxorubicin wurden mit dem *in vivo* Therapieansprechen am Tag 8 verglichen. Es lagen klinische Daten für 63 Vorläufer-T-Zell ALL Proben vor. Diese Proben

zeigten eine ähnliche Verteilung der Reifungs-Subtypen wie die 81 Proben, in denen die *in vitro* Sensitivität zu Chemotherapeutika gemessen wurde (13 pro-/prä-, 38 kortikale, 12 reife T-ALL). Von den 63 Proben zeigten 36 ein gutes Ansprechen auf die Initialtherapie. Diese Proben zeigten *in vitro* eine höhere Sensitivität gegenüber Dexamethason und Doxorubicin als Proben mit schlechtem Therapieansprechen. Die Mittelwerte der spezifischen Apoptose \pm SEM in Prozent betragen 43 \pm 4 versus 34 \pm 6 für Dexamethason und 49 \pm 5 versus 34 \pm 6 für Doxorubicin. Die beobachteten Unterschiede waren nur für Doxorubicin annähernd signifikant ($p=0,052$). Für Dexamethason konnte eine statistische Signifikanz erreicht werden, wenn für die Sensitivität zur Apoptose-Induktion ein Schwellenwert von 10 % gesetzt wurde. Dabei stellte sich heraus, daß Vorläufer-T-Zell ALL mit > 10 % spezifischer Apoptose-Induktion durch Dexamethason signifikant häufiger ein gutes Ansprechen auf die Initialtherapie zeigen (32 von 49 sensitiven Proben) als Vorläufer-T-Zell ALL mit geringerer *in vitro* Sensitivität (4 von 14 nicht-sensitiven Proben) (Fischer-Exakt-Test: $p=0,03$).

Für eine Korrelation der *in vitro* Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Dexamethason mit dem Blastenanteil am Tag 15 der Therapie *in vivo* lagen Daten für 51 Vorläufer-T-Zell ALL vor. Es konnte eine signifikante Korrelation mit der *in vitro* Sensitivität auf Dexamethason beobachtet werden ($r_s=-0,46$, $p=0,001$) (Abb. 32). Dagegen bestand kein signifikanter Zusammenhang mit der Sensitivität gegenüber Doxorubicin (nicht gezeigt).

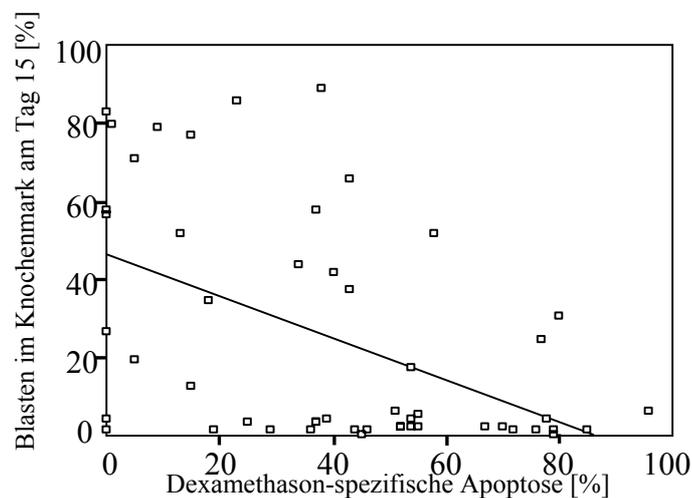


Abb. 32: Die Dexamethason-induzierte Apoptose korreliert invers mit der Blastenzahl im Knochenmark am Tag 15 der Initialtherapie in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL. Primäre Vorläufer-T-Zell ALL Proben wurden 24 h mit 2 μ M Dexamethason inkubiert und die Apoptose durchflußzytometrisch bestimmt. (Spearman-Regression: $r_s=-0,46$, $p=0,001$, $n=51$).

Innerhalb der Vorläufer-T-Zell ALL, die *in vitro* spontane Apoptose zeigten, konnte eine negative Korrelation der Sensitivität zu IL-7 mit der frühen Zytoreduktion durch die Therapie

in vivo, sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils von Blasten am Tag 8 im peripheren Blut ($r_s=-0,28$, $p=0,01$, $n=82$) als auch bezüglich des Anteils an Blasten am Tag 15 im Knochenmark ($r_s=-0,27$, $p=0,04$, $n=59$), beobachtet werden (Abb. 33).

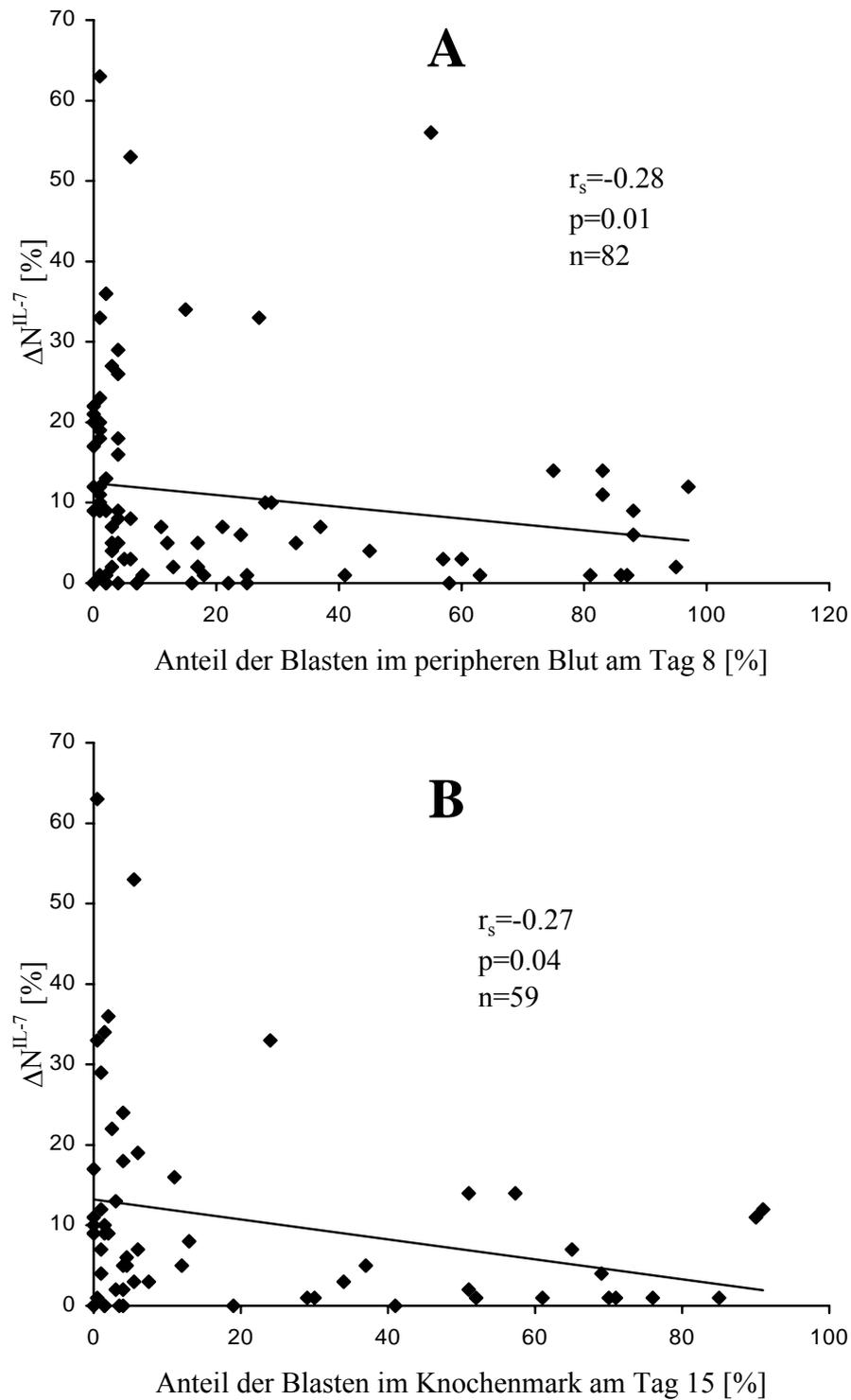


Abb. 33: Korrelation der IL-7-spezifischen Apoptose-Inhibition (ΔN^{IL-7}) mit dem prozentualen Anteil an leukämischen Blasten im peripheren Blut am Tag 8 (A) und im Knochenmark am Tag 15 (B). Die Anzahl der Blasten korrelierte invers mit dem Ausmaß der Apoptose-Inhibition.

Auffallend war, daß die Gruppe der Vorläufer-T-Zell ALL, die *in vitro* keine spontane Apoptose zeigten, einen höheren prozentualen Anteil an Blasten im peripheren Blut am Tag 8 der Therapie aufwiesen als Vorläufer-T-Zell ALL mit spontaner Apoptose-Induktion (Mittelwerte in %: 33 ± 15 vs 22 ± 3). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant, da nur für 5 Proben ohne spontaner Apoptose-Induktion klinische Daten vorlagen. Innerhalb der Vorläufer-T-Zell ALL mit spontaner Apoptose-Induktion bestand keine Korrelation mit dem prozentualen Anteil an Blasten am Tag 8. Bezüglich der Blastenzahl, die am Tag 15 der Therapie bestimmt wird, konnte eine tendenzielle negative Korrelation mit dem Ausmaß der spontanen Apoptose beobachtet werden ($r_s = -0.24$, $p = 0.076$; $n = 59$).

Die in Vorläufer-T-Zell ALL ($n = 45$) gemessenen konstitutiven Expressionsstärken der Proteine Bcl-2 und Bax wiesen keine signifikante Korrelation mit den Blastenanteilen am Tag 8 oder Tag 15 auf. Allerdings zeigten Vorläufer-T-Zell ALL mit höherer Expression von Bcl-2 tendenziell einen höheren Anteil an Blasten am Tag 8 und am Tag 15 (Mittelwert: $r_s = 0,20$ und $p = 0,17$).