

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität gegenüber der Apoptose-Induktion durch Chemotherapeutika in immunphänotypisch definierten Vorläufer-T-Zell ALL Subtypen sowie in leukämischen T-Zelllinien *in vitro* untersucht. Die leukämischen Zellen wurden hinsichtlich verschiedener Apoptose-relevanter Merkmale, wie die Expression von Bcl-2, Bax und CD95 sowie die *in vitro* Sensitivität gegenüber spontaner und CD95-vermittelter Apoptose weiter charakterisiert. Weiterhin wurde untersucht, ob das Ansprechen auf Zytokine, die in der normalen Hämatopoese das Wachstum und Überleben von hämatopoetischen Zellen regulieren, eine Rolle in der Apoptose-Regulation und der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika spielen.

6. Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion in Vorläufer-T-Zell ALL: Kortikale Vorläufer-T-Zell ALL stellen den sensitivsten Subtyp gegenüber der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose dar

Immunphänotypisch definierte Vorläufer-T-Zell ALL Untergruppen unterscheiden sich in ihrem Ansprechen auf die Chemotherapie. Die *in vitro* Inkubation der Vorläufer-T-Zell ALL Zellen mit Dexamethason und Doxorubicin führte zur Induktion unterschiedlicher Apoptoseraten. Bei der Unterteilung der Vorläufer-T-Zell ALL hinsichtlich einzelner CD-Marker sowie der immunphänotypischen Gruppierung nach den EGIL-Richtlinien zeigte sich, dass kortikale CD1a positive Vorläufer-T-Zell ALL, die eine prognostisch günstigere Gruppe darstellen [168-170], eine höhere *in vitro* Sensitivität sowohl gegenüber Dexamethason- als auch Doxorubicin-induzierter Apoptose aufweisen, als pro-/prä- oder reife T-ALL. Die beobachteten reifungsabhängigen Unterschiede spiegeln wahrscheinlich eine allgemein höhere Sensitivität gegenüber der Induktion von Chemotherapeutika-induzierten Apoptose in der prognostisch günstigen Gruppe der kortikalen T-ALL wider. Klinische Studien deuten darauf hin, dass kortikale T-ALL bezüglich ihrer höheren Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion normalen kortikalen Thymozyten ähneln [169].

Die *in vitro*-Sensitivität gegenüber Doxorubicin in Vorläufer-T-Zell ALL korrelierte mit der Expression von CD2, von dem gezeigt wurde, daß es in kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL eine prognostische Signifikanz besitzt [169, 171]. Im Gegensatz dazu konnte der Expression von CD2 in der POG (Pediatric Oncology Group)-Studie keine prognostische Relevanz für kindliche Vorläufer-T-Zell ALL zugeschrieben werden [170]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine positive Korrelation zwischen der Expression von CD2 und CD1a beobachtet

werden, so daß die höhere *in vitro*-Sensitivität gegenüber einer Chemotherapeutika-induzierten Apoptose in CD2 positiven Vorläufer-T-Zell ALL wahrscheinlich zum Teil durch die höhere *in vitro*-Sensitivität von CD1a positiven Vorläufer-T-Zell ALL erklärt werden könnte. Eine CD2-abhängige Apoptose-Induktion in CD2 positiven Vorläufer-T-Zell ALL kann jedoch nicht ausgeschlossen werden [169, 171]. Tatsächlich konnte CD2-Molekülen eine Mediatorfunktion in der Übermittlung pro-apoptotischer Signale in aktivierten T- und NK-Zellen zugeschrieben werden [172, 173]. Eine weitere Untersuchung dieser Funktion von CD2 für die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose nicht nur in Vorläufer-T-Zell ALL, sondern auch in anderen leukämischen Subtypen wie z.B. dem FAB M4Eo-Subtyp akuter myeloischer Leukämien mit der Inversion inv(16), die häufig CD2 exprimieren [153, 174], wäre interessant.

Im Gegensatz zu der Beobachtung, daß die Dexamethason-induzierte Apoptose positiv mit der Expression von CD3 korreliert, konnte bzgl. Doxorubicin keine Korrelation mit der CD3-Expression beobachtet werden. Reife CD1a-/CD3+- Vorläufer-T-Zell ALL zeigten sich sehr sensitiv gegenüber Dexamethason, wohingegen reife T-ALL im Vergleich zu kortikalen weniger sensitiv gegenüber Doxorubicin reagierten. Die beobachteten Unterschiede in der *in vitro* Sensitivität reifer, sCD3 („surface“-CD3) positiver Vorläufer-T-Zell ALL hinsichtlich einer Apoptose-Induktion durch Dexamethason und Doxorubicin stehen im Einklang mit Beobachtungen *in vivo*. So konnte in der POG Studie gezeigt werden, daß reife T-ALL ein schlechteres Therapieansprechen aufweisen, als andere Subtypen [170].

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit könnte man annehmen, daß reife T-ALL Zellen vor allem resistent gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Anthrazykline sind und dies zu der schlechten Prognose innerhalb dieses Vorläufer-T-Zell ALL Subtyps beiträgt. Interessant wäre die Untersuchung weiterer Chemotherapeutika im Hinblick auf ihre Apoptose-induzierende Wirkung in Vorläufer-T-Zell ALL, um herauszufinden welche Agenzien spezifisch auf reifungsabhängige Untergruppen wirken.

7. Expression und Funktionalität Apoptose-relevanter Regulationsfaktoren in Vorläufer-T-Zell ALL

7.1 Der CD95 Signalweg ist nicht bedeutsam für die spontane oder die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL

Die Sensitivität gegenüber spontaner Apoptose sowie Apoptose-Induktion durch Dexamethason oder Doxorubicin *in vitro* zeigte keine signifikante Korrelation mit der

konstitutiven Expressionsstärke von CD95 in Vorläufer-T-Zell ALL. Ebenso korrelierte die Sensitivität gegenüber der CD95-induzierten Apoptose nicht mit der Sensitivität gegenüber Dexamethason und Doxorubicin. Dies spricht gegen eine Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Doxorubicin von einer Aktivierung des CD95-Signalweges in Vorläufer-T-Zell ALL. Obwohl in einigen Studien eine Beteiligung des CD95-Signalweges in der Doxorubicin-induzierten Apoptose postuliert wird [92-95], sprechen andere Arbeiten gegen eine Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber Doxorubicin vom CD95-induzierten Signalweg. So konnte in leukämischen Zelllinien die durch Doxorubicin induzierte Apoptose nicht durch die Blockierung des CD95-Signalweges inhibiert werden [99, 100]. Vergleichende Experimente an CD95-Wildtyp und CD95-resistenten parental Zelllinien zeigten, dass die Doxorubicin-induzierte Apoptose unabhängig von CD95 erfolgt [99]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Chemotherapeutika Apoptose und eine Aktivierung von Caspase-8/FLICE induzieren und dass dafür keine CD95-Rezeptor/Ligand Interaktion notwendig ist [101]. Die meisten der aufgeführten Experimente wurden an Zelllinien verschiedener Herkunft durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine größere Anzahl von frischem Zellmaterial mit Vorläufer-T-Zell ALL untersucht. Die erbrachten Ergebnisse zusammen mit früheren Beobachtungen, die gezeigt haben, dass die konstitutive Expressionsstärke von CD95 keinen Schluß auf das Therapieansprechen von Vorläufer-T-Zell ALL *in vivo* zuläßt [175, 176], deutet darauf hin, dass eine Fehlregulation des CD95-Rezeptor/-Ligand-Systems wahrscheinlich keine relevante Ursache für die Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika in Vorläufer-T-Zell ALL darstellt.

7.2 Differenzielle Beteiligung von Bcl-2 und Bax in der spontanen und Chemotherapeutika-induzierten Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL

Die Sensitivität gegenüber spontaner Apoptose sowie Apoptose-Induktion durch Dexamethason oder Doxorubicin *in vitro* zeigten keine signifikanten Korrelationen mit den konstitutiven Expressionsstärken von Bcl-2 und Bax in Vorläufer-T-Zell ALL. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse unserer vorangegangenen Studien, in denen eine relativ große Anzahl von Patientenproben mit ALL (n=95) [30] und AML (n=100) [166] untersucht wurden, in denen keine Korrelationen zwischen der Bcl-2 Expressionsstärke und dem Ausmaß an spontaner Apoptose bestanden.

Umfangreiche Untersuchungen an ALL, in denen gezeigt wurde, daß die *in vitro* Resistenz der Zellen zu Dexamethason [167, 177] nicht mit der Expression von Bcl-2 korreliert, bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Auch mit der Sensitivität gegenüber verschiedenen anderen zytotoxischen Substanzen besteht keine Korrelation [177].

Die *in vitro* an Vorläufer-T-Zell ALL erbrachten Ergebnisse zeigen Parallelen zu den Beobachtungen *in vivo*. So lassen die konstitutiven Expressionsstärken von Bcl-2 keinen Schluß auf das Therapieansprechen von Vorläufer-T-Zell ALL *in vivo* zu [175, 176].

Auch die Untersuchungen zu Expressionsveränderungen der Proteine Bcl-2 oder Bax haben keine Korrelation dieser Parameter mit der Sensitivität gegenüber Dexamethason oder Doxorubicin in Vorläufer-T-Zell ALL zeigen können.

Im Gegensatz zu der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose konnte während der Induktion spontaner Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL eine Hochregulation der Expression von Bax im Zuge der spontanen Apoptose beobachtet werden. Bcl-2 zeigte keine Expressionsänderungen während der Induktion spontaner Apoptose. Diese Ergebnisse deuten auf eine differenzielle Beteiligung von Bcl-2 und Bax in der Regulation der Apoptose hin.

7.3 Intrazelluläre Lokalisationsänderungen Apoptose-relevanter Regulationsfaktoren während der *in vitro* Induktion von Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL

Mit Hilfe der konfokalen Laserscan Mikroskopie konnte in Vorläufer-T-Zell ALL Zellen gezeigt werden, dass Bcl-2 vor allem mit den Mitochondrien assoziiert ist, wohingegen Bax zum Teil mit den Mitochondrien assoziiert, daneben jedoch auch stark im Zytosol vertreten ist. Bei Induktion von Apoptose wurde eine Lokalisationsänderung von intrazellulärem Bax beobachtet, das verstärkt zu den Mitochondrien hin verschoben wurde. Die Lokalisation von Bcl-2 änderte sich dagegen nicht.

Die intrazelluläre Lokalisation von Bcl-2 auf Mitochondrien und die zytosolische Verteilung von Bax wurde unter Verwendung derselben Methode bereits in transfizierten Nierenepithelzellen der Linie Cos-7 und Fibroblasten der Linie L929 beobachtet [55]. Mit Hilfe von Zellfraktionierungsexperimenten sowie durch konfokale Laserscan- 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 [49, 53-56] [48]. Bax liegt hauptsächlich cytosolisch vor [49, 53].

Kürzlich wurde postuliert, dass eine Translokation von Bax zur äußeren Mitochondrien-Membran hin eine Schlüsselrolle in der Induktion von Apoptose spielt [57]. In Maus-Thymozyten konnte während der Apoptoseinduktion durch Dexamethason oder γ -Bestrahlung eine Verschiebung von Bax vom Zytosol zu den Membranen hin beobachtet werden, wohingegen Bcl-2 keine Lokalisationsänderungen erfuhr [53]. Der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose in B-CLL Zellen gehen Konformationsänderungen von Bax voraus, die

eine Integration von Bax in die Mitochondrien-Membran zur Folge haben [178]. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit wurden in diesen Zellen keine Expressionsveränderungen im Zuge der Apoptose-Induktion beobachtet.

Die hier im Zuge der Apoptose-Induktion beobachteten Lokalisationsänderungen von Bax deuten darauf hin, daß Lokalisationsänderungen von Bcl-2-verwandten Proteinen eine wichtige Rolle für die Induktion von Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL spielen könnten. Die in Vorläufer-T-Zell ALL im Zuge der Apoptose induzierte verstärkte Bindung von Bax an die Mitochondrien könnte zu einer Erhöhung des Verhältnisses von pro- zu anti-apoptotischen Proteinen auf der Mitochondrien-Membran und zu einer Destabilisierung des Membran-Potentials führen. Als Folge könnte es zu einer Öffnung der PT-Poren und damit zu einer Freisetzung von Cytochrom-C kommen, das zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 die Aktivierung von Caspasen initiiert [52], die schließlich zu den Apoptose-assoziierten morphologischen Veränderungen der Zelle führen [58]. Um eindeutige Aussagen über die Bedeutung der intrazellulären Proteinlokalisationsänderungen für die Induktion von Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL treffen zu können, muß jedoch eine höhere, statistisch repräsentative Anzahl der Vorläufer-T-Zell ALL Proben untersucht werden.

8. IL-7 als antiapoptotischer Überlebensfaktor in Vorläufer-T-Zell ALL

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Sensitivität von kindlichen Vorläufer-T-Zell ALL auf Zytokine hinsichtlich einer Modulation der Apoptose untersucht. Wie bereits mehrfach für leukämische Zellen beschrieben [30, 164-167] führte die *in vitro* Kultivierung von Vorläufer-T-Zell ALL Zellen zur Induktion von spontaner Apoptose in den meisten der untersuchten Proben. Dabei erwies sich das Zytokin IL-7, im Gegensatz zu IL-4 und IL-2, als ein wirkungsvoller Inhibitor der spontanen Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL Blasten.

Die Wirkung von IL-7 äußerte sich in Vorläufer-T-Zell ALL vor allem durch die Inhibition von Apoptose, während das Zytokin auf die Proliferation nur in wenigen Proben einen signifikanten Effekt zeigte. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen in isolierten pro-T-Zellen, in denen IL-7 inhibierend auf die *in vitro* induzierte spontane Apoptose wirkte, jedoch keinen Einfluß auf die Zellzyklusverteilung der Zellen hatte [148]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, daß IL-7 eher als Überlebensfaktor („trophischer Faktor“) wirkt als als Wachstumsfaktor. Die Beobachtung, daß Vorläufer-T-Zell ALL Proben mit einer höheren Sensitivität zu IL-7 auch eine stärkere spontane Apoptose *in vitro* zeigen spricht für die Wirkung von IL-7 als antiapoptotischer Faktor, da die spontane Apoptose als Folge eines Entzuges von Überlebensfaktoren angesehen wird. Verschiedene Faktoren, die das Wachstum und Überleben von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen gewährleisten, werden von

Stromazellen im Knochenmark gebildet. In Experimenten an humanen B-Lymphoblasten konnte gezeigt werden, dass das Überleben dieser Zellen von der Präsenz von Stromazellen aus dem Knochenmark abhängig ist und eine Kokultivierung zu einer Inhibition der *in vitro* Apoptose führt [131].

Es ist bekannt, daß Zytokine nicht nur anti- sondern auch pro-apoptotische Effekte ausüben können [128]. Die beobachtete pro-apoptotische Wirkung von IL-4 und IL-2 in einigen Vorläufer-T-Zell ALL Proben steht im Einklang mit Beobachtungen an aktivierten T-Zellen und Thymozyten, in denen diese beiden Zytokine, aber nicht IL-7, Apoptose-induzierend wirkten [179-181]. Aber auch in leukämischen Blasten (B-ALL) wurden pro-apoptotische Effekte durch IL-4 beobachtet [182, 183].

IL-7 konnte in Vorläufer-T-Zell ALL auch die durch Dexamethason und Doxorubicin *in vitro* induzierte Apoptose beeinflussen. In Zelllinien wurden pro- und anti-apoptotische Effekte von IL-7 auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose beobachtet [184]. In Vorläufer-T-Zell ALL wirkte IL-7 ausschließlich inhibierend sowohl auf die Dexamethason- als auch die Doxorubicin-induzierte Apoptose. Die Wirkung von IL-7 als Überlebensfaktor konnte in unserer Arbeit auch an der leukämischen T-Zelllinie KE-37 gezeigt werden, bei der die durch Dexamethason induzierte Apoptose, aber nicht der induzierte Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus inhibiert werden konnte [185].

Die Suppression der Zytokinen-Expression, die das Wachstum und Überleben von Zellen beeinflussen, stellt einen Mechanismus der durch Glukokortikosteroide induzierten Apoptose in hämatologischen Zellen dar [114]. Man könnte sich daher vorstellen, dass der IL-7- und der Dexamethason-induzierte Signalweg auf der Ebene der durch Wachstumsfaktoren induzierten Regulationsmechanismen miteinander gekoppelt ist. Diese Vermutung wird durch die beobachtete Korrelation zwischen der *in vitro* induzierten Apoptose durch Dexamethason mit der IL-7-vermittelten Inhibition der spontanen Apoptose sowie der Inhibition der Dexamethason-induzierten Apoptose durch IL-7 bekräftigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Rolle von IL-7 als Überlebensfaktor in Vorläufer-T-Zell ALL hin. Um die genauere Funktion von IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL beurteilen zu können, sollten weitere Untersuchungen unternommen werden, wie z.B. die Bestimmung des IL-7-Spiegels im Serum von Vorläufer-T-Zell ALL Patienten oder die Blockierung von IL-7 durch Antikörper während der *in vitro* Kultivierung von Vorläufer-T-Zell ALL Blasten mit autologem Serum oder Stromazellen, die neben verschiedenen Faktoren auch IL-7 synthetisieren.

8.1 Kortikale Vorläufer-T-Zell ALL stellen den sensitivsten Subtyp gegenüber der Apoptose-Inhibition durch IL-7 dar

Die Sensitivität zu spontaner Apoptose-Induktion korrelierte mit einem reiferen Immunphänotyp, der sich durch die Expression von CD1a sowie einer fehlenden Expression von CD34 und CD33 auszeichnet.

Vorläufer-T-Zell ALL Proben mit einem unreifen Phänotyp, charakterisiert durch die Expression von CD34 und CD33, zeigten sich relativ insensitive gegenüber IL-7. Eine Sensitivität der Vorläufer-T-Zell ALL gegenüber IL-7 ging vor allem mit einer Expression kortikaler und reifer CD-Marker einher (CD1a, CD3, CD8). Die Sensitivität gegenüber spontaner Apoptose sowie die Sensitivität gegenüber IL-7 korrelieren somit mit den gleichen immunologischen Reifungsstadien. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalwege, die zur Induktion von spontaner Apoptose sowie zur Apoptose-Inhibition durch IL-7 führen, miteinander gekoppelt sind. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, dass IL-7 die spontane Apoptose in Vorläufer-T-Zell ALL inhibieren kann und die spontane Apoptoserate mit dem Ausmaß der Inhibition durch IL-7 korreliert.

Die Rolle von IL-7 als antiapoptotischer Faktor im Vergleich zu IL-2 und IL-4 in Vorläufer-T-Zell ALL ähnelt der Bedeutung dieses Zytokins in der normalen T-Zell-Entwicklung. In der normalen Hämatopoese hängt die Sensitivität von Progenitorzellen gegenüber Zytokin-induzierter Signalwege, die die Proliferation und das Überleben der Zellen regulieren, von der Linienzugehörigkeit sowie vom Differenzierungsstadium der Zellen ab. [28, 128, 129]. Während der Thymozyten-Entwicklung zeigen unreife pro-T-Zellen eine selektive Sensitivität gegenüber IL-7, während sie gegenüber IL-2 und IL-4 nicht empfindlich sind [186]. Im Laufe der Reifung verlieren die Zellen im kortikalen, doppelt positiven CD4+/CD8+-Differenzierungsstadium zunächst die Sensitivität zu Zytokinen [187]. Nach der positiven und negativen Selektion erlangen die reifen, einfach-positiven (CD4+/CD8- oder CD4-/CD8+) Thymozyten die Sensitivität gegenüber IL-7 wieder und werden außerdem auch sensitiv gegenüber IL-2 und IL-4 [28]. Die in dieser Arbeit bei den meisten der Vorläufer-T-Zell ALL beobachtete selektive Sensitivität gegenüber IL-7 bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber IL-2 und IL-4 spiegelt demnach die Sensitivität gegenüber Zytokinen von unreifen pro-T-Zellen wider.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß IL-7 eine Rolle im Differenzierungs- und Reifungsprozeß in Vorläufer-T-Zell ALL spielen könnte. Da man davon ausgeht, daß leukämische Zellen von entarteten pluripotenten Stammzellen oder linienspezifischen Progenitorzellen abstammen [188-190], könnte man annehmen, daß IL-7-resistente Vorläufer-T-Zell ALL aus relativ unreifen pluripotenten Progenitorzellen entstehen, während IL-7-sensitive Vorläufer-T-Zell ALL von weiter differenzierten Progenitoren herrühren, die bereits

der lymphatischen Zellreihe zugeordnet sind. Die Expression der α -Kette des IL-7-Rezeptors zeigte im Gegensatz dazu nur eine tendenzielle, nicht signifikante Korrelation mit dem Immunphänotyp und kann daher für die Korrelation zwischen der IL-7-Sensitivität und dem Phänotyp der Vorläufer-T-Zell ALL nicht verantwortlich gemacht werden. Die beobachtete hohe Variabilität der IL-7-Sensitivität in Vorläufer-T-Zell ALL Proben mit ähnlich starker Expression des IL-7-Rezeptors deutet auf eine komplexe Regulation von Signaltransduktionswegen in leukämischen Blasten hin. Obwohl die molekularen Mechanismen der Regulation von zytokinabhängigen Signalwegen und deren Einfluß auf die spontane Apoptose nicht genau bekannt sind, konnten frühe Ereignisse in der durch den IL-7-Rezeptor getriggerten Signaltransduktionskaskade in humanen fötalen Thymozyten und in Vorläufer-T-Zell ALL Blasten mit einer funktionellen Tyrosin-spezifischen Proteinkinase und einer Stimulation des Inositol-Phospholipid Umsatzes in Zusammenhang gebracht werden [191, 192]. Als Folge können zahlreiche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, wie z.B. Stat5 und c-myc [140, 193]. Defekte in diesen Signalwegen, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, könnten die unterschiedliche Sensitivität von Vorläufer-T-Zell ALL Proben zu IL-7 begründen.

8.2 Die durch IL-7 hervorgerufene Apoptose-Inhibition korreliert mit der IL-7-Rezeptor Expression und einer Expressionserhöhung von Bcl-2

Das Ausmaß der IL-7-vermittelten Inhibition der spontanen Apoptose korrelierte mit der Expressionsstärke des IL-7- α -Rezeptors. Dagegen bestanden keine Korrelation mit der den Rezeptoren für IL-2, IL-4 und IL-7 gemeinsamen γ -Kette. Dies spiegelt offensichtlich die vorrangige Bedeutung der α -Kette in der Regulation der Zytokin-spezifischen zellulären Antwort wider.

Die *in vitro* induzierte Inhibition der spontanen Apoptose durch IL-7 zeigte sich, ebenso wie die spontane Apoptose, unabhängig von der konstitutiven intrazellulären Expressionsstärke von Bcl-2 und Bax. Obwohl die Signalwege, die der Zytokin-vermittelten Apoptose-Inhibition zugrunde liegen noch nicht genau bekannt sind, wird vermutet, dass Proteine der Bcl-2-Familie in der Regulation dieses Prozesses involviert sind. Dafür sprechen z.B. Studien an Wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinien, in denen eine Überexpression von Bcl-2 eine durch Zytokin-Entzug induzierte Apoptose verhindert, wohingegen eine Überexpression von Bax die Apoptose verstärkt [194-196]. In leukämischen Blasten (AML, B-ALL, CLL) konnte eine Korrelation zwischen der konstitutiven Expression von Bcl-2 und Bax mit dem Ausmaß der spontanen Apoptose beobachtet werden [119, 165, 182, 197, 198]. Im Gegensatz dazu

zeigen unsere eigenen relativ umfangreichen Studien an n=95 ALL [30] und n=100 AML [166] jedoch keine Korrelationen zwischen der spontanen Apoptoserate und der konstitutiven Expression von Bcl-2.

Expressionsänderungen scheinen eine bedeutendere Rolle für die Apoptose-regulierende Funktion von Bcl-2-Familie Proteinen zu spielen als konstitutive Expressionsniveaus [87]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Vorläufer-T-Zell ALL die spontane Apoptoserate mit einer Erhöhung der Bax-Expression korrelierte. Dagegen ergaben sich keine Korrelationen mit der Expression von Bcl-2. Im Gegensatz dazu korrelierte die IL-7-vermittelte Inhibition der spontanen Apoptose mit einer Hochregulation von Bcl-2, während Bax keine signifikanten Änderungen zeigte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien an pro-T-Zellen, in denen eine Apoptose-assoziierte Hochregulation von Bax beobachtet wurde, die durch IL-7 inhibiert werden konnte [148]. Ebenso wie in Vorläufer-T-Zell ALL, konnte eine Korrelation zwischen einer Erhöhung der Bcl-2 Expression und einer IL-7-induzierten Apoptose-Inhibition auch in normalen murinen pro-T-Zellen, malignen T-Lymphoma Zellen und humanen aktivierten T-Lymphozyten beobachtet werden [148, 149, 199-201]. Allerdings erfolgte in den humanen aktivierten T-Lymphozyten und den murinen malignen T-Lymphomzellen keine Änderung der Bax-Expression [199, 201].

Obwohl in einigen Zellsystemen gezeigt wurde, dass das Verhältnis von anti- zu pro-apoptotischen Molekülen Apoptose-abhängige Ereignisse besser voraussagen können als einzelne Moleküle [202-204], erbrachte das Verhältnis Bcl-2/Bax im Vergleich zu Bcl-2 in Vorläufer-T-Zell ALL keine bessere Korrelation mit der Apoptose-Modulation. Die Ergebnisse deuten auf eine differenzielle Beteiligung von Bcl-2 und Bax in der Regulation der spontanen Apoptose und der Apoptosemodulation durch IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL hin.

Die Ergebnisse an Vorläufer-T-Zell ALL weisen darauf hin, daß die spontane Apoptose sowie die inhibitorische Wirkung von IL-7 in ähnlicher Weise über Bcl-2-verwandte Proteine reguliert werden wie in normalen T-Zellen. Die spezifische Bcl-2-abhängige Rolle von IL-7 als ein anti-apoptotisch wirkender Faktor ist auch in der normalen T-Zell-Entwicklung von großer Bedeutung. Mäuse, denen die Gene für IL-7 und IL-7-Rezeptor fehlen, zeigen im Gegensatz zu IL-2- und IL-4-defizienten Mäusen erhebliche Störungen in der Thymozyten-Entwicklung [144, 145]. Da auch Bcl-2-defiziente Mäuse Entwicklungsstörungen der lymphatischen Zellen aufweisen [205], und eine Bcl-2 Überexpression in IL-7-defizienten Mäusen die Reifung von Thymozyten weitgehend wiederherstellen kann [149], wurde vermutet, dass IL-7 seine anti-apoptotische Wirkung durch eine Hochregulation oder Beibehaltung eines bestimmten Bcl-2 Expressionsniveaus in pro-T-Zellen ausübt [206].

Obwohl die Sensitivität zu Dexamethason nicht von der konstitutiven Expression von Bcl-2 und Bax abhängt, scheint die Dexamethason-induzierte Apoptose durch eine IL-7-vermittelte

Expressionserhöhung von Bcl-2 inhibiert zu werden. Vorläufer-T-Zell ALL, in denen IL-7 die Dexamethason-induzierte Apoptose inhibieren konnte, zeigten im Mittel eine signifikant stärkere Erhöhung von Bcl-2 durch die Behandlung mit Dexamethason und IL-7 als Vorläufer-T-Zell ALL, in denen IL-7 keinen Effekt hatte. Das bedeutet, dass die IL-7-induzierte Inhibition der Dexamethason-induzierten Apoptose durch eine Hochregulation von Bcl-2 in Vorläufer-T-Zell ALL -Zellen erklärt werden könnte. Bax dagegen scheint in der IL-7-vermittelten Modulation der Dexamethason-induzierten Apoptose, ähnlich wie in der Modulation der spontanen Apoptose durch IL-7, keine Rolle zu spielen, da keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsänderung von Bax zwischen IL-7-sensitiven und IL-7-insensitiven beobachtet werden konnten. Ähnliches konnte auch in aktivierten primären humanen T-Lymphozyten beobachtet werden, in denen die Inhibition der Dexamethason-induzierten Apoptose durch IL-7 von einer Hochregulation von Bcl-2 begleitet wurde, wohingegen Bax keine Änderungen erfuhr [207]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass IL-7 die gleichen Signalwege für die Apoptose-Inhibition aktiviert, wie sie schon bei der Inhibition der spontanen Apoptose beobachtet wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalwege, die durch Dexamethason und IL-7 induziert werden, durch gemeinsame „down-stream“-Effektoren, wahrscheinlich auf der Ebene der Bcl-2-Familie Proteine, reguliert werden.

Alternativ können noch andere intrazelluläre Moleküle als gemeinsame Effektoren in der Signaltransduktion von IL-7 und Dexamethason angenommen werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF-kappaB einen Überlebensfaktor in verschiedenen Zellsystemen darstellt und in kindlichen ALL Zellen konstitutiv aktiviert ist [208, 209]. Interaktionen zwischen NF-kappaB und dem Glucocorticoid-Rezeptor auf der Ebene der transkriptionellen Regulation konnten bereits in verschiedenen Systemen nachgewiesen werden [210-212]. In normalen Vorläufer T-Zellen konnte gezeigt werden, daß Interaktionen zwischen dem durch IL-7 induzierten Signalweg und der Aktivierung von NF-kappaB möglich sind [213-215]. Es wurden auch direkte Interaktionen zwischen dem Glucocorticoid-Rezeptor und den Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie beobachtet [216, 217]. Da die Signaltransduktion von IL-7 mit dem JAK/STAT Signalweg gekoppelt ist [218, 219], stellen die Proteine der STAT-Familie mögliche Zielfaktoren für die pro-apoptotische Wirkung von Glukokortikosteroiden in Vorläufer-T-Zell ALL dar.

Obwohl IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL auch auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose inhibierend wirkt, spricht die beobachtete fehlende Korrelation zwischen der Sensitivität gegenüber IL-7 und Doxorubicin sowie zwischen der Doxorubicin- und der Dexamethason-induzierten Apoptose für eine weitgehend differenzielle Regulation dieser beiden Signalwege in Vorläufer-T-Zell ALL.

9. Prognostische Bedeutung der *in vitro* Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und IL-7 für das klinische Ansprechen *in vivo*

9.1 Die *in vitro* Sensitivität gegenüber Dexamethason korreliert mit dem frühen *in vivo* Ansprechen auf die Chemotherapie

Die *in vitro* Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion durch Dexamethason und Doxorubicin sollte mit dem frühen *in vivo* Ansprechen auf die Chemotherapie korreliert werden, das anhand der Blastenzahl im peripheren Blut am Tag 8 sowie der Blastenzahl im Knochenmark am Tag 15 bewertet wird.

Die *in vitro* induzierte Apoptose durch Dexamethason korrelierte signifikant mit dem frühen Ansprechen auf die Chemotherapie bezüglich der Blastenzahl im Knochenmark am Tag 15. Dies spricht für eine klinische Relevanz der *in vitro* Sensitivität zu Dexamethason. Es konnte jedoch keine starke Korrelation mit der Blastenzahl im peripheren Blut am Tag 8 beobachtet werden. Eine Erklärung für diese kontroversen Beobachtungen könnten zeitabhängige Unterschiede in der Zytoreduktion im Knochenmark und im peripheren Blut darstellen.

Die *in vitro* Sensitivität zu Doxorubicin in Vorläufer-T-Zell ALL korrelierte nur schwach mit der *in vivo* Zytoreduktion während der Initialtherapie. Dies könnte darauf hindeuten, dass die *in vitro* Sensitivität gegenüber Anthrazyklinen eher eine allgemeine Sensitivität als eine Chemotherapeutika-spezifische Sensitivität leukämischer Zellen gegenüber einer Chemotherapie *in vivo* widerspiegelt. Der Einsatz eines größeren Spektrums von chemotherapeutischen Substanzen könnte die klinische Relevanz der *in vitro* Untersuchungen zur Apoptose verbessern.

In Studien, in denen eine Vielzahl von zytotoxischen Substanzen getestet wurden, konnte mit Hilfe der MTT („Methyl-Thiazol-Tetrazolium“-)Methode gezeigt werden, dass die *in vitro* Chemosensitivität einen wertvollen prognostischen Marker für das Therapieansprechen in kindlichen ALL darstellt [220, 221]. Dabei wurde eine positive Korrelation zwischen dem *in vitro* und *in vivo* Ansprechen auf Prednison in kindlichen ALL beobachtet [220]. Es wurde gezeigt, daß innerhalb der ALL die Gruppe der Vorläufer-T-Zell ALL generell resistenter zu den meisten zytotoxischen Substanzen wie z.B. Glukokortikosteroide und Anthrazykline ist als common und prä-B-ALL [3, 222, 223]. Untersuchungen zu Subtypen-spezifischen Unterschieden innerhalb der Gruppe der Vorläufer-T-Zell ALL gab es bisher jedoch nicht. Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Annexin-V-Färbung erzielten Ergebnisse zur Apoptose brachten wertvolle Informationen zu Reifungs-abhängigen Unterschieden bezüglich der Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion von leukämischen Zellen innerhalb der Vorläufer-T-Zell ALL. Dabei ergaben sich signifikante

Korrelationen zwischen den *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen. Die in dieser Arbeit angewendete Methode erwies sich damit als wertvoll für die Untersuchung der *in vitro* Chemosensitivität in akuten Leukämien. Die weitere Beobachtung der in dieser Arbeit einbezogenen Patienten wird zeigen, ob die untersuchten Apoptose-Parameter dazu beitragen werden, den Therapieausgang von Vorläufer-T-Zell ALL vorherzusagen.

9.2 Die *in vitro* Sensitivität gegenüber IL-7 stellt einen unabhängigen Parameter zur Erkennung von Vorläufer-T-Zell ALL Subtypen mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion dar

Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Sensitivität zu IL-7 und dem klinischen Ansprechen gefunden werden, in der Art, daß Vorläufer-T-Zell ALL mit höherer *in vitro* Sensitivität zu IL-7 *in vivo* eine bessere Blastenreduktion durch die Behandlung mit Prednison erfahren. In der statistischen Multivariat-Analyse, bei der alle in dieser Arbeit gefundenen Apoptose-relevanten Parameter berücksichtigt wurden, wie spontane Apoptoserate, Modulation der Apoptose durch IL-7 und Expression von Bcl-2 und Bax, zeigte sich, daß nur die Sensitivität zu IL-7 einen unabhängigen Zusammenhang mit der frühen Zytoreduktion aufweist ($p < 0,05$) und daher einen potentiellen prognostischen Wert in Vorläufer-T-Zell ALL besitzt. Aufgrund dieser Ergebnisse, kann man folgern, daß die Unterteilung der Vorläufer-T-Zell ALL nach ihrer *in vitro* Sensitivität zu IL-7 auch eine prognostische Signifikanz hat.

Obwohl das Ausmaß der spontanen Apoptose signifikant mit der Sensitivität zu IL-7 in Vorläufer-T-Zell ALL korrelierte, konnte kein Zusammenhang zwischen der spontanen Apoptose und der frühen *in vivo* Blastenreduktion beobachtet werden. Dies steht im Einklang zu Studien an pädiatrischen ALL, in denen keine Korrelation zwischen der spontanen Apoptose und dem Ansprechen auf Initialtherapie gefunden wurde [4]. In AML dagegen wurde der prognostische Wert der spontanen Apoptose mehrfach gezeigt [166, 224]. Die *in vitro* beobachtete Induktion von spontaner Apoptose könnte durch den Entzug von Faktoren erklärt werden, die die Zellen *in vivo* vor Apoptose schützen. Ein Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Glukokortikosteroide besteht in der Suppression von Transkriptionsfaktoren, die Gene regulieren, die für das Wachstum und Überleben von Zielzellen verantwortlich sind [114, 225]. Eine Behandlung mit Prednison *in vivo* könnte in einer allgemeinen Herunterregulation der Expression von Zytokinen und leukämischen Überlebensfaktoren in der stromalen Mikroumgebung resultieren. In Faktor-abhängigen leukämischen Zellen könnte dies zu einer Apoptose-Induktion durch Entzug von Überlebensfaktoren führen und eine Erklärung für die beobachtete Korrelation zwischen dem IL-7-Effekt *in vitro* und dem frühen Therapieansprechen *in vivo* sein. Die Apoptose-Induktion durch die Herunterregulation von

Überlebensfaktoren würde somit einen anti-leukämischen Mechanismus darstellen, der zusätzlich zu den bekannten direkten Effekten der Apoptose-Induktion durch Glukokortikosteroide und andere Chemotherapeutika in den Zielzellen erfolgt [226, 227].

Die Ergebnisse zur Korrelation zwischen der IL-7-Sensitivität und einem reiferen, kortikalen Immunphänotyp zusammen mit der beobachteten Korrelation zwischen der *in vitro* Sensitivität zu IL-7 mit dem Ansprechen auf Chemotherapeutika *in vivo* deuten darauf hin, daß die Fähigkeit von leukämischen Blasten, auf IL-7 im Sinne einer Apoptosemodulation zu reagieren, als ein *in vitro* Parameter zur Erkennung verschiedener Entwicklungsstadien von Vorläufer-T-Zell ALL, die sich in der Zugänglichkeit ihrer apoptotischen Programme unterscheiden, herangezogen werden kann.